

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390353

研究課題名(和文) 神経再生医療を目指した多能性組織幹細胞の単離と神経分化ペプチドによる神経分化誘導

研究課題名(英文) Isolation of pluripotent somatic stem cells for neuronal regenerative medicine and neuronal differentiation peptide-mediated neuronal differentiation

研究代表者

菅野 洋(Kanno, Hiroshi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：40244496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：多能性組織幹細胞として、神経幹細胞と皮膚由来間葉系幹細胞を用い、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)を細胞内へ導入した。結果として、11種類のペプチドは、分化誘導するニューロンのタイプがそれぞれ異なり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。これらの機能性ペプチドの神経分化メカニズムは、Stat3の分解によると考えられるが、現在、検討中である。

研究成果の概要(英文)：We used neural stem cells and skin-derived mesenchymal stem cells as pluripotent somatic stem cells to neuronal lineage. Eleven BC-box proteins(SOCS1-7, ASB3, WSB2, LRR1, VHL)-derived functional peptides are delivered to those somatic stem cells. Each peptide induced to differentiate different type of neuron. VHL and socs7-derived peptides induced to differentiate dopaminergic and motor neurons, and SOCS5-derived peptide induced to differentiate retinal color epithelial cells and glutamate neuron. This mechanism of neuronal differentiation is suggested to be related to degradation of Stat3, but is under investigation.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：多能性組織幹細胞 神経分化誘導 神経分化ペプチド 神経分化ドメイン 神経分化ドメイン モーターニューロン ドーパミンニューロン

1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞と同様な多分化能を有する多能性幹細胞は、生体を構成する様々な組織にも内在している。ただ、組織中に内在する多能性幹細胞は、組織により分化しうる細胞系列の方向に違いがあるため、神経再生医療に用いる神経系細胞へ分化しうる多能性幹細胞の母地はある程度限定されており、採取するのに侵襲が大きい組織は多能性幹細胞を単離するには適していない。しかし、皮膚や骨髄のような採取容易な自己の組織から神経系細胞へ分化しうる多能性幹細胞が単離できれば、採取の際の侵襲が少なく、iPS細胞やES細胞などのように移植に伴う癌化の危険性や免疫拒絶の問題がほとんどないため、神経再生医療のための細胞移植治療のソースとして最も理想的と考えられる。このため、神経系細胞へ分化しうる多能性幹細胞の単離および維持の方法の確立が重要と考えられる。最近本研究代表者らは新生仔ラット皮膚の真皮より神経系細胞へ分化能を有する間葉系多能性幹細胞の単離と維持に成功したものの(Stem Cells Dev 18: 1523, 2009)、これは10数回の試行後によく成功したにすぎないのが実状であった。しかしその後は改良を重ね、ヒト皮膚の表皮からも多能性幹細胞の単離に成功して神経細胞への分化を報告し(日本再生医療学会2010)、幹細胞マーカーであるCD133抗体を用いた細胞磁気分離法(MACS法)により更に効率よく多能性幹細胞を単離しうることが明らかになってきていた。また、連携研究者の出沢らは、ヒトの皮膚あるいは骨髄の間葉系組織に内在する神経系細胞へ分化しうる多能性幹細胞をヘパリンの長時間処理と幹細胞マーカーであるSSEA-3抗体を用いて単離に成功し、MUSE細胞と命名して注目されている(Proc Natl Acad Sci U S A. 107:8639, 2010)。この間葉系組織からのMUSE細胞の単離の報告は、研究代表者らが開発したCD133抗体を

