

令和元年6月24日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10946

研究課題名(和文)末梢神経損傷に対する細胞移植治療を目的とした新規シュワン細胞誘導法

研究課題名(英文) Novel Schwann cell induction method for cell transplantation treatment for peripheral nerve injury

研究代表者

素輪 善弘 (SOWA, YOSHIHIRO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80468264

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)：Schwann cell (SC)は、末梢神経再生に必須の役割を果たす。本研究において、線維芽細胞に2つの転写因子の遺伝子を導入することで、その40%以上をSCに直接転換させることに成功した。得られた直接誘導シュワン細胞(dSC)は、SC特異的マーカーを強発現し、様々な神経栄養・保護因子を十分量に産生・分泌する。また、神経細胞と共培養すると、神経軸索を伸長させる神経再生活性を有し、ミエリン鞘を形成した。さらに、マウス坐骨神経欠損モデルを作成し、神経欠損部にdSCを移植すると、神経再生が著明に亢進され、ミエリン鞘が形成し、歩行機能と除神経筋萎縮が有意に改善することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本発明では、ダイレクト・リプログラミングにより体細胞から短期間でシュワン細胞を提供できる。このシュワン細胞は、移植する本人の体細胞から容易に誘導できるので、得られたシュワン細胞を移植した場合にも免疫学的な拒絶応答などの問題は生じない。また、iPS細胞やES細胞を経由することなく直接体細胞からシュワン細胞を誘導できるため、癌化などの多能性幹細胞に起因する問題を回避できる。さらに末梢神経のみならず、脊髄損傷や脳損傷などの中枢神経障害に対する移植細胞として、またはシュワン細胞機能不全症などの病態解明など幅広く応用利用される可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Schwann cells (SCs) fulfill important functions in supporting and healing peripheral nerve tissue. Here, we found that transduction of both SOX10 and Krox20 genes directly converted human fibroblasts into functional SCs. The directly converted Schwann cells (dSCs) showed typical SC characteristics, and were capable of forming myelin that is the key component of the myelin sheath. Xenogeneic transplantation of the dSCs aided recovery from peripheral nerve injury in mice, leading to functional improvements including locomotive performance. The present technology provides a potential novel transplantation therapy for damaged peripheral and central nervous tissues.

研究分野：形成外科学

キーワード：末梢神経 神経再生 脂肪 シュワン細胞 幹細胞 ダイレクト・リプログラミング

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

## 1. 研究開始当初の背景

シュワン細胞は、神経栄養および神経保護因子の産生、細胞外マトリックスの産生、ミエリン形成等を行うことにより、末梢神経再生に重要な役割を担う。外傷に伴う神経欠損や様々なシュワン細胞機能不全症に対して、自家シュワン細胞を移植することができれば理想的な再生医療になると期待される。実際、外傷や悪性腫瘍切除に起因する神経損傷に対して、自家神経より分離・培養したシュワン細胞を移植する治療が効果を上げているが、患者への侵襲の大きさと、供給できるシュワン細胞の数の不足という問題がある。

我々はヒト線維芽細胞(Human Dermal Fibroblast:HDF)に2つの遺伝子(Sox10,Krox20)を導入することで、高効率にシュワン細胞を直接誘導する技術を確立した。得られたシュワン細胞(iSC)はシュワン細胞特異的な遺伝子群(S100, GAP43, p75NTR, GFAPなど)を強発現する。このような技術はこれまで全く報告がない。しかし神経再生能や機能面についての評価はされておらず、この手法の臨床応用への検討課題は多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の4点である。

iSCの神経再生促進効果を検証する。

生体内における神経再生促進効果とミエリン化能の検討

線維芽細胞以外の体細胞からの誘導を検討する。

ゼノフリーの培養系を樹立する。

## 3. 研究の方法

### 平成27年度

#### iSCの神経再生促進効果など期待される細胞機能の検証。

##### 遺伝子プロファイリング

皮膚由来ヒト線維芽細胞(HDF)からiSCへの細胞転換を分子生物学的に確認するため、iSC、cSC(初代培養のシュワン細胞)、HDFのそれぞれについて免疫組織学的染色、RT-PCRとmicroarray analysisを行い、遺伝子発現プロファイリングの比較を行う。

##### Neurite outgrowth assay

培養下での軸索伸長作用についての機能比較:iSC、cSC、HDFの培養上清を採取する。NG108-15 neuronal cells (a motor neuron-like cell line: Jiang et al. 2003)の神経突起伸長に対する促進効果を計測し比較する。

##### 神経保護因子の産生能の比較

NT3、GDNF、BDNF、NGFおよびVEGFのmRNA発現と培養上清中への分泌を、RT-PCRとELISAで測定し、iSC、cSC、HDFで比較する。

##### ミエリン化能の計測

神経細胞と共培養し、培養液中にアスコルビン酸を添加することでミエリン化を誘導する。ミエリン関連マーカーの発現で評価し、iSC、cSC、HDFで比較する。

### 平成28年度

#### 生体内における神経再生促進効果の検証

iSCが移植後に神経再生にどのような影響を与えるかを、免疫不全マウス坐骨神経欠損モデルを用いて検討する。このとき比較対照群として、神経分化させた脂肪由来幹細胞(differentiated adipose derived stem cells:dADSCs)とcSCの2種類を使用する(図H)。免疫不全マウスの坐骨神経幹に5mm gapを作成した後、これらの細胞をゼラチンハイドロゲルチューブに播種させ移植する。術後異なる期間(2, 5, 8週目)において、組織学的検索(架橋再生組織面積、axon

