

アフリカツメガエルのオタマジックの遺伝子が脊髄損傷の治療に有効！ ～脊髄内在性神経幹細胞への遺伝子導入による神経再生～

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学の夏目 敦至（なつめ あつし）准教授、福岡俊樹客員研究者（筆頭著者）、加藤彰研究員（共筆頭著者）らの研究グループは、再生能力を持つアフリカツメガエルの幼生（オタマジック）の遺伝子から神経再生に有効な遺伝子を発見し、脊髄損傷したマウスの脊髄内の幹細胞に遺伝子を入れることで神経再生に成功しました。

脊髄損傷は、その治療に対し、これまでも多くの研究がなされてきましたが、現在においても完全に神経を再生させることは難しく、手足の麻痺などの重い後遺症を残す難治性の神経外傷です。脊髄損傷の治療が難しい要因として、哺乳類の脊髄における神経再生能力が非常に限られていること、そしてグリア瘢痕（はんこん）^{※1}と呼ばれる損傷部の傷跡が神経再生を妨げることが挙げられ、それらの克服により脊髄損傷治療が期待できます。

本研究では、脊髄の中心部にある上衣細胞^{※2}が損傷することにより多分化能のある幹細胞の性質を持つことに着目し、幹細胞を神経細胞へ誘導できれば神経再生へと繋がる可能性があると考えました。そして幹細胞へ導入する有力な候補遺伝子として、神経再生能の高いアフリカツメガエルの遺伝子解析から、神経転写因子 *Neurod4* を導き出しました。損傷後、幹細胞からアストロサイト^{※3}、そしてグリア瘢痕になる細胞分化の運命を *Neurod4* の導入により方向転換させることに成功しました。アストロサイトになる運命のものが神経細胞（ニューロン）へ分化し、さらには損傷部の傷跡の主成分であるグリアの減少が認められました。また、分化したニューロンは、それぞれが新たに運動ニューロン^{※4}とシナプス^{※5}を形成することも確認でき、実際に *Neurod4* を導入されたマウスは運動機能が改善しました。本研究により、脊髄内在性幹細胞に対する神経転写因子 *Neurod4* 導入は脊髄損傷に対する有力な治療法となる可能性が示されました。

本研究成果は、国際生物学総合誌「iScience」（英国時間 2021 年 2 月 3 日付（日本時間 2021 年 2 月 3 日の午前 9 時）の電子版）に公開されました。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費助成事業新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」の助成を受けました。

