

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16934

研究課題名（和文）脳梗塞内に生じる新規幹細胞の動態解析と遺伝子改変マウスを用いた神経再生機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of induced iNSPCs within the ischemic area and neural regeneration mechanism using transgenic mice

研究代表者

土居 亜紀子 (Doi, Akiko)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70793321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞病態時に特異的に誘導され、神経再生機構の鍵を握る新規幹細胞（脳傷害誘導性神経幹細胞：injury induced-NeuralStem/Progenitor Cells, iNSPCs）を発見しin vitro においては活動電位を有する機能的な神経に分化することを報告してきた。この細胞の動態を解明するために、神経幹細胞マーカーであるnestinをGFPで標識した遺伝子改変マウス(Nestin-GFPマウスCB-17 系統)を作製した。免疫組織化学的解析により脳梗塞病態時においては梗塞領域及びSVZ に神経分化能を有する幹細胞が誘導されたが、両者の細胞特性や起源は異な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

本研究においては脳梗塞巣内に生じるiNSPCsは成体脳にもともと存在するSVZ由来神経幹細胞と異なる起源や特性を持つことが示唆された。iNSPCs元来壊死巣と呼ばれていた組織由来であり、そこから発生する細胞のトランスに成功した。また、本研究により樹立したNestin-GFP組換えマウス（CB-17 系統）は、再現性や生存率が高いことから、脳梗塞病態時において、神経幹細胞を起点とした組織修復及び神経再生機構の解明や評価に極めて有用なツールとなり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Accumulating evidence reveals that endogenous neural stem/progenitor cells (NSPCs) are activated under pathological conditions, such as stroke. To elucidate the localization of these cells, researchers have created genetically modified mice wherein the neural stem cell marker, Nestin, is labeled with a green fluorescent protein (Nestin-GFP mice). Immunohistochemical analysis of Nestin-GFP (CB-17 line) mice revealed that GFP was expressed not only in the subventricular zone (SVZ), a well-known neurogenic region of the brain, but also in the infarct region. Neurospheres, a hallmark of NSPCs, were formed from both tissues after the isolation and culture of the SVZ and infarcted regions, respectively. They differentiated into various neural lineages, including neuronal cells, astrocytes, and oligodendrocytes. However, PCR analysis revealed that NSPCs from the SVZ and infarcted region had distinct characteristics, implying that these cells have a distinct origin.

研究分野：病態神経科学

キーワード：脳梗塞 脳傷害誘導性神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

日本において脳血管障害は死亡原因の上位疾患であり、重度要介護者や寝たきりの主要な原因である。脳血管障害の中でも脳梗塞患者は増加傾向にあるものの、根本的に有効な治療法はなく、要介護者数の抑制には神経再生といった観点から新規治療法の開発が必要である。神経再生の分野において、成体脳に神経幹細胞の存在が明らかとなってから、幹細胞を基盤とした神経再生療法の臨床応用に大きな期待が寄せられている。しかしながら、数々の臨床試験からも神経幹細胞治療が有効であるとの確固たる証拠に乏しいのが現状である。その理由の一つとして、これまで多くの研究では発生過程で出現する神経幹細胞や正常脳組織から単離した神経幹細胞を用いて治療効果を検討してきたことが考えられる。そこで、我々は脳梗塞病態時に特異的に誘導される内在性の新規幹細胞（脳傷害誘導性神経幹細胞：injury induced-Neural Stem/Progenitor Cells, iNSPCs）を発見し、この細胞が *in vitro* においては活動電位を有する機能的な神経に分化することを報告してきた。しかしながら、iNSPCs による内在性神経再生亢進を標的とした新規神経再生療法を開発するためには、iNSPCs の詳細な生体内動態を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では細胞の生体内動態の解析に用いられている Cre-loxP システムを活用し iNSPCs に発現する nestin 遺伝子のプロモーターの調節下に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスを用い、脳梗塞病態下における iNSPCs の生体内トレースを行うことで脳梗塞後の生体内動態及びその神経分化能を検討した。しかしながら、遺伝子改変マウスは基本的に C57BL/6 系統であり、多くの脳動脈枝と側副血管を有するため、中大脳動脈（MCA）を閉塞させる脳梗塞モデルを作製しても、梗塞領域のばらつきが大きく、長期生存を見込めなかった。そこで、nestin プロモーターの制御下に GFP を発現するマウス B6.Cg-Tg (Nestin-EGFP) 1Yamm transgenic mice (C57BL/6 系統) を CB-17/Icr-Jcl マウスと戻し交配し、脳梗塞後長期生存可能な nestin-GFP 組換えマウス (CB-17 系統) を新規に作製し、脳梗塞病態下における iNSPCs の生体内動態を急性期から慢性期にかけて詳細に検討した。

