

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10693

研究課題名(和文)ハンセン病原菌誘導幹細胞・シュワン細胞を用いた新規運動器系組織再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method of regenerative therapy on tissues associated with locomotion using M. leprae-induced stem cells and Schwann cells

研究代表者

真先 敏弘 (Masaki, Toshihiro)

帝京科学大学・医学教育センター・教授

研究者番号：00585028

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)：シュワン細胞の神経外組織再生作用について検討した。その結果、マウス一次培養シュワン細胞がPDGF-AA, IGF-BP3を培養上清中に分泌すること、またRT-PCRによりこれらの遺伝子をマウス一次培養シュワン細胞が発現することを明らかにした。特にPDGF-AAは組織再生において中心的役割を果たすblastemaの増殖を促進する作用が報告されている。またマウス皮膚損傷モデルに対する細胞移植実験においては移植シュワン細胞がホスト由来シュワン細胞をリクルートすることによって皮膚再生を促進している可能性が示唆された。ただし移植実験においてシュワン細胞が皮膚再生を促進する直接的な証拠は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はシュワン細胞が皮膚再生を促進する可能性を示唆した。特にシュワン細胞によるPDGF-AAの分泌は両生類・哺乳類の組織再生に中心的役割を果たすblastemaの増殖促進を示唆する点で重要である。本研究の成果は、学術的には末梢神経に限定されていたシュワン細胞の概念が覆る可能性を示唆し、シュワン細胞の組織再生という新しい機能を解明する研究を促進し、ひいてはシュワン細胞についての新しい概念が作られる可能性がある。また社会的にはシュワン細胞移植という再生医療の新しい方法を提示し、再生医療の発展を促進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Extra-nerve tissue repair function of Schwann cells was analyzed. As a result, it was delineated that mouse primary Schwann cells secrete PDGF-AA and IGFBP3. Also expression of Pdgfa and Igfbp3 were confirmed by RT-PCR. PDGF-AA is reported to induce blastema proliferation which is critically important in tissue regeneration in both amphibians and mammals. In Schwann cell transplantation to mouse skin injury model, it was suggested that transplanted Schwann cells enhance skin regeneration by recruiting endogenous Schwann cells. However, direct evidence showing Schwann cells enhance skin regeneration could not be obtained.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 皮膚再生 PDGF シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、シュワン細胞は末梢神経に限定された機能を持つ細胞と考えられてきた。しかし近年、このシュワン細胞の概念を覆す知見が得られつつある。つまり以下のようにシュワン細胞が組織再生において中心的な役割を果たす芽体細胞群(blastema)の増殖を促進することが分かってきた。2007年 Kumar, 2016年 Johnston はシュワン細胞系細胞が両生類四肢再生ないしマウス指尖再生に重要な役割を果たす blastema の増殖を促進すること、またこの増殖にシュワン細胞系細胞が分泌する PDGF-AA が関わっていることを報告した。以上からシュワン細胞は末梢神経における機能に加え、四肢再生を含めた多様な組織(皮膚、骨、軟骨、神経、血管、結合組織など)の再生に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

2. 研究の目的

シュワン細胞の組織再生促進作用を明らかにするため、シュワン細胞が組織再生を促進する液性因子を発現・分泌するかどうか、また主として皮膚損傷モデルを用いてシュワン細胞の移植により皮膚再生を促進するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス一次培養シュワン細胞の発現・分泌する液性因子の検討

RayBio® C-series Mouse Growth Factor Array 3, Ray Biotech は32種の液性因子を同時に測定することが可能であり、この中に重要な組織再生液性因子と考えられるものがすべて含まれていた。このため、この array を用いてシュワン細胞培養上清中の液性因子を解析した。コントロールとしては細胞を培養していない培養液を用いて比較検討した。

