

令和元年6月19日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08089

研究課題名(和文)ウマを用いた直接転換法による迅速な神経再生医療の基盤技術の確立

研究課題名(英文) Neuron regenerative therapy by direct reprogramming of equine dermal fibroblasts

研究代表者

石原 章和 (Ishihara, Akikazu)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：80707224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、馬の皮膚線維芽細胞をフローサイトメトリーで選別したあと、神経細胞用培地で培養することで、神経系細胞への分化を誘導できることが示され、また、それらの細胞を脊髄神経の外植片内に注射することで、神経分化に関連する遺伝子活性を増加できることを確認した。そして、この細胞を、頸部脊髄内に注射したところ、ホスト神経細胞においても、非注射部位の神経細胞に比較して、神経分化に関連する遺伝子活性が増加していた。以上の結果から、皮膚組織から分離した線維芽細胞を、ダイレクトリプログラミングにて神経系細胞に分化させ、それらを脊髄組織内に注射することで、損傷した神経組織の再生を誘導できることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、皮膚組織から分離した線維芽細胞を、ダイレクトリプログラミングにて神経系細胞に分化させ、それらを脊髄組織内に注射することで、損傷した神経組織の再生を誘導できることが確認された。このような「迅速な神経の再生医療」では、皮膚組織を採取した後、その日のうちに実施可能な再生医療として、脊髄疾患の治療指針を革新する、究極の治療法になるものと期待される。また、内視鏡を使って非侵襲的に細胞を注射するという、マイクロ医療と細胞治療の融合が達成されれば、脳疾患に対する再生医療も革新的に発展させると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, equine dermal fibroblast selected by flow cytometry can be derived into neuron-pathway by specific medium and the injection of these cells into spinal cord explant resulted in the significant upregulation of neuron-related gene expression. In addition, endoscopic direct injection of these cells into the cervical spinal cord tissue in horses induced the neuron-related gene upregulation in the host cells surrounding the injection site as well. These results demonstrated that dermal fibroblasts harvested from skin tissue can be derived into neuron by direct-reprogramming and used for spinal cord regeneration by direct injection for the treatment sites.

研究分野：獣医学

キーワード：再生医療 神経治療 皮膚線維芽細胞 ウマ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は一度傷つくと治癒が殆ど起こらないため、ヒトの脊髄損傷には未だに有効な治療法がなく、抜本的な脊髄再生の技術の開発が急務である。近年の研究では、皮膚の線維芽細胞を神経細胞へと直接的に分化できる事が証明されており、申請者も同様に、ウマの皮膚細胞を神経細胞に分化した。申請者は、iPS 細胞の作製が必要ないのであれば、分化誘導された皮膚細胞を、神経損傷の部位にそのまま局所投与することで、活発に修復している組織内にある豊富な成長因子によって、*in vitro* 培養環境よりも速やかに直接転換を起こせるのではないかと考え、また、クモ膜下腔に挿入した内視鏡を介して、脊髄組織内に細胞を局所注射する手法を確立した。内視鏡を使って非侵襲的に細胞を注射するという、マイクロ医療と細胞治療の融合が達成されれば、大脳や小脳への細胞移植も可能になり、アルツハイマー病などの脳疾患に対する再生医療も革新的に発展させると考えられた。

2. 研究の目的

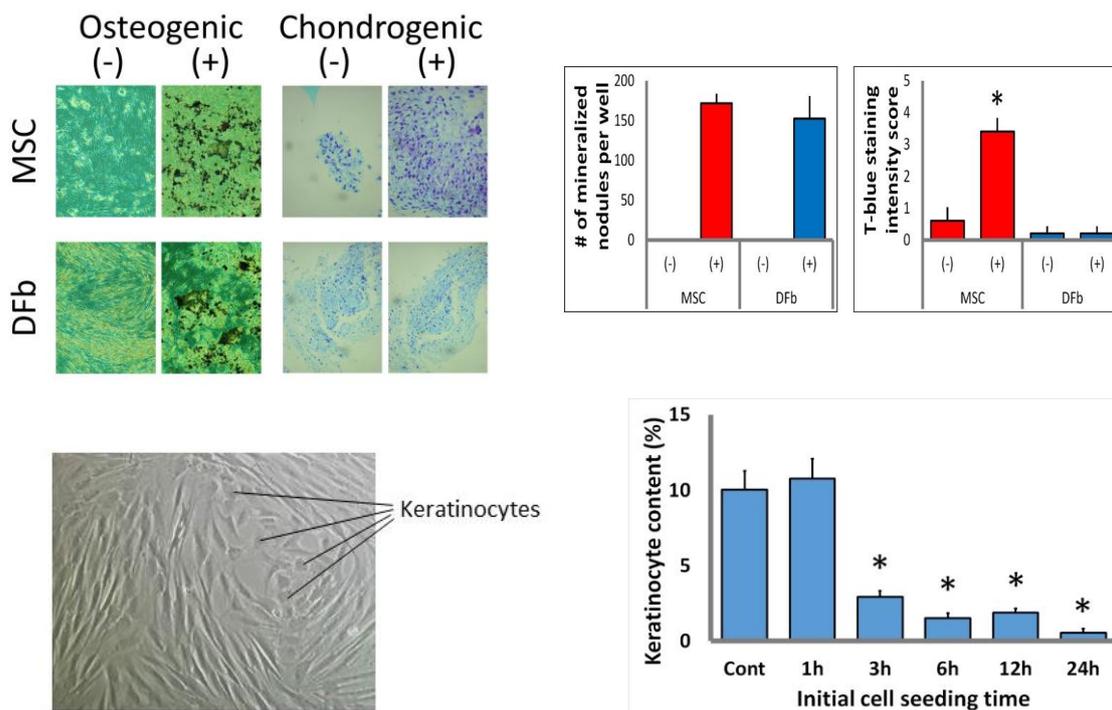
本研究では、神経分化を誘導した皮膚線維芽細胞を局所投与して、生体内環境を利用して神経系細胞に直接転換させ、簡便に臨床応用できる神経再生医療の基盤技術を確立させることを目的とした。