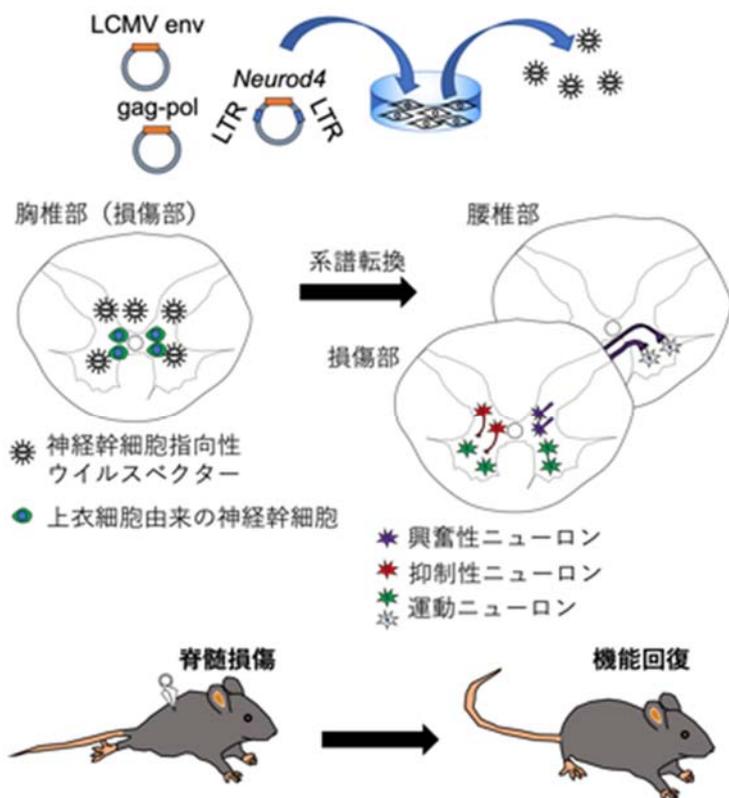


図 1. 脊髄幹細胞へのハイブリッドベクターによる *Neurod4* 導入と、アストロサイトからニューロンへの分化転換およびシナプス形成

脊髄損傷後、上皮細胞由来の神経幹細胞^{*6}に *Neurod4* を選択的に導入することで、ニューロンへの分化が促進される。分化した興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、運動ニューロンはそれぞれシナプスを形成することで、下肢機能の改善をもたらす。

ポイント

- 脊髄損傷は現在も重い後遺症を残す難治性の神経外傷であり、その理由として哺乳類において脊髄内での神経再生能力が非常に低いことが挙げられる。
- 極めて高い再生能力を有するアフリカツメガエルの幼生の網羅的発現解析を行い、有望な神経転写因子「*Neurod4*」を発見した。
- ささまざまな神経系細胞へ分化する神経幹細胞に感染しやすい髄膜炎ウイルスの膜と遺伝子導入用ベクターをハイブリッドしたウイルスを独自に開発した。このベクターを用いて、脊髄損傷部位に *Neurod4* 遺伝子を導入した。
- *Neurod4* 遺伝子の導入により、神経幹細胞からアストロサイトへ分化する運命が変化し、その代わり神経細胞へ分化を導くことができた。新生運動ニューロンと既存のニューロンがシナプスを形成することで下肢機能が改善された。

1. 背景

脊髄損傷は現在においても重篤な後遺症を残す神経損傷です。いち早く有効な治療の提供が社会的な大きなニーズです。その中心となるのが再生医療研究となります。我々の研究は、再生能の高いアフリカツメガエルの RNA-seq^{※7} 解析を行い、成人の脊髄にも存在する神経幹細胞を神経細胞へ積極的に分化誘導を起し、最終的には神経再生を目指すものです。その目的のため、神経幹細胞にのみ感染しやすいベクター（遺伝子の運び屋）を独自に開発し、アフリカツメガエルの解析から得た有力な神経転写因子である「*Neurod4*」を遺伝子導入しました。

神経再生能力の低い哺乳類の脊髄にも、内在性の神経幹細胞は存在します。その鍵となるのが脊髄内の中心管と呼ばれる構造を囲む、上衣細胞と呼ばれる細胞です。近年、脊髄損傷後の急性期から亜急性までの間に、上衣細胞が脱分化^{※8}して神経幹細胞に逆戻りするという報告がされています。我々はこの性質に着目し、脊髄損傷後に上衣細胞から脱分化する幹細胞に神経転写因子を導入することで意図的にニューロンへと分化を誘導できれば、神経再生につながる可能性があると考えました。

神経再生治療については、iPS細胞などの多分化能のもつ幹細胞の移植が世界中で数多くの研究が試みられその有効性が報告されていますが、拒絶反応や腫瘍化の可能性などの問題点があり、今後の臨床研究の結果が待たれます。一方、本研究のような内在性の幹細胞を活性化する本方法は拒絶反応や腫瘍化のリスクを軽減できるという利点があります。

2. 研究成果

我々は、アフリカツメガエルの脊髄損傷後の発現を RNA-Seq を用いて解析し、神経再生に関わる最も有効な候補遺伝子として「*Neurod4*」を発見しました。また、神経幹細胞に感染性の高いリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス^{※9}（Lymphocytic Choriomeningitis Virus [LCMV]）のエンベロープ（ウイルスの殻）にレトロウイルスの中身を入れたハイブリッドベクターを独自に開発しました。レトロウイルスは分裂細胞にのみ遺伝子が入りこむ性質があり、このハイブリッド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もつぱら遺伝子導入することができました。

