

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：34441

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18266

研究課題名（和文）脈絡叢を介した神経再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of axon regeneration via choroid plexus

研究代表者

兼清 健志 (Kanekiyo, Kenji)

藍野大学・中央研究施設・講師

研究者番号：20525399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、中枢神経系のメンテナンスを担っている脳脊髄液を産生している脈絡叢に着目し、脊髄損傷治療に応用するために脈絡叢の性質を明らかにし、脈絡叢を介した神経再生メカニズムの一端を明らかにすることであった。本研究によって、脈絡叢上皮細胞の脳室による性質の違い（側脳室由来脈絡叢は幹細胞性があること、第四脳室由来脈絡叢は増殖が早いこと）、脊髄損傷に対する応答、分泌する液性因子が脊髄損傷後の神経再生を促進し、運動機能回復に寄与することが明らかになった。さらに、神経細胞だけでなく、オリゴデンドロサイトにも作用し髄鞘形成も促進することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国には現在10万人を超える脊髄損傷患者があり、損傷部位によっては一生車椅子の生活を強いられているが、有効な治療法は未だ確立されておらず、従来とは異なる観点からの治療法の開発が急務である。本研究によって、脈絡叢の脳室による性質の違い、脊髄損傷に対する脈絡叢の反応、脊髄損傷に対する脈絡叢成分の効果とメカニズムが明らかになった。これによって、脈絡叢を脊髄損傷治療へ応用するための知見が得られたことは学術的に意義深い。本研究で得られた知見をもとにさらに詳細な解析を行い、脈絡叢を最も有効に脊髄損傷治療へ応用することへつながると期待されるため、医療へ貢献できるという社会的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is elucidation of a mechanism of neural regeneration of injured spinal cord via choroid plexus for clinical application. In this study, we clarified the followings. Firstly, the characteristic difference between the choroid plexus epithelial cells from 4th ventricle and lateral ventricle. Secondly, the response of the choroid plexus to spinal cord injury in vivo. Lastly, the effect of soluble factors secreted from choroid plexus epithelial cells on neural regeneration after spinal cord injury. Briefly, the conditioned medium from choroid plexus epithelial cells contributed the axon growth and remyelination by oligodendrocytes, which leads to the recovery of the motor function after spinal cord injury.

研究分野：再生医療

キーワード：脊髄損傷 脈絡叢 神経再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国には現在 10 万人を超える脊髄損傷患者がおり、損傷部位によっては一生車椅子の生活を強いられているが、有効な治療法は未だ確立されておらず、従来とは異なる観点からの治療法の開発が必要である。申請者らは種々の栄養因子を含む脳脊髄液 (CSF) を産生している脈絡叢上皮細胞 (choroid plexus epithelial cell, CPEC) に着目し、脊髄損傷モデルラットに対して CPEC 移植やその培養上清の投与が有効であることを明らかにしてきた。一方で、PBS のみを投与したコントロール群でも、損傷部で一定の神経再生は見られることが分かってきた。このことは、中枢神経も自己再生能力を持っていることを示唆している。これまでの知見から脊髄損傷後に脈絡叢が形態学的に変化していることがわかっていたので、CSF を産生している CPEC が脊髄損傷に応答して自己再生能力の一端を担っていると考えられるが、そのメカニズムはわかっていなかった。

2. 研究の目的

上述のような背景を踏まえて、本研究では脊髄損傷時におこる CPEC の応答を調べることで、CPEC を介した神経再生メカニズムの一端を明らかにし、自己再生能力を利用した、細胞移植を必要としない神経再生治療の新たな方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

CPEC の単離・初代培養は、3~4 週齢のラットの側脳室および第四脳室から脈絡叢を採取し、酵素処理後、ポリ-L-リジンコートしたディッシュ上で 10% FBS 含有 DMEM で培養した。培養上清 (CPEC-CM) は、無血清培地に交換して 24 h もしくは 48 h 後の培地を回収し、遠心分離後の上清を回収することで調製した。

