

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09370

研究課題名(和文)安全かつ高効率誘導を実現する新世代型ダイレクトリプログラミング法の総合的開発

研究課題名(英文) Development of a novel direct reprogramming method realizing safe and highly efficient induction

研究代表者

山下 徹 (Yamashita, Toru)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：60644408

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)：本研究では、低侵襲な経静脈的投与による脳内への遺伝子導入技術を確認し、その治療効果を実証することを目的とした。

まずマウスの血液脳関門(BBB)を高効率に透過できる性質を持つAAVベクターAAV-PHP.eBを用いた遺伝子導入技術を樹立し低侵襲な経静脈的投与による脳内への遺伝子導入技術を確認した。次に脳虚血マウスモデルにこのAAVベクターを尾静注投与し、その治療効果を評価した。その結果、本治療により脳梗塞マウス海馬における神経新生が亢進し、認知機能が一部改善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

このダイレクトリプログラミング法はiPS細胞を経ずに神経系細胞を誘導できることから、腫瘍形成能が非常に低いことが期待されている。in vivoで直接患者脳内のグリア細胞から目的の神経系細胞を誘導し神経ネットワークを再構築できれば、細胞移植治療で問題となる培地内の血清の持ち込みなどの感染リスクの回避できるなど利点が非常に多く、その成果の波及効果は高い。しかしながらこのダイレクトリプログラミング法によって誘導された神経系細胞の治療効果や腫瘍形成能は未知の部分が多く、in vivoの系を利用して評価していくことが重要であり、今後臨床現場で治療応用を行うにあたり非常に重要な基礎的基盤となると言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a minimally invasive transvenous gene delivery technology into the brain and to demonstrate its therapeutic efficacy. First, we established gene transfer technology using AAV-PHP.eB, an AAV vector that can penetrate the blood-brain barrier (BBB) of mice with high efficiency. Next, the AAV vector was injected intravenously by tail injection into a mouse model of cerebral ischemia, and its therapeutic effect was evaluated. The results showed that this treatment enhanced neurogenesis in the hippocampus of mice after cerebral infarction and partially attenuated cognitive dysfunction.

研究分野：脳卒中、神経疾患全般

キーワード：ダイレクトリプログラミング 脳梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本を含めた先進諸国における急速な高齢化は、寝たきり患者の増加という大きな社会問題を引き起こしている。寝たきり患者の原因の約 40%が脳卒中であるが、パーキンソン病や多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患も大幅に増加してきており、その治療法開発が強く望まれている。このことから、脳梗塞や神経変性疾患で一旦失われてしまった神経ネットワーク機能を、幹細胞移植治療や内在性神経再生機構の促進を行うことで修復する「再生療法」の実現が待ち望まれている。

そういった背景の中で、申請者らは特定の転写因子を細胞に発現させることで直接目的とする細胞に誘導する新技術：ダイレトリプログラミング法に着目し研究を継続的に行ってきた。その結果、2019年には脳梗塞の脳内グリア細胞から脳内で直接 iN 細胞を誘導することにも成功し Scientific Reports 誌に発表してきた。ただ、今後の臨床応用への展開を考えると、染色体への組み込みがほぼないとされる安全性の高いアデノ随伴ウイルス (AAV ウイルス) の静注投与による遺伝子導入法の開発が必要と考えている。静注療法が可能となれば、外科的手術や麻酔等の必要もなくなり汎用性の高い治療法になりうる。また脳梗塞だけでなく、ALS を含めた全身に病変が広がる神経変性疾患への応用も行いやすい点でも有利な点が多い。このアデノ随伴ウイルス (AAV ウイルス) の静注投与により iN 細胞を効率的に誘導することができるか？また治療効果を示すことができるのかを明らかにすることは学術的にも重要な課題であった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでダイレトリプログラミング法により皮膚線維芽細胞から神経系細胞 (iN 細胞) を直接誘導する実験系を確立し、マウス皮膚線維芽細胞より直接的に誘導された iN 細胞を脳梗塞マウスモデルに細胞移植を行い、その治療効果と安全性を報告してきた。また、近年脳梗塞後の脳内グリア細胞から脳内で直接的に神経系細胞を誘導することにも成功した。本研究では、これまで培ってきたダイレトリプログラミング技術を脳梗塞のみならず神経変性疾患など多様な神経疾患への治療応用へ展開することが目的である。計画している具体的な研究項目は、低侵襲な経静脈的投与による脳内への遺伝子導入技術を確立し、その治療効果を実証する 3つの異なる遺伝子を 1つのウイルスベクターで遺伝子導入を可能とするポリシストロニックベクターの構築と利用の2つである。