3. 研究の方法

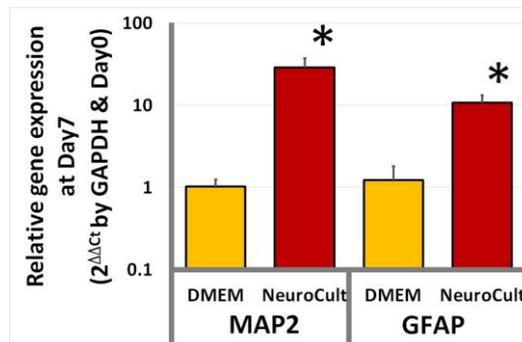
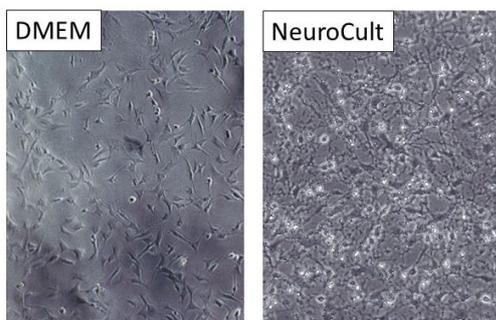
ウマの真皮組織をコラゲナーゼ分解した後、フローサイトメトリー法を用いて、分化能 (CD90 陽性で MHC-II に陰性) を持ち、生存 (7AAD 陰性) している皮膚の線維芽細胞を選別した。細胞の分離および選別に最も適した、酵素濃度、分解時間、表面抗原、および、選別蛍光度などの条件を検討した。選別した皮膚線維芽細胞を、神経系細胞の分化培地内で培養することで分化誘導を起こし、Trypan blue 染色によって細胞の生存率を判定した後、2~7 日間培養して、RT-PCR による MAP2 遺伝子 (ニューロン分化) および GFAP 遺伝子 (アストロサイト分化) の活性測定、免疫染色による MAP2 および GFAP 蛋白生成の定量化を行った。選別および分化誘導した皮膚線維芽細胞を、ウマから採取した脊髄組織片の内部に注射してから、一週間培養し、この組織片内を、RT-PCR による MAP2・GFAP 遺伝子解析を行った。また、組織片をコラゲナーゼ分解して、フローサイトメトリー法で回収した細胞の遺伝子活性を評価して、さらに、振り落とされた周囲の細胞においても、同様の評価を行い、注射した細胞との相乗作用を検討した。そして、選別および分化誘導した皮膚線維芽細胞を、内視鏡を介して実馬の脊髄組織内に局所投与したあと、その箇所の脊髄組織を採材して、組織学的検査によって評価し、また、その箇所の組織における MAP2・GFAP 遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

