

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06645

研究課題名(和文) 神経栄養因子による骨形成因子CCN経路活性化を通じたヒトiPS細胞の神経分化研究

研究課題名(英文) Differentiation of human iPS cells by CCN

研究代表者

葛原 隆 (Kuzuhara, Takashi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：00260513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCCN2タンパク質を含む培地で培養後、免疫抗体染色法を用いて神経突起マーカーMAP2の染色を行った結果、CCN2タンパク質は神経突起伸展の促進効果が見られた。神経前駆細胞のp44/42 MAPKのリン酸化を検定したところ、リン酸化が増加した。CCN2タンパク質の添加により、細胞内のp-44/42 MAPKが活性化し神経栄養因子様活性を示したと考えられる。CCN2タンパク質がヒト神経細胞の分化や成熟過程に関わるとい報告はこれまでになく、そのCCN2タンパク質は骨形成に関わることが知られていることから、骨形成と神経分化・成熟を結びつける接点となっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨形成因子CCNファミリータンパク質が神経分化に関与するという研究は他には全く無く世界の中でも極めて創造性が高い研究と言える。この研究を通して、神経細胞の分化と骨形成の接点が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive RNA sequencing showed that mRNA level expression of smooth muscle protein 22-alpha (SM22a), annexin A2 (ANXA2), CCN2, IGFBP3, and CCN1 were up-regulated, whereas those of the TP53 was down-regulated by treatment with jiadifenolide. In silico molecular network analysis showed that the up-regulated mRNA level expression of CCN, CCN1, CCN2, SM22a, ANXA2, and IGFBP3 genes were related to the regulation of SMAD, SMAD1, SMAD2, SMAD3, nuclear factor- κ B (NF- κ B), and STAT3 or p53. RT-qPCR showed that expression levels of CCN1, CCN2, CCN6, SM22a, and ANXA2 mRNA were significantly up-regulated in jiadifenolide-treated cells. These results showed that jiadifenolide activates CCN signaling via up-regulating the mRNA level expression of the CCN family members CCN1, CCN2, and CCN6, and CCN2 gene expression. CCN2 protein promoted neuronal dendritic outgrowth and increased neuronal cell numbers and increased phosphorylation of p44/42 MAPK protein in human neuronal precursor cells.

研究分野：薬学

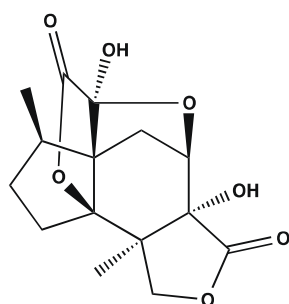
キーワード：ジアジフェノライド ヒトiPS細胞 神経前駆細胞 CCN CCN2 神経突起伸展 p-44/42 MAPK リン酸化

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

低分子性神経栄養因子ジアジフェノライドによるアルツハイマー病治療薬に向けて

近年、高齢化社会により認知症患者が増加し、社会問題となっている。認知症の中で大部分を占めるアルツハイマー型認知症患者の脳内では、神経細胞内部に老人斑や神経原繊維変化といった異常タンパク質が蓄積し、神経細胞死が誘導されることで脳萎縮が引き起こされ、神経細胞間での情報伝達の喪失によって障害が起きる。そこで、アルツハイマー型認知症治療のため、神経突起伸張作用や神経細胞生存維持作用を持つ神経栄養因子が注目されている。しかしながら、高分子タンパク質である神経栄養因子は臨床的問題から脳内への投与は困難である。従って、これらの臨床的問題を解決し、神経栄養因子活性を示す低分子化合物が求められている。ジアジフェノライド(下図)は、中国南西部に生息するシキミ属植物(*Illicium jiadifengpi*)の実から抽出された分子量 310 の低分子化合物であり、ラット由来初代培養神経細胞に対して、神経突起伸張の促進活性を示す。



