

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07752

研究課題名(和文) 犬組み換え線維芽細胞増殖因子を用いた幹細胞を利用しない脊髄再生医療の確立

研究課題名(英文) Establishment of regenerative medicine for spinal cord injury using bFGF without stem cells

研究代表者

枝村 一弥 (EDAMURA, Kazuya)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80366624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)含有の神経分化誘導培地で犬の骨髄間質細胞(BMSCs)を培養したところ、生理学的な機能を有するニューロンへと分化させることができ、そのメカニズムの一部も解明した。次いで、脊髄損傷の犬への臨床応用を目指し、犬遺伝子組換えbFGF(rc-bFGF)を精製した。犬のBMSCsをrc-bFGFで刺激したところ、神経活動のあるニューロンへと分化させることに成功した。これらの結果から、rc-bFGFは犬の神経再生医療に貢献できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Canine bone marrow stromal cells (BMSCs) were incubated with the basal medium for neurons containing recombinant human basic fibroblast growth factor (rh-bFGF). The rh-bFGF treatment resulted in the differentiation of canine BMSCs into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells, and we also clarified a part of the mechanism. In this study, canine recombinant basic fibroblast growth factor (rc-bFGF) was synthesized with a wheat germ cell-free protein synthesis system. When our synthesized protein was added to HEK293 cells, the expression of pERK was confirmed. The result suggested that our synthesized protein was rc-bFGF and had the functions as bFGF. When canine BMSCs were incubated with bFGF, the cell shape changed to neuron-like morphology. In addition, rc-bFGF induced differentiation of canine BMSCs into voltage- and glutamate-responsive neurons. The rc-bFGF might contribute to regenerative therapy for neuron in dogs.

研究分野：獣医外科学

キーワード：犬 塩基性線維芽細胞増殖因子 再生医療 骨髄間質細胞 脊髄損傷 神経再生 動物 無細胞蛋白質合成技術

1. 研究開始当初の背景

外傷や椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷は、犬で最も多く遭遇する神経疾患である。重症例では現在の医療技術を駆使してもその機能回復は困難であり、車椅子での生活を余儀なくされている。最悪のケースでは安楽死も選択され、未だ脊髄損傷の画期的な治療法は確立していない。

近年、重度な脊髄損傷の治療のひとつの選択肢として幹細胞を用いた脊髄再生医療が注目されており、人医療のみでなく獣医療においても臨床研究が盛んに行われている。現在までに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、胚性幹細胞 (ES 細胞)、神経幹細胞、嗅球上皮細胞、脂肪組織由来幹細胞、脱分化脂肪細胞、骨髄間質細胞 (Bone marrow stromal cells; BMSCs) が脊髄再生医療のための細胞源の候補として検討がなされている。当研究室ではこれらの細胞の中で採取および培養が容易で、多分化能を有し、神経系への分化も確認されている骨髄間質細胞が、犬における最も現実的な脊髄再生のための細胞源と考える研究を行ってきた。

しかし、残念なことに未だ実用化に至らず、培養時における異種血清の使用、腫瘍形成の危険性、培養にかかわる費用、移植後の細胞の定着性などの問題から、幹細胞療法の限界に直面している。このように、幹細胞を用いた脊髄再生医療を確立するためには越えるべき壁が多い。最近になり、当研究室では犬の骨髄間質細胞を生理学的な機能の有するニューロンへと分化させることに世界で初めて成功し報告をした。その研究の過程で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が犬の幹細胞の生存やニューロン分化に関与する極めて有力な因子であることも明らかになった。もし、bFGF が損傷脊髄内に元来存在する幹細胞を、機能の有する成熟したニューロンへと分化させることができれば、幹細胞の移植をすることなくより低コストで安全性の高い脊髄再生医療を達成できる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は、犬の組換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を用いたサイトカイン療法を構築し、幹細胞を利用することなく脊髄損傷の動物の治療成績の向上を目指す極めて臨床的で実証的な研究である。現在まで、我々は幹細胞を用いた再生医療の研究に従事してきたが、異種血清の混入、腫瘍形成の危険性、移植後の細胞の定着性などの問題から実用化をするためには越えるべき壁が多い。我々は、bFGF が犬の幹細胞を機能の有するニューロンへと分化することを世界で初めて明らかにしており、それを治療へと展開することで幹細胞を用いずに脊髄再生を目指す独創的で貴重な研究である。これらの研究成果は、幹細胞を用いた再生医療よりも早期の実現化が予想できるだけでなく、ヒトの臨

