

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293415

研究課題名(和文) 幹細胞に依存しないエピジェネティクス制御を利用した新たな組織再生医療の確立

研究課題名(英文) Neurogenic differentiation potential of mouse osteoblastic cell line

## 研究代表者

里村 一人 (Satomura, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療実現のための細胞源として、生体内で最終分化した細胞に対して遺伝子導入を伴わない分化転換により目的とする機能細胞を確保する可能性につき検討した。その結果、特定組成の神経細胞分化誘導因子の存在下に骨芽細胞は神経細胞様細胞形態へと分化転換し、特有のタンパク質を発現することが確認された。さらにこれらの細胞をマウス脊髄損傷モデルに移植したところ、後肢の運動回復が確認でき、組織学的免疫細胞組織学的にも脊髄の機能の回復が認められた。これらのことから、最終分化した細胞でも適切な分化誘導環境におくことで遺伝子導入を伴わない分化転換現象が起こりうること、その細胞は再生医療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the new method for direct reprogramming of adult somatic cells into different cell type by changing environment around cells without gene transfection of transcriptional factors. As a result, mouse osteoblastic cells cultured under the neural conditioned medium were induced transdifferentiation into neural cells. These cells expressed some proteins related neural cells. Moreover, to elucidate the possibility that these cells could be use as the cell source for regenerative medicine of spinal cord, these cells were transplanted with mouse spinal cord injury model. As a result, recovery of motor function of hind limbs was confirmed. Moreover, it is indicated that these cells could produce/secretion some neurotrophic factors. From these findings, it is suggested that adult somatic cells could be a source of regenerative medicine without gene transfection.

研究分野：外科系歯学

キーワード：再生医療 分化転換 機能細胞 脊髄損傷

## 1. 研究開始当初の背景

現在行われている生体臓器移植や人工臓器移植などの先端医療には、それぞれ拒絶反応や耐久性、機械的強度などのさまざまな問題点や限界があり、Quality of Life の向上を目指す上で細胞を用いた再生医療の果たす役割は大きい。再生医療においては、安定した幹細胞の供給源を確保することはきわめて重要であり、胚性幹細胞 (ES 細胞) や成体幹細胞、あるいは人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた研究が進められている。しかし、細胞の安定性等の生物学的制約や倫理的問題、分離・同定法の未確立、さらにはウイルスベクターを用いた遺伝子導入に伴う安全性の確保など、安全で確実な再生医療実現のためには未だ克服すべき点が多い。そのため、新たな視点に立った、細胞源の確保と安定的な供給は急務であると言える。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、再生医療に利用する細胞を、従来のような幹細胞 (すなわち、クローン技術により作製する ES 細胞や効率的選別・分離方法が確立されていない成体幹細胞、あるいは造腫瘍性の懸念が克服されていない iPS 細胞) ではなく、生体内において最終分化したと考えられる種々の細胞 (骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、神経細胞、血管内皮細胞など) とし、これらの細胞への遺伝子操作を行うことなく、他の機能細胞に分化転換させる方法を確立し、併せてこの分化転換現象がエピジェネティックな変化なものであることを確かめるとともに、積極的なエピジェネティクス制御を駆使することによる新たな視点からの再生医療の実現を目的としている。そこで本研究期間においては、まず、分化転換の対象とする細胞を顎口腔領域から比較的簡単に採取が可能な骨芽細胞とし、骨芽細胞を神経細胞に安定的に分化転換させ、分化転換により作製された神経細胞の分子細胞生物学的特性について確認するとともに、*in vivo* における神経組織の再生への応用の可能性について実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨芽細胞から神経細胞への分化転換

特定組成の神経細胞分化誘導因子の存在下にマウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞の分化転換を行い、表現型の変化を経時的に観察するとともに、神経細胞の特徴である細胞突起 (dendrite および axon) の形成・伸長を形態学的に観察する。さらに神経細胞の分化マーカーである neurofilament 200、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、Tuj-1 (Neuron-specific class III beta-tubulin) 等の遺

伝子発現 (real-time RT-PCR 法)、タンパク質発現 (Western blotting 法、免疫細胞化学的手法) を指標として神経細胞への分化状態を確認する。

### (2) 分化転換後の細胞の機能について検討

分化転換により作製した細胞が実際に神経細胞としての機能を有しているか否か、NGF 刺激に対する電気生理学的応答性を細胞外誘導法により検討する。また、膜電位感受性蛍光色素である Di-8-ANEPPS を用いて分化転換した細胞に通電刺激を行い、膜電位の変動を測定することにより、神経細胞の機能を有することを確認する。また、*in vitro* において分化転換した神経細胞の軸索を、AXIS™ (Axon Investigation System) を用いて計測し、神経細胞としての機能の定量的評価を行う。

