

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18438

研究課題名（和文）障害海馬での神経幹細胞の枯渇を招かない長期的な神経再生の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on long-term nerve regeneration without depletion of neural stem cells in the damaged hippocampus.

研究代表者

加瀬 義高（KASE, Yoshitaka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00830655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：p38の活性を維持することのできるRK-682はヒトiPS細胞由来のニューロンの神経突起を伸長する効果を有することが明らかになった。老化や神経変性疾患の進行に伴い、神経突起が退化することが知られているが、これに対してRK-682が有用である可能性がある。また、脳傷害に対して、神経幹細胞の移植での再生医療を考えた場合、神経幹細胞にあらかじめRK-682を添加することで、移植後に分化する神経細胞の神経突起を伸長できることが予想され、再生医療に有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でRK-682はp38のリン酸化活性の維持を介して、神経突起伸長に寄与することが明らかとなった。老化に限らず、神経変性疾患では軸索変性が認められることから、RK-682は神経変性疾患に対しても有効である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：RK-682, which can maintain p38 activity, has been shown to elongate neurites of human iPS cell-derived neurons. It is known that neurites degenerate due to aging and neurodegenerative diseases, for which RK-682 may be useful. In addition, RK-682 may be useful in regenerative medicine for brain injury by transplantation of neural stem cells, since RK-682 can elongate neurites after transplantation by adding RK-682 to neural stem cells in advance.

研究分野：神経科学

キーワード：神経突起 ニューロン 老化 p38

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、胎児期だけでなく成体においても日々新たな神経細胞が産出される(神経新生)が、その源の細胞である神経幹細胞 (Neural stem cell; NSC) および神経前駆細胞 (Neural progenitor cell; NPC) は老化に伴い大幅に減少し、神経新生も低下すること、および高齢マウスでは、それにより認知機能障害を引き起こすことが知られていた。近年報告されている間葉系幹細胞、脳内栄養因子等を用いた脳梗塞、脳挫傷モデルマウス治療に関する研究においては、一時的な神経新生は認められるが、それらを用いることにより神経幹細胞の賦活化および神経幹細胞の細胞分裂の末に残存神経幹細胞の枯渇を招く恐れがあり、治療後長期にわたってどのような弊害が出てくるのかわかっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに脳内の神経新生領域において、老化に伴い、NPC 内で p38 の発現が減少することが NPC の加齢依存的な減少の原因であることを発見しており、加えて、p38 の発現が大幅に低下した高齢マウスの側脳室周囲の神経前駆細胞に p38 を強制的に発現させることで、神経新生を促進し、側脳室周囲の脳実質組織の萎縮を防ぐことに成功していた (Kase Y et al, Stem cell reports, 2019)。

本研究ではその知見を活かし、マウス海馬歯状回に p38 過剰発現ウイルスベクターを注入し、NPC の加齢依存的な減少を軽減することで神経新生を促し、ニューロンの減少、海馬の萎縮を防ぐことで海馬の傷害による認知機能障害の予防および回復を目指した。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞 (hiPSC) 由来ニューロンの作成方法

(1) hiPSC の培養

201B7 株 (CiRA、京都大学より供与) および 414C2 株 (CiRA、京都大学より供与) の hiPSC は、マイトマイシン C 処理 SNL マウス線維芽細胞フィーダー細胞を用いて、0.5% CO₂ を含む雰囲気下で、0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン (Nacalai Tesque; 26253-84) および 4 ng/ml 線維芽細胞成長因子 2 (FGF-2) (PeproTech; 100-18B) を含む標準的なヒト胚性幹細胞 (hESC) のフィーダー細胞を用いて培養した。