次いで上清中に存在することが確認された PDGF-AA, IGFBP3 について RT-PCR によりシュワン細胞に発現しているかどうかを解析した。

なおこれらの解析においては、前回科研費課題 26501006「上皮間葉転換による幹細胞誘導リプログラミングの分子機構の解明」において私たちが Snai1 をシュワン細胞に導入することにより開発作成した間葉系幹細胞類似細胞(本報告書では Snai1-シュワン細胞と記載)における発現も併せて検討した。

(2) GFP 標識シュワン細胞を用いたマウス皮膚損傷モデルへの移植実験

マウス一次培養シュワン細胞にレンチウイルスを用いて GFP 遺伝子を導入し、GFP で標識した。この GFP 標識シュワン細胞をマウス皮膚損傷モデルの皮膚損傷部位に一か所あたり 10^7 個程度、移植した。マウス皮膚損傷についてはマウス背部に 7 mm 角程度の正方形の形で皮膚全層を除去した。1 週後、移植部位をサンプリングし、クリオスタットにて凍結切片を作成。HE 染色とともに CD31, p75, S100, CGRP に対する特異抗体(それぞれ R&D System, Abcam, Abcam, Abcam)を用いて細胞移植したかたものと比較検討した。なお CD31 は血管再生、p75, S100 はシュワン細胞、CGRP は軸索再生のマーカーとして使用した。

4. 研究成果

(1) マウス一次培養シュワン細胞の発現・分泌する液性因子の検討

32 種の液性因子のうち、PDGF-AA と IGFBP3 のみがシュワン細胞培養上清および Snai1-シュワン細胞培養上清ともにコントロールと比較して明らかに増加していた。

RT-PCR ではシュワン細胞、Snai1-シュワン細胞ともに PDGF-AA, IGF-BP3 の発現を確認した。PDGF-AA については Snai1-シュワン細胞はシュワン細胞よりも発現がやや多い傾向があったが、定量的解析では有意差はなかった。

(2) GFP 標識シュワン細胞を用いたマウス皮膚損傷モデルへの移植実験

本検討では次のような新しい知見を得た。

移植シュワン細胞は真皮深層に局在した。

移植シュワン細胞の周囲に多数の宿主由来細胞(GFP 陰性)が集簇した。

移植シュワン細胞の周囲に集簇した細胞の多くは S100, p75 陽性であり、シュワン細胞系細胞が移植シュワン細胞周囲に集簇することが分かった。

これらの結果は移植シュワン細胞がさらに宿主動物由来シュワン細胞をリクルートすることにより、シュワン細胞による組織再生効果を増幅している可能性を示唆している。

また CD31 染色では移植皮膚においてやや染色が増加する傾向が見られたが、定量的解析

によって有意差はなかった。CGRP は特異的染色を得るのが困難であり、軸索再生についての評価はできなかった。また損傷皮膚に視診上、表皮再生および体毛の再生が促進される傾向を認めたが、マウスのサンプル数が少数であったため定量的解析はできなかった。

以上のように、一次培養シュワン細胞が blastema 増殖作用が報告されている PDGF-AA を分泌すること、また角膜上皮再生や骨再生促進作用が報告されている IGFBP3 を分泌すること、移植シュワン細胞がホスト動物由来シュワン細胞をリクルートすることの3つを本研究における新しい知見として得ることができた。

これら3つの結果はいずれもシュワン細胞が皮膚再生を促進することを示唆する。しかし上記のように本研究の移植実験においては、シュワン細胞が実際に皮膚再生を促進する直接的な証拠を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 真先敏弘、佐々木直道、斉藤史明、園生雅弘、Anura Rambukkana
2. 発表標題 Soluble factors of Schwann cells and Schwann cell-derived stem cells promoting tissue regeneration
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木直道、斉藤史明、園生雅弘、Anura Rambukkana, 真先敏弘
2. 発表標題 Soluble factors of Schwann cells and Schwann cell-derived stem cells promoting tissue regeneration
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	斉藤 史明 (Saito Fumiaki) (40286993)	帝京大学・医学部・准教授 (32643)	
研究分担者	前島 洋 (Maejima Hiroshi) (60314746)	北海道大学・保健科学研究所・教授 (10101)	

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