用いたMACS法による単離法とともに、多能性組織幹細胞の単離法の確立に大きく道を拓いたが、これらの方法はなお安定してはならず、完全には確立しているとは言えない。通常、神経系へ分化しうる多能性幹細胞は細胞成長因子(FGFなど)、神経栄養因子等の添加により神経細胞へ分化誘導可能であるが、多能性幹細胞の種類によって分化誘導方法、分化誘導率はかなり異なる。神経細胞への分化能を有する多能性幹細胞に関して、研究代表者は神経幹細胞へVHL遺伝子を導入することで高率に神経細胞への分化誘導を示し(Cancer Res 2000)、連携研究者と研究代表者らは、骨髄間葉系幹細胞へ神経栄養因子と共にNotch遺伝子を導入することで高率に神経細胞への分化誘導を示した(J Clin Invest 2003)。更に、研究代表者はVHL蛋白の中で神経分化に関わるドメインをelongin BCの結合部位のアミノ酸配列であると同定し、そのドメインのアミノ酸配列からなるペプチド(神経分化ペプチド)を合成した(Protein Pept Lett 2009)。更に、この神経分化ペプチドを種々の多能性幹細胞(神経幹細胞、皮膚由来幹細胞、骨髄間葉系幹細胞)に導入して、高効率に神経細胞へ分化誘導することに成功し、これらの分化誘導された多能性幹細胞を神経疾患モデル動物(パーキンソン病・脊髄損傷)の脳・脊髄へ移植して、移植された細胞が神経細胞として機能して神経疾患モデル動物の症状が改善することを報告した(Neuroreport 2009; Stem Cell Dev 2009; Neuroreport 2010; J Neurosurg 2010)。これらのことから、神経系に分化しうる多能性組織幹細胞には神経分化ペプチドを導入することで、神経細胞へ分化誘導可能で、分化誘導された細胞をドナー細胞として用いた細胞移植治療は神経再生医療として期待できるものと考えられた。ただ、神経分化ペプチドとして合成したのは、VHL蛋白の中のドメインのアミノ酸配列のみであり、この配列は

BC ボックスモチーフ[(A,P,S,T)LXXXCXXX (A,I,L,V)]という構造の配列の一つにすぎず、BC ボックス蛋白群といわれる約 100 種類の蛋白群はすべてこの相同配列を含む。これらの BC ボックス蛋白群の BC ボックスモチーフ配列からなるペプチドは、いずれも elongin BC と結合して複合体を形成し elongin A と elongin BC との結合を阻害すると共に Stat3 の発現を阻害することによって神経分化誘導を示すと考えられた。現在のその内の 10 数種類を検討したところ、神経分化誘導活性があることが判明したが、活性の程度は様々であった。神経細胞には様々な subtype があり、BC ボックスモチーフ構造の多数のペプチドのうちで VHL 蛋白由来のペプチドは主にドーパミン作動性神経への誘導活性を示すことが判明しているが(Stem Cell Dev 2009; J Neurosurg 2010)他の種類の BC ボックスモチーフペプチドはどれが各種の神経への誘導活性を示すかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究ではまず神経系細胞への分化能を有する多能性幹細胞を採取容易な組織から効率よく単離する方法を現在報告されている方法を基盤にして安定してかつ高効率に単離できるように改良して確立し、また幹細胞を維持するための技術の開発を行い、これらの方法に基づいて実際にヒトの各種組織から神経系へ分化しうる多能性幹細胞を単離、維持する。また、神経分化ペプチドによる多能性幹細胞の神経分化機構を解明すると共に、多能性 VHL 蛋白由来以外の BC ボックスモチーフペプチドが多能性組織幹細胞に対してどの程度の神経分化誘導活性を示し、どの種類の神経への分化誘導活性を有するかと明らかにする。更に、BC ボックスモチーフ構造からなる神経分化ペプチド導入により、神経細胞へ分化誘導された多能性組織幹細胞を神経疾患モ