脊髄損傷マウスに本ウイルスベクターを導入し、脊髄幹細胞にウイルスが感染することを確認したのち、脊髄損傷後に *Neurod4* を導入しました。*Neurod4* が導入された細胞の中で、ニューロンに分化する細胞が対照群と比較して明らかに増加しました。また、通常脊髄損傷後に発生するアストロサイトはグリア瘢痕と呼ばれる障壁を形成し神経の軸索再生を妨げることが知られており、その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ます。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べたところ、*Neurod4* 群ではアストロサイトの数は対照群と比較して明らかに減少しました。*Neurod4* の導入により、上衣細胞から脱分化した幹細胞は、グリア瘢痕を形成するアストロサイトからニューロンへと転換することが示されました。

さらに、*Neurod4* 導入により分化したニューロンの種類を調べたところ、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、運動ニューロン、いずれの細胞への分化も確認されました。また、それらの神経細胞が下肢機能に関与する運動ニューロンとのシナプスを形成していることも確認できまし

た。運動機能を評価したところ、*Neurod4* 群は対照群と比較して有意な改善を示しました。これらの結果より、*Neurod4* 導入により幹細胞のニューロンへの分化を促進し、アストロサイトへの分化を抑制し、これらの相乗効果により軸索が伸長しやすくなり、運動ニューロンとシナプスを形成し、運動機能の改善をもたらしたと考えられます。

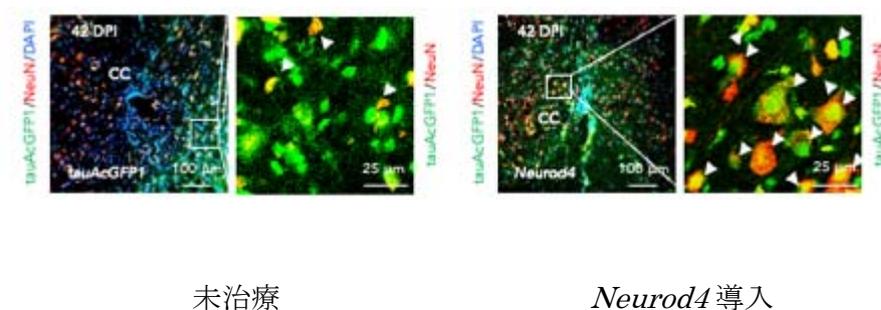


図 2. *Neurod4* 導入による神経幹細胞から NeuN 陽性神経細胞への分化誘導

Green fluorescent protein (GFP)と呼ばれる緑色蛍光蛋白で標識されたウイルス感染細胞のうち、*Neurod4*が導入された細胞は NeuN 陽性（赤く染まった神経細胞のマーカ）の神経細胞が有意に増加した。