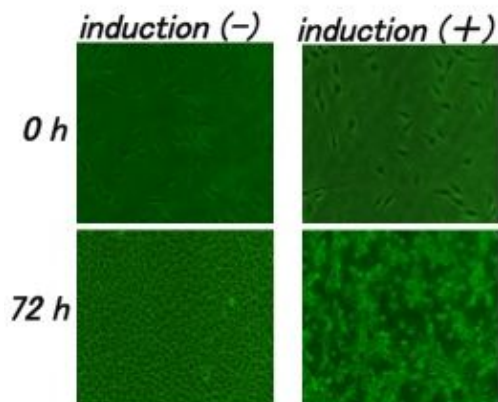
### (3) 機能細胞の再生医療への応用の可能性の検討

GFP 標識した MC3T3-E1 細胞を、前述の分化転換条件で培養し神経細胞へと分化転換させた後、あるいは、細胞をそのまま、マウスに人工的に作製した脊髄損傷部位に移植する。その時の経時的なマウスの後肢運動能の回復につき経時的に観察する。また、その時の経時的な組織変化と細胞の局在、分布について GFP をマーカーとして追跡観察する。さらに再生部位のタンパク質発現を免疫細胞化学的手法により確認し、分化転換により作製された神経細胞が実際に生体内において神経再生に関与することを明らかにする。

## 4. 研究成果

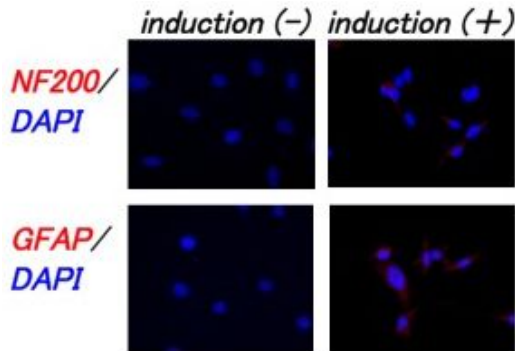
### (1) 骨芽細胞から神経細胞への分化転換結果

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、特定の条件下で培養すると、遺伝子導入することなく、神経細胞様の形態、つまり、細胞突起様の形成・伸長を確認できた。



## (2) 分化転換後の細胞機能検討の結果

さらに、このとき、神経細胞関連分子として知られるニューロフィラメント 200 や GFAP を指標に免疫細胞化学的手法によりタンパク質発現を検討した結果、この分化転換後の細胞にこれらのタンパク質が発現していることが確認できた。



また、電気生理学的検討により、分化転換した細胞を NGF 刺激したところ、電位変化が確認でき、分化転換後細胞は神経細胞としての機能を有している可能性が示唆された。

以上のことから、遺伝子導入を伴わない培養条件のみによる機能細胞の分化転換が可能であることが示唆され、これらは、細胞がおかれた環境によるところが大きいことが示された。

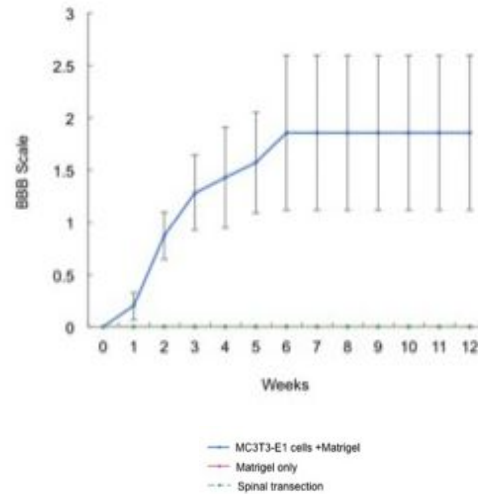
以上をまとめると、MC3T3-E1 が骨芽細胞から神経細胞への分化転換能を有し、それが細胞を取り巻く環境によって誘導されることがわかり、そこから考慮すると、中枢神経系の再生医療においても、周囲環境を整えば分化転換現象を利用した細胞再生医療が可能になるのではないかという仮説の下、マウス脊髄損傷モデルを作成し、その損傷部へ直接 MC3T3-E1 を移植することで、神経再生が可能か否かについて検討を進めた。

