


財団法人日中医学協会
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005年3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 梨井 康 

所属機関名： 国立成育医療センター研究所

所属部署： 移植・外科研究部 職名： 室長
〒157-8535

所在地： 東京都世田谷区大蔵2-10-1

電話： 03-3146-181 内線： 4421

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

幹細胞システムを用いた神経幹細胞の分化・同定・分離および再生医療への応用方法の確立

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究は神経幹細胞分離・分化誘導システムを用いて、脊髄損傷の機能修復およびリソソーム蓄積病脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善を明らかにした。移植・再生医療における新しい技術として期待できる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 梨井 康 職名： 室長

所属機関： 国立成育医療センター研究所 部署： 移植・外科研究部

中国側研究者氏名： 陳 乃宏 職名： 教授

所属機関： 中国医学科学院 部署： 薬物研究所

-日中医学協会助成事業-

幹細胞システムを用いた神経幹細胞の分化・同定・分離および 再生医療への応用方法の確立

研究者氏名	梨井 康
所属機関	国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 室長
共同研究者氏名	陳 乃宏
所属機関	中国医学科学院・協和医科大学 薬物研究所 教授

要 旨

従来、損傷を受けた成体の中枢神経系は、ニューロン自身に分裂能がないために機能再生は不可能であることと考えられた。しかし、最近の研究成果から神経幹細胞成体脳内存在することが分かり、また、胚性幹細胞の中枢神経系を構成する細胞への分化することが明らかになり、様々の神経疾患の再生医療研究が積極的に進められている。神経幹細胞は増殖し継代を繰り返すことができるという自己複製能力と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する細胞を作り出すことができる多分化能を有する。本研究は再生医学研究分野に最も進んでいる神経幹細胞分離・分化誘導システムの構築および移植の実施によって、(1) ラット脊椎損傷動物モデルでの脊髄損傷の機能修復；(2) ムコ多糖症 VII 型リソソーム蓄積病マウスモデルに対する脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善；(3) ヒト胎児脳幹細胞に存在するガングリオシドの誘導分化作用効果等を明らかにした。これら幹細胞を用いる再生医学の研究成果は臨床応用へ向けた技術基盤の確立に大きく寄与すると思われる。また、移植・再生医療における新しい技術として期待できる。

Key Words

再生医学、神経幹細胞、脊髄損傷、ムコ多糖症 VII 型リソソーム蓄積病、細胞移植

結 言

従来、損傷を受けた成体の中枢神経系は、ニューロン自身に分裂能がないために機能再生は不可能であることと考えられた。しかし、最近の研究成果から神経幹細胞成体脳内存在するこ

とが分かり、また、胚性幹細胞の中樞神経系を構成する細胞への分化することが明らかになり、様々の神経疾患の再生医療研究が積極的に進められている。神経幹細胞は増殖し継代を繰り返すことができるという自己複製能力と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中樞神経系を構成する細胞を作り出すことができる多分化能を有する。本研究は再生医学研究分野に最も進んでいる神経幹細胞分離・分化誘導システムの構築を確実出来た上、ラットの脊髄損傷動物モデルを樹立し、このモデルを用いて、In vitro で胎児幹細胞から分化・誘導した神経前駆細胞、あるいは神経細胞などを移植することによってニューロンの新生と、その損傷治癒効果について検討する。それにより脊髄損傷のみでなく、さまざまな神経変性疾患の機能修復を目指した再生療法の基盤的技術が確立できると考えられる。一方、ムコ多糖症 VII 型（以下 MPSVII と略す）はリソソーム蓄積病の一つで、リソソームの酵素である β -glucuronidase の活性が欠如している。MPSVII は、全身のリソソーム内に β -glucuronidase の基質であるグリコサミノグリカンが蓄積し、骨の発達異常・肝脾腫・精神発達遅滞をきたす。これまで MPSVII のマウスモデルに対し、酵素補充療法・ウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法などが行われている。今回我々は、神経幹細胞を MPSVII マウスの新生児期に移植することにより、中樞神経においても同様にクロスコレクションを介した生化学的・組織学的改善が認められるか検討を行い、同疾患に対する神経幹細胞移植の有効性を考察した。移植後マウスに対する脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善を明らかにした。

対象と方法

1. 脊椎損傷動物モデル：

1) 脊椎損傷動物モデルの樹立：自作の器具で圧迫法により脊髄損傷を引き起こし、同時に損傷及び回復の測定器具を開発した。

2) 胎児脳幹細胞分離培養・分化システムの構築：妊娠 14 日目のラットから胎児を取り出し、測脳室壁から神経幹細胞を分離した。上皮増殖因子の存在下で、neurosphere 法で培養した。さらに、神経幹細胞への遺伝子導入について検討を行った。

