

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659655

研究課題名(和文) 多能性間葉系幹細胞へのBC-boxモチーフペプチド導入による神経分化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuronal differentiation of pluripotent mesenchymal stem cells by intracellular delivery of BC-box motif peptides

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、BCボックス蛋白群が有しているElongin BCと結合するアミノ酸配列であるBC-boxモチーフ構造[(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)]が、神経分化ドメインであることを突き止め、BC-boxモチーフペプチドは、Elongin BCと結合して複合体を形成するとJAK2/Stat3の発現を制御し多能性間葉系幹細胞を神経細胞へ分化誘導することが示唆された。種々のBC-boxモチーフペプチドと特異的神経マーカーのプロモーターとの関連を網羅的Chipアッセイにて調べるとBC-boxモチーフペプチドはそれぞれ特異的な神経マーカーへの結合が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study we used neural stem cells and skin-derived mesenchymal stem cells as pluripotent somatic stem cells to neuronal lineage. BC-box proteins-derived functional peptides corresponding to BC-box motif structure [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)], showing induction activity of neuronal differentiation, are delivered to those somatic stem cells. Different BC-box motif peptides induced to differentiate different type of neuron, but two kinds of somatic stem cells differentiated to same neurons. This mechanism of neuronal differentiation is suggested to be related to blocking of binding between elongin BC & A, and inhibition of JAK2/Stat3, but is under investigation. From these results, it is considered that this study will contribute to neuronal regenerative medicine using somatic stem cells differentiated to useful neurons.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：多能性間葉系幹細胞 BC-boxモチーフペプチド 神経分化誘導

1. 研究開始当初の背景

あらゆる臓器の細胞へ分化する多能性幹細胞には、ES細胞やiPS細胞の他に、間葉系細胞に含まれる一部の細胞集団が存在することが明らかとなっている(PNAS 2010)。この多能性間葉系幹細胞は、iPS細胞などと同様にあらゆる臓器の細胞へ分化することができ、神経細胞へも分化する。これまで、研究代表者は、BC-boxモチーフペプチドの一種であるVHLペプチドが、主にドーパミンニューロンへの分化誘導活性があることを明らかにし、VHLペプチドを導入したラット皮膚由来の多能性間葉系幹細胞をパーキンソン病モデルラットの脳へ移植すると移植した細胞がドーパミンニューロンへ分化し、パーキンソン病モデルラットの神経症状が改善されることを示してきた(Stem Cells Dev 18 : 1523-1532,2009; J Neurosurg 113:648-655, 2010)。また、最近ではBC-boxモチーフペプチドの一種であるSOCS7ペプチドがacetyl cholinesterase(ChAT)陽性のモーターニューロンへの分化誘導活性があることを報告した(第70回日本脳神経外科学会総会、2011)。このほかにBC-boxモチーフペプチドの一種であるASB3ペプチドに網膜神経細胞の局在蛋白であるロドプシンの陽性細胞への分化誘導活性があることも判明している(未発表データ)。これに対して、BC-boxモチーフペプチドの一種であるelonginAペプチドは神経分化誘導ではなく、逆に幹細胞を未分化の状態に維持させる作用があることが判明している(未発表データ)。BC-boxモチーフペプチドによる幹細胞の神経分化制御機構は、幹細胞に発現しているStat3の発現抑制と関係があると考えられ、BC-boxモチーフペプチドがVHLやSOCS7などのSOCS-box群の場合は、elonginCと結合し複合体を形成後ユビキチン/プロテアソーム系を通じてStat3

を分解することによりグリアへの分化を抑制してニューロンへの分化を進めるが、BC-boxモチーフペプチドがelonginA群の場合はelonginCと結合しmRNAの伸長反応を進めて細胞の分化を阻害すると考えられる。ただし、この機構については完全に明らかになっている訳ではなく、とくにユビキチン/プロテアソーム系の関与については反応系全体から推測されているに過ぎない。また、BC-boxモチーフペプチドのわずかなアミノ酸の違いにより構造異同により、分化するニューロンの種類や分化誘導効率が異なっていたり、あるいは全く逆に分化を抑制するが、このことに関しては全く解明されていない。更に、こうして多能性間葉系幹細胞をBC-boxペプチド導入により種々のニューロンへ分化させた細胞をドナーとした再生医療もまだ動物実験を進めている段階であり、これらを臨床応用すること重要な課題である。

2. 研究の目的

研究代表者は、種々のBC-box motif ペプチドを多能性間葉系幹細胞へ導入すると、elonginAペプチド以外のBC-box motif ペプチドでは様々なニューロンへ分化誘導するが、elonginAペプチドでは分化を抑制することを見出した。これまで、研究代表者は、BC-boxモチーフペプチドの一種であるVHLペプチドが、主にドーパミンニューロンへの分化誘導活性があることを明らかにし、VHLペプチドを導入したラット皮膚由来の多能性間葉系幹細胞をパーキンソン病モデルラットの脳へ移植すると移植した細胞がドーパミンニューロンへ分化し、パーキンソン病モデルラットの神経症状が改善されることを示してきた。また、最近ではBC-boxモチーフペプチドの一種であるSOCS7ペプチドがacetylcholinesterase(ChAT)陽性のモーターニューロンへの分化誘導活性があ

ることを報告した。このほかにBC-box モチーフペプチドの一種であるASB3ペプチドにロドプシンの陽性細胞への分化誘導活性があることも判明している。これに対して、BC-box モチーフペプチドの一種であるelonginA ペプチドは神経分化誘導ではなく、逆に幹細胞を未分化の状態に維持させる作用があることが判明している。このようにBC-box モチーフペプチドのわずかなアミノ酸の違いにより構造異同により、分化するニューロンの種類や分化誘導効率が異なっていることに関しては全く解明されていない。

