

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390074

研究課題名（和文） 骨髄間葉系細胞における胚葉を超えた分化転換機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of transdifferentiation in bone marrow stromal cells

研究代表者

出沢 真理 (DEZAWA MARI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50272323

研究成果の概要：骨髄間葉系細胞に Notch 細胞質ドメインの遺伝子導入とサイトカイン刺激を組み合わせることによって神経細胞や骨格筋細胞が特異的に誘導される。本研究では間葉系細胞からの胚葉を超えた分化転換機構を解明するために、Notch 導入による骨髄間葉系細胞内シグナル系や遺伝子発現の変化を解析し、ある特定のシグナル系の変動を認め、またそれらは通常の発生過程における神経幹細胞／前駆細胞や筋前駆細胞での Notch の反応とは異なるものであった。骨髄間葉系細胞における特殊性を反映しているものと思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：幹細胞生物学、再生医学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：幹細胞、分化転換、間葉系細胞、Notch、神経

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系細胞は患者本人からの容易に採取可能であり、細胞数が確保が可能であることから「自己細胞移植治療」への応用が期待される。この細胞に Notch 遺伝子導入とサイトカイン処理を順序だてて組み合わせることによって、神経細胞(Dezawa et al., J Clin Invest, 2004)や骨格筋細胞(Dezawa et al, Science, 2005)への分化転換が引き出されることを見出した。本研究では Notch の骨髄間葉系細胞における作用点を明らかにし、「胚葉を超えた分化転換」の分子機構を解明

することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) Initial step の解析：神経誘導では NICD の導入が、骨格筋誘導ではサイトカイン処理が誘導の initial step に相当する。この段階における遺伝子発現の違いはその後の誘導の方向性を決定付ける重要な段階にあると考えられ、操作の前後における遺伝子発現の違いを解析する。

(2) 分化転換における Notch の新規の機能：Notch のドメインごとの導入による誘導

を行い、分化転換活性ドメインを同定する。さらにこの活性ドメインと GFP の融合蛋白質を発現するベクターを骨髄間葉系細胞へ導入し、抗 GFP 抗体によって免疫沈降し、共沈してくる蛋白質をマス・スペクトロメトリーで同定する。また Notch はシグナル伝達系に作用をしていることが想定され、NICD 導入と同時に各種シグナル伝達阻害剤を投与し、神経・筋細胞への分化に対する影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 各種阻害剤を投与し、神経誘導と筋肉誘導をおこなうことによってどのシグナル系が動いているかを同定する。

(2) 分化誘導の initial step の解析：骨髄間葉系細胞に NICD を導入すると神経幹細胞様に分化する (Dezawa et al., J Clin Invest, 2004, Hayase et al., 2009 JCBFM in press)。また bFGF, PDGF, Neuregulin, FSK のサイトカインを投与後によって骨髄間葉系細胞は Pax7 などの筋前駆細胞のマーカーを発現するようになる (Dezawa et al., Science, 2005)。この両操作は誘導の initial step に相当する。これらの刺激の前後において、DNA microarray を用いてどのような因子が変化するかを網羅的に調べ、pathway 解析において関連するシグナル系を絞り込む。

(3) 導入した Notch タンパクの発現動態を Western blot によって追跡する。NICD-GFP の fusion plasmid を作製し、導入し、6 時間ごとに 5 日間までの間のサンプルを解析してその発現動態を追跡する。また plasmid による発現、retrovirus による発現をそれぞれ試み、Notch の発現動態と分化転換との相関を調べる。

(4) Notch の新規の機能：Notch は RAM, Ankyrin repeat, TAD のドメインから構成されている (Wilson JJ & Kovall RA, Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. Cell, 124: 985-, 2006)。そこでそれぞれのドメインを pCI-neo plasmid vector に導入して神経誘導 (MAP2 陽性率で評価)、骨格筋誘導 (MyoD 陽性率によって評価) を行い、Q-PCR を用いてそれぞれの分化転換マーカー (例えば神経では NuroD, Neurogenin など、筋肉では Pax7, Myogenin, MyoD, など) の発現量を調べ、神経および筋肉への分化転換への活性を有するドメインを同定する。さらにこの活性ドメインと FLAG の融合蛋白質を発現するベクターを骨髄間葉系細胞へ導入し、抗 FLAG 抗体によって免疫沈降し、共沈してくる蛋白質をマス・スペクトロメトリーで同定する。現在いくつかの結合蛋白の候補が絞られているため、これらの裏づけを免疫沈降などの方法でさらに確認を

