

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21372

研究課題名(和文) 頭部外傷における間葉系幹細胞と神経ペプチドの神経新生促進作用

研究課題名(英文) Neuro-regenerative effects of MSC and neuropeptide after traumatic brain injury

研究代表者

渡邊 潤 (Watanabe, Jun)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：50649069

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)：急性期頭部外傷モデルに対する間葉系幹細胞の分泌タンパク質であるTSG-6の神経新生に対する影響を解析した。すると、TSG-6は新生神経細胞のマーカーであるdoublecortin陽性の新生神経細胞数を増加させることが明らかとなった。次に、慢性頭部外傷モデルとして頻回脳震盪モデルの作成を試みた。しかし、脳内出血による死亡例が多かったこと、個体差が非常に大きかったことからモデル条件の固定を行うことができなかった。また、Crispr Cas9システムによるPACAP受容体欠損マウスの作成を試みた。その結果PACAP受容体欠損マウスは胎生致死、新生児期致死を起こしやすいことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究成果から、間葉系幹細胞の分泌タンパク質であるTSG-6が頭部外傷後の神経の保護作用があるだけでなく、神経新生促進作用もあることが明らかとなった。頭部外傷は現在根治治療の方法がなく、TSG-6が新たな治療法となりうる可能性を示唆した。また、そのメカニズムにPACAPが関与している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of TSG-6 on neuro-regeneration after acute traumatic brain injury. The results clarified the administration of TSG-6 increased the doublecortin positive new born neurons. Then we tried to establish the chronic model of repeated head concussion. However, intracerebral hemorrhages caused the animal death in high rate. As the standard deviation of neural death was also huge, we could not fix the model condition. In addition, we tried to make PACAP receptor knock out mouse using crispr CAS9 system. The results indicated the knock out of PACAP causes the death in fetal or new born phase.

研究分野：神経再生学

キーワード：頭部外傷 神経新生 間葉系幹細胞 神経ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷は交通事故や転倒などにより引き起こされる神経外傷性疾患であり、急性期の死亡や全身性機能不全を免れても、慢性期に認知障害や情緒障害のため社会適応障害(高次脳機能障害)が顕著となる症例が多く報告されている。特に、交通事故後の頭部外傷患者は10代、20代が多く、就学や就職への弊害が社会問題となっている。現在、日本全国の高次脳機能障害者の数は男性を中心に約27万人と推定されているが、頭部外傷後の高次脳機能障害の改善の報告はリハビリテーション訓練を除いて非常に少なく、新規治療法の確立が求められている領域である。一方、中枢神経系の神経細胞は再生能力がなく、一度失われると回復しないと近年まで考えられてきた。しかしながら、側脳室下帯と海馬歯状回において神経新生が起きていることが発見され、頭部外傷においても再生医療への応用が期待されている。

申請者は骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)を用いて頭部外傷モデルマウスの記憶障害、鬱様行動の治療改善効果を検討、解析してきた。MSCは骨髄由来の間葉系幹細胞の総称で、その免疫調節機能により中枢神経系疾患に対する新規治療法として期待されている。申請者のグループはMSCsを移植した脳虚血、心筋梗塞および肺炎のヒト遺伝子の網羅的解析からTNF- α -stimulated gene/protein 6(TSG-6)という共通のタンパク質の増加を見出し、hMSCs由来TSG-6の心筋梗塞などへの回復効果を明らかにした(Lee RH et al. Cell Stem Cell 2009)。申請者は頭部外傷モデルを用い、MSCsおよびTSG-6の急性期投与が障害領域を減少させ、記憶障害と鬱様行動を改善させることを見出した(Watanabe J et al. Neurobiology of Disease 2013)。しかし、MSC投与と神経申請への影響、さらには記憶障害改善効果の因果関係は不明のままである。

