

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592567

研究課題名(和文) 聴神経再生治療を志向した骨髄由来間葉系幹細胞から聴神経分化誘導の高効率化

研究課題名(英文) High-Efficiency Differentiation of Auditory Neurons from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Aiming at Regenerative Therapy of Auditory Nerve.

研究代表者

下村 敦司 (Shimomura, Atsushi)

北海道医療大学・リハビリテーション科学部・教授

研究者番号：50340237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究の目的は、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)から聴神経を高効率に分化させる技術を開発することである。転写因子Tlx3とPax2は、聴神経の発生に必須な因子である。本研究で我々は、Tlx3とPax2がエピジェネティック酵素との相互作用を介し、聴覚神経の分化を制御していることを見つけた。我々の結果から、これら酵素の活性に影響する試薬が、BMSCから聴神経の高効率な分化誘導に役立つかもしれないことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study is to develop the technique for high-efficiency differentiation of auditory neurons from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC). The transcription factor Tlx3 and Pax2 is essential for auditory neural development. Here, we found that Tlx3 and Pax2 regulate auditory neural differentiation through their interaction with epigenetic enzymes. Our results suggest that reagents that can affect the activity of these enzymes might be useful for high-efficiency differentiation of auditory neurons from BMSC.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞 グルタミン酸作動性ニューロン 感音難聴 聴神経 再生治療 エピジェネティック

## 1. 研究開始当初の背景

聴神経変性により引き起こされる感音難聴では、一度失われた聴神経は再生されない。このため治療法が確立しておらず、聴覚障害は一生続くこととなる。それゆえ、失われた聴神経を補う再生治療は、このような感音難聴に対して最も有効な治療法となりうる。グルタミン作動性ニューロンは聴神経の 95% を占め、このニューロンを介して、有毛細胞や蝸牛神経核の神経細胞間で音情報の受け渡しを行っている。そのため、感音難聴の再生治療で聴神経の代替となる幹細胞由来ニューロンは、グルタミン作動性ニューロンの特性を有することが必要である。聴神経への分化過程では、転写因子 Tlx3 が興奮性グルタミン酸作動性ニューロンへの分化運命を、転写因子 Pax2 が抑制性 GABA 作動性ニューロンへの分化運命を決定することが報告されている。この 2 つの転写因子の機能発現のバランスにより、聴神経の分化運命は決定される。これまで私たち研究グループでは、骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone Marrow Stem Cells, 以下 BMSC とする) からグルタミン酸作動性ニューロン様細胞を産み出す技術開発を行ってきた。しかし、この方法による分化効率は、神経への分化効率は移植細胞中 0.6% (*in vivo* の場合) と著しく低い。

## 2. 研究の目的

上述の方法を応用研究や治療に展開するには分化効率が低すぎるため、その改善が求められる。本研究では、Tlx3 と Pax2 による聴神経分化の制御機構を明らかにし、その成果を基に、BMSC からグルタミン酸作動性ニューロン様細胞への分化誘導効率を向上させることである。

## 3. 研究の方法

(1) Tlx3 によるグルタミン作動性ニューロンへの分化機構を明らかにするために、Tlx3 と相互作用する因子の同定を生化学的方法により行った。

(2) Tlx3 の相互作用因子について、グルタミン作動性ニューロンへの分化過程における特性解析 (分子生物学的・細胞生物学的・生理学的解析) を行った。

(3) グルタミン作動性ニューロンへの分化過程における Pax2 の役割とその機能を調べた。具体的には、Pax2 に相互作用する因子の同定を生化学的方法により行った。

(4) Pax2 とその相互作用因子について、グルタミン作動性ニューロンへの分化過程における特性解析 (分子生物学的・細胞生物学的・薬理学的解析) を行った。

(5) Pax2 の機能抑制を行った際、BMSC からグルタミン作動性ニューロンへの分化効率への影響を細胞生物学的に解析した。

(6) BMSC の高効率分化誘導法の開発のために、培地容量を変えた際、BMSC からニューロンへの分化効率への影響を細胞生物学

的に解析した。

## 4. 研究成果

当初予定していた、siRNA を用いた Pax2 の発現抑制とオーディトリニューロパチーの動物モデルへの適応実験については、研究期間内に終わることができなかった。それ以外は、おおむね順調に進展することができ、いくつかの成果を上げることができた。さらに、BMSC からニューロンを大量に得る分化誘導法の発見という予期しない成果も得ることができた。本書で報告した一部の成果については、まだ論文発表に至っていないが、近日中に発表できるよう成果の取りまとめを行っている。研究成果を以下の (1) から (3) にまとめた。

