

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 15501  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23659457  
 研究課題名（和文） ヒト神経系不死化細胞株の網羅的樹立と三次元モデル構成の試み  
 研究課題名（英文） Comprehensive establishment of human immortalized cell lines  
 originating from central and peripheral nervous system  
 研究代表者  
 神田 隆 (KANDA TAKASHI)  
 山口大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号： 40204797

研究成果の概要（和文）：本研究の主目的は、汎用性が高く、かつ元細胞の形質を完全に保持したヒト中枢神経系・末梢神経系構成細胞株を網羅的に作成し、個々の細胞の生物学的特性を把握する基盤を整備することである。2 年間の研究により、ヒト骨格筋微小血管由来内皮細胞と同周細胞（平成 23 年度）、ヒト脊髄微小血管由来内皮細胞と同周細胞（平成 24 年度）の不死化細胞株が樹立できた。細胞種によっては単離・不死化操作が極端に困難で未だ株化に至っていないものも多数残っており、網羅的な樹立にはさらなる研究の継続が必要である。

研究成果の概要（英文）：Human immortalized cell lines originating from central and peripheral nervous system are potent tool to understand the molecular and physiological properties of cells composing the human nervous system. The aim of this study is to comprehensively establish the human cell lines of central and peripheral nervous system origin which retain original cellular properties. In this study period, we finally established (1) microvascular endothelial cell line and pericyte cell line of human skeletal muscle, and (2) microvascular endothelial cell line and pericyte cell line of human spinal cord. These immortalized cell lines adequately keep cellular properties of cells in vivo, and thus will be widely used as potent research tools for the human muscle disorders and spinal cord diseases including multiple sclerosis and neuromyelitis optica.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経内科学、神経免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、神経内科学

キーワード：神経細胞学、神経免疫学、血液脊髄関門、不死化細胞株、内皮細胞、血管周細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経系構成細胞の機能を制御して難治性神経疾患の根本的治療を目指す、という戦略を立てた場合、それぞれの細胞の分子特性が十分に理解されているという大前提がクリアされる必要がある。各細胞のヒト不死化株はこの目的を達成するにあたっての最も重要なツールの一つであり、その必要性については疑念の余地がない。しかし、世界の多くの

研究室で“不死化細胞株”として使用されていた細胞の大多数は、単に SV40 large T antigen、ヒト papilloma ウイルス遺伝子などを transfect して“癌化”させたのみの細胞であり、ほとんどが元細胞の重要な蛋白を欠失しているだけでなく、多くは腫瘍化し、元細胞の形質を殆どとどめない形状に分化してしまう傾向が顕著であった。このため、不死化細胞株の解析による元細胞の性状の詳細

細な解析、あるいは、不死化細胞株を用いた生理的な *in vitro* 実験システムの構築といった本来の目的の達成にはほど遠い状況が続いていた。汎用性が高く、かつ元細胞の形質を完全に保持した優れたヒト神経系不死化培養細胞株は、その技術的困難から国内外とも殆ど確立されていなかったのが、本研究開始時点での現状であったといつてよい。

研究代表者の研究室では、この数年来適切な不死化遺伝子の選択や株化細胞の維持に最適な条件を探求してきた結果、温度感受性 SV40 large T 抗原とヒトテロメラーゼ遺伝子のレトロウイルスベクターを用いた **double transfection** が、ヒト細胞の不死化に最良の方法であるという結論を得、2010 年に至ってようやく、ヒトバリアー構成不死化細胞株に関する論文を複数上梓することができた (Sano et al. *J Cell Physiol* 2010; Shimizu et al. *J Cell Physiol* 2010)。この温度感受性 SV40 large T 抗原は通常の培養温度である 37°C で不活化するため、通常の培養環境では癌化遺伝子の活性化がおこっていない細胞として扱うことができ、また、生化学的・形態学的にも一次培養細胞とほぼ区別のつかない特性が継代を重ねても維持されるという利点をもつ。この不死化細胞作製を公表するや否や、国内外の多数の施設から細胞譲渡・共同研究の依頼があり、現在、国立精神・神経医療研究センター神経研究所、フランス・ナント大学、米国 UCSF 等に細胞が供与され、共同研究が進行中である。このシンプルな研究計画の実現はまさに世界から待たれていたものであり、最適な不死化条件が確立した現在、バリアー構成細胞に留まらず神経系のすべての細胞にこの不死化技術を応用し、神経系構成細胞の細胞学的特性を明らかにする基盤を整備するという本研究の目的が達成される背景がようやく成立した。