(2) ニューロスフェアの形成

hiPSCs (414C2 株) をマウス胚性線維芽細胞との接着培養で 12 日間培養した後、浮遊培養で 30 日間胚性体を形成させた。凝集した細胞は、培養期間の各日に様々な因子を用いて、hiPSC-NS/PCs 由来の NS/PCs に分化させた。

hiPSC (201B7 系統) を、3 μM の SB431542 (Tocris; 301836-41-9) および 150nM の LDN193189 (StemRD; 1062368-24-4) で 6 日間前処理した。その後、細胞を解離させ、ビタミン A を含まない 2%B27 サプリメント (Thermo Fisher; 17504-044)、20ng/ml FGF-2、10 μM Y27632 (Nacalai Tesque; 08945-71)、1 μM レチノイン酸 (RA; Sigma; R2625-1G)、3 μM CHIR 99021 (Reprocell; 04-0004)、10 μM SB431542 (Calbiochem; 301836-41-9) を低酸素・加湿環境下 (4% O₂、5% CO₂) で 6 日間培養した。形成されたニューロスフェアは、単細胞に解離させて継代した後、培養して神経細胞誘導培地 (ビタミン A を含まない 2%B27、20ng/ml FGF-2、10 μM Y27632、1 μM RA を添加

したMHM)を用いて、4%O₂(低酸素)環境下で6日間培養した。

(3) hiPSC-NS/PC由来のニューロンの分化誘導

hiPSC-NS/PCsをポリ-L-オルニチン/ラミニンコートしたチャンバースライドグラス(Iwaki; 5732-008)にプレATINGした。2%のB27と1%のペニシリン/ストレプトマイシンを添加したMHM培地を用いて、37℃の加湿環境下で14日間培養した。

4. 研究成果

まず、哺乳類成体脳内で内在性のNSC、NPCの賦活化により神経新生を促進していく上で、神経新生が老化によりどのように低下していくのかのこれまでの知見を詳細にまとめ、把握しておく必要があった。その内容につき、過去30年分にわたってまとめた結果を論文として執筆し、査読つき国際ジャーナル *Inflammation and Regeneration* 誌にて発表した(Kase Y., Shimazaki T., Okano H., Current understanding of adult neurogenesis in the mammalian brain: how does adult neurogenesis decrease with age? *Inflamm Regen.* 2020;40:10.)。本論文でまとめた内在性NSC、NPCおよび神経新生の老化に伴う生理学的変化の知見を把握した上で、本研究をスタートさせた。

最初に脳内の海馬歯状回でp38を発現させるべく、p38の配列を組み込んだレンチウイルスベクターを作成した。p38は、*p38α*、*p38β*、*p38γ*の4つのサブタイプが存在するが、メジャーアイソザイムであるp38αを選択した。レンチウイルスは、Lenti-X 293T細胞(Takara Bio, Inc., 632180)に、pCMV-VSV-G-RSV-RevおよびpCAG-HIVgp48のレンチウイルスコンストラクトをGeneJuice® Transfection Reagent(Merck Millipore, 70967-6CN)を用いて、一過性にトランスフェクションすることで作製した。効率的な感染を得るために、超遠心分離とPBSへの再懸濁によって調製した高力価(>10⁹ IFU/mL)の濃縮ストックを作成した。

次に、ウイルスベクターを海馬に局所注入する条件検討の実験を行った。目的の部位に注入でき、かつ注入された細胞が生存しているか確かめるために、ffLuc Lentivirus (titer 2.5×10⁸/ml)を用いてIVISにて観察した。B6/Jマウスのbregmaからanteroposterior -2.0 mm, lateral ±1.5 mm, depth 1.7 mmの位置に31G針でffLuc Lentivirusを2μL注入し、ルシフェリンを体重1gあたり150μg投与して観察した(Figure 1)。

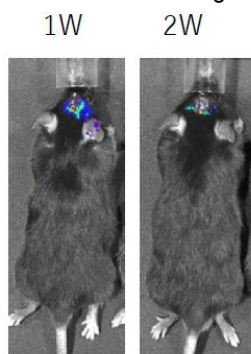


Figure 1: 海馬へのウイルス注入手技が成功している図。投与後1週後(1W)と2週後(2W)。

ウイルスベクターを局所注入後、ウイルスベクターが導入された細胞は生存させることができ、この段階で局所注入の手技としては成功していた。次のステップとして実際にp38過剰発現ウイルスベクターを導入した。しかしここで、問題が生じた。

上述したように、これまでに我々は、腔になっているような側脳室にp38発現ウイルスベクターを注入する実験は成功していたのだが、側脳室のような腔内に注入するのではなく、実質組織に注射で注入すると、傷つけた箇所の炎症を惹起してしまう現象が生じてしまった。実質組織に局所注入する際にはどうしても、組織を壊して針を侵入させることになる。化合物や炎症に関係