ジアジフェノライド

光学活性のある炭素が 7 個ある
非常にユニークな化学構造

ヒト iPS 細胞を用いた神経分化の研究

臨床応用する上で必要な、ジアジフェノライドのヒト神経細胞における神経栄養因子様活性は解明されていなかったため、ヒト神経細胞に直接作用し、神経栄養因子様活性を検討するためヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた。ヒト細胞における効果を倫理的問題なく検討でき、ヒト細胞におけるメカニズム解析に有用である。ヒト iPS 細胞から神経細胞を作製し、ジアジフェノライドによるヒト神経細胞に対する神経栄養因子様活性を検討した。ジアジフェノライド処理により神経突起ネットワークの広がりが確認され、神経細胞増殖作用または神経細胞生存維持作用を示した。MAP2 及び PSD95 のタンパク量増加から神経突起伸張作用だけでなく、シナプス成熟への関与も示唆された。ジアジフェノライドはアルツハイマー型認知症に対する治療薬候補として期待される。次にジアジフェノライドのヒト神経細胞に対する作用を網羅的に検討するために、次世代シーケンサーを用いて細胞内 mRNA 発現の変化等の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、ジアジフェノライドの添加により、CCN シグナル伝達経路のスコアが最も高いと分かった。

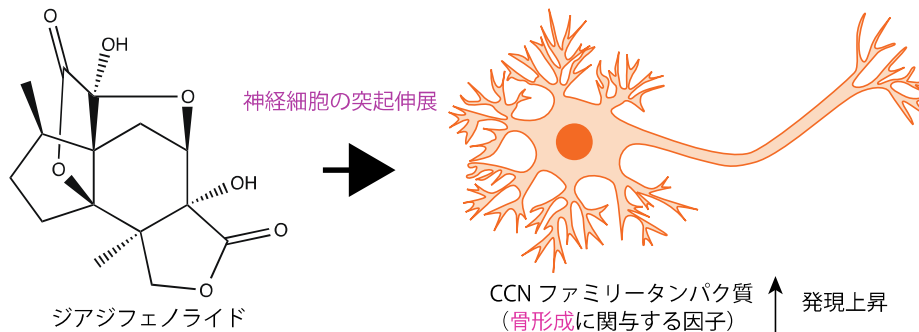
神経栄養因子ジアジフェノライドによる骨形成因子 CCN ファミリーの誘導

CCN タンパク質は Cystein-rich 61 (Cyr61: CCN1), Connective tissue growth factor (CTGF: CCN2), Nephroblastoma overexpressed (Nov: CCN3)の頭文字により命名されたファミリーを形成するタンパク質である。このファミリーの代表格である CCN2/CTGF は軟骨細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、破骨細胞前駆細胞の 4 種の細胞に働いて内軟骨性骨化を全般にわたり促進する多機能因子である。ジアジフェノライド添加により CCN シグナル経路が活性化し、ヒト神経細胞分化が促

進することが示唆された。

2. 研究の目的

ヒトを含む脊椎動物では、脊椎などでは神経細胞が収納されており、発生段階では骨と神経は連携して発生分化が行われると考えられる。申請者らは、植物由来の低分子化合物であるジアジフェノライドがヒト iPS 細胞由来の神経細胞を突起伸展させる活性と神経分化マーカーを増加させる活性を有することを発見した。ヒト iPS 細胞を用いて神経細胞へと分化させ、その過程に低分子化合物ジアジフェノライドが神経栄養因子活性を持つ研究自体が世界の中でも独自のものである。ジアジフェノライドの作用メカニズムを調べるために、ヒト iPS 細胞由来の神経細胞に対する遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーにて包括的に調べたところ、ジアジフェノライドの処理により骨や軟骨の形成に関わる組織再生因子である CCN ファミリーの遺伝子発現が増大していることを見いだした。CCN タンパク質が、iPS 細胞や神経細胞の分化過程に関わるという報告は未だなく、その関連性から骨形成と神経分化を結びつける極めて新しい局面を切り開く研究になると期待できる。そのメカニズムとして骨形成因子 CCN ファミリータンパク質が神経分化に関与するという研究は他には全く無く世界の中でも極めて創造性が高い研究と言える。この研究を通して、神経細胞の分化と骨形成の接点が明らかになる可能性がある。



3. 研究の方法

ジアジフェノライド添加により CCN ファミリー分子の遺伝子発現が上昇するのか定量的に確認すると共に、CCN シグナル経路活性化による神経前駆細胞の分化成熟に対する影響などを検討する。

ジアジフェノライドの作用メカニズムの検討

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いジアジフェノライド作用による細胞内遺伝子発現変化の網羅的な解析を行うことで、ジアジフェノライドの作用メカニズムを解明する。

