

成体マウス脳内への神経幹細胞の移植について

村松 大¹, 能智禄弥², 佐藤祐樹², 久恒辰博²

Transplantation of neural stem cells into adult mouse brain

Dai MURAMATSU¹, Rokuya NOCHI², Yuki SATO², Tatsuhiko HISATSUNE²

緒言

「成体哺乳類の中樞神経は一度損傷すれば、二度と再生させる事は出来ない。この絶対真理を変えることが可能であるとするなら、それは将来の科学である。」これは19世紀の偉大なる神経解剖学者 Santiago Ramon y Cajal の言葉である¹⁾。近年の脳科学研究はこれに応えるかの如く進展目覚しく、中樞神経系の再生に関する報告も数多く見られるようになってきた。例えば、ヒトを含めた霊長類では、記憶を司る海馬という領域に神経幹細胞が存在し、新たにニューロンを生み出す事が明らかになっている²⁾。海馬に存在する神経幹細胞は、その数が一生を通して保たれており、学習行動による刺激を受ける事で新たなニューロンを生み出すと考えられている^{3,4)}。嚙歯類では、海馬の他に側脳室下帯という領域に神経幹細胞が存在し、新たなニューロンを生み出している。生み出されたニューロンは Rostral Migratory Stream (RMS) という経路を介して、嗅覚を司る嗅球に移動する⁵⁾。これらの新生ニューロンは、脳梗塞など虚血症状をきたした脳内においては、嗅球ではなく線条体へ移動することが確認されている⁶⁾。線条体は運動機能を司る領域であり、脳梗塞により障害を受けた線条体に、これらの新生ニューロンが移動することで、運動機能の回復に寄与しているものと考えられている。認知、創

造、判断といった高次機能を司る大脳皮質では、通常、ニューロンの再生は見られないが、脳虚血後に神経前駆細胞から、新たなニューロンが生み出されるという報告がなされている^{7,8)}。しかし、この様な内在性神経幹細胞や神経前駆細胞によるニューロンの再生は神経変性疾患に見られる大規模なニューロンの脱落を補うレベルでは無く、その為、神経変性疾患に対しては移植による外部からのニューロンの補填が現実的な治療方法であると考えられている。

これまで細胞移植に関しては、ドナー不足や免疫拒絶、脳死患者や中絶胎児からの臓器移植に伴う倫理的問題など、様々な問題を抱えていた。しかし近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の登場や骨髄における間葉系幹細胞の研究から、これらの問題に対する解決の糸口が見出されたことにより、移植研究はかつてない盛り上がりを見せている⁹⁾。既に、ラットパーキンソン病モデルやマウス脊椎損傷モデルにおいて、病変部位への iPS 細胞の移植により、有意な治療効果が示されている^{10,11)}。また、脊椎損傷患者への胚性幹細胞 (ES 細胞) の移植に関わる臨床試験が開始されるなど、移植による中樞神経系の再生医療は現実的なものとなりつつある。今後、パーキンソン病やアルツハイマー病、脳梗塞といった様々な疾患に対する移植研究が行われると考えられるが、これにはまだ多くの問題が残されている。すなわち、幹細胞移植による治療を行う場合、どの領域に、どのタイプのニューロンを移植すれば良いのか、移植されたニューロンはどのように既存の神経組織

1 代替試験法研究部細胞発がん研究室

2 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学研究室

とネットワークを構築するのかなど、解明すべき問題は多い。また、移植に最適な細胞の分化段階を把握することも重要である。細胞を未分化の分化段階で移植した場合には、生着率は高いがニューロンへの分化効率が低く、さらに増殖能が高い為に細胞塊を形成してしまう可能性がある¹²⁾。一方、ニューロンに分化した状態で移植した場合には、生着することなく死滅してしまう¹³⁾。

