神経細胞移植におけるプレイオトロフィンの効果

飛田 秀樹

Effect of Pleiotrophin in Neural Transplantation

by

Hideki Hida, M.D., Ph.D.

from

Department of Neurophysiology & Brain Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

Before clinical applications of neural stem/progenitor cells in neural transplantation, many basic problems need investigating; for example, how to induce the differentiation to neurons and how to improve the survival of grafted cells. Therefore, search and analysis for differentiation/survival factors are important areas of neural transplantation research.

To for search differentiation/survival factors of dopaminergic (DAergic) neurons, we investigated enhanced trophic factor in the DA-depleted striatum using ELISA and a cDNA microarray. Expression of pleiotrophin (PTN), VEGF and GDNF were enhanced in the DA-depleted striatum. To ascertain the effect of PTN on survival and differentiation of DAergic neurons, cultured DAergic neurons from E15 ventral mesencephalon and ES-derived nestin positive cells were treated with PTN. Cultured DAergic neurons treated with PTN (50 ng/ml) at 1 and 3 day *in vitro* increased the number of TH-positive cells at 5 day *in vitro*, although treatment with midkine (50 ng/ml), a family protein, did not; indicating that PTN promoted survival specific to DAergic neurons. It was found that PTN treatment to ES-derived nestin positive cells increased the number of TH-positive cells after neural differentiation, showing that PTN promoted differentiation to DAergic neurons from neural stem cells.

To ascertain the effect of PTN in neural transplantation, donor cells (E15 ventral mesencephalic tissue) were treated with PTN during cell preparation; cells were transplanted into the striatum of rat hemiparkinson model and methamphetamine-induced rotation testing was carried out until 5 weeks after transplantation. It was found that PTN treatment during cell preparation improved motor functional behavior as compared to controls, and that there were more surviving DAergic neurons in the striatum at 5 weeks after transplantation in their PTN-treated group. The results showed that PTN treatment of donor cells promotes the recovery of disturbed motor function.

Our data indicates that PTN, an enhanced trophic factor in DA-depleted striatum, is useful as a differentiation/survival factor for DAergic neurons in neural transplantation.

(Received July 8, 2004; accepted April 21, 2005)

Key words : trophic factor, Parkinson disease, stem cells

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 14 : 487-492, 2005

名古屋大学大学院医学研究科脳神経生理学 / 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 [連絡先: 飛田秀樹]

Address reprint requests to: Hideki Hida, M.D., Ph.D., Department of Neurophysiology & Brain Science, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

はじめに

大脳基底核に入力した興奮性入力、ハイパー直接路、直接路、間接路を通じて基底核からの抑制性出力を時間的・空間的に制御し、結果的に視床や大脳皮質のニューロン活動を制御することによって運動を調節している。近年、パーキンソン病における大脳基底核での病態が明らかになってきた。すなわち、パーキンソン病では線条体中のドパミン (DA) 量の減少に伴い、直接路の活動低下と間接路の亢進が誘発され、その結果大脳基底核からの抑制性出力が常に増加した状態となっている⁸⁾。

パーキンソン病に対する治療として、L-dopa などの薬物療法や視床破壊術や脳深部刺激法などの脳定位手術法が行われている。さらに、新しい治療法として“神経細胞移植”の欧米での臨床試験が進み、一定の効果が報告されている。しかし、神経細胞移植において“ドナー細胞不足”が大きな問題点の一つとなっている。

この問題に対し、神経幹細胞、胚性幹 (ES) 細胞、骨髄間葉系細胞などの幹細胞を用いたドナー細胞の開発が進められている。すなわち、幹細胞から DA ニューロンへの分化誘導が可能となれば、開発されたドナー細胞を用いた神経細胞移植の可能性が広がると考えられる。基礎研究レベルでは、①幹細胞から DA ニューロンへ分化誘導させること、②移植後に幹細胞由来ドナー細胞の脳内生着率を改善させること、などが現在のところ解決すべき問題点である。いずれの問題も、DA ニューロンの分化誘導因子／栄養因子の探索およびその解析が重要となってくる。

われわれは、DA が欠乏した線条体に発現増加する栄養因子の探索、解析をこれまでに進めてきた。その候補因子の一つである pleiotrophin (PTN) の解析を進め、神経幹細胞および DA ニューロンに対する作用、神経移植における効果を検討し、以下のような結果を得たので報告する。

