

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09453

研究課題名(和文) Xenopus由来因子のエピゲノム制御による神経系細胞の系譜転換と神経再生

研究課題名(英文) Neurod4 converts endogenous neural stem cells to neurons with synaptic formation after spinal cord injury

研究代表者

西村 由介(Nishimura, Yusuke)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20447816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経再生能の高いアフリカツメガエル(Xenopus)に高度に発現し、神経再生に関わる神経転写因子(Neurod4)を同定することに成功した。次いで、神経幹細胞に特異的に感染し遺伝子導入可能な新規ハイブリッドベクターを開発し、脊髄損傷後に上衣細胞由来の内在性幹細胞に対してNeurod4を遺伝子導入した。その結果、内在性幹細胞を運動機能回復に直結するニューロンへと分化誘導することに成功した。また、同時に、グリア瘢痕の主成分となるアストロサイトへの分化の抑制が見られ、脊髄損傷マウスの後肢運動機能の有意な改善が得られた。また、歯髄幹細胞を導入することにより、さらなるグリア瘢痕抑制が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷を受傷した患者の身体的・精神的な苦痛は計り知れない。医療人・研究者としてはいち早く有効な治療を提供することが社会的なニーズであり、使命であると考えている。本研究で脊髄損傷後の遺伝子発現を網羅的に解析して、損傷脊髄の神経再生に有効な遺伝子群を見出すことができ、この遺伝子がニューロンへの分化誘導を行い、神経再生へとつながる鍵になる。同様の手法にて、脊髄上衣細胞を標的として遺伝子治療により脊髄損傷に対する神経再生治療を試みた研究は存在せず、内在性神経幹細胞の分化の系譜転換を行うという点で、今までに無い治療法である。

研究成果の概要(英文)：The transcriptome analysis of injured *Xenopus laevis* tadpole and mice suggested that Neurod4L.S., a basic-helix-loop-helix transcription factor, was the most promising transcription factor to exert neuroregeneration after spinal cord injury (SCI) in mammals. We generated a pseudotyped retroviral vector with the neurotropic lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) envelope to deliver murine Neurod4 to mice undergoing SCI. SCI induced ependymal cells to neural stem cells (NSCs) in the central canal. The LCMV envelope-based pseudotyped vector preferentially introduced Neurod4 into activated NSCs, which converted to neurons with axonal regrowth and suppressed the scar-forming glial lineage. Neurod4-induced inhibitory neurons predominantly projected to the subsynaptic domains of motor neurons at the epicenter, and Neurod4-induced excitatory neurons predominantly projected to subsynaptic domains of motor neurons caudal to the injury site suggesting the formation of functional synapses.

研究分野：脳神経外科(脊髄外科)

キーワード：神経転写因子 Neurod4 上衣細胞 ウイルスベクター グリア瘢痕

1. 研究開始当初の背景

我国にはすでに 10 万人以上の脊髄損傷者が生活をされており、脊髄損傷を受傷した患者の身体的・精神的な苦痛は計り知れない。医療人・研究者としてはいち早く有効な治療を提供することが社会的なニーズであり、使命である。

これまで我々は、脊髄損傷後のマウスに神経向性の高いヘルペスウイルスベクターを用いて神経栄養因子を導入することで機能改善と脊髄前角運動ニューロンの保護作用を見出した (Natsume et al. *Exp Neurol* 2001a, 2001b, 2003, *J Neurotrauma* 2004)。その後、体外から輸注した神経幹細胞が損傷部位に特異的に集簇する性質を利用し、これをキャリアと神経栄養因子を損傷部位に分泌させるシステムを構築した (Takeuchi, Natsume, et al, *Neurosci Lett* 2007)。同時に、内在性の神経幹細胞が瘢痕性グリアに分化し再生軸索の物理的障壁になることから、JAK-STAT 経路を活性化することで亜急性期に神経幹細胞から反応性グリアに分化することを抑制することに成功した (Natsume et al. *J Neurotrauma* 2009, Nishimura, Natsume, et al. 2013)。これまで未分化な神経幹細胞を神経栄養因子送達のキャリアとして利用したり、あるいは神経幹細胞から反応性グリアへの分化の抑制を試みたりと未分化から分化への一方向の発想であった。その後、グリア瘢痕形成前の急性期から亜急性 (10 日後) までの間に、神経管を構築する上衣細胞が放射性グリアに脱分化し、ネスチン陽性の神経幹細胞に至るという興味ある新発見が報告された。神経幹細胞や iPS などの多分化能のもつ幹細胞の移植は、奇形腫発生などの腫瘍化が懸念されている。一方、内在性の神経幹細胞を活性化できれば、拒絶反応もなく、腫瘍リスクもないと考えた。神経幹細胞の活性化のために、神経再生に関わる遺伝子を同定してそれを内在性神経幹細胞に導入することが最も有効であると考えた。