ニューロンやその他のグリア細胞の単離・初代培養はマウスで確立してきた方法 (Kanekiyo et al. *J Neurosci* 2013) をラットに応用して行った。略説すると、ニューロンは SD ラットの新生仔の海馬から、グリア細胞は大腦から、接着性の違い、密度勾配遠心、レクチン-免疫パニン各グリア細胞を単離し、それぞれ至適培地で培養した。

(2) 脊髄損傷モデルラットの作製

8-9 週齢のメスの SD ラットに New York University impactor を用いて圧挫損傷を与えることで脊髄損傷モデルラットを作製した。CPEC-CM の投与は、損傷直後から、浸透圧ポンプを用いて第四脳室から脳脊髄液経路で 1 週間もしくは 2 週間にわたって投与した。コントロール群には DMEM のみを同様に投与した。運動機能の評価は、Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) スコアを用いた。組織の解析は、4% PFA による灌流固定後、30% スクロース置換した組織をクリオスタットで 10 μm 厚の切片にし、クレストコートスライドガラス (Matunami) に貼り付けた。その後、各種抗体を用いた免疫組織化学染色や HE 染色を行い、光学顕微鏡での観察を行った。また、一部の個体は 2.5% GA, 2% PFA/PB で固定し、電子顕微鏡 (H-760, Hitachi) での観察を行なった。

(3) 免疫組織化学染色

凍結切片に対して、0.3% Triton X100 を添加した Blocking One Histo (Nacalai) を用いて、5-10 min 透過処理とブロッキング処理を行った。次いで、一次抗体を室温で一晩、二次抗体を室温で 30 min 反応させた。核染色のために 0.3 μM DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Nacalai) を二次抗体溶液に添加して反応させた。一次抗体と二次抗体の希釈には、Blocking One Histo を PBS で 1/20 に希釈したものをを用いた。Fluoromount/Plus (Diagnostic BioSystems) を用いてカバーガラスをかけた後、蛍光顕微鏡 (Axio Imager M1 utilizing AxioVision software, Carl Zeiss) で解析した。取得画像の定量解析には ImageJ software (NIH) を用いた。

4. 研究成果

本研究で得られた多くのデータは未発表なため詳細を記載することはできないが、得られた成果の概要を以下に報告する。

(1) 脈絡叢上皮細胞 (CPEC) の培養条件の確立

これまでの研究では、第四脳室と側脳室由来の CPEC を区別せず混ぜて 10% FBS 含有 DMEM (High-glucose) で培養していたが、本研究では第四脳室と側脳室由来の CPEC の性質の違いまで明らかにすることを視野に入れていたので、まずそれぞれの CPEC の至適培養条件を検討した。種々の基本培地やディッシュのコート剤、血清濃度等を検討した結果、いずれの脳室由来の CPEC も poly-L-lysine コートのディッシュ上で 10% FBS 含有 α -MEM を用いたものが最も増殖が早く、形態学的なコンディションも良かったので、これを至適培養条件とした。

(2) *In vitro* での第四脳室由来 CPEC と側脳室由来 CPEC の違い

まず、第四脳室由来 CPEC と側脳室由来 CPEC の違いを明らかにするために、前述した指摘培養条件でそれぞれを培養した。まず、免疫細胞化学的手法でタンパク質レベルでの種々の因子

の発現の違いを比較検討した。その結果、驚くべきことに、側脳室由来の脈絡叢上皮細胞の多くは未分化マーカーとして知られる Sox2 を発現していたが、第四脳室由来の脈絡叢上皮細胞は Sox2 を全く発現していなかった (図 1)。このことは、側脳室の脈絡叢上皮細胞は分化能を持った状態で待機し、脊髄損傷などの中枢神経系の障害時に目的部位に遊走し、必要な細胞に分化することで自己修復の一端を担っていることを示唆している。その仮説を実証するために、遊走については現在 *in vivo* で検証中である。