行なう。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で骨髄間葉系細胞に Notch Intracellular Domain (NICD) を導入し、サイトカイン刺激をすると神経細胞に分化すること、また誘導順序を逆にしてサイトカインで刺激し NICD を導入すると骨格筋が誘導されることを見出した。この間葉系幹細胞の分化転換機構を NICD の果たす役割から検証した。

(2) 骨髄間質細胞に NICD を導入すると、神経前駆細胞へ分化する。そこで、様々な各種阻害剤を加えて、分化への影響を検討した結果、NICD は MEK1/2 シグナル系を主体として作用をしている可能性が強く示唆された。

(3) Western blot で NICD-GFP の発現を追跡したところ、導入から 48 時間にピークがあり、その後速やかに分解され、4 日にはほとんど認められなかった。一方レトロウイルスで NICD を stable transfectant として導入するとサイトカイン刺激による分化転換が阻害された。このことから、NICD はすばやく分解され、一過性に発現があることが重要であることが分かった。

(4) ラットおよびヒトの骨髄間葉系細胞に NICD を導入し、その前後における DNA microarray を行い、signal pathway 解析を行った。その結果、誘導前の細胞で発現している未分化性に関わる GATA3, GATA4, GATA6, Foxo1A などが NICD 導入によって発現が消失し、逆に PARP, BRCA, STAT2 などの pathway が活性化されることがわかった。

(5) NICD の様々な deletion mutant を作成し、トランスフェクションすることによって、神経細胞への分化転換に必要な最小限の Notch 細胞内領域を検索したところ、アンキリン・リピート領域に強い神経と筋肉の誘導活性があることが示唆された。これは、NICD によってもたらされる神経細胞誘導が、従来言われている核における転写制御作用によるものではないことを示唆しており、大きな所見である。また、アンキリン・リピートと GFP との融合蛋白質の発現ベクターも作成したが、これをトランスフェクションしてもやはり同様の高効率で神経細胞へと分化させることが確認できた。

(6) 骨髄間質細胞へ Ankyrin-FLAG を導入し免疫沈降を行うことによって、アンキリン・リピートと相互作用する蛋白質を同定したところ conventional Notch pathway に関連するもの以外の分子と結合することが分かった。

(7) このことから骨髄間葉系細胞での分化転換には conventional pathway とは別の経路で誘導が起きていることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計19件)

- ① K Nagane, M Kitada, S Wakao, M Dezawa, Y Tabata, (5人中4番目: Dezawa=correspondence): Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. Tissue Eng 15(00): (in press) (査読有)
- ② 北田容章, 出澤真理: 神経・筋変性疾患における細胞移植治療; 骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植への可能性, Clin Neurosci: (in press) (査読無)
- ③ Makoto Hayase, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Yutaka Itokazu, Kazuhiko Nozaki, Nobuo Hashimoto, Yasushi Takagi, Mari Dezawa(*Correspondence): Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2009: (in press) (査読有)
- ④ Ishikawa N, Suzuki Y, Dezawa M, Kataoka K, Ohta M, Cho H, Ide C: Peripheral nerve regeneration by transplantation of BMSC-derived Schwann cells as chitosan gel sponge scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2009: (in press) (査読有)
- ⑤ Kidata M & Dezawa M: Induction system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases. Histology and Histopathology 24(5): 631-642, 2009(査読有)
- ⑥ Dezawa M: Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases. Medical Molecular Morphology 41(1): 14-19, 2008(査読有)
- ⑦ Dezawa M, Nabeshima Y-I: Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy. "Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation" in Research Signpost: 79-92, 2008(査読有)
- ⑧ Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M: Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord. J Neurosurg Spine, 9(6): 600-610, 2008 (査読有)
- ⑨ 出澤真理: 骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性, 最新医学 63 (12): 55-63, 2008(査読無)
- ⑩ 出澤真理: 筋ジストロフィーと細胞移植治療, 医学のあゆみ 226 (5): 393-396, 2008 (査読無)
- ⑪ Dezawa M: Induction system of neuronal and muscle cells from bone marrow stromal cells and applications for degenerative diseases. Inflammation and Regeneration 27(2): 96-101, 2007(査読有)
- ⑫ Ishikawa N, Suzuki Y, Ohta M, Cho H, Suzuki S, Dezawa M, Ide C: Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge. J Biomed Mater Res A. 83(1): 33-40, 2007 (査読有)
- ⑬ Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C: Administration of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells After Spinal Cord Injury Suppresses Cavity Formation and is Followed by Functional Recovery. J Neurotrauma 24: 1026-1036, 2007(査読有)
- ⑭ Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M: Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. Biochem Biophys Res Commun. 359: 915-920, 2007(査読有)