アフリカツメガエルの幼生期と成体期では、前者の脊髄損傷は完全に再生するが、後者は再生能力がないことが知られている。幼生期または成体期アフリカツメガエルの脊髄損傷後の網羅的発現解析 (RNA-seq) の結果から、幼生期の脊髄神経再生後のみに見られ、ヒト (霊長類) まで保存されている遺伝子群を抽出することにより、神経再生に有効な因子を同定できると考えた。

次いで、神経再生に関わる因子を遺伝子導入する方法を検討し、ウイルスベクターを用いることとした。分裂細胞のゲノムに目的遺伝子が挿入されるレトロウイルスベクターは感染効率が低いという欠点がある。そこで我々は、上衣細胞特異的に感染し髄膜炎を起こすリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) をエンベロープとし、発現系はレトロウイルスであるシュードタイプウイルスベクターの構築に成功した。

我々が開発したウイルスベクターを用いて、脊髄損傷マウスに神経再生に有効な遺伝子を導入することにより、神経損傷後に上衣細胞から脱分化した内在性神経幹細胞に特異的に遺伝子発現が得られ、神経再生を導く可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷後の機能的・解剖学的な神経再生を目指すことを最終的な目的とした。それを達成するために、(i) 大規模ゲノム解析を行い、アフリカツメガエルでの神経再生時に高発現し、内在性神経幹細胞を誘導する分子を選定すること、(ii) 新規に開発した神経幹細胞嗜好性のあるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) のエンベロープ (殻) と分裂細胞に感染し恒常的に発現するレトロウイルスのハイブリッドベクター (シュードウイルス) を構築し、感染効率と発現効率上昇を両立させる技術を開発すること、(iii) 神経再生に関わる分子を遺伝子導入した脊髄損傷マウスの運動機能評価を行うこと、そして病理学的検討を行い、軸索伸長とシナプス再構築が得られるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエルの幼生期の脊髄神経再生能力

神経再生研究でよく用いられるモデルであるアフリカツメガエルの幼生期と成体期では、前者の脊髄損傷は完全に再生するが後者は再生能力が乏しいことが知られている。我々は幼生期 (regenerative stage) または成体期 (nonregenerative stage) のアフリカツメガエルの脊髄損傷後の網羅的発現解析 (RNA-seq) を行った。Basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子は神経細胞の運命の仕様と分化の重要な決定要因として知られており、アフリカツメガエルの脊髄損傷後の 107 つの bHLH 転写因子を解析したところ、神経再生に関わる最も有効な候補遺伝子として Neurod4 が浮上した。また、本研究のマウス脊髄損傷モデルにて、Neurod4 を含む神経再生に関わる重要な遺伝子として知られている候補遺伝子 (Neurod4, Neurod1, Atoh1, Neurog2, Ascl1) を、マウスとアフリカツメガエル間での発現比較を行ったところ、その発現差異は Neurod4 で最も大きかった。さらに、Neurod4 はマウスの脊髄損傷後の発現の上昇が Sham と比較して乏しく、マウスに対する Neurod4 の導入は神経再生を補完できる可能性が高いと考えられた。これらの結果を踏まえ、本研究では Neurod4 を神経再生の有力な候補遺伝子として選定し、その

有効性について評価した。

(2)効率的な内在性神経幹細胞への遺伝子導入を可能とするベクターの開発

分裂細胞のゲノムに目的遺伝子が挿入されるレトロウイルスベクターは感染効率が低いという欠点がある。そこで我々のグループは、幹細胞嗜好性があり髄膜炎を起こすことで知られるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus [LCMV])³⁾をエンベロープとし、発現系はレトロウイルスであるシュードタイプウイルスベクターを構築した。レトロウイルスは活性化された神経幹細胞や前駆細胞などの分裂細胞にのみ感染し、ニューロンなどの非分裂細胞には感染しないという特徴がある。このベクターを用いることで、脊髄損傷後に上衣細胞から脱分化した幹細胞に特異的に遺伝子導入を行うことが可能となる。Neurod4 を本ベクターに搭載してマウスの脊髄損傷後に導入し、対照群との比較検討を行った。

