

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20977

研究課題名（和文）新生児の損傷誘発性神経幹細胞が繊毛を介して脊髄を修復する分子機構の解明

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of injury induced neural stem cells in the neonatal spinal cord

研究代表者

依藤 依代（Yorifuji, Iyo）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30963342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：当該遺伝子K0マウスは生後0日齢より脳室が拡大し、また1日齢で脊髄を損傷すると運動および感覚異常がみられた。K0マウスでは再生した灰白質の領域が顕著に減少していたことから、当該遺伝子は神経幹細胞の増殖や分化を制御して新生児期の組織修復をになうと考えられた。損傷7日目の脊髄を用いたRNAシーケンスでは、K0マウスの正常脊髄では繊毛関連遺伝子が低下し、炎症に関連する遺伝子の発現が増加していた。損傷脊髄では遺伝子Cの発現が増加するが、K0マウスでは増加が軽度であった。また、レポーターマウスを作製して、当該遺伝子陽性細胞の起源と系譜を追跡する系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により繊毛関連遺伝子が発達脳および損傷脊髄の修復を制御する分子機構の一端が明らかになった。当該遺伝子による神経幹細胞の増殖・分化制御の理解が深まることで、神経発達異常や中枢神経の障害に対する新規の治療法開発につながることを期待される。また、損傷に特異的な神経幹細胞の起源と系譜の解析により、生体内で時空間的に細胞動態を把握することができ、神経幹細胞による組織再生の最適化が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The target gene K0 mice showed the enlarged lateral ventricles at post neonatal day 0 (P0). The K0 mice after spinal cord injury (SCI) at P1 showed motor and sensory abnormalities during their development. The regenerated gray matter area was significantly reduced in K0 mice, suggesting that the gene regulates neural stem cell proliferation and differentiation to repair spinal cord after the neonatal SCI. RNA sequencing of the intact spinal cord at day 7 post SCI showed the decreased expression of cilia-related genes and increased expression of inflammation-related genes in K0 mice. Gene C expression was increased in the injured spinal cord, but the increase was mild in K0 mice. The reporter mice were established to trace the cellular lineage and determine the origin of target gene-positive cells.

研究分野：神経再生

キーワード：繊毛 神経幹細胞 脊髄損傷 新生児 放射状グリア 水頭症 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

新生児では脊髄損傷後に組織が修復され、成体に比して運動機能が著しく改善することが知られている。これは成体の損傷部では神経軸索の再生を阻害する瘢痕ができるのに対し、新生児では神経幹細胞が軸索の再生が可能な環境を再構築することが一因になっている。新生児では特定の免疫細胞が脊髄の修復を促進することが示されてきた。一方で、損傷後に神経幹細胞が組織学的に変化することは分かっていたが、詳細な分子機構は明らかとなっていない。これまで神経幹細胞は単一の遺伝子で規定できなかったため、詳細な機能を解明するのは困難であった。申請者は新生児と成体の脊髄損傷部の細胞種を単一核 RNA シーケンスにより同定した (Ikeda-Yorifuji et al., 2022)。新生児では損傷後に特殊な神経幹細胞が増加すること、この細胞が繊維毛遺伝子の特異的に発現することを明らかにした。この細胞種が発現する繊維毛関連遺伝子をノックアウト(KO)したマウスは水頭症を発症し、また新生児期に脊髄を損傷すると運動機能が低下する傾向にあった。発達期の正常脳では神経幹細胞の繊維毛が細胞の増殖や分化を制御して層構造を創りだす。以上より、新生児の中枢神経損傷部では神経幹細胞が繊維毛を介して組織を修復することが示唆される。しかしながら、新生児の損傷誘発性神経幹細胞が繊維毛関連遺伝子によりどのように軸索の再生が可能な環境を再構築するのかは分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は神経幹細胞が繊維毛関連遺伝子を介して新生児の脊髄を修復する機構を解明することである。さらに、損傷誘発性神経幹細胞の時空間的な分化制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 繊維毛関連遺伝子が新生児の脊髄損傷の修復に必要なことの検証

当該遺伝子 KO マウスでの運動および感覚機能の検証：1 日齢のマウスの脊髄を損傷し、運動にかかわる神経伝導路が発達する 4 週齢以降に運動および感覚機能を評価する。運動機能はハシゴ歩きでの後肢の踏み外しや歩容検査により評価をする。また、感覚検査は von Frey filament による機械刺激への閾値、またホットプレートによる温痛覚、アセトンへの冷感反応を評価する。