## (3) 機能細胞の再生医療への応用

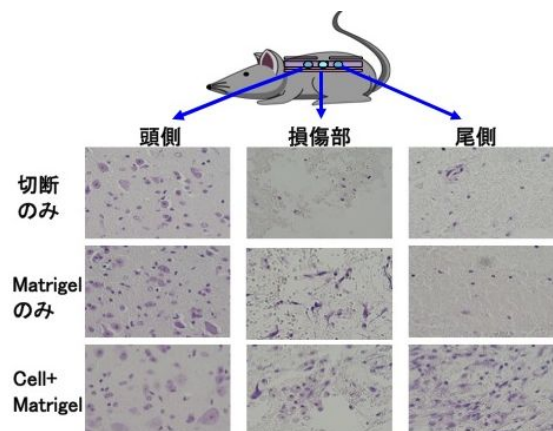
機能細胞である骨芽細胞を用いて中枢神経再生が可能か否かを検討するために、まずマウスを用いて脊髄損傷モデルを作成した。マウス第 10 胸椎を露出させ、これを幅 2 mm で切断し、後肢の完全な運動機能障害が出現することを確認した。

この脊髄損傷モデルマウスに対して、脊髄損傷と同日に GFP 標識した MC3T3-E1 細胞とマトリゲルを混和して損傷部に移植し、コントロール群としてマトリゲルのみの移植群と切断のみの群を準備した。切断後 1 週間おきに後肢運動機能を BBB Scale (後肢運動機能を視覚的に点数評価する基準) にて評価し、切断後 5 日目と 12 週目に組織学的検討も行った。

その結果、脊髄切断後、切断のみを行った群とマトリゲルのみ移植のコントロール群では 12 週後も後肢の運動機能は完全に失われたままであったが、マトリゲルに MC3T3-E1 を混和し移植した群では、後肢を大きく動かせる程度まで運動機能の回復が認められた。

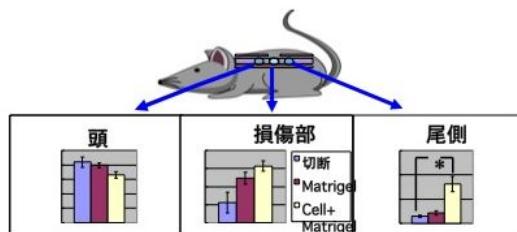


そこで、脊髄切断部の組織学的検討を行った。その結果、切断後 5 日目の脊髄損傷部では、切断のみの群では脊髄が断裂しており、神経の変性が起こっていることが確認できた。マトリゲルのみ移植群と細胞移植群ではそれに加えて損傷部にマトリゲルが存在していた。この各群の頭側では組織所見に明らかな違いは認められなかったが、尾側において、その違いが明らかとなった。つまり、切断のみの群とマトリゲルのみ移植群では脊髄組織の変性、細胞数の減少が認められたが、一方、細胞移植群では、多くの細胞が存在していることが確認できた。また、脊髄損傷部では、切断のみの群で細胞数の著しい現象や変性が認められ、マトリゲルのみ移植の群ではマトリゲル中に少数の紡錘形細胞が散在していた。細胞移植群にはマトリゲル中に多くの類円形の細胞が認められた。

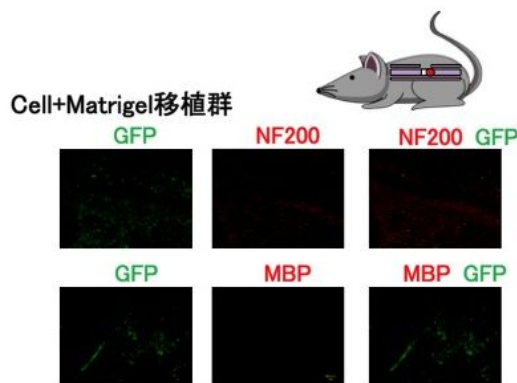




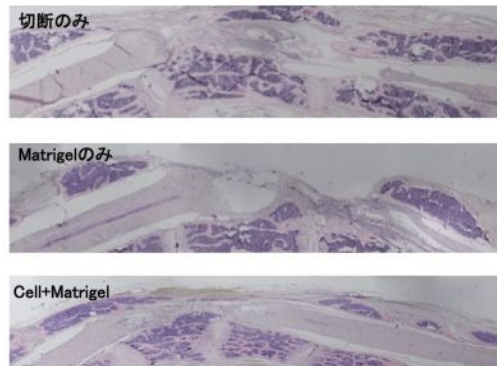
そこで、脊髄損傷部およびその頭側と尾側における細胞数を比較したところ、頭側においては各群管に有意差はなく、損傷部においては切断のみの群に対してマトリゲルのみ移植群および細胞移植群において細胞数が多い傾向が認められた。一方、尾側においては、細胞移植群において切断のみの群とマトリゲルのみ移植群と比較し、有意に多くの細胞が認められた。