3. 研究の方法： AAV 投与を行うことで実際、虚血後の運動機能や認知機能は回復するのか？

脳梗塞モデルマウスを以下の3群に分け AAV 投与実験を行った。 AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx-Ptbp1 ベクター、 AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasSg ベクター (コントロールベクター)、 同量の溶媒 HBSS。脳梗塞作成後より体重、運動機能の評価のために Bederson's test, Corner test, EBST test, 認知機能の評価のために新規物体探索テストを 28 日目と 56 日目の 2 回測定した。2 ヶ月後に Sacrifice を行い、梗塞体積 (Nissl 染色) 及び mCherry 陽性成熟神経細胞 (NeuN) に群間差が見られるかどうか評価した (図 1-2)。

図1．実験プロトコール

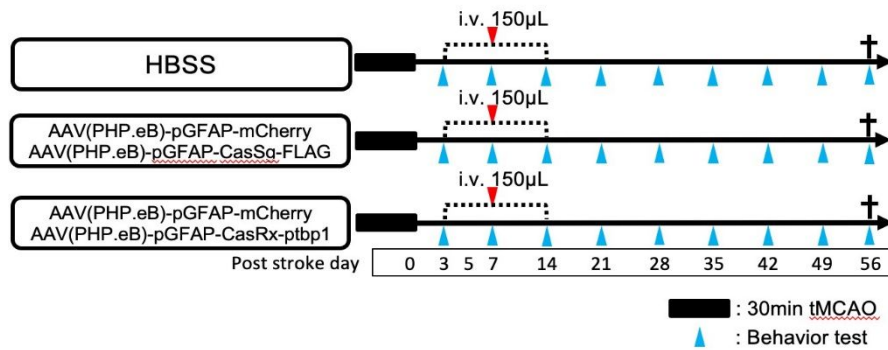
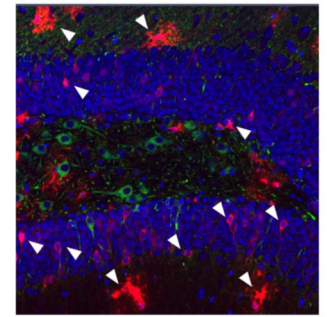


図2．海馬に多くの mCherry 陽性細胞（矢頭）を認めた。



4．研究の方法

運動機能評価では、Bederson's test, Corner test, EBST test 上、3 群間で有意な差は認めなかった。一方、認知機能を評価する新規物体探索テストでのみ CasRx - Ptpb1 KD 群で有意な治療効果を認めた。

脳梗塞体積を評価するために虚血後 56 日後の脳切片を Nissl 染色で評価したところ、脳梗塞体積は HBSS 群、CasRx 群、CasRx - Ptpb1 KD 群の 3 群間で有意な差は認めなかった。また大脳皮質ならびに海馬における神経新生を mCherry/NeuN 2 重陽性細胞数を数えることで評価したところ、大脳皮質では変化はないものの、海馬歯状回における神経新生が有意に増加していることが明らかになった。以上の結果をまとめ、現在英文誌に投稿中である。

また以上の結果から、脳梗塞マウスモデルにおいては、Ptpb1 KD のみでは大脳皮質での異所性神経新生は起こらず、海馬歯状回での神経新生増強効果が発揮されたのではないかと推定された。そのため in vivo で効率的に iN 細胞を誘導するためには、Ptpb1 KD + Ascl1、NeuroD1、Sox2 強制発現を組み合わせ導入する必要があると考えられた。今後、Ptpb1 KD に加えて、Ascl1 + NeuroD1 + Sox2 を発現するポリシストロニックベクターを用いた治療法開発を進めていく予定としている。

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 1件）

1. 著者名 Yamashita Toru, Kushida Yoshihiro, Abe Koji, Dezawa Mari	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-Tumorigenic Pluripotent Reporative Muse Cells Provide a New Therapeutic Approach for Neurologic Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 961 ~ 961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10040961	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下徹、阿部康二
2. 発表標題 BBB通過型ウイルスベクターを用いた新規in vivoダイレトリプログラミング法の開発
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下徹、阿部康二
2. 発表標題 安全かつ高効率誘導を実現する新世代型ダイレトリプログラミング法の開発
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下徹 福井裕介
2. 発表標題 安全かつ高効率誘導を実現する新世代型ダイレトリプログラミング法の開発
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山下徹 阿部康二	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 316
3. 書名 ダイレクトリプログラミング *分担執筆	

〔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
---------	---------