このような背景から、様々な神経疾患に対する治療法の検討や移植細胞の品質管理の為に、移植細胞の性状を簡便に評価できる試験系が将来求められると考えられる。そこで本稿では、細胞接着分子インテグリン $\alpha 5$ を指標にした、細胞の移植に適した時期の選定と、それに基づく成体マウス脳内へのニューロンの移植に関する技術を紹介する¹⁴⁾。この方法は、神経幹細胞がニューロンへ分化する際に、インテグリン $\alpha 5$ の発現が減少する事を指標とするものである¹⁵⁾。神経幹細胞がニューロンへ分化する時期を把握するのに有効であり、ニューロンへ分化する直前の神経幹細胞を移植することにより、脳組織において速やかに分化することが可能となった。この方法により、これまでニューロンの再生が難しいとされた成体大脳皮質をはじめ、様々な領域で細胞移植によるニューロンの再生が可能となった。また、移植されたニューロンは短期間で神経回路網を構築することから、移植後の脳組織での移植細胞の詳細な挙動について簡便に解析できるのではないかと考えられる。

1. インテグリン $\alpha 5$ を指標にした細胞移植に適した時期の選定

材料と方法

細胞

p53 ノックアウトマウス胎生期 14 日の大脳基底核より樹立された神経幹細胞株¹⁶⁾を用いて実験を行った。神経幹細胞の増殖用培地は、Dulbecco's modified Eagle medium/F12 nutrient mixture 1:1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) に 1.2 g/L 炭酸水素ナトリウム, 100 U/mL ペニシリン (萬有製薬, 東京), 100 μ g/mL ストレプトマイシン (明治製菓, 東京), 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies) を加え, さらに塩基性繊維芽細胞成長因子 (Life Technologies) を 10 ng/

mL になるように添加し, pH7.2 に調整した培地を使用した。レトロウイルスベクターの感染およびニューロンへの分化誘導の際には, ウシ胎児血清, 塩基性繊維芽細胞成長因子の代わりに N2 サプリメント (Life Technologies) を加えた無血清培地を使用した。なお, 培養ディッシュは, 15 μ g/mL ポリ-L-オルニチン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) により 2 時間以上コーティングした後, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により 2 回洗浄後, 1 μ g/mL フィブロネクチン (Life Technologies) により 2 時間以上コーティングしたものを使用した。

レトロウイルスベクターの産生

神経幹細胞のニューロンへの分化誘導とラベルを行うため, レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行った。実験には, ニューロン分化に関わる転写因子である Neurogenin 1 (Ngn 1) と Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を発現する pMY-Ngn1-IRES-EGFP レトロウイルスベクター, 対照として EGFP のみを発現する pMY-IRES-EGFP レトロウイルスベクターを用いた (タカラバイオ, 滋賀)。レトロウイルスベクターの産生は ϕ 100 mm の培養皿に GP2-293 パッケージング細胞 (タカラバイオ) を播種し, 細胞密度が 80% に達した時期に, Transfast transfection reagent (Promega, Madison, WI) を用い, ベクタープラスミド (pMY-Ngn1-IRES-EGFP もしくは pMY-IRES-EGFP) と水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ蛋白質を発現する pVSV-G プラスミド (タカラバイオ) を遺伝子導入した。32°C, CO₂ 5.0% で 48 時間培養後, 産生されたレトロウイルスを含む培地を回収し, 孔径 0.45 μ m のセルロース混合エステルタイプのメンブレンフィルター (アドバンテック, 東京) によりろ過し, 6,000 g, 4°C で 18 時間遠心した。遠心後, 沈殿したレトロウイルスを PBS で溶解し -80°C にて保存した。

遺伝子導入

4 穴チャンバースライドに神経幹細胞を 1.5 \times 10⁴ 個/mL となるように播種し, 翌日, pMY-Ngn1-IRES-EGFP および pMY-IRES-EGFP レトロウイルスベクターを添加した。