当該遺伝子 KO マウスでの神経軸索の再生の検証：脊髄損傷後、5 週齢で神経軸索トレーサー(ピオチン標識デキストラン)を大脳皮質運動野に注入し、損傷部を超えて再生した神経軸索を定量する。当該遺伝子 KO マウスで脳から脊髄へ投射する軸索の再生が減弱することを確認する。

当該遺伝子 KO マウスでの組織修復の検証：脊髄損傷後の複数の時点において、中枢神経の主要な細胞種を組織学的に解析する。損傷部での各細胞数と形態を定量し、組織が適切に修復されるかどうかを確認する。また、細胞増殖への影響は BrdU で標識し経時的に確認する。

(2) 当該遺伝子が神経幹細胞の増殖・分化を制御する分子機構の検証

培養神経幹細胞を用いた増殖・分化の分子機構の検証：当該遺伝子 KO および野生型マウスから神経幹細胞を培養する。組織学的手法やフローサイトメトリーを用いて、BrdU と各種細胞マーカーにより、神経幹細胞の増殖状態や分化後の細胞種を解析する。

当該遺伝子の制御を受ける因子の探索：当該遺伝子 KO および野生型マウスの脊髄損傷部の遺伝子発現の変化を RNA シーケンスにより網羅的に解析する。当該遺伝子の下流ではたらく候補因子を同定する。

(2)- で得られた候補因子のリコンビナントタンパク質あるいは阻害剤を、培養神経幹細胞に投与あるいは脊髄損傷後の個体に投与し、細胞の分化制御への影響を確認する。

(3) 当該遺伝子陽性細胞の細胞系譜と機能の解析

当該遺伝子陽性細胞の細胞系譜解析：当該遺伝子-EGFP-CreERT2 マウスと Ai14 マウス (Cre による組換えで tdTomato を発現するマウス) を交配し、損傷 7 日後にタモキシフェンを投与した際に当該遺伝子が発現している細胞を tdTomato により蛍光標識する。脊髄損傷後に蛍光標識された細胞が、成長後にどの細胞種となったのかについて(2)- と同様の方法で同定する。

当該遺伝子陽性細胞の起源の解析：上記のマウスで、損傷と同時にタモキシフェンを投与した際に、損傷 7 日後に当該遺伝子が発現する (EGFP+) 細胞が tdTomato で標識されるかどうかを検証する。損傷時には当該遺伝子は中心管の上皮細胞でのみ特異的に発現している (上皮細胞のみが tdTomato で標識される) ため、損傷 7 日目に見られる当該遺伝子陽性細胞が上皮細胞に由来するかどうかを確認できる。

4. 研究成果

(1) 繊維毛関連遺伝子が新生児の脊髄損傷の修復に必要なことの検証

当該遺伝子 KO マウスでの運動および感覚機能の検証：1 日齢で脊髄を損傷すると、KO マウスでは運動障害が残存し、ハシゴの踏み外しと歩容の異常がみられた。また、これまで新生児で脊髄損傷をしたあとに感覚を評価した研究はなかったが、機械刺激、温痛覚、冷感覚の評価系を樹立した。KO マウスでは感覚障害の異常が残存することがわかった。このことは、当該遺伝子が

脊髄損傷後の運動・感覚の機能回復に寄与することを示す。

当該遺伝子 K0 マウスでの神経軸索の再生の検証：脊髄損傷後に損傷部の前後で神経軸索を評価した。K0 マウスでは、損傷局所の皮質脊髄路の密度に変化はなかったが、縫線核脊髄路(5HT 陽性)の密度が低下していた。このことは(1)- の運動・感覚障害が脳からの皮質脊髄路の再生よりも 5HT 陽性ニューロンの再生の障害によるもの、あるいは損傷局所の組織再生、おそらく神経細胞やグリア細胞により制御される局所の回路の再編がうまくいかないことによるものであると示唆された。

当該遺伝子 K0 マウスでの組織修復の検証：K0 マウスでは再生した灰白質の領域が顕著に減少しており、同部位の PKC で標識される感覚領域が再生されないことが分かった。また、神経細胞の細胞体、ミエリン形成、免疫細胞について評価した。新生児期に脳室が拡大する病因と併せると、神経幹細胞の増殖や分化を制御して新生児期の組織修復をになうと考えられた。

正常脳発達における当該遺伝子の制御機構の解明：当該遺伝子 K0 マウスは生後 0 日齢より脳室が拡大した。当該遺伝子が脊髄の修復機構と同様に、正常脳発達における神経幹細胞の制御を担っていると考え、当該遺伝子 K0 マウスの脳での細胞種および増殖を評価した。繊毛関連遺伝子 K0 マウスは生後 0 日齢より脳室が拡大し、K0 マウスの脳切片では、脳室周囲の過剰な細胞増殖がみられた。生後 4-5 日で上衣細胞の繊毛運動が成熟することが知られていることから、脳室の拡大は脳脊髄液が鬱滞することによるものではなく、神経幹細胞の成熟に異常をきたしているのではないかと考えられた。