次に、細胞増殖能について比較した。12-well plate 上に、第四脳室と側脳室由来の脈絡叢上皮細胞をそれぞれ同数播種し至適培地で培養し、経時的に細胞を計数したところ、第四脳室由来の脈絡叢上皮細胞の方が顕著に細胞増殖が早かった。さらに、異なる原理によって増殖能を検討するため WST-8 を用いた比色定量法により解析を行った。その結果、第四脳室由来の脈絡叢上皮細胞の方がいずれのタイミングでも吸光度が高かったことから、側脳室由来脈絡叢上皮細胞の方が増殖能が高いことがわかった (data not shown)。加えて、実際に細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を免疫細胞化学染色によって比較したところ、やはり第四脳室由来の脈絡叢上皮細胞の方が Ki-67 陽性細胞が多くみられた (図 2)。これらのことから、第四脳室由来の脈絡叢上皮細胞は、側脳室由来脈絡叢上皮細胞より細胞増殖能が高いことがわかった。第四脳室の脈絡叢はそれ自身が分化するのではなく、産生する液性因子を介して中枢神経系の再生に寄与していることが示唆された。それを明らかにするために、現在、両脈絡叢上皮細胞が産生する液性因子について遺伝子レベルとタンパク質レベルで比較解析を進めている。

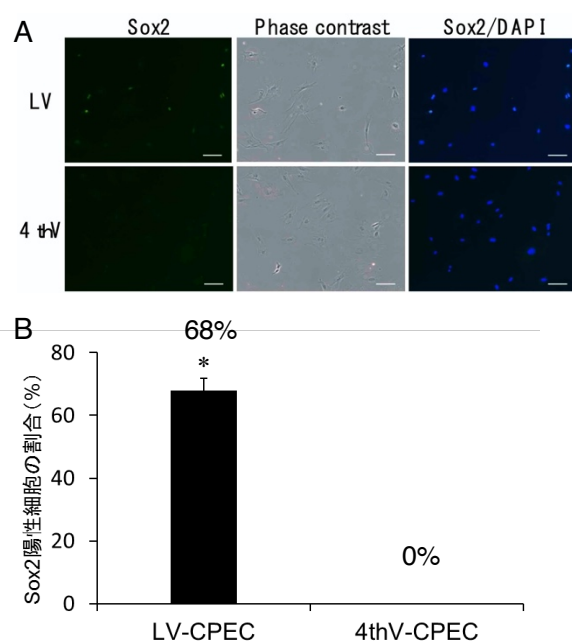


図 1 側脳室由来 CPEC (LV-CPEC) と第四脳室由来 CPEC (4thV-CPEC) の Sox2 の発現

A. PLL コートした 8-well chamber slide 上に LV-CPEC 及び 4thV-CPEC を 8×10^3 個/well ずつ播種し、 α MED 中で培養した。1 日後、4% PFA 固定し、Sox2 (緑) に対して免疫細胞化学染色を行った。核染色は DAPI (青) で行った。位相差 (Phase contrast) で非染色の細胞画像を撮影した。Bar = 100 μ m.

B. LV-CPEC (■) と 4thV-CPEC (□) で Sox2 陽性細胞を 3 視野から計測し、核 (全細胞) との割合を示した。また、平均及び標準偏差を示した。(n = 3) * $p < 0.01$ vs 4thV-CPEC.

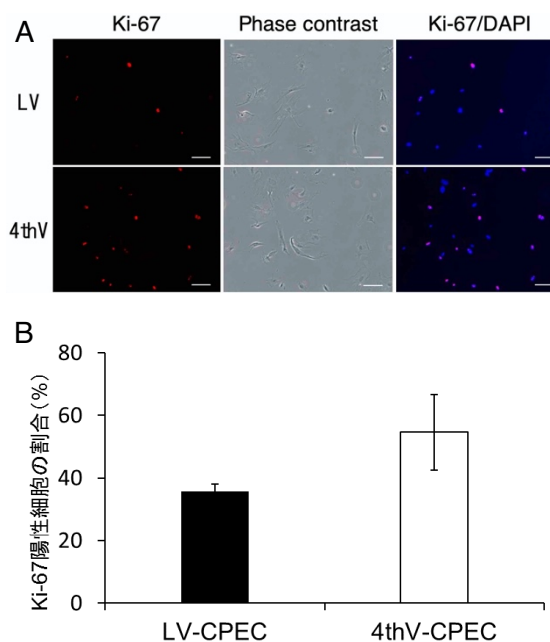


図 2 側脳室由来 CPEC (LV-CPEC) と第四脳室由来 CPEC (4thV-CPEC) の Ki-67 発現

A. PLL コートした 8-well chamber slide 上に LV-CPEC 及び 4thV-CPEC を 8×10^3 個/well ずつ播種し、 α MED 中で培養した。1 日後、4% PFA 固定し、Ki-67 (赤) に対して免疫細胞化学染色を行った。核染色は DAPI (青) で行った。位相差 (Phase contrast) で非染色の細胞画像を撮影した。Bar = 100 μ m.