フローサイトメトリーによる インテグリン $\alpha 5$ の発現解析

レトロウイルスベクター添加後 1-4 日における神経幹細胞のインテグリン $\alpha 5$ の発現解析を行った。PBS で 2 回洗浄後、0.1% トリプシンを含む Ca^{2+} , Mg^{2+} フリーの Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS, Life Technologies) により 37°C で 5 分間の反応により細胞を剥離し、1,400 rpm で 5 分間の遠心により細胞を回収した。0.1% ウシ胎児血清 (Bayer, Kankakee, IL) および 0.1% アジ化ナトリウム (和光純薬工業, 大阪) を添加した HBSS を用いて、 2×10^5 個 / 50 μL の濃度に細胞懸濁液を調製した。一次抗体反応として HBSS により 1/25 に希釈したビオチン標識 - 抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA) を細胞懸濁液に加え 4°C で 20 分間静置した。HBSS を加え遠心した後、一次抗体反応液を含む上澄みを捨てた。この洗浄操作を 2 回行った後、二次抗体反応として 1/50 希釈したストレプトアビジン標識 - フィコエリスリン (Becton Dickinson) を細胞懸濁液に加え 4°C で 20 分間静置した。HBSS で 1 回洗浄し、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヨウ化プロピジウム (和光純薬工業) を含む HBSS に細胞を懸濁し、FACS キャリバー (Becton Dickinson) により解析を行った。

神経幹細胞の免疫抗体染色

レトロウイルスベクター添加後 1-4 日の神経幹細胞について、ニューロンマーカーである MAP-2ab に対する免疫抗体染色を行った。4% パラホルムアルデヒド溶液を用いて細胞を 20 分間固定した後、一次抗体の細胞抗原に対する特異性を賦活性化するため、0.1% トリトン X-100 (和光純薬工業) を含む PBS に 3% ヤギ血清 (Life Technologies) を加えたブロッキング溶液を用いて、2 時間のブロッキングを行った。その後、一次抗体反応としてブロッキング溶液で希釈した 1/750 マウス IgG 抗 MAP-2ab 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) により、4°C で一晩静置した。次に PBS による 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、二次抗体反応として、PBS により希釈した 1/200 ローダミン標識 - 抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies) により、室温で 2 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI を含む PBS で 10 分間、細

胞の核染色を行った。その後、DABCO 入りの包埋剤 (Life Technologies) を用いて包埋した。翌日、マニキュアで封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, Mannheim, Germany) により観察した。20 視野のカウント結果から、細胞数を DAPI 数 / mm^2 として、MAP-2ab 陽性細胞の割合を MAP-2ab 陽性細胞数 / DAPI 数として示した。

結果

インテグリン $\alpha 5$ はニューロンへ分化しようとする神経幹細胞において、その発現が減少することが知られている¹⁵⁾。そこで、ニューロンへの分化を促す転写因子 Ngn1 及び EGFP を共発現するベクターを遺伝子導入した群と、対照として EGFP のみを発現するベクターを導入した群において、インテグリン $\alpha 5$ の発現変化をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Ngn1 遺伝子が導入された群では、2 日にインテグリン $\alpha 5$ の発現が低下した細胞が多く見られた (図 1)。一方、対照として EGFP 遺伝子のみを導入された細胞群では、インテグリン $\alpha 5$ の発現が低下した細胞は見られなかった。ニューロンマーカー MAP-2ab に対する免疫抗体染色の結果からも、Ngn1 遺伝子が導入された群では 2 日から 3 日にかけて、細胞増殖の停止、またニューロンへの分化が見られることが分かった (図 2)。これらの結果から、インテグリン $\alpha 5$ の発現低下した細胞が多数見られた Ngn1 遺伝子導入後 2 日の時期がニューロンへ分化する直前の細胞が多い時期と考え、移植に用いるのに適した時期であると判断した。

2. 成体脳内への神経細胞の移植

材料と方法

動物

4 週齢の ICR マウス 5 匹 (三共ラボサービス, 東京) を細胞移植のレシピエントとして用いた。全ての実験はアメリカ国立衛生研究所と独立行政法人医薬基盤研究所の The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を遵守し、併せて東京大学新領域創成科学研究科の動物実験ガイドラインと独立行政法人医薬基盤研究所の The Animal Welfare and Animal Care Committee