床応用に向けた基礎データとしても有用性が高い。

3. 研究の方法

(1) 犬の骨髄間質細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子を介したニューロンへの分化機構の解明

健常ビーグル犬の骨髄より骨髄間質細胞を分離し、当施設で既に確立している 2% B27 supplement を含む Neurobasal-A medium に bFGF (100 ng/mL) を添加した培養液でニューロンへの分化誘導を行った。ニューロン分化誘導後に、ニューロンマーカー (MAP2、NEFL、ENO2)、神経幹細胞マーカー (NES)、グリアマーカー (GFAP) の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。次に、ニューロンマーカー (NF-L および NSE) に関するタンパク質の発現と局在を免疫染色にて確認した。さらに、Fluo3-AM を用いた Ca²⁺ イメージングにて電気生理学的な機能についても検討を行った。これらの検討で、犬の骨髄間質細胞が bFGF の影響下で機能を有するニューロンへ分化することが確認できれば、次いでそのメカニズムを解析した。まず、犬の骨髄間質細胞における bFGF の受容体 (FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4) の発現を RT-PCR と Western blotting 法にて検討した。次いで、FGF 受容体阻害剤、PI3 キナーゼ阻害剤などを用いて前述のニューロン分化培地で培養し、シグナル伝導路を確認した。また、リガンド-受容体の結合を Cross-linking and immunoprecipitation にて確認し、最終的に犬の骨髄間質細胞を機能のあるニューロンへと分化する過程に bFGF が関与しているか否かを検証した。

(2) 犬組換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (rc-bFGF) の精製

本検討では、rc-bFGF によるサイトカイン療法の臨床応用を目指して、大腸菌などの遺伝子組換え生物を用いない蛋白精製法を検討した。まずは、セルフリーサイエンス社のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術を採用して rc-bFGF の精製を行った。精製した蛋白質が rc-bFGF であることを確認する目的で SDS-PAGE を行い、蛋白定量ソフトにて収量を計測した。さらに、犬の bFGF に特異的な primer を用いて精製過程の mRNA の RT-PCR を行い、精製した蛋白質が rc-bFGF であることを確認する目的で、ウェスタンブロッティングを行った。最後に、精製した蛋白質を HEK293 細胞に添加し、pErk の発現を確認することで bFGF としての機能を有しているか否かについて確認した。

(3) 犬組換え bFGF のニューロン分化能の検証

本検討では、犬の骨髄間質細胞を 10% FBS 含有 α MEM で培養した群 (未分化群) 100 ng/mL の rh-bFGF を含む Neurobasal-A medium

で培養した群 (rh-bFGF 群) 100 ng/mL の rc-bFGF を含む Neurobasal-A medium で培養した群 (rc-bFGF 群) として Neurobasal-A medium のみで培養した群 (対照群) の 4 群に分けて比較を行った。各群ともに、倒立顕微鏡を用いて経時的に細胞の形態の変化を記録した。ニューロン分化誘導 10 日目には、ニューロン様形態へと変化した細胞の割合を算出した。また、ニューロンへと分化誘導した前後の犬の骨髄間質細胞から total RNA を抽出し、real-time PCR を行ってニューロンに関する mRNA の発現量を定量的に評価した。ニューロン分化誘導 10 日目の細胞を用いて、ニューロフィラメント L 鎖に対する蛍光免疫染色も行った。さらに、Fluo3-AM を用いた Ca^{2+} イメージング法にて、ニューロンへと分化誘導した犬の骨髄間質細胞の神経活動を確認した。