線条体における PTN の発現増加

ラット胎仔 (E15) 中脳 DA ニューロンや中脳腹側部由来の neurosphere を片側パーキンソン病モデルラット (6-水酸化 DA により黒質を破壊したモデル) の両側線条体に移植すると、移植された細胞は正常線条体内よりも DA を欠乏した線条体内でよりよく生着、成長する⁷⁾。この結果から、DA が欠乏した線条体中では生体のホメオスタシスが強く働き、生体に有利な環境が形成され、(生体が必要としている DA の産生が可能な) DA ニュー

ロンに特異的な栄養因子 (分化因子、成長因子、生存因子) の発現が増加しているのであろう、という仮説を考えた。ホスト脳内における強いホメオスタシスを示すこれまでの結果として、①DA が枯渇した線条体内に移植された DA 細胞から産生される DA は、3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA) への代謝が減少し、線条体内の DA 量が維持されるメカニズムとなっていること¹⁾、②DA 細胞の移植により DA 欠乏線条体内の移植部周辺の DA レセプターの upregulation が正常化されること、などが挙げられる。

われわれは、6-水酸化 DA の中脳黒質への投与によって黒質線条体路を破壊させたラットの線条体に発現増加する栄養因子を ELISA および cDNA microarray を用いて調べた²⁾。その結果、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、FGF-2、IL-1 β が蛋白レベルで有意に増加していること、PTN、vascular endothelial growth factor (VEGF)、glia maturation factor などの遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした。

成熟ラット線条体に比較的多くの mRNA 発現が認められ、DA 入力の欠乏した線条体でその発現が約 2 倍に増加している PTN に注目し解析を進めた。PTN に関する報告知見として、神経突起伸展促進作用を有する 18 kDa の蛋白であり、発生後期および生直後に最も高い発現が認められる。また、発達期の側脳室周囲に発現が認められることから発生過程での関与が考えられ、最近 PTN が神経幹細胞の分裂を抑制し分化を促進することが示された³⁾。

これまでのわれわれの PTN に関する解析から、①DA 欠乏した線条体では、PTN レセプターの発現が増加している、②約 50% の相同性を持つ midkine (MK) の発現は、PTN の増加とは逆に低下している、③中脳由来 neurosphere 中で PTN 遺伝子の発現頻度は上位にある、などの結果を得ている。DA 欠乏線条体環境下で発現増加する PTN の作用解析の重要性が示唆されたので、①培養 DA ニューロンに対する PTN の作用、②中脳由来 neurosphere および ES 細胞由来 nestin 陽性細胞に対する PTN の作用、③神経移植における PTN の有効性について解析を行った。

培養 DA ニューロンへの PTN の作用

胎生 15 日の中脳より DA ニューロンを調整し、培養下で PTN の作用を調べた²⁾。無処置コントロール群と比べ PTN 処置群では、培養 5 日後にチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性細胞の数が多かった。しかし、神経マーカー

Fig. 1 PTN promotes the survival of cultured DAergic neurons

A : PTN (50 ng/ml) were added at 1 and 3 days *in vitro* (DIV). Cells were fixed and processed for tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining at 5 DIV.

B : Most effective doses of PTN and GDNF were 100 ng/ml and 500 ng/ml, respectively. The effect of PTN on DAergic neurons was additive to that of GDNF *in vitro*. (modified from Ref 2)

の MAP-2 陽性細胞の数に違いは認められなかった。また、培養 5 日間（成熟した DA ニューロン）に PTN を処置した場合にも、PTN 処置群では無処置群より TH 陽性細胞数が多かった。すなわち PTN が DA ニューロンの生存を特異的に促進することが明らかになった。一方、MK 処置によりこの作用は認められなかった。さらに PTN および GDNF を最大作用濃度で同時に処置したところ、相加的に DA ニューロンの生存を促進することがわかった (Fig. 1)。すなわち、PTN は GDNF と異なる機構により DA ニューロンの生存を促進させることがわかった。

