

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10827

研究課題名(和文) 多様な神経疾患治療に応用可能な次世代型ダイレクトリプログラミング法の総合的開発

研究課題名(英文) Comprehensive development of next-generation direct reprogramming method applicable to treatment for various neurological diseases

研究代表者

山下 徹 (Yamashita, Toru)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60644408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳梗塞マウス脳内のグリア細胞にレトロウイルスを用いてAscl1, Sox2, NeuroD1を発現させる実験を行った。その結果レトロウイルス注入後24日目には神経前駆細胞が誘導され、52日目には成熟した神経細胞が誘導されていることが明らかになった。この研究成果により、脳梗塞で一旦失われてしまった神経細胞も、周囲に豊富に残っているグリア細胞から誘導し補充できる可能性が示すことが出来た。今後、誘導効率を更に向上させると共に安全性を確立し、脳梗塞患者の運動麻痺改善に寄与する治療法開発を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、神経特異的転写因子であるAscl1やSox2, NeuroD1を脳内グリア細胞に強制発現させることで、神経系細胞に直接的に誘導することができ、脳梗塞で一旦失われてしまった神経細胞も、周囲に豊富に残っているグリア細胞から誘導し補充できる可能性が示すことが出来た。今後3つの転写因子を発現できる高力価ポリシストロニックベクター等を用いるなど、誘導効率を更に向上させると共に安全性を確立し、脳梗塞患者の運動麻痺改善に寄与する治療法開発を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted experiments to express Ascl1, Sox2, and NeuroD1 in glial cells in the post-stroke brain of mice using retrovirus. As a result, it was revealed that neural progenitor cells were induced 24 days after the retrovirus injection and mature neurons were induced 52 days. These results suggested that nerve cells can be reproduced from the abundant remaining glial cells in the brain. In the future, we will further improve the induction efficiency, establish safety and promote the development of treatment methods that contribute to the improvement of motor paralysis in patients with ischemic stroke.

研究分野：脳梗塞、再生治療、神経変性疾患

キーワード：脳梗塞 iN細胞 ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

日本を含めた先進諸国における急速な高齢化は、寝たきり患者の増加という大きな社会問題を引き起こしてきている。寝たきり患者の原因の約 40%が脳卒中であるが、パーキンソン病や多系統委縮症、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患も大幅に増加してきており、その治療法開発が強く望まれている。このことから、脳梗塞や神経変性疾患で一旦失われてしまった神経ネットワーク機能を、幹細胞移植治療や内在性神経再生機構の促進を行うことで修復する「再生療法」の確立が待ち望まれている。

2006年8月に京都大学山中伸弥教授らによって開発された iPS 細胞は、ほぼすべての組織に分化する「分化万能性」と無限に増殖できる「自己複製能」を併せ持つ多能性幹細胞であり、この技術を使うことで患者自身の皮膚細胞から神経系細胞を含む多様な細胞種を誘導でき、脳梗塞や神経変性疾患等で失われた神経細胞を補充する神経細胞移植治療への応用が期待されている。しかしながら iPS 細胞由来の神経系細胞を移植治療に用いる場合、未分化な iPS 細胞が残存していると腫瘍形成の可能性があるため、臨床応用する段階での課題となっている。申請者はこれまでに脳梗塞マウスモデルを用いて、移植細胞の安全性を評価する実験系を確立し、脳梗塞マウスに iPS 細胞を移植した場合、高い腫瘍形成率と有意に大きい腫瘍を形成することを報告してきた(Yamashita et al. 2010年 Cell Transplantation)。この腫瘍化の問題を解決する一つの有効な方法として現在注目されているのが、iPS 細胞を経ずに皮膚細胞から神経系細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法と呼ばれる手法である。申請者はこれまでにヒト成人皮膚線維芽細胞に 5 つの転写因子を強制発現させることで Human induced neuronal cells(iN 細胞)を誘導することに成功している。またすでにマウス皮膚線維芽細胞から直接誘導した神経幹細胞株(iNS 細胞)を脳梗塞マウスモデルに移植し、その高い治療効果と移植後 6 か月以上後でも腫瘍形成を認めない高い安全性を持つことを 2016 年に報告した (Yamashita et al. 2016年 Cell Transplantation)。