しない遺伝子(タンパク質)なら問題とならないが、今回用いている p38 は急性期炎症に関与するタンパク質であり、この炎症効果が当初想定していたよりも大きく作用してしまった。またウイルスの titer や投与量を調整しても炎症を惹起し周囲の神経細胞死を招く結果となってしまった。ここで研究遂行の戦略を練り直す必要が出てしまった。

そこで我々は海馬にウイルスを直接注入して神経機能の向上を目指すのではなく、化合物をマウスに腹腔内ないしは静脈投与することで海馬の神経機能を維持することを目指した。まず in vitro レベルで、p38 を活性化し神経前駆細胞の増殖ないしは神経機能を向上させる化合物の同定を目指した。

ここで注目した化合物が、RK-682 である。RK-682 は Streptomyces 属から単離された化合物で、脱リン酸化酵素の阻害剤として働く。p38 のリン酸化状態に対しては特に、tyrosine 残基のリン酸化の脱リン酸化を阻害する (Figure 2)。

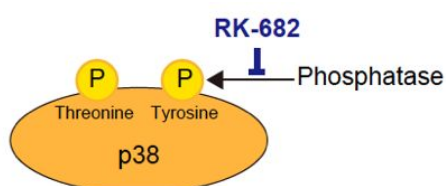


Figure 2: RK-682 の p38 における脱リン酸化酵素の阻害様式。

これまで RK-682 の神経領域における研究応用例はなかったが、まず我々はこの化合物を神経細胞(ニューロン)へ添加した時の毒性や効果をシャーレ上で検証した。ここで用いたニューロンは将来的な応用を見据えたこと、および動物愛護の観点からヒト iPS 細胞 (human induced pluripotent stem cell; hiPSC) から分化誘導して作成したニューロンを用いた。その作成方法については、方法のセクションに記述した。

ヒト iPS 細胞由来の NSC および NPC の集合体である human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neural stem/progenitor cells (hiPSC-NS/PCs; neurospheres)を作成し、それらに、RK-682(20 μM)の添加処理を約 24 時間施したのちに、ニューロンへ分化させ培養した。すると、hiPSC-NS/PCs の増殖性は変わらなかったが、ニューロンの神経突起が伸長する効果が確認された (Figure 3)。

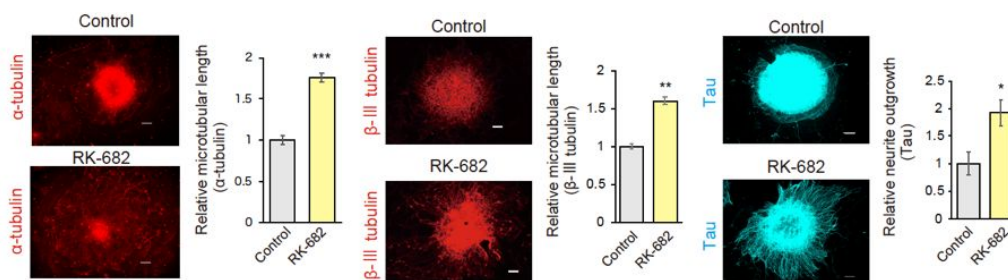


Figure 3: RK-682 による神経突起伸長効果を示した図

左から α-tubulin, β-III tubulin, Tau にて neurosphere から分化させたニューロンを免疫染色し神経突起長を測定している。

また、hiPSC-NSPCs からシングルセルレベルに一旦乖離した後に、ニューロンを作成し、ニューロンへ分化誘導後 5 日目で RK-682 を添加しても突起伸長効果を認めるかどうか検証した。すると、ニューロンへ分化した後の状態からでも RK-682 により神経突起が伸長することが確認された (Figure 4A-4D)