### (1) Tlx3 によるグルタミン酸作動性ニューロン分化機構の解明

本研究では、Tlx3 がヒストンアセチル化酵素活性を有する転写共役因子 CREB Binding Protein (CBP) と、Tlx3 の DNA 結合領域であるホメオドメイン (HD) を介して直接結合することを免疫沈降法により明らかにした。Tlx3 を胚性幹 (ES) 細胞に強制発現させてニューロンへと分化誘導を行うと、その大部分の細胞がグルタミン酸作動性ニューロンへと誘導される。この細胞系を用い、Tlx3 の HD がグルタミン酸作動性ニューロンへの分化誘導に必須な領域であるのかを調べた。HD を欠失した Tlx3 (Tlx3- HD) を ES 細胞に強制発現し、分化誘導を行った。分化効率については、リアルタイム PCR、イムノブロットング、免疫染色法、フローサイトメトリーによるマーカー遺伝子発現により評価を行った。その結果、Tlx3 を発現させた ES 細胞よりも、Tlx3- HD を発現した細胞から誘導されるグルタミン酸作動性ニューロン数が優位に低いことが明らかとなった。さらに、Tlx3- HD 発現細胞から誘導されたグルタミン酸作動性ニューロンでは、グルタミン酸への応答も悪くなっていることが生理学的解析から示された。以上の結果から、Tlx3 と CBP 複合体形成を促進させることが、グルタミン酸作動性ニューロンへの分化効率への改善に繋がる可能性が示唆された。

さらに私たちは、Tlx3 と CBP の結合が、Pbx3 の存在下で増強されることを見つけた。Pbx3 は Tlx3 と協働して働く転写因子である。Tlx3 を強制発現させた ES 細胞をニューロンへと分化誘導すると、その大部分がグルタミン酸作動性ニューロンへと分化する。未分化状態の Tlx3 強制発現 ES 細胞では、Tlx3 と CBP は結合していない。しかし、ニューロンへの分化に伴い、Tlx3 と CBP は結合するようになる。Pbx3 の発現は、ニューロンへの分化誘導時に上昇してくる。これらの結果は、Pbx3 が Tlx3 と CBP 複合体形成を促し、これにより幹細胞をグルタミン酸作動性ニューロンへの分化へと誘導することを示唆して

いる。すなわち、Pbx3の強制発現が、BMSCからグルタミン酸作動性ニューロン様細胞への分化誘導効率を向上させる可能性を示している。

今回得られた結果はES細胞モデルを用いて得られたものであるが、BMSCに適応してその効果を調べることを今後予定している。

#### (2) Pax2のグルタミン酸作動性ニューロン分化への関与

Pax2はグルタミン酸作動性ニューロンへの分化を抑え、GABA作動性ニューロンへと分化に導く因子である。さらに、Pax2は転写共役因子であるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)と相互作用し、複合体を形成することが報告されている。これらの結果は、Pax2がHDACと協働し、GABA作動性ニューロンの分化を制御している可能性を示唆している。そこで、グルタミン酸作動性ニューロン分化誘導培地にHDAC阻害剤であるトリコスタチンA(TSA)またはバルプロ酸(VA)を添加した状態で、BMSCをニューロンへと分化させた。分化効率は、リアルタイムPCR法により各マーカー遺伝子の発現量で評価した。その結果、HDAC阻害剤の添加により、グルタミン酸作動性ニューロン特異的マーカー遺伝子の発現が増幅された。このように、BMSCの分化誘導時にHDACの機能を阻止すれば、グルタミン酸作動性ニューロンへの分化効率は改善される。

