

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10715

研究課題名(和文) microRNAをターゲットとした神経幹細胞移植による脳梗塞再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of cerebral infarction regenerative treatment by neural stem cell transplant targeting microRNA

研究代表者

橋本 幸治 (HASHIMOTO, Koji)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：10644792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞に対する新規治療法として再生医療が注目され、様々な幹細胞移植の臨床試験が進められてきたが、十分な治療効果が証明されていない。脳梗塞巣での移植神経幹細胞の生着率の低さが原因としてあげられるが、神経幹細胞への非致死的低酸素刺激によるpreconditioningがその生着率を高め、治療効果を改善すると報告されており解決策として期待されている。本研究は非致死的低酸素刺激による神経幹細胞の耐性獲得機序におけるmicroRNAの役割を検討し、新たな治療法の開発を目的とした。我々の解析によりpreconditioningが神経幹細胞のmicroRNA発現を変化させ、耐性を獲得することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞の耐性現象獲得におけるmicroRNAの発現変化を更に解析することにより、micro RNAをターゲットとした脳梗塞部位での新たな神経幹細胞移植治療の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine has attracted attention as a new therapeutic method for cerebral infarction, and various clinical trials of stem cell transplantation have been advanced. However, significant therapeutic effects have not been proved, which was largely due to the low engraftment rate of transplanted neural stem cells to cerebral infarction site. Preconditioning of neural stem cells by non-lethal hypoxic stimulation enhances the survival rate of transplanted cells and improves therapeutic efficacies, and is expected to overcome the problems of stem cell therapy. The results of this study suggest that micro RNA has pivotal roles in hypoxic preconditioning of neural stem cells.

研究分野：脳血管障害

キーワード：再生医療 神経幹細胞 脳梗塞 micro RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞に対する新規治療法として再生医療が注目され、様々な幹細胞移植の臨床試験が進められてきたが、十分な治療効果が証明されるには至っていない。その原因として、(1) 神経細胞への低い分化効率、(2) 周囲組織とのネットワーク構築の困難性、(3) 移植細胞の低い生着率があげられる。遺伝子改変により酸化ストレス耐性を増幅した神経幹細胞の移植では、その生着率が向上し、神経機能回復が増強されることが報告されている[1]が、遺伝子操作した細胞の臨床応用には安全性の問題があり、また神経細胞への分化誘導や周囲神経組織との再構築に関しては十分な結果が得られていない。

一方、microRNA (miRNA) は長さ 20 から 25 塩基の小型 RNA でヒトでは約 940 種類が存在し、これらは標的 messenger RNA への結合不安定化により、遺伝子の発現を調節し、様々な生命現象に関わることが知られており、血清中で比較的安定で毒性が少ないことから治療のターゲットとして近年注目されている。神経幹細胞においても、その増殖と分化を介した神経組織の発生や、軸索形成をはじめとした脳組織のネットワーク構築において、miRNA が重大な役割を担うことが解明されており、移植後神経幹細胞の miRNA による前処置もしくは併用により、神経再生をコントロールできる可能性がある。また、ホストの劣悪な環境に対する保護効果を有する miRNA も明らかとなっており、これらの制御により移植後の生着率の改善を期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳虚血ホストへ移植された神経幹細胞の miRNA による制御機構を解明し、これをターゲットとした新たな神経幹細胞移植治療の開発を目的とした。

脳梗塞後ホストへの移植神経幹細胞の生着率の低さの原因として、ホスト側の劣悪な環境、すなわち虚血後に惹起される酸化ストレスや炎症反応に伴う細胞毒性が挙げられる。遺伝子操作のみならず薬剤などの併用や前処置により、移植細胞の生着率が向上し、さらに神経幹細胞への非致死的低酸素刺激による preconditioning が移植細胞の生着率を高め、神経機能を改善することが報告されており、この耐性機序の獲得に対する、miRNA の関与について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経幹細胞の採取および培養

生後 1 日の C57BL/6J マウスの脳室下帯から神経幹細胞を摘出し分離する。培養液を用いて 10cm ディッシュ上で浮遊細胞の状態に培養し、2 日に 1 回 Epithelium growth factor (20ng/ml) と Fibrous growth factor (20ng/ml) を投与。5 日に 1 回継代し、第 3~10 継代の神経幹細胞を使用した。