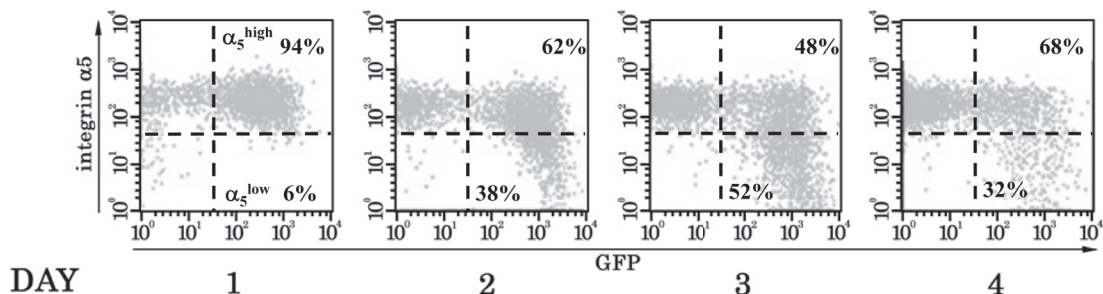


図1 Ngn1 遺伝子によるインテグリンα5発現の低下

Ngn1遺伝子導入後1-4日における、インテグリンα5の発現をフローサイトメトリーにより解析した。Ngn1遺伝子導入後2日より、インテグリンα5の発現低下した細胞が見られ始めたことから、この時期を神経幹細胞がニューロンへと分化している時期とし、移植に適すと判断した。

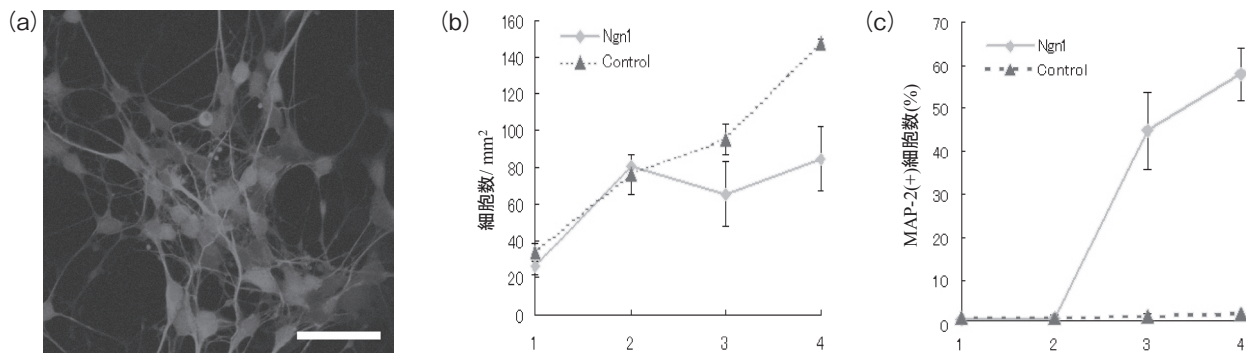


図2 Ngn1 遺伝子導入後1-4日における細胞の変化

- (a) Ngn1遺伝子を導入して4日のMAP-2a2bに対する免疫抗体により染色した像。スケールバー = 20 μm
- (b) Ngn1遺伝子導入後1-4日の細胞数。
- (c) Ngn1遺伝子導入後1-4日のMAP-2ab陽性細胞の割合。

に則して行った。

細胞移植

レトロウイルスにより遺伝子導入された神経幹細胞を2日間培養後、PBSで2回洗浄し、10%トリプシンを含むCa²⁺、Mg²⁺フリーのHBSSにより5分間、37℃で反応させ細胞を遊離させた。その後、細胞を1,400 rpmで5分間遠心回収し10,000個/μLになる様にHBSSで懸濁した。移植に用いたガラスニードルは耐熱ガラス管(ボロシリケートガラス管)(World precision instruments, Sarasota, FL)をマイクロピペット・プレー(Sutter instrument, Novato, CA)により口径100 μmになる様に引張り作製した。このガラスニードルをマイクロインジェクション装置(ナノジェクト2; Drummond scientific company, Broomall, PA)に取り付け、細胞懸濁液を脳内に注入した。移植方法は、ケタミン(20 mg/kg, i.m.)およびキシラジン(10 mg/kg, i.p.)