ES 細胞由来神経幹細胞に対する PTN の作用

PTN は発生過程で中脳背側部にも発現が認められ、DA ニューロン前駆細胞の分化に関与すると考えられ

る。中脳 DA ニューロン前駆細胞は、脳室周囲から放射状に伸びるテネシン陽性の線維上を遊走し、その後これに直交する L1 陽性の線維上を遊走しながら DA ニューロンへ分化する⁵⁾。この過程で sonic hedgehog (SHH) や FGF-8 が作用し、分化を誘導していると考えられている。中脳背側に発現する PTN が SHH および FGF-8 とともに神経前駆細胞の分化を促進するかどうかは、非常に興味深い。そこで、ES 細胞由来 nestin 陽性細胞に対する PTN の作用を調べた。すなわち、ES 細胞を 5 段階のステップを経て神経細胞に分化誘導する系⁶⁾の第 4 段階の nestin 陽性細胞を増殖させる過程に、DA を欠乏した線条体に発現増加する PTN を処置し、DA 分化誘導が促進されるかどうかを検討した。

まず、5 段階分化誘導法の各段階における PTN と PTN レセプター (syndecan-3, PTP- ζ) の発現を調べたところ、ステージ 3 すなわち ES 細胞由来 nestin 陽性細胞のみが選別された状態から PTN と PTN レセプター

Fig. 2 PTN promotes DAergic differentiation of ES-derived nestin-positive cells

A : PTN was treated to ES-derived nestin-positive cells (stage 4) for 6-8 days. Cells were allowed to differentiate for 6 days in stage 5 and fixed at 6 days followed by MAP-2 and TH immunostaining. PTN treatment increased TH-positive cells.

B : TH-positive cells were counted. Treatment of PTN increased the number of TH-positive cells.

C : PTN addition at stage 4 induced Nurr1 mRNA compared to control.
(modified from Ref 4)

の遺伝子が発現することがわかった。PTN が ES 細胞由来 nestin 陽性細胞に対し何らかの作用を持つ可能性がわかる。そこで、ステージ 4 の ES 細胞由来 nestin 陽性細胞を bFGF 存在下で増殖させる過程において PTN および SHH を作用させたと、無処置群に比べると約 4 倍、SHH のみの処置群の約 2 倍の細胞が TH 陽性細胞に分化することを見出した (Fig. 2)。また、PTN 処置により DA ニューロンの発生過程で出現する *nurr-1* 遺伝子の発現が増加すること、培養液中に DA が約 2 倍量分泌されていることを確認した。すなわち、PTN が ES 細胞由来 nestin 陽性細胞の DA ニューロンへの分化誘導を促進することが明らかになった⁴⁾。

神経移植における PTN の有効性

われわれの研究室では、黒質への 6-水酸化 DA 投与 2 週後にメタンフェタミン誘発テストを行い、1 分間に平均 8 回転以上 (>480 回/時間) 破壊側へ回転運動を示す

動物を片側パーキンソン病モデル動物として用いている。また投与 2~3 週後に移植実験を行い、移植 2, 3, 5 週後のメタンフェタミン誘発回転運動を行動評価の指標としている。

PTN のラット (E15) 中脳腹側部由来の DA ニューロンに対する作用が *in vitro* で証明されたので、神経移植において移植ドナー細胞の調整時に PTN を処置することにより、運動機能の改善が促進されるかどうかを調べた。まず本実験目的を考慮し、E15 中脳腹側部の組織をドナー細胞とした実験系の移植細胞の至適細胞濃度を検討した。その結果、5 万個の細胞を移植すると、移植 5 週後にメタンフェタミン誘発回転運動がほぼ改善され、3 万個の細胞では軽度改善される程度であることがわかった。すなわち、3 万個を移植した場合に生存・生着する DA ニューロン (移植 5 週後にチロシン水酸化酵素陽性細胞数は約 134 個であった) から産生される DA によりもたらされる運動機能の改善は、不完全なレベルであることがわかる。

Fig. 3 Treatment of PTN during cell preparation improves functional recovery

A : Methamphetamine-induced rotation tests were carried out until 5 weeks after transplantation following PTN (100 ng/ml) treatment to E15 ventral mesencephalic tissue during cell preparation. Earlier and better functional recovery was found in PTN-treated group.

