

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390273

研究課題名(和文) 霊長類に特異的なニューロン新生と脳再生療法の研究開発

研究課題名(英文) Development of GPR40-positive neural stem cells for the brain restoration

研究代表者

山嶋 哲盛 (Yamashima, Tetsumori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：60135077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：未曾有の高齢化社会を迎えた我が国ではアルツハイマー病に代表される認知症が増え、幹細胞移植による脳再生療法の開発が急務の課題となっている。骨髄には造血幹細胞と間葉系幹細胞(MSC)の両者が含まれるが、GPR40を微量発現した自家骨髄MSCを分離した上で、in vitroでDHAを用いてGPR40陽性の幼弱神経細胞に分化させる手法が本研究で確立された。この細胞をヒトの脳内に移植すれば、海馬において新生ニューロンに分化し、高次脳機能障害を改善できる可能性がある。同時に、DHAなどの多価不飽和脂肪酸がGPR40との結合によりCREBのリン酸化を介してBDNFを産生し神経回路を再編し得ることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Vascular adventitia is a potential source of neuronal stem/progenitor cells in the neurogenic niche of adult monkey hippocampus, and the fatty acid receptor GPR40 is expressed here. As perivascular progenitors might be regarded as in situ counterparts of bone marrow stroma, we studied outcome of clonally-expanded bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (BM-MSC) in response to DHA. During expansion the cell population was enriched in GPR40. DHA in addition to bFGF yielded a mature neuronal phenotype acquisition with a significant GPR40 up-regulation two weeks after culture. Compared to bFGF alone, there were not only quantitative but also temporally-relevant induction of neuronal specific transcripts and proteins. Along with the morphological changes and phenotype acquisition, DHA-dependent GPR40 up-regulation showed a cell cycle arrest implying ongoing differentiation. These data suggest that a DHA/GPR40-mediated mechanism may be involved in the adult neurogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：サル 海馬 骨髄幹細胞 GPR40 多価不飽和脂肪酸 ドコサヘキサエン酸 ニューロン新生 脳再生療法

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪と言えば、肥満やメタボロピック症候群などマイナスのイメージしかないが、実は脂肪に由来する遊離脂肪酸のうち、炭素の2重結合に富む多価不飽和脂肪酸(PUFA)は脳や神経細胞の発達と機能維持には必須のものである。2重結合が存在すると細胞膜の流動性が高まり、膜リン脂質相互間にレセプターが介在し得るスペースができるからである。乳幼児の脳の発達には、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸などのPUFAが必須であること、また、成人においてもその摂取により血液の粘性が低下し、梗塞性疾患が減少することはよく知られている。従来これは炭素の2重結合部が酸化ストレスに弱いため、膜リン脂質の脂肪酸には代謝回転が必要なためと推測されてきただけで、詳しい理由は不明であった。

申請者は、PUFAには細胞膜のリニューアル以外の効果があるに違いないと考え、膵臓におけるインスリン分泌に関わるG-Protein coupled receptorであるGPR40に着目した。なぜなら、GPR40はPUFAと結合し細胞のカルシウム動員と2次的な情報伝達をきたすこと、ならびにその遺伝子が脳に発現していることがすでに報告されていたからである。そこで、申請者はGPR40に対する抗体を作成し検索を行った結果、サル海馬にGPR40が多量に発現していることがわかった。これまでの研究でサル脳に20分間の虚血負荷をかけると、成体海馬において、実験9日目をピークに神経幹細胞が増加し、実験2週目に新生ニューロンが活発に誕生することがわかっていった。しかも、これらの神経幹細胞や新生ニューロンは虚血後1週目をピークに歯状回に新生する毛細血管の外膜に由来していた。

海馬の神経幹細胞の発生母地としては従来、血管の関与が疑われていたが、申請者は毛細血管の外膜に集積する神経幹細胞は、実は、血流に乗って運ばれて来た骨髄の間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)ではないかと推測している。その理由は、最近の研究で、骨髄MSCもわずかながらGPR40の遺伝子と蛋白を発現していると報告されたからである。申請者はサル海馬での発現変化を調べた結果、GPR40は神経幹細胞と新生ニューロンに発現し、実験2週目にピークとなっていた。正常海馬と虚血後のサル海馬の遺伝子発現をデファレンシャル・ディスプレイ法で比較し、申請者はサル海馬の神経幹細胞にダウン症候群細胞接着因子(DSCAM)を発見した。申請者が海馬の神経幹細胞の起源として骨髄を疑うもう一つの理由は、サルの骨髄MSCがこのDSCAMをも発現していたからである。従来より神経細胞接着因子であるNCAMが骨髄MSCにも存在することが

ら、骨髄と脳との関連性が示唆されていた。NCAMのみならず、GPR40とDSCAMという3つの特殊な蛋白が遠く離れた海馬と骨髄に発現していることは、単なる偶然とは思えない。