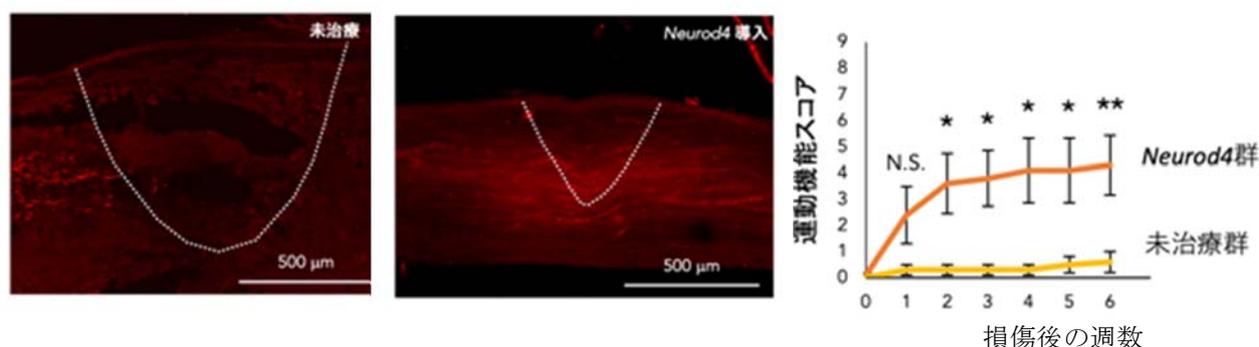


図 3. *Neurod4* 導入により損傷部位を越えて伸長する神経軸索

脳の運動野から打ち込まれた赤色蛍光蛋白によって標識された神経軸索は、未治療の場合は障壁により伸長が妨げられているが、*Neurod4*の導入により損傷部位を越えて伸長していることが確認された。

3. 今後の展開

本研究は、脊髄内在性神経幹細胞に神経分化促進因子の導入を行うことで、意図的にニューロンへの分化誘導を試みたものです。これは内在性の幹細胞を活性化するという点において、幹細胞移植治療とは全く異なった手法といえます。また、*Neurod4* の他にも有望な神経分化促進因子は多く存在し、その効果についても期待されます。本研究は、今後のさらなる研究展開により神経再生治療において有力な手法となる可能性があります。

4. 用語説明

- ※1 グリア瘢痕：損傷を受けた中枢神経系では、損傷周囲部にアストロサイトが生成、集積し、グリア瘢痕と呼ばれる高密度の瘢痕組織を形成する。
- ※2 上皮細胞：胎生期に脳室に面した神経幹細胞を産生し、脳室系の壁を構成する上皮細胞の一種である。
- ※3 アストロサイト：中枢神経系に存在する神経細胞（ニューロン）を支持する細胞。脊髄損傷後、グリア瘢痕（はんこん）を形成する。
- ※4 運動ニューロン：骨格筋の運動を支配する神経細胞
- ※5 シナプス：神経細胞間あるいは筋繊維、神経細胞と他種細胞間に形成される、シグナル伝達などの神経活動に関わる接合部位
- ※6 神経幹細胞：自己複製能を有し、神経系の様々な細胞（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）に分化する能力を持つ。
- ※7 RNA-Seq：次世代シーケンサーによる転写産物の発現定量化、配列からの新規転写産物や新規プライスジャンクションの網羅的探索、微量転写産物を検知することができる。
- ※8 脱分化：成熟細胞から幼若細胞へ逆戻りすること
- ※9 リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス：アレナウイルス科アレナウイルス属のウイルスにより髄膜炎、髄膜脳炎などを引き起こす。また、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスのエンベロープの特性により、そのウイルスは、神経幹細胞特異的に感染する能力を有する。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：iScience（英国時間 2021 年 2 月 3 日付けの電子版に掲載）

論文タイトル：*Neurod4* converts endogenous neural stem cells to neurons with synaptic formation after spinal cord injury

著者：Toshiki Fukuoka¹, Akira Kato¹, Masaki Hirano¹, Fumiharu Ohka¹, Kosuke Aoki¹, Takayuki Awaya¹, Alimu Adilijiang¹, Sachi Maeda¹, Kuniaki Tanahashi¹, Junya Yamaguchi¹, Kazuya Motomura¹, Hiroyuki Shimizu¹, Yoshitaka Nagashima¹, Ryo Ando¹, Toshihiko Wakabayashi¹, Dasfne Lee-Liu^{2,3}, Juan Larrain⁴, Yusuke Nishimura^{1*}, Atsushi Natsume¹

所属：¹Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

²Geroscience Center for Brain Health and Metabolism, Santiago, Chile

³Department of Biology, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁴Cell and Molecular Biology, Developmental Biology and Regeneration, P. Universidad Catolica de Chile, Chile

DOI：10.1016/j.isci.2021.102074

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/iSci_210203en.pdf