

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20747

研究課題名（和文）イモリ切断損傷脊髄の完全再生を担う再生細胞の分化多能性と組織再構築能の検証

研究課題名（英文）Investigation of multipotency and tissue regeneration ability of stem cells that play roles in complete regeneration after spinal cord injury in newts

研究代表者

関 亮平（SEKI-OMURA, Ryohei）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40746624

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：有尾両生類の一種であるイベリアトゲイモリの脊髄損傷時の再生を担う神経幹細胞を分離し培養する手法を確立した。この手法を活用し、マウスの神経幹細胞との性質の比較を実施した。その結果、血清に対する応答の仕方がイモリとマウスで異なることが明らかとなった。また、それぞれの動物種の神経幹細胞からなる細胞塊（ニューロスフィア）のRNA-seqを実施した。各動物種内においてニューロスフィアが由来する器官間および成長段階間でトランスクリプトームの比較解析を実施したところ、発現変動遺伝子の数がイモリとマウスで異なる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

ヒトを含む哺乳類の脊髄損傷後の機能回復は限定的であり、抜本的な治療法が望まれている。本研究では、この治療法開発の土台となる知見を得るための基礎研究として、脊髄の完全再生が可能な有尾両生類の神経幹細胞の培養法を確立することを試み、それを達成した。これにより、有尾両生類がもつ特有の性質を培養系で調査・分析することが可能となった。実際に、マウスの神経幹細胞との比較解析から、有尾両生類の神経幹細胞に特異的に発現する、言わば再生遺伝子の探索へと研究を発展させている。

研究成果の概要（英文）：In this study, I established a method for isolating and culturing neural stem cells (NSCs), which could play key roles in regeneration after spinal cord injury, from a urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. By taking advantage of this method, I carried out comparison of characteristics of NSCs from *P. waltl* with those from the mouse. I found that the response upon serum addition into the culture medium differed according to the species. Furthermore, neurospheres that are composed of NSCs from each species were subjected to RNA-seq. Differential expressed gene (DEG) analyses between organs (brain and spinal cord/neural tube) or developmental stages (larva/embryo and adult) in each species showed the difference in the number of DEGs between the two species.

研究分野：発生生物学、再生生物学

キーワード：有尾両生類 神経幹細胞 脊髄再生

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の中樞神経系は再生能力に乏しく、脊髄損傷後の機能回復は限定的である。我が国における脊髄損傷の患者数は15万人以上であり、また毎年約5,000人が新たに脊髄損傷を負っているとされている。損傷により車椅子生活を強いられる場合が多いことから、脊髄損傷は医療・社会・経済等の様々な面で大きな問題を生じさせる疾患であり、現代医学が抱える課題の1つであると言える。

一方で、イモリやサンショウウオ等の有尾両生類においては、たとえ脊髄が完全に切断されたとしても、その三次元構造を自発的に再構築し、機能的にもほぼ完全な脊髄を再生させることができる。特筆すべきは、有尾両生類の脊髄では、その切断後に特定の細胞が分裂増殖して分断された領域を橋渡しし、最終的に脊髄実質を再構築してしまうことである(Chernoff et al., Dev. Dyn., 2003)。有尾両生類がもつこの特異な能力の分子メカニズムが明らかとなれば、ヒトでの完全な脊髄再生を可能にする新たな治療法の開発に向けた、基盤的な知見を得ることができると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究ではまずイモリの脊髄損傷時の再生を担う神経幹細胞の分離・培養法を開発し、その手法を活用して再生能力の発揮に重要な遺伝子を明らかにすることを目的とした。また、脊髄再生能力の乏しいマウスの神経幹細胞との比較解析を行うことで、イモリがもつ高い再生能力を生み出すメカニズムを明らかにすることを目指した。さらには、マウスの神経幹細胞を人為的に操作することでイモリの神経幹細胞が有する性質を付与することが可能かどうかを検証し、哺乳類への応用の実現可能性を追求することを当初の目標とした。

3. 研究の方法

ゲノムやトランスクリプトームの情報が利用可能であり、遺伝子組換えやゲノム編集も可能であるという利点から、有尾両生類の中でもイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) を用いて本研究を行うこととした。

