

令和元年8月30日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10366

研究課題名(和文) 神経分化制御ペプチドによるMuse細胞の神経分化誘導と神経再生医療への応用

研究課題名(英文) Neuronal differentiation of MUSE cells mediated by neuronal differentiation control peptides and application to neuronal regeneration medicine

研究代表者

菅野 洋 (Kanno, Hiroshi)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40244496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MUSE細胞をラット皮膚由来前駆細胞よりMACS法にて分離後、神経分化誘導活性のある11種類のBC-box蛋白由来の機能性ペプチドであるBC-boxモチーフペプチドを細胞内へ導入し、神経特異蛋白の発現を解析した。11種類の機能性ペプチドは、分化誘導するニューロンのタイプがそれぞれ異なっていた。BC-boxモチーフペプチドによる神経分化誘導メカニズムは、これらのペプチドがMUSE細胞へ導入されるとelongin Cと細胞内で結合し、その直後にJAK2をユビキチン化後分解し、更にSTAT3の阻害を解明し、このVHL-JAK/STATの転写経路がMUSE細胞の神経分化経路であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MUSE細胞は多能性組織幹細胞であり、iPS細胞と同様な多分化能を有するが、iPS細胞のような癌形成能はなく安全であり、再生医療のドナー細胞として期待される。MUSE細胞は無処理のまま静脈内へ投与しても組織を修復する機能を有するが、目的の細胞へ分化誘導後に投与した方が効率よく組織を修復する。ここではBCボックスモチーフ由来の神経分化誘導ペプチドを用いて、MUSE細胞から種々の神経細胞へ分化させる方法を提示し、かつ神経分化転写経路の一部を解明することに成功した。このことは、他の幹細胞にも応用ができる可能性が高く、幹細胞を用いた神経再生医療を改良を加えた点で社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：MUSE cells were sorted from skin-derived precursors with the MACS method. Neuronal differentiation of MUSE cells was induced by intracellular delivery of a VHL peptide composed of the BC-box motif [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)] corresponding to binding site of elongin BC. Neuronal differentiation mediated by the NDD was caused by the binding between it and elongin C followed by JAK2 ubiquitination of JAK2 and inhibition of the JAK2/STAT3 pathway. Then, we showed that different NDD peptide-delivered cells differentiated into different kinds of neuron-like cells. That is, dopaminergic neuron-like cells, cholinergic neuron-like cells, GABAergic neuron-like cells or rhodopsin-positive neuron-like cells were induced by different NDD peptides. These novel findings might contribute to the development of a new method for promoting neuronal differentiation and shed further light on the mechanism of neuronal differentiation of somatic stem cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：MUSE細胞 幹細胞 神経分化誘導 BCボックスモチーフ 再生医療

