

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09101

研究課題名(和文) iPS細胞誘導未分化Schwann細胞による新規末梢神経再生医療に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of new treatment of the peripheral nerve injury using of induced pluripotent stem cell induced immature Schwann cells

研究代表者

平川 明弘 (Hirakawa, Akihiro)

岐阜大学・医学部・特任准教授

研究者番号：50422720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経(坐骨神経)損傷モデルマウスを用いて、KEGG pathway解析によりSchwann細胞の脱分化過程においてPI3K/Aktシグナル、Wnt/ β -cateninシグナル活性が優位に低下すること、脱分化過程の超早期において転写因子Egr1、cFosが発現上昇することをリアルタイムPCR解析により明らかにした。さらにSchwann細胞特異的PI3K/Aktシグナル亢進マウスにおいて末梢神経損傷モデルマウスを作成。神経損傷時、PI3K/Aktシグナルはミエリン崩壊(脱髄化)を抑制する一方で未分化Schwann細胞自体の増殖は亢進させることを、免疫組織化学的手法を用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって末梢神経再生にとって重要とされるSchwann細胞脱分化過程において、PI3K/Aktシグナルが脱分化(ミエリン崩壊・脱髄)を抑制する一方で、未分化Schwann細胞増殖を亢進させるという相反する作用を持つ可能性が示唆された。また未分化Schwann細胞の形質維持に必須の候補遺伝子として転写因子Egr1、cFosが明らかとなった。これは脱分化シグナルに作用するシード化合物を同定することや、ダイレクトリプログラミング手法を用いて未分化Schwann細胞を誘導することによる新しい末梢神経再生医療を開発する際に重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are significantly inactivated in the process of dedifferentiation of Schwann cells following peripheral nerve (sciatic nerve) injury in mice using by KEGG pathway analysis, and the transcription factors, Egr1 and cFos are upregulated 10 hour after the injury using real-time PCR analysis. Furthermore, we established Schwann cell-specific conditional PI3K/Akt signaling activating mice (Sox10-CreERT2+Pten flox/flox) and demonstrated that proliferation of immature Schwann cells was facilitated, on the other hand, demyelination was inhibited at the distal site of the peripheral injury in this mice by using immunohistochemical study.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：未分化Schwann細胞 末梢神経再生 PI3K/Aktシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷などによる末梢神経損傷において、その欠損が大きい場合は自家神経移植を含めた組織移植が行われている。組織移植は患者自身の健常部位からの組織採取を必要とし、採取部位において、知覚障害を含めた何等かの機能障害を生じるとともに、術後の機能回復が十分でないといった問題がある。一方、末梢神経再生の基礎研究において、人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) を付加させた人工神経による軸索再生促進効果が報告されているが、その詳細なメカニズムは未解明である (Uemura T, et al. Cells Tissues Organs. 2014)。また、神経損傷部において末梢神経軸索の髄鞘を形成する Schwann 細胞が脱分化することによって生じる未分化 Schwann 細胞が神経細胞の生存や再生軸索の誘導・伸長に大きな役割を果たすことが示唆されてはいるが (Painter MW, et al. Neuron. 2014)、脱分化時のシグナル経路については未解明な点が多く、未分化 Schwann 細胞の形質維持に必須の遺伝子については不明である (Fukuta M, et al. PLoS One. 2014)。このことから現在までに iPS 細胞から未分化 Schwann 細胞を誘導することや、これを末梢神経損傷治療に用いた研究の報告はなされていない。

2. 研究の目的

末梢神経損傷部における Schwann 細胞の脱分化時のシグナル経路や未分化 Schwann 細胞の遺伝子発現パターンを明らかにし、さらには iPS 細胞から未分化 Schwann 細胞様細胞を誘導することにより全く新しい末梢神経再生医療を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 末梢神経損傷モデルマウスの作製

Painter (Painter MW, et al. Neuron. 2014) らによって報告された方法に従い、8 週齢のマウス (C57BL6) の右坐骨神経を露出させた後、撮子を用いてこれを挫滅させることにより末梢神経 (坐骨神経) 損傷モデルマウスを作成した。