神経幹細胞の分離と培養については、別種の有尾両生類にて報告のある手法(Kirkham et al., Stem Cell Rep., 2014)をベースにニューロスフィア培養を試みた。具体的には、イベリアトゲイモリの大脳半球および脊髄を細かく刻み、パパインで処理することで細胞を分散させた。セルストレーナーを通したのちに、bFGFとEGFおよびB27(- Vitamin A)サプリメントを添加したDMEM/F12培地(イモリの浸透圧に合わせるために滅菌水で66%に希釈したもの)中で、25-27℃、2%CO₂の条件下で浮遊培養を行なった。1週間に1-2回の培地交換を行なったが、この際、半量の培地のみを交換した。なお、この培地にウシ胎児血清(FBS)もしくはイベリアトゲイモリ血清(*P. waltl* serum: PwS)を添加した場合の影響も解析した。このようにして培養した神経幹細胞の分化誘導にあたっては、bFGFおよびEGFを含まない培地を用いて、ポリリジンコートをしたガラス上で接着培養を2週間行なった。培養した細胞で発現するタンパク質の発現解析にあたっては、免疫染色を実施した。

イモリとマウスの神経幹細胞のトランスクリプトームの比較を行うために、それぞれの動物種の幼若個体(イモリの場合は幼生、マウスの場合は胚)と成体の脳および脊髄に由来する細胞を培養し、得られたニューロスフィアから抽出したtotal RNAを用いてRNA-seqを実施した。得られたデータをもとに、サンプル間で発現変動遺伝子(DEG)解析を実施した。

4. 研究成果

上記の方法でニューロスフィア培養を試みたところ、脳と脊髄のどちらに由来する細胞からもニューロスフィア様の形態を呈する細胞塊が形成された。この細胞塊に対して、細胞増殖マーカーであるPhospho-Histone H3の免疫染色を行い増殖活性の有無を検証した。その結果、細胞塊を構成する細胞の中に陽性細胞を見つけることができた。また、神経幹細胞のマーカータンパク質であるNestin、GFAP、Vimentinの発現についても同様に免疫染色により検証したところ、いずれのマーカーも染色が確認された。また、予期していなかった結果として、脳由来と脊髄由来の細胞塊の形態に違いが認められた。具体的には、脳由来の細胞塊は表面に凸凹が認められたのに対して、脊髄由来のものは滑らかな表面を呈していた。これが何を意味しているのかは現時点では不明であるが、ニューロスフィア培養のように細胞塊として培養されるグリオーマ幹細胞の中でも悪性度の高いmesenchymal型のもは凸凹があり、比較的予後が良好なproneural型のもは滑らかな球形であるとの報告がある(Spinelli et al., J. Extracell. Vesic., 2018; Garnier et al., Neuro Oncol., 2018)ことから、脳と脊髄それぞれに由来する細胞の性質の違いを反映している可能性は十分にあると考えている。さらに、今回の培養により得られた細胞塊

の分化多能性について検証するために、分化誘導条件下で2週間培養したのちに免疫染色によって各種マーカータンパク質の発現を解析した。その結果、beta-tubulin 陽性の神経細胞、GFAP 陽性のアストロサイト、O4 陽性のオリゴデンドロサイトが認められ、これら中枢神経系の細胞への分化多能性が示された。以上の結果から、本培養手法により得られた細胞塊は神経幹細胞からなるニューロスフィアであると示唆される。なお、本成果は既に論文として公表済みである (Seki-Omura et al., Dev, Growth Diff., 2022)。

次に、イモリ神経幹細胞の培養時に PwS を添加する実験を行なった。これは、アフリカツメガエルの間葉系幹細胞の培養にカエル自身の血清の添加が有効である (Otsuka-Yamaguchi et al., Stem Cell Res., 2021) という先行研究から着想を得たものである。イモリの脳から細胞を回収し、浮遊培養を開始する段階から PwS を 1%もしくは 10%の濃度で培地に添加したところ、無血清の条件で培養した時よりもニューロスフィア形成が亢進した。神経幹細胞マーカーの Nestin の発現も認められた。次に、細胞培養で一般的に用いられる FBS を 1%の濃度で同様に添加して影響をみたところ、PwS 添加時のようなニューロスフィア形成の亢進が認められた。したがって、PwS に含まれる成分が特別にこの効果をもたらすわけではないことが判明した。むしろ、哺乳類の神経幹細胞の培養では、一般的に FBS は分化を誘導するものと認識されていることから、イモリの神経幹細胞は血清に対する応答の仕方が特殊であり、哺乳類のそれとは異なる性質を持っていることが示唆される。この性質がイモリの高い再生能力と関連している可能性に期待し、現在も解析を進めているところである。

この性質の違いを有尾両生類と哺乳類の神経幹細胞で発現する遺伝子の違いに直接落とし込むために、当初の研究計画を変更してトランスクリプトーム解析を行うこととした。幼生と成体のイモリ、胚と成体のマウスの脊髄と脳から細胞を分取し、ニューロスフィア培養を行なった。幼生イモリの脊髄からはニューロスフィアを得ることができなかったが、これは、脊髄が小さいために十分な細胞を回収できなかったことが原因であると考えられる。これ以外においては培養に成功し、得られたニューロスフィアから十分量の total RNA を精製することができたため、RNA-seq を実施した。