次世代シーケンサーなどを用いたジアジフェノライドによる網羅的な遺伝子発現の解析

ジアジフェノライドのヒト神経細胞に対する作用を網羅的に検討するために、次世代シーケンサーを用いて細胞内 mRNA 及び ncRNA 発現の変化等の遺伝子発現を解析する。これにより、標的遺伝子及びシグナル伝達経路を特定し、細胞内の分子機序を解明する。前段階として、少し結果を得ている。さらに定量 PCR 法・ウエスタンブロット法などにより遺伝子発現の変化を検討する。

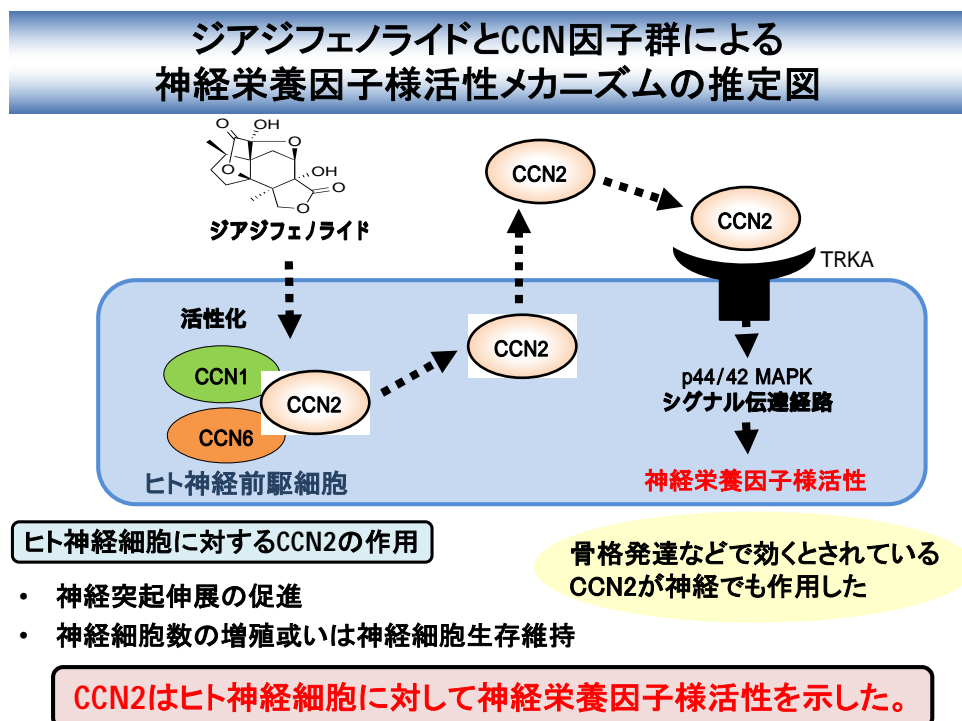
骨形成因子 CCN ファミリーのヒト iPS 細胞由来神経細胞への神経突起促進活性の検討

骨形成因子 CCN ファミリー自体に神経分化や神経突起促進活性があるかを調べる。ヒト iPS 細胞由来神経細胞を培養し、CCN ファミリーのリコンビナントタンパク質を作用させ、神経突起伸展活性の有無を検討する。神経突起伸展は抗 MAP2 抗体を用いた蛍光抗体法による染色を

