

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09488

研究課題名(和文) 小分子化合物を用いた高機能シュワン細胞誘導技術の開発と再生医療への展開

研究課題名(英文) Development of functional Schwann cell induction technology using small molecule compounds and expansion regenerative medicine

研究代表者

素輪 善弘 (sowa, yoshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80468264

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)：SOX10とKrox20という2つの転写因子の遺伝子を導入することでシュワン細胞を誘導する技術を開発した。もし小分子化合物で誘導できるようになれば、移植後の有害事象のリスクを大幅に減少させることができる。SOX10とKrox20の各々を代替する小分子化合物をそれぞれ大型スクリーニングモデルで検索したところ、Krox20の代替となる化合物を同定することに成功した。これにより、線維芽細胞をシュワン細胞のフェノタイプと機能を持つ、schwann cell-like cell(mSCLC)に転換することができた。しかし、SOX10の代替になる化合物は同定できなかったため、今後の課題となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの申請者の研究でSOX10とKrox20の2種類の遺伝子を線維芽細胞に導入発現させることでシュワン細胞に転換することを発見したが、今回の申請分の検討ではこれらの2遺伝子に代わる化合物をスクリーニングした。結果Krox20に代わる小分子化合物が同定され、これを用いることでシュワン細胞により類似したフェノタイプと機能を示すmSCLCを創出することに成功した。この発見から、これまでより安全で容易にシュワン細胞を調整することが可能となり、今後の末梢神経再生に大きく利用価値があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a technique to induce Schwann cells by introducing genes for two transcription factors, SOX10 and Krox20. By searching for small molecule alternatives to each of SOX10 and Krox20 in a large screening model, they were able to identify an alternative to Krox20. This allowed us to convert fibroblasts into schwann cell-like cells (mSCLC), which have the phenotype and function of Schwann cells. However, we were not able to identify a compound that can replace SOX10, which will be the subject of future research.

研究分野：末梢神経再生 組織工学 乳房再建

キーワード：末梢神経再生 シュワン細胞 ダイレクト・コンバージョン 小分子化合物 神経損傷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シュワン細胞は、神経栄養および神経保護因子の産生、ラミニン等の細胞外マトリックスの産生、ミエリン形成等を行い、末梢神経の再生に必須の役割を担う。実際、外傷や悪性腫瘍の切除に起因する神経損傷に対して、自家神経よりシュワン細胞を分離培養して移植する治療が大きな効果を上げている。しかし、ドナー・サイトの神経の犠牲、採取量の不足などの障壁があった。iPS細胞の発見に端を発した体細胞リプログラミングの研究は、体細胞から別の体細胞を直接誘導する(たとえば線維芽細胞から心筋細胞を直接誘導する)ダイレクト・リプログラミングを可能にした。もし、直径数mmの皮膚生検サンプルからでも採取して培養できる線維芽細胞から、シュワン細胞を直接作り出すことができれば、侵襲をほとんど与えずに、移植用の自家シュワン細胞を提供できると期待できる。そこで検討を重ねた結果、2つの転写因子(SOX10とKrox20)を導入することで、ヒト線維芽細胞からシュワン細胞(iSC)を直接誘導することに成功した。マウスの坐骨神経に欠損を作ってこの細胞を移植すると、著明な神経再生と神経機能の回復が得られる(図1)(素輪他, Stem Cells Transl Med. 2017; 素輪他, 国際特許取得)。しかし現在の方法では、遺伝子導入が不可欠であるため、臨床応用のためにはさらに安全性が高い誘導法の確立が必要とされる。よってレトロウイルス・ベクターに代わる小分子化合物を用いて、機能的なシュワン細胞を線維芽細胞から直接誘導する技術を樹立し、得られたシュワン細胞の性状と機能を検討することで末梢神経損傷に対する新規再生医療の基盤を確立することが望まれる。

### 2. 研究の目的

SOX10とKrox20という2つの転写因子の遺伝子を導入することでシュワン細胞を誘導する技術は、世界で唯一の我々の独自技術であり、短期間に低コストで高機能のシュワン細胞を多数の供給することができる。もし小分子化合物で誘導できるようになれば、遺伝子導入と異なりゲノム配列を変化させずにエピジェネティックにフェノタイプを変えるので、移植後の有害事象のリスクを大幅に減少させることができる。シュワン細胞を誘導できる小分子化合物を見出すことは通常では極めて困難であるが、上記の遺伝子導入によるシュワン細胞誘導法を用いれば可能である。すなわちSOX10とKrox20の各々を代替する小分子化合物をそれぞれスクリーニングしたのち、最終的にそれらを組み合わせることで、小分子化合物のみでシュワン細胞を誘導することが可能になると考えられる。以上、これまで培った我々の独創的先端技術を基盤として、小分子化合物によるシュワン細胞誘導法にチャレンジし、より速やかかつ安全に臨床応用できる新技術を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