B. LV-CPEC (■) と 4thV-CPEC (□) で Ki-67 陽性細胞を 3 視野から計測し、核 (全細胞) との割合を示した。また、平均及び標準偏差を示した。(n = 3)

(3) *In vivo* での第四脳室脈絡叢と側脳室脈絡叢の違い

In vitro の結果を受けて、今度は側脳室と第四脳室由来脈絡叢上皮細胞の *in vivo* での生理的な違いを調べるために、正常ラットの脳の凍結切片について免疫組織化学的な解析を行った。その結果、正常ラットではいずれの脳室の脈絡叢上皮細胞もほとんど未分化マーカーを発現しておらず、近傍の上皮細胞が発現していた。例外的に、SSEA-3 は両脳室の脈絡叢上皮細胞の一部で発現が認められた。

次に、脊髄損傷による反応をみるため、圧挫損傷を与えたラットの脳の凍結切片について免疫

組織化学的な解析を行った。その結果、Sox9 は両脳室の脈絡叢上皮細胞に同程度発現が認められた。一方で、SSEA-3 は第四脳室よりも側脳室の脈絡叢上皮細胞で発現が増加した。

これらのことから、*in vivo* でも脊髄損傷後に側脳室の脈絡叢上皮細胞で未分化マーカーの発現が高いことがわかった。今回、脊髄損傷から6週後（慢性期）のラットの脳のみを解析したため、今後さらに、急性期の脊髄損傷ラットも解析することで経時的な脈絡叢上皮細胞の反応を脳室ごとに明らかにしていく予定である。

(4) 脊髄損傷モデルラットに対する脈絡叢上皮細胞の培養上清 (CPEC-CM)の効果とそのメカニズム

脈絡叢上皮細胞の分泌する因子が脊髄損傷に及ぼす効果とそのメカニズムを明らかにする目的で、圧挫損傷モデルラットに脈絡叢上皮細胞の培養上清 (CPEC-CM) を脳脊髄液経路で持続投与し、経時的に BBB スコア評価による行動解析および損傷脊髄の組織学的な解析を行った。行動解析の結果、脈絡叢上皮細胞の培養上清を投与した群ではコントロール群に比べて有意に行動の回復がみられた (図3)。免疫組織化学的な解析の結果、CPEC-CM 投与群では脊髄損傷部の再生神経密度が有意に高くなっていった (data not shown)。さらに、再生神経の髄鞘を調べた結果、CPEC-CM 投与群で有意に髄鞘密度が高くなっていった (図4)。これらのことから、CPEC-CM はこれまでわかっていたニューロンの軸索伸長を促進する作用だけでなく、髄鞘の形成も促進する作用も有していることが明らかになった。再生軸索の髄鞘の一部はシュワン細胞によって形成されることがわかっているので、シュワン細胞の密度を調べた結果、CPEC-CM 投与群とコントロール群に差はなかった (data not shown)。このことから、CPEC-CM はシュワン細胞ではなく、オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成を促進することが示唆された。現在、組織や細胞培養系で CPEC-CM が実際にオリゴデンドロサイトやその前駆細胞に作用しているかどうか解析中である。

本研究によって、脈絡叢上皮細胞の脳室による性質の違い、脊髄損傷に対する応答、分泌する液性因子が脊髄損傷治療に有効であり、髄鞘形成も促進することが明らかになった。今後さらに詳細な解析を行い、最も有効に脊髄損傷治療へ応用するには液性因子をどう使うか、内在的な脈絡叢をどう活性化させるかを詰めて行く。