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

1. 研究開始当初の背景

BC-box motif は elongin BC に結合するアミノ酸配列 [(A,P,S,T)LXXX(A,C)XXX(A,I,L,V)] であり、そのモチーフを有する蛋白は BC ボックス蛋白と呼ばれる。BC ボックス蛋白は、転写因子 Stat の制御が主な機能であり、SOCS-box 蛋白群、ASB-box 蛋白群、WSB-box 蛋白群、VHL-box 蛋白群などに属する数 10 種類の蛋白が知られている。当該研究代表者は 2000 年に BC ボックス蛋白の一種である von Hippel-Lindau 腫瘍抑制蛋白(VHL 蛋白)が、神経幹細胞を神経細胞へ分化誘導することを見出し (Cancer Res, 2000)、その後 VHL 遺伝子を導入して神経幹細胞から神経細胞へ分化誘導した細胞をパーキンソン病モデルラットの線条体へ移植すると、モデル動物の症状が改善し、移植細胞の多くは生着して、ドーパミンニューロンへ分化することを明らかにした(Ann Neurol, 2003)。更に 2009 年には、VHL 蛋白の中で、神経分化に関わるドメインが、BC-box motif を含む 15 個のアミノ酸配列であり、このアミノ酸配列からなるペプチド(VHL ペプチド)を化学合成して神経幹細胞の細胞内へ導入すると神経細胞へ分化することを明らかにし(Prot Pept Lett, 2009)、更に VHL ペプチドに蛋白導入ドメイン(PTD)ペプチドを結合して、細胞内へ導入すると神経前駆/幹細胞 (Neuroreport, 2009)だけでなく、ラット皮膚由来前駆細胞 (Stem Cell Dev, 2009; J Neurosurg 2010)、ラット骨髄間葉系幹細胞(Neuroreport, 2010)、ヒト毛嚢幹細胞 (Int J Mol Science, 2013)などの体性幹細胞が神経細胞へ分化することを明らかにし、これらの VHL ペプチドを導入した様々な体性幹細胞を神経疾患(パーキンソン病、脊髄損傷)モデル動物の脳・脊髄に移植すると、その多くは脳・脊髄内に生着し、神経特異的マーカー陽性の細胞に分化していることを明らかとした(Stem Cell Dev 2009; J Neurosurgery 2010; Neuroreport 2010)。また、皮膚由来幹細胞に VHL ペプチドを導入した細胞は、移植したパーキンソン病モデルラットの脳内でドーパミンを分泌していることが示された(J Neurosurg 2010)。こうして体性幹細胞から VHL 遺伝子や VHL ペプチドにより分化誘導された神経細胞を脳・脊髄に移植することで、脳・脊髄が再生する可能性を示してきた。更に、数 10 種類ある BC ボックス蛋白の BC-box motif のアミノ酸配列はそれぞれ異なっているが、最近、異なるアミノ酸配列からなるペプチド(神経分化制御ペプチド)を体性幹細胞へ導入すると分化誘導される神経細胞の種類が異なることが明らかになった。これまで判明しているところでは、VHL 由来の神経分化制御ペプチドは、TH 陽性のドーパミンニューロンを分化誘導することを報告したが(Stem Cell Dev, 2009)、その他では、SOCS7 と SOCS4 由来の神経分化制御ペプチドは、ChAT 陽性の運動ニューロンを分化誘導し、SOCS5 はロドプシン陽性の網膜色素細胞を、SOCS6 あるいは ASB3 由来の神経分化制御ペプチド導入により体性幹細胞から GABA ニューロンへ分化誘導されることを見出し、SOCS2, SOCS6 はグルタミン酸受容体陽性細胞へ分化誘導することが判明している。体性幹細胞のうちで多能性幹細胞である Muse 細胞は iPS 細胞と同様にあらゆる臓器の細胞に分化できるだけでなく、確立された方法により容易に自己の組織から単離でき、大量に培養することが可能である。また、体性幹細胞から神経細胞への分化誘導法は様々報告されているが、最短でも 1~2 週間程度要するのに対し、神経分化制御ペプチドを用いた分化誘導法によれば、極めて短時間で行うことが可能であり、生体内でも可能である。神経分化制御ペプチドによる神経分化誘導は、elongin C との結合に始まりアストサイトへの分化に関わる Stat3 の発現抑制から始まることが判明しているが(論文投稿中)、その反応の構造生物学的解析はなされていない。また様々なアミノ酸配列の神経分化制御ペプチドにより特定のニューロンが分化誘導されるメ

カニズムはいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用を視野に入れて体性幹細胞として多能性幹細胞である Muse 細胞を皮膚線維芽細胞あるいは骨髄間質細胞から分離し、様々な神経分化制御ペプチドを導入して、種々の神経細胞マーカー陽性の神経細胞へ分化誘導し、神経分化制御ペプチド導入によって特定の神経細胞へ分化するメカニズムについて明らかにすることを目的とする。この経路において神経分化制御ペプチドが細胞内に導入直後に elongin C と結合する際の蛋白の立体的な相互関係を明らかにし、ペプチド医薬が低分子医薬の創薬標的であるかどうか検討して、可能であれば創薬へ結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Muse 細胞の分離 と培養

