

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16696

研究課題名（和文）神経幹細胞移植と神経突起伸長促進化合物を組み合わせた外傷性脳損傷の再生治療研究

研究課題名（英文）Research on regenerative treatment of traumatic brain injury by combining neural stem cell transplantation and neurite outgrowth-promoting compounds

研究代表者

加瀬 義高 (Yoshitaka, Kase)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：00830655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：外傷性脳損傷（特にここでは脳挫傷）は交通事故やその他の外的衝撃により引き起こされ、基本的に一度損傷した脳組織は再生することはない。そのような現状を打破すべく本研究では脳挫傷モデルマウスにおける再生治療に挑むことを目的とした。具体的には、これまで研究代表者が研究してきた、hiPSC由来神経幹/前駆細胞移植による脊髄損傷治療の再生研究の知見と、研究代表者が同定した神経突起伸長促進化合物を組み合わせて、この課題に挑んだ。脳挫傷受傷部位にニューロンの神経突起伸長効果を有する化合物を添加したhiPSC-NS/PCを損傷箇所に移植し、欠損した脳の組織レベルでの回復を促すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷は交通事故やその他の外的衝撃により引き起こされ、基本的に一度損傷した脳組織は再生することはない。交通事故などによる傷害により外傷性脳損傷を受傷し脳機能障害をきたすと、救命はできたとしても、その後の生活様式は一変してしまう。そもそも脳挫傷は、脳梗塞に比べて組織自体が欠損してしまうため、再生がより困難という背景もあり、脳挫傷の再生治療研究は脳梗塞に比べるとその報告数は圧倒的に少ないのが現状であり、これまで、外傷による脳組織の欠損自体を回復させ、運動機能に加え、高次脳機能障害をも回復させた報告はなかったため、本研究は意義あるものである。

研究成果の概要（英文）：Traumatic brain injuries, such as cerebral contusions, often result from car accidents or other external impacts, leading to irreversible damage to brain tissue.

In response to this challenge, our study sought to explore regenerative therapy in a mouse model of brain contusion. Our approach involved combining insights from regenerative research on spinal cord injury treatment, utilizing human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cell transplantation, with a compound identified by the principal investigator for its neurite outgrowth-promoting properties.

We transplanted human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells along with a neurite outgrowth-promoting compound to the site of brain contusion injury in mice, successfully promoting recovery at the tissue level in the damaged brain.

研究分野：神経再生

キーワード：神経幹細胞 神経細胞 脳挫傷 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷(特にここでは脳挫傷)は交通事故やその他の外的衝撃により引き起こされ、基本的に一度損傷した脳組織は再生することはない。交通事故などによる傷害により外傷性脳損傷を受傷し脳機能障害をきたすと、救命はできたとしても、その後の生活様式は一変してしまう。

そもそも脳挫傷は、脳梗塞に比べて組織自体が欠損してしまうため、再生がより困難という背景もあり、脳挫傷の再生治療研究は脳梗塞に比べるとその報告数は圧倒的に少ないのが現状であり、これまで、外傷による脳組織の欠損自体を回復させ、運動機能に加え、高次脳機能障害をも回復させた報告はない。

2. 研究の目的

そのような現状を打破すべく本研究では脳挫傷モデルマウスにおける再生治療に挑むことを目的とした。具体的には、これまで研究代表者が研究してきた、human induced pluripotent stem cell (hiPSC) 由来神経幹/前駆細胞 (human induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cell: hiPSC-NS/PC) 移植による脊髄損傷治療の再生研究の知見 (Okubo et al., 2018) と、研究代表者が同定した神経突起伸長促進化合物 (Kase et al., 2002、特願 加瀬義高、岡野栄之 神経突起伸長促進用キット及びその使用 出願番号: 2021-089367) を組み合わせ、この課題に挑むことを目的とした。

