

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06853

研究課題名(和文) 脳梗塞におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の形質変化の解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of phenotype changes of oligodendrocyte precursor cells in cerebral infarction and therapeutic application

研究代表者

眞木 崇州 (Maki, Takakuni)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70762334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：下記の研究成果を見出した。1) 脳梗塞マウスモデルにおいて、大脳皮質領域で血管周囲のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)が増加し、血管新生と連動する。2) 高度の低酸素負荷をかけた初代培養系OPCは、血管新生促進因子を多く発現、分泌する一方で、OPC分化因子は低下する。3) 高度の低酸素負荷をかけた初代培養系OPCは、血管新生を促進する作用をもつ。4) 中等度～軽度の低酸素負荷をかけた初代培養系OPCでは、血管新生促進因子が低下する一方で、OPC分化因子は亢進する。5) 高度の低酸素負荷をかけたOPCを脳梗塞モデルマウスに対して移植すると、血管新生が促進し、脳梗塞体積が減少、機能が改善する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寿命の延長とともに脳血管疾患は増加し、心疾患と合わせると日本人の死因の第1位であり、後遺症が残り介助が必要となる原因として、認知症と並んで最も多い。脳梗塞に対する再生医療として、リハビリテーション、ロボットスーツ、神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた細胞移植などの試みがなされているが、十分な改善効果は得られていない。本研究により、脳血管疾患に対する新規治療法が見出されることにより、介護・医療等の社会コストの増加、労働力の低下、介護を要する高齢者による事故の増加などの社会問題を解決することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found the following findings: 1) In a mouse model of cerebral infarction, perivascular oligodendrocyte precursor cells (OPCs) increase in the cerebral cortex in parallel with post-stroke angiogenesis. 2) Primary cultured OPCs subjected to severe hypoxia express and secrete more pro-angiogenic factors and less OPC differentiation factors compared with normal OPCs. 4) Primary cultured OPCs subjected to moderate to mild hypoxia express and secrete a decreased level of pro-angiogenic factors and an increased level of OPC differentiation factors. 5) The transplantation of severe hypoxia-preconditioned OPCs into a mouse model of cerebral infarction promotes angiogenesis, reduces infarct volume, and improves motor dysfunction.

研究分野：臨床神経学、脳血管障害、認知症

キーワード：オリゴデンドロサイト前駆細胞 脳梗塞 血管新生 低酸素 細胞治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の寿命の延長に伴い、脳梗塞の発症数は年々増加傾向にある。超急性期の血栓溶解療法や血栓回収療法による治療法が飛躍的に進歩しているものの、限定的である。急性期に血管の再開通が得られないと後遺症が残ることも多く、死亡に至ることも依然として少なくない。実際に2015年の人口動態統計において脳血管疾患は日本人の死亡原因の第4位であり、要介護の原因の第1位である。脳梗塞後の転帰を改善させるためには、神経細胞死が拡大し機能不全にいたる脳を保護し再生させるような治療アプローチが必要であるが、現時点でそのような方法は存在しない。

上記を達成するための課題として、以下の2つが重要であると考えられる。

神経細胞のみではなく、脳内の神経系・グリア系・血管系と脳外の末梢循環系を一つのユニット("Neurovascular Unit")として、脳を包括的に保護する。

脳梗塞後の障害性の反応を抑制し、内因性再生反応を促進する。

オリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)がミエリン鞘を形成するオリゴデンドロサイト(oligodendrocyte, OLG)の供給源という既知の役割を超えて、神経系・グリア系・血管系との相互連携により、脳恒常性維持のために多くの役割を果たしていることが明らかとなりつつある。研究代表者らは、"perivascular OPC"は血管周囲に存在し血管機能を直接調節することや、"circulating pre-OPC"が末梢循環と脳をつなぐ役割を果たす可能性を見出してきた。また、"parenchymal OPC"が神経系と直接シナプスを形成し両者の間に双方向性の作用が存在することも報告されている。

