

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08147

研究課題名(和文)再生可能動物の脊髄再生における神経細胞新生の重要性の証明

研究課題名(英文)The importance of neurogenesis in spinal cord repair of the regeneration competent animal

研究代表者

北田 容章 (Kitada, Masaaki)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80324614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳室内色素投与によりカエル・オタマジャクシの脊髄放射状グリア細胞が標識されることを確認し、これらの細胞が時間経過後に神経細胞として分化しているものと判断された。また、時期特異的遺伝子組換えによる放射状グリア細胞由来新生神経細胞の標識については、両生類における時期特異的遺伝子組換えシステムの環境整備が必要と判断し、Cre/loxPおよびFlp/FRTシステムの効率を検討した結果、ゲノムレベルでは後者が高効率であったものの、蛍光蛋白質の蛍光発現という表現型レベルでは前者もほぼ遜色ないレベルとして扱うことが可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だ抜本的治療法が開発されていない脊髄損傷に関し、これまで行われてきた哺乳類を用いた研究に替え、損傷後の自発的再生により神経機能回復まで至る"再生可能動物"である両生類を用いその再生メカニズムを明らかとすることで、将来的なヒトへの応用を目指すための基礎的な知見を与え得るものである。現在は、"再生可能動物"の再生メカニズムの解明とそのヒトへの応用という大目標を果たすための実験ツールの整備や基盤知見の取得を行っている段階であり、困難に直面する場面もあるものの、ひとつひとつ着実に進捗しているものである。

研究成果の概要(英文)：Intraventricular injection of lipophilic dye enabled the labeling of the ependymal cells/radial glial cells in the *Xenopus laevis*, and new neurons are considered to be derived from these cells. For establishing the system for the spatiotemporal expression of the exogenous genes in amphibians, we compared the efficacy of gene recombination systems and found that the efficacy of the expression of the exogenous gene in the Flp/FRT system is superior to that in the Cre/loxP system at a genome level, however, that in the latter one is almost similar to that in the former one at a level of the activity of fluorescent dyes.

研究分野：再生生物学

キーワード：再生医学 脳・神経 細胞分化・組織形成 脊髄損傷

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでラットやマウスを用い、中枢神経系疾患の細胞移植を中心とした新たな治療法の開発を念頭に研究を進めてきた。細胞移植の効果は、a.分泌されるサイトカインや栄養因子による組織保護効果、b.神経細胞から伸長する再生軸索の足場としての機能、C.神経細胞としての移植効果等が挙げられるが、これまでの研究により、研究代表者らは移植脈絡叢上細胞や移植神経幹細胞、未処理骨髄間葉系細胞、そして神経細胞誘導済み骨髄間葉系幹細胞がそれぞれ違うレベルにてこれらの機能を呈することを示してきた(J Neurocytol 2000, 2004; Exp Neurol 2001; Glia 2001; Neurosci Lett 2001, 2002; J Neurosci Res 2002, 2003; J Neurosci Methods 2002; Neuroscience 2003; Cell Transplant 2003 等)。また、申請者ら以外の研究においても様々な脊髄再生研究が進められており、そこでは、崩壊髄鞘等の再生抑制因子の除去を目的とした貪食細胞移植や、再生抑制因子の神経細胞内シグナリング抑制、再髄鞘化を意図した髄鞘形成細胞移植等が行われている。しかしながら、いずれの系においても未だ抜本的な神経機能回復をもたらす治療法は開発されていないのが現状である。その理由として、数ある再生抑制要因のうち何が脊髄損傷からの神経機能回復を阻む決定的要因であるのかが明らかでないという点が挙げられる。決定的要因が明らかとなれば、その問題を解決する方策に関する研究を推進する事が脊髄再生への近道と言える。しかしながら、再生不可能な動物のみを用いた研究では、ほぼ完全な再生現象を生じせしめる事が不可能であるため、再生・非再生の比較により再生を阻む要因のうち何が決定的要因かを知る事は困難である。