B : TH-positive cells surviving in grafted area were counted at 5 weeks after transplantation. Treatment of PTN increased the number of TH-positive cells.

そこで、細胞調整時に PTN (100 ng/ml) を処置し 3 万個の細胞を線条体に移植したところ、コントロール無処置群に比べ、メタンフェタミン誘発回転運動がより改善されることがわかった (Fig. 3)。さらに、移植 5 週後に移植部の TH 陽性細胞数を調べたところ、PTN 処置群では陽性細胞数が約 188 個であり、対照群の約 1.4 倍となっていた。すなわち、細胞調整時に PTN を処置することにより細胞の生存が促進され、その結果運動機能の改善が認められることが明らかになった。

まとめ

病態時に強く働く生体ホメオスタシスの解析から、神経細胞移植において有用と考えられる栄養因子が明らかになった。すなわち、DA の枯渇時に線条体に発現増加する栄養因子の 1 つである PTN が、①DA ニューロンの生存を特異的に促進すること、②ES 細胞由来 nestin 陽性細胞の DA ニューロンへの分化誘導を促進すること、③神経移植において PTN 処置がドナー細胞の *in vivo* での生存を促進することが明らかになった。

追記

本文は、第 24 回日本脳神経外科コンgresにおけるプレナリーセッションで発表した内容に基づきまとめたものである。

研究費交付

本研究結果は、科学技術振興調整費 (目標達成型脳科学研究) および科学研究費補助金 (若手 B および基盤 C) による支援のもと行われた成果である。また、その一部は未来開拓学術推進事業による共同研究の成果である。

文 献

- 1) Hashitani T, Mizukawa K, Kumazaki M, Nishino H: Dopamine metabolism in the striatum of hemiparkinsonian model rats with dopaminergic grafts. *Neurosci Res* **30**: 43-52, 1998.
- 2) Hida H, Jung CG, Wu CZ, Kim HJ, Kodama Y, Masuda T, Nishino H: Pleiotrophin exhibits a trophic effect on survival of dopaminergic neurons *in vitro*. *Eur J Neurosci* **17**: 2127-2134, 2003.
- 3) Hienola A, Pekkanen M, Raulo E, Vanttola P, Rauvala H: HB-GAM inhibits proliferation and enhances differentiation of neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **26**: 75-88, 2004.
- 4) Jung CG, Hida H, Nakahira K, Ikenaka K, Kim HJ, Nishino H: Pleiotrophin mRNA is highly expressed in neural stem (progenitor) cells of mouse ventral mesencephalon and the product promotes production of dopaminergic neurons from ES-derived nestin-positive cells. *FASEB J* **18**: 1237-1239, 2004.
- 5) Kawano H, Ohyama K, Kawamura I, Nagatsu I: Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Dev Brain Res* **86**, 101-113, 1995.
- 6) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotech* **18**: 675-679, 2000.

- 7) Nishino H, Hida H, Takei N, Kumazaki M, Nakajima K, Baba H: Mesencephalic Neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol*

164: 209-214, 2000.

- 8) 高草木薫: 大脳基底核の機能: パーキンソン病との関連において. 日本生理学会誌 65 (4/5): 113-129, 2003.

要 旨

神経細胞移植におけるプレイオトロフィンの効果

飛田 秀樹

パーキンソン病に対する治療の新しい試みに神経細胞移植がある。臨床試験において一定の効果が示されているが、ドナー細胞不足が大きな問題点となっている。幹細胞を用いたドナー細胞の開発が期待されているが、ドパミン (DA) ニューロンへの分化誘導および移植細胞の生着率の改善が大きな課題であり、分化因子/生存因子の探索と解析が重要となっている。

われわれは、DA 入力欠如した線条体に発現増加する栄養因子の 1 つとして pleiotrophin (PTN) を同定した。PTN の処置により、培養 DA ニューロンの生存が特異的に促進され、また ES 細胞由来神経幹細胞の DA ニューロンへの分化が促進されることが明らかになった。さらに、PTN をドナー細胞の細胞調整時に処置すると、移植後の生存細胞数が増加し、運動機能が改善されることが明らかになった。以上のことから、DA が欠乏した線条体に発現増加する PTN の神経移植における有用性が示された。

脳外誌 14 : 487-492, 2005