(2) 当該遺伝子が神経幹細胞の増殖・分化を制御する分子機構の検証

培養神経幹細胞を用いた増殖・分化の分子機構の検証：神経幹細胞への当該遺伝子の直接的な影響を検証するため、生後 1 日齢のマウスの脳室から神経幹細胞を単離し、神経幹細胞の増殖と分化を評価する培養系を立ち上げた。K0 マウス由来の細胞では増殖および分化に障害を来することが示された。生体脳と培養細胞での逆転現象が観察された理由としては、単離培養の微小環境が生体とは異なるためであると考えている。生体では機能の異常な神経幹細胞が代償的に異常な増殖を引き起こしているのではないかと推察している。

当該遺伝子の制御を受ける因子の探索：偽手術群では、K0 マウスは野生型マウスに比べて繊毛関連遺伝子が低下し、炎症に関連する遺伝子の発現が増加していた。このことから、当該遺伝子がほかの繊毛関連遺伝子を制御し、また脊髄発達において炎症を抑制する可能性が示唆される。一方で、損傷脊髄では遺伝子 C が増加するが、K0 マウスの損傷脊髄での増加は軽度であった。これまでに遺伝子 C は神経幹細胞の増殖や分化を制御することが知られており、当該遺伝子が損傷誘発性の神経幹細胞を制御する機構の一端となることが期待される。

(2)- の遺伝子 C のリコンビナントタンパク質を培養神経幹細胞に添加し、細胞の増殖および分化を解析した。

(3) 当該遺伝子陽性細胞の細胞系譜と機能の解析

当該遺伝子陽性細胞の細胞系譜解析：損傷 7 日後にタモキシフェンを投与した際に当該遺伝子を発現している細胞を tdTomato により蛍光標識し、損傷 28 日後にどのような細胞種のマーカーを発現するか解析を行った。免疫細胞マーカーの発現は見られなかったが、神経細胞、グリア細胞マーカーの発現がみられた。また、脳における発現を確認したところ、tdTomato 陽性細胞は脳室から嗅球へと移動する細胞集団として観察できており、本遺伝子が神経幹細胞のマーカーであることを支持する結果である。

当該遺伝子陽性細胞の起源の解析：損傷と同時にタモキシフェンを投与すると、損傷 7 日後に当該遺伝子を発現する (EGFP+) 細胞は tdTomato で標識されなかった。当初の予想と反して、損傷誘発性の神経幹細胞は上衣細胞に由来しないという結果であった。上衣細胞以外の細胞が、損傷により上衣細胞のような特徴をもつ細胞へと分化するという知見は、本課題により初めて発見された事象である。

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 Sakura Hosen, Iyo Ikeda-Yorifuj, Toshihide Yamashita	4 . 巻 833
2 . 論文標題 Asporin and CD109, expressed in the injured neonatal spinal cord, attenuate axonal re-growth in vitro	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 Neuroscience Letters	6 . 最初と最後の頁 137832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2024.137832	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 依藤 依代、山下 俊英
2 . 発表標題 Dysfunction of the ependymal-like cell marker Enkur causes hydrocephalus and impairs the recovery after neonatal spinal cord injury.
3 . 学会等名 第26回グリア研究会
4 . 発表年 2022年
1 . 発表者名 Iyo Yorifuji , Hiroshi Tsujioka , and Toshihide Yamashita
2 . 発表標題 Single nucleus RNA sequencing revealed ependymal like cells induced by spinal cord injury in neonatal mice.
3 . 学会等名 Neuroscience 2022（国際学会）
4 . 発表年 2022年
1 . 発表者名 永安郁弥、依藤依代、山下俊英
2 . 発表標題 神経幹細胞の分化制御を介した新生児の脊髄修復機構
3 . 学会等名 第17回神経発生討論会・第20回成体脳のニューロン新生懇談会 合同大会
4 . 発表年 2024年

1．発表者名 依藤依代、山下俊英
2．発表標題 新生児の脊髄損傷後にあらわれる上衣細胞様細胞
3．学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4．発表年 2024年

1．発表者名 永安郁弥、依藤依代、山下俊英
2．発表標題 新生児の脊髄損傷で誘導される神経幹細胞の分化制御機構
3．学会等名 西日本医学生学術フォーラム2023
4．発表年 2023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
---------	---------