こうした現状に対し、研究代表者は再生可能動物である両生類に着目した研究を行ってきた。カエル・オタマジャクシは同一ゲノムを有する動物であるにも関わらず、変態という時期を挟み、その脊髄再生能が大きく変化することが知られている。研究代表者は、この期間において神経細胞新生能が大きく変化することを見出している。状況証拠により、おそらくこの神経細胞新生能の違いが、再生の可能性を左右しているものと考えている。

本研究では、この再生可能時期のオタマジャクシ脊髄における神経細胞新生に着目し、脊髄損傷からの神経機能回復における神経細胞新生の重要性を証明する事を目的とする。より具体的には、再生可能時期のカエル・オタマジャクシにおいて、幹・前駆細胞特異的に薬剤誘導性の遺伝子組換えを生じせしめ、薬剤投与時以降の幹・前駆細胞に由来する神経細胞を死滅させるという手法を採る。このトランスジェニックカエル・オタマジャクシを樹立し、脊髄再生可能時期のカエル・オタマジャクシでの神経細胞新生の与える影響を解析する。神経細胞新生が生じないカエル・オタマジャクシにて神経機能回復に大きな影響が観察されるのであれば、マウス・ラット等の高等動物においても、脊髄損傷からの根本的神経機能回復には細胞移植等による神経細胞供給が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、カエル・オタマジャクシの脊髄損傷における神経細胞新生の重要性を証明する事を目的とし、薬剤誘導性に幹・前駆細胞由来の新生神経細胞を可視化するトランスジェニックカエル・オタマジャクシを作成し、損傷脊髄における新生神経細胞の機能を解明すると共に、薬剤誘導性に新生神経細胞を死滅させるトランスジェニックカエル・オタマジャクシも作成し、脊髄損傷後の神経機能回復における神経細胞新生の意義を明らかとする。

3. 研究の方法

本研究では脊髄損傷における再生可能動物であるカエル・オタマジャクシを用いて以下の実験を行うことで、放射状グリア細胞からの神経細胞新生の証明と、損傷脊髄における新生神経細胞の役割、そして脊髄損傷からの機能回復における新生神経細胞の重要性の証明を行う。

平成27年度

- ・選択的色素標識による放射状グリア細胞からの神経細胞新生の証明
- ・放射状グリア細胞特異的薬剤誘導性遺伝子発現トランスジェニック動物の作成・樹立

平成28年度

- ・トランスジェニック動物を用いた放射状グリア細胞からの神経細胞新生の証明
- ・脊髄損傷における新生神経細胞の機能解明
- ・組織学的解析

平成29年度

- ・新生神経細胞の細胞死誘導による、脊髄損傷における神経細胞新生の重要性の証明
- ・神経機能解析と組織学的解析

4. 研究成果

本研究では、脊髄損傷後の再生可能動物としてカエル・オタマジャクシ (*Xenopus laevis*) を使用し、放射状グリア細胞を標識した上でこの細胞の細胞運命を追跡すること、および細胞運命を調節することでその神経機能再生に与える影響を観察することを主な実験方法としているが、標識方法は3種類を想定していた。すなわち、脳室内の色素注入による放射状グリア細胞の標識と、脳室内のアデノウイルス注入による放射状グリア細胞への遺伝子導入による標識、および、放射状グリア細胞特異的プロモーターと時期特異的遺伝子組換え酵素発現による遺伝学的標識という3手法である。2番目のアデノウイルスを用いた放射状グリア細胞への遺伝子