3) 脊椎損傷動物モデルを用いた胎児脳幹細胞移植の効果の検討：In vivo 局所移植後損傷ラットの全身症状、中樞神経系症状及び病理組織上の改善を検討した。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。

2. ムコ多糖症 VII 型マウスモデル：

1) MPSVII マウスの皮膚の線維芽細胞である 3521 細胞を 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用したメディウムのみを、もう一方にはメディウムと 1mM のマンノース 6 リン酸を加えた。

24 時間後の β -glucuronidase 活性（以下 GUSB 活性）を比較した。

2) C3H マウスの神経細胞を 65°C1 時間湯浴させることにより、内因性の GUSB 活性を不活化させ、MPSVII マウスの神経細胞の代用とした。これも①と同様に 2 群に分け、クロスコレクションを介し細胞外から取り込まれた GUSB 活性の比較を行った。

3) GFP トランスジェニックマウスの受精後 14 日目の胎児の脳から神経幹細胞を選択的に培養した。MPSVII マウスの新生児の側脳室に、神経幹細胞を移植し、生後 3 週時の GUSB 活性を測定するとともに、組織所見の比較検討を行った。

4) 海馬機能の評価として Novel object test を用いて、MPS 非治療群、治療群、コントロール群三群に分け検討を行った。装置は 65 x 65 x 27 cm の open field (black) で、全てプラスチック製の黄色のものを使用 (Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:1723-1728 を modify した)。

結 果：

1. 脊椎損傷動物モデル：

ラットを用いて、自作の器具で圧迫法により脊髄損傷を引き起こし、脊椎損傷動物モデルを樹立したと同時に損傷及び回復の測定器具を開発し、その測定方法を確立した。妊娠 14 日目のラットから胎児を取り出し、測脳室壁から神経幹細胞を分離した。上皮増殖因子の存在下で、neurosphere 法で培養し、胎児脳幹細胞分離培養・分化システムを構築した。また、神経幹細胞は増殖し、継代を繰り返すことができるという自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトといった中枢神経系を構成する細胞にもなる多分化能を有していることを免疫染色法によって確認した。さらに、神経幹細胞への遺伝子導入について検討を行い、lentivirus ベクターを用いた方法が最も有効であることを明らかにした。脊椎損傷動物モデルを用いた胎児脳幹細胞移植の効果について検討したところ、In vitro での神経幹細胞のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化を免疫染色法にて確認できた。以上の結果を踏まえ、ラット胎児由来の神経幹細胞を用いて移植実験を行った。In vivo 局所移植後損傷ラットの全身症状、中枢神経系症状及び病理組織上の改善で治療の有効性を明らかにした。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。非治療群よりは有意な治療効果があることを確認できた。

2. ムコ多糖症 VII 型マウスモデル：

リソゾーム蓄積症の病態解明と新規治療法の開発に関する基礎的検討神経幹細胞は移植ドナー細胞としての適性を評価するため、先ず FACS による神経幹細胞の細胞表面マーカーの検討および、神経幹細胞の内因性のリソゾーム酵素活性の測定を行った。神経幹細胞表面には MHC class II, CD80, CD86, ICAM-1 分子の発現が認められず、MHC class I 分子も低発現であり、移植後の急性拒絶反応を起こしにくい細胞であることが明らかとなった。また、神経幹細胞は内因性リソゾーム酵素活性値が高く、中でも GUSB 活性値は 200-800 U/mg protein

