

課題番号	LS021
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	血球系細胞と神経細胞の融合を応用した小脳再生技術の開発
研究機関・ 部局・職名	群馬大学・大学院医学系研究科・教授
氏名	平井 宏和

1. 当該年度の研究目的

これまでに、骨髄細胞、間葉系幹細胞、間葉系幹細胞由来の Muse 細胞を MACS と FACS を用いて sorting し、培養することに成功している。また 2 種類(トランスジェニックとノックイン)の脊髄小脳変性症モデルマウスを譲り受けて繁殖させている。

本年度は、これらの細胞を脊髄小脳変性症モデルマウスに髄注し、病態の進行を抑制できるか、さらに症状を回復させることができるのかを、髄注後定期的に行動学的、形態学的、および電気生理学的に検討する。

骨髄細胞を脊髄小脳変性症モデルマウスに髄注した予備実験で、運動失調が改善する結果を得ている。ただし、髄注する細胞数が多いと逆に運動失調が悪化した。そこで、どの程度の数の骨髄細胞を移植した場合に、治療効果が最大になるのか、さらに骨髄細胞の中のどのタイプの細胞が主な治療効果を担っているのかの解明を目指す。

2. 研究の実施状況

マウスの骨髄由来の間葉系幹細胞(セルライン)3000 個を、運動失調が出現し始める生後5週の脊髄小脳変性症モデルマウス(トランスジェニックマウス)の髄腔内に注射した。生後 10 週目から20週まで、ロータロッドによってモデルマウスの運動失調の程度を測定したところ、運動失調はほとんど観察されず、野生型とほぼ同程度の成績を示した。そこで生後20週の時点でマウスを灌流固定して小脳を観察した。未処置のモデルマウスではプルキンエ細胞層の配列は乱れ、プルキンエ細胞樹状突起は顕著に萎縮していた。これに対し、間葉系幹細胞を髄注したモデルマウスのプルキンエ細胞層の乱れは軽微であり、樹状突起の面積も、野生型よりは小さかったものの、未処置のものより有意に大きいことが明らかとなった。未処置のモデルマウスのプルキンエ細胞を電気生理学的に解析したところ、代謝型グルタミン酸受容体活性化によって引き起こされるシナプス前抑制が完全に見られなかった。これに対して、間葉系幹細胞を髄注したモデルマウスのプルキンエ細胞では、代謝型グルタミン酸受容体活性化によって顕著なシナプス前抑制が観察された。ヒトの間葉系幹細胞 50,000 個の脊髄小脳変性症モデルマウスの小脳皮質への注射でも、運動失調の進行を抑制できることがわかった。さらに間葉系幹細胞を GFP で蛍光ラベルして、小脳皮質に注射し 8 週後に観察したところ、プルキンエ細胞が蛍光標識されており、注射した間葉系幹細胞がプルキンエ細胞に融合したものと考えられた。

様式19 別紙1
3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計8件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計8件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Jin D, Muramatsu SI, Shimizu N, Yokoyama S, Hirai H, Yamada K, Liu HX, Higashida C, Hashii M, Higashida A, Asano M, Ohkuma S, Higashida H Dopamine release via the vacuolar ATPase V0 sector c-subunit, confirmed in N18 neuroblastoma cells, results in behavioral recovery in hemiparkinsonian mice. <i>Neurochemistry International</i> 2012 Nov;61(6):907-12. 2. Hirai H*. Basic Research on Cerebellar Gene Therapy Using Lentiviral Vectors. <i>Cerebellum</i> 2012 Jun;11(2):443-5. 3. Uesaka N, Mikuni T, Hashimoto K, Hirai H, Sakimura K, Kano M. Organotypic Coculture Preparation for the Study of Developmental Synapse Elimination in Mammalian Brain. <i>Journal of Neuroscience</i> 2012 Aug 22; 32(34): 11657-11670. 4. Goenawan H, Hirai H*. Modulation of lentiviral vector tropism in cerebellar Purkinje cells in vivo by a lysosomal cysteine protease cathepsin K. <i>Journal of NeuroVirology</i> 2012 Oct16. [Epub ahead of print] 5. Oue M, Handa H, Matsuzaki Y, Suzue K, Murakami H, Hirai H*. The murine stem cell virus promoter drives correlated transgene expression in the leukocytes and cerebellar Purkinje cells of transgenic mice. <i>PLoS One</i> 2012;7(11):e51015. 6. Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, Liang M, Zhong J, Tsuji T, Yoshihara T, Sumi K, Ishiyama M, Ma WJ, Ozaki M, Yagitani S, Yokoyama S, Mukaida N, Sakurai T, Hori O, Yoshioka K, Hirao A, Kato Y, Ishihara K, Kato I, Okamoto H, Cherepanov SM, Salmina AB, Hirai H, Asano M, Brown DA, Nagano I, Higashida H. Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. <i>Nature Communications</i> 2013 Jan 8;4:1346. doi: 10.1038/ncomms2336. 7. Takechi Y, Mieda T, Iizuka A, Toya S, Suto N, Takagishi K, Nakazato Y, Nakamura K, Hirai H*. Impairment of spinal motor neurons in spinocerebellar ataxia type 1-knock-in mice. <i>Neuroscience Letters</i> 2013 Feb 22;535:67-72.
---------------------	---