現時点ではイベリアトゲイモリとマウスのオルソログ対応がなされていないため、イモリ-マウス間の直接比較ができず、どちらかの種で特異的に高発現している遺伝子を特定することはできずにいるが、それぞれの動物種内で DEG 解析を行ったところ、以下の点が明らかとなった。まずイモリにおいては、「成体の脳と脊髄に由来するニューロスフィアの比較」により 5,000 以上の発現変動遺伝子 (FDR < 0.1) が見つかった一方で、「幼生の脳と成体の脳に由来するニューロスフィアの比較」で見つかった発現変動遺伝子は 20 以下であった。次にマウスにおいては、「成体の脳と脊髄に由来するニューロスフィアの比較」と「胚の脳と成体の脳に由来するニューロスフィアの比較」のいずれにおいても数百の発現変動遺伝子が見つかり、イモリとの違いが認められた。この成果は第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会にて報告済みである。今後は、イモリとマウスの種間比較を実施することで、イモリの中枢神経系の再生において重要な役割を果たすと予想される候補遺伝子をスクリーニングすることを計画している。さらには、この遺伝子を人工的にマウスの神経幹細胞に発現させ、「マウス細胞のイモリ化」を試みるという本研究課題の実施期間中に取り組むことができなかった解析に挑戦していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi Shinichi, Seki-Omura Ryohei, Yamada Shintaro, Kamata Taito, Sato Yuki, Oe Souichi, Koike Taro, Nakano Yousuke, Iwashita Hikaru, Hirahara Yukie, Tanaka Susumu, Sekijima Tsuneo, Ito Takeshi, Yasukochi Yoshiki, Higasa Koichiro, Kitada Masaaki	4. 巻 891
2. 論文標題 OLIG2 translocates to chromosomes during mitosis via a temperature downshift: A novel neural cold response of mitotic bookmarking	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 147829 ~ 147829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2023.147829	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 Hayashi Shinichi, Oe Souichi, Koike Taro, Seki Omura Ryohei, Nakano Yosuke, Hirahara Yukie, Tanaka Susumu, Ito Takeshi, Yasukochi Yoshiki, Higasa Koichiro, Kitada Masaaki	4. 巻 165
2. 論文標題 <scp>OLIG2</scp> is an in vivo bookmarking transcription factor in the developing neural tube in mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 303 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15746	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 Seki Omura Ryohei, Hayashi Shinichi, Oe Souichi, Koike Taro, Nakano Yousuke, Hirahara Yukie, Tanaka Susumu, Kitada Masaaki	4. 巻 64
2. 論文標題 Establishment of neural stem cell culture from the central nervous system of the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 494 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12820	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 Nakashima Keiko, Hirahara Yukie, Koike Taro, Tanaka Susumu, Gamo Keizo, Oe Souichi, Hayashi Shinichi, Seki-Omura Ryohei, Nakano Yousuke, Ohe Chisato, Yoshida Takashi, Kataoka Yosky, Tsuda Masayuki, Yamashita Tatsuyuki, Honke Koichi, Kitada Masaaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Sulfatide with ceramide composed of phytosphingosine (t18:0) and 2-hydroxy FAs in renal intercalated cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100210 ~ 100210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jlir.2022.100210	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 Oe Souichi, Hayashi Shinichi, Tanaka Susumu, Koike Taro, Hirahara Yukie, Seki-Omura Ryohei, Kakizaki Rio, Sakamoto Sumika, Nakano Yosuke, Noda Yasuko, Yamada Hisao, Kitada Masaaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein 1 Post-transcriptionally Regulates Fragile X Mental Retardation 1 Expression Through 3' Untranslated Region in Central Nervous System Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.869398	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25件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 関 亮平、林 真一、大江 総一、佐藤 勇輝、小池 太郎、中野 洋輔、岩下 洸、平原 幸恵、北田 容章
2. 発表標題 有尾両生類の神経幹細胞の特殊性について
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林 真一、関 亮平、佐藤 勇輝、大江 総一、小池 太郎、中野 洋輔、岩下 洸、伊藤 健、安河内 彦輝、日笠 幸一郎、北田 容章