と、骨髄間葉系幹細胞と比較すると10倍程度高いことが判明した。3521細胞及び、C3H神経細胞において、マンノース6リン酸を加えた群では、GUSB活性は有意に低かった。加えない群では、メディアムのGUSB活性程度までGUSB活性の上昇を認めた。さらに、GFPによりマーキングされた細胞は、移植後脳全体に広がっていることが確認された。生後3週時に移植したマウスでは、GUSB活性の著明な増加と組織所見の改善を認めた。海馬機能の改善について検討では三群ともに、A vs B, A' vs Cの探索行動時間の割合(%)は有意差がない。ただし、三群ともに、A'よりCへ探索する時間の長い傾向にある。探索時間(sec)の長さは、MPS非治療群、治療群ともに、コントロール群との有意差はみられない。非治療群で探索時間減少の傾向がみられた。次に、GFPトランスジェニックマウスの受精後14日目の胎児の脳から神経幹細胞を選択的に培養後、MPSVIIマウスの新生児の側脳室に、神経幹細胞を移植し、生後3週時のGUSB活性を測定するとともに、組織所見の比較検討を行った。さらに、海馬機能の評価としてNovel object testを用いて、MPS非治療群、治療群、コントロール群三群を分け検討を行った。1日目と3日目に5分間ずつobjectのない状態のfieldにマウスを入れて慣らす。4日目(対象物呈示1日目)に、2つの新奇な対象物(A, B)をfield内の対角隅のそれぞれ壁から15cmの所に設置し、10分間探索させる。24時間後(5日目=対象物呈示2日目)、Aをreplica(A' = familiar)に、またBを新しい物体(C = novel)に置きかえ、10分間探索させる。対象物呈示1日目および2日目の行動をビデオ記録し、10分間中の各object(A, B, A', C)への探索行動時間を計測した。Objectへの鼻もしくは前肢による接触を探索行動とみなした。

考 察:

本研究は神経幹細胞の二つの動物疾患モデルにおける再生医療への応用に向けた基礎研究を行った。神経幹細胞への遺伝子導入について遺伝子導入後の発現効率、発現期間及び細胞の毒性lentivirusベクターが神経幹細胞への遺伝子導入には有用であることを明らかにした。また、神経幹細胞は移植ドナー細胞としての適性を評価するため、FACSによる神経幹細胞の細胞表面マーカーの検討を行い、神経幹細胞表面にはMHC class II, CD80, CD86, ICAM-1分子の発現が認められず、MHC class I分子も低発現であり、移植後の急性拒絶反応を起こしにくい細胞であることが明らかとなった。上記in vitro検討の結果を踏まえて、ラット脊髄損傷モデルを用いて、In vivo局所移植後損傷ラットの全身症状、中枢神経系症状及び病理組織上の改善で治療の有効性を明らかにした。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。非治療群よりは有意な治療効果があることを確認できた。一方、ムコ多糖症VII型マウスモデルを用いた検討において、神経幹細胞は移植後の急性拒絶反応を起こしにくく、内因性のGUSB活性値も高いことから、MPSVIIの中枢神経病変に対する細胞療法のドナー細胞にふさわしい細胞であることを明らかにした。また、移植後神経幹細胞は速やかに脳全体に

広がり、少なくとも移植後 3 週間にわたり、脳の病理所見を改善させるに足る酵素量を維持できた。MPSVII マウスの中樞神経病変に対する神経幹細胞の移植療法は極めて有用である。また、新生児期 MPSVII マウスの神経幹細胞移植後、聴性脳幹反応検査において軽度ながら改善を認めた。海馬機能の評価として行った Novel object test では、未治療のマウスでは全探索行動時間自体が極端に短かったのに比し、移植後のマウスでは、全探索行動時間・探索行動様式が、正常コントロールと差が無いことが示された。さらに、ヒト中絶胎児の脳組織や初代培養神経細胞を用いて、アセチルコリンやドーパミンなどのリリース促進作用を調べたところ、アセチルコリンやドーパミンのリリース促進作用が見られなかった。

以上の研究より、脊髄損傷や神経変性疾患の機能修復を目指した再生治療法の開発の基礎研究を進め、幹細胞を用いる再生医学の研究成果を臨床応用へ向けた技術基盤確立に大きく寄与すると思われる。また、移植・再生医療における新しい技術として期待される。

参考文献：

1. Y. Kamata, A. Tanabe, A. Kanaji, M. Kosuga, Y. Fukuhara, X-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, N. Azuma, T. Okuyama. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 10(5): 406-14, 2003.
2. Kanaji M. Kosuga, X-K. Li, Y. Fukuhara, A. Tanabe, Y. Kamata, N. Azuma, M. Yamada, T. Sakamaki, Y. Toyama, T. Okuyama. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type vii by neonatal adenoviral gene transfer. *Mol Ther* 8(5):718-25, 2003.
3. H. Higashi and N. Chen. Ganglioside/protein kinase signals triggering cytoskeletal actin reorganization. *Glycoconjugate. J.* Vol,20(1), 49-58. 2004.
4. 小林庸次、奥山虎之： 特集編集「先天代謝異常症」病理と臨床 2003；22：1-102.

注：本研究の一部は2005年3月1-2日「第4回日本再生医療学会総会」にてポスター発表、「再生医療」（2005年2月 Vol.4 Suppl）に掲載

作成日：2005年3月15日