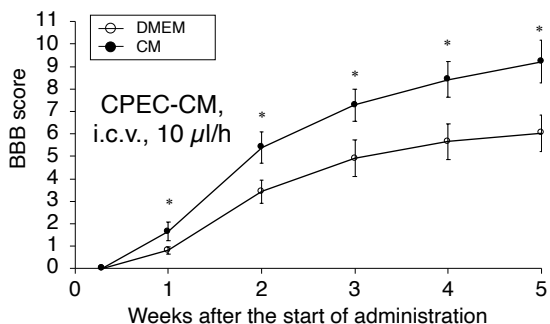


図3 BBB スコアによる行動評価
圧挫損傷モデルラットに脈絡叢上皮細胞の培養上清 (CPEC-CM) を脳脊髄液経路で投与し、毎週 BBB スコアによる行動評価を行った。コントロール群には無血清の DMEM を用いた。また、平均及び標準偏差を示した。(n = 8 for DMEM and 7 for CM). **p* < 0.05.

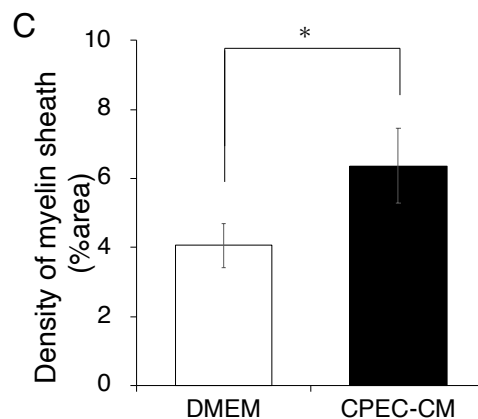
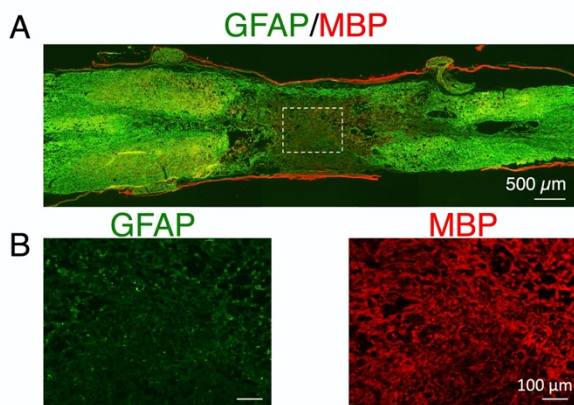


図4 損傷部における髄鞘密度

圧挫損傷モデルラットに脈絡叢上皮細胞の培養上清 (CPEC-CM) を脳脊髄液経路で投与し、5週間後に固定して作製した凍結切片について免疫組織化学染色による解析を行った。コントロール群には無血清の DMEM を投与した。