さらに申請者のグループは、神経ペプチド pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide(PACAP)の神経保護作用に注目して長年研究を行ってきたが、近年PACAPが神経新生を促進することを見出した。これは、PACAPの脳室内投与により神経新生が促進されたこと、さらにPACAP欠損マウスでは脳虚血後の神経新生が抑制されていたことにより明らかとなった(Neuropeptides 2015にて発表。論文準備中)。また興味深いことに、脊髄損傷モデルにおいて、MSCによる神経保護作用はPACAP欠損マウスでは見られないことも発見した(Tsumuraya T et al. Neuroinflammation. 2015)。

2. 研究の目的

以上の背景から、頭部外傷後のMSCによる神経新生の促進にもPACAPが何かしらの役割を担っていることが強く示唆される。しかし神経障害後の神経新生に対するMSCとPACAPの相互作用に関しては全く分かっていない。そこで本研究では頭部外傷後のMSCによる神経新生促進機構の解明を特にPACAPに注目して行い、さらに障害時における神経新生をより増加させる方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

頭部外傷モデルマウスを用いたMSC投与の神経新生への影響の解析

既に申請者はMSCとその分泌タンパク質TSG-6が急性期の経静脈投与で神経保護作用・神経新生促進作用があることを明らかとしたが、慢性期のMSCs投与が同様に神経新生を促進するか、また投与経路によって効果に違いがあるかを検討する。

ゲノム編集技術によるPACAP受容体欠損マウスの作成とおよび評価

Crispr-CAS9システムを用いたPACAP受容体欠損マウスを作成し、その頭部外傷モデルにMSCとその分泌タンパク質TSG-6を急性期の経静脈投与する。神経保護作用・神経新生促進作用のWild Typeとの違いについて解析を行う。

4. 研究成果

まず既に確立されている急性期頭部外傷モデルに対するTSG-6の神経申請に対する影響を解析した。すると、TSG-6は新生神経細胞のマーカーであるdoublecortin陽性細胞数を増加させることが明らかとなった(図1)。

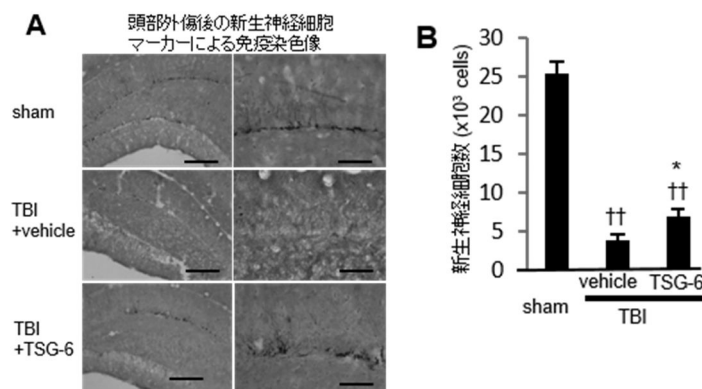


図1.TSG-6の神経新生促進作用

次に、慢性頭部外傷モデルとして頻回脳震盪モデルの作成を試みた。これは頭がい骨上に金属のプレートを設置し、その金属プレートをインパクトにより24時間ごと、4日連続で打撃をすることで作成した。しかし、脳内出血による死亡例が多かったこと、ear-barで頭骨を固定しないモデルのため脳内の障害の個体差が非常に大きく、したがって神経新生のばらつきも非常に大きかったことからモデル条件の固定を行うことができなかった。今後は打撃時の頭部の固定方法の工夫や、打撃の強さの調整によりモデル条件の固定を行っていく予定である。

Crispr Cas9 システムによる PACAP 受容体欠損マウスの作成

1) pCAG-EGxxEP システムによる PAC1R の Target 配列の決定

pCAG-EGxxEP システムは Crispr Cas9 システムにより遺伝子が切断されると HEK293 細胞に GFP が発現する。これにより Crispr Cas9 システムの Target 配列が決定できるシステムである (図2, Mashiko D, et al. Dev Growth Differ 2014)。本研究ではこのシステムを使用して、PAC1 受容体の標的配列の決定を行った。図3で示すように HEK 細胞に GFP が発現し、PAC1R 配列を切断できる候補配列を得ることができた。