## 2. 研究の目的

(1) 研究代表者の確立した温度感受性 SV40 large T 抗原とヒトテロメラーゼ遺伝子のレトロウイルスベクターを用いた **double transfection** によるヒト不死化細胞株作製技術を更に発展させ、神経細胞を除くヒト中枢神経系・末梢神経系構成細胞の不死化細胞株を網羅的に作製する。樹立した不死化細胞株を用いて、個々の神経系構成細胞の生物学的特性を把握する基盤を整備すること。

(2) 複数種のヒト不死化細胞株を用いて神経系の *in vitro* モデルを再構築することにより、より生理的条件に近い形での実験系を樹立して難治性神経疾患の解明に寄与すること。この 2 年間で目的としたのはヒト脳血管モデルの構築である。

上記 2 点が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

文書による承諾の得られたヒト脳、末梢神経および骨格筋の剖検材料、または手術材料を用いる。十分な洗浄ののち、無菌操作下でのコラゲナーゼ、ディスパーゼによる細胞分離を含む定法にのっとり目的とする細胞の単離を行い、続いて一次培養を行う。培養皿上に複数のコロニーが形成された段階で、レトロウイルスベクターを用いて温度感受性 SV40 large T 抗原、続いてヒトテロメラーゼ遺伝子を **transfect** する。不死化形質を獲得した単独細胞を複数クローニングし、それぞれを樹立細胞株の候補とする。

候補各クローンについて、発現遺伝子を中心とした生化学的解析と生理学的解析を行う。目的とする細胞の *in vivo* での形質を最も良好に保持している細胞株をピックアップし、キーとなる分子の蛋白レベルでの発現を確認してヒト不死化細胞株の樹立とする。

上記の手技によって確立した不死化細胞株を複数組み合わせ、神経系の *in vitro* 三次元モデルを構築する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト骨格筋由来微小血管周細胞 (図 1)、微小血管由来内皮細胞 (図 2) の不死化細胞株が樹立できた。