再生、髄鞘形成)、行動学的検索 (BBB score および Walking track analysis)、坐骨神経機能評価法(SFI)を行い、神経再生促進効果を iSC、dADSC、cSC 間で比較検討する。髄鞘形成能については、蛍光免疫染色の重染色で組織学的評価を行う。

## 平成 29 年度

### **ゼノフリーの培養系の樹立。**

遺伝子導入後のヒト線維芽細胞を、FBS 添加培地に換えて種々の無血清合成培地、またはヒト血清を添加した培地を用いて培養する。経時的に RT-PCR による解析を行って、シュワン細胞特異的遺伝子発現を定量する。シュワン芽細胞の誘導効率、誘導に要する期間を比較し、最適なゼノフリー培養条件を見出す。FBS 添加培地に比して、シュワン細胞へのダイレクト・リプログラミングの効率が 75%以上であることを目指す。

### **線維芽細胞以外の体細胞(血液リンパ球、脂肪由来の間質細胞)からの誘導。**

皮膚線維芽細胞以外のさらなる低侵襲な体細胞として、血液由来の細胞もしくは脂肪組織由来の間質細胞が考えられる。われわれは、すでにこれらの細胞の分離・培養の豊富な経験がある。そこで健康人ボランティアからインフォームド・コンセントを得て末梢静脈血を採取する。また通常の形成外科的手術で生じた余剰組織より脂肪由来の間質細胞を分離する。これらの細胞を、線維芽細胞と同様の方法で遺伝子導入後、iSC に誘導される効率と誘導に要する期間を比較し、もっとも適した細胞を見出す。60%以上の細胞を iSC に誘導でき、得られた iSC が線維芽細胞に比して 80%以上の神経再生能を有することを目指す。得られた iSC の神経再生促進効果を評価する目的で、培養中での神経栄養因子の産生・放出能、神経軸索の伸長効果を計測する。

## 4. 研究成果

### 平成 27 年度

iSC の神経再生促進効果など期待される細胞機能の検証。

#### 遺伝子プロファイリング

RTPCR による遺伝子発現解析で、iSC 細胞において著明な s100B や p75NTR の発現上昇がみられた。これらは同定した 2 つの因子の組み合わせによってのみ明らかな発現を認めた。

#### Neurite outgrowth assay

cSC と iSC いずれにおいても、Con に比較して神経突起伸長効果は優れており、両者は comparable であった。

#### 神経保護因子の産生

cSC と iSC の神経栄養因子発現パターンは類似しており、いずれも Con に比較して発現量は有意に増加していた。

#### ミエリン化能の計測

In vitro の系では、あらかじめ GFP でマーキングした dSC を後根神経節細胞と共培養することで、in vivo の系では同様に GFP にラベリングした dSC を神経欠損部に移植してから 10 週後に再生神経内で移植した dSC がミエリン化マーカーを発現しているかを検討した。念のために、MBP と P0 の 2 種類のミエリンマーカーで確認した。GFP でマーキングした iSC と DRGn との共培養において DRG の神経突起に沿って移植したシュワン細胞がみられ、多数の GFP 細胞がミエリンマーカーと Overlap していた。これらは 2 種類のミエリンマーカーで確認された。

### 平成 28 年度

#### **生体内における神経再生促進効果の検証**

再生された神経架橋についてはマクロ像での con 群よりしっかりとした架橋が生成されており、pSC とも明らかな差異はみられなかった。再生神経の短軸切片の Luxol fast blue によるミエリン染色により、再生したミエリン数を比較したところ Con 群に比較して有意にミエリン再生が優れており、pSC 群に匹敵していた。坐骨神経機能インデックスでは 12W の時点で dSC 群は cSC に匹敵する坐骨神経機能の回復がみられた。また支配筋の委縮についても Con 群と比較して委縮は軽度であり、cSC と dSC 間での有意差はみられなかった。

#### 生体内におけるミエリン化能の検証

再生神経に沿うように GFP+細胞が並んでいるが、これらはミエリンマーカー + 細胞と Overlap していた。また、2 種類の神経マーカーとミエリンマーカーで確認できた。以上より dSC は神経損傷部位への移植により、ミエリン化することが明らかとなった。

#### 平成 29 年度

#### 線維芽細胞以外の体細胞(血液リンパ球、脂肪由来の間質細胞)からの誘導

血管内皮細胞を細胞材料としても、20%近くの効率でシュワン細胞に誘導できたが、内皮細胞の増殖力が乏しく、遺伝子の導入効率に問題があった。一方、皮膚線維芽細胞の代替細胞として脂肪組織由来の間質細胞は、皮膚線維芽細胞を上回る(45%)導入効率を示した。しかし、われわれが目指した線維芽細胞 60%以上のシュワン細胞への誘導効率を持つ代替細胞ソースが見いだされた。今後、線維芽細胞に代わる細胞材料として脂肪間質細胞が注目されていくことが予想される。

