

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 25 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

これまでの研究で、3,000 個の間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells; MSCs)を、脊髄小脳失調症(Spinocerebellar ataxia; SCA)モデルマウスの小脳に直接注射することで、運動失調の進行を有意に遅らせ、さらに小脳プルキンエ細胞の萎縮を抑制できることを明らかにした。また、レンチウイルスベクターを用いて GFP でラベルした MSCs を用いることで、移植した MSCs が小脳プルキンエ細胞に融合していることも明らかにした。ただし、GFP の蛍光強度が弱いため、GFP 発現は小脳切片を免疫染色することで、はじめて確認することができた。当該年度は、免疫染色なしで MSC が融合したプルキンエ細胞を同定できるシステムを確立し、融合プルキンエ細胞の性質をパッチクランプ法で解析することを目指す。

2. 研究の実施状況

プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター制御下でテトラサイクリントランスアクチベーター(tTA)を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを、SCA1 モデルマウスの小脳に注入した。2 週間後に tTA 存在化で GFP を発現する 5 万個の MSC を小脳に注入した。MSC が tTA を発現するプルキンエ細胞に融合した場合のみ、GFP が発現する仕組みである。MSCs を注射して 6 週間後に灌流固定、小脳スライスを作成したところ、弱い GFP 蛍光をもつプルキンエ細胞を 1 スライスあたり 1~2 個確認できた。免疫染色後に観察したところ、1 スライスあたり 10 個程度の明瞭に GFP 発現プルキンエ細胞を認めることができた。このことから、MSC はプルキンエ細胞に融合すると考えられた。しかし厳密に言えば、MSC の TRE プロモーターには漏れがあり、tTA なしでもわずかに GFP を発現する。実際、TRE 制御下で GFP を発現する MSC のみを小脳に注入した場合でも、微弱ながら数個の GFP 陽性プルキンエ細胞を免疫染色後に認め、MSC がプルキンエ細胞に分化した可能性が否定できない。また理由は不明であるが、tTR-TRE システムを用いても、GFP 陽性プルキンエ細胞の蛍光は、免疫染色なしではかなり弱く、生きた小脳スライスを用いるパッチクランプ実験で GFP 陽性細胞を同定するのはきわめて困難であった。そこで、絶対にもれのない Flex システムを用いることにした。このシステムでは、MSC の中に組み込まれた GFP 遺伝子は逆向きに入っているため、たとえ TRE にもれがあっても GFP タンパク質が産生されず、プルキンエ細胞に発現させた組換え酵素 Cre があってはじめて産生される。プルキンエ細胞には、Cre と tTA を発現させた。この実験系を確立し、マウスに注射したところである。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 10 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 8 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Irie T, Matsuzaki Y, Sekino Y, <u>Hirai H</u>. Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. <i>Journal of Physiology</i> 2014 Jan 1;592(Pt 1):229–47. 2. Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, <u>Hirai H</u>. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. <i>Cerebellum</i> 2014 Feb;13(1):29–41. 3. Matsuzaki Y, Oue M, <u>Hirai H</u>. Generation of a neurodegenerative disease mouse model using lentiviral vectors carrying an enhanced synapsin I promoter. <i>Journal of Neuroscience Methods</i> 2014 Feb 15;223:133–43. 4. Yamaura H, <u>Hirai H</u>, Yanagihara D. Postural dysfunction in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. <i>Neuroscience</i> 2013 Jul 23;243:126–35. 5. Mikuni T, Uesaka N, Okuno H, <u>Hirai H</u>, Deisseroth K, Bito H, Kano M. Arc/Arg3.1 is a postsynaptic mediator of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum. <i>Neuron</i> 2013 Jun 19;78(6):1024–35. 6. Nascimento-Ferreira I, Nóbrega C, Vasconcelos-Ferreira A, Onofre I, Albuquerque D, Aveleira C, <u>Hirai H</u>, Déglon N, Pereira de Almeida L. Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease. <i>Brain</i> 2013 Jul;136(Pt 7):2173–88. 7. Akther S, Korshnova N, Zhong J, Liang M, Cherepanov SM, Lopatina O, Komleva YK, Salmina AB, Nishimura T, Fakhrol AA, <u>Hirai H</u>, Kato I, Yamamoto Y, Takasawa S, Okamoto H, Higashida H. CD38 in the nucleus accumbens and oxytocin are related to paternal behavior in mice. <i>Molecular Brain</i> 2013 Sep 23;6(1):41. 8. Miki T, <u>Hirai H</u>, Takahashi T. Activity-dependent neurotrophin signaling underlies developmental switch of Ca²⁺ channel subtypes mediating neurotransmitter release. <i>Journal of Neuroscience</i> 2013 Nov 27;33(48):18755–63. <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 9. Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, <u>Hirai H</u>. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. <i>Cerebellum</i> 2013 Nov 17. [Epub ahead of print] 10. Okonogi N, Nakamura K, Suzuki Y, Suto N, Suzue K, Kaminama T, Nakano T, <u>Hirai H</u>. Cranial irradiation induces bone marrow-derived microglia in adult mouse brain tissue. <i>Journal of Radiation Research</i> [Accepted]
------------------------	--