導入においては、放射状グリア細胞がアデノウイルス受容体を発現している必要がある。哺乳類における両生類の脊髄放射状グリア細胞に該当する細胞は脊髄上衣細胞であるが、上衣細胞はアデノウイルス・コクサッキーウイルス共通受容体 (CAR) を発現していることが知られている。両生類の脊髄放射状グリア細胞におけるこの CAR の発現について、哺乳類で使用可能ないくつかの抗体を用いて免疫組織化学法により検証したところ、特定の抗体により放射状グリア細胞における CAR の発現が確認され、その発現の程度や発現パターンより、アデノウイルスによる感染が成立し、かなり特異的に遺伝子発現を生じせしめることが可能であることが示唆された。そこで次に、脳室内への色素注入による脊髄放射状グリア細胞標識を行った。色素としては脂溶性色素である DiIC18(3) (DiI) や 5-(and-6)-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE) を用いた。これらの色素はそれぞれ細胞膜と細胞質を標識するものであり、成体ラット第4脳室への DiI 投与実験では、脊髄上衣細胞の標識と時間経過後の細胞移動、および細胞分化を証明することが可能であった (Kitada et al. *Dev Growth Differ* (2018))。同様の手法により、オタマジャクシの脊髄上衣細胞の標識を試みた。いずれの色素も脳室内投与1日経過後に中心管周囲の細胞への、2週間経過後には脊髄実質内の細胞での取り込みが観察された。前者の細胞は前述の CAR 陽性の細胞であり、放射状グリア細胞と考えられた。但し、オタマジャクシの脳室内への色素注入はガラス管を用いて行う必要があるが、薄い皮膚の下がすぐ脳室となっており脳室壁もかなり薄いという点が成体ラットとは全く異なっている。このため、色素注入を行ってもすぐに色素がリークしてしまう個体が多く、用いる個体数を多くすることで解決を図った。また、アデノウイルス投与による遺伝子導入においても同様の事態が生じ、こちらの問題は個体数を多くしても解決を図ることは困難であった。アデノウイルスの脳室投与による成体ラット上衣細胞の標識では、上衣細胞が時間経過後にアストロサイトへの分化を示した (Kitada et al. *Dev Growth Differ* (2018)) が、オタマジャクシ脳室への色素投与による脊髄放射状グリア細胞標識においては、時間経過後に放射状グリア細胞が神経細胞へと分化しているものと判断された。次に遺伝学的な手法により放射状グリア細胞から生ずる新生神経細胞のみを特異的に標識する方法であるが、これを実現するためには放射状グリア細胞特異的プロモーター制御下に時期特異的発現を可能とする遺伝子組換え酵素を発現するドライバーを有するラインと、遺伝子組換え酵素により異なる蛍光色素遺伝子 (あるいは細胞毒遺伝子) を発現するラインと、2種のトランスジェニック動物を作成する必要がある。このトランスジェニック動物における時期特異的な遺伝子組換え・遺伝子発現について、研究途中において問題が生じることが明らかとなった。より具体的には、放射状グリア細胞における時期特異的な遺伝子発現が想定した形で生じないことによる。これは導入遺伝子が同染色体に複数挿入された場合に、意図しない遺伝子組換えが生じるためと考えられ、導入遺伝子が1コピーであればこのような問題は生じないと考えられる。導入遺伝子数を減じる方法としては、セーフ・ハーバー遺伝子座に代表されるような細胞種によらず全ての細胞種で一定程度の活性のある遺伝子座にノックインの手法により外来遺伝子を組込むか、あるいは、特定の制限酵素を用いたトランスジェニック動物作成法を適用し導入遺伝子数を制限するかという2種の手法が想定される。前者の方法では導入遺伝子コピー数は1つとなるのに対し、後者の方法では導入遺伝子コピー数は1~数コピーとなるため、更にひと工夫が必要となる。現在 *Xenopus laevis* においては、前者のようなセーフ・ハーバー遺伝子座は同定されていないため、この手法を適用することは不可能である。そのため、後者の手法を適用する必要がある。この場合導入遺伝子コピー数は複数となる可能性があり、導入遺伝子コピー数が1つとなった個体を抽出する必要がある。また、実際に導入遺伝子の発現が確認される個体でなければならない。このため、導入遺伝子数のコピー数を確認した上で成体まで発現が続く個体を選別する必要がある。導入遺伝子数のコピー数確認には サザンブロッティングや DigitalPCR 等によるジェノタイプピング手法が有効である。このシステム構築に時間を要した。すなわち、本研究では F0 動物を作出後特定の遺伝子配列を有する個体を同定し、さらにその動物が性成熟するまでの期間飼育する必要がある。これらの動物はいずれもジェノタイプピングを行っておく必要があり、マウス等と異なり個体のマーキングが困難であるため1匹ずつ飼育する必要があり、このため一定数の飼育スペースが必要となるため、比較的大規模な飼育システムの構築が必要となる。また、時期特異的遺伝子組換えシステムについても問題がある。カエル・オタマジャクシにおいてドライバー・レポーター遺伝子を有する2種のトランスジェニック動物を用いた時期特異的遺伝子組換えシステムは、現時点で一般的ではない。その理由は、時期特異的遺伝子組換えを可能とする遺伝子組換え酵素の活性がカエル・オタマジャクシにて必要十分に機能するかどうか不明である点が挙げられる。哺乳類等においては Cre/loxP システムが一般的に利用されているが、このシステムの必要十分に疑義が生じており、Flp/FRT システムの適用も可能とした導入遺伝子を作成し、システム構築を行った。Flp リコンビナーゼはこれまでに Flp, Flpe, Flpo の3種類が主に用いられている。Cre リコンビナーゼに加え、これら Flp リコンビナーゼの3バリエーションによる遺伝子組換え効率について検討を行った。その結果、ゲノムレベルでは Flp リコンビナーゼの方が効率良く、要する時間も短く遺伝子組換えを可能とすることが明らかとなったが、蛍光蛋白質の発現効率にて検定される表現型機能レベルにおいては、大きな違いがないことが判明した。すなわち、蛍光蛋白質の蛍光強度の測定においては両者間で大きな違いは認められなかった。Cre リコンビナーゼは汎用性が高いことがメリットとして挙げられる。但し、体表面に近い組織によっては低温の影響のため組換え効率が落ちるため、注意が必要で