### 2. 研究の目的

ドコサヘキサエン酸(DHA)を含む多価不飽和脂肪酸(PUFA)は、脳の発達や維持に必須であるばかりでなく高次脳機能障害も改善し得るが、その機序は未解明である。PUFAの受容体であるG-protein coupled receptor40(GPR40)は、膵臓でインスリン分泌に関与することが最近解明された。GPR40は膵臓よりも脳における発現量が多いが、脳での役割は未知である。申請者は従来脳虚血サルを用いて神経細胞の生と死について研究し、成体海馬ではGPR40がPUFAの情報伝達を行うことでニューロン新生に関わることを見出した(Prog Neurobiol 84:105, '08)。

本研究では、PUFAがGPR40との結合によりCREBのリン酸化を介してBDNFを産生し神経回路を再編することを証明する。同時に臨床応用として、脳再生療法に応用可能なGPR40陽性・骨髄多機能幹細胞を開発する。具体的には、サル海馬組織よりタンパク質を抽出した後、プロテオミクス解析を行うが、個々のタンパク質の発現量解析は蛍光標識2次元ディファレンスゲル電気泳動解析(2D-DIGE)により行う。標的タンパク質についてはアミノ酸配列を同定するだけでなく酸化ストレスによるカルボニル化の程度を評価する。

### 3. 研究の方法

1) ニホンザルを対象として全身麻酔下で胸骨を除去し、縦隔経由で無名動脈と鎖骨下動脈を20分間クランプし、一過性全脳虚血負荷をかけた後、クランプをはずし再灌流する。

2) 実験後2週目に遅延見合わせテストを行い、該当サルの記憶力低下を再評価する。

3) ニューロン新生が増加する虚血2週目に海馬組織を摘出し、免疫組織化学的にGPR40陽性の神経幹細胞とPSA-NCAM陽性の新生ニューロンを同定する。

4) 該当サルの骨髄細胞より分離した骨髄MSCをMEM complete medium (EM)とsubsequent neural stem cell expansion medium (N2 supplement + bFGF + EGF)(NM)中で培養する。

5) 培養の前後にこれらの細胞が発現するタンパク質をRT-PCRと2次元電気泳動で解析し、発現変化を評価する。該当バンドを摘出し、プロテオミクス解析により分化促進因子を同定する。

6) 細胞をFluo-3/AM fluorescent

indicator dye で標識して PUFA を投与し、どの程度の細胞内カルシウム動員が起きるかを、ARUGUS-50/CA imaging system で評価する。

7) 上記培養細胞を GFP で標識後、虚血サルの海馬に隣接する脳室内に定位脳的に投与し、至適量のドコサヘキサエン酸やアラキドン酸などを投与し、神経幹細胞に分化誘導する。

8) その他の PUFA により GPR40 陽性の神経幹細胞を用いて、上記の実験を行い、PUFA による細胞内カルシウム動員の程度を判定する。海馬の新生ニューロンと同様の効果を示す骨髄由来の神経幹細胞の作成が目標である。

#### 4. 研究成果

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は脳や神経細胞の発達と機能維持には必須のものである。炭素の 2 重結合が存在すると細胞膜の流動性が高まり、膜リン脂質相互間にレセプターやチャンネルなどが介在し得るスペースができる。しかし、2 重結合部は酸化ストレスに弱いため、膜リン脂質の脂肪酸には代謝回転が必要である。本研究では、PUFA には細胞膜のリニューアル以外の効果があるに違いないと考え、PUFA と結合することでシグナル伝達を行い、インスリン分泌に関わるとされる G-Protein coupled receptor の 1 種である GPR40 に着目した。

成体サルに一過性全脳虚血負荷をかけると、海馬において実験9日目をピークに神経幹細胞が増加し、2週目に新生ニューロンが活発に誕生する。これらの神経幹細胞や新生ニューロンは虚血後 1 週目をピークに歯状回に新生する毛細血管の外膜に由来していた。海馬の神経幹細胞の発生母地としては従来血管の関与が指摘されていたが、申請者は、毛細血管の外膜に集積する神経幹細胞は、実は血流に乗って運ばれて来た骨髄の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) ではないかと推測した。その理由は、1) 骨髄MSCもわずかながら GPR40 を発現している。また、2) 神経細胞接着因子である NCAM が骨髄MSCにも存在することから、従来より骨髄と脳との関連性が示唆されていた。そこで、PUFA の投与によって GPR40 を刺激すれば、in vitro でも骨髄MSCは神経細胞に分化するのではないかと作業仮説を立て実験を行った。

サル骨髄MSCの採取は、全身麻酔下で大腿骨に 2 つの小穴を穿ち、ヘパリン入りの DPBS で灌流して行った。LymphoPrep™ を加えた骨髄液を静置し、上清を捨てる。これを swing-out rotor で室温で 800 x g で 30 分間遠心する。サンプルと溶液との境界

