

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15751

研究課題名(和文)ケミカル・セルフェイト・コンバージョンがもたらすフィージブルな神経再生治療

研究課題名(英文) Establishment of a novel cell fate conversion procedure that may be applicable to regeneration therapy for peripheral nerve injury

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：シュワン細胞は、神経栄養因子の分泌、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。外傷や腫瘍の摘出に伴う神経欠損、あるいは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。

我々はヒト線維芽細胞をシュワン細胞に直接コンヴァートさせる技術を樹立した。さらにより移植に適したシュワン細胞の誘導法の開発に成功し、得られたシュワン細胞が高い機能を有することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Schwann cells play important roles in the regeneration of the peripheral nerve tissue, by secreting neurotrophic factors, producing extracellular matrix, and forming myelin.

If transplantation of autologous Schwann cells is possible, such a procedure may provide an ideal regenerative therapy to treat a large nerve defect caused by trauma and by surgical resection of a tumor, as well as diseases associated with functional aberration of Schwann cells.

We established a technology to directly convert human fibroblasts into Schwann cells. We have also succeeded in inducing such Schwann cells that may be more suitable for transplantation therapy, and confirmed that they are highly functional.

研究分野：再生医療

キーワード：ダイレクト・コンヴァージョン シュワン細胞 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

シュワン細胞は、神経栄養因子の分泌、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。外傷や腫瘍の摘出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、患者への侵襲が大きく、また供給できるシュワン細胞の数が十分でない例もある。

そこで、iPS 細胞あるいは間葉系幹細胞 (MSC) よりシュワン細胞を分化誘導して再生医療に応用しようと試みられているが、これらも患者への侵襲性や安全性において、多くの問題がある。

我々はヒト線維芽細胞 (Human dermal fibroblast: HDF) に、Sox10 と Krox20 遺伝子を導入することで、高い効率でシュワン細胞を直接誘導する技術を確認した (Sowa Y, Kishida T, et al., Transl Med. 2017)。得られたシュワン細胞 (Directly reprogrammed Schwann cell: dSC) は、シュワン細胞関連遺伝子群 (S100, GAP43, p75NTR, GFAP など) を強発現し、また BDNF、GDNF、NGF 等の神経栄養因子を産生していた。dSC を NG108-15 細胞と共培養したところ、NG108-15 細胞からの神経突起伸長の促進効果が認められた。また脊髄後根神経節細胞と共培養すると、軸索に沿ったミエリン形成を行うことが示された。

免疫不全マウスに坐骨神経傷害モデルを作成し、その傷害部位 (神経両端を 5 mm のギャップを挟んで挿入した、ゼラチン conduit の内部) に dSC を異種移植すると、坐骨神経の再生を著明に回復し、軸索に沿ってミエリンを形成した。さらに除神経筋萎縮を抑制し、歩行障害を軽減させたことから、末梢神経機能の回復を促進することが確認できた。

このように、Sox10 と Krox20 遺伝子を共導入することにより、ヒト線維芽細胞を神経再生能とミエリン形成能を有するシュワン細胞に高い効率で誘導できることが分かった。

しかしながら、この方法で誘導したシュワン細胞には、現状ではまだ実用化を阻む様々な問題が残っており、臨床応用のためにはさらなる改良が必要である。

そこで本研究では、体細胞からシュワン細胞の新しい誘導法を確立することによって、神経再生治療の実現性を高めることを目標とした。

## 2. 研究の目的

従来の方法で誘導したシュワン細胞よりもさらに優れたシュワン細胞を、ヒト線維芽細胞から誘導する方法を確立する。

得られたシュワン細胞 (Chemically converted Schwann cells: CCSCs) の神経再生促進効果を証明する。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養。

ヒト線維芽細胞を種々の条件で培養しシュワン細胞への誘導を試みた。得られた細胞を CCSC 群とした。

比較検討のために、通常の培地で同期間培養をおこなったものを CM 群、誘導培地のみで培養をおこなったものを SCM 群とした。また陽性コントロールを dSC とした。

それぞれの群の細胞を、継時的に S100、p75NTR、GAP43、NG2、MBP2 等のタンパクに特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。

### Real time RT-PCR 解析。

それぞれの群の細胞から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、経時的に mRNA を回収した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いた逆転写反応を行った後、得られた cDNA を用いて、Sox10、Krox20、S100、GAP43、p75NTR、GFAP、Nestin、MBP 遺伝子の mRNA レベルを、StepOnePLUS (Applied Biosystems) による real time RT-PCR 解析で定量した。

### Neurite outgrowth assay。

HDF、dSC、CCSC の培養上清を採取した。これらを NG108-15 neuronal cells の培養に加え、神経突起の伸長に対する促進効果を計測し比較した。

### ミエリン化能の評価

各細胞を脊髄後根神経節細胞と共培養し、培養液中にアスコルビン酸を添加してミエリン化を誘導した。その後、ミエリン関連マーカー (PO と MBP) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。