あるとも考えられた。トランスジェニック動物の作出・維持に予想外の時間を要しているため、まずは上記効率と表現型についてとりまとめる方向とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Tezuka, Y., Yamazaki, Y., Kitada, M., Morimoto, R., Kudo, M., Seiji, K., Takase, K., Kawasaki, Y., Mitsuzuka, K., Ito, A., Nishikawa, J., Asai, N., Nakamura, Y., Gomez-Sanchez, C. E., Ito, S., Dezawa, M., Sasano, H., & Satoh, F. (2019). 18-Oxocortisol Synthesis in Aldosterone-Producing Adrenocortical Adenoma and Significance of KCNJ5 Mutation Status. *Hypertension*, 73(6), 1283-1290. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12064 査読有
2. Kitada, M., Murakami, T., Wakao, S., Li, G., & Dezawa, M. (2019). Direct conversion of adult human skin fibroblasts into functional Schwann cells that achieve robust recovery of the severed peripheral nerve in rats. *Glia*, 67(5), 950-966. doi:10.1002/glia.23582 査読有
3. Kitada, M., Wakao, S., & Dezawa, M. (2018). Intracellular signaling similarity reveals neural stem cell-like properties of ependymal cells in the adult rat spinal cord. *Dev Growth Differ*, 60(6), 326-340. doi:10.1111/dgd.12546 査読有
4. Amin, M., Kushida, Y., Wakao, S., Kitada, M., Tatsumi, K., & Dezawa, M. (2018). Cardiogenic Growth Factor-Driven Induction of Human Muse Cells Into Cardiomyocyte-Like Phenotype. *Cell Transplant*, 27(2), 285-298. doi:10.1177/0963689717721514 査読有
5. Kitada, M., & Dezawa, M. (2018). Congress report: A report of the 16th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. *Regen Ther*, 8, 15-19. doi:10.1016/j.reth.2018.01.001 査読有
6. Suzuki, J. I., Dezawa, M., & Kitada, M. (2017). Prolonged but non-permanent expression of a transgene in ependymal cells of adult rats using an adenovirus-mediated transposon gene transfer system. *Brain Res*, 1675, 20-27. doi:10.1016/j.brainres.2017.08.033 査読有
7. Uchida, N., Kushida, Y., Kitada, M., Wakao, S., Kumagai, N., Kuroda, Y., Kondo, Y., Hirohara, Y., Kure, S., Chazenbalk, G., & Dezawa, M. (2017). Beneficial Effects of Systemically Administered Human Muse Cells in Adriamycin Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 28(10), 2946-2960. doi:10.1681/ASN.2016070775 査読有
8. Kitada, M., Takeda, K., & Dezawa, M. (2016). Regulation of DM-20 mRNA expression and intracellular translocation of glutathione-S-transferase pi isoform during oligodendrocyte differentiation in the adult rat spinal cord. *Histochem Cell Biol*, 146(1), 45-57. doi:10.1007/s00418-016-1421-z 査読有
9. Nakamura, Y., Kitada, M., Satoh, F., Maekawa, T., Morimoto, R., Yamazaki, Y., Ise, K., Gomez-Sanchez, C. E., Ito, S., Arai, Y., Dezawa, M., & Sasano, H. (2016). Intratumoral heterogeneity of steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revealed by intensive double- and triple-immunostaining for CYP11B2/B1 and CYP17. *Mol Cell Endocrinol*, 422, 57-63. doi:10.1016/j.mce.2015.11.014 査読有
10. Takeda, K., Dezawa, M., & Kitada, M. (2016). The expression of PLP/DM-20 mRNA is restricted to the oligodendrocyte-lineage cells in the adult rat spinal cord. *Histochem Cell Biol*, 145(2), 147-161. doi:10.1007/s00418-015-1384-5 査読有