連携研究者である出澤真理らの報告した真の多能性間葉系幹細胞である Muse 細胞をヒト皮膚線維芽細胞(タカラバイオ社)またはヒト骨髄間質細胞(東洋紡社)から分離し、培養する。MUSE 細胞の分離・培養方法は、出澤らの方法(Pro Natl Acad Sci, 2011)に準じて行い、多能性幹細胞のマーカーである抗 SSEA-3 抗体を用いて細胞分離装置(ミルテニー社 AutoMACS)により分離し、培養する。

(2) 神経分化制御ペプチド合成

以下の BC-box motif を含む配列のペプチド(神経分化制御ペプチド)を蛋白導入ドメイン HIV-TAT (YARAAARQARA)を結合させて、ペプチド合成装置にて固相法にて合成する(下線は BC-box motif)(これはペプチドを合成する会社に委託する)。

SOCS-box family

SOCS1 PLQELCRQRIVAAVG, SOCS2 TLQHFCRLAINKCT, SOCS3 TLQHLCRKTVNGHLD
SOCS4 SLQHICRTVICNCTT, SOCS5 SLQYICRAVICRCTT, SOCS6 SLQYLRCFVIRQYTR
SOCS7 SLQHLCRFRIRQLVR, ASB1 TLLSLCRVAVRRALG, ASB2 PLAHLRRLRVRKAIG,
ASB3 SLTHLCRLEIRSSIK, WSB1 SLQHICRMSIRRVMS, WSB2 SLKHLRKRKALRSFLT
RAR1 SLQDLCCRAVVSTP, SSB1 PLMDLCRRSVRLALG

VHL-box family VHL TLKERCLQVVRSLVK, hLRR-1 TLLESSARTILHNRI

(3) 神経分化制御ペプチドによる体性幹細胞の神経分化誘導

上記の方法で化学合成された各種神経分化制御ペプチドは、浮遊性のニューロスフェア状に塊を形成している Muse 細胞では pippinging または trypsin-EDTA 等で単細胞化してから、また骨髄間葉系幹細胞や脂肪組織由来間葉系幹細胞のように接着している細胞では trypsin-EDTA 等で細胞を剥離してから、growth factor を除いた培地中に 1~5 μ M の濃度で添加する。ペプチドにて分化誘導する場合は、培地中から growth factor は除いて、原則として無血清の DMEM/F12 のみの培地を用いる。BC-box motif ペプチドには蛋白導入ドメイン(PTD)が結合されており、約 30 分で細胞の核まで入り、神経分化は添加 2 時間後から始まるが、添加 24 時間以降の細胞について神経分化を形態学的、免疫化学的に検討した。

(4) BC-box motif ペプチド導入による神経分化誘導機構の解明

生体分子相互作用の定量的研究に幅広く使われる技術である等温滴定型カロリメトリー (ITC) により、BC-box motif ペプチドと elonginC の分子間で結合が起きた際に生じる発熱または吸熱を測定することにより、BC-box motif ペプチド (ここでは BC-box motif ペプチドの一つである VHL ペプチド) と elongin C との親和性を測定。結合中の熱変化を測定することで、解離定数 (K_D)、結合比 (n)、エンタルピー変化 (ΔH) およびエントロピー変化 (ΔS) を特定し、分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを得た。

(5) BC-box motif ペプチドの神経分化機構とユビキチン/プロテアソーム系との関係解明

BC-box motif ペプチドを導入した多能性体性幹細胞内で引き起こされる反応を検討した結果、すべての BC-box motif ペプチドでまず最初に elongin BC と結合し複合体を形成し、これがユビキチンリガーゼとして機能して、JAK2 をユビキチン化後、プロテアソームにて分解し、更に、STAT3 の発現の阻害を引き起こすことが過程を、免疫沈降法およびウエスタンブロット法により解析した。これはすなわち、グリア細胞への分化を促す Stat3 の発現阻害によって多能性間葉系幹細胞である MUSE 細胞から神経細胞への分化が起こっていると考えられ、それを裏付けるように STAT3 siRNA を多能性体性幹細胞に導入したところ、神経分化が誘導されるかと検討した。