図 1 ヒト骨格筋由来微小血管周細胞株。不整形、多角形の形態を示す。

(2) ヒト脊髄微小血管由来周細胞、同微小血管由来内皮細胞の不死化細胞株が樹立できた。

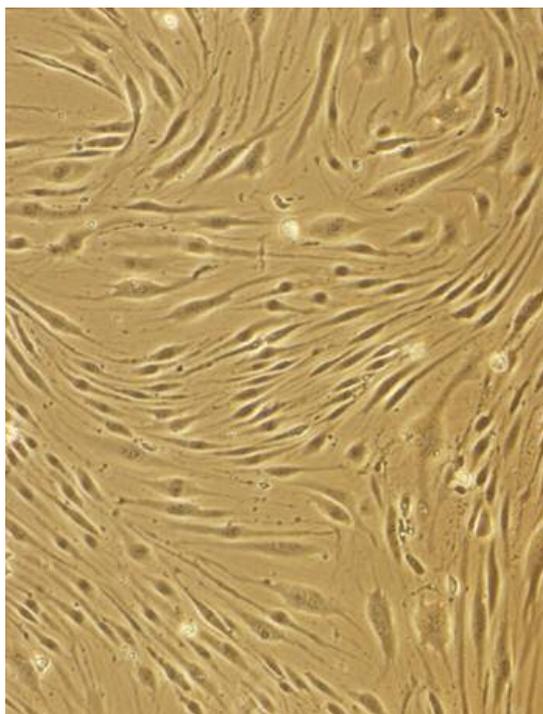


図 2 ヒト骨格筋由来微小血管内皮細胞株。紡錘形の形態は 20 継代以上維持可能であった。

骨格筋微小血管由来不死化細胞株については、ヒト壊死性筋症の代表的疾患である抗 SRP 抗体筋症患者の血清がこの血管周細胞の細胞死を惹起することを報告した (Manuscript in preparation)。また、後者についてはヒト脳および末梢神経バリアー由来内皮細胞・血管周細胞との比較を行い、脊髄微小血管由来内皮細胞・血管周細胞は独自の細胞学的形質を把持していることを確認した (Maeda et al. Clin Exp Neuroimmunol 2013, in press)。

当初の目的の 1 つであった脳血管 *in vitro* model の構築は、良好なヒト血管平滑筋細胞株の樹立ができなかったために研究期間中の達成は残念ながらできなかった。しかし、細胞株化の技術的情報はこの 2 年間で十分蓄積されており、継続する研究課題で達成し得るものと考えている。

##### 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 6 件)

- ① Yasuteru Sano, Yoko Kashiwamura, Masaaki Abe, Le-Ha Dieu, Jörg Huwyler, Fumitaka Shimizu, Hiroyo Haruki, Toshihiko Maeda, Kazuyuki Saito, Ayako Tasaki, Takashi Kanda. A stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its

barrier-specific nature, independent of the passage number. Clin Exp Neuroimmunol 4:2013, in press.

(査読有)

DOI: N/A

- ② Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Osamu Tominaga, Toshihiko Maeda, Masaaki Abe, Takashi Kanda. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of transforming growth factor- $\beta$  by pericytes and vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 by endothelial cells *in vitro*. Neurobiol Aging 34: 1902-1912, 2013. (査読有)

DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.012

- ③ Takashi Kanda: Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune-mediated neuropathies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 84: 208-212, 2013. (査読有)

DOI: 10.1136/jnnp-2012-302312

- ④ Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Toshiyuki Takahashi, Hiroyo Haruki, Kazuyuki Saito, Michiaki Koga, Takashi Kanda: Sera from neuromyelitis optica patients disrupt blood-brain barrier. J Neurol Neurosurg Psychiatry 83: 288-297, 2012. (査読有)

DOI: 10.1136/jnnp-2011-300434

- ⑤ Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Hiroyo Haruki, Takashi Kanda: Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase in the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. Neurochem Res 37: 401-409, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s11064-011-0626-8.

- ⑥ Masaaki Abe, Yasuteru Sano, Toshihiko Maeda, Fumitaka Shimizu, Yoko Kashiwamura, Hiroyo Haruki, Kazuyuki Saito, Ayako Tasaki, Motoharu Kawai, Tetsuya Terasaki, Takashi Kanda. Establishment and Characterization of Human Peripheral Nerve Microvascular Endothelial Cell Lines: A New *in vitro* Blood-Nerve Barrier (BNB) Model. Cell Struct Funct 37: 89-100, 2012.

(査読有)

DOI: org/10.1247/csf.11042

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 神田 隆、清水文崇、佐野泰照、尾本雅俊、田崎綾子、春木明代、大石真莉子. 抗 SRP 抗体陽性ミオパチー患者由来 IgG は筋内小血管ペリサイトの細胞死を誘導する. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 自己免疫疾患に関する調査研究平成 24 年度班会議、平成 24 年 12 月 14 日、丸ビルホールアンドカンファレンススクエア、東京

〔図書〕（計 1 件）

- ① 神田 隆. 中外医学社、Annual review 2013 神経、2013、pp.99-106.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

神田 隆 (KANDA TAKASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40204797