

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16594

研究課題名（和文）オプトジェネティクスによる幹細胞移植後の神経細胞の機能評価

研究課題名（英文）Functional evaluation of transplanted neural stem cells by optgenetics

研究代表者

梅林 大督（Umebayashi, Daisuke）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：90635575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷モデルの作成と電気生理学的、運動機能の評価法を確立した。神経幹細胞の未分化性を確認し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分裂能と多能性を免疫染色にて評価した。チャンネルロドプシン2、ハロロドプシンのプラスミドを用いてレンチウイルスベクターを作成（CS2-CAG-ChR2-mVenus、CS2-CAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2-WPRE）。これにより光誘導遺伝子の細胞への導入を可能とした。HEK293TFT細胞へのtransfectionに成功し、今後神経幹細胞に導入して移植実験を開始する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光感受性遺伝子導入神経幹細胞を作成し、神経幹細胞の機能をリアルタイムに興奮・抑制させることにより、その神経再生への機序を明らかにする実験系への確立に貢献した。これにより、神経幹細胞の再生効果が細胞自体の増殖によるものか液性因子によるものかの探索が今後期待でき得る。

研究成果の概要（英文）：We established the mouse spinal cord injury model, following to regulate electrophysiological and motor score systems.

Neural stem cells were cultured and estimated their multipotency. Lentivirus of CS2-CAG-ChR2-mVenus-ST, CS2-CAG-eNpHR3.0-mRuby2-ST, and CS2-CAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2-ST using HEK293FT cells were produced. These optogenetics are ready to transfect the neural stem cells. We are starting to evaluate these optogenetics in vivo.

研究分野：脳神経機能再生外科学

キーワード：チャンネルロドプシン ハロロドプシン プラスミド ウイルスベクター 神経幹細胞 トランスフェクション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞移植は脊髄損傷の治療として臨床応用が期待されている。しかし、漠然と幹細胞を移植しただけではその効果は期待できないことが明らかになりつつある。神経幹細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化するが、移植細胞がニューロンに分化して定着したとしても神経回路に組み込まれて機能していなければ機能再生には貢献しない。ニューロンの移植の効果が乏しいのであればオリゴデンドロサイト前駆細胞などの移植で十分であり、神経幹細胞としての移植は必要ない。

また、幹細胞移植においては移植細胞自体が定着して機能することと、細胞移植時に移植細胞から分泌される神経栄養因子の効果の双方が神経再生に影響していると考えられている。神経栄養因子の効果の方が、定着した移植細胞の機能による再生効果よりも大きいという報告もある。もしも、移植した細胞自体よりも神経栄養因子の効果の方が大きいのであれば、細胞自体の移植は必要ではない。しかし、移植による神経栄養因子の効果ではなく、定着した移植細胞自体が機能していることを判断するには、一度定着した神経細胞を欠損させる方法しかなかった。具体的にはドキシサイクリンなどを用いて遺伝子発現を抑制させたりする方法であり、神経細胞を欠損させることに一定の時間を要する。そのために評価に時間差が生まれることから運動機能評価などにおいては差を見出しにくいこと、また移植細胞から分化した神経細胞の存在を確認しても実際にその細胞が神経回路の内へ構築され神経細胞としての機能を果たしているかの評価が困難であったことが問題であった。

2. 研究の目的

オプトジェネティクスは、特定の神経に光感受性活性化タンパク質を発現させ、低侵襲な光を照射することにより神経活動を人為的に制御する手法である。例えば、代表的な光感受性タンパク質の一つであるチャンネルロドプシン2 (Channelrhodopsin-2: ChR2) は、緑藻類から単離された分子で、青色光により活性化され、陽イオンチャンネルを開く。ファイバーグラスを通して発光ダイオードで青色光刺激を加えることにより、神経細胞に脱分極を起こすという手法である。また逆に、chloride transporter であるハロロドプシン (Halorhodopsin) を発現させ、黄色光刺激で過分極を起こすことにより、神経細胞の発火を抑制することもできる。

神経幹細胞に光感受性タンパク質を導入後に培養し、神経損傷モデルに移植して、その後に光刺激で移植後定着した神経細胞を活性化、抑制させ移植された神経細胞の寄与の大きさを評価することにより、神経細胞への分化する細胞移植の要否を判断する。結果によって、今後に必要な移植細胞の種類が限定できる。今までも移植細胞に薬剤耐性遺伝子などを組み込み、移植後に薬剤により死滅させて効果を研究する実験は行われてきたが、本研究においては移植細胞を生きたまま興奮、抑制させることにより、その細胞の実際の機能を観察することが可能となり得る。

3. 研究の方法

マウスモデルの確立：脊髄損傷マウスにおいて、Behavior score と電気生理学的手法を用いて移植細胞の機能を判定する。具体的には評価法としては以下のものを用いる。

運動機能評価：BMS for locomotion (Basso et al. Journal of Neurotrauma. 3. 635-659, 2006)

Inclined plane test (ボードを水平面より 90 度まで固定可能な装置を作成し、各角度に傾けたボードの上に頭を上方向けてマウスを乗せ、5 秒間ボードの上で維持できた最大の角度を記録

