

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18387

研究課題名（和文）iPS由来神経幹細胞/嗅粘膜ハイブリッド型グラフトを用いた脳出血治療法の開発

研究課題名（英文）New treatment method for brain hemorrhage by co-culturing neural stem/progenitor cells using olfactory ensheathing cells

研究代表者

高垣 匡寿（Takagaki, Masatoshi）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70724433

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）：嗅粘膜鞘細胞を足場として、神経幹/前駆細胞を共培養し、シート状に整形することで脳出血の再生方法を模索する実験を計画した。大脳オルガノイドを経由した神経幹/前駆細胞の作成方法は樹立できたが、諸事情により嗅粘膜鞘細胞を用いた実験ができなくなったため、代わりにバイオマテリアルを用いたシート化を目指したが達成できなかった。また、SDラットを用いた脳皮質下出血モデルは作成できたが、移植における免疫抑制方法は確立できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞を用いた脳出血の再生方法に関してはほとんど研究が進んでいない。障壁としては出血部位の微小環境の悪化や広範な出血による欠損部の補填が細胞数的に困難であることが挙げられる。我々は足場を用いた神経幹細胞の培養方法の確立や、ラット脳出血モデルへの移植方法の確立を模索したもののどちらも思ったような成果が上がらず、中途終了する方針となった。しかし、本研究での神経幹細胞の樹立方法やラット脳出血モデルの確立などは今後の研究の礎になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We planned an experiment to explore a method to regenerate brain hemorrhage by co-culturing neural stem/progenitor cells using olfactory ensheathing cells as a scaffold and shaping them into sheets. Although we were able to establish a method to create neural stem/progenitor cells via cerebral organoids, we were unable to conduct the experiment using olfactory ensheathing cells due to various reasons, so we aimed to create sheets using biomaterials instead, but were unable to succeed. We were also able to create a subcortical hemorrhage model using SD rats, but were unable to establish an immunosuppression method for transplantation.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 神経幹/前駆細胞 シート化 脳出血モデル

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞を用いた再生医療の進歩は著しく、大脳などの中枢神経の領域特異的ニューロンや神経幹/前駆細胞を誘導することができるようになってきている。それに伴い変性疾患や脳血管障害に対する臨床研究も行われ始めている。しかし、脳血管障害の中でも脳出血に対する研究は脳梗塞など他の脳疾患に比較して進んでおらず、臨床の現状としては降圧して出血の拡大を防ぐことやリハビリテーションによる回復を目指す以外に方法はない状態である。特に脳出血における再生に関しては、脳出血後に移植先の組織の微小環境が炎症や瘢痕などにより二次的損傷を受けており、それらが移植細胞の生着や分化などを阻害しているものと考えられている。また、出血による脳損傷と瘢痕化は広範囲に広がり移植細胞を十分に充填することが困難であることも一因と考えられる。

ここで、嗅粘膜はヒト成人において唯一生理的に神経新生が行われている部位である。嗅上皮内の微小環境内で、嗅覚受容体ニューロンを供給する神経幹/前駆細胞は増殖・維持される。さらに分化した嗅覚受容体ニューロンの軸索は固有層を通過して嗅球へと軸索を伸長している。この嗅粘膜の微小環境を支えているのが嗅粘膜鞘細胞 (Olfactory ensheathing cell; OEC) と呼ばれるグリア細胞である。OEC は固有層に存在しニューロンの軸索伸長を支持する足場を提供する他、GDNF や BDNF などの神経栄養因子を分泌し神経幹細胞の増殖・分化をコントロールしている。この特性を利用して嗅粘膜あるいは OEC を足場として用いて損傷部位の環境を改善しつつ、神経幹細胞/前駆細胞を生着させることで中枢神経の損傷部位への生着効率の改善や軸索伸長の促進が可能なのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は脳出血後の微小環境を、嗅粘膜鞘細胞 (olfactory ensheathing cell; OEC) によりリモデリングし、ヒト人工多能性幹細胞由来の神経細胞・神経幹/前駆細胞 (human induced pluripotent stem cell-neural stem/progenitor cells; hiPS-NSPCs) の生着・分化・機能・軸索投射・シナプス形成を効率的なものとするという、これまでにない概念の脳出血に対する再生医療技術を開発することを目的とする。また、広範な脳出血への効率的な移植方法を確立するために、OEC と hiPSC-NSPC の共培養を行う際に OEC を足場としてシート状に整形して脳出血部位への外科的貼付が容易になるような形態へと加工する方法を模索する。