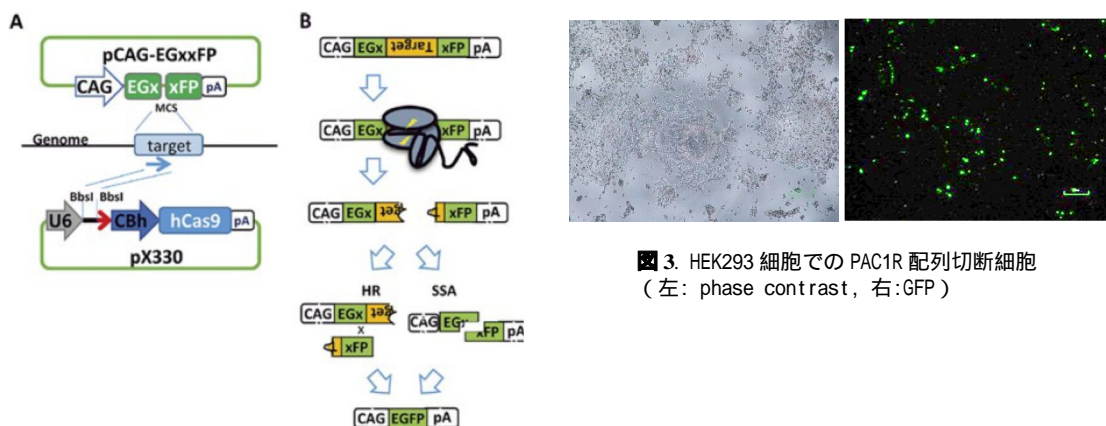


図3. HEK293 細胞での PAC1R 配列切断細胞 (左: phase contrast, 右:GFP)

図2. pCAG-EGxxEP システムの概要

2)受精卵への Crispr Cas9 システム導入による PACAP 受容体欠損マウスの作成

上で得られた Target 配列を組み入れた Crispr Cas9 プラスミドをマウス受精卵に導入した。しかし、産出されたマウスの PAC1 受容体の遺伝子を調べたところ、遺伝子欠損マウスはいなかった。そこで胎児期、新生児期の PACR 遺伝子を調べたところ、10 腹の母マウスから得られた胎生致死を起こしていたマウスのうち 22.0%が PAC1R 遺伝子を欠損していた。また生まれてから 1 週間以内に死亡したマウス 36 匹のうち 13.8%が PAC1R 遺伝子を欠損していた。以上の結果から、PAC1-R の欠損が胎生致死・新生後すぐの死亡を引き起こす可能性が示唆された。現在、コンディショナルノックアウトマウスの作成を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Murai N, Ohtaki H, Watanabe J, Xu Z, Sasaki S, Yagura K, Shioda S, Nagasaka S, Honda K, Izumizaki M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Intrapancreatic injection of human bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells alleviates hyperglycemia and modulates the macrophage state in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0186637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0186637	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 該当する
1. 著者名 Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S.	4. 巻 176
2. 論文標題 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjd.14885	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 該当する
1. 著者名 Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki A, Shioda S.	4. 巻 59
2. 論文標題 Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 270-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12031-016-0731-x.	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 -
1. 著者名 Arata S, Watanabe J, Maeda M, Yamamoto M, Matsuhashi H, Mochizuki M, Kagami N, Honda K, Inagaki M.	4. 巻 2
2. 論文標題 Continuous intake of the Chaga mushroom (<i>Inonotus obliquus</i>) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2016.e00111. eCollection 2016 May.	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 Sasaki S, Watanabe J, Ohtaki H, Matsumoto M, Murai N, Nakamachi T, Hannibal J, Fahrenkrug J, Hashimoto H, Watanabe H, Sueki H, Honda K, Miyazaki A, Shioda S.	4. 巻 176
2. 論文標題 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes eccrine gland sweat secretion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 413-422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.14885.	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Jun, Kagami Nobuyuki, Kawazoe Mamiko, Arata Satoru	4. 巻 69
2. 論文標題 A simplified enriched environment increases body temperature and suppresses cancer progression in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 207 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0099	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 Kim Dong-Ki, Choi Hosoon, Nishida Hidetaka, Oh Joo Youn, Gregory Carl, Lee Ryang Hwa, Yu Ji Min, Watanabe Jun, An Su Yeon, Bartosh Thomas J., Prockop Darwin J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Scalable Production of a Multifunctional Protein (TSG-6) That Aggregates with Itself and the CHO Cells That Synthesize It	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0147553	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 該当する