・シュワン細胞のダイレクト・リプログラミングを誘導する小分子化合物の探索 1) Krox20の機能を代替する小分子化合物の探索

最初に、Krox20の機能を代替する小分子化合物を、以下の方法で探索する。

ヒト線維芽細胞に、Sox10を単独で遺伝子導入する。9,600分子種の小分子化合物Core Libraryを音波分注した384wellプレート(創薬機構より供与)に、この細胞を播種する。

培養後、シュワンマーカーS100bを蛍光染色し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を定量する。Krox20とSox10を共導入して誘導したiSC(ポジティブコントロール)に比し、80%以上のシグナルを発するウェルを陽性とする。でヒットした候補化合物について、S100b染色強度とS100bとP75NTRのmRNA発現量を指標として、2次スクリーニングを行う。

・Sox10の機能を代替する小分子化合物の探索

次に、Sox10の機能を代替する小分子化合物を見出す。上記1)とは逆に、ヒト線維芽細胞にKrox20を単独で遺伝子導入し、この細胞を用いて上記と同様のスクリーニングを行う。

小分子化合物によるシュワン細胞のダイレクト・リプログラミング

1)と2)で見出した候補化合物を、種々の濃度で混合し、遺伝子導入していない線維芽細胞に加えて培養する。

同様に、S100b染色強度とS100bとP75NTRのmRNA定量を指標として、最も効率よく高品質なシュワン細胞を誘導できる2つの化合物の組み合わせを決定する。

の化合物で誘導したシュワン細胞(chemically converted Schwann cells = ccSC)のGFAP、

GAP43、NG2、SOX10 の発現を免疫染色、mRNA 定量を行う。また網羅的遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイ解析で調べ、pSC(ヒト初代培養シュワン細胞)、iSC と比較する。

#### 小分子化合物で誘導したシュワン細胞の in vitro 機能解析

神経保護因子の産生：NT3、GDNF、NGF の mRNA 発現と培養上清中への分泌を RT-PCR と ELISA で測定し、遺伝子導入で誘導した細胞と培養シュワン細胞で比較する。

神経突起伸長促進作用：ccSC、pSC、HDF の培養上清を NG108-15 neuronal cells の培養に添加し、神経突起の伸長を計測し比較する (Neurite outgrowth assay)。

ミエリン化能の計測：神経細胞と共培養し、アスコルビン酸を添加してミエリン化を誘導する。ミエリン関連マーカーの発現で評価し、ccSC、pSC、iSC で比較する

#### 4 . 研究成果

Krox20 については遺伝子導入で誘導した dSC (ポジティブコントロール) に比し、陽性のシグナルを発する化合物 X を同定できたが、SOX10 の代替え化合物は残念ながら同定されなかった。そこで Krox20 の代替えとなる化合物 X を投与して、シュワン誘導培地で化学刺激的誘導を試みたところ、これまでのコンベンショナルな誘導シュワン (conventional Schwann cell-like cell: cSCLC) に比較して誘導効率は飛躍的に向上した (以下 modified SCLC: mSCLC)。

#### 幹細胞能の確認

ヒト線維芽細胞を (10% FBS, 2  $\mu$ M Compound A を含む dMEM 培地) で培養し MSC 様細胞を作製した。作成した MSC 様の細胞は、細胞形態上は線維芽細胞に大きな変化は確認されなかったが、通常の誘導培地で培養することで骨・軟骨・脂肪細胞の 3 系統の間葉系細胞に分化することが確認された。また増殖力 (自己複製能) も確認され stemness は維持されていた。

#### 細胞形態と細胞染色によるシュワン細胞マーカー発現の検討

MSC 様の細胞をシュワン細胞誘導培地で培養したところ、約 72 時間後には、位相差顕微鏡で明るく見える類円形の細胞体と数本の長い突起を有した (双極性形態) SC 様の細胞を認め、1 週間後には多くの細胞が同様の形態に変化しているのが確認された。また mSCLC は cSCLC に比較してシュワン細胞マーカー (s100b, GFAP, P75NTR, GAP43) やミエリン関連蛋白 (MBP) を強く発現した。(図 2)。