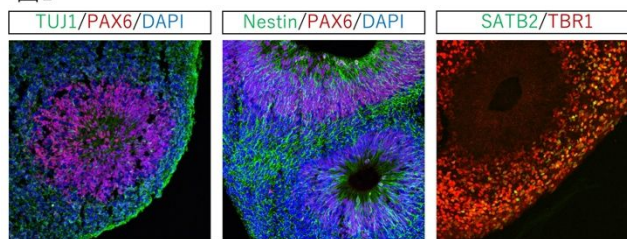
### 3. 研究の方法

多能性幹細胞には理化学研究所バイオリソースセンターから入手した iPS 細胞標準株 201B7 を用いることとした。まずは hiPS 細胞の培養系の確立から開始し、安定した hiPS 細胞の供給に成功した。その hiPS 細胞を解離した後に、V bottom の 96 well 低吸着培養容器に 12000 細胞/well になるように播種することで胚葉体を形成させ、SMAD 阻害薬 (SB431542, LDN193189) 並びに Wnt 阻害薬 (IWR1e) を用いることで前脳領域選択的な分化誘導を行い、細胞外マトリックス (Matrigel) を用いることで大脳オルガノイドを作成した。免疫染色を行い大脳オルガノイドの品質を確認した。その作成した大脳オルガノイドを一旦解離して EGF、FGF、LIF を添加した無血清培地で浮遊培養することで hNSPCs を作成した。また、hNSPCs が神経に分化することを確認するために解離した後に Matrigel コーティングした 4 well plate 上で接着培養した。ここで連携研究者の異動もありラット嗅粘膜の採取技術の取得とその培養・実験系の確立を行うことが困難となった。代替案としてバイオマテリアルを足場として利用できないか検討を行った。メッシュ状の吸収性素材 (PLGA) やメッシュ状のハイドロキシアパタイトと PLGA の合剤、不織布状のシリカファイバーを用いて色々な条件下で hNSPCs の培養方法の検討を行った。また、同時進行で SD ラットの脳皮質下にコラゲナーゼ を注入することで脳皮質下出血モデルを作成した。

#### 4. 研究成果

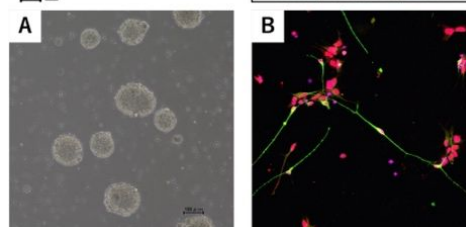
上記の方法で大脳オルガノイドを誘導し、免疫染色 (TUJ1、PAX6、Nestin、SATB2、TBR1) を行い、分化を確認した (図 1)。これを解離したのちに EGF、FGF、LIF を添加した無血清培地で浮遊培養することで hNSPCs を作成した (図 2A)。この hNSPCs を解離して接着培養することで神経細胞への分化能を持つことが確認でき、興奮性ニューロン (VGlut1) も含まれていることが判明した (図 2B)。

図1



続けてラット嗅粘膜を採取して OEC の培養系を確立して共培養方法の検討を行う予定であったが、連携研究者の異動など予想外の事態が起こったため急遽バイオマテリアル足場を用いての培養方法の検討へと方針転換を行った。

図2



吸収性のメッシュ状の素材 (PLGA) やメッシュ状のハイドロキシアパタイトと PLGA の合剤、不織布状のシリカファイバーなどへの播種を試みたがうまくいかず、hiPS 細胞を上記の足場に撒いた状態で神経誘導も行ったが実験系として安定しなかった。

また、同時に SD ラットの脳皮質下出血モデルの作成も行った。コラゲナーゼ を定位的にハミルトンシリンジで注入することで脳皮質下出血モデルの作成には成功した (図 3)。

続けて免疫抑制条件の検討を、皮質除去モデルを用いて行った。当初はシクロスポリン A 単剤での免疫抑制で移植可能と考えていたが、移植 4 週間後での生着は確認できなかった。メチルプレドニゾン、ミコフェノール酸モフェチルなど多剤による免疫抑制方法を試したが最終的に生着は確認できなかった。

図3



上記のように hNSPCs の効率的な誘導やラット脳出血モデルの作成には成功したが、想定外の事情もあり元々予定していた OEC を用いての共培養方法の確立ということはできなかった。また、移植に関しても免疫抑制方法の確立ができず、本研究期間内で当初予定していた研究成果を上げる目処が立たないと判断された。

しかしながら、大脳皮質オルガノイドから hNSPCs を作成する方法の確立やラット脳出血モデルの開発など本研究で得られた知見は大きなものであり、今後の実験に繋がれると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺田 栄作, 馬場 庸平, 高垣 匡寿, 中村 元, 西田 武生, 井筒 伸之, 竹中 朋文, 川端 修平, 松井 雄一, 山田 修平, 中川 僚太, 貴島 晴彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳皮質オルガノイドを用いた皮質再生法の開発
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 寺田栄作、馬場庸平、高垣匡寿、中村元、西田武生、中川僚太、福田竜丸、川端修平、松井雄一、山田修平、竹中朋文、井筒伸之、貴島晴彦
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドを用いた皮質再生法の開発
3. 学会等名 第47回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田栄作、馬場庸平、高垣匡寿、中村元、西田武生、松村剛樹、中川僚太、福田竜丸、松井雄一、山田修平、竹中朋文、貴島晴彦
2. 発表標題 シート状の不織布培養担体は大脳オルガノイドの皮質神経層の形成と拡大をサポートする
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------