2. 発表標題 イモリ型脊髄再生における再生遺伝子の特定と原理の解明
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 勇輝、林 真一、大江 総一、小池 太郎、中野 洋輔、関 亮平、岩下 洸、北田 容章
2. 発表標題 先天性中枢性低換気症候群に見られる変異型PHOX2Bの染色体局在の変化
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大江 総一、佐藤 輝英、岩下 洸、林 真一、小池 太郎、関(大村)亮平、中野 洋輔、佐藤 勇輝、平原 幸恵、北田 容章
2. 発表標題 長鎖非コードRNA MANCR1はOLIG2およびCD44の遺伝子発現制御を介してグリオーマ幹細胞のMES型細胞形質を維持する
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩下 洸、大江 総一、佐藤 輝英、林 真一、小池 太郎、関(大村)亮平、中野 洋輔、佐藤 勇輝、平原 幸恵、北田 容章
2. 発表標題 長鎖非コードRNA linc00944はPI3K/Akt経路を介してグリオーマ幹細胞の細胞死を制御する
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平原 幸恵、蒲生 恵三、小池 太郎、大江 総一、林 真一、関 亮平、中野 洋輔、岩下 洸、佐藤 勇輝、北田 容章
2. 発表標題 末梢神経におけるスルファチド分子種の機能的多様性の解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中野 洋輔、大江 総一、林 真一、小池 太郎、関 亮平、岩下 洸、佐藤 勇輝、平原 幸恵、北田 容章
2. 発表標題 デジタル組織標本を導入した組織解剖学教育における新規実習教材
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤輝英、大江総一、阪本純加、柿崎梨緒、岩下洸、林真一、小池太郎、関亮平、中野洋輔、佐藤勇輝、平原幸恵、北田 容章
2. 発表標題 LncRNA MANCR1はグリオーマ幹細胞においてCD44 mRNA安定化に関与する
3. 学会等名 第99回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入に向けて
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関亮平、林真一、大江総一、小池太郎、中野洋輔、平原幸恵、田中進、北田容章
2. 発表標題 イモリ中枢神経系に由来する幹細胞の培養法の確立
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小池太郎、大江総一、林真一、関亮平、中野洋輔、北田容章
2. 発表標題 マウス一次感覚ニューロンにおけるCD34陽性ニューロンの同定
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野洋輔、大江総一、林真一、小池太郎、関亮平、北田容章
2. 発表標題 解剖学分野における医用画像の早期取扱いがもたらす教育効果
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関亮平、林真一、大江総一、小池太郎、中野洋輔、平原幸恵、田中進、北田容章
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの神経幹細胞培養法の確立
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入に向けて
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蒲生恵三、平原幸恵、小池太郎、大江総一、林真一、関亮平、中野洋輔、小野勝彦、北田容章
2. 発表標題 スルファチド分子種はシュワン細胞系譜の初期から発現する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大江総一、柿崎梨緒、阪本純加、佐藤輝英、林真一、小池太郎、関亮平、中野洋輔、北田容章
2. 発表標題 miR-505はSTAT3/AUF1経路を介してグリオーマ幹細胞の腫瘍形成能を制御する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関亮平、林真一、大江総一、小池太郎、中野洋輔、平原幸恵、田中進、北田容章
2. 発表標題 イペリアトゲイモリ中枢神経系由来の神経幹細胞の培養法
3. 学会等名 両生類研究センターバイオリソース棟落成記念シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、北田容章
2. 発表標題 マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入に向けて
3. 学会等名 両生類研究センターバイオリソース棟落成記念シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、北田容章
2. 発表標題 イモリ脊髄再生におけるトランスクリプトーム解析 -イモリから学ぶ再生原理-
3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関亮平、林真一、大江総一、小池太郎、中野洋輔、平原幸恵、田中進、北田容章
2. 発表標題 イペリアトゲイモリの神経幹細胞培養 ~脊髄の完全再生を担う細胞の分化多能性解明を目指して~
3. 学会等名 第3回イペリアトゲイモリ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、平原幸恵、田中進、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、北田容章
2. 発表標題 イモリ脊髄再生におけるトランスクリプトーム解析 -イモリから学ぶ再生原理-
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小池太郎、榎原智美、田中進、平原幸恵、林真一、大江総一、関亮平、中野洋輔、北田容章、熊本賢三
2. 発表標題 ラット足底皮膚の層板小体の分布と接地位置の相関
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蒲生恵三、平原幸恵、小池太郎、大江総一、田中進、林真一、関亮平、中野洋輔、小野勝彦、北田容章
2. 発表標題 末梢神経におけるスルファチド分子種の挙動と作用機序の検討
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大江総一、柿崎莉緒、阪本純加、田中進、平原幸恵、林真一、小池太郎、関亮平、中野洋輔、北田容章
2. 発表標題 Silencing of miR-505 suppresses the malignant phenotype in glioma stem cells by targeting AUF1
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平原幸恵、中島啓子、小池太郎、蒲生恵三、田中進、大江総一、林真一、関亮平、中野洋輔、大江知里、吉田崇、片岡洋祐、津田雅之、本家孝一、北田容章
2. 発表標題 腎集合管に局在する2つのヒドロキシル基を持つ特殊なスルファチド分子種の同定
3. 学会等名 第127回日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/SEKI-R_CV
--

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