デル動物の神経系へ移植することで神経疾患モデル動物の症状が改善されるか、移植された細胞が神経細胞として機能しているかについて明らかにする。神経疾患モデルは、ラットを用いて作成し、パーキンソン病、脊髄損傷、網膜変性疾患について検討した。これらの研究ののちに、臨床応用のための臨床前研究として、少数の大型の動物(カニクイザル)を用いてこの研究の安全性、有効性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)神経分化ペプチドによる多能性組織幹細胞の神経分化誘導メカニズムの解明：神経分化ドメインを BC ボックスモチーフのアミノ酸配列を含む蛋白群において同定し、神経分化ドメインによる多能性組織幹細胞の神経分化誘導のメカニズムを解明する。神経分化ドメインによる神経分化誘導メカニズムは、神経分化ペプチドを導入した多能性幹細胞内で引き起こされる反応を検討した結果、神経分化ペプチドが elongin BC と結合し複合体を形成することによって、elongin A との結合を阻害すると共に、その複合体が Stat3 の発現の阻害を引き起こすことが判明しており、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幹細胞から神経細胞への分化が起こる可能性が高いと考えられた。Stat3 の発現阻害に関してはユビキチン/プロテアソーム系が関与している可能性があると考えられ、これを検証する。これらの検討は、ウエスタンブロット法および免疫沈降法にて行う。

また、RNA の伸長反応 (elongation) に促進的に関わる BC ボックス蛋白である elongin A 由来の BC ボックスモチーフペプチドは、その他の BC ボックス蛋白が元々 RNA の伸長反応に抑制的に関わることから、神経分化に対しても抑制的に関わ

ることが考えられる、実際に分化を抑制し、幹細胞維持に関わっているのかを検討する。また、このことから幹細胞維持機構を解明し、多能性組織幹細胞の幹細胞維持に対して、elongin A 由来の BC ボックスモチーフペプチドが有用かどうかを検討する。これらの検討は、位相差顕微鏡による形態学的検討、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫細胞化学、ウエスタンブロット法および免疫沈降法により行った。

なお以上の神経分化ペプチドによる多能性組織幹細胞の神経分化誘導メカニズムの解明に関しては、ラット神経幹細胞、ラット皮膚由来幹細胞を主に用いて行い、ヒトの皮膚由来間葉系幹細胞は細胞が単離する方法がほぼ確立されてから用いた。

(2)PTD-VHL ペプチドによる種々の多能性組織幹細胞の神経分化誘導の検討：神経分化ペプチドの一つであり、これまで神経分化活性を報告してきた VHL ペプチドを蛋白導入ドメイン (PTD) を付加して細胞膜透過性ペプチドとして F-moc 法にて化学合成する (研究協力者：東亜合成株式会社先端科学研究所長 吉田 徹彦)。この PTD-VHL ペプチドを種々の多能性組織幹細胞に導入して神経分化誘導について検討した。これらの検討は、位相差顕微鏡を用いた多能性幹細胞の形態変化の観察 (神経突起伸長など)、各種抗体 (Tuj-1, MAP2, Neurofiment-M, NeuN, TH, DAT, Pax6, Ach, GABA, GFAP, Nestin など) を用いた蛍光免疫細胞化学法およびウエスタンブロット法、RT-PCR 法にて行った。

(3)多能性組織幹細胞から神経分化誘導された細胞を用いた細胞移植療法の検討：神経分化ペプチドを導入した多能性組織幹細胞を神経疾患 (パーキンソン病、脊髄損傷、緑内障) モデル動物の中枢神経系へ移植して、幹細胞が神経細胞へ分化して神経細胞

として機能しているかどうか、病理組織学的解析 (PLP にて灌流固定後、凍結切片を凍結マイクロトームで作成し、ニューロンマーカー (Map2, Tuj1, NeuN, Neurofilament, Rodopsin) の発現を蛍光免疫染色により検討した。また、大型モデル動物としては、カニクイザルの緑内障モデルを用いて行いに行った。これらはいずれも神経分化ペプチドの安全性の検討から始めて、神経症状の改善、病理組織学的検討についても行った。

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神経幹細胞とラット皮膚由来間葉系幹細胞ならびに形成外科手術の際に得られた余剰な皮膚表皮より分離・培養したヒト皮膚由来間葉系幹細胞を用いた。ヒト皮膚由来間葉系幹細胞に関しては、その分離・培養方法に関して試行錯誤を続けたが、ラット皮膚由来間葉系幹細胞の樹立した方法に準じて行い、報告した (Int J Mol Sci. 14:9604-9617, 2013)。連携研究者である出澤らの報告した MUSE 細胞に関しては、出澤らが研究を進め、その確立した分離方法について報告した (Nat Protoc 8(7): 1391-415, 2013)。更に、Muse 細胞はヒト線維芽細胞だけでなく、ヒト脂肪組織由来幹細胞からも分離できることを報告した (Stem Cells Dev 23:717-728, 2014)。