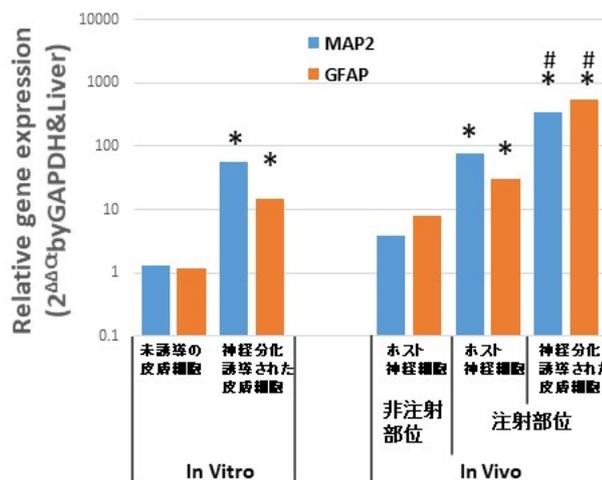
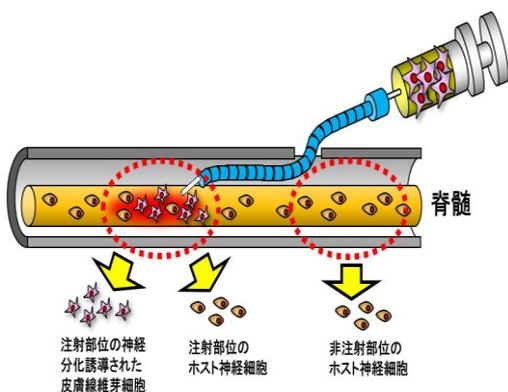
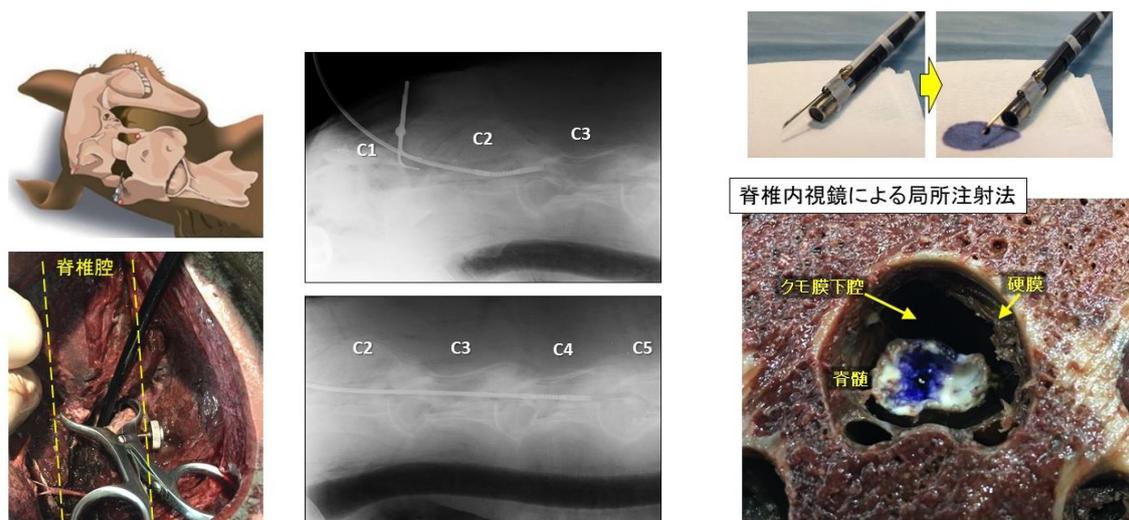
一年目の研究では、馬の皮膚組織から皮膚線維芽細胞の分離を行う最適な条件を確立させた (コラゲナーゼの濃度、攪拌時間、等)。また、コラゲナーゼ分解で得られた細胞群から、フローサイトメトリーにて分化能を有する細胞を抽出した結果、前駆細胞性を示す CD90(+) の割合を高めることが可能であったことから、組織再生能が優れていることが示唆された。この際、選別した細胞群を二段階接着法による培養することで、角化細胞 (短時間で接着する) の混入率を減少させ、皮膚線維芽細胞の純度を有意に向上できることが確認された。



二年目の研究では、抽出した細胞を神経細胞用培地で培養することで、神経分化に関連する遺伝子の活性が有意に増加することが確認され、皮膚線維芽細胞を神経系細胞への分化を誘導できることが示唆された。また、抽出した細胞を脊髄神経の外植片内に注射して培養したところ、同様に神経分化に関連する遺伝子の活性が有意に増加していた。さらに、屠体の頸部組織を用いた実験では、脊椎腔内に挿入した内視鏡を介して脊髄神経の内部に細胞を注入できることが確認された。



三年目の研究では、実馬を用いた In vivo 実験によって、神経系細胞に分化させた皮膚線維芽細胞を、高い生存性で脊椎内移植することで、神経組織の再生を亢進させられることを確認した。まず、馬の皮膚組織から分離・選別した CD90(+)の皮膚線維芽細胞を、神経細胞用培地にて神経系細胞へと分化させたあと、頸部脊椎内に注射した。その後、脊椎組織を採取してコラゲナーゼ分解してフローサイトメトリーで解析したところ、注射した CD90(+)細胞の生存性が認められ、また、CD(-)のレシピアント組織の神経細胞においても、非注射部位の神経細胞と比較して、神経分化に関連する遺伝子活性が増加していた。さらに、神経系細胞に分化させた皮膚線維芽細胞をクモ膜下腔内に注射した場合にも、同様に脊椎組織内での CD90(+)細胞の生存が確認された。



以上の結果から、皮膚組織から分離した線維芽細胞を、ダイレクトリプログラミングにて神経系細胞に分化させ、それらを脊髄組織内に注射することで、損傷した神経組織の再生を誘導できることが確認された。また、脳脊髄液内に同細胞を注射することで、遠隔部位の損傷組織にも細胞を遊走・移植させて治療できる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計1件）

第162回 日本獣医学会学術集会

馬を用いた直接転換法による迅速な神経の再生医療の基盤技術の確立

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。