部よりパストールピペットを用いて、単核細胞群を採取し、DPBSを加えて250 x gで10分間、2回洗浄する。これを1% PSFと15% FBSを含む培養液で再遠心し、ペレットを3日間培養し浮遊細胞を除去するとMSCが得られた。骨髄には造血幹細胞とMSCの両者が含まれるが、GPR40を微量発現した自家骨髄MSCを分離し、clonal expansionを行った。

申請者は、DHA/GPR40シグナルが clonally-expanded骨髄MSCにおける神経細胞マーカーの発現に影響を与えるか否かに注目した。その結果、元来GPR40を発現する骨髄MSCは、通常の培養液に微量のDHAを添加することで、GPR40の発現増加と同期して神経細胞に分化してゆくことがわかった。すなわち、細胞周期の解析では、DHA にbFGFを添加すると骨髄MSCは増殖を停止し、G<sub>0</sub>休止期に移行した。ネスチン陽性の幹細胞は、幼弱ニューロンマーカーであるβ III-tubulinを発現した後、NF-Mおよび Map2陽性のphenotypeへと成熟することが、RT-PCRとウエスタンブロットおよび免疫組織で証明された。未処置の骨髄MSC と比べ、bFGF 添加群ではGPR40のmRNAと蛋白の発現増加がみられた。さらに、GPR40の代表的なリガンドであるDHAをごく微量投与すると、RT-PCRとウエスタンブロットではGPR40の発現は低下し、免疫組織学的局在は細胞膜表面から細胞質へと変化した。これは、G protein-coupled receptorの特徴である'Receptor internalization'に一致する現象であった。しかも、GPR40の発現低下と同期して、β III-tubulinやNF-M、Map2などの神経細胞マーカーの発現増加がみられた。

さらに、成体脳ニューロン新生の亢進を示す一過性完全脳虚血ザルを用いてGPR40と転写因子であるphosphorylated cAMP response element-binding protein (pCREB)の発現について検索した。同時に、pCREB の下流にあるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) とそのレセプターであるtropomyosin receptor kinase B (TrkB)の発現についても検索した。すでに報告したように、ウエスタンブロットではGPR40は虚血負荷後の第2週目に発現が亢進していたが、pCREBも虚血第2週目に発現が亢進しており、しかも海馬のニューロン新生の増加の時期と一致していた。免疫組織化学的にもGPR40とpCREBの局在発現パターンはほぼ一致しており、歯状回下層(SGZ)の成熟ニューロンや新生ニューロン、星状膠細胞などに発現していた。GPR40/pCREBの2重陽性細胞は虚血15日目のSGZにおいて有意に増加していた。一方、BDNFの成熟型(mBDNF)とTrkBの蛋白量は有意な発現増加を示さなかったが、mBDNFの前駆体であるproBDNFは虚血9日目にピークとなっていた。さらに、免疫

組織学的には新生ニューロンはBDNFを発現するが、TrkBは発現していなかった。以上の結果から、成体脳海馬においてPUFAによってニューロン新生が惹起されるためには、同じシグナル伝達経路内においてGPR40とpCREBおよびBDNFが連動していることが示唆された。

未曾有の高齢化社会を迎えた我が国では脳血管障害や頭部外傷などの器質的脳疾患やアルツハイマー病などの神経変性疾患に伴う高次脳機能障害に苦しむ患者が増え、幹細胞移植による脳再生療法の開発が急務の課題となっている。骨髄には造血幹細胞とMSCの両者が含まれるが、GPR40を微量発現した自家骨髄MSCを分離した上で、in vitroでDHAを用いてGPR40陽性の幼稚神経細胞に分化させる手法が本研究で確立された。この細胞をヒトの脳内に移植すれば、海馬において新生ニューロンに分化し、高次脳機能障害を改善できる可能性がある。ES細胞やiPS細胞には腫瘍化や免疫抑制などの課題があり、自家骨髄由来の神経幹細胞は脳再生療法の開発に今後多大な貢献をし得るものと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yamashima T.: Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain-cathepsin hypothesis' -A perspective review. Progress in Neurobiology 105: 1-23, 2013(査読有り) ほか9件

〔学会発表〕(計 5 件)

山嶋 哲盛: 虚血性と変性性の神経細胞死  
第22回海馬と高次脳機能学会  
平成25年10月12日、金沢 ほか4件

〔図書〕(計 2 件)

山嶋 哲盛: サラダ油が脳を殺す -「錆び」から身体を守る(218頁) 河出書房新社 2012年8月21日出版 ほか1件

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: GPR40 陽性骨髄幹細胞  
発明者: 山嶋 哲盛  
権利者: 金沢大学  
種類: 再公表特許(A1)  
番号: 特願 2011-548981  
出願年月日: 2010年12月28日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山嶋 哲盛 (Yamashima Tetsumori)  
金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 60135077

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: