

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in “Biologia Molecolare”



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

ELABORATO DI LAUREA

**EFFETTI NEUROPROTETTIVI DI CELLULE
STAMINALI/PROGENITRICI NEURALI DERIVATE DA
CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE
GENETICAMENTE MODIFICATE
NEL TRATTAMENTO DELLA
LESIONE CEREBRALE TRAUMATICA**

Tutor: Prof.ssa Silvia Barbon

Dipartimento di Neuroscienze

Co-Tutor: Prof.ssa Elena Stocco

Dipartimento di Neuroscienze

Laureando: Zocca Manuel

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
1. STATO DELL'ARTE	pag. 2
1.1 Target clinico: la Lesione Cerebrale Traumatica	pag. 2
1.1.1 Descrizione e impatto clinico della patologia	pag. 2
1.1.2 Danno primario e danno secondario	pag. 2
1.2 Attuali terapie disponibili	pag. 3
1.3 Medicina rigenerativa e Terapia cellulare	pag. 4
1.4 Cellule staminali pluripotenti indotte	pag. 4
1.4.1 Caratteristiche e potenzialità	pag. 4
1.4.2 Limiti e strategie di sicurezza: il <i>genome editing</i>	pag. 5
1.5 Scopo della tesi	pag. 5
2. APPROCCIO SPERIMENTALE	pag. 6
2.1 Produzione di iPSC modificate e differenziamento in NS/PC	pag. 6
2.1.1 Coltura cellulare e <i>genome editing</i> mediante CRSPR/Cas9	pag. 6
2.1.2 Differenziamento in CD-NS/PC	pag. 6
2.1.3 Trasduzione mediante vettore lentivirale	pag. 7
2.1.4 Valutazione della vitalità cellulare	pag. 7
2.1.5 Analisi di espressione genica	pag. 7
2.1.6 Analisi <i>in vitro</i> degli effetti della 5-FC sui neuroni	pag. 7
2.2 Modello animale di TBI	pag. 7
2.2.1 Generazione della lesione cerebrale	pag. 7
2.2.2 Disegno sperimentale e trapianto cellulare	pag. 8
2.3 Analisi sperimentali post trapianto	pag. 8
2.3.1 <i>Imaging bioluminescente per il monitoraggio della migrazione delle CD-NS/PC</i>	pag. 8
2.3.2 Valutazione della permeabilità della barriera emato-encefalica	pag. 9
2.3.3 <i>Beam Walking Test</i> (test del cammino sulla trave)	pag. 9
2.3.4 <i>Accelerating Rotarod Test</i> (test della barra rotante accelerata)	pag. 9
2.3.5 Analisi immunoistochimiche e citochimiche	pag. 10
2.3.6 Analisi statistica	pag. 10
3. RISULTATI	pag. 11
3.1 Produzione e caratterizzazione delle CD-NS/PS	pag. 11
3.2 Analisi della migrazione delle CD-NS/PS	pag. 11
3.3 Valutazione macroscopica della lesione cerebrale traumatica	pag. 13
3.4 Valutazione comportamentale	pag. 14
3.5 Analisi istopatologiche mediante immunofluorescenza	pag. 15
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 20
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 23
APPENDICE	pag. 24

ABSTRACT

La lesione cerebrale traumatica (*Traumatic Brain Injury*, TBI) è una delle principali cause di disabilità neurologica, determinando nei pazienti deficit motori, e cognitivo-comportamentali. Le opzioni terapeutiche attualmente disponibili risultano ancora limitate nel favorire un recupero funzionale completo.

L'impiego di cellule staminali/progenitrici neurali (*Neural Stem/Progenitor Cells*, NS/PC) derivate da cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) rappresenta una promettente strategia rigenerativa per il trattamento delle lesioni cerebrali traumatiche. Tuttavia l'utilizzo clinico delle iPSC è ancora limitato dal rischio di tumorigenesi dovuto alla possibile persistenza di cellule indifferenziate altamente proliferative.

L'articolo analizzato in questo lavoro di tesi propone una strategia innovativa basata sull'utilizzo di NS/PC derivate da iPSC umane geneticamente editate mediante tecnologia CRISPR/Cas9, al fine di ottenere l'espressione stabile del gene della citosina deaminasi/uridil fosforibosil transferasi (yCD-UPRT). Tale sistema consente la conversione della 5-fluorocitosina (5-FC) in 5-fluorouracile (5-FU), permettendo l'eliminazione selettiva delle cellule indifferenziate potenzialmente tumorigeniche.

Nel modello murino di TBI, il trapianto cellulare ha determinato un miglioramento delle performance motorie, una riduzione del danno cerebrale secondario e minore perdita della barriera ematoencefalica rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati suggeriscono che le NS/PC geneticamente editate possano essere una strategia promettente e sicura per la terapia delle lesioni cerebrali traumatiche.

Parole chiave: medicina rigenerativa, trauma cerebrale, editing genomico, CRISPR/Cas9, cellule iPS

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Target clinico: la lesione cerebrale traumatica

1.1.1 Descrizione e impatto clinico della patologia

La lesione cerebrale traumatica (*Traumatic Brain injury*, TBI) rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale ed è una delle principali cause di morte e disabilità, nonostante gli avanzamenti della medicina moderna.

Tale patologia può verificarsi in diversi contesti, quali incidenti stradali, lesioni riportate durante l'attività sportiva, traumi subiti in contesti di guerra e cadute accidentali. Uno dei fattori maggiormente studiati e modellizzati nell'ambito di questa patologia riguarda la gravità della lesione, strettamente correlata alla velocità di impatto tra la testa e l'oggetto responsabile del trauma [1].

Si possono identificare due diverse classificazioni di TBI: danno focale (limitato a un'area specifica) o danno diffuso/esteso. [2]. Il danno focale si verifica attraverso la trasmissione improvvisa di una forza meccanica al capo, determinando, a causa dell'impatto, la compressione del tessuto nervoso sottostante [2]. Tale compressione porta alla formazione di emorragie ed ematomi, oltre che alla degenerazione neuronale e a diverse conseguenze a lungo termine, come la progressiva perdita di neuroni, che aumenta il rischio di sviluppo di varie patologie neurodegenerative (i.e., malattia di Parkinson, Alzheimer) [1].

La lesione diffusa è caratterizzata da estese lesioni assonali e vascolari dovute a strappi e compressioni del tessuto nervoso durante rapide accelerazioni o decelerazioni. In tali casi, le differenze nelle proprietà meccaniche e nell'ancoraggio reciproco delle varie porzioni dell'encefalo fanno sì che queste si muovano con velocità differenti [2].

I pazienti sopravvissuti al trauma presentano una ridotta aspettativa di vita e sono costretti a prolungati periodi di riabilitazione, mantenendo al contempo gravi deficit fisici e cognitivi, spesso associati ad alterazioni dell'umore e del comportamento [1].

A peggiorare il quadro clinico contribuisce il fatto che i neuroni del sistema nervoso centrale (SNC) si comportano, dal punto di vista proliferativo, come un epitelio non rinnovabile, caratterizzato da cellule che vanno incontro a morte cellulare qualora tentino di replicare il proprio DNA [3]. In condizioni patologiche è stata dimostrata una limitata capacità proliferativa della componente cellulare neuronale, che risulta insufficiente a garantire una riparazione efficace del danno.

1.1.2 Danno primario e danno secondario

La TBI si verifica attraverso due diverse fasi di danno cerebrale: il danno primario (*primary brain injury*), che si verifica nell'immediato a seguito dell'impatto o del repentino cambio di velocità, e il danno secondario (*secondary brain injury*), che può verificarsi nelle ore o nei giorni successivi al danno primario [4].

Il danno primario è caratterizzato da fratture craniche, contusioni cerebrali ed ematomi (dovuti a lesioni del sistema vascolare cerebrale e che possono essere epidurali, subdurali, intraparenchimali, intraventricolari e subaracnoidei), oltre che dalla lesione assonale diffusa (*Diffuse Axonal Injury*, DAI), il cui sviluppo è tuttavia in parte associato anche ai processi del danno secondario. Il DAI (o *Traumatic Axonal Injury*, TAI) si sviluppa attraverso due processi distinti. Il primo è caratterizzato dall'alterazione della permeabilità dell'assolemma, dal rigonfiamento mitocondriale e dal danno citoscheletrico; il secondo prevede la combinazione di

rigonfiamento assonale locale e dell'interruzione del trasporto assonale, che porta all'attivazione della calpaina e, successivamente, della calcineurina. La calcineurina determina un'alterazione del reticolo di microtubuli, con conseguente alterazione della dinamica del trasporto assonale, rigonfiamento, accumulo di organelli e, infine, disconnessione neuronale [2]. Come conseguenza di tale disconnessione, la regione distale dell'assone va incontro a degenerazione walleriana, che consiste nella degenerazione della guaina mielinica e dei cilindri assonali [2].

Il danno secondario si verifica attraverso una serie di vie neurotossiche, generalmente innescate da ipossia, ipotensione e incremento della pressione intracranica. Esso è caratterizzato dall'alterazione della struttura cellulare e dell'omeostasi dei neurotrasmettitori, con conseguente induzione della degenerazione neurale secondaria (*Secondary Neuronal Degeneration*, SND) [1]. In particolare, si osserva uno squilibrio tra la trasmissione glutammatergica, principale sistema di neurotrasmissione eccitatoria del SNC, e quella GABAergica, che rappresenta invece il principale sistema inibitorio. Tale alterazione determina un'eccessiva attivazione del recettore N-metil-D-aspartato (*N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR) e del recettore dell'acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*, AMPAR), favorendo un eccessivo ingresso di calcio intracellulare e l'attivazione di pathway apoptotici e necrotici [1]. Parallelamente, il rilascio di molecole endogene da parte delle cellule danneggiate attiva i recettori *Toll-like* delle cellule immunitarie, inducendo la cascata infiammatoria mediata da *Myeloid Differentiation Primary Response 88* (MyD88) e dal *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), con conseguente rilascio di citochine pro-infiammatorie e attivazione della microglia [1].

1.2 Attuali terapie disponibili

Tra le principali strategie terapeutiche impiegate nel trattamento del TBI si può citare la neurochirurgia. Tuttavia, la sua applicazione presenta numerose limitazioni, legate principalmente alla complessità del processo decisionale clinico nelle prime ore successive al trauma. In particolare, nel TBI devastante, la prognosi è estremamente complessa, poiché gli interventi da effettuare entro le prime 72 ore dall'evento traumatico possono, in alcuni casi, contribuire all'insorgenza di complicanze potenzialmente fatali o di gravi disabilità neurologiche [5]. I modelli prognostici attualmente disponibili per la TBI presentano un'accuratezza limitata, consentendo in media una predizione di circa il 35% dell'esito neurologico, in quanto molti dei fattori determinanti per una valutazione accurata non sono osservabili nelle fasi iniziali della lesione [5].

Una delle principali strategie terapeutiche consiste nel controllo dell'ipertensione intracranica mediante il monitoraggio e la riduzione della pressione stessa, fondamentale per prevenire l'instaurarsi del danno cerebrale secondario [6]. Tra gli approcci maggiormente utilizzati rientra la terapia iperosmolare, che prevede la somministrazione di agenti osmotici, in particolare mannitolo e soluzione salina ipertonica. Questi trattamenti determinano inizialmente un aumento del volume plasmatico e una riduzione della viscosità ematica, migliorando la perfusione e l'ossigenazione cerebrale. Successivamente, grazie al gradiente osmotico, favoriscono il richiamo di liquidi dal parenchima cerebrale al circolo ematico, contribuendo alla riduzione della pressione intracranica [6]. Sebbene tali terapie

siano fondamentali per limitare il danno secondario, esse non sono prive di effetti avversi e non risultano in grado di promuovere la rigenerazione del tessuto nervoso lesionato. A seguito della fase acuta, ai pazienti viene generalmente proposto un percorso riabilitativo finalizzato al recupero, seppur parziale, delle funzioni fisiche e cognitive compromesse. Tali interventi comprendono riabilitazione motoria, fisioterapia, nuoto, logopedia, musicoterapia, terapia occupazionale e riabilitazione neurocognitiva [7].

Nel complesso, le attuali strategie terapeutiche sono principalmente rivolte alla gestione delle complicanze acute e alla riduzione delle sequele funzionali del TBI. Tuttavia, esse non rappresentano un trattamento risolutivo della lesione, poiché non sono in grado di promuovere un'efficace rigenerazione del tessuto nervoso.

1.3 Medicina rigenerativa e Terapia cellulare

La medicina rigenerativa è una disciplina medica dedicata allo studio e allo sviluppo di strategie terapeutiche innovative volte a promuovere la rigenerazione dei tessuti danneggiati.

Una delle principali strategie usate in questo ambito è rappresentata dalla terapia cellulare, che si basa sull'impiego di cellule staminali, sfruttandone il potenziale di autorinnovamento e di differenziamento, al fine di favorire la sostituzione delle cellule danneggiate e ripristinare la corretta struttura e funzione del tessuto.

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate caratterizzate dalla capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi in uno o più tipi cellulari specializzati. Le cellule staminali embrionali, localizzate nella massa cellulare interna della blastocisti, sono pluripotenti, mentre le cellule staminali adulte presentano generalmente un potenziale differenziativo più limitato. Nei tessuti adulti esse risiedono in specifiche nicchie staminali, che ne regolano la sopravvivenza, il mantenimento e l'attivazione. In risposta a opportuni stimoli biologici, possono proliferare e differenziarsi, dando origine alle cellule specializzate del tessuto di appartenenza.

Tra le principali applicazioni della terapia cellulare rientrano le patologie traumatiche e neurodegenerative del sistema nervoso centrale, accomunate dalla perdita di neuroni e cellule gliali e dalla limitata capacità rigenerativa del tessuto nervoso. In questo contesto, la medicina rigenerativa propone strategie innovative basate sul trapianto di cellule staminali capaci di sostituire le cellule danneggiate e di favorire la ricostituzione del tessuto nervoso. Tra queste, le cellule staminali/progenitrici neurali (*Neural Stem/Progenitor Cells*, NS/PC) rappresentano una delle popolazioni più promettenti, in quanto rappresentano i precursori dei neuroni e delle altre cellule del sistema nervoso centrale. Queste cellule mantengono una significativa capacità proliferativa e possono differenziarsi principalmente in neuroni, astrociti e oligodendrociti. Una volta trapiantate nel sito di lesione, e in presenza di un microambiente favorevole caratterizzato dal rilascio di fattori neurotrofici, possono contribuire alla ricostituzione dei circuiti neuronali danneggiati, promuovendo la formazione di nuove connessioni sinaptiche e sostenendo i processi di riparazione tissutale.

1.4 Cellule staminali pluripotenti indotte

1.4.1 Caratteristiche e potenzialità

Un'altra categoria di cellule staminali ampiamente impiegata nella medicina rigenerativa è rappresentata dalle cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC). Esse sono ottenute mediante la riprogrammazione

di cellule somatiche adulte attraverso l'introduzione di specifici fattori di trascrizione, che ne inducono il ritorno a uno stato pluripotente. Questo processo è reso possibile dal fatto che le cellule differenziate conservano l'intero patrimonio genetico dell'organismo e differiscono principalmente per modificazioni epigenetiche, quali la metilazione del DNA e le modificazioni degli istoni, che regolano l'espressione genica. La riprogrammazione comporta il silenziamento dei geni associati al fenotipo somatico e la riattivazione di quelli della pluripotenza, conferendo alle iPSC caratteristiche biologiche e molecolari analoghe a quelle delle cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, ESC) [8].

Rispetto alle ESC, le iPSC offrono il vantaggio di poter essere ottenute direttamente da cellule somatiche del paziente, ad esempio fibroblasti cutanei, evitando il ricorso a embrioni e riducendo le problematiche etiche associate al loro utilizzo. Inoltre, il loro impiego consente di sviluppare approcci di medicina personalizzata e di limitare il rischio di rigetto immunologico [9].

1.4.2 Limiti e strategie di sicurezza: il *genome editing*

La principale limitazione dell'impiego delle iPSC è rappresentata dalla possibile persistenza di cellule indifferenziate dopo il trapianto. In assenza di un microambiente in grado di regolarne il differenziamento, tali cellule possono continuare a proliferare, aumentando il rischio di formazione di teratomi e altre lesioni tumorali.

Per aumentare la sicurezza di utilizzo delle iPSC sono state sviluppate diverse strategie di ingegneria genetica, tra cui il *genome editing* mediante il sistema CRISPR/Cas9. Rispetto ai tradizionali vettori virali, che possono determinare un'integrazione casuale del transgene nel genoma con conseguente rischio di mutagenesi inserzionale e di silenziamento dell'espressione genica, il *genome editing* consente di introdurre modificazioni mirate in specifici loci genomici. Ciò permette di integrare sistemi di controllo della sopravvivenza cellulare e di eliminare selettivamente le cellule non correttamente differenziate, migliorando il profilo di sicurezza delle terapie cellulari senza comprometterne il potenziale rigenerativo [10].

1.5 Scopo della tesi

La presente tesi si propone di analizzare criticamente lo studio di Ryotaro Imai e collaboratori, che descrive lo sviluppo di una strategia di medicina rigenerativa per il trattamento della TBI basata sul trapianto di cellule NS/PC derivate da iPSC geneticamente modificate. In particolare, verranno esaminati l'approccio di *genome editing* adottato per migliorarne la sicurezza e i risultati ottenuti in termini di neuroprotezione e recupero funzionale, al fine di valutarne le potenziali prospettive di applicazione clinica.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1 Produzione di iPSC modificate e differenziamento in NS/PC

2.1.1 Coltura cellulare e *genome editing* mediante CRISPR/Cas9

Le cellule staminali pluripotenti utilizzate (1210B2-hiPSC) sono state ottenute da cellule mononucleate del sangue periferico di una donna afro-americana di 29 anni e coltivate secondo un protocollo *feeder-free*, ovvero in assenza di cellule di supporto ("*feeder cells*").

Per generare cellule staminali/progenitrici neurali (NS/PC) esprimenti la citosina deaminasi (CD-NS/PC), il plasmide di espressione Cas9/sgRNA (pU6-ACTBgRNA-Cas9) è stato creato clonando oligonucleotidi codificanti per l'sgRNA, specifico per il codone di stop del locus *ACTB*, nel sito BbsI del plasmide pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9.

Per creare il plasmide donatore della ricombinazione omologa (*Homology-Directed Repair donor plasmid*), le braccia omologhe destra e sinistra di *ACTB* sono state amplificate mediante PCR a partire da DNA genomico estratto da fibroblasti umani e clonate nel vettore PrecisionX HR *donor vector* HR100PA-1.

Successivamente, una cassetta policistronica contenente il gene *yCD-UPRT* e il gene di resistenza alla blasticidina (*Bsd*) è stata inserita tra le braccia omologhe, ottenendo così il plasmide HR-ACTB-2A-yCD-UPRT-2A-Bsd. Il plasmide è stato progettato con l'estremità C-terminale del locus *ACTB* e la sequenza PAM riconosciuta da ACTBgRNA è stata sostituita con 5'-NTG-3'. Tutti i plasmidi sono stati verificati mediante sequenziamento del DNA.

Per la transfezione, 1×10^6 iPSC sospese in 100 μ L di Opti-MEM sono state unite a 3 μ g di pU6-ACTBgRNA-Cas9 e 10 μ g di HR-ACTB-2A-yCD-UPRT-2A-Bsd. La miscela è stata quindi sottoposta ad elettroporazione a 125 V per 5 ms. Successivamente, le cellule sono state trasferite in un terreno di coltura completo e sottoposte a selezione positiva mediante blasticidina (0,5 μ g/mL). L'avvenuta integrazione del transgene è stata confermata mediante PCR genomica.

2.1.2 Differenziamento in CD-NS/PC

Le iPSC sono state coltivate in terreno StemFit AK02N in un incubatore con 5% di CO₂. Durante ogni passaggio cellulare è stato aggiunto l'inibitore ROCK (Y-27632) alla concentrazione finale di 10 μ M.

Per indurre la formazione dei corpi embrioidi (*Embryoid Bodies*, EB), sono stati aggiunti due inibitori della via SMAD, SB431542 e LDN193189, alle concentrazioni finali rispettivamente di 100 nM e 10 μ M.

Le cellule sono quindi state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo a V, alla concentrazione di 9000 cellule/75 μ L/pozzetto, e mantenute in coltura per 14 giorni. Al quattordicesimo giorno gli aggregati sono stati dissociati ottenendo il primo passaggio delle NS/PC.

Le NS/PC sono state coltivate come neurosfere in sospensione in un terreno contenente D-MEM/Ham's F-12, supplemento B27, *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) e *leukemia inhibitory factor* (LIF).

Dopo lo scongelamento dello stock criopreservato, le NS/PC sono state mantenute in coltura per 25 giorni, eseguendo tre ulteriori passaggi fino al raggiungimento del passaggio 10. Successivamente, le neurosfere sono state dissociate in cellule singole immediatamente prima del trapianto.

2.1.3 Trasduzione mediante vettore lentivirale

Le CD-NS/PC sono state trasdotte mediante il vettore lentivirale CSII-EF-ffLuc, contenente il gene ffLuc, costituito dalla fusione tra una proteina fluorescente Venus e la luciferasi di lucciola. La trasduzione è stata eseguita con una molteplicità di infezione pari a 2. Successivamente, le cellule trasdotte sono state seminate come singole cellule in piastre a 96 pozzetti ed espanse, al fine di ottenere cloni cellulari stabili esprimenti ffLuc.

2.1.4 Valutazione della vitalità cellulare

Per valutare la sensibilità delle CD-NS/PC alla 5-fluorocitosina (5-FC), è stato eseguito un saggio di vitalità cellulare mediante Cell Counting Kit-8. Le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di 5-FC (0,002-50 μ M) e la vitalità è stata determinata tre giorni dopo il trattamento, confrontando ciascun campione con il controllo non trattato. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

2.1.5 Analisi di espressione genica

Per verificare il mantenimento dell'espressione del transgene durante il differenziamento, l'RNA totale è stato estratto da NS/PC e neuroni e successivamente retrotrascritto in cDNA. L'espressione dei geni *ACTB*, *yCD-UPRT* e *GAPDH* è stata valutata mediante Real time PCR quantitativa (RT-qPCR), utilizzando il metodo $\Delta\Delta C_t$ e *GAPDH* come gene di riferimento. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato.

2.1.6 Analisi in vitro degli effetti della 5-FC sui neuroni

Per valutare gli effetti di 5-FC sui neuroni è stato preparato un terreno costituito da Matrigel e Neurobasal Medium, supplementato con B27 e GlutaMAX, in rapporto 1:100.

Il *coating* con Matrigel è stato eseguito utilizzando 300 μ L di questa miscela e le NS/PC sono state incubate per un giorno. Successivamente, il surnatante è stato rimosso e le NS/PC sono state incubate per 14 giorni in Neurobasal Medium contenente 0,05 μ L di DAPT per mL. Metà del terreno di coltura è stata sostituita ogni 4 giorni.

2.2 Modello animale di TBI

2.2.1 Generazione della lesione cerebrale

Il TBI è stato indotto secondo il metodo della "*cryo-injury*" (crio-lesione). Sono state utilizzate femmine BALB/c nu/nu di 6 settimane di età, allevate a temperatura costante e con cicli luce/buio di 12 ore. Gli animali sono stati anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di 200 μ L di una miscela anestetica contenente medetomidina, midazolam e butorfanolo, quindi fissati su un telaio stereotassico.

Per ogni topo è stata eseguita un'incisione longitudinale della cute del capo ed è stato praticato un foro nel cranio 2 mm anteriormente e 2 mm lateralmente a sinistra rispetto al bregma, in corrispondenza della corteccia motoria-sensoriale. Successivamente, una sonda metallica raffreddata mediante CO₂ è stata applicata sulla superficie cerebrale per 30 secondi, seguiti da 30 secondi di intervallo. Il ciclo è stato ripetuto dieci volte, inducendo una lesione cerebrale localizzata. Nel sito di contusione è stata quindi eseguita un'iniezione intracerebrale di una sospensione di CD-NS/PC nel gruppo di intervento oppure di phosphate-buffered saline (PBS) nel gruppo di controllo. La cute è stata quindi richiusa mediante clip chirurgiche.

Tutte le procedure sono state eseguite sotto guida microscopica. Al termine dell'intervento gli animali sono stati riportati nelle rispettive gabbie con libero accesso ad acqua e cibo, senza somministrazione di antibiotici.

2.2.2 Disegno sperimentale e trapianto cellulare

Prima dell'esperimento principale sono stati eseguiti due esperimenti preliminari. Il primo aveva lo scopo di valutare la migrazione *in vivo* delle CD-NS/PC mediante imaging bioluminescente in tre topi. Il secondo era finalizzato a determinare la permeabilità della barriera ematoencefalica mediante estravasazione di Evans Blue in otto topi.

Successivamente è stata valutata la funzionalità motoria e sono state effettuate analisi immunoistochimiche a seguito del trapianto in vivo delle CD-NS/PC. Un totale di 28 topi è stato suddiviso in tre gruppi sperimentali:

- *gruppo di controllo*, trattato con PBS;
- *gruppo di intervento A*, trattato con CD-NS/PC;
- *gruppo di intervento B*, trattato con CD-NS/PC e 5-fluorocitosina (5-FC) somministrata per via intraperitoneale per 14 giorni consecutivi a partire dal giorno 35 post-operatorio, al fine di eliminare le cellule indifferenziate mediante l'attivazione del gene *yCD-UPRT*.

Nei gruppi di intervento sono stati iniettati 4 μ L di sospensione cellulare contenente 5×10^5 CD-NS/PC mediante una siringa Hamilton da 10 μ L, ad una profondità di 2 mm dal centro della contusione prodotta con il metodo della *cryo-injury*. Nel gruppo di controllo sono stati iniettati 4 μ L di PBS secondo la medesima procedura. L'iniezione è stata effettuata nell'arco di due minuti, al fine di evitare perdite di soluzione o reflusso lungo il tragitto dell'ago.

I topi sono stati sottoposti a valutazione comportamentale mediante *Beam Walking Test* e *Accelerating Rotarod Test* nei giorni 3, 5 e 7 post-operatori, quindi con cadenza settimanale fino al giorno 63.

Infine, gli animali sono stati sacrificati ai diversi endpoint sperimentali previsti dal protocollo (giorni post-operatori 7, 14, 35, 42 e 63), in funzione delle analisi da eseguire. In particolare, i sacrifici ai giorni 7, 14 e 42 sono stati effettuati per la valutazione della permeabilità della barriera emato-encefalica mediante Evans Blue, quello al giorno 35 per confermare istologicamente la migrazione delle CD-NS/PC monitorata mediante imaging bioluminescente, mentre il sacrificio al giorno 63 è stato eseguito per le analisi immunoistochimiche e citochimiche finali, comprendenti la valutazione del differenziamento cellulare, della proliferazione residua e dell'atrofia cerebrale.

2.3 Analisi sperimentali post trapianto

2.3.1 Imaging bioluminescente per il monitoraggio della migrazione delle CD-NS/PC

L'imaging bioluminescente *in vivo* è stato eseguito mediante il sistema Xenogen-IVIS 100. Tre topi sono stati anestetizzati mediante isoflurano e successivamente iniettati per via intraperitoneale con 300 mg/kg di D-luciferina. Gli animali sono stati quindi posizionati su un supporto riscaldato all'interno della camera del sistema IVIS (*In Vivo Imaging System*), una piattaforma di imaging ottico che consente di rilevare e quantificare segnali bioluminescenti o fluorescenti emessi da cellule o tessuti negli animali vivi, permettendo il monitoraggio non invasivo della loro localizzazione e sopravvivenza nel tempo. Le immagini acquisite tramite questo

sistema sono state quantificate come fotoni/minuto, al fine di monitorare la presenza delle CD-NS/PC.

Per valutare la capacità migratoria delle cellule trapiantate, il TBI è stato indotto nell'emisfero sinistro, mentre le CD-NS/PC sono state trapiantate nello striato controlaterale (emisfero destro). In questo modo è stato possibile verificare la migrazione delle cellule verso il sito di lesione.

Le analisi istologiche sono state eseguite dopo il sacrificio degli animali mediante decapitazione al 63° giorno post-operatorio, correlando i risultati istologici con quelli ottenuti mediante imaging bioluminescente.

2.3.2 Valutazione della permeabilità della barriera emato-encefalica

Per la valutazione della permeabilità della barriera emato-encefalica sono stati utilizzati otto topi, quattro sottoposti al trapianto di CD-NS/PC nel sito di contusione e quattro trattati con PBS come gruppo di controllo.

Nei giorni 7, 14 e 42 post-operatori, ai topi sono stati iniettati 300 µL di una soluzione salina al 2% di Evans Blue nella vena caudale. Dopo due ore di circolazione del colorante, gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione e sottoposti a perfusione transcadiaca con paraformaldeide (PFA) al 4%.

Successivamente, il tessuto cerebrale è stato fissato in PFA al 4% e immerso overnight a 4 °C in soluzioni di saccarosio al 10% e successivamente al 20%.

La permeabilità della barriera emato-encefalica è stata valutata macroscopicamente confrontando l'estensione dell'extravasazione di Evans Blue nei gruppi sperimentali. Inoltre, nei giorni 14 e 42 post-operatori è stata eseguita una valutazione quantitativa mediante misurazione dell'area interessata dall'extravasazione del colorante, al fine di confrontare il grado di alterazione della barriera emato-encefalica tra i diversi gruppi sperimentali.

2.3.3 Beam Walking Test (test del cammino sulla trave)

Il *Beam Walking Test* (ovvero, test del cammino sulla trave) è stato utilizzato per valutare la coordinazione motoria complessa.

L'apparato sperimentale era costituito da una trave lunga 90 cm, posizionata ad un'altezza di 90 cm dal suolo. La larghezza della trave diminuiva progressivamente da 13 mm a 5 mm verso l'estremità finale.

Ad un'estremità della trave era collocata una scatola nera contenente una gabbia con materiale da nidificazione. Per incentivare il movimento dell'animale verso la meta, un ventilatore posizionato sulla parete della scatola convogliava aria lungo la trave. Il topo veniva posizionato con il muso a 80 cm dalla scatola e, dopo il rilascio della coda da parte dell'operatore, veniva registrato il tempo necessario per attraversare la trave e raggiungere la scatola nera.

Prima della valutazione basale pre-operatoria tutti gli animali sono stati sottoposti a due sessioni di addestramento.

2.3.4 Accelerating Rotarod Test (test della barra rotante accelerata)

L'*Accelerating Rotarod Test* (ovvero, test della barra rotante accelerata), è un test comportamentale utilizzato per valutare la coordinazione motoria, l'equilibrio e l'apprendimento motorio nei roditori. L'apparato sperimentale era costituito da un'asta rotante (*rotarod*) del diametro di 3 cm, suddivisa in cinque compartimenti per l'alloggiamento degli animali.

All'inizio della prova l'asta ruotava a 2 rpm; successivamente la velocità veniva aumentata automaticamente fino a 30 rpm nell'arco di 300 secondi.

È stato registrato il tempo trascorso prima che il topo cadesse dalla barra oppure che il muso si posizionasse al di sotto dell'asse di rotazione, criterio utilizzato come endpoint della prova.

Anche per questo test gli animali sono stati sottoposti a due sessioni di addestramento prima della valutazione basale pre-operatoria.

2.3.5 Analisi immunoistochimiche e citochimiche

Il tessuto cerebrale degli animali oggetto di studio è stato fissato in formalina, incluso in paraffina e successivamente sottoposto a analisi immunoistochimiche e citochimiche standard.

Le sezioni istologiche, dello spessore di 3 μ m, sono state inizialmente colorate con anticorpi anti-STEM121 oppure anti-STEM101, utilizzati per identificare le cellule umane trapiantate.

Successivamente è stata eseguita una doppia immunofluorescenza utilizzando uno dei seguenti anticorpi: anti-GFAP, anti-NeuN, anti-Olig2, anti-Nestin oppure anti-Ki67. Infine, è stata effettuata una terza colorazione con anticorpo anti-cleaved caspase-3, mentre i nuclei sono stati marcati mediante DAPI.

I campioni sono stati montati ed osservati mediante microscopio a fluorescenza *All-In-One* (BZ-9000 Biorevo) e microscopio confocale a scansione laser (FV3000). Il primo è stato impiegato per acquisire immagini panoramiche a basso ingrandimento, mentre il secondo è stato utilizzato per valutare la colocalizzazione dei marcatori fluorescenti ad elevato ingrandimento.

La percentuale di cellule STEM121-positive che esprimevano NeuN, GFAP, Olig2 oppure Nestin è stata determinata mediante conta cellulare. Analogamente, è stata calcolata la percentuale di cellule STEM101-positive positive anche per Ki67.

Per la valutazione dell'atrofia cerebrale è stata inoltre misurata l'area del ventricolo laterale sinistro, in corrispondenza della sede della lesione, confrontandola con quella del ventricolo laterale destro non lesionato.

2.3.6 Analisi statistica

Per il confronto tra i gruppi sperimentali è stato utilizzato il test t di Student. L'analisi è stata applicata ai risultati dei test comportamentali (*Beam Walking Test* e *Accelerating Rotarod Test*), all'area di extravasazione dell'Evans Blue, alle analisi immunoistochimiche e alla misura dell'area dei ventricoli laterali. Le elaborazioni statistiche sono state effettuate mediante i software Statcel 3 e GraphPad Prism versione 8. Tutte le analisi sono state eseguite in modo indipendente in duplice replica.

3. RISULTATI

3.1 Produzione e caratterizzazione delle CD-NS/PC

Per aumentare la sicurezza dell'impiego delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), sono state ottenute cellule staminali/progenitrici neurali esprimenti il gene suicida yCD-UPRT (CD-NS/PC), usando la strategia di *genome editing* con tecnologia CRISPR/Cas9. In particolare, il gene è stato inserito nel locus ACTB, precedentemente identificato come un sito genomico idoneo a garantire un'espressione stabile del transgene durante il differenziamento cellulare (**Fig. 1A, B**).

Per verificare la funzionalità del sistema, è stata inizialmente valutata la sensibilità delle CD-NS/PC alla 5-fluorocitosina (5-FC) mediante saggio di vitalità cellulare. I risultati hanno evidenziato una riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione di 5-FC. In particolare, concentrazioni comprese tra 7 e 50 μ M hanno determinato una marcata diminuzione della sopravvivenza delle cellule, confermando la corretta espressione e funzionalità del gene suicida yCD-UPRT (**Fig. 1C**).

Successivamente è stata analizzata l'espressione del transgene mediante RT-qPCR nelle diverse fasi del differenziamento cellulare. L'espressione del gene ACTB è risultata mantenuta durante tutto il processo, mentre il gene yCD-UPRT è stato identificato sia nelle iPSC geneticamente modificate sia nelle NS/PC derivate, con una riduzione nei neuroni maturi, pur rimanendo rilevabile (**Fig. 1D**). Tali risultati dimostrano che il *genome editing* consente di ottenere un'espressione stabile del transgene anche dopo il differenziamento in cellule neurali.

Infine, è stato valutato l'effetto della 5-FC sulle cellule differenziate *in vitro*. L'analisi di immunofluorescenza ha evidenziato che, in assenza del trattamento, erano presenti cellule Ki67-positive, indice di attività proliferativa. Al contrario, dopo la somministrazione di 5-FC tali cellule risultavano assenti, mentre i neuroni positivi per β III-tubulina venivano preservati. Analogamente, le cellule Nestin-positive, rappresentative della popolazione progenitrice neurale, risultavano notevolmente ridotte dopo il trattamento. Questi risultati dimostrano che il sistema yCD-UPRT/5-FC consente di eliminare selettivamente le cellule ancora proliferanti o indifferenziate, preservando le cellule neuronali mature (**Fig. 1E**).

3.2 Analisi della migrazione delle CD-NS/PC

Per valutare la capacità migratoria delle CD-NS/PC, le cellule sono state trapiantate nel lato controlaterale (destro) rispetto al sito della lesione cerebrale (emisfero sinistro). L'analisi mediante imaging bioluminescente ha evidenziato che le CD-NS/PC iniziavano a migrare verso il sito della lesione a partire dal giorno 14 post-trapianto cellulare.

In parallelo, la colorazione istochimica di STEM121, che reagisce specificatamente con una proteina citoplasmatica delle cellule umane trapiantate, identifica CD-NS/PC nel corpo calloso e nella zona di lesione.

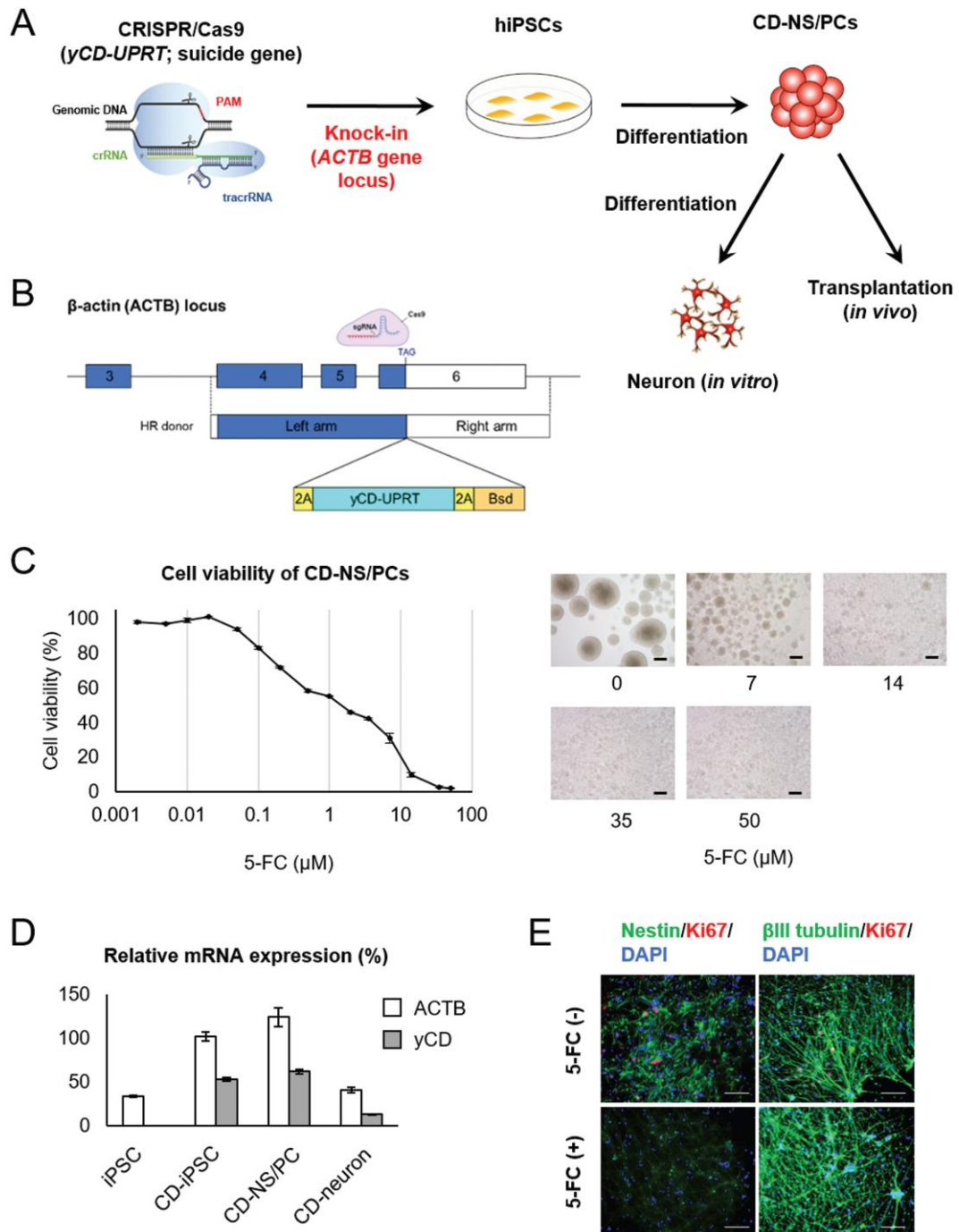


Figura 1. Generazione delle CD-NS/PC mediante *genome editing* e differenziamento. (A) Schema del processo di *genome editing*. Una parte delle CD-NS/PC è stata differenziata in neuroni *in vitro* e successivamente utilizzata per valutare l'effetto della 5-fluorocitosina (5-FC) sulle cellule neuronali. (B) Rappresentazione schematica della strategia di inserimento del gene *yCD-UPRT* nel locus *ACTB* mediante il sistema CRISPR/Cas9. Sono mostrati la sequenza bersaglio dell'RNA guida singolo (sgRNA) e il costrutto donatore per ricombinazione omologa (HR). (C) Vitalità delle CD-NS/PC a ciascuna concentrazione di 5-FC. Sono inoltre riportate immagini microscopiche delle CD-NS/PC coltivate in presenza di 0, 7, 14, 35 o 50 μ M di 5-FC per 7 giorni. Scale bar: 200 μ m. (D) Espressione relativa dell'mRNA nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), nelle NS/PC e nei neuroni. (E) Analisi *in vitro* dell'effetto della 5-FC sui neuroni. La nestina o la β III-tubulina sono visualizzate in verde, Ki67 in rosso e il DAPI in blu. In assenza di 5-FC erano presenti cellule positive per Ki67, mentre in presenza di 5-FC tali cellule risultavano assenti, con conservazione dei neuroni positivi per β III-tubulina. Scale bar: 100 μ m.

3.3 Valutazione macroscopica della lesione cerebrale traumatica

L'analisi delle sezioni cerebrali ha mostrato che la lesione indotta tramite metodo criogenico si estendeva fino a raggiungere la capsula esterna. Inoltre, la compromissione della barriera emato-encefalica è stata visualizzata macroscopicamente mediante l'extravasazione del colorante Evans Blue. Questi dati suggeriscono che la lesione provocata non è limitata alla sola superficie cerebrale, ma si estende in profondità nella materia bianca (**Fig. 2A**).

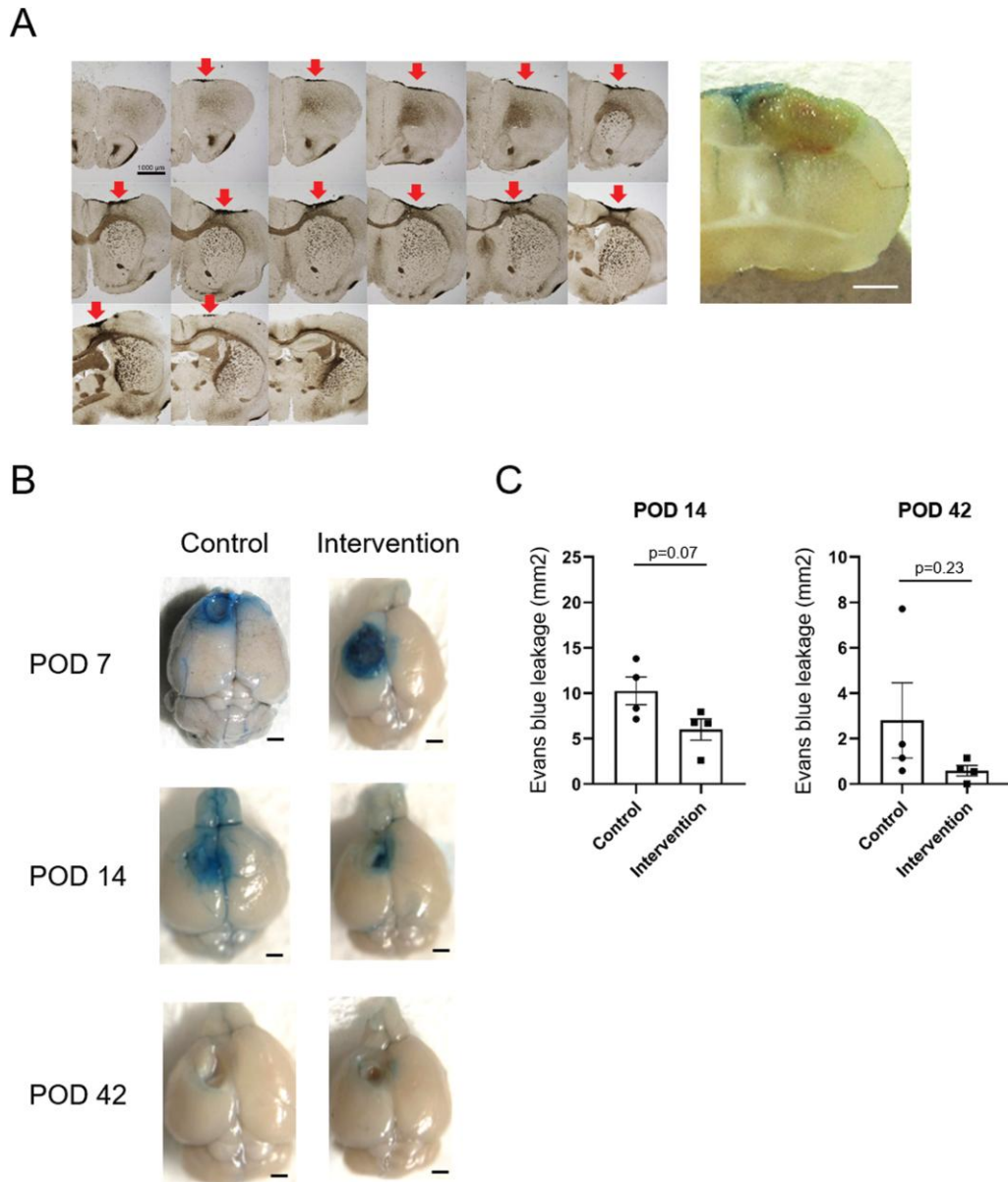


Figura 2. Effetto della TBI indotta mediante il metodo di *cryo-injury*. (A) Il TBI indotto mediante il metodo della crio-lesione è stato osservato su sezioni trasversali colorate con 3,3'-diaminobenzidina (sinistra). Le frecce indicano l'area della lesione sulla superficie cerebrale. La compromissione della barriera emato-encefalica è stata visualizzata mediante somministrazione endovenosa di Evans Blue (destra). *Scale bar*: 1000 μ m. (B) Visualizzazione macroscopica, nel tempo, della compromissione della barriera emato-encefalica mediante la fuoriuscita di Evans Blue. *Scale bar*: 1000 μ m. **POD**: giorno post-operatorio (*postoperative day*). (C) Valutazione quantitativa dell'extravasazione di Evans Blue. L'entità della fuoriuscita del colorante è risultata significativamente inferiore nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo ai giorni postoperatori 14 e 42.

In particolare, nel gruppo di controllo è stata osservata una tendenza a perdite prolungate di colorante, più evidenti al giorno 14 post-operatorio (**Fig. 2B**). La valutazione quantitativa ha inoltre mostrato un trend di riduzione dell'area di extravasazione dell'Evans Blue nel gruppo trattato con CD-NS/PC ai giorni 14 e 42 post-intervento; tuttavia, tale differenza non ha raggiunto la significatività statistica ($P = 0,07$ e $P = 0,23$, rispettivamente) (**Fig. 2C**).

3.4 Valutazione comportamentale

I risultati del *Beam Walking Test* sono risultati migliori (ovvero con tempi di percorrenza inferiori) nel gruppo di intervento B (CD-NS/PC associate al trattamento con 5-FC) rispetto al gruppo di controllo durante l'intero periodo di osservazione (**Fig. 3A**). In particolare, sono state osservate differenze statisticamente significative ai giorni post-operatori 3, 5, 49 e 63, con valori di $P = 0,02$, $0,01$, $0,04$ e $0,002$, rispettivamente. La stessa tendenza è notata nel gruppo di intervento A, trattato con sole CD-NS/PC.

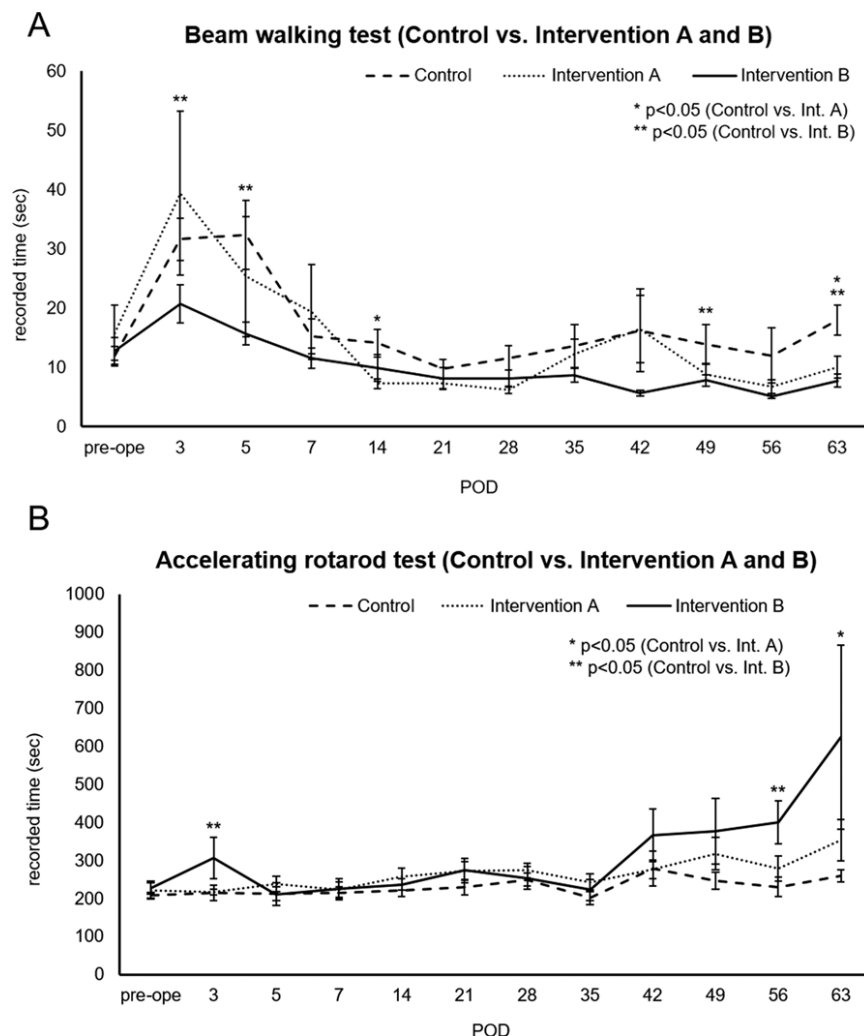


Figura 3. Valutazione comportamentale. (A) Prestazioni al *Beam Walking Test*, espresse come tempo medio (secondi), tra il gruppo di controllo e i gruppi trattati. (B) Prestazioni all' *Accelerating Rotarod Test*, espresse come tempo medio (secondi), tra il gruppo di controllo e i gruppi trattati. Gli asterischi (*) e i doppi asterischi (**) indicano i punti temporali nei quali è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi (controllo e gruppo trattato A oppure controllo e gruppo trattato B, rispettivamente). **POD**: giorno postoperatorio (*postoperative day*).

Anche le prestazioni ottenute mediante l'*Accelerating Rotarod Test* hanno mostrato una tendenza al miglioramento (ovvero un aumento del tempo di permanenza sull'asta rotante) nei gruppi di intervento sottoposti al trapianto cellulare con il passaggio della lesione cerebrale traumatica alla fase cronica, evidenziando differenze statisticamente significative in alcuni punti temporali (**Fig. 3B**). È importante sottolineare che non sono state osservate differenze statisticamente significative tra il gruppo di intervento A e il gruppo di intervento B, indicando che la successiva somministrazione di 5-FC non compromette il recupero funzionale ottenuto mediante il trapianto delle CD-NS/PC.

Inoltre, è da segnalare che un topo appartenente al gruppo di intervento A otteneva raramente un tempo inferiore a 10 secondi nel *Beam Walking Test*, sia durante le prove sperimentali sia durante la fase di addestramento preoperatorio, registrando quindi valori costantemente superiori rispetto alla media del proprio gruppo. Per questo motivo, i dati relativi a tale animale sono stati esclusi dall'analisi statistica del *Beam Walking Test*.

3.5 Analisi istopatologiche mediante immunofluorescenza

L'analisi microscopica ha evidenziato che un numero limitato di NS/PC aveva raggiunto il sito della contusione al 7° giorno post-operatorio. Al contrario, al 63° giorno post-operatorio è stato osservato un elevato numero di NS/PC migrate verso la sede del danno (**Fig. 4A**).

L'analisi di immunofluorescenza eseguita al 63° giorno post-operatorio ha mostrato che le NS/PC positive per STEM121 presentavano la maggiore co-localizzazione con il marcatore neuronale NeuN (**Fig. 4B**), mentre solo una piccola quota di cellule risultava positiva anche per GFAP, marcatore degli astrociti. Non sono invece state osservate cellule positive contemporaneamente per STEM121 e Olig2, indicando l'assenza di differenziamento verso la linea oligodendrogliale.

Questi risultati sono stati successivamente confermati dalla valutazione quantitativa mediante conta cellulare (**Fig. 4C**). Circa l'80% delle cellule STEM121-positive risultava positivo anche per NeuN, mentre la percentuale di cellule che esprimevano contemporaneamente GFAP e STEM121 era significativamente inferiore (17%). Non è stata rilevata alcuna co-localizzazione tra STEM121 e Olig2 (0%).

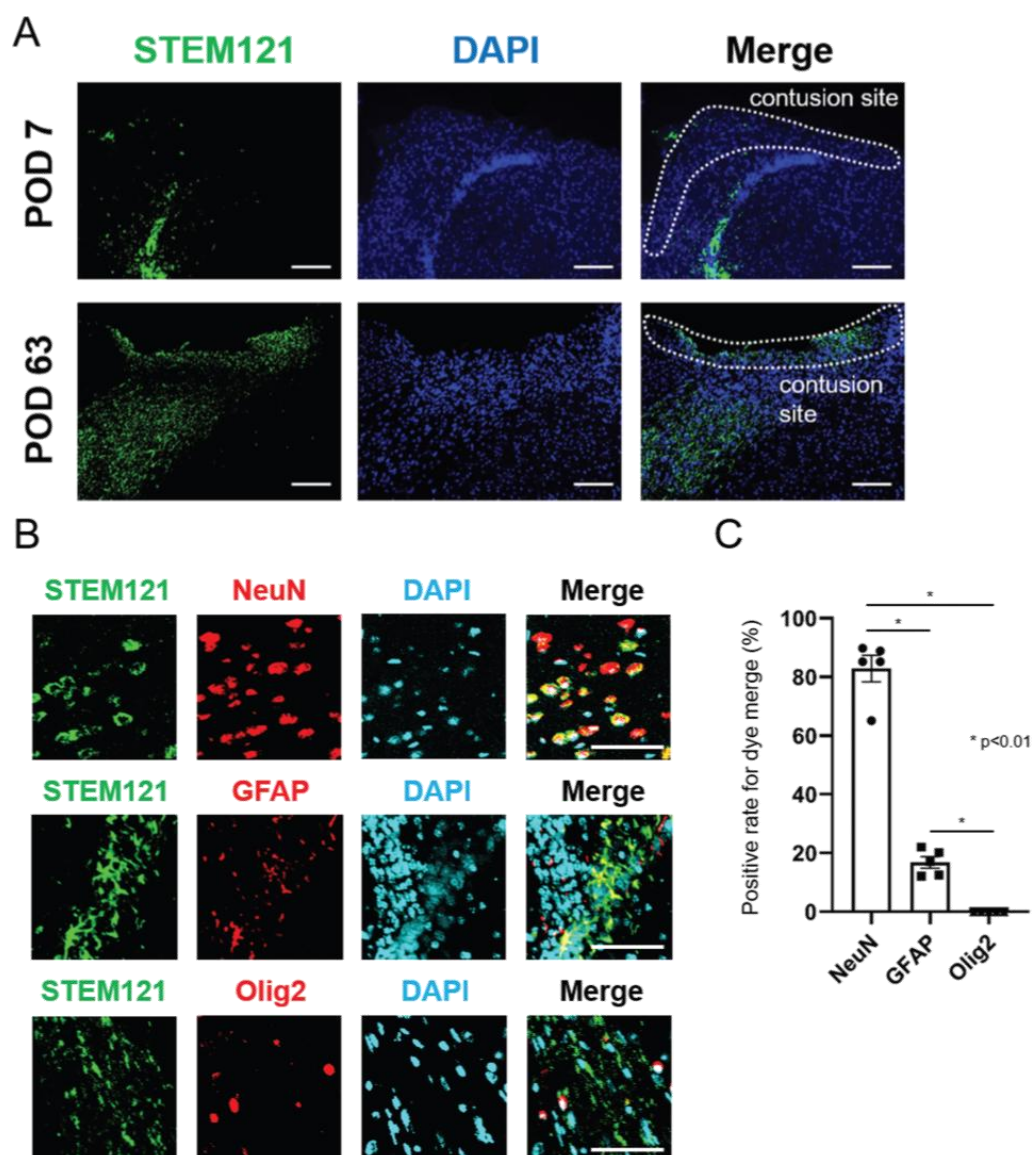


Figura 4. Analisi istopatologiche dopo il trapianto di CD-NS/PC. L'immunofluorescenza è stata eseguita su sezioni cerebrali di animali sottoposti a trapianto di NS/PC (gruppo trattato A). STEM121 è visualizzato in verde, DAPI in blu, mentre NeuN, GFAP e Olig2 sono visualizzati in rosso. (A) Migrazione delle NS/PC positive per STEM121 verso il sito della contusione nel corso delle 9 settimane successive alla lesione. *Scale bar*: 100 μ m. (B) Immagini ad alto ingrandimento del sito della TBI. Le NS/PC positive per STEM121 hanno mostrato la più elevata co-localizzazione con NeuN (83%), mentre solo una piccola percentuale risultava co-localizzata con GFAP (17%) e nessuna con Olig2 (0%). *Scale bar*: 50 μ m. (C) Analisi quantitativa mediante conta cellulare per la definizione della percentuale di cellule positive per la co-localizzazione di STEM121 con NeuN, GFAP o Olig2.

Per valutare l'efficacia del sistema suicida γ CD-UPRT/5-FC, il gruppo di intervento A (CD-NS/PC senza trattamento con 5-FC) è stato messo a confronto con il gruppo di intervento B (CD-NS/PC trattate con 5-FC) al giorno 63 post-intervento. L'analisi di immunofluorescenza ha rilevato che nel gruppo di intervento A era ancora presente una piccola popolazione di cellule indifferenziate positive per Nestin, pari a circa il 14% delle cellule trapiantate. Al contrario, nel gruppo trattato con 5-FC non sono state osservate cellule positive per Nestin, indicando che la

somministrazione del profarmaco aveva eliminato efficacemente le cellule progenitrici residue (**Fig. 5A, B**).

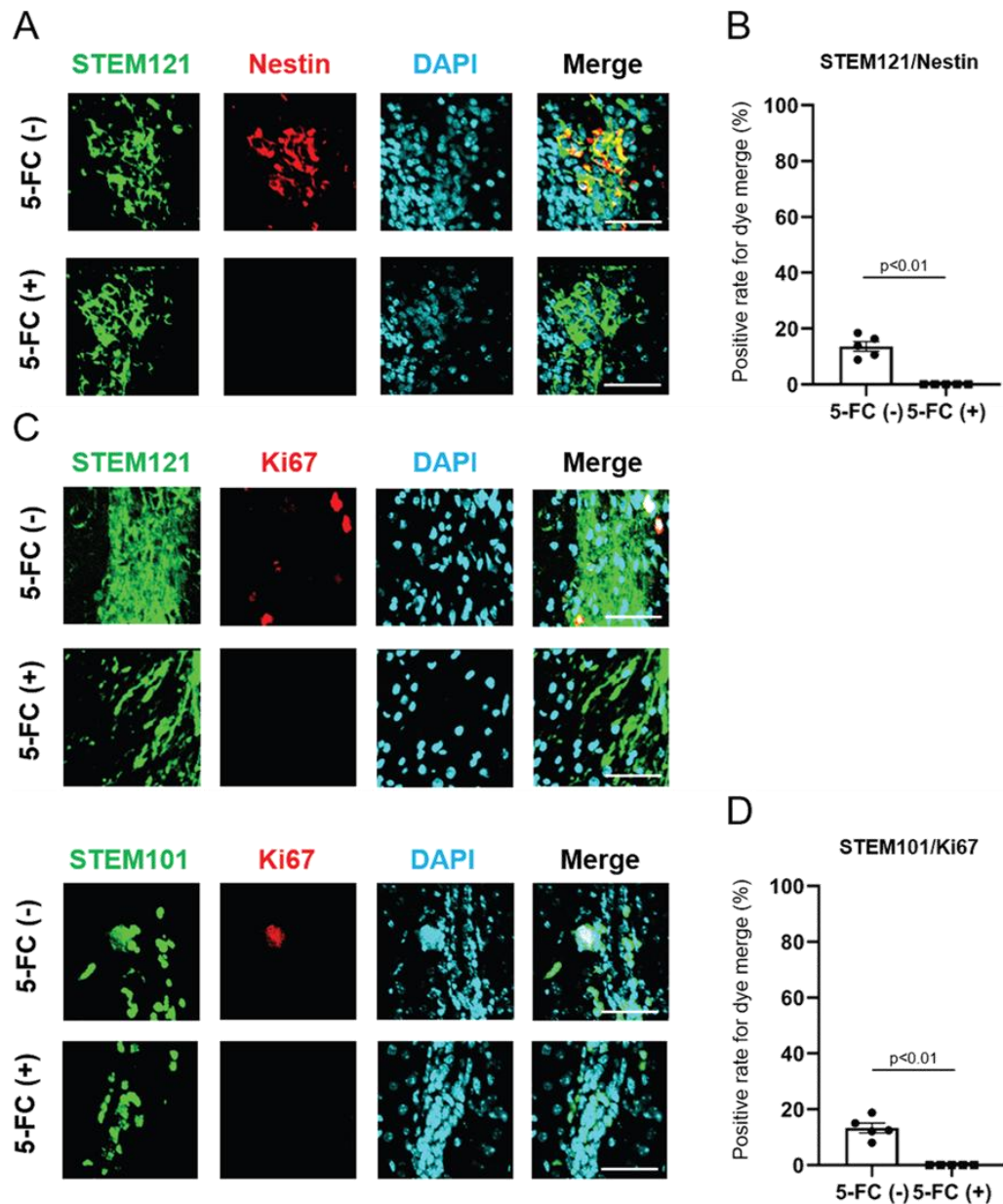


Figura 5. Effetto della somministrazione di 5-FU sulle CD-NS/PC trapiantate. Confronto tra il gruppo trattato A (senza 5-FU) e il gruppo trattato B (con 5-FU) al 63° giorno postoperatorio. STEM121 o STEM101 sono visualizzati in verde, DAPI in blu, mentre Nestin o Ki67 sono visualizzati in rosso. **(A)** Nel gruppo trattato A erano ancora presenti, seppur in numero ridotto, cellule indifferenziate positive per Nestin (14%), mentre tali cellule non sono state osservate nel gruppo trattato B. *Scale bar*: 50 μ m. **(B)** Percentuale di cellule positive per la co-localizzazione di STEM121 con Nestin. **(C)** Sia per STEM121 sia per STEM101, nel gruppo trattato A erano ancora presenti cellule positive per Ki67 (13%), mentre nel gruppo trattato B tali cellule non sono state rilevate. *Scale bar*: 50 μ m. **(D)** Percentuale di cellule che mostravano co-localizzazione tra STEM101 e Ki67.

Analogamente, l'analisi immunofluorescente mediante doppia colorazione per STEM121 o STEM101 e Ki67 ha mostrato la presenza, nel gruppo di intervento A, di cellule proliferanti, rappresentanti circa il 13% della popolazione trapiantata. Tali

cellule non erano invece rilevabili nel gruppo trattato con 5-FC, suggerendo che le cellule positive a STEM121 o a STEM101 ancora proliferanti venissero eliminate in seguito alla somministrazione del profarmaco (**Fig. 5C, D**). Le differenze riscontrate mediante conta cellulare sono risultate statisticamente significative per tutti i confronti ($P < 0,01$).

Successivamente è stato valutato l'effetto neuroprotettivo del trapianto di NS/PC. Al 63° giorno post-operatorio, nel gruppo di controllo non sottoposto a trapianto è stata osservata un'estesa perdita dei neuroni originari positivi per NeuN nelle aree circostanti la contusione cerebrale. Al contrario, nel gruppo di intervento A tali neuroni apparivano in larga misura preservati (**Fig. 6A**).

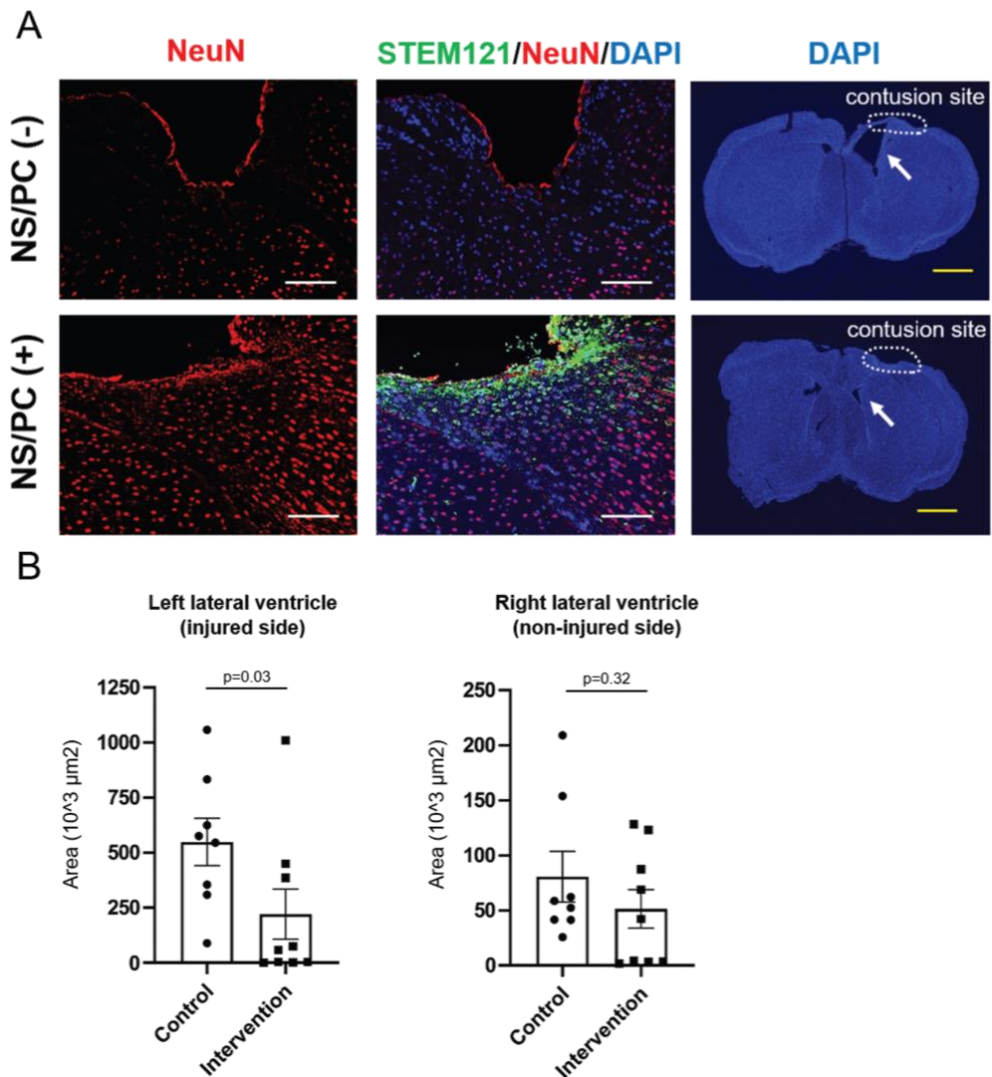


Figura 6. Prevenzione dell'atrofia cerebrale dopo TBI. Analisi di immunofluorescenza su sezioni cerebrali trapiantate con NS/PC. **(A)** Confronto tra il gruppo di controllo e il gruppo di intervento A al 63° giorno postoperatorio. Nel gruppo di controllo si osservano una marcata perdita di neuroni NeuN-positivi (rosso) in prossimità della lesione e un maggiore ingrandimento del ventricolo laterale sinistro (freccie), mentre nel gruppo trattato le NS/PC STEM121-positive (verde) sono localizzate in prossimità del sito lesionato. *Scale bar*: 100 μm (bianca); 1000 μm (gialla). **(B)** L'area del ventricolo laterale sinistro risulta significativamente maggiore nel gruppo di controllo rispetto ai gruppi trattati, senza differenze significative nel ventricolo controlaterale.

Per quantificare il grado di atrofia cerebrale è stata quindi misurata l'area del ventricolo laterale sinistro, corrispondente all'emisfero lesionato. Tale area è risultata significativamente maggiore nel gruppo di controllo rispetto a entrambi i gruppi sottoposti al trapianto cellulare ($p = 0,03$) (**Fig. 6B**), indicando una maggiore dilatazione ventricolare conseguente all'atrofia del tessuto cerebrale. Al contrario, l'area del ventricolo laterale destro, corrispondente all'emisfero non lesionato, non ha mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p = 0,32$) ed è risultata mediamente inferiore rispetto a quella osservata nel lato lesionato.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La lesione cerebrale traumatica (*Traumatic Brain Injury*, TBI) rappresenta ancora oggi una delle principali cause di mortalità e disabilità neurologica a livello mondiale. Nonostante i progressi della neurochirurgia e delle terapie intensive, gli approcci terapeutici attualmente disponibili sono prevalentemente rivolti al controllo del danno secondario e alla riabilitazione funzionale, senza essere in grado di promuovere una reale rigenerazione del tessuto nervoso lesionato. In questo contesto, la medicina rigenerativa e, in particolare, la terapia cellulare rappresentano una delle strategie più promettenti per favorire il recupero strutturale e funzionale del sistema nervoso centrale.

Le cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) costituiscono una sorgente cellulare di particolare interesse, poiché associano l'elevata capacità proliferativa e differenziativa tipica delle cellule staminali alla possibilità di essere ottenute da cellule somatiche adulte, superando le principali problematiche etiche legate all'impiego delle cellule staminali embrionali. Tuttavia, la loro applicazione clinica è ancora limitata dal rischio di tumorigenesi, dovuto alla possibile persistenza di cellule indifferenziate dopo il trapianto.

L'aspetto maggiormente innovativo dello studio di Imai e collaboratori consiste proprio nello sviluppo di una strategia volta ad aumentare la sicurezza della terapia cellulare.

Attraverso l'utilizzo della tecnologia dell'editing genetico basata sul sistema CRISPR/Cas9, le cellule iPSC sono state modificate mediante l'inserimento di un gene "suicida" derivante dal lievito (yCD-UPRT). Dopo il trapianto cellulare e la successiva somministrazione di 5-fluorocitosina (5-FC), il prodotto del gene suicida converte il profarmaco 5-FC in 5-fluorouracile (5-FU), il quale attiva un pathway tossico che determina la morte delle cellule indifferenziate, preservando al contempo le strutture neurali originali e quelle derivate dal differenziamento delle NS/PC, senza interferire in tale modo con il grado di rigenerazione raggiunto. Questo approccio rappresenta quindi un efficace sistema per ridurre la tumorigenicità e permette di aumentare la sicurezza di potenziali terapie cellulari nell'ambito della medicina rigenerativa.

I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia di questa strategia. Le analisi immunoistochimiche hanno evidenziato la completa eliminazione delle cellule proliferanti positive per Ki67 e delle cellule progenitrici Nestin-positive dopo il trattamento con 5-FC, mentre i neuroni differenziati positivi per β III-tubulina e NeuN risultavano preservati. Questi dati rappresentano il principale punto di forza dello studio, poiché dimostrano come sia possibile ridurre il rischio di tumorigenesi senza compromettere il processo di differenziamento neuronale né l'efficacia terapeutica del trapianto.

Oltre agli aspetti di sicurezza, lo studio dimostra che il trapianto delle CD-NS/PC produce effetti biologicamente rilevanti sul recupero del tessuto cerebrale lesionato. Le cellule trapiantate hanno mostrato la capacità di migrare spontaneamente verso il sito della lesione, differenziandosi prevalentemente in neuroni maturi, mentre il recupero funzionale osservato nei test comportamentali (*Beam Walking Test* e *Accelerating Rotarod Test*) suggerisce un'effettiva integrazione delle cellule nel tessuto ospite. Inoltre, la riduzione dell'atrofia cerebrale e della dilatazione ventricolare osservata nei gruppi trattati indica un possibile effetto neuroprotettivo delle cellule trapiantate.

Nonostante i risultati promettenti, lo studio presenta alcuni limiti che meritano di essere considerati. In primo luogo, gli esperimenti sono stati condotti esclusivamente in un modello murino di TBI, che, pur rappresentando un valido sistema sperimentale, non riproduce completamente la complessità della patologia nell'uomo. Inoltre, il periodo di osservazione è limitato a 63 giorni, un intervallo temporale sufficiente a valutare gli effetti iniziali del trattamento ma non a escludere completamente possibili eventi avversi tardivi, compresa l'eventuale comparsa di fenomeni tumorali.

Un ulteriore aspetto che richiederà approfondimenti riguarda l'individuazione del sito ideale per il trapianto delle cellule. Alcuni studi hanno infatti riportato un tasso di sopravvivenza cellulare più elevato quando le cellule vengono trapiantate nel ventricolo laterale. Tuttavia, nell'articolo analizzato le NS/PC hanno mostrato una elevata capacità migratoria verso la sede della lesione, suggerendo che l'efficacia della rigenerazione tissutale non dipenda in modo sostanziale dal sito di iniezione. Saranno pertanto necessari ulteriori studi comparativi per definire quale approccio garantisca il miglior compromesso tra sopravvivenza cellulare, migrazione ed efficacia terapeutica.

Infine, sebbene il differenziamento neuronale rappresenti l'obiettivo principale della terapia proposta, rimane aperta la possibilità di migliorare ulteriormente l'efficacia del trattamento promuovendo anche la ricostituzione dell'intero microambiente nervoso.

In prospettiva futura, l'individuazione dei fattori neurotrofici chiave maggiormente espressi potrebbe fornire un nuovo locus, altamente espresso in fase di lesione, per inserire il gene suicida, consentendo di sfruttarne l'elevata attività trascrizionale per ottenere una maggiore espressione della proteina di interesse. In alternativa, potrebbe essere studiata la regione promotrice di questi geni, che potrebbe essere utilizzata per creare un costrutto transgenico con il gene suicida sottoposto a tale promotore inducibile.