組み換え DNA 実験と動物実験  
所定の認可を得て行った。

#### 4. 研究成果

典型的な研究結果の一部を図1～5に示す。

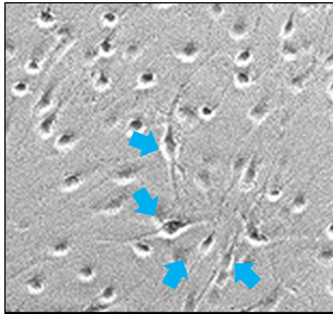


図1 CCSCは典型的なシュワン細胞様の形態を呈した。

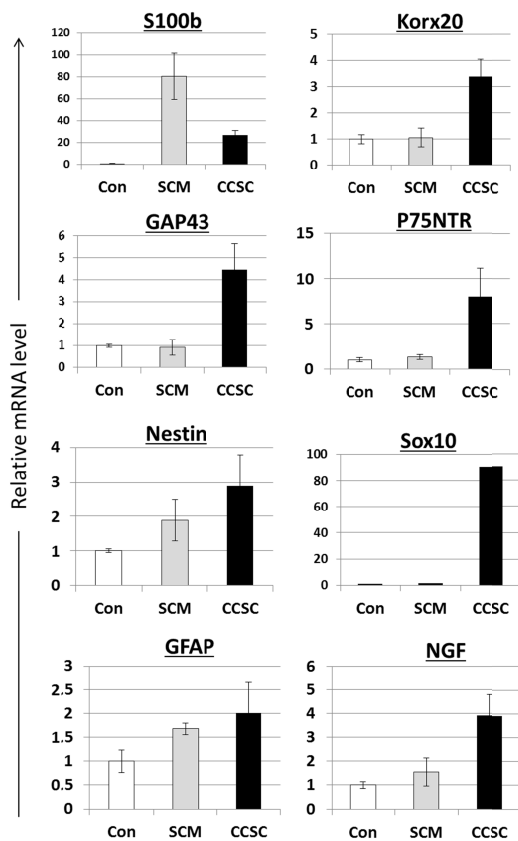


図2 CCSCはシュワン細胞マーカーを発現した。

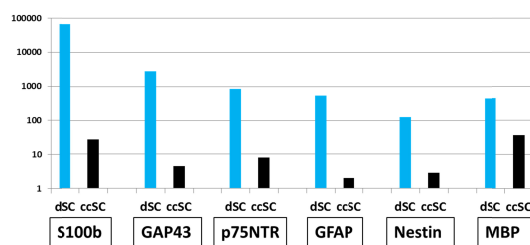


図3 CCSCはシュワン細胞マーカーを発現

する。

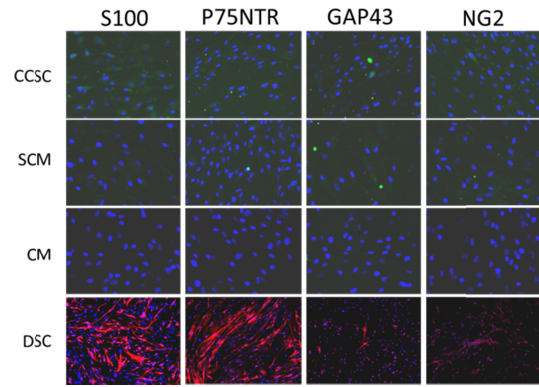


図4 CCSCはシュワン細胞関連たんぱくを発現した。

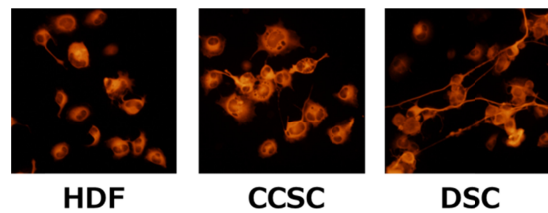


図5 CCSCは神経突起の進展を促進した。

このように、本研究では当初の目的を達成し、従来よりも優れたシュワン細胞の誘導法を確立することに成功し、得られたシュワン細胞が高い機能を有することを確認した(論文投稿準備中)。

本誘導法は、移植用の自家シュワン細胞を供給することを可能とすることが期待できるので、外傷や悪性腫瘍の切除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、新しい有効な再生医療法に繋がることを期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Generation of Directly Converted Human Osteoblasts That Are Free of Exogenous Gene and Xenogenic Protein.

Yamamoto K, Sato Y, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Sowa Y, Yamamoto T, Kanamura N, Kishida T, Mazda O.

J Cell Biochem. 2016 Nov;117(11):2538-45. doi: 10.1002/jcb.25546. Epub 2016 Mar 31.

PMID: 26990860 (査読あり)

Hypoxia Potentiates Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid in Rat Articular Cartilage.

Ichimaru S, Nakagawa S, Arai Y, Kishida T, Shin-Ya M, Honjo K, Tsuchida S, Inoue H, Fujiwara H, Shimomura S, Mazda O, Kubo T. Int J Mol Sci. 2016 Jun 25;17(7). pii: E1013. doi: 10.3390/ijms17071013. PMID: 27347945 ( 査読あり )

Tumor-homing effect of human mesenchymal stem cells in a TH-MYCN mouse model of neuroblastoma.

Kimura K, Kishida T, Wakao J, Tanaka T, Higashi M, Fumino S, Aoi S, Furukawa T, Mazda O, Tajiri T. J Pediatr Surg. 2016 Dec;51(12):2068-2073. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.041. PMID: 27686479 ( 査読あり )

Sowa Y, Kishida T, Tomita K, Yamamoto K, Numajiri T, Mazda O. 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 )

Efficient direct conversion of human fibroblasts into myogenic lineage induced by co-transduction with MYCL and MYOD1. Wakao J, Kishida T, Fumino S, Kimura K, Yamamoto K, Kotani SI, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Tajiri T, Mazda O. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jun 24;488(2):368-373. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.059. Epub 2017 May 10. PMID: 28501623 ( 査読あり )

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

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