	<p>8. Nóbrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Hirai H, Déglon N, de Almeida LP. Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. <i>PLoS One</i> 2013;8(1):e52396.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計17件</p>	<p>専門家向け 計16件</p> <p>1. 入江 智彦、松崎 泰教、関野 祐子、平井 宏和 脊髄小脳変性症 13 型における変異型 Kv3.3 チャネルは、培養小脳プルキンエ細胞において細胞死と興奮性変化を引き起こす 第 90 回日本生理学会大会(東京) 3/27-29/2013(3/29/2013)</p> <p>2. (自ら企画した会議シンポジウム)『小脳における細胞種特異的遺伝子発現法の開発とその応用』 平井 宏和 ウィルスベクターを利用した小脳プルキンエ細胞、バーグマングリア、あるいは介在ニューロン特異的、かつ効率的な遺伝子発現法—カテプシン K 活性の調節及び細胞種特異的プロモーターの開発 第 90 回日本生理学会大会(東京) 3/27-29/2013(3/27/2013)</p> <p>3. 上坂 直史、三國 貴康、平井 宏和、狩野 方伸 細胞培養法と細胞種特異的遺伝子導入法を用いたシナプス刈り込みのメカニズムの解明 第 90 回日本生理学会大会(東京) 3/27-29/2013(3/27/2013)</p> <p>4. 平井 宏和 SCA3 モデルマウスの電気生理学的解析と AAV9 経静脈投与による神経機能回復の検討 厚生労働科研 難治性疾患等克服研究事業 「運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究」班 平成24年度班会議(東京) 1/9-10/2013</p> <p>5. 中村 和裕、平井 宏和 脊髄小脳変性症1型ノックインマウスの抹消神経機能解析 厚生労働科研 難治性疾患等克服研究事業 「運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究」班 平成24年度班会議(東京) 1/9-10/2013</p>

6. (自ら企画した会議)平成 24 年度国際シナプス研究会(岡崎)
International Synapse Research Workshop 2012 11/8-9/2013
代表世話人 平井宏和
Goenawan H, Hirai H. Modulation of lentiviral vector tropism in cerebellar Purkinje cells in vivo by a lysosomal cysteine protease cathepsin KJ

7. Noriyuki Okonogi, Kazuhiro Nakamura, Yoshiyuki Suzuki, Takuya Kaminuma, Sutou Nana, Takashi Nakano, Hirokazu Hirai

Cranial Irradiation Induces Migration of Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) to the Cerebellum in Adult C57BL/6 Mice
American Society for Radiation Oncology, 10/28-31, Boston, USA

8. Hirai H.
Development of highly efficient and cell-type specific gene transfer into the cerebellum and its application to gene therapy
Bandung Biomolecular Medicine Confrence2 (Bandung, Indonesia) 10/5/2012(パジャジャラン大学主催)

9. 平井 宏和、大上美穂、松崎泰教、鈴江一友
トランスジェニックマウスにおいて、マウス幹細胞ウィルスプロモーターは白血球とプルキンエ細胞選択的に遺伝子発現する
(英文タイトル Correlated expression of a transgene in leukocytes and Purkinje cells by the murine stem cell virus promoter in transgenic mice)
第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/20/2012)

10. 飯塚朗、松崎泰教、今野歩、細井延武、平井 宏和
Lentivector を用いた RORa によるプルキンエ細胞樹状突起発達障害のレスキューとその臨界期の検討(英文タイトル Critical period of RORa-regulated dendritic development of Purkinje cells in vivo)
第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/20/2012)

11. 今野歩、Shuvaev AN、三宅紀子、三宅弘一、柳 茂、島田隆、平井 宏和
AAV9 の静脈注射による脊髄小脳変性症3型モデルマウスへの遺伝子治療の試み
(英文タイトル Gene therapy for spinocerebellar ataxia type-3 using trans-blood-brain barrier gene delivery by AAV9)
第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/19/2012)

12. Shuvaev AN, Yamato S, Hanna Goenovan, Yanagihara D, Hirai H
Impairment of metabotropic glutamate receptor signaling in mouse Purkinje cells