(2) 損傷末梢側の神経組織における遺伝子発現変化の同定

上記(1)で作成したモデルマウスにおいて、損傷後早期 (10, 48 時間後) に損傷末梢側、損傷中枢側、および非損傷側 (左側) の神経組織を採取。逆転写酵素を用いて mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子プロファイリングを行い、損傷末梢側において特異的に発現上昇もしくは低下を認める遺伝子群を解析した。また Painter らの報告 (Painter MW, et al. Neuron. 2014) と同様の手法 (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway Database 使用) を用いて損傷末梢側の神経組織において上方調節もしくは下方調節されているシグナル伝達経路を同定した。

(3) (2) で同定された上方調節もしくは下方調節されているシグナルの関与を解析するために、Cre-ERT システムを利用して、Schwann 細胞特異的にこれらのシグナルが亢進したマウスを作成。さらにこれらのマウスにおいて坐骨神経損傷モデルを作製し、損傷後 7 日目に損傷部を採取。組織切片を用いて未分化 Schwann 細胞の発現について免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 坐骨神経損傷 48 時間後において KEGG pathway 解析を行った結果、Schwann 細胞の脱分化過程において PI3K/Akt シグナル、Wnt/ -catenin シグナル活性が優位に低下することを同定した (表 1)。

また、脱分化の過程 (神経損傷 48 時間後) において既知の転写因子 (cJun 等) よりも早くかつ優位に上昇する転写因子群 (cFos, Egr1, Runx2, Sox4, Atf3 等)

Annotation Cluster 4 Enrichment Score: 3.943215773017712			
Category	Term	Count %	PValue
KEGG_PATHWAY	mmu04512:ECM-receptor interaction	26 0.926586	9.77E-06
KEGG_PATHWAY	mmu04510:Focal adhesion	43 1.532431	1.23E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04151:PI3K-Akt signaling pathway	60 2.138275	0.001234722
Annotation Cluster 6 Enrichment Score: 2.869853534436737			
Category	Term	Count %	PValue
KEGG_PATHWAY	mmu05217:Basal cell carcinoma	19 0.67712	1.59E-05
KEGG_PATHWAY	mmu04916:Melanogenesis	26 0.926586	8.59E-05
KEGG_PATHWAY	mmu04310:Wnt signaling pathway	32 1.140413	2.13E-04
KEGG_PATHWAY	mmu04390:Hippo signaling pathway	33 1.176051	3.43E-04

表 1. KEGG Pathway 解析 (損傷後 48 時間)

を同定した。さらに超早期に上昇する転写因子を同定するため、坐骨神経損傷後 10 時間で mRNA を抽出し、リアルタイム PCR にて解析したところ、Egr1, cFos が超早期に発現上昇することが

明らかとなった (図 1)。

(2)

PI3K/Akt シグナルの関与を解析するため、Schwann 細胞特異的遺伝子改変マウス: Sox10-Cre-ERT2 マウスと Pten flox/flox マウスを交配。

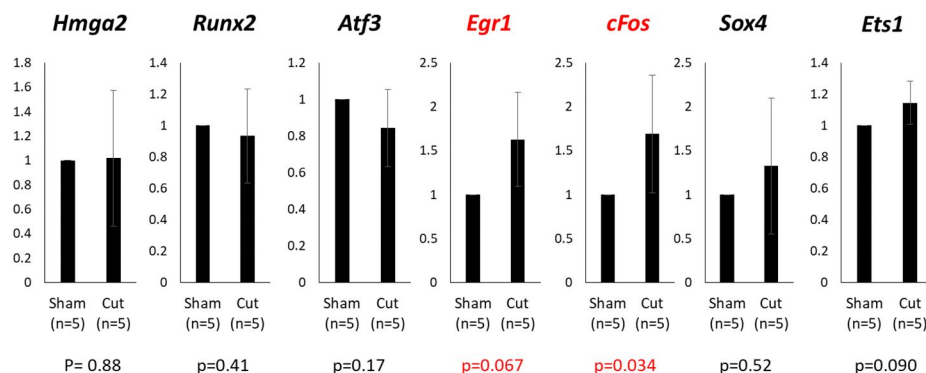


図 1. リアルタイム PCR (損傷後 10 時間)