さらに、Pax2の機能抑制を効率的かつ特異的に行うために、Pax2によるGABA作動性ニューロンへの分化機構を調べた。神経芽細胞について、Pax2複合体構成因子の同定を免疫沈降法により行った。その結果、Pax2はヒストンメチル化酵素(HMTase)と相互作用することが明らかとなった。(論文投稿準備中)この結果から、BMSCからグルタミン酸作動性ニューロンへの分化過程においても、Pax2-HMTase複合体による転写制御が、グルタミン酸作動性ニューロンへの分化を抑制している可能性が示唆された。今後、siRNA法を用いたPax2の発現抑制、またはHMTase阻害剤によるPax2-HMTase複合体の機能抑制が、BMSCのグルタミン酸作動性ニューロンへの分化効率を向上させるのかどうかを検討予定である。

#### (3) 低容量分化誘導法の開発

低容量の分化誘導培地で、BMSCをニューロンへ、またはグルタミン酸作動性ニューロンへと分化誘導を行うと、アポトーシスによる死滅を防ぎ、規定培地量よりも多くのニューロンを得ることができると明らかにした。高価な誘導培地を減らすことができ、かつ得られるニューロンの収量も多く生産性が高いことから、この方法は再生医療において有用な技術となりえる。(論文掲載準備中)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Shimomura A, Patel D, Wilson SM, Koehler KR, Khanna R, and Hashino E. Tlx3 Promotes Glutamatergic Neuronal Subtype Specification through Direct Interactions with the Chromatin Modifier CBP. *PLoS One*. 2015 10:e0135060.

Iizuka-Kogo A, Senda T, Akiyama T, Shimomura A, Nomura R, Hasegawa Y, Yamamura K, Kogo H, Sawai N, and Matsuzaki T. Requirement of DLG1 for Cardiovascular Development and Tissue Elongation during Cochlear, Enteric, and Skeletal Development: Possible Role in Convergent Extension. *PLoS One*. 2015 10:e0123965.

Onouchi T, Kobayashi K, Sakai K, Shimomura A, Smits R, Sumi-Ichinose C, Kurosumi M, Takao K, Nomura R, Iizuka-Kogo A, Suzuki H, Kondo K, Akiyama T, Miyakawa T, Fodde R, and Senda T. Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. *Mol Brain*. 2014 7:21.

Shimomura A, Takasaki A, Nomura R, Hayashi N, and Senda T. Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit as a novel interaction partner of lymphocyte enhancer factor 1. *Med Mol Morphol*. 2013 46(1):14-19.

[学会発表](計3件)

Atsushi Shimomura, Dharmeshkumar Patel, Sarah M. Wilson, Karl R. Koehler, Rajesh Khanna and Eri Hashino. E. Essential role for CBP in Tlx3-mediated neuronal differentiation from embryonic stem cells.

36th annual Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, USA, February 16-20, 2013

Atsushi Shimomura, Dharmeshkumar Patel, Sarah M. Wilson, Karl R. Koehler, Rajesh Khanna, Eri Hashino. Tlx3 promote glutamatergic neuronal differentiation through the interaction with epigenetic co-factor CBP. 第 120 回日本解剖学会学術集会 2015 年 3 月 21 日～23 日 兵庫 神戸市

下村 敦司, Dharmeshkumar Patel, Sarah M. Wilson, Karl R. Koehler, Rajesh Khanna, Eri Hashino. Tlx3 はエピジェネティック因子 CBP との相互作用によりグルタミン酸作動性ニューロンへの分化を運命づける. 第 60 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 2014 年 9 月 6 日～7 日 福島 福島市

〔図書〕(計 1 件)

Shimomura A and Hashino E. Epigenetic Regulation of Neural Differentiation from Embryonic Stem Cells. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision* 2013:305-325.

〔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

下村 敦司 (SHIMOMURA ATSUHISI)  
北海道医療大学・リハビリテーション科学部・教授  
研究者番号：50340237

(2) 研究分担者

向後 晶子 (KOGO AKIKO)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：20340242

野村 隆士 (NOMURA RYUJI)  
藤田保健衛生大学・医学部・講師  
研究者番号：20325161

(3) 連携研究者

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号：70312501