(3)脊髄損傷マウスへの遺伝子導入の実際

マウスは 9-10 週の雌の C57BL/6J マウスを用い、脊髄損傷はクリップによる脊髄圧挫損傷モデルとした。G3T-hi 細胞 (Takara Bio)を用いて前述のシュードタイプウイルス産生細胞液を作成し、2%イソフルレンによる麻酔下にてハミルトンシリンジを用いた後頭下穿刺により 2 μ L (2 \times 10⁵ 個の細胞を含有)注入する。T9-T10 の椎弓切除を行い、脊髄をクリップ (KN-353 Cat. No, AM-1; 夏目製作所) にて 30 秒間圧迫し脊髄損傷を作成する。損傷により上衣細胞が幹細胞へと脱分化し、幹細胞嗜好性を持つ上記ウイルスベクターによる特異的な遺伝子導入が可能となる。

(4)評価方法

主に神経関連抗体を用いた免疫染色や in situ hybridization 法による組織学的評価に加え、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) による各遺伝子発現の定量的評価を行った (それぞれ N=3)。グループ間の統計的有意差の検討には Student's t-test を用い p < 0.05 で有意差ありとした。また、後肢機能評価は Basso Mouse Scale (以下 BMS、0-9 点)を用いた。損傷後 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 日後 (days post injury, DPI) に評価を行い、3DPI にて BMS 2 の時は損傷が不完全であると判断しこれを除外した。下肢機能は 1 分間のビデオ作成のうえ、損傷手技に関与しない 2 名の観察者により BMS で評価し、その平均を取った。Neurod4 群と対照群をそれぞれ N=5 で評価し、それぞれの週数の BMS をウィルコクソンの順位和検定で比較解析し、p < 0.05 で有意差ありとした。統計分析は GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA) を使用した。

(5)歯髄幹細胞の直接投与

グリア瘢痕抑制効果があるとされる歯髄幹細胞を直接投与することにより、さらなる神経再生を加速させることができると考え、歯髄幹細胞を損傷脊髄の髄内に直接投与して、脊髄損傷マウスの機能回復が得られるか評価を行った。

4. 研究成果

(1)LCMV のエンベロープを有するシュードタイプウイルスの神経幹細胞への特異的感染

損傷後の急性期、上衣細胞は幹細胞へと脱分化し始める。本研究における圧挫損傷モデルにおいても、中心管周囲の多くの細胞が 7 DPI で神経幹細胞マーカーである Nestin が陽性を示したのに対し、Sham では Nestin 陽性細胞が確認されなかった。また本シュードタイプウイルス導入の結果、Nestin 陽性細胞の多くにウイルス感染、つまり Green Fluorescent Protein (GFP)陽性が確認できた。感染は中心管を構築する上衣細胞そのものではなく、その周囲の脱分化した Nestin 陽性細胞で確認でき、分裂細胞に特異的に感染するレトロウイルスベクターの特徴を示しているといえる。

(2)Neurod4 導入による神経幹細胞のニューロンへの分化誘導

次に Neurod4 を発現するレトロウイルスベクターを構築し損傷後に導入し、その効果を評価した。42 DPI にて、Neurod4 が導入された (tauAcGFP1 陽性) 細胞のうち、ニューロンのマーカーである NeuN 陽性細胞数は対照群と比して明らかな増加を認めた。qPCR でも NeuN (Rbfox3 mRNA) の発現は対照群と比較して有意な増加を認めた。つまり、損傷後の幹細胞への Neurod4 導入によりニューロンへの分化が促進されることが示された。

(3)Neurod4 導入による GFAP 陽性アストロサイトの減少、後肢運動機能の改善

脊髄損傷後に発生するアストロサイトはグリア瘢痕を形成し、軸索の再生の物理的障壁となり神経再生を阻害するが、グリア瘢痕を形成するアストロサイトのうち半数以上は上衣細胞に由来するとされる。そこで、Neurod4 導入によるアストロサイトへの分化への影響を調査した。結果、Neurod4 群では GFAP 陽性のアストロサイトの数は対照群と比較して明らかな減少を認めた。qPCR でも GFAP 発現は対照群と比較して有意な減少が確認された。Neurod4 の導入は、上衣細胞から脱分化した幹細胞の分化系統をニューロンへと系譜転換することで、アストロサイトへの分化を潜在的に減少させた可能性が示された。後肢運動機能の評価には BMS を使用し、損傷後 6 週間、マウスの運動機能を評価した。結果、Neurod4 群は対照群と比較して有意な改善を示

した (損傷後 1 週間、 2.4 ± 1.1 vs 0.30 ± 0.20 、 $P = 0.056$; 損傷後 6 週間 : 4.3 ± 1.1 対 0.60 ± 0.40 、 $P = 0.0080$)。