	<p>expressing a mutant gene of spinocerebellar ataxia type 1 第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/18/2012)</p> <p>13. Hanna Goenawan ,Hirai H. Modification of lentiviral tropism for Purkinje cells by cathepsin K released from HEK 293T cells 第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/18/2012)</p> <p>14. 入江智彦、松崎泰教、関野祐子、平井宏和 Kv3.3 チャネルのミスセンス変異は小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達不全と細胞死を引き起こす (英文タイトル Missense mutation in Kv3.3 channel causes cell death and impairs neuronal excitability of cultured cerebellar Purkinje cells) 第35回日本神経科学大会(名古屋) 9/18-21/2012(発表日 9/18/2012)</p> <p>15. 平井 宏和 「脊髄小脳変性症の小脳機能障害の解析」 秋田大学生体情報研究センター設置記念シンポジウム～グローバル COE プログラム「生体調節シグナルの統合的研究」群馬大学・秋田大学連携)のさらなる展開～、秋田、8/31-9/1/2012(秋田大学主催)</p> <p>16. Hosoi N, Mitsumura K, Hirai H. Disruption of mGluR-mediated signalling at cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses in staggerer mutant mice 8th FENS FORUM of NEUROSCIENCE, Barcelona, 7/18/2012 第8回ヨーロッパ神経科学学会</p> <p>一般向け 計1件 (自ら企画した会議)平井 宏和</p> <p>1. 講演会座長担当「自閉症に関連する遺伝子の研究 定方 哲史」 「総力戦による勝利～脳梗塞からの機能回復 高鶴 裕介」 パネルディスカッション司会担当「どうすれば脳科学者になれるのか 今村一之、福田正人、柳川右千夫」 一般向け実習担当 世界脳週間 2012「脳科学者になるには」4/28/2012 群馬大学</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>平井宏和、第5章 小脳への遺伝子導入 小脳と運動失調 小脳はなにをしているのか (アクチュアル 脳・神経疾患の臨床) [単行本] 辻 省次 (編集), 西澤正豊 (編集)、中山書店、ISBN: 978-4-521-73442-2</p>

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野ホームページ http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp 世界脳週間 2012 「脳科学者になるには」 http://www.gunma-u.ac.jp/cgi-bin/koukai/prg/koukai.cgi?id=a001 群馬大学 Nature 世界版 2012 年群馬特集「Nature Spotlight on Gunma」の発行 http://www.gunma-u.ac.jp/sb/sb.cgi?eid=509
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1. 公開講座・世界脳週間 2012(平成 24 年 4 月 27 日)群馬大学、高校生大学生一般、約 150 名 2. 中学生医療体験実習「体を動かすしくみ、その損傷と治療法」(平成 24 年 7 月 8 日)未来学園(前橋市)、中学生、10 名 3. 小中学生のための医学体験教室(平成 24 年 8 月 22 日)群馬大学、小中学生、10 名 4. 前橋商工会議所まちなかキャンパス(平成 24 年 11 月 15 日)、元気プラザ21(前橋市)、一般、28 名
新聞・一般雑 誌等掲載 計1件	Nature 世界版 2012 年「Nature Spotlight on Gunma」 A big hope for patients with genetic diseases http://www.nature.com/naturejobs/science/articles/10.1038/nj0398
その他	山陽放送、『RSK 地域スペシャル メッセージ』、「友情と鳥の姿に支えられて」～小脳萎縮と闘う野鳥カメラマン～、2012 年 6 月 20 日(脊髄小脳変性症の最先端研究者として、群馬大学で取材) http://ja.wikipedia.org/wiki/RSK_地域スペシャル_メッセージ

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	127,000,000	57,976,000	39,712,000	29,312,000	
間接経費	38,100,000	17,392,800	11,913,600	8,793,600	
合計	165,100,000	75,368,800	51,625,600	38,105,600	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	22,492	39,712,000		39,734,492	33,306,050	6,428,442	
間接経費	0	11,913,600		11,913,600	11,913,600	0	
合計	22,492	51,625,600	0	51,648,092	45,219,650	6,428,442	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	9,248,953	実験用設備、パソコン、試薬、消耗品等
旅費	561,060	研究打合せ、学会発表、学会情報収集等
謝金・人件費等	15,125,023	研究支援者、実験補助者雇用
その他	8,371,014	顕微鏡修理、学会参加登録費、英文校正等
直接経費計	33,306,050	
間接経費計	11,913,600	
合計	45,219,650	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ミニマルチガスイン キュベーター	BL-42MD 十慈フィールド	1	689,115	689,115	2012/4/17	群馬大学
				0		
				0		