ラット神経幹細胞およびラット皮膚由来間葉系幹細胞を用いて、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ボックス蛋白由来のペプチドが組織幹細胞へ導入されるとエロンジンCと細胞内で結合し、その直後に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エロンジンBCとエロンジンAとの結合を拮抗阻害することとStat3の分解が神経分化誘導を惹起しているもの考えられた(論文投稿中)。また、これを支持する知見として、神経膠腫幹細胞にVHL遺伝子を導入することにより、JAK/STAT系が抑制されるのが明らかとなり報告した(Int J Oncol. 42:881-6, 2013)。

霊長類を用いた動物実験については、神経分化誘導ペプチドであるVHLペプチドをカニクイザルの緑内障モデルの眼内(網膜)に直接注入して、神経再生(保護)効果を検討したところVHLペプチドに神経細胞が保護される効果が確認された(論文未発表)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Kanno H, Kubo A, Higashida T. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor

protein during neuronal differentiation of somatic stem cells and its application to neuronal regeneration. J Transl Med Epidemiol 2(1): 1013, 2014.

URL:<http://www.jscimedcentral.com/TranslationalMedicine/translationalmedicine-spivon-hippel-lindau-disease-1013.pdf>.

査読有

Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. Stem Cells Dev. 23(7):717-28. 2014
doi: 10.1089/scd.2013.0473. 査読有

Kanno H, Kubo A, Yoshizumi T, Mikami T, Maegawa J. Isolation of Multipotent Nestin-Expressing Stem Cells Derived from the Epidermis of Elderly Humans and TAT-VHL Peptide-Mediated Neuronal Differentiation of These Cells. Int J Mol Sci. 14(5):9604-9617., 2013. doi: 10.3390/ijms14059604. 査読有

Kanno H. Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells. World J Stem Cells. 5(4):163-171, 2013. doi: 10.4252/wjsc.v5.i4.163. 査読有

Kanno H, Sato H, Yokoyama TA, Yoshizumi T, Yamada S. The VHL tumor suppressor protein regulates tumorigenicity of U87-derived glioma stem-like cells by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway. Int J Oncol. 42(3):881-6. 2013
doi: 10.3892/ijo.2013.1773. 査読有

Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. Nat Protoc. 8(7):1391-415., 2013 doi: 10.1038/nprot.2013.076. 査読有

Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamasaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. J Invest Dermatol. 133(10):2425-2435, 2013 doi: 10.1038/jid.2013.172. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Kanno H, Kubo A, Yoshizumi T, Mikami T, Maegawa J: Isolation of multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells derived from epidermis of elderly humans and TAT-VHLpeptide-mediated neuronal differentiation of these cells. Annual Meeting 2013, Society for Neuroscience, San Diego, California, USA, 2013 年 11 月 12 日

Kanno H, Kubo A, Higashida T, Ito N: Identification of a neural Induction domain in BC-box proteins and neural induction of somatic stem cells by transfer of its domain peptide, The Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, 2012 年 3 月 8 日

菅野 洋, 久保篤彦, 東田哲博, 伊藤典彦: 多能性幹細胞の神経分化を誘導する機能性ペプチドを用いた神経再生医療の開発, 第 12 回日本分子脳神経外科学会, 横浜, 2011 年 10 月 12 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 1 件)

名称: 神経分化誘導ペプチド及びその利用
発明者: 菅野 洋, 吉田徹彦, 小林菜穂子
権利者: 菅野 洋, 東亜合成(株)
種類: 日本国特許
番号: 第 4934034 号
取得年月日: 2012 年 2 月 24 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 洋(KANNO, Hiroshi)
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号: 40244496

(2) 研究分担者

伊藤 典彦(ITO, Norihiko)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 80264654

(3) 連携研究者

出澤 真理(DEZAWA, Mari)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号: 50272323