する) MEP(motor evoked potential)(マウスの Bregma から 1 mm外側に刺激電極を挿入し、1Hz, 15mA 刺激にて大腿筋からの運動神経誘発電位の波形、振幅を測定する)

光感受性遺伝子導入神経幹細胞の作成: チャンネルロドプシン 2、ハロロドプシンのプラスミドを選択して、大腸菌にてプラスミド増幅させる。それぞれのベクターを作成して、神経幹細胞への導入を行い、光感受性遺伝子導入神経幹細胞の株を樹立する。

移植実験: 神経幹細胞に光感受性タンパク質を導入後に培養し、マウスの脊髄損傷モデルに移植して、その後に光刺激で移植後定着した神経細胞を活性化させる群(チャンネルロドプシン 2 を導入)、抑制させる群(ハロロドプシンを導入)と光刺激を行わない群にわけて評価を行い、移植された神経細胞の寄与の大きさを評価することにより、神経細胞への分化する細胞移植の要否を判断する。結果によって、今後に必要な移植細胞の種類が限定できる。神経栄養因子とオリゴデンドロサイトの移植のみで対応できる可能性も示唆される。マウス神経幹細胞を使用し、移植した神経細胞にオプトジェネティクスによって脱分極や過分極を引き起こすことによって、移植細胞が神経回路内で機能しているのかを判別する。

4. 研究成果

脊髄損傷モデル作成方法の確立のため、まずは実際に 8 週齢程度、C57BL6 約 20g 雌の脊髄損傷モデルを作成してその自然経過を再確認した。また、MEP (motor evoked potential) 機械の刺激条件を調節し、運動機能評価方法の確認のため、inclined plane 台の作成をおこなった。神経幹細胞の光刺激においては、損傷部位の近傍に光刺激装置のカニューレ先端を埋めこむ必要があり、損傷部位の移植幹細胞のオプトジェネティクスによる変化・動態を観察するためには、この部位の移植幹細胞に光刺激が届かなければならない。我々の予定していた実験系においては脊髄損傷モデルを用い光刺激装置 (Teleopto) を埋め込むことを想定していたが、実際に脊髄損傷モデルで背部に Teleopto を埋め込むことは設置部位として不安定性である可能性も考慮され、並行して同様の神経損傷モデルとして、安定性の良い頭蓋骨を利用できる脳損傷モデルの確立も進めた。8 週齢程度、C57BL6 約 20g 雌の皮質運動野を脳挫傷モデルの作成も同様に計画した。

細胞実験では、神経幹細胞の培養を行い、継代させて神経幹細胞のストックを作成した。神経幹細胞を継代培養し、未分化神経幹細胞であることを nestin 抗体にて確認した。さらに、これらの神経幹細胞を分化培地で培養して、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化能を免疫染色 (GFAP, beta tubulin, O4) にて確認した。以上のことから使用する神経幹細胞において、分裂能と多能性を確認して安定した細胞を保存した。

光感受性遺伝子である ChR2 遺伝子および eNpHR3.0 遺伝子導入神経幹細胞の作成のため、当初はエレクトロポレーションによる導入を想定していた。しかし、ハイコピーのプラスミドのエレクトロポレーションによる導入効率が悪く、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入に切り替えた。そのため、まず ChR2 遺伝子および eNpHR3.0 遺伝子のプラスミドを用いてウイルスベクターの作成を行った。ChR2 については CAG プロモーターと結合させレンチウイルスベクター CS⁺-CAG-ChR2-mVenus 作成した。eNpHR3.0 については CS⁺-CAG-MCS-WPRE と pBSK-eNpHR3.0-mRuby2 から、目的のプラスミドである CS⁺-CAGeNpHR3.0-mRuby2 を作成した。しかし、RFP IgG 抗体の eNpHR3.0-mRuby2 の認識が不良であったため、FLAG を挿入して認識できるように新たに CS⁺-CAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2-WPRE を作成することとなった。pCAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2 と CS⁺-CAG-eNpHR3.0-mRuby2 を結合させて CS⁺-CAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2 を作成した。これらのプラスミドを神経幹細胞への導入に先立って、まずは汎用されている HEK293TFT 細胞に

transfection して培養した。免疫染色、ウェスタンブロッティングにて目的遺伝子の導入を確認した。FLAG 抗体による遺伝子導入も確認され、蛍光性や膜移行性は特に問題はない結果を得た。これらのレンチウイルスベクターCS -CAG-ChR2-mVenus および CS -CAG-eNpHR3.0-FLAG-mRuby2 を用いて HEK293FT 細胞に transfection してレンチウイルス の作成を行った。これにより光誘導遺伝子の細胞への導入を可能とした。HEK293TFT 細胞への transfection に成功し、今後神経幹細胞に導入して移植実験を開始する段階に至った。

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
研究協力者	山本 紘之 (Yamamoto Hiroyuki)	京都府立医科大学・脳神経機能再生外科学・大学院生 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関