

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14594

研究課題名（和文）イヌとヒトの比較オミクスを活用したヒト脱分化脂肪細胞の生理活性物質による神経分化

研究課題名（英文）Bioactive ligand-based neuronal reprogramming in human dedifferentiated fat cells using comparative omics between dogs and humans

研究代表者

中野 令 (Rei, Nakano)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：60755619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：中枢神経の損傷は不可逆的であり、機能再生には成熟した神経細胞の移植が有効である。近年、ES/iPS細胞を用いた神経細胞の創生と並んで、体細胞への遺伝子導入によって神経細胞を直接誘導する方法が盛んに研究されている。しかしながら、遺伝子導入した細胞の移植は現実的ではないため、遺伝子導入を伴わない方法で分化誘導を行う必要がある。脱分化脂肪細胞は脂肪から得られ、生体外での増殖能を持つため、再生医療の細胞源として期待されている。本研究では、生理活性物質を使って、遺伝子導入を行わずにヒトでの神経分化を達成に成功した。これらの成果は、ヒトの中枢神経系の機能再生を目的とした治療法の実現へ貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者の研究から、脱分化脂肪細胞の生理活性物質による神経分化の効率は高効率であることが明らかとなっている。生理活性物質および化合物を使って、遺伝子導入を置き換えることで、腫瘍化や過剰な免疫応答のリスクを回避することができ、臨床応用の実現可能性が大きく高まることが期待できる。また、本研究の成果から、霊長類やげっ歯類といったヒトに近いとされるモデル生物以外の動物種の情報もヒトの細胞分化に活用できることを示すことができる。本研究のストラテジーを基にして、幅広い動物種のデータを有効活用し、ヒトではこれまで不可能であった種類の細胞分化を誘導する新技術の発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Disorders of the central nervous system cause permanent motor and sensory dysfunction or leads to death in severe cases. Functional regeneration in the central nervous system by stem cell transplantation has been studied, but no effective treatment method has been established. In this study, we established a compound-based neuronal reprogramming system for human dedifferentiated adipocyte.

研究分野：神経リプログラミング

キーワード：神経リプログラミング 脱分化脂肪細胞 慢性脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経の損傷は不可逆的であり、機能再生には成熟した神経細胞の移植が有効である。近年、ES/iPS 細胞を用いた神経細胞の創生と並んで、体細胞への遺伝子導入によって神経細胞を直接誘導する方法が盛んに研究されている。しかしながら、遺伝子導入した細胞の移植は現実的ではないため、遺伝子導入を伴わない方法で分化誘導を行う必要がある。脱分化脂肪細胞は脂肪から得られ、生体外での増殖能を持つため、再生医療の細胞源として期待されている。申請者は、既にイヌの脱分化脂肪細胞を生理活性物質のみで神経分化させることに成功している。しかしながら、同じ方法を用いてもヒトの場合は神経分化が進まないことを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、脱分化脂肪細胞とその化合物添加に対する DNA 修飾や転写レベルの違いを、過去に例のないイヌとヒトの比較オミクス解析を活用して俯瞰することで、ヒトでの神経分化に必要な内因性の遺伝子を明らかにし、その活性化を引き起こす生理活性物質をスクリーニングする。本研究で明らかにした生理活性物質を使って、遺伝子導入を行わずにヒトでの神経分化を達成する。

3. 研究の方法

申請者は、化合物スクリーニングおよび比較オミクス解析を行い、ヒト脱分化脂肪細胞の神経リプログラミングに重要な化合物を明らかにした。神経マーカーの mRNA 発現、タンパク質発現、タンパク質局在について明らかにするため、リアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング、免疫染色を行った。また、パッチクランプ、カルシウムイメージング、神経伝達物質イメージングを行い化合物で処理した細胞の神経機能を明らかにした。神経伝達物質の合成酵素の mRNA 発現をリアルタイム PCR で検出し、神経伝達物質の合成を免疫染色で確認した。

4. 研究成果

イヌ脱分化脂肪細胞をレチノイン酸と bFGF で処理することによって、アセチルコリンおよびドパミン刺激に反応する神経細胞へと分化することを明らかにした。

しかし、ヒトの脱分化脂肪細胞に同様の処理を行っても、神経細胞へと分化しないことも明らかになった。化合物スクリーニングの結果、ヒト脱分化脂肪細胞の神経リプログラミングに重要な化合物構造を明らかにした。さらに、ヒト脱分化脂肪細胞を化合物で処理すると、神経細胞マーカーである NEFL および MAP2 の mRNA 発現上昇をリアルタイム PCR にて捉えた。NEFL および MAP2 タンパク質発現が上昇することをウエスタンブロッティングにて検出した。NEFL および MAP2 のタンパク質は細胞質に局在することが免疫染色から明らかとなった。これらの結果から、化合物で処理することで神経リプログラミングが誘導されていることが示唆された。