上記をふまえ本研究では、BC-box モチーフペプチドの多能性間葉系幹細胞内への導入による神経分化制御機構を解明し、BC-box モチーフペプチド導入細胞をドナー細胞とする神経再生医療を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 多能性間葉系幹細胞の分離・培養：多能性間葉系幹細胞として、ラット皮膚由来の多能性間葉系幹細胞とヒト皮膚線維芽細胞より分離した多能性間葉系幹細胞を用いた。
- (2) BC-box motif ペプチド合成：BC-box motif ペプチドは、固相法にて化学合成した18種類(SOCS-BOX family, VHL-box family, Virus family, elongin A family)を用いた。
- (3) BC-box motif ペプチド導入による神経分化機構の解明：BC-box motif ペプチド導入により、多能性間葉系幹細胞が種々のニューロンに分化するメカニズムについて、Stat3 阻害機構を中心に検討を行った。

多能性間葉系幹細胞の分離・培養

現在、研究代表者はウイスターラッ

ト新生仔背部真皮より樹立した多能性間葉系幹細胞を保持している (Stem Cells Dev 18: 1523-1532 2009)。これは論文中にも記載してあるように多分化能を有する幹細胞であり、BC-box motif モチーフの一種であるVHLペプチドを導入することにより、主に中脳のドーパミンニューロンへ分化する (Stem Cells Dev, 18 1523-1532 2009; J Neurosurg, 113:648-655, 2010)。本研究で主に使用する細胞の一つとして、この細胞を用いる。この細胞の培養方法は、Stem Cells Dev 2009に記載した方法に従って行う。この他には、将来の臨床応用を視野において、ヒト皮膚線維芽細胞より、Dezawaらの報告した多能性間葉系幹細胞であるMUSE細胞を分離・培養する。ヒト皮膚線維芽細胞は原則として購入した細胞(LONZA社)を用いる。MUSE細胞の分離・培養方法は、Dezawaらの方法に準じて行い、多能性幹細胞のマーカーである抗SSEA-3抗体を用いて細胞分離装置(ミルテニー社 AutoMACS)により分離し、培養した。

BC-box motif ペプチド合成

以下の配列のペプチドを蛋白導入ドメイン modified HIV-TAT (YARAAARQARA) を結合させて、ペプチド合成装置にて固相法にて合成した。

SOCS-box family

SOCS1 PLQELCRQRIVA AVG,
SOCS2 TLQHFCRLA INKCT
SOCS3 TLQHLCRKTVNGHLD,
SOCS4 SLQHICRTVICNCTT
SOCS5 SLQYICRAVICRCTT,
SOCS6 SLQYLCRFVIRQYTR
SOCS7 SLQHLCRFRIRQLVR,
ASB 1 TLLSLCRVAVRRALG,

ASB2 PLAHLCLRLVRKAIG,
ASB3 SLTHLCRLEIRSSIK,
WSB1 SLOHICRMSIRRVMS,
WSB2 SLKHLCKALRSFLT
RAR1 SLQDLCCRAVVSTP,
SSB1 PLMDLCRRSVRLALG

Virus family

HIV-1 Vif A SLOYLALKALVTPKK

VHL-boxfamily

VHL TLKERCLQVVRSLVK,
hLRR-1 TLLESSARTILHNRI

Elongin A family

hEloA TLHQQCIRVLKNNI

4. 研究成果

本研究において、研究代表者らは、
elongin BC をリガンドとする BC ボックス
蛋白群が神経幹細胞のみならず多能性間葉
系幹細胞の神経分化制御に関わっており、
elongin BC と結合するアミノ酸配列であ
る BC ボックスモチーフ構造
[(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)]が、
神経分化ドメインであることを突き止めた。
BC ボックスモチーフ構造は、哺乳類の細
胞のみならず、ウイルスにも認められるこ
とから、生物進化の過程において保存され
た重要な構造であると考えられる。BC ボ
ックス蛋白群は、elongin BC と結合するモ
チーフ (BC box motif) を持つことからそ
う呼ばれるが、転写因子 Stat3 を制御する
SOCS-box 群は、elongin BC と結合して
SBC 複合体を形成すると Stat3 の発現を制
御し多能性幹細胞を神経細胞へ分化誘導す
ることが示唆されていた。このため、多能
性間葉系幹細胞の細胞内へ BC-box モチー
フペプチドを導入した際に様々な種類の神
経細胞への分化が何故引き起こされるのか
を検討した。その結果、BC-box モチーフ
ペプチドを細胞内へ導入すると
JAK/STAT 系が抑制されることが Western
blotting の結果から明らかとなり、この反

応は JAK2 の発現をまず制御することから
始まることが示唆された。次に、VHL、
SOCS5、SOCS7 由来の 3 種類の BC-box
モチーフペプチドを多能性間葉性幹細胞へ
導入して、神経マーカーのプロモーターと
の関連を網羅的 Chip アッセイにて調べて
みると 3 種類の BC-box モチーフペプチド
はそれぞれ特異的な神経細胞への分化に直
接関わっていることが明らかとなった。ま
た、elongin BC に結合して機能する
BC-box モチーフペプチドの最小数のアミ
ノ酸配列を検討し、7 個のアミノ酸配列が
最小であることが判明した。

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 4 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-spil-von-hippel-lindau-disease-1013.pdf>. 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/ijco.2013.1773. 査読有

〔学会発表〕(計 1 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

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