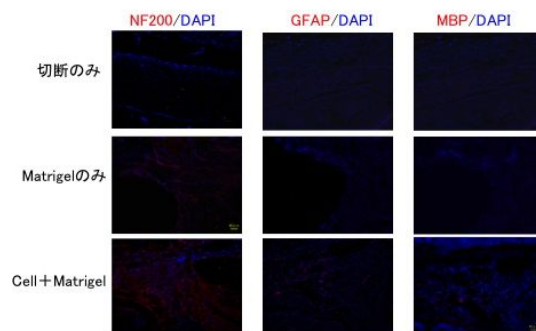
また、この尾側において、神経細胞関連因子であるニューロフィラメント 200 およびミエリンベースックプロテインのタンパク質発現について免疫組織化学的に検討したところ、切断のみの群、マトリゲルのみ移植群ではともに陽性細胞は認められなかったのに対し、細胞移植群では損傷部に GFP 陽性細胞が認められ、損傷部に近接する尾側の組織にニューロフィラメント 200 陽性細胞も認められたが、両者の局在は一致しなかった。一方、ミエリンベースックプロテイン陽性細胞は認められなかった。



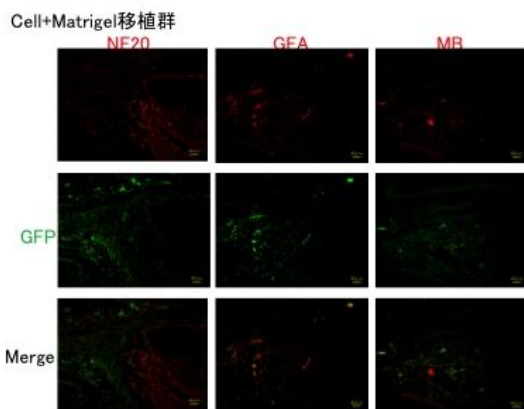
さらに脊髄損傷後 12 週目では、組織学的検討を行うと、切断のみの群、マトリゲルのみ移植群では、損傷部から尾側にかけて脊髄の断裂や萎縮が認められるが、一方で、細胞移植群では、損傷部脊髄の萎縮は認められるものの、尾側においてほぼ正常な脊髄組織が維持されていた。



このときの神経細胞関連分子のタンパク質発現についても、ニューロフィラメント 200、GFAP、ミエリンベースックプロテインを指標として検討すると、損傷部に近接する尾側の領域において、切断のみの群では少数のニューロフィラメント 200 陽性細胞の存在が認められたのに対し、GFAP、ミエリンベースックプロテインの発現は認められなかった。マトリゲルのみ移植群においても、損傷部に近接する尾側においてニューロフィラメント 200 の陽性細胞が認められるのみであった。一方、細胞移植群においては、多数のニューロフィラメント 200 陽性細胞に加えて、少数の GFAP 陽性細胞およびミエリンベースックプロテイン陽性細胞が認められた。



そこで、これらの陽性細胞が移植骨芽細胞であるかどうかを確認するため、GFP の局在との関連を比較検討した。その結果、GFP 陽性を示す移植細胞にはニューロフィラメント 200 の発現は認められず、GFAP およびミエリンベースックプロテインの発現が確認された。



以上の結果から、骨芽細胞株 MC3T3-E1 が神経細胞様細胞への分化転換能を有していること、脊髄損傷モデルにおいて骨芽細胞を移植することで後肢運動機能障害が改善すること、骨芽細胞を移植することで損傷部より尾側の脊髄の変性が抑制されること、移植骨芽細胞が GFAP やミエリンベースックプロテインを発現し、その周囲の細胞でニューロフィラメント 200 の発現がみられるようになること、が確認できた。これらのことから、細胞移植によって後肢運動機能が改善したメカニズムとしては、移植骨芽細胞がアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化することにより、損傷部周囲の組織に対し保護効果をもたらすとともに、ニューロトロフィックファクターなどの産生・分泌による神経再生へのサポート的な効果をもたらしたことによる可能性が考えられた。今後はさらに検討を重ね、より安全で効率的な機能細胞による再生医療実現を目指していく予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

戸田(徳山)麗子、館原誠晃、手塚充樹、今村武浩、井出信次、田所 晋、梅木泰親、竹部祐生亮、福島龍洋、寺田知加、里村一人 分化転換現象を利用した骨芽細胞による新たな神経再生、第 25 回日本口腔内科学会学術大会、2015 年 9 月 18 日～19 日、大阪大学吹田キャンパス、大阪府吹田市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

### (2)研究分担者

館原 誠晃 (TATEHARA, Seiko)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90380089

徳山 麗子 (TOKUYAMA, Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

井出 信次 (IDE, Shinji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00611998

富岡 重正 (TOMIOKA, Shigemasa)

徳島大学・大学院医歯薬顎研究部・准教授

研究者番号：70188770