様式19 別紙1

<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 18 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 三木崇史、平井宏和、高橋智幸 Activity-dependent neurotrophin signaling underlies developmental switch of Ca²⁺ channel subtypes mediating neurotransmitter release 2013 シナプス研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」12/12-13/2013 2. 飯塚朗、松崎泰教、今野歩、平井宏和 <i>Staggerer</i> マウスにおけるプルキンエ細胞の mGluR を介した応答は発達期の RORα を必要とする 2013 シナプス研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」12/12-13/2013 3. Uesaka N, Mikuni T, Hirai H, Kano M Identification of retrograde signaling molecules required for developmental synapse elimination in the cerebellum by an RNAi-based approach. Neuroscience2013 11/9-13/2013 サンディエゴ 4. Konno A, Shuvaev AN, Yanagi S, Hirai H. Perturbation of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the rescue by intravascular administration of AAV9 23rd Neuropharmacology Conference 11/7-8/2013 サンディエゴ 5. Konno A, Shuvaev AN, Yanagi S, Hirai H. Disruption of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the partial restoration via intravenous administration of AAV9 Neuroscience2013 11/9-13/2013 サンディエゴ 6. Hirai H Development of Gene and Stem Cell Therapies Against Neurodegenerative Diseases, Focusing on Spinocerebellar Ataxia The Indonesian Neurological Association Congress, Bandung-Indonesia, 10/24-27/2013 (発表日 10/27/2013) 7. Hirai H Retinoid-related orphan receptor α (RORα) が制御する小脳プルキンエ細胞の発達と寿命 第 86 回日本生化学会大会 横浜 9/11-9/13/2013 (発表日 9/13) 8. Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Hirai H Route of AAV9 vector introduction decides the distribution patterns of transduced cell in the cerebellum: Implication of gene therapy approaches for cerebellar disease. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山 (発表日 7/5) 9. Matsuzaki Y, Oue M, Hirai H. Generation of neurodegenerative disease model mice using the altered neuron-specific synapsin I promoter. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山 (発表日 7/5) 10. Yamaguchi T, Konno A, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Robust and cell type-specific transgene expression by applying tetracycline-controlled system to AAV9 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山 (発表日 7/5) 11. Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H. Disruption of metabotropic glutamate receptor signaling and rescue through intravascular administration of AAV9 in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山 (発表日 7/5) 12. Hirai H Progress of spinocerebellar ataxia research on pathology, model animals and gene/stem cell therapies. Toward clinical application.
------------------------	---