による麻酔下にて、マウス頭部を三次元固定器により固定し頭部の皮膚を開いた後、移植を行う領域上にある頭蓋骨を口径0.8 mmのドリル歯を用いて切除し、脳を露出させた。側脳室下帯、線条体、および大脳皮質の領域に1μLの細胞懸濁液、すなわち10,000個の細胞を移植した。細胞懸濁液の入ったガラスニードルを挿入し、50 nLを15秒毎、すなわち1分間に200 nLになる様に細胞懸濁液を注入し、合計1μLの細胞懸濁液を注入した後、2分間静置してから静かにニードルを抜いた。側脳室下帯や線条体に比べ大脳皮質は細胞密度が高い為、注入した細胞懸濁液は組織内へ浸潤し難い。そこで、大脳皮質への移植に関しては、大脳皮質前頭前野領域の5箇所合計1μLとなるように移植した。切開部の皮膚を生理的食塩水で洗浄し、縫合糸により縫合した。各マウスには移植手術前日に免疫抑制剤サイクロスポリンA(ノバルティスファーマ, 東京)を10 mg/kgにな

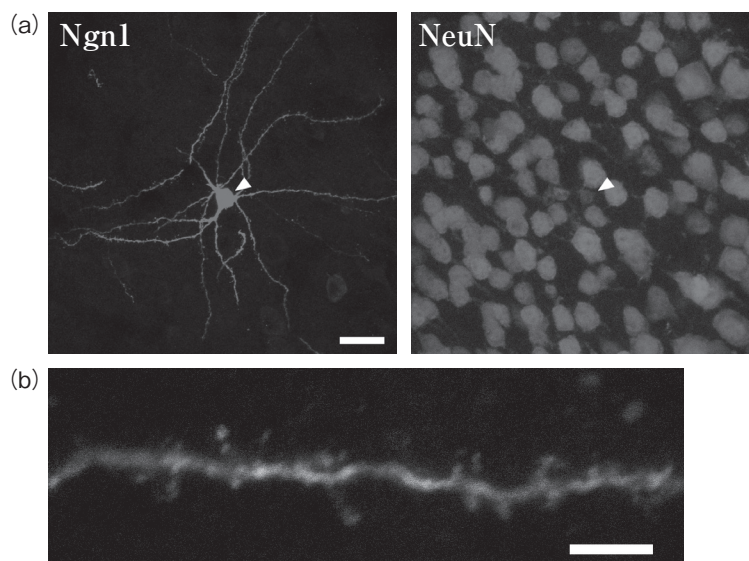


図3 成体大脳皮質へ移植されたニューロン

- (a) Ngn1遺伝子を導入した細胞を移植後、5日の成体大脳皮質をNeuNに対する免疫抗体により染色した像。EGFPを発現した移植細胞がNeuNを発現していたことが確認された。スケールバー = 40 μm
- (b) 移植されたニューロンの樹状突起にスパイン構造が確認された。スケールバー = 4 μm

るように腹腔内投与し、以後1日置きに投与した。
脳切片の作成

成体マウス脳内へ細胞を移植して5日後にエーテル麻酔下で4%パラホルムアルデヒド溶液を用いてマウスの灌流固定を行った。灌流固定後、脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド溶液中に一晩固定し、翌日、スクロース置換を行った。置換後、凍結包埋剤 (Electron microscopy sciences, Hatfield, PA) により脳を凍結させ、クライオスタットを用いて前頭断面方向に40 μm の厚さとなる様に脳切片を作製した。

組織の免疫抗体染色

移植後5日の脳組織切片について、成熟ニューロンマーカーであるNeuNタンパクに対する免疫抗体染色を行った。脳組織切片をトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で10分間洗浄後、0.3%トリトンX-100を含むTBSに3%ヤギ血清を加えたブロッキング溶液を用いて、2時間のブロッキングを行った。その後、一次抗体反応としてブロッキング溶液で希釈した1/1000ラットIgG抗GFP抗体 (Abcam), 1/1000マウスIgG抗NeuN抗体 (Abcam) により、4°Cで一晩静置した。次に、TBSにより15分間の洗浄を3回行った。洗浄後、二次抗体

反応として0.3%トリトンX-100を含むTBSで希釈した1/1000 Alexa488 標識 - 抗ラット IgG 抗体, 1/200 ローダミン標識 - 抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies) により室温で2時間静置した。TBSで3回洗浄後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI を含む TBS で10分間、組織切片の核染色を行った。その後、DABCO 入りの包埋剤を用いて包埋した後、マニキュアで封入し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