(4) 軸索伸展培養モデルを用いた rc-bFGF の効果

最初に、ガラススペースディッシュに Neuron device (Xona microfluidics 社) を置き、細胞分離側 (cell side) の chamber に犬の骨髄間質細胞を播種した。犬の骨髄間質細胞が定着した後に、2% B27 supplement を含む Neurobasal-A medium に rc-bFGF (100 ng/mL) を添加した培養液で 10 日間刺激し、ニューロンへと分化誘導させた。次いで、軸索分離側 (axonal side) に向かって静水圧をかけて、ニューロンへと分化させた細胞から軸索が伸展するか否かを検討した。軸索を伸展させてからは、倒立顕微鏡を用いて経時的に軸索の伸展の程度を観察した。伸展させてから 10 日目に免疫細胞染色を行って、伸展した軸索の確認を行った。

(5) 脊髄トラクトグラフィーを用いた再生脊髄評価法の確立

日本大学動物病院の既存設備である magnetic resonance imaging (MRI) を使用し、犬を用いて検討を行った。まず、通常の診断時に使用している T1 強調画像、T2 強調画像、水分抑制画像 (FLAIR 像) を撮像した。次いで、拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging) を撮像し、3D トラクトグラフィー画像を構築した。そして、上行性および下行性の神経伝達路の描出が可能か否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 犬の骨髄間質細胞を bFGF で処理したところ、ニューロン様の形態へと変化した。ニューロンに関する mRNA とタンパク質の発現が増加していた。さらに、ニューロン様の細胞は、脱分極および L-glutamate 刺激に反応する機能を有することが明らかになった。次いで、犬の骨髄間質細胞における FGFR のサブタイプの発現を RT-PCR およびウェスタンブロッティングにて検討したところ、FGFR-1

と FGFR-2 が発現していた。bFGF と FGFR サブタイプの結合を CLIP 法にて確認したところ、bFGF は FGFR-2 と強く結合することが明らかになった。さらに、FGFR、PI3K、Akt、MEK、PLC の各阻害剤を用いて、ニューロン分化における細胞内シグナリングを検討したところ、FGFR-2/PI3K/Akt/GSK-3 β 経路が関与することが明らかとなった。これらの結果から、犬の幹細胞のニューロン分化には bFGF が重要な役割をなしている可能性が分子生物学的にも証明された。

(2) シークエンス解析により無細胞蛋白合成用発現ベクターの目的の部位に犬の bFGF 遺伝子が挿入されていることが確認された。次いで、蛋白精製過程における rc-bFGF の mRNA の発現を RT-PCR で確認したところ、大腸菌で精製した rc-bFGF の mRNA と同じ位置にバンドの形成が認められた。また、精製した蛋白質のウェスタンブロッティングを行ったところ、大腸菌由来の rc-bFGF と同じ位置にバンドの形成が認められた。さらに、精製した蛋白質を HEK293 細胞に添加し、pErk の発現を確認することにより、bFGF として機能しているか否かについて検討した。その結果、従来の機能を有する rh-bFGF を添加した際と同様に pErk の発現を認めた。これらの結果から、今回精製した蛋白は生理的な機能を有する rc-bFGF であることが確認できた。

(3) 犬の骨髄間質細胞は rh-bFGF を用いた時と同様に、rc-bFGF の刺激によりニューロン様の形態へと変化した。ニューロン様細胞は、rc-bFGF 群において最も早く出現し、その形態変化率も最も優れていた。また、rc-bFGF 群においてニューロン様の形態へと変化した細胞の割合は、rh-bFGF 群に比べ有意に高かった。一方で、未分化群および対照群においては、ニューロン様の形態へと変化した細胞はわずかであった。ニューロン分化誘導前後における mRNA の発現を比較したところ、rc-bFGF 群と rh-bFGF 群においてニューロンのマーカーである *NEFH*、*NEFL*、*MAP2* の発現が増加していた。蛍光免疫染色を行ったところ、rc-bFGF 群と rh-bFGF 群の両群においてニューロフィラメント L 鎖に対する陽性細胞が認められた。さらに、培養 10 日目の細胞を 50mM KCl にて脱分極刺激したところ、rc-bFGF 群と rh-bFGF 群において他群に比べて有意な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。さらに、神経伝達物質である L-glutamate にて同様に刺激したところ、rc-bFGF 群と rh-bFGF 群において他群に比べて有意な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。