様式19 別紙1

	<p>第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山(発表日 7/5)</p> <p>13. 三木 崇史、平井 宏和、高橋 智幸 小脳抑制性シナプス前末端カルシウムチャネルサブタイプスイッチ機構 Neuro2013 6/20-23/2013 Kyoto(発表日 6/21)</p> <p>14. Shuvaev AN, Sato Y, Goenawan H, Yanagihara D, Hirai H Disruption of metabotropic glutamate receptor signaling in Purkinje cells expressing a lentivirally transduced mutant SCA1 gene Neuro2013 6/20-23/2013 Kyoto(発表日 6/21)</p> <p>15. Fathul H, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Hirai H Distinct transgene expression profiles in the cerebellum by the direct cortical, intrathecal and intravenous injection of AAV9: Implication of gene therapy for cerebellar diseases. Neuro2013 6/20-23/2013 Kyoto(発表日 6/20)</p> <p>16. 松崎 泰教、大上 美穂、平井 宏和 中枢神経系の神経細胞特異的に導入遺伝子が発現する遺伝子組換えマウスの作出と解析 Neuro2013 6/20-23/2013 京都(発表日 6/20)</p> <p>17. 今野 歩、Shuvaev Anton、三宅 紀子、三宅 弘一、柳 茂、島田 隆、平井 宏和 脊髄小脳変性症3型マウスモデルにおける mGluR1 の機能不全と AAV9 を用いた遺伝子治療によるその機能回復 Neuro2013 6/20-23/2013 京都(発表日 6/20)</p> <p>18. 入江 智彦、松崎 泰教、関野 祐子、平井 宏和 脊髄小脳変性症にみられる変異型 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 Neuro2013 6/20-23/2013 京都(発表日 6/20)</p> <p>一般向け 計 2 件</p> <p>19. 【自ら企画したシンポジウム】平井 宏和「若手のキャリアプランにおけるテニュアトラック制度の可能性」 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 名古屋 8/29-9/1/2013(発表日 8/30)</p> <p>20. 【自ら企画したシンポジウム】平井 宏和「研究の面白さとは—勉強と研究の違い—」 世界脳週間 2013「脳研究のススメ」4/27/2013 群馬大学</p>
<p>図書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 公開講座・世界脳週間 2013(平成 25 年 4 月 27 日)群馬大学、高校生大学生一般、約 150 名午前中に最先端研究の魅力を伝えた。午後に高校生、一般の方(10 名)が研究室を訪問し、さらに詳しく本 NEXT プログラムの内容と成果について説明し、質問や意見を伺った。 2. 小中学生のための医学体験教室(平成 25 年 8 月 20 日)群馬大学、小中学生、10 名群馬県の小中学生が研究室を訪問した。本 NEXT プログラムの詳細を説明し、実際に研究室を案内し、実験も少し体験してもらうことで、最先端科学研究の魅力を伝えた。
<p>新聞・一般雑誌等掲載計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	97,688,000	29,312,000	0	
間接経費	38,100,000	29,306,400	8,793,600	0	
合計	165,100,000	126,994,400	38,105,600	0	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	6,428,442	29,312,000	0	35,740,442	35,740,442	0	0
間接経費	0	8,793,600	0	8,793,600	8,793,600	0	0
合計	6,428,442	38,105,600	0	44,534,042	44,534,042	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	11,113,711	研究実験消耗品 外
旅費	902,110	学会発表、データ収集 外
謝金・人件費等	17,437,843	研究支援者雇用 外
その他	6,286,778	動物実験施設利用料 外
直接経費計	35,740,442	
間接経費計	8,793,600	
合計	44,534,042	

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
ソフトウェアワークス テーションライセンス	SS-11	1	947625	947,625	2013/12/18	群馬大学大学院 医学系研究科
561nmレーザー	LDSYS-561GH- SP43	1	2,493,750	2,493,750	2014/2/14	群馬大学大学院 医学系研究科
				0		