しかし、脳梗塞後のOPCがどのようにその他の細胞種に影響し、Neurovascular Unitの障害や修復に関与するのかについては不明な点が多く残されている。また、一つの細胞種においても脳内領域や病的環境により多くの形質(phenotype)があることが近年報告されつつあるが、脳梗塞後のOPCの形質変化については未解明の点が多い。OLGと比較してOPCは増殖・遊走能が高く、成人脳において皮質・白質ともに広範囲に存在している。OPCの多彩な機能を合わせて考慮すると、OPCを用いた細胞治療が脳梗塞後の"Neurovascular Unit"を包括的に保護し内因性再生反応を促進する新しい治療アプローチとなる可能性がある。

以上を背景として、「脳梗塞後の病的環境におけるOPCの形質変化を詳細に検討することにより、脳梗塞に対するOPCによる新規細胞治療を開発できないか?」という問いに至った。

### 2. 研究の目的

脳梗塞後の病的環境において、OPCが、どのように神経系、グリア系、血管系を含めた周囲の細胞と相互作用し、病態に関与しているのかを明らかにし、治療応用への基盤を確立することが本研究の目的である。脳内に存在する神経系以外の細胞として、アストロサイト、ミクログリア、血管系に着目した研究は近年増加傾向にあるが、OPCと脳梗塞という観点での研究は依然として少ない。また、脳梗塞後の再生反応を促進する新規治療法として種々の薬物療法、リハビリテーション改良、レーザー治療、骨髄細胞や神経幹細胞などが検討されているが、OPCを用いた細胞治療の報告は現時点で存在しない。さらに、病的環境におけるOPCの形質変化についての報告は少ない。そのため、上記の点を明らかにすることは独自性が高いといえる。また、最終的に脳梗塞の新規治療方法の提供まで行うことを計画しており、臨床適用という観点での創造性に富むものである。

### 3. 研究の方法

研究の方法は、下記のとおりである。

目的1: 虚血負荷による初代培養系OPCの機能・形質変化の解析(培養実験)

目的2: 脳梗塞モデルにおけるOPCの動態の解析(動物実験)

目的3: 脳梗塞モデルに対するOPC移植の至適条件の検討(移植実験)

目的1: 培養実験系において、虚血負荷によるオリゴデンドロサイト前駆細胞の形質変化が他の細胞種に対して与える影響を明らかにする。

オリゴデンドロサイトと神経細胞の作成は、新生ラットと胎生期ラットからそれぞれ初代培養を行い、血管周皮細胞は、ScienceCell Research Laboratoriesより、脳微小血管内皮細胞は、Cell systemsより購入して培養する。血液脳関門(blood brain barrier, BBB)の評価には、脳微小血管内皮細胞を用いたin vitro BBBモデルを使用する。虚血負荷(低酸素・低グル

コース)をした培養 OPC またはオリゴデンドロサイトより調製した培養液 (conditioned media, CM) 中の液性因子が神経細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞の生存、増殖、形質または BBB の機能をどのように制御しているかを media transfer 実験により検討する。

目的 2: 脳梗塞モデル動物における OPC の動態や OPC 欠損による影響を解析する。

脳梗塞モデルマウスは、マウスの中大脳動脈 (middle cerebral artery, MCAO) にフィラメントを挿入し閉塞させる MCA 閉塞モデルを作成する。虚血中心部と虚血周辺領域における OPC の数や形質変化、血管系や神経系との相互作用を免疫染色、ウェスタンブロットなどにより評価する。また、脳内の OPC に特異的な PDGFR- $\beta$  をマーカーとして、MCAS/FACS によりマウス脳から OPC を分離し、脳梗塞後の OPC の遺伝子発現変化を RNA-seq により解析する。OPC 欠損マウスモデルとして、“PDGFR- $\beta$  Cre/ERT / ROSA26-DTRfloxed/floxed マウス (時期特異的に PDGFR-陽性 OPC を欠損させることができる遺伝子改変マウス)”を用いる。OPC 欠損マウスに対して脳梗塞モデルを作成することにより脳梗塞後の内因性 OPC の役割について解析する。