### (2) 神経幹細胞への preconditioning

継代時に神経幹細胞を  $1.0 \times 10^5$ /ml の濃度でディッシュに散布し、5 日間培養した。ディッシュをチャンバーに入れ、チャンバー内を 5%酸素の標準ガス (O<sub>2</sub> 5%、CO<sub>2</sub> 5%、N<sub>2</sub> 90%) で置換し、24 時間培養した。再酸素化後、24 時間インキュベーターで培養した。

### (3) miRNA の網羅的解析

Controlの神経幹細胞とpreconditioning後の神経幹細胞をそれぞれ遠心分離し、ペレットを作成した。それぞれTotal RNA 1000 ng を分取し、FlashTag™ Biotin HSR RNA

Labeling Kitを用いて、キット添付プロトコール (FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit for GeneChip™ miRNA Arrays User Manual) に従い、Biotin-labeled Sample を作製した後、110.5μL Hybridization Master Mixと21.5μL Biotin-labeled Sampleのハイブリダイゼーション溶液132μLを調製した。

GeneChip™ Hybridization Oven 645を用いて、Arrayを、48 , 18時間 ( 60 rpm ) インキュベートし、GeneChip™ Fluidics Station 450 を用いて、洗浄を行った。その後、GeneChip™ Scanner 3000 7G を用いて、装置添付マニュアル ( GeneChip™ Command Console (AGCC) 4.0 User Manual ) に従い、Arrayのスキャニングとデータ解析を行い、preconditioning後の神経幹細胞の虚血耐性に関連するmiRNAについて、controlと比較検討した。

#### 4 . 研究成果

Preconditioning 後の神経幹細胞での miRNA は control に比較して高発現する群 ( Fig.1 ) が認められた。一方、発現が低下する miRNA はわずかだった ( Fig.2 )。発現が亢進した miRNA の大半は miRNA-9 群だった。

Fig. 1

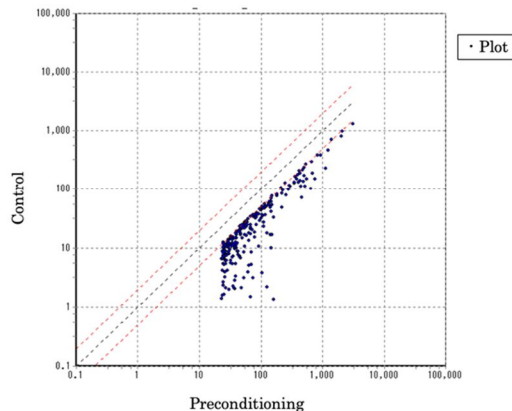
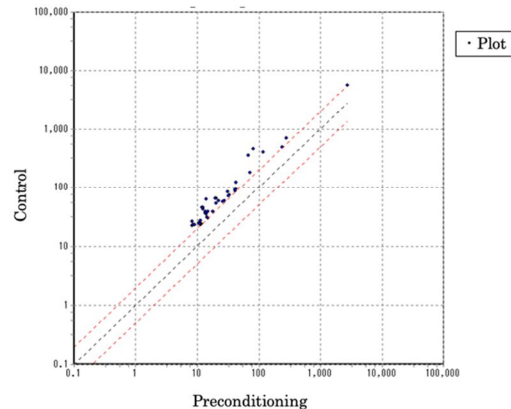


Fig. 2



今回の我々の研究により、preconditioning 後の神経幹細胞に高発現する miRNA の存在が明らかとなった。Preconditioning 後の神経幹細胞で、発現比率の高い miRNA-9 は、神経細胞の分化に重要な働きを示し、分化が進むとともに発現が急激に上昇すると報告されており [ 2 ]、非致死的低酸素刺激が、神経細胞への分化を促進する因子となり得るが、今後更なるサンプルの蓄積が重要な課題となる。

( 引用文献 )

1. Wakai T, et al. Transplantation of neural stem cells that overexpress SOD1 enhances amelioration of intracerebral hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34:441-449, 2014
2. Karayiorgou M, et al. Specific microRNAs Modulate Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. *Stem cell.* 24:857-864, 2006

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	若井 卓馬  (WAKAI Takuma)  (30456446)	山梨大学・大学院総合研究部・助教    (13501)	
研究分担者	福田 憲人  (FUKUDA Norito)  (60791902)	山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教    (13501)	