

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14952

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト短期取得方法の開発

研究課題名(英文)Development of the method for short-term acquisition of oligodendrocytes

研究代表者

湊 雄介 (Minato, Yusuke)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00710245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では虚血周皮細胞より誘導されるオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)様細胞を用いてオリゴデンドロサイトの取得を試みた。しかし、OPC様細胞を十分量安定して得られるよう維持することができず、虚血周皮細胞から直接オリゴデンドロサイトへ分化させてもその効率は非常に低かった。虚血周皮細胞には継代による分化能の低下や継代回数制限がある。そこで虚血周皮細胞を安定して維持する方法を検討した。その結果、継代時の播種細胞密度を高くすることにより分化能を持った細胞を長期間維持できることを見出した。さらにBMPシグナルのアンタゴニスト存在下で培養することで、神経幹細胞様細胞を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞を得る方法として、発生段階の脳組織から直接得る、ES細胞やiPS細胞の作成を経て神経幹細胞へと誘導する、といった方法が主に知られている。今回、本研究により成体の脳梗塞巣から、神経への分化能を保持し、かつ安定的に長期維持できる神経幹細胞様細胞を得ることに成功した。このことは幹細胞生物学に新たな知見をもたらすだけでなく、脳梗塞などの疾患に対する細胞治療といった臨床応用へつながることが将来的に期待できる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to get oligodendrocytes using oligodendrocyte precursor cell (OPC)-like cells which is induced from ischemic pericytes. However, it was very difficult to maintain OPC-like cells. In addition, the differentiation efficiency of ischemic pericytes into oligodendrocytes was very low.

Ischemic pericytes have limitations in the differentiation ability and in the passage times. Thus we tried to stably maintain ischemic pericytes. As a result, the cells were maintained for long periods of time by the high seeding cell density. In addition, they kept their ability to differentiate. Furthermore, we obtained neural stem cell-like cells by culturing ischemic pericytes with a BMP antagonist.

研究分野：細胞生物学

キーワード：虚血周皮細胞 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周皮細胞は血管壁細胞であり、全身の小血管に基底膜に包まれて存在する。本学先端医学研究所の松山知弘教授、中込隆之准教授らは脳梗塞モデルマウスを用い、梗塞巣内に多分化能を有した周皮細胞(虚血周皮細胞)が出現することを見出した。虚血周皮細胞は中枢神経系の各種細胞に分化できることから、中枢神経系の各種疾患に対する細胞治療に有用と考えられている。虚血周皮細胞の分化をより緻密にコントロールすることにより、細胞治療への応用に道が開かれると考えられる。

細胞治療への応用に向けて虚血周皮細胞を制御するため、我々は細胞外マトリックス(ECM)に着目した。ECMは細胞外に存在する超分子複合体の総称であり、細胞の接着や組織形成・維持に重要な役割を果たしている。周皮細胞の周囲に存在する基底膜もECMにより構成されている。これまでECMは単なる構造体、基質成分としてしか認識されていなかったが、近年細胞の増殖や分化の制御に直接関わっていることが明らかにされてきている。

虚血周皮細胞を特定のECM上で培養して継代すると、数回の継代後に著しい形態変化を示した。この細胞を免疫染色すると、ほぼすべての細胞がオリゴデンドロサイトマーカーであるO4で染色され、他の中枢神経系細胞マーカーでは染色されなかった。オリゴデンドロサイトは中枢神経系での髄鞘形成に関わり、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から分化誘導される。その分化過程はマーカーの発現や細胞形態に応じて数段階に分けられる。そこでRT-PCR法により遺伝子発現を検討したところ、OPCマーカー遺伝子であるPDGFR α やST8SIA1の発現が検出された。一方、MAGやMOGなどの成熟オリゴデンドロサイトマーカー遺伝子の発現は検出されなかった。以上の結果から、この細胞はOPC様細胞である可能性が考えられた。

観察された形態変化は無血清培養により誘導される。そこで次に液性因子による影響の有無を検討するため、ECMが血清存在下でも虚血周皮細胞からOPC様細胞へ誘導できるか検討した。検討を行った結果、血清存在下では虚血周皮細胞は形態変化を起こさなかった。また、O4+細胞の割合を調べたところ、無血清培養ではほぼすべての細胞がO4+であったのに対し、O4+細胞の割合は血清濃度依存的に著しく低下した。以上の結果から、血清中にはOPC様細胞への誘導を阻害する因子が含まれていることが示唆された。

現在OPCを得るには、(1)ES細胞やiPS細胞からOPCを分化誘導する方法、(2)神経系でない体細胞からリプログラミングによりOPCを得る方法、(3)生体組織から直接分取する方法がある。しかしこれらの方法にはいずれも(1)長期間を要する、(2)遺伝子操作する必要がある、(3)収量が少ない、といった医療へ応用する上での問題点がある。

2. 研究の目的

今回我々は、OPC様の性質を持つ可能性がある細胞集団を遺伝子操作なしに短期間かつ高効率に取得できた。そこで本研究では、虚血周皮細胞からOPC様細胞が高効率で得られるメカニズムを分子レベルで明らかにし、オリゴデンドロサイトの短期取得方法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)オリゴデンドロサイトへの分化検討

