

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 2 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16642

研究課題名(和文)ホスト脳環境の至適化による多能性幹細胞移植治療の開発促進

研究課題名(英文)Optimization of the host brain environment for the cell replacement therapy

研究代表者

佐俣 文平 (Samata, Bumpei)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：80779166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成体マウスを用いて皮質傷害後の異なる時期(直後、7日間、14日間、28日間)に胎仔マウス由来皮質神経細胞の移植を行ったところ、傷害後7日目に移植した群で線条体や大脳脚、視床において神経軸索の伸長が認められた。これらの結果を基に、皮質傷害後7日目に増加する遺伝子群を調べたところ、皮質傷害直後と比べて8倍以上の増加を認めた遺伝子が414個明らかになった。さらにこの中から分泌因子24個の組換えタンパク質を作製した。胎児マウス及びヒトES細胞由来皮質神経細胞に対する効果を検証したところ、8個の分泌因子について神経軸索の伸長促進作用を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに大脳皮質細胞を用いた細胞移植実験はいくつか報告されているが、そのすべてが移植細胞の質を改善することに焦点を当てている。本研究成果は宿主脳環境の至適化によって細胞移植の治療効果を高め得るという点に特色がある。また脳環境の至適化に寄与する分泌性因子を明らかにすることができれば、細胞移植時にその候補因子を添加することによって直接的に脳環境を調整することや、その産生細胞を活性化することによって間接的に脳環境を調整することによって細胞移植の治療効果を高められる可能性がある。このように本研究成果は細胞移植治療技術の開発を広範囲でサポートできる極めて汎用性の高い技術と考えられる。

研究成果の概要(英文)：When fetal mouse-derived cortical neurons were transplanted at different times after cortical injury (immediately, 7 days, 14 days, and 28 days) using adult mice, elongation of nerve axons was observed in the striatum, cerebral peduncle and thalamus in the group transplanted 7 day after the injury. Based on these results, we identified 414 genes that highly expressed genes in the group transplanted 7 day after the injury. Among these candidates, we prepared 24 proteins with signal peptide. Finally, it was confirmed that 8 candidates have the effect of promoting the elongation of nerve axons.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 ES細胞 iPS細胞 細胞移植 炎症 神経回路再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患や脳損傷によって大脳皮質のネットワークが遮断されると、失われた神経回路を再構築することは極めて難しい。これまでに種々の治療法が検討されてきたが、その効果は限定的であり、現在は皮質ネットワークの再生を目的とした細胞移植治療が期待されている。

Gaillard らの研究グループは胎仔マウスの運動野組織を用いた移植実験から、移植片の中には皮質ネットワークの再生に寄与する細胞が存在することを明らかにしている (Gaillard et al, Nat Neurosci 2007)。細胞移植治療によって運動機能の回復を目指すためには、脳内に生着した細胞が広範囲にわたって突起を伸展させ、宿主の神経細胞とシナプスを再形成する必要がある。しかし髄鞘化された成熟神経細胞からは軸索伸長阻害因子が分泌されているので、成体の脳は細胞移植治療には不向きな環境と言える。一方で、傷害を受けた脳は活性化したマクロファージやアストロサイトなどから放出されるサイトカインによってその環境が著しく変化している (Lindvall et al, Stroke 2011)。申請者は皮質傷害後の環境が移植細胞に与える影響を調べる目的で予備実験を行ってきた。Gaillard らの研究グループと同様にアスピレーターを使って生後 8 週齢の C57BL/6 マウスの運動野領域に傷害を加え、そこに胎生 14 日齢 EGFP マウス由来の運動野組織を移植したところ、傷害を加えてから 7 日目に移植を行った場合に、傷害直後に移植をした群に比べて細胞生着や軸索新生、軸索伸長が顕著に亢進することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

大脳皮質を対象とした細胞移植治療において、成体の脳環境は軸索伸長阻害因子などが放出されているため移植治療の効果を十分に期待することは難しい。しかし申請者はマウスを用いた皮質傷害モデルにおいて、一過的に移植後の細胞生着等に至適な環境が現れることを見出してきた。そこで本研究では、皮質傷害後の脳環境の変遷の理解、脳環境の至適化に寄与する分泌性因子の同定、分泌性因子とヒト ES/iPS 細胞を組み合わせた新規細胞移植治療法の開発に取り組む。

3. 研究の方法

脳環境の至適化に寄与する分泌性因子の同定

傷害後の脳には免疫細胞やアストロサイト等が集積しているため、その中から脳環境の至適化に寄与する分泌性因子を探索した。最初に、皮質傷害 7 日後で 8 倍以上の増加を認めた遺伝子を 414 個明らかにした。この中からシグナル配列を有す候補を 24 個に絞り込み、全長をクローニングした後に HEK293T 細胞へのトランスフェクションを行った。その後、各候補因子の培養上清液を用いて胎仔マウス由来大脳皮質細胞やヒト ES 細胞由来大脳皮質細胞に対する有効性を検証した。具体的には、ポリ L-リジンとラミニンをコーティングしたディッシュ上で 3 日間または 6 日間の培養を行い、総細胞数や神経軸索長などの変化を評価した。

候補因子を用いる新規細胞移植治療法の検討

上記候補因子の組換えタンパク質を作製するためにプレビパチルス発現系システムの構築を行った。各候補因子のシグナル配列以降をベクターに組み込み、培養上清液を獲得した。次に、ニッケルカラムを用いて His タグ精製を行うことで各候補因子の精製を行った。

細胞移植の際は、候補因子と移植細胞を同部位に直接投与した。移植 1 ヶ月後に灌流固定を行い、凍結脳切片を用いた免疫組織染色法により移植細胞の生着や神経軸索の伸長等を評価した。

4 . 研究成果

11 週齢のマウス皮質領域に傷害を加え、皮質傷害後の異なる時期（直後、7 日間、14 日間、28 日間）に胎生 14 日齢の EGFP マウス皮質領域を移植した。術後 2 ヶ月の時点で還流固定を行い、免疫染色によって移植片の有無を調べたところ、すべての群で半数以上の個体に細胞生着を認めた。また、傷害後 7 日目に移植した群で傷害側の線条体や大脳脚、視床において移植片由来神経突起の有意な伸長を認めた。同群の錐体交叉に逆行性標識試薬を投与したところ、移植片内で逆行性に標識される細胞が複数個認められた。これは移植片由来の神経突起が脊髄付近まで到達していることを示唆する。以上から、皮質傷害後は脳環境が一過性に変遷しており、そのような環境変化は移植細胞における神経突起伸長促進効果を示すことが分かった。

皮質傷害直後および 7 日後における皮質組織の遺伝子発現量が 8 倍以上変化する候補因子を 414 個抽出した。さらにデータベースを用いて候補因子に含まれるシグナル配列の有無から分泌性因子を 24 個に絞り込んだ。最終的に、強制発現細胞株を用いた機能解析を通して候補の絞り込みを行った。最終的に選定された候補についてはプレビパチルス発現システムを用いて組換えタンパク質の作製を行った。培養細胞を用いた実験からは胎仔マウス皮質細胞やヒト ES 細胞由来大脳皮質細胞において神経軸索の伸長促進作用を確認することができた。また細胞移植実験では候補因子と移植細胞を同部位に投与することで、移植細胞の神経軸索伸長作用を示唆する結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----