脳挫傷受傷部位に神経細胞(ニューロン)の神経突起伸長効果を有する化合物を添加した hiPSC-NS/PC を損傷箇所に移植し、欠損した脳の組織レベルでの回復を促す、そしてこれまで報告のない組織回復と運動機能障害との回復を達成させるべく研究を開始した。

3. 研究の方法

脳の損傷箇所に hiPSC-NS/PC を移植し、欠損した脳組織の回復を行う。しかしながら脳組織のボリュームを回復できたとしても、神経細胞同士のシナプス形成やリレーを回復させなければ運動機能の大幅な回復は望めない。そこで、再生したニューロンの神経突起伸長を亢進させて、神経細胞同士のリレーをも回復させることを試みる。研究代表者らは、 γ -secretase inhibitor の中で、特に Compound 34 が hiPSC-NS/PC からニューロンへ分化させる能力を高く有し、RK-682 という化合物が p38 のリン酸化を維持することでさらに神経突起伸長を促進することを見出している (Kase et al., 2022c、特願 加瀬義高、岡野栄之 神経突起伸長促進用キット及びその使用 出願番号: 2021-089367)。この2つの化合物を hiPSC-NS/PC に前処理として添加し、その後損傷部位に移植することで、外傷による脳組織の欠損の回復と、運動機能障害からの回復までを目標にした研究を遂行することとした。

4. 研究成果

外傷性脳損傷 (TBI; Traumatic brain injury) モデルマウスの作成

外傷性脳損傷モデルマウスの作成については、外傷性脳損傷の中でも直撃損傷 (Coup) の脳挫傷を想定してモデルマウスの作成にあたった。ヒト由来の細胞を移植するため、使用するマウスはメスの BALB/c nude マウス (8-9 週齢マウス) を用いた。

外傷からの回復を目指す正確な再生治療研究を施行するには、同程度の損傷レベルを有した TBI モデルマウスを複数個体にわたって、安定して作成できることが要求されるが、これに関しては慶應義塾大学医学部脳神経外科学教室、高原健人先生の協力を得て施行した。Bregma から 2.5mm 外側、2.5mm 吻側の箇所に冷凍手術装置で、挫傷を作成することで右後肢に局限して麻痺

をきたしたモデルマウスを作成することができた (図 1、 図 2)。

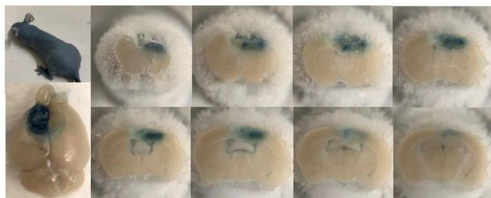


図 1、 TBI 作成後の受傷領域の評価

Evans blue をマウスの尾静脈から投与した。マウスの全身に Evans blue が広がるとともに、脳を受傷部位にだけ Evans blue が浸潤していることがわかる。



図 2、 TBI 作成後のマウスの右後肢に局限して麻痺が生じている

Rotarod test で受傷がないコントロールマウス (左) と異なり受傷マウス (右) では明らかに右後肢に局限して麻痺が生じている。

Hipsc 由来神経幹細胞の作成、ストック化

京都大学 cira (Center for ips Cell Research and Application) より供与していただいた hipsc line 414C2 株を用いて hipsc-NS/PC ストックを作成した。Hipsc-NS/PC を分化誘導し、移植に使用するための神経幹細胞の状態でのストックの作成を行なった。誘導方法は、Okada らが報告した neurosphere (Okada et al., 2008) を作成する浮遊培養系を用いた。