Sempre in un'ottica di futuri miglioramenti della tecnica, successivi studi dovrebbero porre l'attenzione non solo alla ricostruzione delle strutture e dei collegamenti nervosi, ma anche alla ricostituzione della glia circostante. Le cellule della glia sono infatti cellule estremamente importanti per il corretto funzionamento del tessuto nervoso. Gli astrociti, le cellule gliali principali, sono fondamentali per la generazione di un microambiente ideale per il corretto mantenimento dei neuroni e la loro proliferazione aiuta la rigenerazione del tessuto (cicatrice gliale) e contribuisce a formare la barriera emato-encefalica. Gli ependimociti sono cellule che rivestono la superficie interna dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale e sono necessari per il movimento del liquido cerebrospinale, che ha funzione protettiva nei confronti di encefalo e midollo. Infine, la microglia è costituita da cellule dotate di attività fagocitaria (simili ai macrofagi; derivano dalla linea monocito-macrofagica) che svolgono un'importante funzione immunitaria, contribuendo anch'esse alla riparazione del tessuto.

Per questi motivi, nelle future applicazioni della terapia cellulare per la riparazione del tessuto nervoso, potrebbe essere vantaggioso associare alle NS/PC anche cellule staminali progenitrici della glia, al fine di favorire la ricostituzione di un microambiente idoneo alla rigenerazione e al mantenimento del tessuto nervoso, contribuendo in particolare al ripristino della barriera emato-encefalica e dell'integrità della rete vascolare lesionata. In particolare, la microglia potrebbe

modulare la risposta immunitaria conseguente alla morte delle cellule eliminate mediante trattamento con 5-FC, limitando il danno secondario associato all'infiammazione, ultimo punto di attenzione sollevato dagli autori dell'articolo. In conclusione, il lavoro di Imai e collaboratori propone una strategia innovativa che combina genome editing e terapia cellulare per aumentare la sicurezza dell'impiego delle hiPSC nella medicina rigenerativa. L'introduzione del sistema suicida yCD-UPRT/5-FC rappresenta un importante passo avanti verso la possibile applicazione clinica delle cellule staminali pluripotenti, dimostrando come sia possibile preservarne il potenziale rigenerativo riducendo al contempo il rischio di tumorigenesi. Sebbene siano necessari ulteriori studi preclinici e clinici per confermarne efficacia e sicurezza a lungo termine, i risultati ottenuti suggeriscono che questa piattaforma possa rappresentare una promettente strategia terapeutica non solo per la lesione cerebrale traumatica, ma anche per altre patologie neurologiche caratterizzate da perdita di tessuto nervoso.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Kundu S, Singh S. What Happens in TBI? A Wide Talk on Animal Models and Future Perspective. *Curr Neuroparmacol*. 2023;21(5):1139-1164. doi: 10.2174/1570159X20666220706094248.
- [2] Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med*. 2010 ;14(10):2381-92. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x.
- [3] Copani A, Caraci F, Hoozemans JJ, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F. The nature of the cell cycle in neurons: focus on a "non-canonical" pathway of DNA replication causally related to death. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(4):409-12. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.10.016. Epub 2006 Nov 1. PMID: 17196375.
- [4] Fesharaki-Zadeh A, Datta D. An overview of preclinical models of traumatic brain injury (TBI): relevance to pathophysiological mechanisms. *Front Cell Neurosci*. 2024;18:1371213. doi: 10.3389/fncel.2024.1371213.
- [5] Manet R, de Courson H, Capel C, Joubert C, Chivoret N, Faillot M, Balanca B, Bani-Sadr A, Cardinale M, Coca A, Cotton F, Esnault P, Gallet C, Gazzola S, Goutagny S, Jecko V, le Marechal M, Luauté J, Mortamet G, Moyer JD, Quintard H, Rolland A, Samarut É, Sigaut S, Verin E, Vinchon M, Decq P, Payen JF, Dagain A. Neurosurgical management of the acute phase of adult and pediatric traumatic brain injury: 2025 guidelines of the French Society of Neurosurgery. *Neurochirurgie*. 2025;71(4):101686. doi: 10.1016/j.neuchi.2025.101686.
- [6] Kareemi H, Pratte M, English S, Hendin A. Initial Diagnosis and Management of Acutely Elevated Intracranial Pressure. *J Intensive Care Med*. 2023;38(7):643-650. doi: 10.1177/08850666231156589.
- [7] Stadler H, Müller K, Kurlmann G, Lendt M. Effectiveness of Neuropediatric Inpatient Rehabilitation. *Neuropediatrics*. 2024;55(2):83-89. doi: 10.1055/s-0043-1777124.
- [8] Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):112. doi: 10.1038/s41392-024-01809-0.
- [9] Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev*. 2009;30(3):204-13. doi: 10.1210/er.2008-0031.
- [10] Carlsen L, Schorl C, Huntington K, Hernandez-Borrero L, Jhaveri A, Zhang S, Zhou L, El-Deiry WS. Pan-drug and drug-specific mechanisms of 5-FU, irinotecan (CPT-11), oxaliplatin, and cisplatin identified by comparison of transcriptomic and cytokine responses of colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2021;12(20):2006-2021. doi: 10.18632/oncotarget.28075.

APPENDICE

Imai R, Tamura R, Yo M, Sato M, Fukumura M, Takahara K, Kase Y, Okano H, Toda M. Neuroprotective Effects of Genome-Edited Human iPS Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells on Traumatic Brain Injury. *Stem Cells*. 2023;41(6):603-616. doi: 10.1093/stmcls/sxad028.

Neuroprotective Effects of Genome-Edited Human iPSC Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells on Traumatic Brain Injury

Ryotaro Imai¹, Ryota Tamura^{*,1,†} , Masahiro Yo², Mizuto Sato¹, Mariko Fukumura¹, Kento Takahara¹, Yoshitaka Kase³, Hideyuki Okano³ , Masahiro Toda^{*,1,†}

¹Department of Neurosurgery, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

²Laboratory for Cell Function and Dynamics, RIKEN Center for Brain Science, Wako, Saitama, Japan

³Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

*Corresponding author: Ryota Tamura, MD, PhD, Department of Neurosurgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan. Tel: +81 3 5363 3808; Fax +81 3 3358 0479; Email: moltobello-r-610@keio.jp; or, Masahiro Toda, MD, PhD, Department of Neurosurgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan. Email: todam@keio.jp

†Co-corresponding authors.

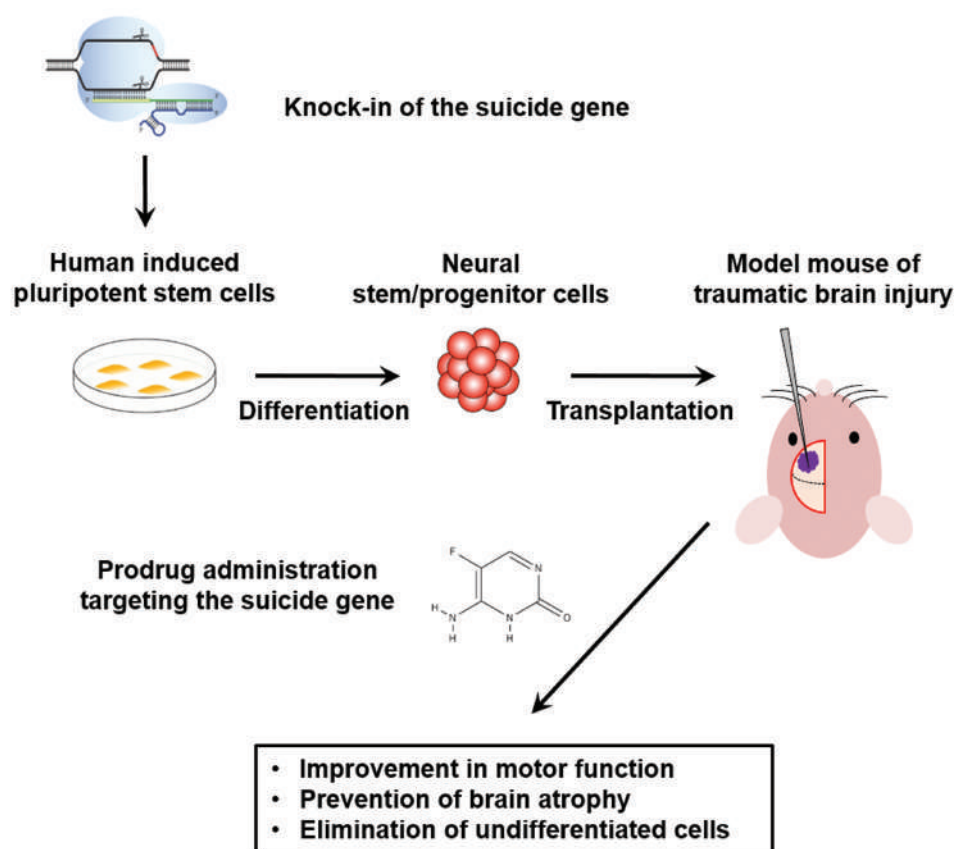
Abstract

Despite developing neurosurgical procedures, few treatment options have achieved functional recovery from traumatic brain injury (TBI). Neural stem/progenitor cells (NS/PCs) may produce a long-term effect on neurological recovery. Although induced pluripotent stem cells (iPSCs) can overcome ethical and practical issues of human embryonic or fetal-derived tissues in clinical applications, the tumorigenicity of iPSC-derived populations remains an obstacle to their safe use in regenerative medicine. We herein established a novel treatment strategy for TBI using iPSCs expressing the enzyme-prodrug gene yeast cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase (yCD-UPRT). NS/PCs derived from human iPSCs displayed stable and high transgene expression of yCD-UPRT following CRISPR/Cas9-mediated genome editing. In vivo bioluminescent imaging and histopathological analysis demonstrated that NS/PCs concentrated around the damaged cortex of the TBI mouse model. During the subacute phase, performances in both beam walking test and accelerating rotarod test were significantly improved in the treatment group transplanted with genome-edited iPSC-derived NS/PCs compared with the control group. The injury area visualized by extravasation of Evans blue was smaller in the treatment group compared with the control group, suggesting the prevention of secondary brain injury. During the chronic phase, cerebral atrophy and ventricle enlargement were significantly less evident in the treatment group. Furthermore, after 5-fluorocytosine (5-FC) administration, 5-fluorouracil converted from 5-FC selectively eliminated undifferentiated NS/PCs while preserving the adjacent neuronal structures. NS/PCs expressing yCD-UPRT can be applied for safe regenerative medicine without the concern for tumorigenesis.

Key words: CRISPR/Cas9; genome editing; iPSC cell; neural stem/progenitor cell; traumatic brain injury.

Graphical Abstract

Genome editing via CRISPR/Cas9



Significance Statement

Research on cell transplantation therapy for the central nervous system is rapidly advancing. Among the various cell types, induced pluripotent stem cells can overcome ethical and practical issues, while their potential to form tumors remains a safety concern. We established genome-edited induced pluripotent stem cells containing a safeguard, a suicide gene, to eliminate undifferentiated cells after the transplantation. We also demonstrated that neural stem/progenitor cell transplantation effectively improved motor function and prevented brain atrophy in the mouse model of traumatic brain injury. The present concepts can be applied not only to traumatic brain injury but also to strokes or other neurological disorders.

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) consists of hemorrhage, cerebral infarction, necrosis, and edema.¹ Despite developing neurosurgical procedures, few treatment options have achieved functional recovery from TBI.² Most patients cannot fully recover because regeneration is limited in the adult brain. Therefore, TBI is a continuous public health concern with limited treatment options.

Cell transplantation therapies employing a wide range of stem cells have recently attracted attention. Mesenchymal stem cells (MSCs) can easily be harvested from bone marrow and adipose tissue. Transplantation-mediated trophic support and immune regulation are the main mechanisms by which MSCs support the repair of damaged brain tissue.³ According to the latest research, bone marrow-derived MSCs improve motor deficits after TBI.⁴ However, the disadvantage of MSCs is that they cannot efficiently differentiate into stable neural tissue, meaning functional recovery primarily

depends on the secretion of neurotrophic factors during the acute phase.⁵

Neural stem/progenitor cells (NS/PCs), however, can differentiate into neurons and glial cells to produce long-term treatment effects and functional recovery by repairing neural structures after brain injury.⁶ Some clinical attempts have been made to apply human NS/PCs derived from fetal cortical brain tissue or spinal cord to treat ischemic stroke.^{7,8} However, along with the accompanying ethical issues, NS/PCs are difficult to obtain from human embryos. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have the potential to overcome ethical and practical issues for clinical application,⁹ while tumorigenicity remains a major concern for the safety of iPSC-based regenerative medicine.¹⁰⁻¹³

Gene-directed enzyme prodrug therapy is an attractive approach to prevent potential tumorigenesis.^{14,15} In general, induction of stable constitutive transgene expression by viral vectors is difficult in human iPSCs (hiPSCs).^{16,17} Recently, we

demonstrated *ACTB* as the most appropriate gene locus to achieve stable constitutive transgene expression in hiPSCs via CRISPR/Cas9-mediated genome editing.¹⁸ Herein, we established a novel gene therapy for TBI using NS/PCs derived from human genome-edited iPSCs expressing an enzyme-prodrug gene.

Materials and Methods

Cell Culture and CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing

1210B2-hiPSCs were derived from human peripheral blood mononuclear cells of a healthy 29-year-old African-American female (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA). 1210B2-hiPSCs (kindly provided by Shinya Yamanaka, Kyoto Univ., Kyoto, Japan) were cultured with a feeder-free protocol.^{15,19} Fig. 1A shows a schematic overview of the experimental design to establish cytosine deaminase-expressing NS/PCs (CD-NS/PCs). The Cas9/sgRNA expression plasmid, pU6-ACTBgRNA-Cas9, was constructed by cloning DNA oligonucleotides coding for sgRNA targeting near the stop codon of *ACTB* into the *BbsI* site of the pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 plasmid.²⁰ To generate homologous recombination (HR) donor plasmids, 1-kb fragments of the left and right homology arms of *ACTB* were PCR-amplified from genomic DNA isolated from human fibroblasts (NB1RGB; RIKEN BRC, Ibaraki, Japan) and cloned into the PrecisionX HR donor vector HR100PA-1 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA). Next, a polycistronic cassette containing yeast cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase (yCD-UPRT) and a blasticidin-resistance fusion gene (*Bsd*) was inserted between the left and right homology arms, resulting in the HR donor plasmid HR-ACTB-2A-yCD-UPRT-2A-Bsd. HR donor plasmids of *ACTB* were designed to be in frame with the C-terminus of *ACTB* and express fusion proteins joined with a self-cleaving 2A peptide sequence. The PAM sites of ACTBgRNA were substituted by 5'-NTG-3' in HR donor plasmids (Fig. 1B). All plasmids were verified by DNA sequencing.

For transfection, 1×10^6 iPSCs suspended in 100 μ L of Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were mixed with pU6-ACTBgRNA-Cas9 (3 μ g) and the HR donor plasmid (10 μ g), and subjected to electroporation at 125 V for 5 ms using a NEPA21 electroporator (Nepa Gene, Chiba, Japan). Immediately after electroporation, cells were plated in a complete medium and subjected to Bsd selection (0.5 μ g/mL). To verify integration, genomic PCR analysis was performed.

Differentiation into CD-NS/PCs

Embryoid body (EB) formation and NS/PCs generation were performed as previously described. An EB formation method using dual SMAD inhibitors was used. iPSCs were cultured in StemFit AK02N medium (Ajinomoto, Tokyo, Japan) in a 5% CO₂ incubator. ROCK inhibitor (Fujifilm, Osaka, Japan; Y-27632) was added at the time of cell passaging at a final concentration of 10 μ M. To induce EB formation, dual SMAD inhibitors, namely, SB431542 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA) and LDN193189 (MedChemExpress) were added to StemFit Basic02 medium (Ajinomoto) at final concentrations of 100 nM and 10 μ M, respectively. With this medium, the cells were seeded into V bottom 96-well plates at a concentration of 9000 cells/75 μ L/well, and cultured for 14

days. On day 14, the aggregates were dissociated to generate the first passage of NS/PCs. The NS/PCs were maintained by culturing them as floating neurospheres in the medium, which consisted of D-MEM/Ham's F-12 (Fujifilm; 048-29785) with B27 (Thermo Fisher Scientific; 17504044), epidermal growth factor (PeproTech, Cranbury, NJ, USA; AF-100-15), fibroblast growth factor (PeproTech; 100-18B), and leukemia inhibitory factor (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; 07690-31). Following the thawing of the cryopreserved stock, NS/PCs were maintained in culture for a total duration of 25 days, undergoing 3 passages to reach passage 10. Subsequently, cell transplantation was carried out. We dissociated the CD-NS/PC spheres into single cells immediately prior to transplantation.

Lentiviral Vector-Mediated Transduction

CD-NS/PCs were transduced with the lentiviral vector CSII-EF-ffLuc containing the ffLuc gene (a Venus fluorescent protein²¹ and firefly luciferase fusion gene) at a multiplicity of infection of 2. Transduced cells were seeded as single cells into a 96-well plate and expanded. Single-cell clones stably expressing ffLuc were established.

Cell Viability Assay

A cell viability assay was performed to evaluate the sensitivity of each CD-NS/PC clone to 5-fluorocytosine (5-FC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The assay was performed three days after cells were exposed to 5-FC using a Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) as previously described.¹⁵ The dosages ranged from 0.002 to 50 μ M. To account for background absorbance, the absorbance value of the medium at 450 nm was subtracted from each sample. Cell viability was determined by calculating the relative changes in cells that were not exposed to 5-FC. Each experiment was performed in triplicate.

Analysis of Gene Expression

Total RNA was extracted from NS/PCs or neurons using ISOGEN (NIPPON GENE, Tokyo, Japan). Subsequently, cDNA libraries were prepared from the total RNA by employing ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to detect the gene expression of GAPDH, *ACTB*, and yCD. *ACTB* and yCD expression levels were assessed by calculating the relative changes in comparison with GAPDH through the $\Delta\Delta C_t$ method. The RT-qPCR was conducted under the following conditions: 95 °C for 120 s, succeeded by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, 72 °C for 60 s, and melting curve analysis using Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in ViiA 7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). The amplification efficiency of each primer pair (Supplementary Table S1) was evaluated by the standard curve method. Each sample was tested in triplicate.