#### ゼノフリーの培養系の樹立の検討

遺伝子導入後のヒト線維芽細胞を、FBS 添加培地に換えて種々の無血清合成培地、またはヒト血清を添加した培地を用いて培養を行い、最適なゼノフリー培養条件を検討した。しかしながら、FBS 添加培地に比して、シュワン細胞へのダイレクト・リプログラミングの効率が 37%から 5%に低下した。また誘導した誘導シュワン細胞の Viability も低下す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)

素輪善弘, 他. 線維芽細胞から転換したシュワン細胞の末梢神経損傷部位への移植効果の検討. 末梢神経. 29 巻 56-57. 2018 (査読あり)

Sowa Y, et al. Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo. Stem Cells Transl Med. 2017 Apr;6(4):1207-1216 (査読あり)

Sowa Y, et al. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. Plast Reconstr Surg. 2016(査読あり)

Yamamoto K, Sato Y, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Sowa Y, et al. Generation of Directly Converted Human Osteoblasts That Are Free of Exogenous Gene and Xenogenic Protein. J Cell Biochem. 2016 Nov;117(11):2538-45.(査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

Sowa Y, et al. Potential application of adipose tissue in peripheral nerve injury. IFATS2018 2018 Dec 14 Las Vegas, USA

素輪善弘 他, Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo.学会賞講演 第 61 回日本形成外科 2018/4/12 博多

素輪善弘 他. 新規人工神経開発に向けたフィージブルなシュワン細胞供与法の検討. 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2018/10/1. 東京

Sowa Y, et al. Direct reprogramming of Fibroblasts into Schwann Cells. The 14th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery.2018 Jun 5.Korea

Sowa Y, et al. Direct Reprogramming of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve. American Society of Plastic Surgeons. 2018 Sep 28., USA

素輪善弘,他.Platelet-rich plasma (PRP)のシュワン細胞に対する増殖・遊走能効果の検討. 第 17 回再生医療学会総会.2018/03/21 博多

素輪善弘, 他. Platelet-rich plasma (PRP)はシュワン細胞を介して神経再生を促進させる. 第 10 回日本創傷外科学会.2018/7/6  
埼玉

素輪善弘, 他.線維芽細胞から転換したシュワン細胞の末梢神経損傷部位への移植効果の検討. 第 29 回日本末梢神経学会. 2018/9/7 下関

素輪善弘, 他. Platelet-rich plasma (PRP)はシュワン細胞を介して末梢神経再生を亢進させる.第 10 回 多血小板血漿 (PRP) 療法研究会, 第 8 回 DDS 再生医療研究会 2018/11/18 大阪

素輪善弘,他.ダイレクト・リプログラミングを用いたシュワン細胞移植による神経損傷治療 第 9 回日本創傷外科学会総会. 2017/07/06(岐阜)

素輪善弘,他.臨床応用に向けた脂肪幹細胞の基礎研究. 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2017/10/20(大阪)

素輪善弘,他.Platelet-rich plasma (PRP)はシュワン細胞の増殖・遊走能を促進させる。第 47 回日本創傷治療学会 2017/11/27

素輪善弘,他.第 15 回日本再生医療学会総会 ダイレクト・リプログラミングによる線維芽細胞から機能的シュワン細胞への誘導 2016 年 3 月 17 日 大阪

素輪 善弘,他.第 25 回形成外科基礎学術集談会 脂肪組織幹細胞に含まれる血管内皮由

素輪善弘,他.末梢神経欠損損傷における自作シュワン細胞付加型ゼラチンハイドロゲルチューブ移植 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016.11.22 博多

〔図書〕(計2件)

素輪善弘, 田畑泰彦, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修. 末梢神経欠損治療に対するゼラチンハイドロゲルチューブの活用. ゲル化・増粘剤の使い方、選び方事例集 2018 4 節 1-4 項 126-132 技術情報協会社(東京)

素輪 善弘, 岸田 綱郎, 沼尻 敏明, 松田 修【細胞移植と神経再生】 末梢神経 末梢神経における脂肪組織由来幹細胞移植(解説/特集) Clinical Neuroscience2016 34 巻 10 号 Page1157-1160 中外医学社(東京)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：シュワン細胞及びその調製方法  
発明者：素輪 善弘、岸田綱郎、松田 修  
権利者：京都府公立大学法人  
種類：特許  
出願番号：PCT/JP2015/075921  
出願年：2015年  
国内外の別：国内

名称：体細胞の調製方法  
発明者：素輪 善弘、山本健太、岸田綱郎、山本俊郎、松田 修  
権利者：京都府公立大学法人  
種類：特許  
出願番号：PCT/JP2016/081187  
出願年：2016年  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

該当なし

### (2)研究協力者

岸田 綱郎 (Kishida Tsunao)  
京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)准教授  
研究者番号：00370205

松田 修 (Matsuda Osam)  
京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)教授  
研究者番号：00271164

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。