

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713047

研究課題名(和文)免疫系-神経系クロストークによる脊髄損傷の病態解明

研究課題名(英文) Crosstalk between immune system and nervous system in the pathogenesis of spinal cord injury

研究代表者

神山 淳 (KOHYAMA, JUN)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：30437511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脊髄損傷時における免疫系と神経系との細胞間相互作用を解析した。脊髄損傷部位においては損傷後に免疫細胞の集積が見られ、この免疫系細胞の周辺にはOlig2陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞が集積することが明らかとなった。同時にオリゴデンドロサイト前駆細胞は正常時には増殖が非常に緩やかな細胞集団であるが損傷依存的に増殖が活性化することが明らかとなった。この機構の一端として本研究では細胞間シグナル伝達機構の一つとして知られるNotchシグナルの活性化が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To unravel mechanistic insight in progression of spinal cord injury, I focused on the interaction between the immune system and the nervous system. I initially discovered activation of Sox2 expression in the injured site and, importantly, the Sox2-positive cells were surrounded by microglial cells. To further clarify the mechanism of Sox2 upregulation, we characterized the cells and found that these cells were oligodendrocyte precursor cells (OPCs). At the site of spinal cord injury, immune cell accumulation was observed after injury, and these immune cells expressed ligand for Notch signaling. Then, proliferation of OPCs was activated by Notch signaling. Furthermore, conditional knockout of RBP-J, an effector of Notch signaling, in OPCs resulted in defect in activation of OPCs, indicating that interaction between immune system and nervous system, which was mediated by Notch signaling is important for pathogenesis of spinal cord injury.

研究分野：神経科学一般

キーワード：脊髄損傷 Notchシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

『中枢神経系は再生しない』と従来考えられており、脳虚血や脊髄損傷などの中枢神経系に対する損傷は中枢神経の再生能力の欠如により重篤な障害をもたらすと考えられてきた(Science 1999)。しかし、成体中枢神経系における神経幹細胞の存在が側脳室や海馬において明らかとなり、特に脳虚血時においては脳室下帯に存在する神経幹細胞が梗塞層に移動し、成熟ニューロンへと分化することが知られている(J.Neurosci 2006)。一方、成体脊髄においては神経幹細胞が存在しないため、再生困難な中枢神経系であると考えられている(Nature 2010)。しかし、生体側の防御機構は存在し、損傷脊髄に集積する免疫系細胞が反応性アストロサイトにより囲まれ、炎症細胞の損傷周囲への浸潤を阻害し、炎症の拡大を防ぐ(Nat Med 2006)ということが知られている。

2. 研究の目的

中枢神経系においては脳血液関門が存在し、血流を介した中枢神経系への物質の移行が制限されている。それゆえ、他臓器間と比較し、臓器間の相互作用が乏しい臓器である。しかし、損傷時には脳血液関門が破綻するため、体内の外部環境の影響にさらされる。本研究では『損傷=生体内の外部環境(特に免疫系)との暴露』と捉え、外部環境の、神経系細胞への標的をオリゴデンドロサイト前駆細胞とし、神経系-免疫系の障害時におけるクロストークの実態を明らかとする。

3. 研究の方法

(1)オリゴデンドロサイト前駆細胞の標識

オリゴデンドロサイト前駆細胞において選択的に発現する遺伝子にタモキシフェン誘導性 Cre を発現したマウス、Cre 依存的に GFP を発現するマウスを交配し、成体においてオリゴデンドロサイト前駆細胞を標識する。

(2)脊髄損傷モデルの作成

マウス脊髄に対して圧挫モデルを作成し、解析を行った。

4. 研究成果

損傷脊髄における組織像の継時的変化

マウス脊髄において損傷をかけ2週間後に組織像を解析すると CD11b で標識される免疫系の細胞集団とそれとをかこむグリア細胞が見出される。このグリア細胞には反応性アストロサイトと呼ばれる細胞集団とオリゴデンドロサイト前駆細胞が含まれているが特にオリゴデンドロサイト前駆細胞においては Sox2 の発現が見出されており、特に免疫系細胞に近接するオリゴデンドロサイトにおいてこの傾向が見られた。