In vitro Analysis of the Effect of 5-FC on Neurons

Matrigel (Corning, Corning, NY, USA) and Neurobasal Medium (Thermo Fisher Scientific) containing B27 supplement (Thermo Fisher Scientific) and GlutaMAX supplement (Thermo Fisher Scientific) were mixed at 1:100. Matrix coating was performed using 300 μ L of this mixture, and NS/PCs were incubated for a day. The supernatant was then removed, and NS/PCs were incubated for 14 days in Neurobasal Medium containing 0.05 μ L of DAPT (Fujifilm) per mL. Half of the medium was changed every 4

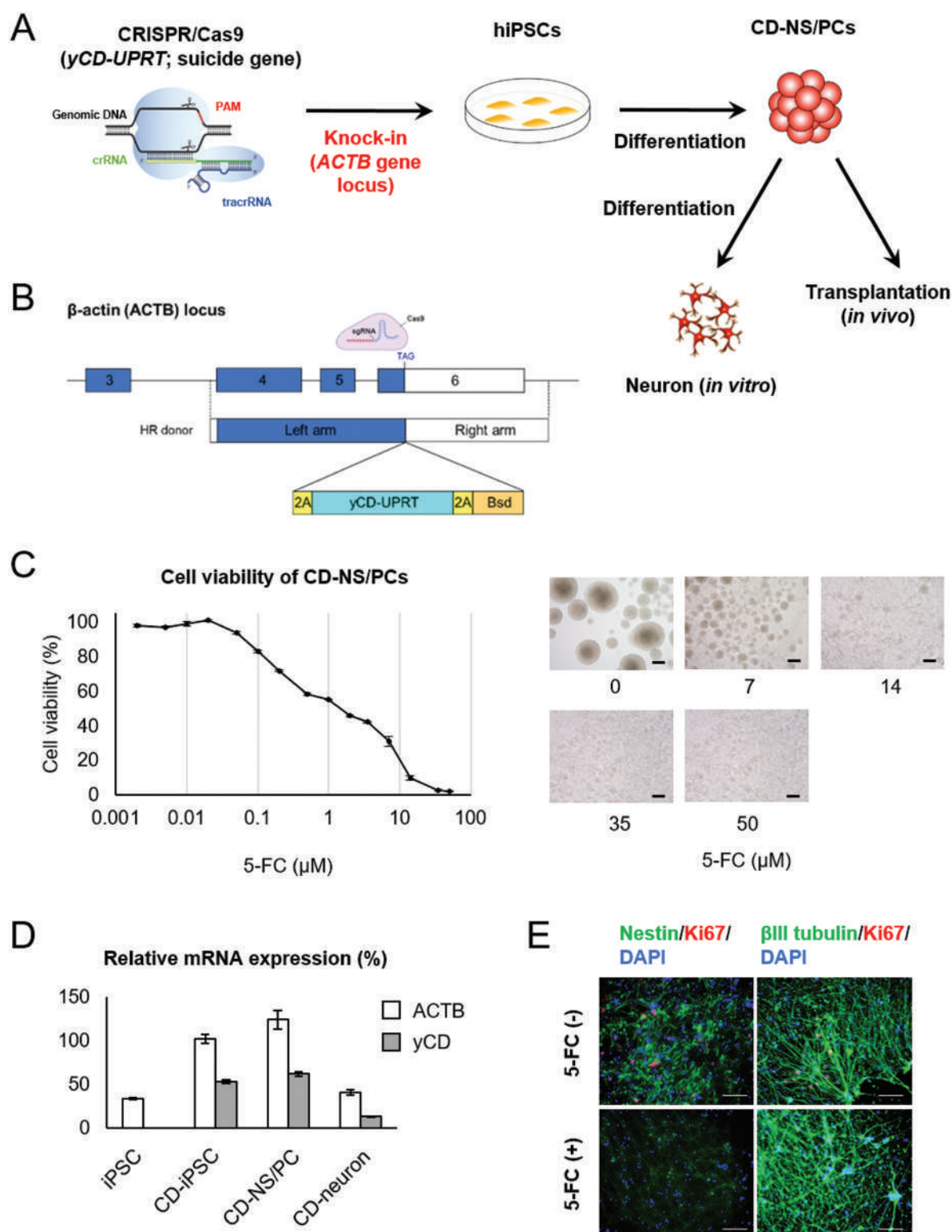


Figure 1. Establishment of CD-NS/PCs by genome editing and differentiation (**A**) schematic overview of genome editing. Some CD-NS/PCs were differentiated into neurons *in vitro* and subsequently utilized to assess the impact of 5-FC on neuronal cells. (**B**) Schematic depiction of the CRISPR/Cas9-mediated strategy for inserting the γ CD-UPRT gene into the β -actin locus. Single guide RNA (sgRNA) target sequence and HR donor constructs are shown. (**C**) Cell viability of CD-NS/PCs at each 5-FC concentration. Micrographs of CD-NS/PCs cultured in the presence of 0, 7, 14, 35, or 50 μ M of 5-FC for 7 days are also shown. Scale bar, 200 μ m. (**D**) Relative mRNA expression of iPSCs, NS/PCs and neuron. (**E**) *In vitro* analysis of the effect of 5-FC on neurons. Nestin or β III tubulin is labeled in green; Ki67 in red; and DAPI in blue. Ki67-positive cells remained without 5-FC, while they were absent in the presence of 5-FC, with β III tubulin-positive neurons being preserved. Scale bar, 100 μ m.

days. Subsequently, 5-FC was administered for 6 days. Cells were fluorescently stained with anti-Nestin (1:200, mouse IgG; Chemicon, Tokyo, Japan; MAB5326), anti-Ki67 (1:500, rabbit IgG; Novocastra, Newcastle, UK; NCL-Ki67p), and anti-beta III tubulin (1:200, mouse IgG2a; Sigma-Aldrich; T8660) antibodies.

Reanalysis of Published RNA-seq Data

Published RNA-seq data for NS/PCs and MSCs were reanalyzed.¹⁸ We obtained FASTQ data from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO: GSE150470). Raw FASTQ files were trimmed for adapters by Cutadapt²² and Salmon²³ to generate the transcripts per million (TPM) and estimated counts using the transcript index from GRCh38 (Gencode v40). We selected genes associated with terms “neurotrophic,” “neuro growth,” and “neurotrophin” in Gene Ontology. Heatmaps of gene expression were drawn on the row-wise z -value of $\log_2(\text{TPM} + 1)$ for each gene.

Animal Model of TBI

All experiments were performed by Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of Keio University (Approval No. 14057) and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The brain injury model was created based on a previously reported “cryo-injury” method.²⁴ Six-week-old female BALB/c nu/nu mice (Sankyo Labo Service Corporation, Tokyo, Japan) were housed at a constant temperature with a 12-h light-dark cycle. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 200 μL of mixed anesthetic (0.3 mg medetomidine, 4 mg midazolam, and 5 mg butorphanol in 10 mL of normal saline) and fixed in a stereotaxic frame. For each mouse, a longitudinal skin incision was made on the head, and a burr hole was drilled out on the cranium (Emax EVolution; Nakanishi, Tochigi, Japan) at a point 2 mm anterior and 2 mm left lateral to the bregma (motor-sensory cortex). Next, a metal probe chilled with CO_2 gas (Cryomatic Console MKII; Keeler, Malvern, PA, USA) was applied to the brain surface (Fig. 2A). Ten sessions were performed, each of which comprising a 30-s probe application followed by a 30-s break, as previously described.²⁴ Following intracerebral injection of NS/PC solution (intervention groups) or phosphate-buffered saline (PBS, control group) at the contusion site, the skin was closed with surgical staples. These procedures were microscopically conducted. Mice were returned to their cages and allowed free access to food and water, with no antibiotics given.

Study Design and Cell Transplantation

Preceding the main experimental framework, we performed 2 preliminary experiments. The first involved tracking the movement of CD-NS/PCs in 3 mice, whereas the second evaluated the permeability of the blood-brain barrier through Evans blue leakage observed in eight mice. The specific procedures will be elaborated upon later.

Subsequently, we proceeded to assess the motor function and immunohistochemical findings following *in vivo* transplantation of CD-NS/PCs. A total of 28 mice were divided into 3 experimental groups (Fig. 2B): (1) control group receiving PBS, (2) intervention group A receiving CD-NS/PC alone, and (3) intervention group B receiving CD-NS/PC and intraperitoneal 5-FC for 14 consecutive days from postoperative day 35 to eliminate undifferentiated CD-NS/PCs by the suicide gene (yCD-UPRT). In the intervention groups, 4

μL of CD-NS/PC solution (containing 5×10^5 single cells) was stereotactically injected using a 10- μL Hamilton syringe (Hamilton Company, Reno, NV, USA; 701RN; outer diameter 0.47 mm, inner diameter 0.13 mm); ie, 2 mm in depth from the contusion center on the brain surface produced by “cryo-injury” technique. In the control group, 4 μL of PBS was similarly administered. The injection was meticulously performed over 2 min to avoid unexpected solution loss or overflow. The mice underwent behavioral assessments using 2 modalities, namely the beam walking test and accelerating rotarod test, at postoperative days 3, 5, and 7, followed by weekly assessments until day 63. In addition, the mice were sacrificed at predetermined timings and subjected to immunohistochemical evaluation. An overview of the time course is presented in [Supplementary Fig. S1](#).

Bioluminescent Imaging to Monitor the Migration of CD-NS/PCs

In the first preliminary experiment, a Xenogen-IVIS 100 imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) was used for *in vivo* bioluminescent imaging (BLI), as described previously.^{25,26} Three mice anesthetized with isoflurane gas were intraperitoneally injected with 300 mg/kg of D-luciferin (VivoGlo Luciferin; Promega, Madison, WI, USA) and placed on a warmed stage inside the camera box of the IVIS imaging system coupled with a charge-coupled device camera. Images were quantified as photons per minute for CD-NS/PCs. To evaluate the migration activity of CD-NS/PCs, BLI was used to monitor CD-NS/PCs *in vivo*. TBI was made on the anterior-left side, as described above. Next, CD-NS/PCs were transplanted into the contralateral side (right striatum). Histological analysis was performed after sacrificing mice by decapitation on postoperative day 35. Images were quantified as photons per minute for CD-NS/PCs.

Determination of Blood-Brain Barrier Permeability

The second preliminary experiment comprised 8 mice, with 4 of them receiving CD-NS/PC transplantation into the brain contusion, while the other 4 underwent PBS injection as a control group. On postoperative days 7, 14, and 42, we injected 300 μL of 2% saline solution of Evans blue (Nacalai Tesque) into the caudal veins of mice before decapitation. After the circulation of dye for 2 h, mice were sacrificed and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA). Brain tissues were fixed with 4% PFA followed by soaking in 10% and 20% sucrose at 4 °C overnight. We macroscopically evaluated differences in blood-brain barrier permeability between control and intervention groups by the degree of Evans blue leakage. In addition, to provide a quantitative assessment, we calculated the area of Evans blue leakage in the photographs on postoperative days 14 and 42.

Beam Walking Test

The beam walk tests complex motor coordination. The beam apparatus (BT-18; Shin Factory, Fukuoka, Japan) consisted of a 90-cm beam with a flat surface fixed at 90 cm height, and a black box harboring a cage with nesting material at the end of the beam. The width of the beam tapered from 13 to 5 mm toward the end. To attract the mouse, a fan on the box wall blew air in the direction of the beam. The mouse was placed with its nasal apex 80 cm away from the goal, and its tail was released to allow movement. The time it took for the mouse to traverse the beam and reach the black box was

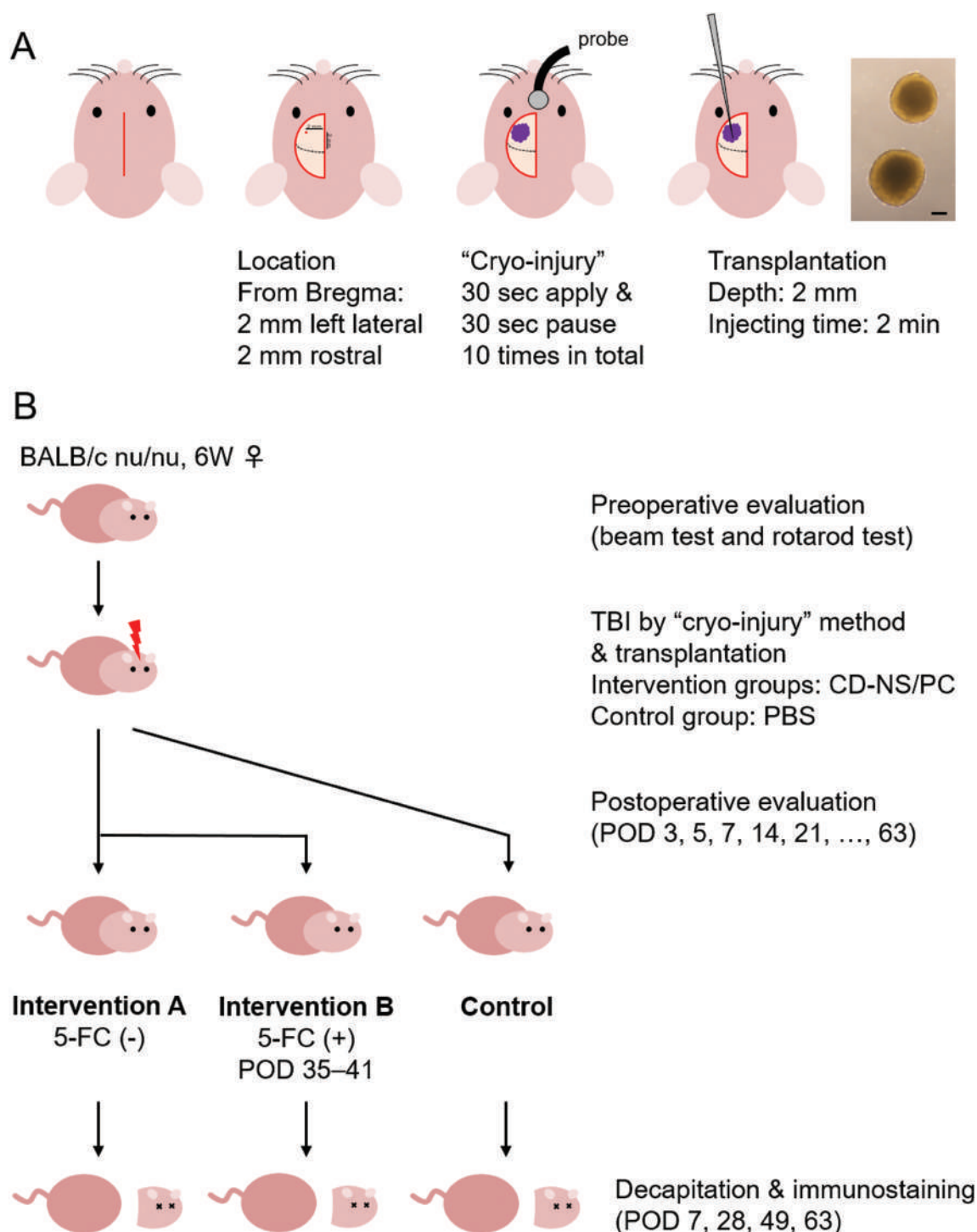


Figure 2. Schematic overview of the experiment (A) sequential illustrations showing overall surgical procedures of the TBI mouse model, including the information on skin incision, contusion location, "cryo-injury" method, and transplantation technique. A micrograph of transplanted NS/PCs is also presented. Scale bar, 200 μ m. (B) Schema of the experimental time course, including the timing of behavioral evaluation and decapitation. Note that 5-FC was consecutively administered from postoperative days 35 to 48 in intervention group B. POD, postoperative day.

recorded. Prior to the initial assessment before surgery, mice were subjected to training twice.

Accelerating Rotarod Test

The rotarod unit (Acceler Rota-Rod for Mice 7650; Ugo Basile SRL, Gemonio, Italy) was equipped with a 3.0-cm diameter rotating rod and 5 separated compartments to accommodate

mice. Initially, the rod was rotating at 2 rpm. Subsequently, the speed was automatically increased at a constant rate from 2 to 30 rpm over 300 s. The time was recorded when the mouse fell off, or its nasal apex came below the rotating axis. In the same way as the beam walking test, mice practiced the preoperative accelerating rotarod test twice before the baseline assessment.

Immunohistochemical and Cytochemical Analysis

Brain tissue was formalin-fixed and paraffin-embedded, and standard immunohistochemical and cytochemical procedures were carried out. For immunohistochemistry, paraffin-embedded tissue sections (3 μm thick) were initially fluorescently stained with an anti-STEM121 antibody (1:500, mouse IgG; Takara, Kusatsu, Japan; Y40410) or anti-STEM101 antibody (1:100, mouse IgG; Takara; Y40400). Double staining was then performed using one of the following antibodies: anti-GFAP (1:200, rabbit IgG; Abcam, Cambridge, UK; ab33922), anti-NeuN (1:200, mouse IgG; Chemicon; MAB377), anti-Olig2 (1:200, rabbit IgG; Immuno-Biological Laboratories, Fujioka, Japan; 18953), anti-Nestin (1:200, mouse IgG; Chemicon; MAB5326), anti-Nestin (1:100, mouse IgG1; Thermo Fisher Scientific; MA1-110), and anti-Ki67 (1:500, rabbit IgG; Novocastra; NCL-Ki67p). Finally, the third staining was conducted with an anti-cleaved caspase 3 antibody (1:200, rabbit IgG; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 9661). After staining the nuclei of each section with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), samples were mounted with ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific). Specimens were examined with an All-In-One Fluorescence Microscope (BZ-9000 Bioevo; Keyence, Osaka, Japan) and a confocal laser scanning microscope (FV3000; Olympus, Tokyo, Japan). The former was utilized to capture comprehensive images at low magnification, while the latter was employed to visualize the merging of fluorescent dyes at high magnification. The proportion of STEM121-positive cells exhibiting dye merge with each marker (NeuN, GFAP, Olig2, and Nestin) in tissue sections was evaluated by quantifying cell counts. The percentage of STEM101-positive cells showing Ki67 positivity was also assessed. Moreover, to evaluate brain atrophy, the area of the left lateral ventricle (square μm) was measured on a histological cross-section containing the contusion center, as well as the area of the non-injured right lateral ventricle.

Statistical Analysis

To assess differences in behavioral performance between the experimental groups, Student's *t*-test was performed for times (seconds) recorded in beam walking and accelerating rotarod tests during each evaluation. Additionally, the quantified area manifesting Evans blue extravasation, positive rates for dye merge observed in histological investigation, and the microscopically measured area of bilateral lateral ventricles were also subjected to *t*-test. All analyses were conducted with statistical software (Statcel 3; OMS Publishing, Tokyo, Japan; GraphPad Prism version 8; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and independently repeated twice.

Results

Establishment of CD-NS/PCs

The suicide gene (yCD-UPRT) was successfully transduced into the *ACTB* locus of hiPSCs. The Sanger sequencing results verifying successful incorporation of transgene is depicted in [Supplementary Fig. S2A](#). The viability of NS/PCs derived from these genetically modified iPSCs declined in response to elevated 5-FC concentration ([Fig. 1C](#)). Expression of yCD-UPRT gene was maintained after differentiation from iPSCs to NS/PCs and neurons ([Fig. 1D](#)). Most neurotrophic factor

genes showed no significant difference in expression between NS/PCs and CD-NS/PCs ([Supplementary Fig. S2B](#)). In vitro analysis demonstrated that the absence of 5-FC resulted in the persistence of Ki67-positive proliferative cells, while they were not observed in the presence of 5-FC ([Fig. 1E](#)). Notably, the differentiated neurons with beta III tubulin positivity were not affected by 5-FU.