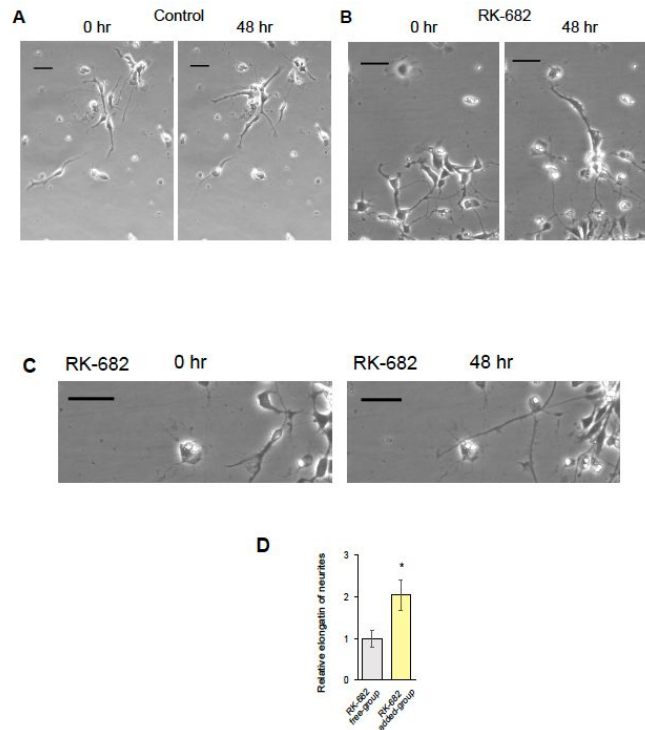


Figure 4: シングルニューロンに分化後に RK-682 を投与しても神経突起長を伸ばすことができる。

(A および B) hiPSC-NS/PCs から神経細胞を分化誘導して 5 日目に、DMSO (A) または RK-682 (B) を添加し、48 時間培養した後、タイムラプス法で得られた代表的な画像を示す。スケールバー：50 μm 。

(C) RK-682 によって伸長した神経突起の拡大画像。スケールバー：50 μm 。

(D) RK-682 を神経細胞に添加し、2 日後に神経突起の伸長の度合いを測定し、定量化した。各実験において、少なくとも 4 つの視野のすべての神経細胞を定量化した ($n=3$; $p=0.0494$)。統計解析には、unpaired two-tailed Student's t-tests を用いた。棒グラフの値は、平均値 \pm SE を表す。* $p < 0.05$

この RK-682 を用いた研究を今後アカデミアで安定して継続していくために「神経突起伸長促進キットおよびその使用」で特許出願を行なった。本研究において、p38 のリン酸化活性を維持することのできる RK-682 はニューロンの神経突起を伸長する効果を有することが明らかになった。老化や神経変性疾患の進行に伴い、神経突起が退化することが知られているが、これに対して RK-682 が有用である可能性がある。

また、脳傷害に対して、神経幹細胞の移植での再生医療を考えた場合、神経幹細胞にあらかじめ RK-682 を添加することで、移植後に分化する神経細胞の神経突起を伸長できることが予想され、再生医療に有用である可能性がある。

< 引用文献 >

Kase Y, Otsu K, Shimazaki T, Okano H. Involvement of p38 in Age-Related Decline in Adult Neurogenesis via Modulation of Wnt Signaling. *Stem Cell Reports*. 2019;12(6):1313-1328. doi:10.1016/j.stemcr.2019.04.010

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kase Y, Sato T, Okano Y, Okano H.	4. 巻 25
2. 論文標題 The GADD45G/p38 MAPK/CDC25B signaling pathway enhances neurite outgrowth by promoting microtubule polymerization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104089	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 Kase Y, Shimazaki T, Okano H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Current understanding of adult neurogenesis in the mammalian brain: how does adult neurogenesis decrease with age?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00122-x	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加瀬義高、佐藤月花、岡野雄士、岡野栄之
2. 発表標題 -secretase inhibitors enhance the neurite growth via modulation of p38 MAPK activation （優秀演題賞）
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加瀬義高、佐藤月花、岡野雄士、岡野栄之
2. 発表標題 ヒトのニューロンにおける神経突起伸長メカニズムの解明と神経突起伸長化合物の探索（優秀発表賞）
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 神経突起伸長促進用キット及びその使用	発明者 加瀬義高、岡野栄之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-089367	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 神経突起伸長促進用キット及びその使用	発明者 加瀬義高、岡野栄之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 21676	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	岡野 栄之 (OKANO Hideyuki)		
研究協力者	佐藤 月花 (SATO Tsukika)		
研究協力者	岡野 雄士 (OKANO Yuji)		

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