2. 研究の目的

近年、脳内のアストロサイトなどのグリア細胞を直接脳内で神経系細胞に変えてしまう、いわゆる in vivo ダイレクトリプログラミング法の研究成果が最近相次いで報告されてきている (Guo et al., Cell Stem Cell, 2013)。本研究では、上記のダイレクトリプログラミング法を in vivo に応用し、脳内のグリア細胞を目的の神経系細胞に直接誘導する技術の確立が目的として、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

予備的検討では脳梗塞マウスモデルに精製レトロウイルス pMX-GFP 脳内投与後 2 日後に組織学的検討を行った。その結果、マイクログリア (41.9%)、アストロサイト (40.5%)、オリゴ前駆細胞 (14.5%) が GFP 陽性細胞であった。一方で神経前駆細胞や成熟ニューロンには GFP 陽性細胞は認めず、今回用いたレトロウイルスは上記グリア細胞特異的に感染することを確認した。

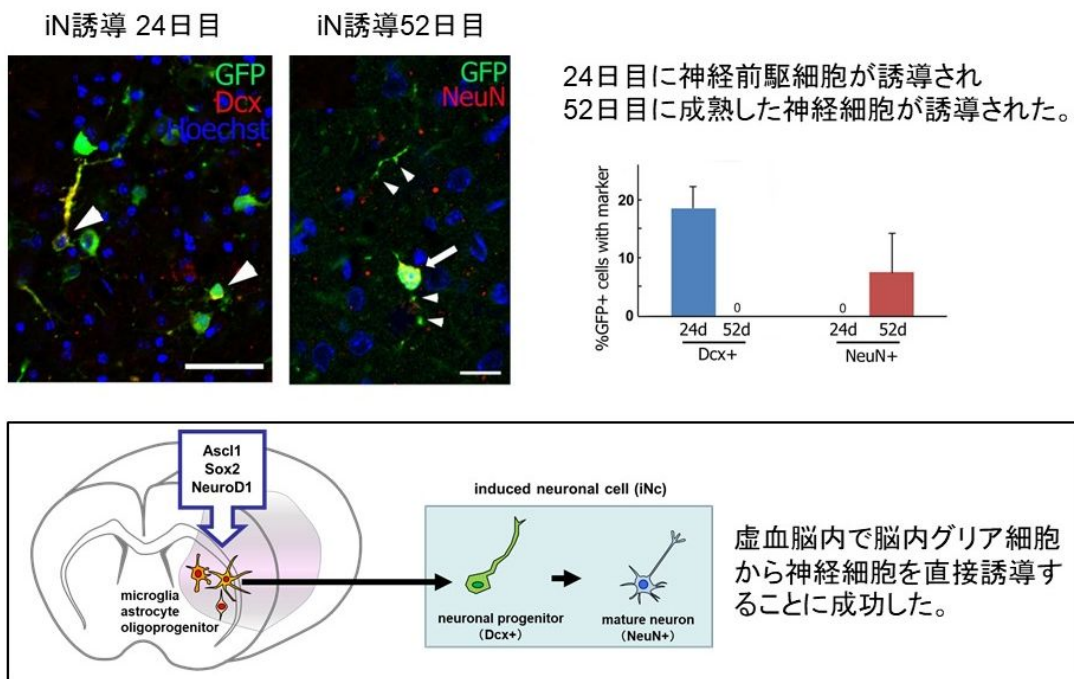
次に本実験として 8 週齢オスの ICR マウスを 2 群 (n=13, n=14) に分け、30 分一過性中大脳動脈脳虚血 3 日後に精製レトロウイルス pMX-GFP と pMX-Ascl1 + pMX-Sox2 + pMX-NeuroD1 (計 $1.5-2.0 \times 10^7$ /ul) を虚血周辺部に投与を行い、7, 21, 49 日後に運