さらに、パッチクランプによって活動電位を計測することで電気生理学的機能を有することが明らかとなった。またカルシウムイメージングによって電位依存性および神経伝達物質依存性の Ca^{2+} influx が確認された。神経伝達物質イメージングでは、電位依存性に神経伝達物質の放

出を認めた。神経伝達物質合成酵素である GAD1 および CHAT の mRNA 発現の上昇と GABA および Ach の合成が観察された。これらの結果から、化合物で処理した細胞が神経細胞類似の機能を有することが示唆された。

これらの研究成果によって、申請書らはヒト脱分化脂肪細胞の神経リプログラミングシステムを開発に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Mizuno Masashi, Nakano Rei, Nose Saki, Matsumura Moeka, Nii Yasuyuki, Kuroguchi Kentaro, Sugiya Hiroshi, Uechi Masami	4. 巻 13
2. 論文標題 Canonical NF- B p65, but Not p105, Contributes to IL-1 -Induced IL-8 Expression in Cardiac Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 863309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.863309	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 Zhang B, Vogelzang A, Miyajima M, Sugiura Y, Wu Y, Chamoto K, Nakano R, Hatae R, Menzies RJ, Sonomura K, Hojo N, Ogawa T, Kobayashi W, Tsutsui Y, Yamamoto S, Maruya M, Narushima S, Suzuki K, Sugiya H, Murakami K, Hashimoto M, Ueno H, Kobayashi T, Ito K, Hirano T, Shiroguchi K, Matsuda F, Suematsu M, Honjo T, Fagarasan S	4. 巻 599
2. 論文標題 B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 471 ~ 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04082-1	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 該当する
1. 著者名 Luginbuhl Joachim, Kouno Tsukasa, Nakano Rei, Chater Thomas E., Sivaraman Divya M., Kishima Mami, Roudnický Filip, Carninci Piero, Plessy Charles, Shin Jay W.	4. 巻 16
2. 論文標題 Decoding Neuronal Diversification by Multiplexed Single-cell RNA-Seq	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 810 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.02.006	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 該当する
1. 著者名 Naruke Atsuto, Nakano Rei, Nunomura Junichi, Suwabe Yoko, Nakano Masumi, Namba Shinichi, Kitanaka Taku, Kitanaka Nanako, Sugiya Hiroshi, Nakayama Tomohiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Tpl2 contributes to IL-1 -induced IL-8 expression via ERK1/2 activation in canine dermal fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259489	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 Suwabe Yoko, Nakano Rei, Namba Shinichi, Yachiku Naoya, Kuji Manami, Sugimura Mana, Kitanaka Nanako, Kitanaka Taku, Konno Tadayoshi, Sugiya Hiroshi, Nakayama Tomohiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Involvement of GLUT1 and GLUT3 in the growth of canine melanoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243859	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 Yoshitake Ryohei, Saeki Kohei, Eto Shotaro, Shinada Masahiro, Nakano Rei, Sugiya Hiroshi, Endo Yoshifumi, Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Aberrant expression of the COX2/PGE2 axis is induced by activation of the RAF/MEK/ERK pathway in BRAFV595E canine urothelial carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64832-5	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 Nakano Rei, Nakayama Tomohiro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Biological Properties of JNK3 and Its Function in Neurons, Astrocytes, Pancreatic -Cells and Cardiovascular Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1802 ~ 1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081802	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 Nakano Rei, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Kitanaka Nanako, Suwabe Yoko, Konno Tadayoshi, Yamazaki Jun, Nakayama Tomohiro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-Transcriptional and Translational Function of Canonical NF- B Signaling in Activating ERK1/2 in IL-1 -Induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 579266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.579266	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 Nakano Rei, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Kitanaka Nanako, Sato Masaki, Shibukawa Yoshiyuki, Masuhiro Yoshikazu, Kano Koichiro, Matsumoto Taro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229892	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 Kitanaka Nanako, Nakano Rei, Sakai Manabu, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Konno Tadayoshi, Nakayama Tomohiro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 ERK1/ATF-2 signaling axis contributes to interleukin-1 -induced MMP-3 expression in dermal fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222869	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 Kitanaka Nanako, Nakano Rei, Sugiura Kanae, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Konno Tadayoshi, Nakayama Tomohiro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Interleukin-1 