#### 遺伝子発現

8, 14 および 21 日後に RNA を抽出し、SOX10, Krox20, S100b mRNA の相対的発現レベルを経時的に real time RT-PCR にて定量した結果では、Compound A およびシュワン誘導培地を用いない線維芽細胞に比較して、8 日目に約 3 倍、14 日目に 29 倍、21 日目に 6 倍の発現の上昇がみられた。同様に S100b においても 8 日目に約 3 倍、14 日目に 27 倍、21 日目に 16 倍の発現の上昇がみられ、シュワン誘導培地を用いたが Compound A を用いていない細胞に対しても約 2.5 倍の発現が見られた。しかしながら、これらの発現は dSC の発現と比較すると、はるかに低いものあり、また SOX10 の発現は 14 日目には発現の上昇が確認されたが、その他の Time Point では確認されなかった。

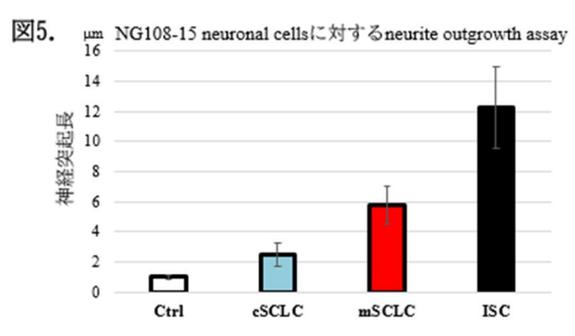
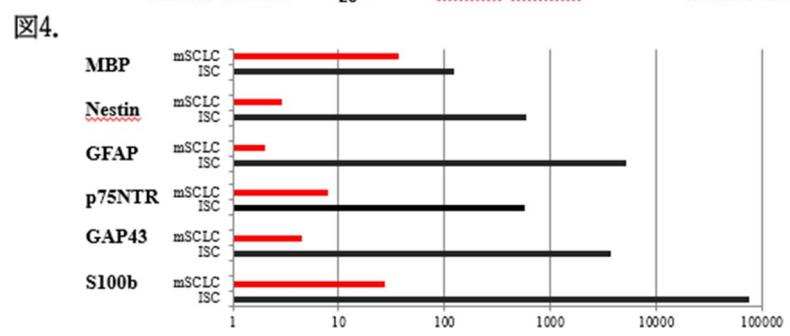
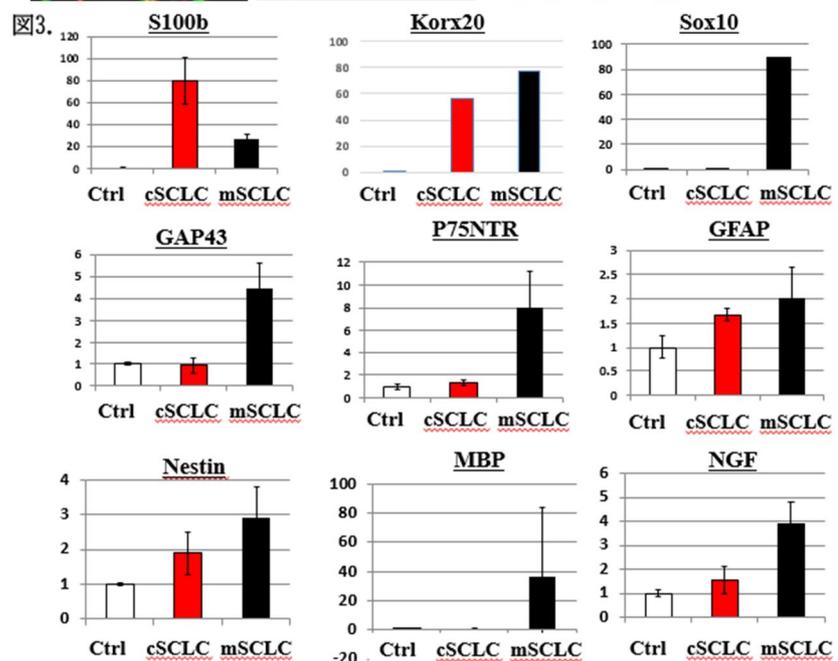
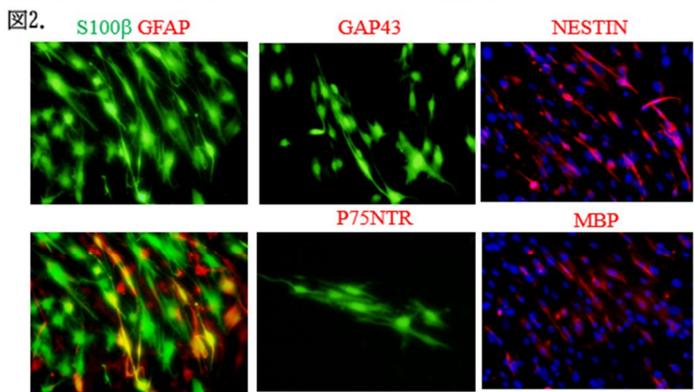
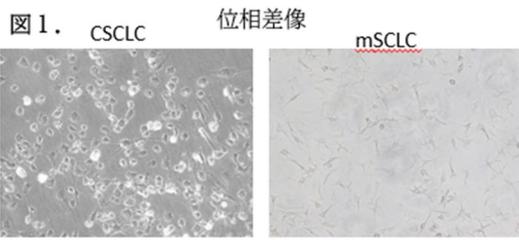
培養開始から 14 日目の代表的な Sox10, Krox20, S100, GAP43, p75NTR, GFAP, Nestin, MBP の発現を提示する (図 2)。しかし、これらは DSC の発現と比較すると、はるかに低い発現といえた (図 3)。