3. 研究の方法

・遺伝子組換えマウスの作製

nestin-CreERT2 マウスを YFP レポーターマウス (ROSA26-stop-YFP レポーターマウス) と交配させ、nestin-CreERT2/Rosa26-YFP マウスを作製した。脳梗塞に関しては、これまでの我々の報告に準じて、中大脳動脈の永久閉塞にて行った (Stem Cells, 2015)。iNSPCs による nestin 発現時期に合わせて Tamoxifen を投与することで YFP 陽性 iNSPCs の生体内動態を免疫組織化学的手法にて実施した。

・遺伝子組換えマウスの戻し交配による作製

B6.Cg-Tg (Nestin-EGFP) 1Yamm 組換えマウスに C.B17/Icr-+/+Jcl を 5 世代以上戻し交配することにより、nestin-GFP 組換えマウス (CB-17 系統) を作製した。

・作製した nestin-GFP 組換えマウス (CB-17 系統)、nestin-GFP 組換えマウス (C57BL/6 系統) に加え、それぞれのコントロールである CB-17 マウス、C57BL/6 マウスに対して脳梗塞を作製後、TTC 染色を用いて梗塞領域を比較検討した。

・脳梗塞急性期の脳切片を作製し、脳梗塞巣及びその周囲に存在する GFP 陽性 iNSPCs 及び SVZ に存在する GFP 陽性 NSPC の局在や細胞数などに関して比較検討した。また、GFP 陽性 iNSPCs 及び GFP 陽性 NSPC を経時的にそれぞれ単離し、spheroid 形成能や神経分化能を免疫組織化学染色、PCR 等にて比較検討した。

4. 研究成果

脳梗塞 3 日、5 日目の nestin-CreERT2/Rosa26-YFP マウス組織を用いて、免疫組織化学染色を行ったところ、コントロールでは YFP 陽性細胞は SVZ に観察されたが、脳梗塞後には YFP 陽性細胞が損傷部位に向かって遊走することが認められた。しかし、SVZ 由来 YFP 陽性細胞の遊走能は限られており、梗塞領域において YFP 陽性細胞が観察されることはほとんどなかった。さらに、梗塞領域に発現していた PDGFR β 陽性細胞は、YFP を発現しなかった。これらの結果、iNSPCs が SVZ 由来の NSPC から誘導されていないことが示唆された。

B6.Cg-Tg (Nestin-EGFP) 1Yamm 遺伝子組換えマウスにおいて脳梗塞モデル作製時における MCA 周辺の動脈枝について検討したところ、nestin-GFP 組換えマウス (C57BL/6 系統) に比べ、CB17 マウスと 5 世代戻し交配した nestin-GFP 組換えマウス (CB-17 系統) では動脈枝の数が減少していた。TTC 染色にて梗塞領域を比較検討したところ、nestin-GFP 組換えマウス (C57BL/6 系統) のマウスでは個体間の変動が大きかったが、nestin-GFP 組換えマウス (CB-17 系統) では個体間の変動は少なく、CB17 マウスのように梗塞領域が一定の大きさであり再現性が見られた。これらの結果より、5 世代以上戻し交配することで CB17 系統の特徴を獲得したことが示された。次に GFP 陽性内在性神経幹細胞の生体内動態に関する検討を行うため、脳梗塞後の脳切片を用い免疫組織化学染色を行ったところ、SVZ で GFP 陽性細胞の一部がアストロサイトマーカーである GFAP と共発現していた。梗塞領域の境界においては GFP 陽性細胞の一部が GFAP を発現していたが梗塞中心領域では GFAP と共発現している細胞は観察されなかった。次にペリサイトマーカーである PDGFR β 、NG2 マーカーで検討したところ、SVZ では GFP 陽性細胞が NG2 や PDGFR β と共発現は観察されなかったが、梗塞領域では GFP 陽性細胞の一部では NG2、PDGFR β と共発現していた。この結果から SVZ に発現する GFP 陽性 NSPC と梗塞中心領域の GFP 陽性 iNSPCs は異なった細胞集団である可能性が示唆された。さらに脳梗塞領域と SVZ 領域から spheroid 形成能の検討を行ったところ、どちらからも NSPC マーカー

である nestin、SOX2 を発現する spheroid が作製された。PCR の結果から、SVZ 由来の spheroid と比較して梗塞領域由来の spheroid では PDGFR β の遺伝子発現レベルが高いことが示された。これらの所見からも、虚血領域および SVZ 由来の spheroid では NSPC の特性が異なっていることが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Nishie Hideaki, Nakano-Doi Akiko, Sawano Toshinori, Nakagomi Takayuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Establishment of a Reproducible Ischemic Stroke Model in Nestin-GFP Mice with High Survival Rates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12997 ~ 12997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312997	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土居 亜紀子
2. 発表標題 CD44 is expressed both in ischemia-induced multipotent stem cells and their niches microglia/macrophages, after ischemic stroke in mice.
3. 学会等名 第43回神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土居 亜紀子
2. 発表標題 脳梗塞後の組織修復過程におけるCD44発現の検討
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------