損傷後 7 日目の損傷部組織切片を作成し、抗 MBP 抗体(成熟 Schwann 細胞マーカー)および抗 p75NTR 抗体(未分化 Schwann 細胞マーカー) を用いて免疫染色を行った(図 2)。

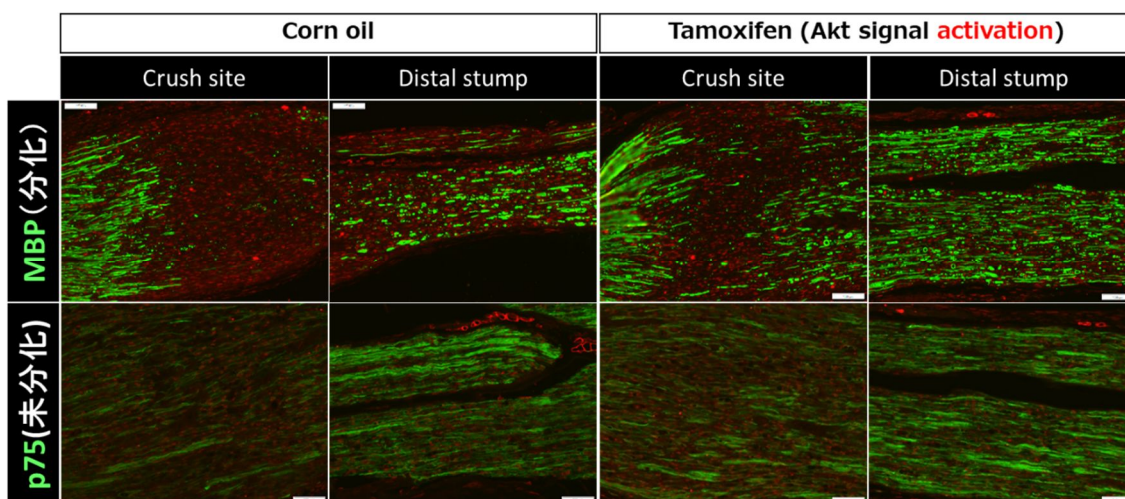


図 2. 損傷部 ~ 損傷部末梢組織像 (損傷後 7 日 免疫染色 長軸横断面)

上段 緑:MBP 赤:Sox 10 下段 緑:p75NTR 赤:Sox 10 Scale bar: 30 μm

成熟 Schwann 細胞のマーカーである MBP はコントロール群に比べ、PI3K/Akt シグナル亢進マウスで染色性が高く、Schwann 細胞が損傷部 ~ 損傷部末梢において分化した状態を維持していると考えられた。一方、未分化 Schwann 細胞のマーカーである p75NTR においても PI3K/Akt シグナル亢進マウスにおいて発現が上昇していた。上記結果より PI3K/Akt シグナルは神経損傷時、Schwann 細胞の脱分化を抑制する一方で、未分化 Schwann 細胞自体の増殖は亢進させるといふ、神経再生にとっては相反する作用を示す可能性が示唆された。

(3) AdAMS (先端モデル動物支援プラットフォーム) の支援をうけて、Rosa26-stop-Pten マウスを作成した。

今後、Sox10-Cre-ERT2 マウスと Rosa26-stop-Pten マウスを交配させることにより PI3K/Akt シグナル抑制マウスを作成。上記と同様の実験とともに運動機能解析を行い、同シグナルの関与の解析をさらに進める予定である。

< 引用文献 >

Uemura T, et al. Long-term efficacy and safety outcomes of transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres with bioabsorbable nerve conduits for peripheral nerve regeneration in mice. *Cells Tissues Organs*.2014;200(1):78-91.

Painter MW, et al. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron*. 2014 Jul 16;83(2):331-343.

Fukuta M, et al. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLoS One*.2014 Dec 2;9(12):e112291.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	河村 真吾 (Shingo Komura) (30456511)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	
研究分担者	秋山 治彦 (Akiyama Haruhiko) (60402830)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関