損傷に応じて Sox2 の転写レベルが亢進する

損傷脊髄における Sox2 の発現上昇が見出されたが、この発現上昇が Sox2 の転写レベルの上昇によるものか、もしくは転写後調節によるものかを検討するために Sox2 プロモーター制御下に EGFP を発現するトランスジェニック動物 (Sox2-EGFP TG) を用いて検討した。Sox2-EGFP TG を用いて脊髄損傷モデルを作成し、損傷7日後に免疫組織化学的手法を用いて解析したところ、損傷部周辺において EGFP の発現上昇が見出された。このことから Sox2 の発現上昇は損傷脊髄における『外来因子』により惹起されるものであると示唆された。

免疫系細胞と神経系細胞のクロストークに関する解析

上記の知見より、神経系細胞、特にオリゴデンドロサイト前駆細胞が損傷後に免疫系細胞のミクログリア近傍で活性化し、Sox2 の発現上昇が惹起されていることが示唆された。そこでミクログリアとオリゴデンドロサイト前駆細胞との細胞間相関に着目し、解析することにした。細胞間で作用し、相互作用する因子として本研究では Notch シグナルに着目した。興味深いことに免疫系細胞は Notch シグナルのリガンドを発現し、オリゴデンドロサイト前駆細胞において Notch シグナルの活性化を検出する Notch1 の細胞内ドメインに対する抗体(anti-Cleaved Notch1)を用いて染色したところ Olig2 陽性細胞で強い発現が損傷後に見出された。これらのことから脊髄損傷後に免疫系と神経系は Notch シグナルを介した細胞間相互作用していること

が示唆された。

オリゴデンドロサイト前駆細胞の活性化に

Notch シグナルの活性化は必須である

そこでオリゴデンドロサイト前駆細胞特異的に Notch シグナルの必須構成因子である RBP-J のコンディショナルノックアウトマウスを交配し、解析したところオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化が阻害された。

オリゴデンドロサイト前駆細胞において Sox2 の下流に DNMT が発現する

オリゴデンドロサイト前駆細胞において損傷後 Sox2 の発現が上昇するためその下流因子を検索したところ DNA メチルトランフェラーゼ 3a (DNMT3a) を見出した。Dnmt3a は DNA メチル化を制御し、オリゴデンドロサイト前駆細胞において Dnmt3a を特異的に阻害するとオリゴデンドロサイトの成熟が促された。脊髄損傷においては脱髄が生じることが知られるが、この結果は損傷により活性化された免疫系のシステムにより神経系の細胞がエピジェネティックを変容され、内在性のオリゴデンドロサイト前駆細胞による再生が阻害されていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Chai M, Sanosaka T, Okuno H, Zhou Z, Koya I, Banno S, Andoh-Noda T, Tabata Y, Shimamura R, Hayashi T, Ebisawa M, Sasagawa Y, Nikaido I, Okano H, Kohyama J. Chromatin remodeler CHD7 regulates the stem cell identity of human neural progenitors. *Genes Dev*. 2018 Jan 15;32(2):165-180. doi: 10.1101/gad.301887.117. 査読有り
2. Okuno H, Renault Mihara F, Ohta S, Fukuda K, Kurosawa K, Akamatsu W, Sanosaka T, Kohyama J, Hayashi K, Nakajima K, Takahashi T, Wysocka J, Kosaki K, Okano H. CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations. *Elife*. 2017 Nov

28;6. pii: e21114. doi: 10.7554/eLife.21114.

査読有り

3. Itakura G, Ozaki M, Nagoshi N, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Iida T, Kashiwagi R, Ookubo T, Yastake K, Matsubayashi K, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):12996. doi: 10.1038/s41598-017-13522-w. 査読有り
4. Itakura G, Kawabata S, Ando M, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T, Ookubo T, Kojima K, Kashiwagi R, Yasutake K, Nakauchi H, Miyoshi H, Nagoshi N, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Transplantation of iPSC Derivatives. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8(3):673-684. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.02.003. 査読有り
5. Iida T, Iwanami A, Sanosaka T, Kohyama J, Miyoshi H, Nagoshi N, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Whole-Genome DNA Methylation Analyses Revealed Epigenetic Instability in Tumorigenic Human iPSC Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*. 2017 May;35(5):1316-1327. doi: 10.1002/stem.2581. 査読有り
6. Yamazaki K, Fukushima K, Sugawara M, Tabata Y, Imaizumi Y, Ishihara Y, Ito M, Tsukahara K, Kohyama J, Okano H. Functional Comparison of Neuronal Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells under Different Oxygen and Medium Conditions. *J Biomol Screen*. 2016 Dec;21(10):1054-1064. doi: 10.1177/1087057116661291. 査読有り
7. Ozaki M, Iwanami A, Nagoshi N, Kohyama J, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Nishiyama Y, Kawabata S, Sugai K, Iida T, Matsubayashi K, Isoda M, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto

- M, Okano H, Nakamura M. Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. *Stem Cell Res.* 2017 Mar;19:128-138. doi: 10.1016/j.scr.2017.01.007. 査読有り
8. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017 Jul;57(4):96-103. doi: 10.1111/cga.12206. Epub 2017 Mar 22. 査読有り
 9. Okubo T, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T, Matsubayashi K, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Pretreatment with a γ -Secretase Inhibitor Prevents Tumor-like Overgrowth in Human iPSC-Derived Transplants for Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports.* 2016 Oct 11;7(4):649-663. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.015. Epub 2016 Sep 22. 査読有り
 10. Sugai K, Fukuzawa R, Shofuda T, Fukusumi H, Kawabata S, Nishiyama Y, Higuchi Y, Kawai K, Isoda M, Kanematsu D, Hashimoto-Tamaoki T, Kohyama J, Iwanami A, Suemizu H, Ikeda E, Matsumoto M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H. Pathological classification of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells towards safety assessment of transplantation therapy for CNS diseases. *Mol Brain.* 2016 Sep 19;9(1):85. doi: 10.1186/s13041-016-0265-8. 査読有り
 11. Isoda M, Kohyama J, Iwanami A, Sanosaka T, Sugai K, Yamaguchi R, Matsumoto T, Nakamura M, Okano H. Robust production of human neural cells by establishing neuroepithelial-like stem cells from peripheral blood mononuclear cell-derived feeder-free iPSCs under xeno-free conditions. *Neurosci Res.* 2016 Sep;110:18-28. doi: 10.1016/j.neures.2016.04.003. 査読有り
 12. Nishiyama Y, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Sugai K, Nishimura S, Kashiwagi R, Yasutake K, Isoda M, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field. *Neurosci Res.* 2016 Jun;107:20-9. doi: 10.1016/j.neures.2015.11.011. 査読有り
 13. Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, Itakura G, Kobayashi Y, Nishiyama Y, Sugai K, Nishimura S, Iwai H, Isoda M, Shibata S, Kohyama J, Iwanami A, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Grafted Human iPSC Cell-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells Contribute to Robust Remyelination of Demyelinated Axons after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports.* 2016 Jan 12;6(1):1-8. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.013. 査読有り
 14. Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Commun.* 2015 Mar 9;6:6514. doi: 10.1038/ncomms7514. 査読有り
 15. Zhou Z, Kohda K, Iyata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano H, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. *Mol Brain.* 2014 Apr 3;7:24. doi:10.1186/1756-6606-7-24. 査読有り
- 〔学会発表〕(計 7 件)
1. ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価項目の確立(第1報). 飯田剛 神山淳 岩波明生 岡野栄之 松本守雄 中村雅也, 2015 年

2. Intracranial xenograft model as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. Keiko Hori, Jun Kohyama, Kohei Matsubayashi, Akio Iwanami, Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, 2014

3. Assessment of Tumorigenic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell- derived Neural Stem/Progenitor Cells. Tsuyoshi Iida, Jun Kohyama, Akio Iwanami, Rei Yoshida, Soraya Nishimura, Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, 2014

4. iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系の確立. 飯田剛 神山淳 岩波明生 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也. 旭川, 2014 年

5. Intracranial xenograft as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. ポスター Keiko Hori, Jun Kohyama, Kohei Matsubayashi, Akio Iwanami, Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, 2014

6. ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立. 口演 飯田剛 神山淳 岩波明生 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也, 2014 年

7. iPS 細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価系の確立. 口演 飯田剛 神山淳 岩波明生 岡野栄之 戸山芳昭 中村雅也. 2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 淳 (KOHYAMA, Jun)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号：30437511