A. CPEC-CM 群について、アストロサイトマーカーである GFAP と髄鞘マーカーである MBP で二重染色した画像。GFAP 陰性エリアが損傷部に対応している。

B. A の点線の範囲を拡大した像。

C. 免疫組織化学染色の画像を統計処理したグラフ。損傷部中の髄鞘を形成している面積の割合を損傷部 (GFAP 陰性エリア) の面積に占める髄鞘 (MBP 陽性エリア) 面積で示した。(n = 8 for DMEM and 7 for CM). **p* < 0.05.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Norihiko, Kanekiyo Kenji, Yamada Yoshihiro, Tamachi Masahiro, Suzuki Yoshihisa, Fukushima Masatoshi, Saito Fukuki, Abe Seiya, Tsukagoshi Chihiro, Miyamoto Chimi, Ide Chizuka	4. 巻 1707
2. 論文標題 Structures of filum terminale and characteristics of ependymal cells of its central canal in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 208 ~ 215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.11.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanekiyo K, Wakabayashi T, Nakano N, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima M, Saito F, Abe S, Tsukagoshi C, Miyamoto C, and Ide C.	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of Intrathecal Injection of the Conditioned Medium from Bone Marrow Stromal Cells on Spinal Cord Injury in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 521-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2017.5201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanekiyo K, Nakano N, Homma T, Yamada Y, Tamachi M, Suzuki Y, Fukushima M, Saito F, and Ide C.	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of Multiple Injection of Bone Marrow Mononuclear Cells on Spinal Cord Injury of Rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 3003-3011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2016.4841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ide C., Nakano N, Kanekiyo K, Yamada Y, Homma T, Tamachi M, Abe S, Miyamoto C, Tsukagoshi C.	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of trophic factors on the treatment of spinal cord injury in rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Aino Journal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kenji Kanekiyo, Norihiko Nakano, Seiya Abe, Chihiro Tsukagoshi, Chimi Miyamoto, Chizuka Ide
2. 発表標題 Effects of Conditioned Medium from Bone Marrow Stromal Cells on Rat Spinal Cord Injury
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakano N, Kanekiyo K, Kunii S, Morimoto K, Omae K, and Ide C
2. 発表標題 Analysis of neuronal cells induced by low adhesive scaffold collagen.
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kanekiyo, Norihiko Nakano, Seiya Abe, Chihiro Tsukagoshi, Chimi Miyamoto, Chizuka Ide
2. 発表標題 Therapeutic effect of injection of conditioned medium from bone marrow stromal cells on rat spinal cord injury.
3. 学会等名 第91回日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野法彦、兼清健志、國井沙織、森本康一、尾前薫、井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経系細胞
3. 学会等名 第59回組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井沙織、兼清健志、中野法彦、加藤暢宏、尾前薫、井出千束、森本康一
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンによる神経細胞の活性化と組織再生機能の検証
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼清健志
2. 発表標題 脊髄損傷治療へ向けた上衣細胞の利用
3. 学会等名 第2回Glycoleague研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野法彦、兼清健志、國井沙織、森本康一、尾前薫、井出千束
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲンを足場とした神経細胞の突起伸長
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼清健志、中野法彦、塚越千尋、宮本陳敏、安部征哉、井出千束
2. 発表標題 ラット終系の構造と中心管上衣細胞の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼清健志、中野法彦、安部征哉、塚越千尋、宮本陳敏、井出千束
2. 発表標題 脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間質細胞培養上清の効果
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼清健志、中野法彦、安部征哉、塚越千尋、宮本陳敏、井出千束
2. 発表標題 脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間質細胞培養上清の脳室内投与の効果
3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼清健志
2. 発表標題 脊髄損傷治療へ向けた脈絡叢上皮細胞の利用
3. 学会等名 第1回 Glycoleague研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanekiyo K, Nakano N, Suzuki Y, and Ide C
2. 発表標題 Therapeutic effect of multiple-injection of bone marrow-derived mononuclear cells on rat spinal cord injury
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sakuda K, Kitazume S, Kanekiyo K, et. al.
2. 発表標題 Analysis of astrocytes with brain specific branched O-mannosyl glycans in demyelination
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kanekiyo K, Nakano N, and Ide C
2. 発表標題 Therapeutic potential of choroid plexus epithelial cells for spinal cord injury
3. 学会等名 International Symposium, Systems Glycobiology and Beyond, Toward a bridge between fundamental research and applied science (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kanekiyo K, Nakano N, Suzuki Y, and Ide C
2. 発表標題 Effects of multiple-injection of bone marrow-derived mononuclear cells on spinal cord injury of rats
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakano N, Kanekiyo K, Nakagawa T, Asahi M, and Ide C.
2. 発表標題 NTAK/neuregulin-2 secreted by astrocytes promotes survival and neurite outgrowth of neurons via ErbB3.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中野法彦、兼清健志、井出千束	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 Bio Clinica	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名称：神経細胞培養材および神経損傷治療剤 発明者：森本康一、國井沙織、兼清健志、中野法彦、井出千束、尾前薫 出願人：学校法人近畿大学、学校法人藍野大学、公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 出願番号：国際特許、特願：PCT/JP2019/003502特開：W02019/151450</p>

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
研究協力者	井出 千束 (Ide Chizuka)		
研究協力者	中野 法彦 (Nakano Norihiko)		
研究協力者	鈴木 義久 (Suzuki Yoshihisa)		