promotes interleukin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0220262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220262	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 Kitanaka Nanako, Nakano Rei, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Konno Tadayoshi, Nakayama Tomohiro, Sugiya Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 NF- B p65 and p105 implicate in interleukin 1 -mediated COX-2 expression in melanoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0208955-0208955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0208955	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 Nakano Rei, Kitanaka Taku, Namba Shinichi, Kitanaka Nanako, Sugiya Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Protein kinase C regulates nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase, which contributes to bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8535-8535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26473-7	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 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中野 令, 最首 桃子, 岡田 純一, 中野 真澄, 難波 信一, 北中 菜菜子, 北中 卓, 今野 忠好, 中山 智宏, 杉谷 博士
2. 発表標題 グルココルチコイドによる翻訳阻害を介したシクロオキシゲナーゼ-2発現の抑制
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成毛 淳人, 中野 令, 諏訪部 陽子, 布村 順一, 杉浦 叶, 中野 真澄, 北中 菜菜子, 北中 卓, 杉谷 博士, 中山 智宏
2. 発表標題 イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン8の発現 インターロイキン1 によるTp12を介したERK経路の活性化
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諏訪部 陽子, 中野 令, 難波 信一, 八竹 直哉, 久慈 愛, 杉村 真奈, 北中 菜菜子, 北中 卓, 今野 忠好, 中野 真澄, 合屋 征二郎, 高橋 朋子, 杉谷 博士, 中山 智宏
2. 発表標題 イヌメラノーマ細胞におけるGLUT1およびGLUT3を介した細胞増殖
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 布村 順一, 中野 令, 諏訪部 陽子, 成毛 淳人, 中野 真澄, 八竹 直哉, 久慈 愛, 杉村 真奈, 難波 信一, 北中 菜菜子, 合屋 征二郎, 高橋 朋子, 杉谷 博士, 中山 智宏
2. 発表標題 イヌメラノーマ細胞におけるIL-1 刺激によるNF- B経路を介したMMP-3発現
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野令
2. 発表標題 伴侶動物の機能再生を目標としたイヌ体細胞の神経プログラミングシステムの開発
3. 学会等名 第163回日本獣医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 中野令, 北中菜菜子, 諏訪部陽子, 難波信一, 北中卓, 合屋征二郎, 高橋朋子, 中山智宏, 杉谷 博士
2. 発表標題 イヌ滑膜線維芽細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2に対するグルコサミン塩酸塩誘導性グリコシル化抑制とオートファジー誘導性タンパク質分解
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 諏訪部陽子, 中野令, 杉浦叶, 難波信一, 北中菜菜子, 北中卓, 合屋征二郎, 高橋朋子, 中山智宏, 杉谷 博士
2. 発表標題 イヌ皮膚由来線維芽細胞におけるインターロイキン1 による Tpl-2/ERKシグナリング経路を介したインターロイキン8の発現
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 中野令、北中卓、難波信一、北中菜菜子、今野忠好、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ滑膜由来線維芽細胞におけるNF- B依存性ERK1/2核移行を介したCOX-2発現
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久慈愛、中野令、杉村真奈、八竹直哉、難波信一、北中菜菜子、今野忠好、北中卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ悪性黒色腫細胞のTRPA1を介した細胞死におけるPLD1の関与
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八竹直哉、中野令、久慈愛、杉村真奈、難波信一、北中菜菜子、今野忠好、北中卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌメラノーマ細胞におけるIL-1 刺激によるMMP-3発現
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野令
2. 発表標題 伴侶動物の機能再生を目標としたイヌ体細胞の神経リプログラミングシステムの開発
3. 学会等名 日本大学センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rei Nakano, Yoshiyuki Shibukawa, Koichiro Kano, Taro Matsumoto, Hiroshi Sugiya
2. 発表標題 Bioactive Ligands-Based Neuronal Reprogramming of Human Dedifferentiated Fat Cells without Induction of Ectopic Genes
3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rei Nakano, Yoshiyuki Shibukawa, Koichiro Kano, Taro Matsumoto, Hiroshi Sugiya
2. 発表標題 NEURONAL DIFFERENTIATION OF DEDIFFERENTIATED CELLS FROM HUMAN MATURE ADIPOCYTES
3. 学会等名 ISSCR 17th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野令、北中卓、難波信一、北中菜菜子、澁川義幸、加野浩一郎、松本太郎、杉谷博士
2. 発表標題 イヌ脱分化脂肪細胞の脳タイプJNK (JNK3) を介したGABA作動性ニューロンへのリプログラミング
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久慈愛、中野令、杉村真奈、八竹直哉、難波信一、今野忠好、北中菜菜子、北中卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌメラノーマ細胞はアルカリ環境下で細胞死が誘導される
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉村真奈、中野令、久慈愛、八竹直哉、難波信一、今野忠好、北中菜菜子、北中卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 イヌメラノーマ細胞におけるホルポールエステルによるシクロオキシゲナーゼ2発現
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八竹直哉、中野令、久慈愛、杉村真奈、難波信一、今野忠好、北中菜菜子、北中卓、高橋朋子、中山智宏、杉谷博士
2. 発表標題 グルコサミン塩酸塩によるイヌメラノーマ細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第161回日本獣医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 1. 哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞を製造する方法及び哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞への分化誘導用キット	発明者 杉谷博士、中野令、松本太郎、加野浩一郎	権利者 学校法人日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、P180014843	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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