(6) 種々の BC-box motif ペプチドにより分化誘導される特異的なニューロンとの関係解明

種々の異なる BC-box motif ペプチドによりどのようにして異なるニューロンが分化誘導されるか、クロマチン免疫沈降(ChIP) アッセイマイクロアレイで網羅的に解析した。具体的には、VHL 由来の BC-box motif と dopamine transporter (DAT) および tyrosine hydroxylase (TH) のプロモーターとの関係、また SOCS7 ないし SOCS4 由来の BC-box motif と Choline Acetyltransferase (ChAT) のプロモーターとの関係、VHL 由来の BC-box motif と Rhodopin のプロモーターとの関係、SOCS6 および ASB3 の BC-box motif と GABA transporter のプロモーターとの関係に関してクロマチン免疫沈降(ChIP) アッセイマイクロアレイで調べた。

4. 研究成果

多能性組織幹細胞のうち、神経細胞へ分化可能な細胞は、神経幹細胞、間葉系組織幹細胞などである。本研究では、多能性組織幹細胞として、既に単離後樹立したラット皮膚由来間葉系幹細胞から MUSE 細胞を MACS 法にて分離後、その細胞を用いて研究した。MUSE 細胞分離に関しては、研究協力者である出澤らの報告した分離方法に準じて行った (Nat Protoc 8(7): 1391-415, 2013)。ラット皮膚由来間葉系幹細胞由来の MUSE 細胞を用いて、これらの細胞に神経分化誘導活性のある 11 種類の BC ボックス蛋白由来の機能性ペプチド (SOCS1-7, ASB3, WSB2, LRR1, VHL 由来) を細胞内へ導入し、神経特異蛋白の発現を蛍光免疫細胞化学およびウエスタンブロット法にて解析した。この結果として、11 種類の機能性ペプチドは、分化誘導するニューロンのタイプがそれぞれ異なっていたが、神経幹細胞と皮膚由来間葉系幹細胞で分化誘導されるニューロンのタイプは同じであった。具体的には、VHL と SOCS7 由来のペプチドは、ドーパミンニューロン、モーターニューロン、GABA ニューロンを分化誘導し、SOCS5 由来のペプチドは網膜色素上皮細胞とグルタミン酸ニュー

ロンへと分化誘導した。また、SOCS5, 6由来のペプチドは、グルタミン酸ニューロンこれらの機能性ペプチドの神経分化誘導メカニズムに関しては、BCボックスモチーフペプチドが組織幹細胞へ導入されるとelongin Cと細胞内で結合し、その直後にJAK/Statの発現が阻害されることとことから、これらのペプチドが細胞内でelongin BCと複合体を形成し、その複合体はユビキチンリガーゼとして働いて、JAK2をまずユビキチン後分解し、さらにSTAT3の発現を阻害する転写経路を考えて、これを証明するための実験を行った。まずBCボックスモチーフ配列からなるペプチドの一種のVHLペプチドがelongin Cと結合が行われるかを等温滴定型カロリメトリー (ITC) にて検証し、VHLペプチドを細胞内へ導入後にJAK2がユビキチン化されるかを免疫沈降法とウエスタンブロット法にて解析したところ、ITCの結果では、BCボックスモチーフ配列の15アミノ酸残基のVHLペプチドの結合を確認、さらにJAK2抗体で免疫沈降後、ユビキチン抗体でウエスタンブロットングした結果にて、VHLペプチド導入前のコントロールに比べて、明らかにユビキチンの発現が亢進していることを示し、VHLペプチドを細胞内へ導入後にJAK2がユビキチン化されることを証明した。同時にVHLペプチドを導入後のJAK2とSTAT3の発現を検証したところ、細胞内へ導入後JAK2とSTAT3の発現が急激に低下したことにより、JAK2がユビキチン化されたのち、更にSTAT3の発現が抑制されたことを示した。更にSTAT3 siRNAにて細胞を処理したところ、VHLを導入したときと同様に細胞の神経分化が見られたことから、VHL-JAK/STAT経路は、幹細胞の神経分化経路の一つであることが示された。