〔学会発表〕 (計 12 件)

1. 北田容章、村上徹、山内正憲、出澤真理. ヒト線維芽細胞を用いた機能的シュワン細胞の非遺伝子導入的ダイレクトリプログラミング. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2019年
2. 北田容章、村上徹、山内正憲、出澤真理. 遺伝子導入を必要としないヒト線維芽細胞からの機能的シュワン細胞誘導. 第18回日本再生医療学会総会. 2019年
3. 北田容章、出澤真理. 低温培養の培養細胞における部位特異的遺伝子組換えの効率検討. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018年
4. 北田容章、出澤真理. 両生類に最適な部位特異的遺伝子組換えシステムの特定. 第17回日本再生医療学会総会. 2018年

5. 北田容章. 再生可能動物である両生類を用いた脊髄再生メカニズムの探索. 第122回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017年
6. 北田容章. 再生可能動物の再生現象から探る脊髄再生戦略. 第16回 日本再生医療学会総会. 2017年
7. 北田容章. パネルディスカッション -モデル両生類の飼育方法の標準化と実験材料の共有化について-. 次世代両生類研究会 第2回会合. 2016年
8. 北田容章. 新たな脊髄再生戦略 -「治り方」から考える「治し方」-. 第121回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016年
9. 北田容章、出澤真理. 両生類における脊髄再生機構の解明. 第15回 日本再生医療学会総会. 2016年
10. Masaaki Kitada. The great capacity of the ependymal cells of the spinal cord in amphibian - toward the treatment of spinal cord injury in humans -. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research. 2016年
11. 北田容章. 下等脊椎動物に観る脊髄再生様式と、その哺乳類への応用の可能性. 第26回 日本小児整形外科学会. 2015年
12. 北田容章. ヒトへの応用をめざした両生類を用いた脊髄再生研究. 次世代両生類研究会 第一回会合. 2015年

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：