

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09115

研究課題名(和文)片麻痺モデルへの神経細胞シート移植とリーリン/エフリン経路の臨床応用の可能性

研究課題名(英文) Involvements of Reelin/Ephrin pathway for functional recovery of hemiplegic mice with neural cell transplant

研究代表者

鈴木 登 (Suzuki, Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982

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)：片麻痺モデルで神経幹細胞移植を行い運動細胞分化にリーリンからエフリンに至るシグナル経路が果たす役割を解析した。移植神経細胞が損傷部皮質でリーリンを産生しそこでは移植神経細胞と近隣の宿主神経細胞はDab1リン酸化、Aktのリン酸化を誘導した。さらにCREBを活性化してその核内移行をもたらした。Dab1遺伝子欠損マウス由来神経幹細胞に野生型 Dab1 遺伝子を導入するとEphrin BsとApoer-Dab1を含む複合体とシナプス足場タンパク質Gripの共発現を回復した。即ち神経細胞移植での神経ネットワークの再構築にリン酸化Dab1を介する細胞内シグナル伝達が重要なことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は身体機能障害や認知機能障害を引き起こし生活の質を低下させる。さらに介護の負担が増加し、経済的な損失が発生する。医療費の増加や労働力の減少ももたらす。我々は神経幹細胞が片麻痺マウスの運動機能を回復させる事を報告してきた。本研究では神経細胞移植による運動神経回路再構築に関わる細胞分化・成熟による回復メカニズムを可用性分子レベルで解明した。リーリンをはじめとするこれら分子の役割と移植神経細胞と宿主神経組織の関連を明らかにしたことで、今後の神経再生治療法開発のための基盤となる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cell transplantation was performed in a hemiplegic model, and role of the signaling pathway from reelin to ephrin in motor neuron differentiation was analyzed. Transplanted neurons produced reelin in the damaged cortex, where the transplanted neurons and neighboring host neurons induced Dab1 phosphorylation and Akt phosphorylation. In addition, CREB was activated and the phosphorylated CREB was migrated into nuclear. Transfection of wild-type Dab1 genes into neural stem cells derived from mice deficient in the Dab1 gene restored the co-expression of the synaptic scaffold protein Grip with complexes containing Ephrin Bs and Apoer-Dab1. Collectively, it was shown that intracellular signal transduction mediated by phosphorylated Dab1 is important for the reconstruction of neural networks in hemiplegic mice with neural transplantation.

研究分野：再生医学

キーワード：リーリン エフリン 運動神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒト iPS 細胞からレチノイン酸等を用いて神経幹・前駆細胞まで分化を誘導した。この細胞を片麻痺モデルマウスの側脳室近傍に移植した。移植した側脳室近傍から損傷部皮質まで、移植神経細胞が移動しながらシナプトフィジン陽性の神経網を再構築し、マウスの運動機能が改善した。脳損傷マウスでは損傷部グリア細胞からケモカイン SDF1 が産生されていた。移植された神経前駆細胞はその受容体である CXCR4 を特異的に発現しており、神経前駆細胞に作用し更なる分化と損傷部への移動が認められた。実際、CXCR4 の阻害物質を移植マウスに投与すると、神経前駆細胞の移動は認められなくなった。

移動した損傷皮質で残存宿主神経細胞と再接続し、移植部近傍では残存する錐体路と再接続することで、神経細胞移植による運動機能回復がもたらされていた。ここでもちいた移植細胞は神経幹細胞や比較的若い前駆細胞であり、移植後に局所において運動神経への更なる分化を誘導する必要がある。この過程にも SDF1 が作用していた。移植した神経細胞は NCAM、L1CAM を選択的に発現し神経網再構築には NCAM と L1CAM が必須であった。これらの成績から、神経網の再構築にはケモカインとケモカイン受容体および神経接着因子との相互作用が必要であることが示された。

2. 研究の目的

脳卒中は身体機能障害や認知機能障害を引き起こし生活の質を低下させる。さらに介護の負担が増加し、経済的な損失が発生する。社会的にも医療費の増加や労働力の減少ももたらす。交通外傷による頭部外傷もほぼ同様の転帰となる。

我々は神経幹細胞が片麻痺マウスの運動機能を回復させる事を報告してきた。本研究では神経細胞移植による運動神経回路再構築に関わる細胞分化・成熟による回復メカニズムを可溶性分子レベルで解明した。リーリンをはじめとするこれら分子の役割と移植神経細胞と宿主神経組織の関連を明らかにすることで、今後の神経再生治療法開発のための基盤となる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではヒト iPS 細胞をソニックヘッジホッグ、ノジン、レチノイン酸と共培養することで神経幹・前駆細胞を誘導した。大脳運動野を凍結損傷した片麻痺マウスに免疫抑制薬投与下に神経細胞移植を行いその有用性を評価した。移植後に、運動機能の回復を確認して、その脳を回収して迅速に凍結保存した。一部はホルマリン固定した。サンプルを各種の免疫染色を行い、定量的に評価した。

4. 研究成果

細胞質アダプタータンパク質 Dab1 は、リーリンシグナル伝達経路の重要な構成要素として知られている。これまでにリーリン/Dab1 経路欠損マウス由来の神経幹/前駆細胞(NSPC)を片麻痺マウスに移植すると、正常に遊走せず、運動ニューロンにも分化しないことを報告した。

そこで、運動ニューロンの分化におけるリーリン/Dab1 経路の正確な役割を詳細に解析した。最初に、野生型 (WT/WT) マウス由来 NSPC が成熟運動ニューロンに向けて分化する培養系を用いて、運動神経細胞の分化と成熟における Reelin/Dab1 シグナル伝達の役割を調べた。Ctip2、Crim1、Fezf2、Foxp2 は皮質運動ニューロン マーカーとして知られている。運動ニューロンの分化誘導培養を行った後にはこれらの皮質運動ニューロン マーカーすべてが WT/WT 細胞由来 NSPC で発現された。一方、Yot/yot 細胞由来 NSPC は、Ctip2 の発現低下と Crim1、Fezf2、および Foxp2 の局在異常を示しました。機能的に正常な Dab1 遺伝子のトランスフェクションにより、yot/yot 細胞由来 NSPC の各運動ニューロンマーカーの発現と正常な局在がもたらされた。コンピューターデータベースを用いたインシリコ解析で各遺伝子上流にある共通の遺伝子発現経路として予想される pCreb の発現の減少を発見した。神経系をはじめとして、多くの組織形成において ephrin/ Eph Receptor シグナリングの重要に関わることが示されている。WT/WT 細胞由来 NSPC では運動神経分化に伴い Ephrin Bs と Apoer-Dab1 を含む複合体と、Grip などのシナプス足場タンパク質が発現されていた。一方で yot/yot 細胞由来 NSPC では、Ephrin Bs と Apoer-Dab1 を含む複合体と、Grip などのシナプス足場タンパク質の発現を認めないか著しく減弱していた。機能的に正常な Dab1 遺伝子のトランスフェクションは、Ephrin Bs と Apoer-Dab1 を含む複合体とシナプス足場タンパク質 Grip の共発現を回復した。これらの結果は、運動ニューロンへの分化を誘導する実験系を用いた場合に、リーリンの下流に位置する、機能的に正常な Dab1 を活性化することにより、神経受容体複合体のリモデリングとシナプス機能と可塑性がもたらせれる事を示している。これらの成績はリーリンあるいは、その下流の経路を活性化することが、失われた神経機能の再獲得をもたらすことを示唆している。

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
研究分担者	清水 潤 (Shimizu Jun) (30509964)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

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