次に、VHL、SOCS5、SOCS7由来の3種類のBC-boxモチーフペプチドを多能性間葉性幹細胞へ導入して、神経マーカーのプロモーターとの関連を網羅的Chipアッセイにて調べてみると3種類のBC-boxモチーフペプチドはそれぞれ特異的な神経細胞への分化に直接関わっていることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kanno H, Xu Y, Miyakawa T, Kubo A, Higashida T, Kobayashi NB, Yoshida T, Tanokura M.

BC-Box Motif-Mediated Neuronal Differentiation of Somatic Stem Cells.

Int J Mol Sci. 2018;19(2). pii: E466. doi: 10.3390/ijms19020466.

. Takayanagi S, Mukasa A, Nakatomi H, Kanno H, Kuratsu JI, Nishikawa R, Mishima K,

Natsume A, Wakabayashi T, Houkin K, Terasaka S, Yao M, Shinohara N, Shuin T, Saito N.

Development of Database and Genomic Medicine for von Hippel-Lindau Disease in Japan.

Neurol Med Chir (Tokyo). 2017;57 (2):59-65. doi: 10.2176/nmc.ra.2016-0206.

. Xu Y, Miyakawa T, Nosaki S, Nakamura A, Lyu Y, Nakamura H, Ohto U, Ishida H, Shimizu

T, Asami T, Tanokura M. Structural analysis of HTL and D14 proteins reveals the basis for

ligand selectivity in Striga. Nat Commun. 2018;9(1):3947. doi:10.1038/s41467-018-06452-2

. Nosaki S, Miyakawa T, Xu Y, Nakamura A, Hirabayashi K, Asami T, Nakano T, Tanokura M.

Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1.

Nat Plants. 2018. 4(10):771-776. doi: 10.1038/s41477-018-0255-1.

〔学会発表〕(計 4 件)

Hiroshi Kanno. Neuronal differentiation of skin-derived precursors by intracellular delivery of synthesized peptides derived from BC-box proteins. 11th World Congress on Cell and Tissue Science 2018. 2018.5.9, Radisson Narita, Tomisato, Japan

菅野 洋, 永山 正雄, 篠永 正道;幹細胞を用いた脳梗塞/認知症に対する再生医療の研究.第 7 回国際医療福祉大学学術大会.大田原、2017.8.27 .

菅野 洋, 篠永 正道, 永山 正雄, 宮川 拓也, 田之倉 優: 皮膚由来間葉系幹細胞を用いた脳梗塞/認知症に対する神経再生医療の研究. 第 16 回日本再生医療学会. 仙台, 2017.3.7

菅野 洋, 篠永 正道, 永山 正雄: 体性幹細胞を用いた脳梗塞/認知症に対する神経再生医療の研究. 第 76 回日本脳神経外科学会総会. 名古屋, 2017.10.13

〔図書〕(計 2 件)

Kanno H, Steinbach JP. 16: Familial tumor syndromes :von Hippel-Lindau disease. Oxford Textbook of Neuro-Oncology edited by BatchelorT, NishikawaR, Tarbell N, and WellerM. pp187-193. Oxford University Press, UK, 2017. 9.8 .

菅野 洋 : von Hippel-Lindau disease フォン・ヒッペル・リンドウ病 日本脳腫瘍病理学会編 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第4版, pp180-181,医学書院,東京, 2017.9.28

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田之倉 優

ローマ字氏名：Tanokura Masaru

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：特任教授

研究者番号(8桁)：60136786

研究分担者氏名：宮川 拓也

ローマ字氏名：Miyakawa Takuya

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：特任准教授

研究者番号(8桁)：50596559

(2)研究協力者

研究協力者氏名：出澤 真理

ローマ字氏名：Dezawa Mari