

## 低分子化合物による単球の生体内分化転換を利用した神経再生療法の開発

二宮 格

新潟大学脳研究所 臨床神経科学部門 脳神経内科

### 【研究の背景】

脳卒中は世界の死因の主な原因であるのみならず、後遺症が残り介護が必要となることも少なくない。その治療はリハビリや抗血栓剤の二次予防が中心であり、治療効果は限定的であるが、それはそれらの治療が失った神経細胞を再生できるわけではないからである。従って劇的な神経学的改善を目指すために、効果的な神経再生医療の開発が強く求められている。

ダイレクトプログラミングとはある細胞を別の細胞種へと分化転換させる技術であり、近年注目されはじめている。この技術は iPS 細胞のような多能性の状態を経由せずに直接的な分化転換を行って目的細胞を作製することを可能とし、さらに短期間のうちに誘導することができる。再生医療の分野においては、in vivo での分化転換を可能とする技術として、特に有用性が期待されている<sup>1)</sup>。

### 【目 的】

脳梗塞急性期では、梗塞に陥った部分に、血液中の単球が浸潤しマクロファージへと分化し、分化したマクロファージは梗塞巣での炎症や組織保護に関与する<sup>2)</sup>。発症から4～7日後は単球由来マクロファージが非常に密に集簇している時期であり、我々はこの病態生理に着目し、この時期に低分子化合物を投与することで、集簇しているマクロファージを神経細胞にダイレクトプログラミングすることができるのでないか、またこれにより脳梗塞に対する新しい再生医療を開発することができるのではないかと考えた。この研究は、以上のコンセプトを検証し、脳卒中、とくに脳梗塞に対する神経再生療法を確立することを目的とする。

### 【方 法】

どのような低分子化合物の組み合わせが、マクロファージを神経細胞に変化しうるか、を明らかにする必要があるため、in vitro で低分子化合物の探索研究を行った。化合物としては、繊維芽細胞やアストロサイトを神経細胞に分化転換するという既報のある CHIR99021, Dorsomorphin, Forskolin, ISX-9, Y27632, さらに、これまで分化転換研究領域で使用されたことのない DB2313、以上の6種類の化合物を様々に組み合わせ、単球由来マクロファージと共培養することで、神経細胞への分化転換が起こるかを検証し、得られた神経細胞について、細胞免疫染色を行い、さらにRNAマイクロアレイ及び定量PCRを使用した遺伝子発現解析を行った。

### 【結 果】

単球由来マクロファージは上記に示した6種類の化合物を全て組み合わせ共培養すると、神経突起構造をもつ細胞に転換し、この細胞は神経細胞マーカーTUJ1, DCX, MAP2を発現した。遺伝子発現解析では神経特異的遺伝子の発現の亢進がみられ、マクロファージ特異的遺伝子の発現は抑制されていた。

また、DB2313の濃度検討を行い、0.5 μMのときに約80%の転換効率が得られた。

しかしながら、DB2313の無存在化では、マクロファージは神経様構造をとることなく、遺伝子発現解析にても神経細胞特

異的遺伝子の発現は亢進を維持できなかった。

### 【考 察】

DB2313はマクロファージに特異的遺伝子であるPU.1の発現を抑制する<sup>3)</sup>ことで、神経細胞特異的遺伝子群の発現亢進を効率的に高め、持続させることで神経細胞への分化を促進することが考えられた。

マクロファージから神経細胞に分化転換する6種類の化合物、DB2313, CHIR99021, Dorsomorphin, Forskolin, ISX-9, Y27632は、脳梗塞急性期の再生医療候補薬物になる可能性があり、今後はマウス脳梗塞モデルへの投与実験を計画したい。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

脳卒中急性期における神経再生医療を実現するための薬剤候補を選定することができた。今後は動物実験をすすめ、治療効果や、各薬剤の毒性試験などを行っていきたい。現状神経学的予後を大きく改善する治療がない脳梗塞診療で大きなブレイクスルーとなる可能性がある。また、マクロファージが病巣に集積する疾患であれば、理論上は治療が有効と考えられるため、例えばALSやアルツハイマー病などの神経変性疾患などへも応用が期待できる。

### 【参考・引用文献】

1. Wang, H., Yang, Y., Liu, J. & Qian, L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 410-424 (2021).
2. Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M. & Yoshimura, A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 3, 132 (2012).
3. Antony-Debré, I., et al. Pharmacological inhibition of the transcription factor PU.1 in leukemia. *J Clin Invest* 127, 4297-4313 (2017).