Hipsc-NS/PC 移植による治療介入

上述のように我々は再生治療研究の一環の中で、hipsc-NS/PC から分化した神経細胞において -secretase inhibitor の中でも Compound 34 が特に神経分化する効果、神経突起を伸長する効果が強いことを発見している。さらに、そのメカニズムでは、p38 の活性化 (リン酸化) が正に働いていることが明らかになっており、RK-682 という化合物が、ニューロンでそのリン酸化を維持できることがわかっている (Kase et al., 2022)。さらに、この Compound 34 と RK-682 とを組み合わせて hipsc-NS/PC に添加させてニューロンに分化させると、劇的にニューロンの神経突起が伸長することを発見している (Kase et al., 2022、特願 加瀬義高、岡野栄之 神経突起伸長促進用キット及びその使用 出願番号：2021-089367)。

そこで実験区画としては下記の 4 群とし、移植細胞数は総量 1×10^6 の hipsc-NS/PC とし、2.5ul 懸濁液として挫傷下 3mm に局注した。また移植細胞の投与に関しては、single blind で行った。

グループ hipsc-NS/PC の培養液のみ (培養液に含有されている栄養因子でも回復できてしまうのかどうかの検証目的)

グループ 何も薬剤を添加しない hipsc-NS/PC

グループ Compound 34 (final conc. 2 μ m) を添加した hipsc-NS/PC

グループ Compound 34 (final conc. 2 μ m) + RK-682 (final conc. 10 μ m) を添加した hipsc-

挫傷作成後5日後に細胞移植を開始し、その後1週間ごとに運動能を評価した。

運動能テストとしては、Rotarod test, Beam walking test, 前肢の握力を測定した。Rotarod testでは細胞移植前後の歩行可能時間のindexをとり評価した。すると、group と ではgroup と に比較して成績が悪い傾向にあった。さらに、細胞移植後4週目まではgroup は良好な成績であったが、その後は次第に成績を落とす傾向にあった (図3)。

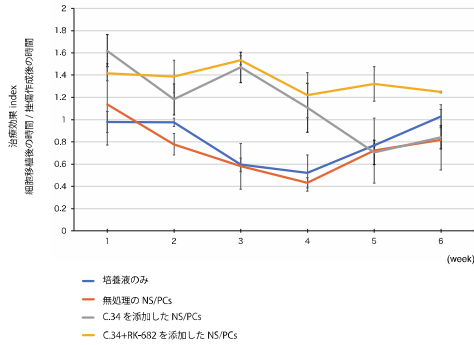


図3、Rotarod testによる各移植群の運動能評価

Compound 34単独投与群、Compound 34 + RK-682投与群のマウスがRotarodに乗っていられる時間が長い傾向にあるが、移植後4週目以降にはCompound 34単独投与群では治療成績が下がっていく傾向にある。

Beam walking testでは、麻痺を起こしている右後肢のスリップ回数を測定した。Compound 34単独投与群、Compound 34 + RK-682投与群のマウスはスリップ回数が少ない傾向にあった。