(4) 歯髄幹細胞によるグリア瘢痕抑制効果と運動機能改善

歯髄幹細胞投与により、14 日目以降の機能回復が対照群と比較して有意に改善した。western blot の結果、歯髄幹細胞は GFAP の発現と Tyr でリン酸化された STAT3 (p-STAT3 at Tyr) の発現を、脊髄損傷後 10 日目に低下させた。それらは 5 日目には変化が無かった。歯髄幹細胞は iba-1 の発現には影響を与えなかった。免疫組織化学的には、脊髄損傷後 10 日目の GFAP 陽性アストロサイトで p-STAT3 at Tyr が主に発現しており、歯髄幹細胞投与により GFAP 陽性アストロサイトにおける p-STAT3 at Tyr が減少していることがわかった。さらに、歯髄幹細胞投与は、SCI 後 10 日目の GFAP 陽性アストロサイトにおける切断型カスパーゼ 3 を有意に誘導した。また、ニューロカンの発現も、脊髄損傷後 10 日目により有意に減少した。以上の結果から、歯髄幹細胞は脊髄損傷後 5 日目から 10 日目にかけて、アストロサイトのアポトーシスを誘導することにより、アストログリオシスとグリア瘢痕形成を抑制する重要な役割を果たし、神経機能の改善をもたらすと考えられる。Neurod4 による内在性幹細胞の神経細胞への分化促進とグリア瘢痕抑制効果に加え、歯髄幹細胞によるさらなるグリア瘢痕抑制効果は、これらの治療を組み合わせることにより相加的な運動機能改善が得られる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuoka Toshiki, Kato Akira, Hirano Masaki, Ohka Fumiharu, Aoki Kosuke, Awaya Takayuki, Adilijiang Alimu, Sachi Maeda, Tanahashi Kuniaki, Yamaguchi Junya, Motomura Kazuya, Shimizu Hiroyuki, Nagashima Yoshitaka, Ando Ryo, Wakabayashi Toshihiko, Lee-Liu Dasfne, Larrain Juan, Nishimura Yusuke, Natsume Atsushi	4. 巻 24
2. 論文標題 Neurod4 converts endogenous neural stem cells to neurons with synaptic formation after spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102074 - 102074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102074	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16件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 福岡俊樹、加藤彰、粟屋堯之、西村由介、夏目敦至
2. 発表標題 脊髄損傷後の内在性幹細胞への 神経転写因子導入による神経再生治療
3. 学会等名 第36回脊髄外科学会 学術委員会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井智哉, 西村由介, 永島吉孝, 伊藤洋, 雄山隆弘, 大須賀浩二, 大道裕介, 三谷泰之, 齋藤竜太
2. 発表標題 歯髄幹細胞を用いた脊髄神経再生研究
3. 学会等名 第36回脊髄外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井智哉, 西村由介, 永島吉孝, 伊藤洋, 雄山隆弘, 大須賀浩二, 大道裕介, 三谷泰之, 齋藤竜太
2. 発表標題 歯髄幹細胞を用いた脊髄神経再生研究
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井智哉, 西村由介, 永島吉孝, 伊藤洋, 雄山隆弘, 大須賀浩二, 大道裕介, 三谷泰之, 齋藤竜太
2. 発表標題 歯髄幹細胞を用いた脊髄神経再生研究
3. 学会等名 第21回分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 粟屋堯之, 夏目敦至, 西村由介, 江口馨, 福岡俊樹, 永島吉孝, 若林俊彦
2. 発表標題 Neurod4導入マウスにおける脊髄損傷語の神経再生
3. 学会等名 第34回日本脊髄外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Awaya, Akira Kato, Toshiki Fukuoka, Yusuke Nishimura, Toshihiko Wakabayashi, Atsushi Natsume
2. 発表標題 Neural regeneration with Gene delivery by novel pseudo typed retrovirus
3. 学会等名 第20回分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 粟屋堯之, 加藤彰, 福岡俊樹, 西村由介, 若林俊彦, 夏目敦至
2. 発表標題 脊髄損傷モデルマウスの内在性神経幹細胞に対する遺伝子導入と機能回復
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Fukuoka, Yusuke Nishimura, Atsushi Natsume
2. 発表標題 Neurod4 at the regenerative stage of X.laevis A promising transcription factor to promote functional recovery following spinal cord injury
3. 学会等名 13th Anniversary International Symposium on Nnanomedicine(ISNM2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	大岡 史治 (Ohka Fumiharu) (10725724)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	夏目 敦至 (Natsume Atsushi) (30362255)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

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
---------	---------