Analysis of Migration

We observed that CD-NS/PCs, if transplanted into the contralateral side (right) of the injury site (left), migrated towards the injury site from day 14 ([Supplementary Fig. S3A](#)). Immunohistochemical staining of STEM121, reacting specifically with a cytoplasmic protein of transplanted human cells, detected graft-derived CD-NS/PCs on the corpus callosum and contralateral injury site ([Supplementary Fig. S3B](#)).

Macroscopic Evaluation of TBI

The effect of TBI induced by the “cryo-injury” method was observed to reach as deep as the external capsule on serial cross-section. Additionally, disruption of the blood-brain barrier was macroscopically visualized by Evans blue, suggesting that the brain contusion was not only limited to the surface but extended to the deep white matter ([Fig. 3A](#)). In particular, the control group showed a tendency toward prolonged dye leakage, which was especially pronounced on postoperative day 14 ([Fig. 3B](#)). On quantitative evaluation, a trend toward smaller area of Evans blue leakage was also noted in the intervention group on postoperative days 14 and 42, although statistical significance was not observed ($P = .07$ and $.23$, respectively) ([Fig. 3C](#)).

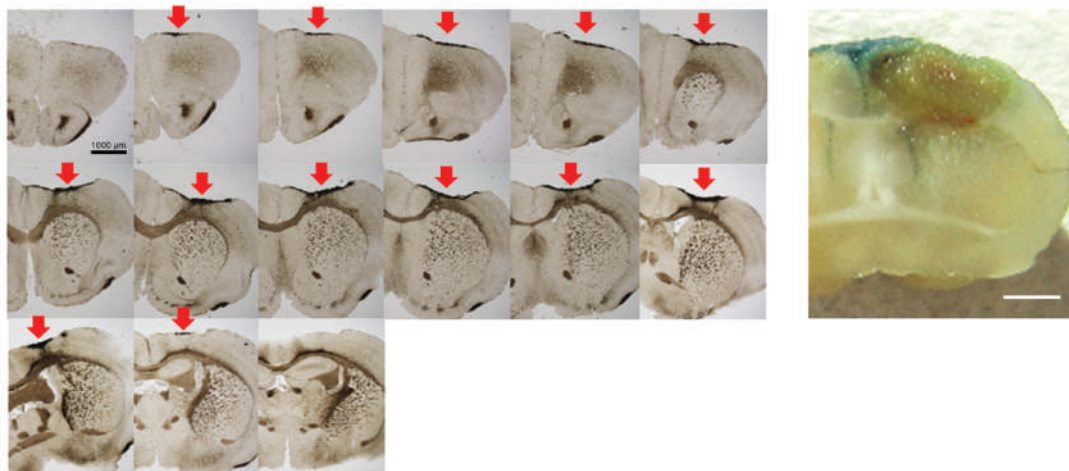
Behavioral Assessment

Beam walking test results were better (ie, recorded times were shorter) for intervention group B (NS/PCs plus 5-FC) compared with the control group over the entire observation period ([Fig. 4A](#)). In particular, significant differences were observed in postoperative days 3, 5, 49, and 63 ($P = .02$, $.01$, $.04$, and $.002$, respectively). Almost the same tendency was noted for intervention group A. Accelerating rotarod test performance also tended to improve (ie, recorded times became longer) in the intervention groups as TBI entered the chronic phase, with significant differences at some time points ([Fig. 4B](#)). Importantly, no significant differences were observed between intervention groups A and B for the rotarod test. It should be noted that one specific mouse belonging to intervention group A rarely scored less than 10 seconds in the beam walking test (including preoperative training), meaning its recorded time always exceeded the average of the same group. Data from this mouse were excluded from the analysis of the beam walking test.

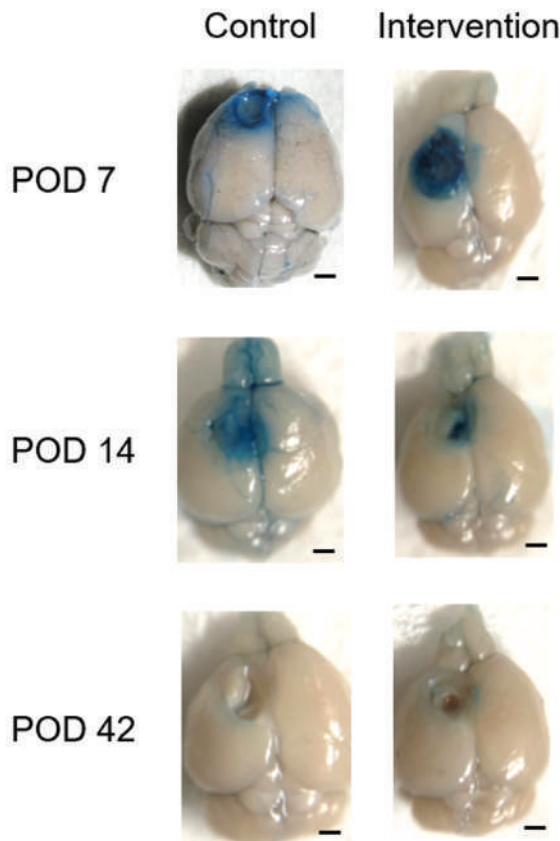
Histological Investigation

Microscopically, a small number of NS/PCs reached the contusion site on postoperative day 7. A large number of NS/PCs were observed migrating to the lesion on day 63 ([Fig. 5A](#)). Multiple fluorescent staining performed on day 63 revealed that STEM121-positive NS/PCs had the strongest overlap with NeuN ([Fig. 5B](#)), while only a few overlapped with GFAP. No NS/PCs positive for Olig2 and STEM121 staining were observed. This finding was quantified by cell counting ([Fig. 5C](#)). Around 80% of cells exhibited merge of NeuN and STEM121, whereas, for GFAP and

A



B



C

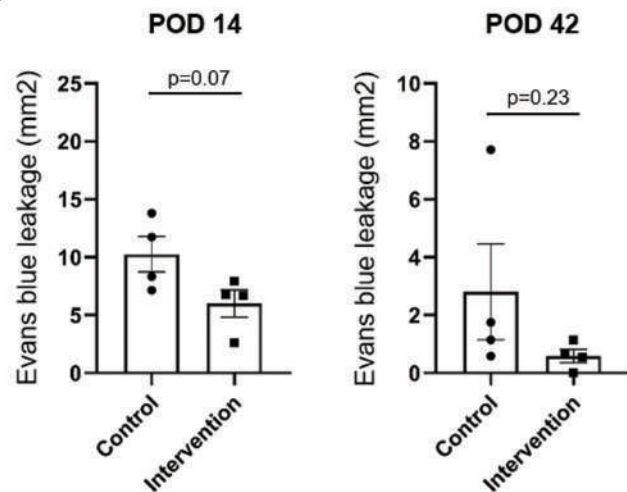


Figure 3. The effect of TBI by “cryo-injury” method (**A**) TBI induced by the “cryo-injury” method was observed on cross-sectional 3,3'-diaminobenzidine staining (left). Arrows indicate the contusion area on the brain surface. At the same time, blood-brain barrier disruption was visualized by intravenous Evans blue (right). Note the deep extension of the contusion. Scale bar, 1000 μ m. (**B**) Macroscopic visualization of blood-brain barrier disruption by Evans blue leakage over time. Mice were injected with Evans blue through the caudal vein 2 hours before decapitation. Prolonged dye leakage was observed in the control group. Scale bar, 1000 μ m. POD, postoperative day. (**C**) Quantitative assessment of Evans blue extravasation. The extent of dye leakage was comparably lesser in the intervention group on postoperative days 14 and 42.

Olig2, the co-localization was detected in 17% and 0% of cells, respectively. Furthermore, histology on postoperative day 63 demonstrated that 14% of cells in intervention group A (without 5-FC) proved to be Nestin positive (ie,

undifferentiated), while such cells were absent in intervention group B (with 5-FC) (Fig. 6A, 6B). Additionally, Ki67-positive cells persisted in the non-5-FC-treated group (13%), whereas they were not detected in the 5-FC-treated group,

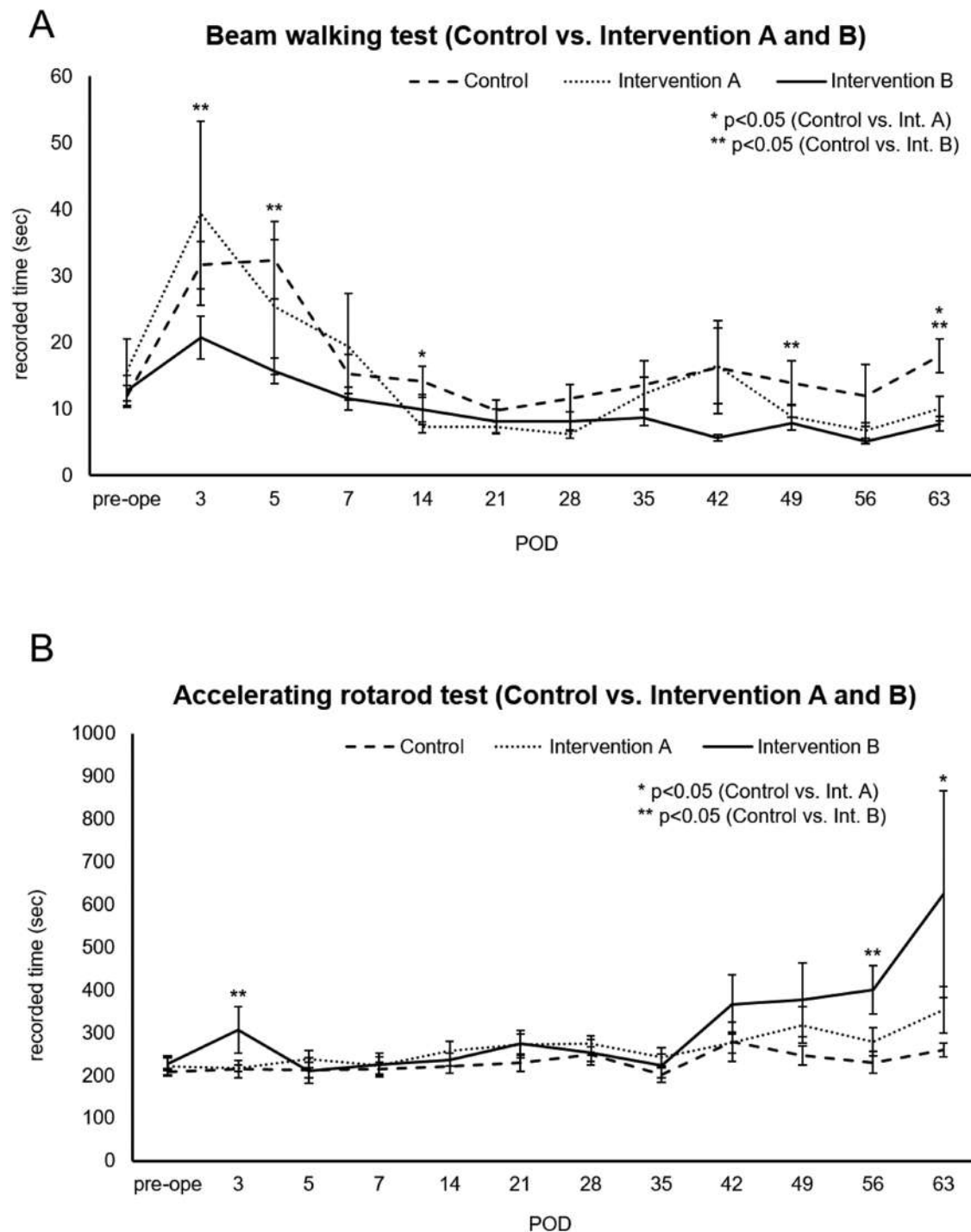


Figure 4. Results of behavioral assessment with each modality **(A)** Graph comparing beam walking test performance (mean seconds) over time for control and intervention groups. **(B)** Graph comparing accelerating rotarod test performance (mean seconds) over time for control and intervention groups. Asterisks and double asterisks indicate the time point when a significant difference was observed between the 2 groups (control and intervention A or control and intervention B, respectively). POD, postoperative day.

suggesting that proliferative STEM121 or STEM101-positive cells disappeared in the presence of 5-FC (Fig. 6C, 6D). These differences in cell counts were found to be statistically significant at a P -value of $< .01$ for all groups.

Evaluating the effect of NS/PC transplantation revealed extensive loss of the original NeuN-positive neurons around the contusion site on postoperative day 63 in the control (non-transplanted) group, while these cells appeared to be spared

in intervention group A (Fig. 7A). Additionally, the cross-sectional measured area of the left lateral ventricle was significantly more prominent in the control group compared with both intervention groups (Fig. 7B). In contrast, the area of the right lateral ventricle (non-injured side) exhibited no significant differences between the two experimental cohorts. The average area was smaller in comparison to that on the injured side.

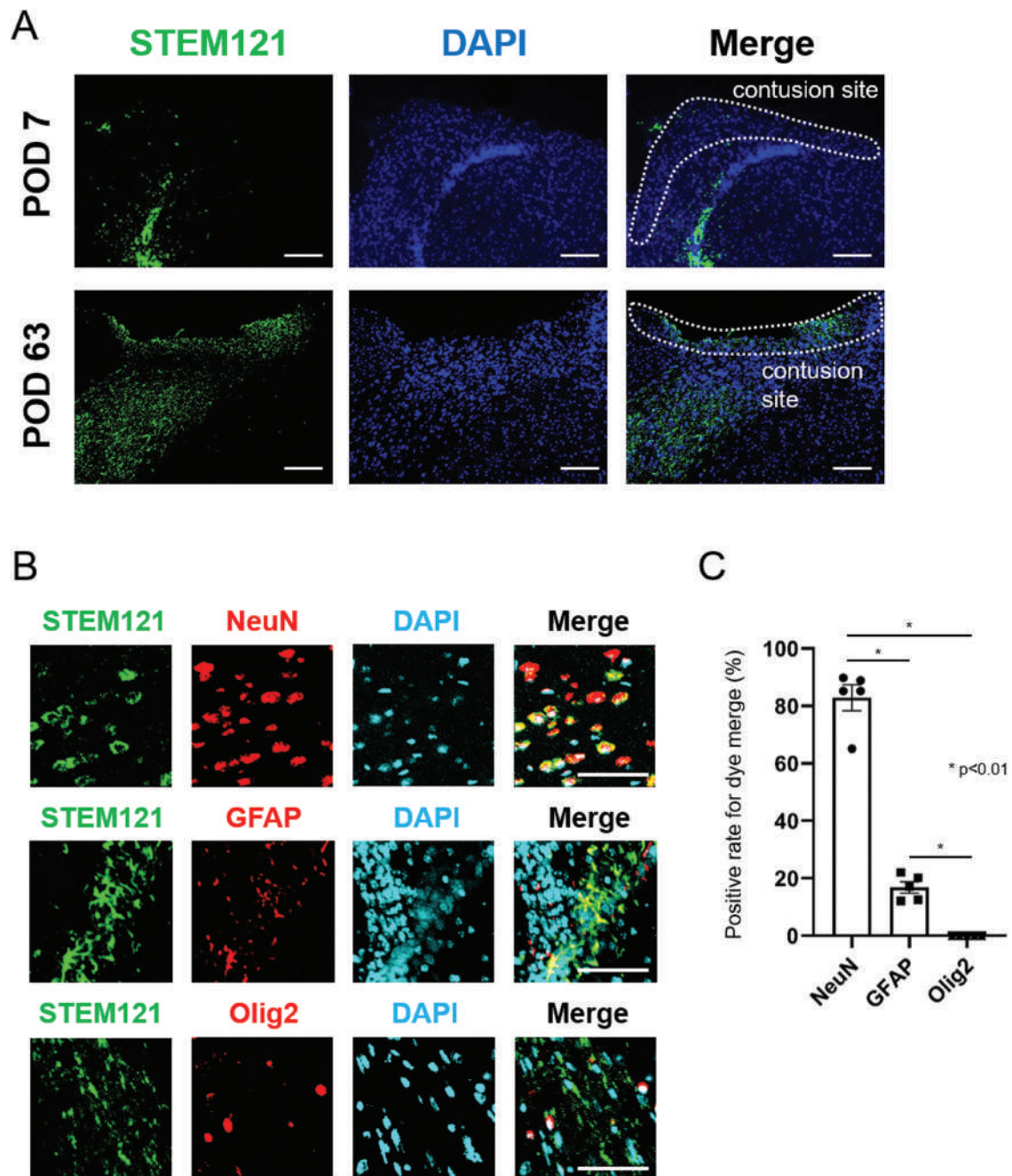


Figure 5. Histopathological findings after transplantation of CD-NS/PCs multiple fluorescent staining of brains transplanted with NS/PCs (intervention group A). STEM121 is labeled in green; DAPI in blue; and NeuN, GFAP and Olig2 are in red. **(A)** Migration of STEM121-positive NS/PCs to the contusion site over 9 weeks after injury. Scale bar, 100 μ m. **(B)** Magnified images of the contusion site. STEM121-positive NS/PCs displayed the most robust dye merge with NeuN (83%), whereas only a few merged with GFAP or Olig2 (17% or 0%, respectively). Scale bar, 50 μ m. **(C)** Positive rate for co-localization of STEM121 with NeuN, GFAP or Olig2.

Discussion

The present study demonstrated the migration of NS/PCs to the brain contusion site in vivo and successful differentiation into neurons during the chronic phase. In addition, significant functional improvements in motor skills and prevention of brain atrophy were noted in mice transplanted with NS/PCs. Furthermore, 5-FC administration resulted in the complete disappearance of undifferentiated NS/PCs, whereas differentiated and viable transplanted cells were preserved. These findings suggest that genome-edited

hiPSC-derived NS/PCs can overcome the general concern of tumorigenesis and show promise for safe regenerative medicine.