(4) 犬骨髄間質細胞を bFGF で処理したところ、ニューロン様の形態へと変化した。次いで、Neuron device を用いて軸索を伸展させたところ、静水圧がかかっている方向に向か

って、軸索が伸展する様子が確認できた。その一部は、microgroove 内に侵入したが、150µm と 450µm の長さを通過するほどの長さには至らなかった。現在は、さらに短い microgroove の Neuron device を使用するなど、改善を図っている。また、軸索分離側(axonal side) の chamber に薄切した損傷脊髄の組織培養を行い、伸展した軸索が、どのようにして損傷脊髄に接合するかの検討も続けている。

(5)MRI を用いた脊髄トラフトブラフィーに関する検討を行ったが、本学保有の機器の限界もあり、理想的な画像を得ることはできなかった。そのため、継続的に検討を続けていくこととなった。

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 3 件)

枝村一弥 , 塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた幹細胞を利用しない脊髄再生医療の確立. 査読 : なし. *BIO Clinica*. 32(10): 97-102. 2017.

枝村一弥 , 獣医療域における再生医療および細胞療法のガイドライン～背景と骨子. 20(3): 46-49. 査読 : なし. *info Vets*. 2017.

Rei Nakano, Kazuya Edamura, Tomohiro Nakayama, Takanori Narita, Ken Okabayashi, Hiroshi Sugiya. Fibroblast growth factor receptor-2 contributes to the basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation in canine bone marrow stromal cells via phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. 査読 : あり. *PLoS One*. 10(11): e0141581. doi: 10.1371/journal.pone.0141581. 2015.

[学会発表] (計 1 4 件)

枝村一弥 , 犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針と届出制度, 第 17 回日本再生医療学会, 2018 年

枝村一弥 , 獣医療域における運動器の再生医療の現状と将来展望, 第 13 回日本獣医再生医療学会, 2018 年

枝村一弥 , 犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針～概要の解説～, 第 13 回日本獣医再生医療学会, 2018 年

Kazuya Edamura, Shun Nakajo, Sena Minowa, Atsushi Yamazaki, Koji Tanegashima, Yoshikazu Masuhiro, Mamiko Seki, Kazushi Asano, Kei Hayashi. Effect of recombinant canine basic fibroblast growth factor on fracture healing in a canine fracture model. *American College of Veterinary*

Surgeon 2017 Scientific Meeting. 2017 年
枝村一弥 , 犬や猫における軟骨再生医療および細胞療法の現状と将来展望, 日本獣医再生細胞療法学会, 2017 年
中條駿, 箕輪聖奈, 山崎敦史, 種子島貢司, 関真美子, 浅野和之, 舩廣善和, 枝村一弥 . 犬の新鮮骨折における犬由来組換え塩基性線維芽細胞増殖因子の骨癒合促進効果, 第 94 回日本獣医麻酔外科学会, 2017 年

枝村一弥 , 犬及び猫における再生医療及び細胞療法の安全性確保に関する指針～概要の解説～, 第 16 回日本再生医療学会, 2017 年

枝村一弥 , 完成間近!! 犬及び猫における再生医療及び細胞療法に関する指針～概要の解説～, 第 12 回日本獣医再生医療学会, 2017 年

枝村一弥 , 獣医学領域における再生医療の現状と将来～トランスレーショナルリサーチとしての獣医療の重要性～, 第 125 回医工学フォーラム, 2016 年

枝村一弥 , 幹細胞を利用しない脊髄再生医療の構築, 日本大学生物資源科学部学術発表会, 2016 年

枝村一弥 , 一次診療医として増加する関節疾患に対し何が出来るか?～関節炎症状改善薬から再生医療まで知っておくべき最新知見～, 日本臨床獣医学フォーラム年次大会 2016, 2016 年

枝村一弥 , 犬や猫における脊髄再生医療の現状, 平成 27 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2016 年

枝村一弥 , 獣医療における再生医療及び細胞療法に関する指針～進捗状況と概要の解説～, 第 11 回日本獣医再生医療学会, 2016 年

枝村一弥 , 獣医領域における再生医療及び細胞療法のガイドライン案, 動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会シンポジウム, 2015 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

枝村一弥 (EDAMURA, Kazuya)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号 : 80366624