OPC様細胞を無血清下で培養し、必要に応じてPDGF-Aあるいは-Bを添加した。OPC様細胞のtotal RNAを抽出、逆転写し、RT-PCRによりPDGFR α の発現を検討した。虚血周皮細胞をオリゴデンドロサイト分化培地で3週間培養後、固定し、免疫染色を行った。

(2)虚血周皮細胞の維持

虚血周皮細胞を高播種密度で培養した。週に2回培地交換を行い、2週に一度継代を行った。虚血周皮細胞を神経分化培地で7日間培養し、免疫染色を行った。

(3)虚血周皮細胞から神経幹細胞様細胞への誘導

虚血周皮細胞をBMPアゴニストあるいはアンタゴニスト存在下で培養した。各種マーカーの発現は免疫染色により評価した。虚血周皮細胞を記録電極が付いた培養皿上で1週間以上神経分化誘導し、活動電位を記録した。

4. 研究成果

(1)オリゴデンドロサイトへの分化検討

OPC様細胞がオリゴデンドロサイトへの分化能を有しているか検討するのに必要な細胞数を確保するため、まずOPC様細胞を維持できる条件について検討を行った。OPC様細胞は無血清下で得られるが、非常に増殖が遅い。OPCの増殖にPDGF/PDGFR α シグナルが重要である。OPC様細胞はPDGFR α をRNAレベルで発現していたことから、そのリガンドであるPDGF-Aあるいは-Bで増殖刺激を試みた。その結果、増殖速度や継代回数に改善はみられず、安定してOPC様細胞を維持することができなかった。他の増殖因子についても検討を行ったが、やはり改善はみられなかった。

OPC様細胞の維持・増殖が困難であったことから、OPC様細胞への誘導を経ずに虚血周皮細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導を試みた。その結果、成熟オリゴデンドロサイトマ-

カーの発現を確認することができたが、その効率は低かった。

(2) 虚血周皮細胞の維持

OPC 様細胞を維持することは分化実験等を行えないほどに困難であった。虚血周皮細胞は分化実験を行えるものの、継代回数に制限がある、継代により分化能が著しく低下する、といった問題がある。今後実験に用いるのに十分な細胞を安定して得るべく、まず虚血周皮細胞の維持条件を検討した。播種細胞密度は、幹細胞の分化能や増殖能に影響を与えることが報告されている。これまで虚血周皮細胞の播種細胞密度は低かったことから、高密度で播種して培養した。その結果、低播種密度で培養したときは継代回数 5 回程度、培養日数 40 日程度、細胞分裂回数 6 回程度が限界であったが、高播種密度では継代回数 10 回以上、培養日数 100 日以上、細胞分裂回数 20 回以上を達成することができた。さらに、10 回以上継代した虚血周皮細胞から神経マーカーを発現する細胞を誘導することができた。

(3) 虚血周皮細胞から神経幹細胞様細胞への誘導

(2) で高密度培養により分化可能な虚血周皮細胞を長期維持できる可能性を見いだしたが、タンジェントカーブ様の増殖曲線を示し、未分化マーカーや分化能にロット差があった。虚血周皮細胞は脳梗塞巣から混合培養として得られることから、培養中に含まれる各種細胞の割合のロット間差によって増殖速度が一定でなかったり、分化能維持に必要な因子の発現にもばらつきが生じているのではないかと考えられた。

BMP シグナルは神経幹細胞の文化や維持の制御、多能性幹細胞からの神経幹細胞への誘導時などへの関与が多数報告されている。そこで BMP シグナルのアゴニスト、アンタゴニストを添加して虚血周皮細胞を培養した。アゴニスト/アンタゴニストの添加により増殖曲線はいずれも直線性を示すようになった。アゴニストは一過的にしか神経マーカーの発現を誘導できなかったが、アンタゴニストは持続して神経マーカーの発現を誘導でき、細胞形態も神経幹細胞に似たものであった。アンタゴニスト存在下で培養した細胞はそのほとんどが神経幹細胞マーカーを発現しており、分化誘導により神経マーカーを発現した。さらに電気生理学的解析により自発活動電位が記録できた。また、虚血周皮細胞は無血清下では培養維持が非常に困難であったが、アンタゴニスト存在下で培養した細胞は無血清下でも容易に培養維持ができるようになった。

以上の結果から、BMP アンタゴニストにより虚血周皮細胞から神経幹細胞様細胞を誘導することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minato Yusuke, Kuwahara-Otani Sachi, Maeda Seishi, Yagi Hideshi	4. 巻 510
2. 論文標題 Platelet-derived growth factor receptor gene is regulated by multiple first exons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 489 ~ 494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.01.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湊雄介、高橋愛、加藤歩、大谷佐知、田中宏一、前田誠司、中込隆之、松山知弘、八木秀司
2. 発表標題 Analysis on the characterization of ischemic pericyte
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湊雄介、大谷佐知、前田誠司、八木秀司
2. 発表標題 新規PDGFRA/Pdgfra転写産物の発現解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----