行い、その画像をコンピューターに取り込んだあと神経突起の面積や長さを計算するソフトウェアによって定量化する。またマーカータンパク質である MAP2 や PSD95 のウエスタンブロットによる定量法により解析する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞株 201B7 を用い、ヒト iPS 細胞から神経前駆細胞を作製し、ジフェノライドがヒト iPS 細胞由来の神経細胞に対して、神経突起伸展の促進活性を有することを見出した。さらに、ジアジフェノライドがどのようなメカニズムで神経栄養因子様活性を示すのかを解明するために、ジアジフェノライドを作用させたヒト iPS 細胞由来の神経前駆細胞における遺伝子発現を RNA シークエンスにより網羅的に解析し、それらの遺伝子発現変化を定量 RT-PCR にて確認した。さらにネットワーク解析により分子間の繋がりを調べたところ、CCN2 遺伝子および CCN シグナルに関わる遺伝子群の発現が上昇することを見出した。ヒト iPS 細胞由来の神経前駆細胞を DMSO 或いは組換えヒト CCN2 タンパク質を含む培地で培養後、免疫抗体染色法を用いて神経突起マーカー-MAP2 の染色を行い画像解析により数値化した。その結果、CCN2 タンパク質は DMSO と比較し神経突起伸展の促進効果を有することを見いだした。さらに、神経前駆細胞の p44/42 MAPK のリン酸化をウエスタンブロット解析により検定したところ、リン酸化が増加した。したがって、CCN2 タンパク質の添加により、細胞内の p-44/42 MAPK が活性化し神経栄養因子様活性を示したと考えられる(下図参照)。CCN2 タンパク質がヒト神経細胞の分化や成熟過程に関わるという報告はこれまでになく、世界で初めての発見である。その CCN2 タンパク質は骨形成に関わることが知られていることから、骨形成と神経分化・成熟を結びつける接点となっている可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Masuda Takeshi, Miki Ryosuke, Ohtsuki Sumio, Kuzuhara Takashi	4. 巻 557
2. 論文標題 In-vitro acetylation of SARS-CoV and SARS-CoV-2 nucleocapsid proteins by human PCAF and GCN5	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 273 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shoji Masaki, Esumi Tomoyuki, Tanaka Narue, Takeuchi Misa, Yamaji Saki, Watanabe Mihiro, Takahashi Etsuhisa, Kido Hiroshi, Yamamoto Masayuki, Kuzuhara Takashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Organic synthesis and anti-influenza A virus activity of cyclobakuchiols A, B, C, and D	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shoji Masaki, Sugimoto Minami, Matsuno Kosuke, Fujita Yoko, Mii Tomohiro, Ayaki Satomi, Takeuchi Misa, Yamaji Saki, Tanaka Narue, Takahashi Etsuhisa, Noda Takeshi, Kido Hiroshi, Tokuyama Takaaki, Tokuyama Takahito, Tokuyama Takashi, Kuzuhara Takashi	4. 巻 16
2. 論文標題 A novel aqueous extract from rice fermented with <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> possesses an anti-influenza A virus activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 畠山大、庄司正樹、葛原隆	4. 巻 35
2. 論文標題 インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼが有するエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物群	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 73-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葛原隆	4. 巻 42
2. 論文標題 生命科学の最前線 精子や卵子はもういらぬ? -幹細胞からの個体の構築へ-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 都薬雑誌	6. 最初と最後の頁 20-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Masaki, Ueda Masako, Nishioka Megumi, Minato Hiroki, Seki Masahide, Harada Kenichi, Kubo Miwa, Fukuyama Yoshiyasu, Suzuki Yutaka, Aoyama Eriko, Takigawa Masaharu, Kuzuhara Takashi	4. 巻 519
2. 論文標題 Jiadifenolide induces the expression of cellular communication network factor (CCN) genes, and CCN2 exhibits neurotrophic activity in neuronal precursor cells derived from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 309 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Shoji Masaki, Yamayoshi Seiya, Yoh Rina, Ohmi Naho, Takenaka Shiori, Saitoh Ayaka, Arakaki Yumie, Masuda Aki, Komatsu Tsugunori, Nagano Rina, Nakano Masahiro, Noda Takeshi, Kawaoka Yoshihiro, Kuzuhara Takashi	4. 巻 293
2. 論文標題 Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyltransferases PCAF and GCN5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7126 ~ 7138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.001683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Masaki, Minato Hiroki, Ogaki Soichiro, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Kume Shoen, Kuzuhara Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Different murine-derived feeder cells alter the definitive endoderm differentiation of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0201239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Ohmi Naho, Saitoh Ayaka, Makiyama Kyoko, Morioka Masumi, Okazaki Hiroki, Kuzuhara Takashi	4. 巻 504