1. 著者名 Xu Zhifang, Ohtaki Hirokazu, Watanabe Jun, Miyamoto Kazuyuki, Murai Norimitsu, Sasaki Shun, Matsumoto Minako, Hashimoto Hitoshi, Hiraizumi Yutaka, Numazawa Satoshi, Shioda Seiji	4. 巻 6
2. 論文標題 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep22373	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 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 渡邊潤, 松橋秀人, 加賀美信幸, 荒田悟
2. 発表標題 簡易型環境エンリッチメント飼育マウスにおけるがん増殖抑制効果
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会（富山）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Watanabe, Hirokazu Ohtaki, Satoru Arata, Seiji Shioda
2. 発表標題 PACAP induces differentiation of neural progenitor cells into glial lineage via radial glia
3. 学会等名 International GPCR symposium (Kyoto, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊潤, 大滝博和, 本田一穂, 荒田悟
2. 発表標題 PACAPによる神経幹細胞のラジアルグリアを介したアストロサイトへの分化誘導作用.
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arata S, Watanabe J, Matsushashi H, Kagami N.
2. 発表標題 Effects of enriched environment on suppression of cancer progression in mice.
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会（福島、郡山）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohtaki H, Yagura K, Tanaka Y, Watanabe J, Miyamoto K, Hiraizumi Y, Dohi K, Honda K.
2. 発表標題 Production of MCP-1 (CCL2) from human mesenchymal stem/stromal cells in ischemic brain
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会 (千葉、幕張)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Watanabe J, Ohtaki H, Yagura K, Honda K, Arata S.
2. 発表標題 Administration of TSG-6 from MSCs improves memory after traumatic brain injury in mice.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会 (千葉、幕張)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohtaki H, Yagura K, Watanabe J, Miyamoto K, Dohi K, Honda K.
2. 発表標題 Regulation of CCL2 (MCP-1) expression from human mesenchymal stem/stromal cells after ischemia through inflammatory cytokines.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会 (宮城、仙台)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Arata S, Watanabe J, Matsushashi H, Kagami N.
2. 発表標題 Effects of enriched environment on suppression of cancer progression in mice.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 (神奈川、横浜)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 Watanabe J, Ohtaki H, Yagura K, Honda K, Arata S.
2 . 発表標題 Administrations of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) produced beneficial effects in models of traumatic brain injury via prevention of blood brain barrier leakage.
3 . 学会等名 Neuroscience 2017 (Washington DC, USA) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Yagura K, Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Watanabe J, Miyamoto K, Tanaka S, Hiraizumi Y, Kanzaki K, Honda K.
2 . 発表標題 Gene and cellular localizations of chemokines and their receptors after spinal cord injury(SCI) in mice.
3 . 学会等名 Neuroscience 2017 (Washington DC, USA) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Ohtaki H, Watanabe J, Yagura K, Miyamoto K, Hiraizumi Y, Honda K, Dohi K.
