

脳内グリア細胞からの神経再生実現にむけて

山下 徹, 阿部康二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

【研究の背景】

日本を含めた先進諸国における急速な高齢化は、寝たきり患者の増加という大きな社会問題を引き起こしてきている。寝たきり患者の原因の約 40%が脳卒中であるが、パーキンソン病や多系統委縮症、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患も大幅に増加してきており、その治療法開発が強く望まれている。このことから、脳梗塞や神経変性疾患で一旦失われてしまった神経ネットワーク機能を、幹細胞移植治療や内在性神経再生機構の促進を行うことで修復する「再生療法」の確立が待ち望まれている。2006 年 8 月に京都大学山中伸弥教授らによって開発された iPS 細胞は、ほぼすべての組織に分化する“分化万能性”と無限に増殖できる“自己複製能”を併せ持つ多能性幹細胞であり、この技術を使うことで患者自身の皮膚細胞から神経系細胞を含む多様な細胞種を誘導でき、脳梗塞や神経変性疾患等で失われた神経細胞を補充する神経細胞移植治療への応用が期待されている。しかしながら iPS 細胞由来の神経系細胞を移植治療に用いる場合、未分化な iPS 細胞が残存していると腫瘍形成の可能性があるため、臨床応用する段階での課題となっている。申請者らもこれまでに脳梗塞マウスモデルを用いた iPS 細胞の安全性を評価する実験系を確立し、脳梗塞マウスに iPS 細胞を移植した場合脳梗塞を起こしていないマウスに比べて有意に高い腫瘍形成率でより大きい腫瘍を形成することを報告してきた (Kawai et al., 2010 年 J Cereb Blood Flow Metab, Yamashita et al. 2010 年 Cell Transplantation)。この腫瘍化の問題を解決する 1 つの有力な方法として現在注目されているのが、iPS 細胞を経ずに皮膚細胞から神経系細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法と呼ばれる手法である。申請者らはすでに、皮膚線維芽細胞から直接誘導した神経幹細胞株 (iNS 細胞) を脳梗塞マウスモデルに移植し、その高い治療効果と移植後 6 か月以上後でも腫瘍形成を認めない高い安全性を持つことを 2016 年に報告している (Yamashita et al. 2016 年 Cell Transplantation)。

【目 的】

そこで本研究では、マウス脳内グリア細胞から神経系細胞を直接的に誘導し、脳梗塞マウスモデルにおける治療効果および安全性を評価することを目的としている。

【方 法】

まず、マウス脳内グリア細胞からダイレクトリプログラミング法により神経系細胞の誘導を行った。生後 1-3 日マウス大脳から、トリプシン処理後に培養することで初代培養グリア細胞株を樹立し、そのグリア細胞株にレトロウイルスベクターを用いて転写因子 (Factor A, Factor B, Factor A + Factor B) をそれぞれ強制発現させ、brain derived neurotrophic factor (BDNF) 存在下で培養を行った。そしてレトロウイルス感染後 0、3、7、12 日後に 4%パラホルムアルデヒドを用いてそれぞれ細胞を固定し、神経系マーカーである抗 β 3-tubulin 抗体で免疫蛍光染色を行い、神経系細胞への誘導効率を評価した。

【結 果】

レトロウイルス感染を行わなかったコントロール群では、細胞の形態変化は起きず β 3-tubulin 陽性細胞は認めなかった。一方、Factor A, Factor B, Factor A + Factor B の 3 群ともに感染後 7 日後に一部の細胞が神経細胞様に形態変化を示し、かつ感染後 12 日目で 3.2%、2.8%、3.7%の β 3-tubulin 陽性細胞を認めた。

【考 察】

今回の検討により、Factor A + Factor B の組み合わせが最も高率に神経系細胞への誘導を起こすことが明らかになった。現在、次のステップとして脳梗塞マウスモデルマウス脳内グリア細胞に転写因子を導入し、直接的に神経系細胞を誘導する実験を行う予定とし、in vivo に使用するための高力価で精製度の高いレトロウイルスの準備を進めている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、グリア細胞は比較的容易に神経系細胞に分化誘導できることが示された。脳内グリア細胞を目的の神経系細胞に自由に誘導することができれば、細胞移植の代わりに自分の脳内の細胞を細胞リソースとして利用することができるため、培地等の脳内への持ち込みもなくなるため安全性が高い治療法となる可能性があり、その臨床的意義は大きいと言える。

【参考・引用文献】

Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K (2010) Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1487-1493.

Yamashita T, Kawai H, Tian F, Ohta Y, Abe K (2010) Tumorigenic development of induced pluripotent stem cells in ischemic mouse brain. *Cell Transplant* 20: 883-891.

Yamashita T, Abe K (2014) Direct reprogrammed neuronal cells as a novel resource for cell transplantation therapy. *Cell Transplant* 23: 435-439.

Yamashita T, Liu W, Matsumura Y, Miyagi R, Zhai Y, Kusaki M, Hishikawa N, Ohta Y, Kim SM, Kwak TH, Han DW, Abe K (2016) Novel Therapeutic Transplantation of Induced Neural Stem Cells for Stroke. *Cell Transplant* 26: 461-467.