目的 3: 脳梗塞モデルマウスに対する OPC 細胞治療の効果を判定する。

初代オリゴデンドロサイト培養系から OPC を大量に培養し、脳実質内移植または末梢からの移植を行い、至適条件を検索する。これまでの検討から、低酸素負荷により OPC が血管新生を促進する形質に変換する一方で、オリゴデンドロサイトへの成熟化は抑制されることが示唆されるが、脳梗塞後の病態において血管新生が必要な時期とオリゴデンドロサイトや神経の再生が必要な時期は異なる。そのため、様々な負荷や遺伝子導入による OPC の形質変化を詳細に分類することにより、適切なタイミングで適切な形質の (“適材適所の”) OPC を投与できる技術を確認することを想定している。また、OPC 細胞移植のみでは生着率の問題などで効果が不十分な可能性を考え、様々な形質の OPC 由来細胞上清を組み合わせた治療も検討する。

#### 4. 研究成果

脳梗塞病態と関連して、異なるレベルの低酸素環境によって OPC の形質・機能が下記のように変化することを見出した。

1) 脳梗塞マウスモデルにおいて、大脳皮質領域で血管周囲の OPC が増加し、脳梗塞後の血管新生と連動する。

2) 高度の低酸素負荷をかけた初代培養系 OPC は、血管新生促進因子を多く発現、分泌する一方で、OPC 分化因子は低下する。

3) 高度の低酸素負荷をかけた初代培養系 OPC は、培養細胞、動物モデルのどちらの系においても、血管新生を促進する作用をもつ。

4) 中等度～軽度の低酸素負荷をかけた初代培養系 OPC では、血管新生促進因子が低下する一方で、OPC 分化因子は亢進する。

以上のことから、脳梗塞後の領域や時相により、脳内の低酸素レベルが変化することに伴い、OPC の形質や周囲の細胞種との相互連携がダイナミックに変容していく可能性が考えられる。

また、上記の知見をふまえて、高度の低酸素負荷をかけた OPC を脳梗塞モデルマウスに対して、発症 3 日目に移植すると、14 日目において、血管新生が促進し、脳梗塞体積が減少、機能が改善することを見出した。

なお、OPC 欠損マウスを作成するのみで、神経活動が低下することを見出したため、OPC 欠損マウスに対して脳梗塞モデルを作成することは行わず、OPC が直接神経活動を制御する機序について検討を続けている。

脳梗塞に対する再生医療として、リハビリテーション、ロボットスーツ、神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた細胞移植などの試みがなされているが、十分な改善効果は得られていない。本研究により、脳血管疾患に対する新規治療法が見出されることにより、介護・医療等の社会コストの増加、労働力の低下、介護を要する高齢者による事故の増加などの社会問題を解決することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minamiyama Sumio, Sakai Madoka, Yamaguchi Yuko, Kusui Makiko, Wada Hideki, Hikiami Ryota, Tamaki Yoshitaka, Asada-Utsugi Megumi, Shodai Akemi, Makino Akiko, Fujiwara Noriko, Ayaki Takashi, Maki Takakuni, Warita Hitoshi, Aoki Masashi, Tomonaga Keizo, Takahashi Ryosuke, Urushitani Makoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Efficacy of oligodendrocyte precursor cells as delivery vehicles for single-chain variable fragment to misfolded SOD1 in ALS rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 312 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2023.01.008	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4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 眞木崇州
2. 発表標題 Heterogeneity of oligodendrocyte precursor cells in health and disease
3. 学会等名 US-Japan Joint Workshop on the Neurovascular Unit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 眞木崇州
2. 発表標題 脳梗塞におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の役割
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞木崇州
2. 発表標題 脳梗塞後のオリゴデンドロサイト系統細胞の形質変化
3. 学会等名 STROKE2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑田康弘、安田謙、高山直樹、戸田真太郎、綾木孝、高橋良輔、眞木崇州
2. 発表標題 Transplantation of hypoxia-preconditioned oligodendrocyte precursor cells for ischemic stroke
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024年

〔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

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