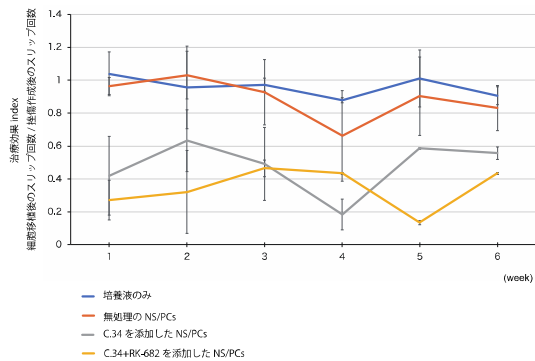


図4、Beam walking testで麻痺側である右後足肢のスリップ回数を測定した。

Compound 34単独群、Compound 34 + RK-682投与群のマウスのスリップ回数が少ない傾向にある。

前肢握力についても測定したが、全グループ間で差はない傾向にあった。

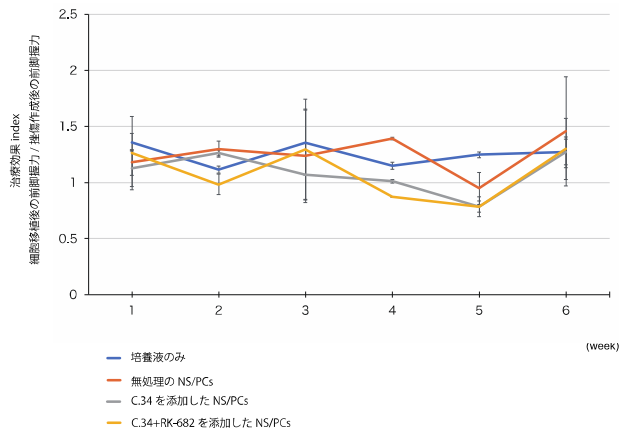


図5、前肢握力の測定。全グループで前肢握力の差はない。

考察

TBIモデルマウスの再生治療研究の前例は少なく、今回の我々の研究でどのような結果が出るのか予想がつかない状況であったが、その結果は驚くべきものとなった。治療開始後1週間目でグループ と で明らかな右後肢のスリップ回数の低減とRotarodにマウスが耐えられる時間が延長された。この傾向は細胞移植後4週目まで継続したが、4週目以降ではRK-682を投与した群の方が良い成績を継続しており、RK-682で前処理したhipsc-NS/PCの方が神経突起を伸長しているのではないかと希望的な予想もできる。ただし、このようなマウス行動実験は繰り返しの実験が必要であり、最低でもN=10は予定しており、現在実験を進めている。また、6週目以降もデータを採取している状況であり、8週目まで継続してデータを採取し、脳の切片作成、組織解析を行う予定である。

また興味深いことに、本研究では細胞培養液だけを移植したグループ と薬剤無処理のhipsc-NS/PCを投与したグループ では治療成績に差がないようである。今後N数を増やさなければ結論は出せないが、脊髄損傷の再生治療では薬剤無処理のhipsc-NS/PCを移植しただけでも治療効果が現れていた (Nori et al., 2011) ことを鑑みると大脳皮質の再生は脊髄損傷の再生より難しい側面を有しているのかもしれない。

今回のTBIモデルマウスは右足後肢に局限して麻痺をきたす系であるが、そのことが前肢の握力測定で実証された形となった。挫傷作成後であってもBeam walking test、Rotarod testと異なり全グループ間で差は認められなかった。また、炎症により全グループ間で握力の低下が招かれ、その後徐々に回復するのではないかとすることも予想していたが、実際にはその現象は観察されなかった。

実験で用いたマウスの脳組織の解析はこれからであるが、ここまで運動能に差がでているので、組織レベルでもグループ 、 とグループ 、 では大きな差が出ていることが予想される。移植している細胞はヒト由来、ホストはマウスであるのでstem121、 tubulin, tau染色などで軸索の進展まで観察する予定である。

また、グループ は薬剤無処理のhipsc-NS/PCであり、グループ 、 と同じ細胞数だけ移植しているにもかかわらず治療成績が悪いことから奇形腫などを形成している、ないしは細胞死を起こしていることが予想されるため、その観察も重点的に行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Kase Y, Sato T, Okano Y, Okano H.	4. 巻 25(4)
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 104089
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 Okano Y, Kase Y, Okano H.	4. 巻 18
2. 論文標題 A set-theoretic definition of cell types with an algebraic structure on gene regulatory networks and application in annotation of RNA-seq data.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 113-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.10.015	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 加瀬義高	4. 巻 61
2. 論文標題 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析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経化学 (Bulletin of Japanese Society for Neurochemistry)	6. 最初と最後の頁 96-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11481/topics181	査読の有無 無
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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加瀬義高
2. 発表標題 神経再生医学の最前線 -細胞移動・軸索伸展から機能回復まで- 神経突起伸展の分子機構と脊髄損傷および 外傷性脳損傷の再生医療への応用
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加瀬義高
2. 発表標題 The GADD45G/p38 MAPK/CDC25B signaling pathway enhances neurite outgrowth by promoting microtubule polymerization
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022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
---------	---------