2 . 発表標題 Suppression of nitric oxide level from microglia by co-culturing with human mesenchymal stem/progenitor cells.
3 . 学会等名 Neuroscience 2017 (Washington DC, USA) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Ohtaki H, Watanabe J, Yagura K, Miyamoto K, Iwakura Y, Dohi K, Honda K.
2 . 発表標題 Human mesenchymal stem/stromal cells express CCL2 (MCP-1) on ischemic hippocampal homogenate exposure (Tu-P10-16).
3 . 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017) (Kanazawa, Japan) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Yagura K, Ohtaki H, Tsumuraya T, Sato A, Watanabe J, Hiraizumi Y, Honda K.
2. 発表標題 Expression patterns and distributions of chemokines and their receptors after spinal cord injury (SCI) in mice.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017) (Kanazawa, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Watanabe J, Sasaki S, Ohtaki H, Arata S, Honda K, Shioda S.
2. 発表標題 PACAP promotes sweat secretion in eccrine gland via PAC1R.
3. 学会等名 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides (Hong Kong, China) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢倉一道, 大滝博和, 圓谷智海, 佐藤 敦, 渡邊 潤, 宮本和幸, 平泉 裕, 本田一穂.
2. 発表標題 脊髄損傷マウスにおけるケモカインの変動と役割.
3. 学会等名 第64回昭和大学学士会総会 (東京)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢倉一道, 大滝博和, 圓谷智海, 佐藤敦, 渡邊潤, 宮本和幸, 平泉裕, 本田一穂
2. 発表標題 脊髄損傷後のケモカインの局在とヒト間葉系幹細胞を用いた組織修復への関与
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊潤, 佐々木駿, 中町智哉, 大滝博和, 荒田悟, 本田一穂, 塩田清二
2. 発表標題 エクリン汗腺におけるPACAPの汗分泌促進作用
3. 学会等名 第13回GPCR研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中町智哉, 大滝博和, 関保, 渡邊潤, 塩田清二
2. 発表標題 PACAPはアクアポリン5を介して涙液分泌を促進する。
3. 学会等名 第13回GPCR研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大滝博和, 渡邊潤, 宮本和幸, 平泉裕, 本田一穂.
2. 発表標題 脳虚血マウスにおける移植ヒト骨髄間葉系幹・前駆細胞 (hMSCs) の応答.
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ohtaki H, Taniguchi S, Tanaka Y, Watanabe J, Miyamoto K, Yoshikawa A, Dohi K, Honda K.
2. 発表標題 Responses of human mesenchymal stem/stromal cells on brain ischemia.
3. 学会等名 Annual Meeting Soceity for Neuroscience 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 本田一穂, 南雲佑, 種田積子, 舟橋久幸, 大滝博和, 澤智華, 渡邊潤, 瀧本雅文, 小田秀明, 新田孝作, 大塚成人
2. 発表標題 腎内血管内皮の多様性の検討: 低真空SEMによる腎生検パラフィン切片の三次元的解析.
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊 潤, 大滝 博和, 矢倉 一道, 本田 一穂, 荒田 悟
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) は頭部外傷モデルマウスの血液脳関門破綻を抑制する
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢倉一道, 大滝博和, 圓谷智海, 佐藤 敦, 渡邊 潤, 宮本和幸, 平泉裕, 本田一穂
2. 発表標題 脊髄損傷マウスにおける慢性的なケモカインとその受容体の発現の変動.
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大滝博和, 渡邊 潤, 矢倉一道, 宮本和幸, 土肥謙二, 内田隆史, 本田一穂.
2. 発表標題 MRIによるPin1遺伝子欠損マウスの脳の容量の解析.
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中町智哉, 大滝博和, 渡邊潤, 松田恒平, 塩田清二
2. 発表標題 PACAP KOマウスにおける加齢に伴う脳内酸化傷害の増加と記憶学習行動の異常.
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Okuma N, Kanamaru M, Moriya R, Tanaka FK, Arata S, Watanabe J, Endou T, Yoshikawa A, Iizuka M, Izumizaki M.
2. 発表標題 Relationship between anxiety behavior and respiration control as determined using optogenetics.
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----