2. 論文標題 Acetylation of lysine residues in the recombinant nucleoprotein and VP40 matrix protein of Zaire Ebola virus by eukaryotic histone acetyltransferases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 635 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kukula-Koch Wirginia, Koch Wojciech, Czernicka Lidia, Glowniak Kazimierz, Asakawa Yoshinori, Umeyama Akemi, Marzec Zbigniew, Kuzuhara Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 MAO-A Inhibitory Potential of Terpene Constituents from Ginger Rhizomes-A Bioactivity Guided Fractionation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23061301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 葛原隆、庄司正樹、関真秀、上田雅子、西岡恵、港洋希、青山絵理子、原田研一、久保美和、福山愛保、鈴木穰、滝川正春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の神経分化におけるCCN経路の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎山今日子、畠山大、小松嗣典、齋藤彩香、廣瀬芽生、大西杏奈、緒方星陵、加賀衣恵、大槻純男、葛原隆
2. 発表標題 アセチル化修飾によるインフルエンザウイルスRNA合成酵素の活性調節
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中成枝、庄司正樹、増田豪、渡辺珠汎、江角朋之、大槻純男、葛原隆
2. 発表標題 バクチオールの抗インフルエンザ活性における標的宿主タンパク質の同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中成枝、庄司正樹、江角朋之、山本雅之、葛原隆
2. 発表標題 シクロバクチオールは抗インフルエンザ活性を有する
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 庄司正樹、田中成枝、増田豪、渡辺珠汎、江角朋之、大槻純男、葛原隆
2. 発表標題 バクチオールの抗インフルエンザ活性は、宿主タンパク質との結合が必要である。
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 葛原隆、庄司正樹、関真秀、上田雅子、西岡恵、港洋希、青山絵理子、原田研一、久保美和、福山愛保、鈴木穰、滝川正春
2. 発表標題 ヒトiPS由来神経前駆細胞の神経分化におけるCCN経路の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kuzuhara, Masaki Shoji, Hiroki Minato, Soichiro Ogaki, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Shoen Kume
2. 発表標題 Short fragment RNA of XIST expressed higher in the primed state of human iPS cells.
3. 学会等名 Cell Symposia: Regulatory RNAs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛原隆
2. 発表標題 ウイルスとiPS細胞のエピジェネティクスの研究
3. 学会等名 第11回 天然物薬用研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛原隆
2. 発表標題 サルーン結合タンパク質の検索
3. 学会等名 藻類成長因子を用いた海藻栽培技術 イノベーション 第三回研究発表会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠山 大, 庄司正樹, 小松嗣典, 齋藤綾香, 横山今日子, 廣瀬芽生, 大西杏奈, 緒方星陵, 中野雅博, 加賀衣恵, 野田岳志, 大槻純男, 河岡義裕, 葛原 隆
2. 発表標題 インフルエンザウイルスPAサブユニットにおけるアセチル化標的のアミノ酸残基の変異によるエンドヌクレアーゼ活性変化
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Shoji, Hiroki Minato, Soichiro Ogaki, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Shoen Kume, Takashi Kuzuhara (presenter).
2. 発表標題 Feeder cells affect the definitive endoderm differentiation of human iPS cells.
3. 学会等名 Stem Cell Dynamics Throughout Life: From Development to the Adult. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山 大, 小松嗣典, 齋藤綾香, 大西杏奈, 横山今日子, 葛原 隆
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのPAサブユニットのアセチル化修飾に伴うエンドヌクレアーゼ活性調節
3. 学会等名 第32回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山 大, 小松嗣典, 齋藤綾香, 大西杏奈, 横山今日子, 緒方星陵, 大槻純男, 葛原 隆
2. 発表標題 インフルエンザウイルスのPAサブユニットのアセチル化修飾によるエンドヌクレアーゼ活性調節効果
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山 大, 小松嗣典, 齋藤綾香, 大西杏奈, 横山今日子, 緒方星陵, 大槻純男, 葛原 隆
2. 発表標題 インフルエンザウイルスRNA合成酵素へのアセチル化修飾による酵素活性調節効果
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司正樹、港洋希、大垣総一郎、関真秀、鈴木穰、糸昭苑、葛原隆
2. 発表標題 異なるマウスフィーダー細胞上で培養されたヒトiPS細胞の胚体内胚葉細胞への分化効率と遺伝子発現の変化
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗インフルエンザウイルス剤	発明者 徳山孝、徳山孝仁、 葛原隆、庄司正樹	権利者 徳山孝、徳山孝仁
産業財産権の種類、番号 特許、2020-125791	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関