- ⑮ 出澤真理：骨髄間葉系細胞からの神経・骨格筋系細胞の誘導，再生医療 16：19-25，2007(査読無)
- ⑯ 出澤真理：胚葉をこえた多分化能と自己細胞移植治療への可能性，蛋白質核酸酵素 シリーズ「幹細胞技術の現状と展望」52 (2)：158-165，2007(査読無)
- ⑰ 出澤真理：骨髄間葉系細胞を用いた筋ジストロフィーへの再生医療の可能性，BRAIN and NERVE-神経研究の進歩 59：503-508，2007(査読無)
- ⑱ 石川裕人，出澤真理：視神経移植とは「視覚と眼球運動のすべて」メディカルビュー社：216-221，2007(査読無)
- ⑲ 国府田正雄，出澤真理：骨髄間葉系細胞を用いた脊髄損傷修復の試み，脳 21 10(2)：144-147，2007(査読無)

[学会発表] (計18件)

- ① 北田容章，出澤真理：成体中枢神経に存在する幼若細胞の探索—内在性前駆細胞の賦活化による神経疾患治療をめざして—，日本解剖学会第114回全国学術集会、岡山、3/27-3/29，2009.
- ② 出澤真理：骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植による神経・筋変性疾患の根本治療法の開発、シンポジウム「再生医療のブレークスルーを目指して」、東京工業大学、1月23日、2009.
- ③ 出澤真理：自己細胞移植による神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発、医薬基盤研究所基礎研究推進事業研究成果発表会、大阪、12月4日、2008.
- ④ Dezawa M：A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. Adult Stem Cells-Biology and Clinical Applications Conference, Brisbane, Australia, November 25-29, 2008.
- ⑤ Dezawa M：A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases. The 21st Chinese SCI Academic Annual Meeting & The 3rd International SCI Treatments & Trials Symposium, Beijing, China, October 29-November 1, 2008.
- ⑥ 出澤真理：思わぬ発見をもたらした骨髄間葉系細胞の分化転換システムと自己細胞移植治療の可能性、女性研究者の現状とこれから、Educational Cardiology in Chiba、千葉、9月4日、2008.
- ⑦ 出澤真理：骨髄間葉系細胞の神経系細胞・筋細胞への誘導システムと変性・損

傷疾患への応用の可能性、第31回日本神経科学会、東京、7月11日、2008.

- ⑧ Dezawa M：Insights into autotransplantation: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. Chicago Neural Repair Club, Children's Memorial Research Center, Northwestern Univ., Chicago, USA, April 13-17, 2008.
- ⑨ 出澤真理：骨髄間葉系細胞における胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦、第113回日本解剖学会、大分、3/27-3/29，2008.
- ⑩ Dezawa M：Bone marrow stromal cells from auto-cell transplantation therapy: applications for neuro- and muscle-degenerative diseases. The 9th US-Japan symposium on Drug Delivery Systems. Hawaii, December 16-20, 2007.
- ⑪ 出澤真理：思わぬ発見をもたらした分化誘導システム：骨髄間葉系細胞の分化誘導システムの確立と神経・筋疾患への応用の可能性、発生工学・疾患モデル研究会、東京、11月26日、2007.
- ⑫ Dezawa M：The discovery of specific induction system in bone marrow stromal cells: Insights into auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases. 17th Lake Shirakaba Conference, Aurora in Regeneration, Vedbaek, Denmark, October 28-November 1, 2007.
- ⑬ Dezawa M：The unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells and application for degenerative diseases. The International Stem Cells Conference, Agrigento, Italy, October 11-13, 2007.
- ⑭ 出澤真理：胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦、Translational Medicine Seminar、箱根、8/11-8/12、2007.
- ⑮ 出澤真理：骨髄間葉系細胞の分化誘導システムを用いた自己細胞移植治療への挑戦、第28回日本炎症・再生学会、東京、8/2-8/3、2007.
- ⑯ 出澤真理：骨髄間葉系細胞を用いた神経・筋疾患への自己細胞移植治療の可能性、第23回日本DDS学会、熊本、6/14-6/15、2007.
- ⑰ Dezawa M：Insights into auto-cell transplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. The 5th Annual Congress of IDDST, Shanghai, China, May 28-June 4, 2007.

- ⑱ 出澤真理：骨髄間葉系細胞を用いた脊髄再生治療の可能性、日本脊髄基金講演会 東京、5月13日、2007.

〔図書〕（計2件）

- ① 出澤真理：骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞の誘導，田畑泰彦編，遺伝子医学MOOK：メディカルドゥ社，pp. 46-49, 2008.
- ② 出澤真理：骨髄間葉系細胞からの神経細胞の誘導，田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK：メディカルドゥ社，pp. 54-56, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出澤 真理
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50272323

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鍋島 陽一
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60801024