結果

Ngn1 遺伝子の導入によりインテグリン $\alpha 5$ の発現低下が見られた細胞群を移植した場合、脳室下帯、線条体、大脳皮質いずれの領域においても、放射状に樹状突起を伸ばした移植細胞を見ることが出来た。成熟ニューロンマーカー NeuN に対する免疫抗体染色の結果から、これらの移植細胞が NeuN を発現する成熟ニューロンへ分化したことが確認された (図 3a)。また、他のニューロンとシナプス結合をする際に見られる樹状突起スパインの構造が、ニューロンへ分化した移植細胞において確認された (図 3b)。これらの結果から、インテグリン $\alpha 5$ の発現低下した細胞は、移植後速やかにニューロンへ分化し、レシピエントの神

経回路網へ組み込まれた事が示された。

一方、対照としてインテグリン $\alpha 5$ の発現低下が見られなかった細胞群を移植した場合には、移植された細胞は移植部位で未分化のまま細胞塊を形成していることが確認された。また、免疫抗体染色の結果から NeuN 陽性となる細胞は見られなかった。

考察

一般に、脳内に移植した神経幹細胞が成熟ニューロンへ分化するには、2週間ないし1か月以上の時間が必要とされている¹⁷⁾。しかし、本実験では、ニューロンへの分化が最も抑制的な環境下であるとされる成体大脳皮質において、5日という短期間で移植細胞のニューロンへの分化が確認された。さらに、大脳皮質のみならず、側脳室下帯や線条体への移植においても、移植細胞のニューロンへの分化を確認している。一方、脳組織への細胞移植の問題点として、移植後に細胞が異常増殖し細胞塊を形成してしまうという危険性が指摘されているが¹²⁾、対照群では脳内で異常増殖し細胞塊を形成しているものが見られた。これらの結果から、インテグリン $\alpha 5$ の発現を指標とすることで、移植細胞は異常増殖をすることなく速やかにニューロンへ分化することが示された。その為、インテグリン $\alpha 5$ の発現を指標とした細胞移植は、脳内の様々な領域への移植実験に対して、移植細胞のニューロンへの分化能や神経回路網の構築といった性状解析を簡便に行うことが出来る系として有用ではないかと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、懇切なご指導および御助言を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学分野の久恒辰博准教授に心より感謝するとともに深く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり、レトロウイルスベクターを御供与頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻分子神経分化制御学の中島欽一教授に心より感謝致します。

文献

- 1) Ramon y Cajal, S.: "Degeneration and regeneration of the nervous system". Oxford University Press, Oxford 1928
- 2) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4: 1313-1317
- 3) Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, et al.: GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 2005; 47: 803-815
- 4) Aizawa K, Ageyama N, Terao K, et al.: Primate-specific alterations in neural stem/progenitor cells in the aged hippocampus. *Neurobiol Aging.* 2009; doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.011, in press.
- 5) Lois C and Alvarez-Buylla A: Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 2074-2077
- 6) Kokaia Z and Lindvall O: Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol.* 2003; 13: 127-132.
- 7) Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, et al.: Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J Neurosci.* 2003; 23: 937-942
- 8) Ohira K, Furuta T, Hioki H, et al.: Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 173-179
- 9) Takahashi K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-676
- 10) Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al.: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 5856-5861
- 11) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al.: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 12704-12709
- 12) Lindvall O and Björklund A.: Cell Therapy in Parkinson's Disease. *NeuroRx.* 2004; 1: 382-393.
- 13) Fricker-Gates RA, Shin JJ, Tai CC, et al.: Late-stage immature neocortical neurons reconstruct interhemispheric connections and from synaptic

- contacts with increased efficiency in adult mouse cortex undergoing targeted neurodegeneration. *J Neurosci.* 2002; **22**: 4045-4056
- 14) Muramatsu D, Sato Y, Hishiyama S, et al.: Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Exp Neurol.* 2005; **194**: 1-11
- 15) Yoshida N, Hishiyama S, Yamaguchi M, et al.: Decrease in expression of alpha 5 beta 1 integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2003; **287**: 262-271
- 16) Yamada K, Hisatsune T, Uchino S et al.: NMDA receptor mediated Ca²⁺ responses in neurons differentiated from p53^{-/-} immortalized murine neural stem cells. *Neurosci Lett.* 1999; **264**: 165-167
- 17) Englund U, Bjoklund A, Wictorin K, et al.: Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; **26**: 17089-17094