動機能評価と組織学的検討をそれぞれ行った。

4. 研究成果

レトロウイルス投与後7, 21日後において、GFP陽性細胞の一部がDcx陽性神経前駆細胞に誘導されており、49日後にはNeuN陽性細胞が誘導されていることが確認できた。また誘導されたNeuN陽性細胞は長い軸索とシナプス様構造を持つなど成熟ニューロンに非常に類似した形態を示していた。一方、Bedersonスコアやコーナーテスト試験においては有意な治療効果は見出すことは出来なかった。以上の研究結果を英語論文にまとめ、Scientific Reports誌に報告した(図1、文献1)。今回、神経特異的転写因子であるAscl1やSox2、NeuroD1を脳内グリア細胞に強制発現させることで、神経系細胞に直接的に誘導することができ、脳梗塞で一旦失われてしまった神経細胞も、周囲に豊富に残っているグリア細胞から誘導し補充できる可能性が示すことが出来た。今後3つの転写因子を発現できる高力価ポリシストロニックベクター等を用いるなど、誘導効率を更に向上させると共に安全性を確立し、脳梗塞患者の運動麻痺改善に寄与する治療法開発を進めていく。

図1. 脳内グリア細胞から誘導されたiN細胞(文献1から改変引用)



Yamashita T, Abe K et al., Scientific Reports, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita Toru, Shang Jingwei, Nakano Yumiko, Morihara Ryuta, Sato Kota, Takemoto Mami, Hishikawa Nozomi, Ohta Yasuyuki, Abe Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 In vivo direct reprogramming of glial lineage to mature neurons after cerebral ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47482-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita T, Liu W, Matsumura Y, Miyagi R, Zhai Y, Kusaki M, Hishikawa N, Ohta Y, Kim SM, Kwak TH, Han DW, Abe K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Novel Therapeutic Transplantation of Induced Neural Stem Cells for Stroke.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Transplant	6. 最初と最後の頁 461-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096368916X692988.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamashita Toru, Shang Jingwei, Nakano Yumiko, Morihara Ryuta, Sato Kota, Takemoto Mami, Hishikawa Nozomi, Ohta Yasuyuki, Abe Koji
2. 発表標題 In vivo direct reprogramming of glial lineage to mature neurons after cerebral ischemia.
3. 学会等名 Asia Pacific Stroke Conference 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下徹、商敬偉、中野由美子、森原隆太、佐藤恒太、武本麻美、菱川望、太田康之、阿部康二
2. 発表標題 虚血脳内グリア細胞から神経細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法の確立
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下徹、阿部康二
2. 発表標題 脳内グリア細胞からの神経再生実現にむけて
3. 学会等名 第1回先進医薬研究報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 山下徹、阿部康二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 44ページ (担当箇所4 - 5ページ)
3. 書名 メディカルサイエンスダイジェスト ~多様な神経疾患治療に応用可能な次世代型ダイレクトリプログラミング法の開発	

1. 著者名 Houkin, Kiyohiro, Abe, Koji, Kuroda, Satoshi	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 156ページ (担当箇所 39-46ページ)
3. 書名 Cell Therapy Against Cerebral Stroke (iPS Cells and iN Cells)	

1. 著者名 山下徹、阿部康二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1312-1369 計157ページ (担当箇所 1307-1310ページ)
3. 書名 内科 -ダイレクトリプログラミングによる神経再生治療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ

脳梗塞後に神経細胞を新たに生み出すことに成功！～脳内グリア細胞から神経細胞を誘導する新技術を開発～
https://www.okayama-u.ac.jp/upload_files/press2019/press20190927-2.pdf

Rising from the ashes—dead brain cells can be regenerated after traumatic injury
https://www.okayama-u.ac.jp/eng/research_highlights/index_id93.html

新聞報道等

2019.10.20 NHK岡山（テレビ）山下徹、阿部康二、脳内の神経細胞生成に成功
2019.11.6 山陽新聞、山下徹、阿部康二、脳梗塞後の神経細胞再生

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----