#### 細胞免疫染色

8 と 22 日後に抗 s100b 抗体、抗 p75NTR 抗体、抗 GAP43 抗体、抗 NG2 抗体 (シュワン細胞マーカー) による免疫染色と DAPI による核染色を行ったところ、弱い陰性コントロールに比較して強い発現が見られた。しかし、RT-PCR の結果と同様、DSC に比較すると、その発現は明らかに低い結果となった (図 4)。

#### 軸索伸長作用の検討

CCSC、の培養上清の NG108-15 neuronal cells の神経突起伸長に対する促進効果については、HDF に比較して優位性はみられなかった。また、DSC に比較すると、促進効果は低かった (図 5)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Louis Fiona, Sawai Seiji, Seki Makoto, Numajiri Toshiaki, Takahashi Kenji, Mazda Osam	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct Conversion of Human Fibroblasts into Adipocytes Using a Novel Small Molecular Compound: Implications for Regenerative Therapy for Adipose Tissue Defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 605 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10030605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sowa Yoshihiro, Kodama Takuya, Fujikawa Kei, Morita Daiki, Numajiri Toshiaki, Sakaguchi Koichi	4. 巻 26
2. 論文標題 The influence of venous system patterns on DIEP flap viability for breast reconstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2000656X.2021.1898971	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 -
1. 著者名 Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Tomita Koichi, Adachi Tetsuya, Numajiri Toshiaki, Mazda Osam	4. 巻 146
2. 論文標題 Reply: Involvement of PDGF-BB and IGF-1 in Activation of Human Schwann Cells by Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plastic & Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 826e ~ 827e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000007407	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 -
1. 著者名 Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Tomita Koichi, Adachi Tetsuya, Numajiri Toshiaki, Mazda Osam	4. 巻 144
2. 論文標題 Involvement of PDGF-BB and IGF-1 in Activation of Human Schwann Cells by Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 1025e ~ 1036e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000006266	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sowa Y, Kishida T, Numajiri T, Mazda O
2. 発表標題 Direct reprogramming of Fibroblasts into Schwann Cells
3. 学会等名 The 14th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sowa Y, Kishida T, Numajiri T, Mazda O
2. 発表標題 Potential application of adipose tissue in peripheral nerve injury.
3. 学会等名 (Panel 6: Learn from Asia.) IFATS2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sowa Y, Kishida T, Morita D, Kodama T, Numajiri T, Mazda O
2. 発表標題 Direct Reprogramming of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve.
3. 学会等名 American Society of Plastic Surgeons 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo.
3. 学会等名 学会賞講演 第61回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 (パネル4: 神経再生への挑戦) 新規人工神経開発に向けたフィジブルなシュワン細胞供与法の検討
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 Platelet-rich plasma (PRP)のシュワン細胞に対する増殖・遊走能効果の検討
3. 学会等名 第17回再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 Platelet-rich plasma (PRP)はシュワン細胞を介して神経再生を促進させる
3. 学会等名 第10回日本創傷外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 線維芽細胞から転換したシュワン細胞の末梢神経損傷部位への移植効果の検討
3. 学会等名 第29回日本末梢神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 素輪善弘, 岸田綱郎, 沼尻敏明, 松田修
2. 発表標題 Platelet-rich plasma (PRP)はシュワン細胞を介して末梢神経再生を亢進させる
3. 学会等名 第10回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会, 第8回DDS再生医療研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 PCT/JP2020/012476	発明者 素輪 善弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、202 0 -07137	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 202 0 -191895	発明者 素輪 善弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、202 0 -191895	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 26特05 - US(米国)	発明者 素輪 善弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第10,675,382号	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 26特05 - JP(日本)	発明者 素輪 善弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第6811443号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	松田 修 (Osam Matsuda)  (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Tunao Kishida)  (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  (24303)	

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
---------	---------