Transduction via lentiviral vectors integrates randomly into the host genome, raising concerns about insertional mutagenesis and oncogene activation. Transgene silencing is frequently observed in hiPSCs. Furthermore, stable constitutive expression of therapeutic genes in hiPSCs is difficult using viral vectors.^{16,17} To address this problem, the yCD-UPRT gene was inserted into the *ACTB* housekeeping gene locus via

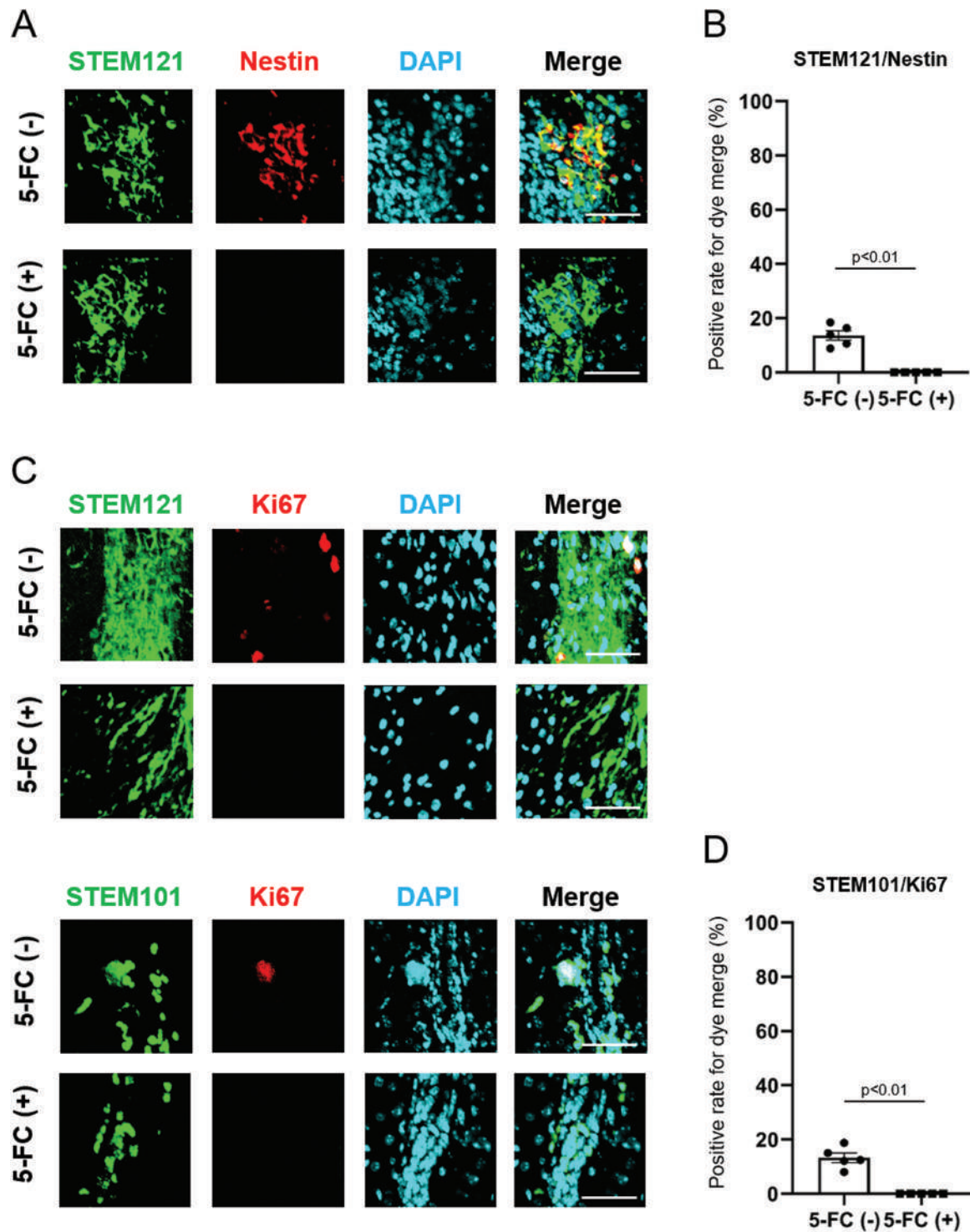


Figure 6. The effect of 5-FC administration on transplanted CD-NS/PCs comparison between intervention groups A (without 5-FC) and B (with 5-FC) on postoperative day 63. STEM121 or STEM101 is labeled in green; DAPI in blue; and Nestin or Ki67 in red. **(A)** Undifferentiated Nestin-positive cells remained in small numbers in intervention group A (14%), while such cells were not observed in intervention group B. Scale bar, 50 μ m. **(B)** Positive rate for colocalization of STEM121 with Nestin. **(C)** For both STEM121 and STEM101, cells with Ki67 positivity remained in intervention group A (13%), while they were not detected in intervention group B. Scale bar, 50 μ m. **(D)** Positive rate for dye merge of STEM101 and Ki67.

CRISPR/Cas9 to achieve stable and constant expression of yCD-UPRT in hiPSCs.¹⁸

We assume that the initial neuroprotective effects against TBI observed in this study are associated with the secretion of various neurotrophic factors from NS/PCs during the acute phase. Reanalysis of published RNA-seq data

indicated that gene integration into the *ACTB* locus does not affect the gene expression of most neurotrophic factors. Importantly, we discovered that there is no substantial disparity in gene expression between genetically modified and non-genetically modified iPSC-derived NS/PCs. However, it remains a topic for future investigation to ascertain which

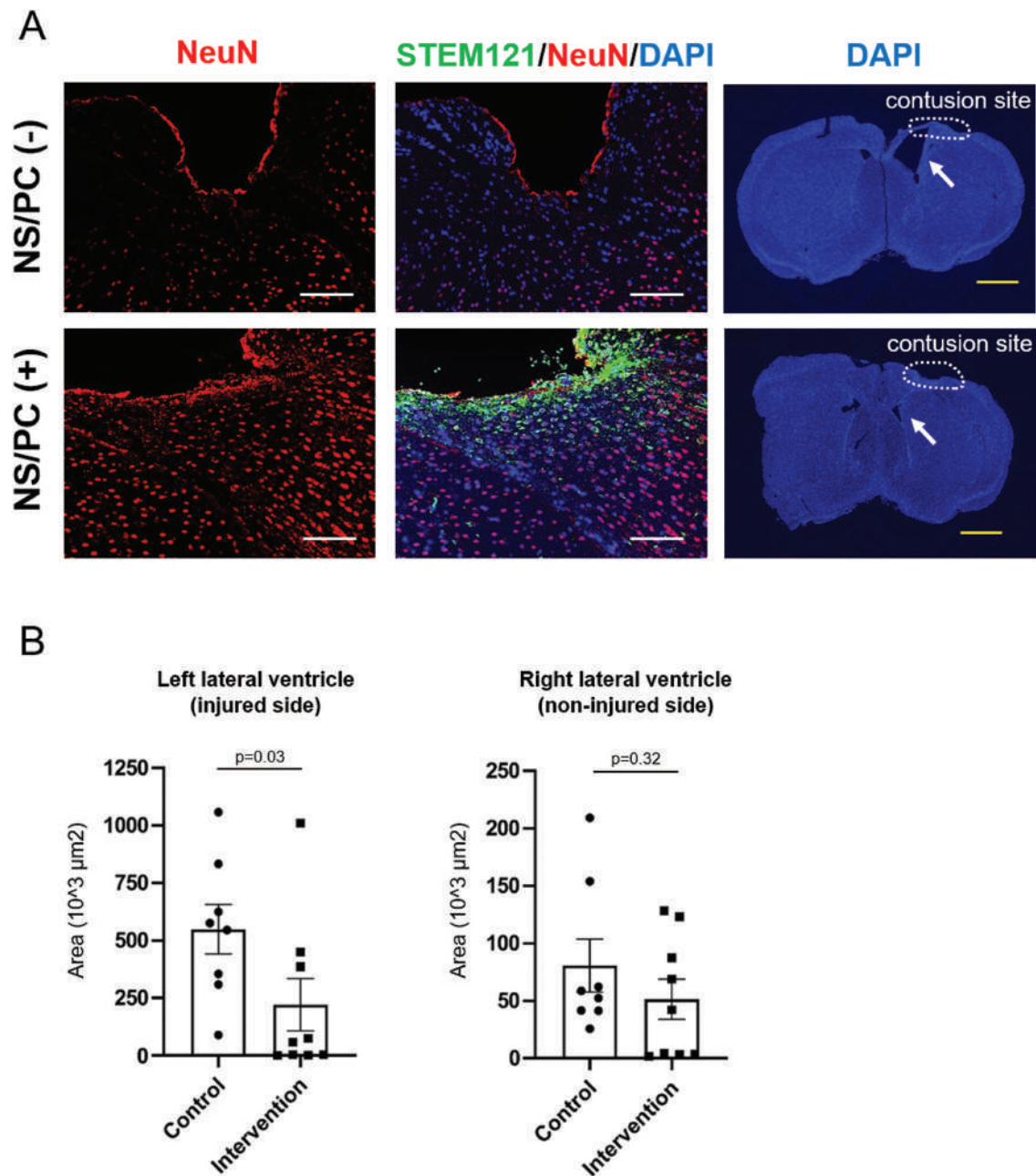


Figure 7. Prevention of cerebral atrophy and lateral ventricle enlargement after TBI. Multiple fluorescent staining of brains transplanted with NS/PCs. STEM121 is labeled in green, DAPI in blue, and NeuN in red. **(A)** Comparison between the control group (without NS/PC transplantation, upper row) and intervention group A (with NS/PC transplantation, lower row) on day 63. Extensive loss of NeuN-positive neurons around the contusion site in the control group is shown. Note that STEM121-positive NS/PCs aggregate near the contusion site in intervention group A. Left lateral ventricle (arrows) was comparably enlarged without NS/PC transplantation. White scale bar, 100 μm ; yellow scale bar, 1000 μm . **(B)** The cross-sectional measured area of the left or right lateral ventricle on postoperative day 63. The control group had significantly larger left ventricular areas than both intervention groups, whereas no significant difference was observed for the right lateral ventricle (non-injured side).

factors are actually present and exerting the most significant impact.

During the chronic phase, NS/PCs have the potential to provide neuroprotection and reconstruct neural networks. Interestingly, ipsilateral ventriculomegaly was significantly less evident in the intervention groups compared with the control group. In a previous study using MSCs, hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage was reportedly prevented due to the anti-inflammatory effects of MSCs, rather than their regenerative capabilities.²⁷ However, NS/PCs completing migration during the chronic phase were viable as

neurons to suppress brain atrophy—a regenerative effect that is expected to improve higher brain function.

Most importantly, the safety of our treatment strategy was demonstrated. After 5-FC administration, 5-fluorouracil (5-FU) converted from 5-FC by cytosine deaminase selectively eliminated redundant undifferentiated transplanted NS/PCs, preserving the adjacent neuronal structures. Indeed, no significant differences in behavioral assessments were noted between intervention groups with or without 5-FC administration. Transplanted NS/PCs terminally differentiated into NeuN-positive neurons in vivo and displayed no further proliferative

ability. Additionally, our initial in vitro investigations have demonstrated that the expression of yCD-UPRT is reduced in differentiated neurons, presumably resulting in decreased release of 5-FU. It has also been observed that the neurons are not affected by 5-FU, most likely due to their incapacity to proliferate.

Further work is needed to optimize the appropriate transplantation site and timing for this cell-based gene therapy. The injury site was the main stereotactic injection target in the present study. Wallenquist et al. reported higher survival rates of NS/PCs transplanted into the lateral ventricle.²⁸ Future studies should compare the effect of different transplantation sites. However, as indicated above, NS/PCs in this study were so migratory that subtle differences in the transplantation site might not be a significant problem. Besides the transplantation site, when to perform cell-based therapy is a considerable concern. In a spinal cord injury model, functional improvement by neural progenitor cell transplantation was more remarkable in the acute phase than in the subacute or chronic phases.²⁹ A phase III study in patients with chronic spinal cord injury also suggested that injection of MSCs into the intramedullary and subdural spaces resulted in a weak therapeutic effect in only two of 16 patients.³⁰ However, as discussed above, NS/PCs have the potential for both reconstruction of neural networks and neuroprotection. In future research, the effect of iPSC-derived NS/PC-mediated cell-based therapy should be examined for chronic TBI.

A major limitation to the engraftment of CD-NS/PCs is the lack of host innate immune responses in immunodeficient mice. TBI has been shown to induce immune-mediated inflammatory reactions that can last post-injury.³¹ The immune system plays a role in driving the secondary phase of tissue damage following TBI. The possible influence of NS/PCs on the immune system should also be mentioned. While findings from stroke studies have shown that transplanted NS/PCs can suppress T-cell responses and down-regulate inflammation,^{32,33} the effects of immunomodulation by transplanted cells can be either beneficial or deleterious, and not always advantageous.³⁴ It has been noted that the by-stander effect of transplanted cells may impact mature neurons, particularly in hosts with normal immune systems.³⁵ Therefore, while speculative due to the lack of data, it is possible that undifferentiated cells dying after 5-FU administration may induce an excessive immune response in hosts with normal immune systems, potentially leading to secondary brain damage that could counteract the neuroprotective effects of NS/PCs. The use of immunocompromised nude mice in this study remains a constraint. Further studies are warranted to evaluate this treatment strategy's effect on the microenvironment of TBI.

Conclusion

iPSC-derived NS/PC transplantation during the acute phase of TBI effectively improved motor function and prevented brain atrophy during the chronic phase. Furthermore, suicide gene transfer solved the concern for tumorigenesis of transplanted cells. Thus, genome-edited iPSC-derived NS/PCs can be applied as a safe regenerative medicine for TBI.

Acknowledgments

This manuscript is dedicated to late Dr Hiroyuki Miyoshi. We thank Professor Shinya Yamanaka at CiRA, Kyoto

University (Kyoto, Japan) for the supply of 1210B2 hiPSCs and Regenerative Medicine iPS Gateway Center (Tokyo, Japan) for the supply of human mesenchymal stem cells. We thank Edanz (<https://jp.edanz.com/ac>) for editing a draft of this manuscript.

Funding

This work was partly supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science (16K20026 to R.T., 17H04306 and 18K19622 to M.T.) and Japan Agency for Medical Research and Development (JP19am0401015 and JP18lm0203004 to M.T.).

Conflict of Interest

H.O. is a compensated scientific consultant of San Bio, Co., Ltd. and K Pharma Inc. and an inventor on patents related to genome-edited iPSCs. M.T. is a founding scientist of iXgene Inc. and an inventor of patents related to genome-edited iPSCs. The other authors declare no potential conflicts of interest.

Author Contributions

R.I.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing. R.T.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing. M.Y.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing. M.S.: assistance with mouse experiments, collection and assembly of data. M.F.: assistance with mouse experiments. K.T.: assistance with mouse experiments. Y.K.: assistance with discussion and review of manuscript. H.O.: assistance with discussion and review of manuscript. M.T.: conception and design, final approval of manuscript.

Data Availability

RNA-seq data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE150470. All other data in this article are available from the corresponding author upon reasonable request.

Supplementary Material

Supplementary material is available at *Stem Cells* online.

References

- Vella MA, Crandall ML, Patel MB. Acute management of traumatic brain injury. *Surg Clin North Am.* 2017;97(5):1015-1030. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.06.003>.
- Shah S, Kimberly WT. Today's approach to treating brain swelling in the neuro intensive care unit. *Semin Neurol.* 2016;36(6):502-507. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1592109>.
- Haus DL, López-Velázquez L, Gold EM, et al. Transplantation of human neural stem cells restores cognition in an immunodeficient rodent model of traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;281:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.008>.
- Kawabori M, Weintraub AH, Imai H, et al. Cell therapy for chronic TBI: interim analysis of the randomized controlled STEMTRA trial. *Neurology.* 2021;96(8):e1202-e1214. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011450>.

5. von Bahr L, Batsis I, Moll G, et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells*. 2012;30(7):1575-1578. <https://doi.org/10.1002/stem.1118>.
6. Kim SU, Jeung EB, Kim YB, Cho MH, Choi KC. Potential tumorigenic effect of genetically engineered stem cells expressing suicide enzymes to selectively target invasive cancer in animal models. *Anticancer Res*. 2011;31(4):1249-1258.
7. Muir KW, Bulters D, Willmot M, et al. Intracerebral implantation of human neural stem cells and motor recovery after stroke: multicentre prospective single-arm study (PISCES-2). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(4):396-401. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322515>.
8. Zhang G, Li Y, Reuss JL, et al. Stable intracerebral transplantation of neural stem cells for the treatment of paralysis due to ischemic stroke. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(10):999-1007. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0220>.
9. Okano H. Transplantation of neural progenitor cells into the human CNS. *Trends Mol Med*. 2022;28(11):897-899. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.09.009>.
10. Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16825-16830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108077108>.
11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
13. Imaizumi K, Sone T, Ibata K, et al. Controlling the regional identity of hPSC-derived neurons to uncover neuronal subtype specificity of neurological disease phenotypes. *Stem Cell Rep*. 2015;5(6):1010-1022. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.005>.
14. Tamura R, Miyoshi H, Yoshida K, Okano H, Toda M. Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma. *Neurosurg Rev*. 2021;44(1):29-49. <https://doi.org/10.1007/s10143-019-01203-3>.
15. Tamura R, Miyoshi H, Morimoto Y, et al. Gene therapy using neural stem/progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells: visualization of migration and bystander killing effect. *Hum Gene Ther*. 2020;31(5-6):352-366. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.326>.
16. Ackermann M, Lachmann N, Hartung S, et al. Promoter and lineage independent anti-silencing activity of the A2 ubiquitous chromatin opening element for optimized human pluripotent stem cell-based gene therapy. *Biomaterials*. 2014;35(5):1531-1542. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.024>.
17. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*. 2005;16(11):1241-1246. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1241>.
18. Tamura R, Miyoshi H, Imaizumi K, et al. Gene therapy using genome-edited iPS cells for targeting malignant glioma. *Bioeng Transl Med*. 2022:e10406. <https://doi.org/10.1002/btm2.10406>.
19. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2014;4:3594. <https://doi.org/10.1038/srep03594>.
20. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
21. Nagai T, Ibata K, Park ES, et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*. 2002;20(1):87-90. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>.
22. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17(1):10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
23. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017;14(4):417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.
24. Tabuse M, Yaguchi M, Ohta S, Kawase T, Toda M. A simple behavioral test for locomotor function after brain injury in mice. *J Clin Neurosci*. 2010;17(11):1412-1416. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.01.056>.
25. Okada S, Ishii K, Yamane J, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J*. 2005;19(13):1839-1841. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4082fje>.
26. Ago K, Nagoshi N, Imaizumi K, et al. A non-invasive system to monitor in vivo neural graft activity after spinal cord injury. *Commun Biol*. 2022;5(1):803. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03736-8>.
27. Ahn SY, Chang YS, Sung DK, et al. Mesenchymal stem cells prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(2):497-504. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.679092>.
28. Wallenquist U, Brännvall K, Clausen F, et al. Grafted neural progenitors migrate and form neurons after experimental traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2009;27(4):323-334. <https://doi.org/10.3233/RNN-2009-0481>.
29. Liu Y, Zhou Y, Zhang C, et al. Optimal time for subarachnoid transplantation of neural progenitor cells in the treatment of contusive spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2013;8(5):389-396. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.05.001>.
30. Oh SK, Choi KH, Yoo JY, et al. A phase III clinical trial showing limited efficacy of autologous mesenchymal stem cell therapy for spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2016;78(3):436-47; discussion 447. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000001056>.
31. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2011;70(3):374-383. <https://doi.org/10.1002/ana.22455>.
32. Ben-Hur T. Immunomodulation by neural stem cells. *J Neurol Sci*. 2008;265(1-2):102-104. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.05.007>.
33. Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, et al. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation. *Brain*. 2009;132(Pt 8):2239-2251. <https://doi.org/10.1093/brain/awp174>.
34. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>.
35. Kojima K, Miyoshi H, Nagoshi N, et al. Selective ablation of tumorigenic cells following human induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cell transplantation in spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(3):260-270. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0096>.