

機関番号：22701
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390389
 研究課題名(和文) 幹細胞の神経分化ドメインの同定とそのペプチドを用いた神経再生医療に関する研究
 研究課題名(英文) Identification of neural induction domain in stem cells and neuronal regenerative medicine using the peptide derived from the domain
 研究代表者
 菅野 洋 (KANNO HIROSHI)
 横浜市立大学 医学部 准教授
 研究者番号：40244496

研究成果の概要 (和文)：

神経幹細胞の神経分化に関わるVHL蛋白の中のBCボックスモチーフ構造のアミノ酸配列が神経分化誘導に関わるドメイン(神経分化ドメイン)であることを明らかにし、このアミノ酸配列構造のペプチドに蛋白導入ドメインを結合して多能性幹細胞を神経細胞へ分化誘導する機能性ペプチド合成した。機能性ペプチドの神経分化誘導活性は約100種のBCボックス蛋白のうちVHL、ABS2、WSB2、LRR-1が強力であった。さらに多能性体性幹細胞にこれらのペプチドを導入して神経疾患動物の脳・脊髄内へ移植すると症状の改善を認め、脳・脊髄内で神経マーカー陽性の細胞へ分化していることが示され、多能性体性幹細胞の神経分化を誘導する機能性ペプチドは、そのペプチドにより神経分化誘導された体性幹細胞を移植して神経を再生させる可能性があることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

We identified a neural induction domain for somatic stem cells at elonign BC binding site in the VHL protein, and show neuronal differentiation of the cells by transfer of the domain peptide linked to protein transduction domain (PTD). In addition, we show that the domain has the same function for the other somatic stem cells, and that BC-box motifs within SOCS-box proteins also have an ability to induce neuronal differentiation. Furthermore, when the domain peptide-transferred stem cells are grafted into recipient nervous tissue, the grafted cells differentiate to neurons and recovery of the neuronal symptom is recognized. Thus, the neuronal differentiation of pluripotent somatic stem cells is occurred by transfer of the neural induction domain peptide linked to PTD and would contribute to neuronal regenerative therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学・機能的脳神経外科

キーワード：神経再生，幹細胞，神経分化ペプチド，脊髄再生，パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

幹細胞からニューロンへの神経分化に関わる蛋白には、Nurr1, Mash, Neurogenin, Notchなどが知られているが、本研究代表者らが報告した VHL (von Hippel-Lindau 腫瘍抑制蛋白) もその一つで、神経幹細胞に VHL 遺伝子を導入することにより、ニューロンへの分化を誘導し (Cancer Res, 2000)、分化誘導した細胞をパーキンソン病ラットの脳内へ移植して、移植した細胞のニューロンへの分化と症状の改善を認めている (Ann Neurol, 2003)。これらの結果から、神経幹細胞を VHL 遺伝子導入によりニューロンへ分化誘導しうることを、また、このようにして神経分化誘導した細胞をドナー細胞として、パーキンソン病などの神経難病の患者の脳に移植することにより神経を再生させて神経難病を治療しうる可能性が示された。しかし、この方法は、臨床応用するためには2つの問題点がある。一つは、遺伝子導入により分化誘導するという過程で遺伝子治療の手法を用いねばならないこと。もう一つは、神経幹細胞を用いるということであり、ヒトの神経幹細胞は自己の脳組織からの採取であれば手術を要し、十分な量の確保は容易でないこと、他人 (中絶した胎児) の脳組織からの採取とその細胞の使用には倫理的な問題や免疫 (移植細胞の拒絶) の問題を克服する必要があることである。これらの問題を解決するためには、遺伝子導入法を用いず、採取が容易な自己の組織幹細胞を用いて、その細胞を神経分化誘導させたのちに移植する技術の開発が重要と考えられたため、組織幹細胞の神経分化に共通するドメインを同定してそれを利用す

ることを考え、幹細胞の神経分化に関与するドメインを VHL の中で同定し、このドメインのアミノ酸配列からなるペプチドを合成してさらに細胞膜通過性の蛋白導入ドメインを結合して細胞内へ導入することにより幹細胞の神経分化を誘導することを試み、成功している (図 1. 米国特許取得 2007 年)。この神経分化ドメインは、BC ボックスモチーフといわれる 10 数個のアミノ酸配列からなり、このアミノ酸配列を含む BC ボックス蛋白すべてに存在し、VHL 以外の BC ボックス蛋白の BC ボックスモチーフも大部分は神経分化ドメインとしての機能があることが判明してきている。

しかもこの神経分化ドメインのペプチドの細胞内導入による神経分化誘導は、神経幹細胞のみならず皮膚由来幹細胞、骨髄間質細胞、脂肪幹細胞など調べたすべての組織幹細胞において認められており (図 2)、この神経分化ドメインは組織幹細胞の神経分化に共通のものではないかと考えられる。この神経分化ドメインペプチドの細胞内導入による神経分化のメカニズムについては、これまでの研究で、神経分化ドメインペプチドは細胞内へ導入後、Elongin BC と結合すること、その際に mRNA 伸張反応を促進する Elongin A と Elongin BC との結合を阻害すること、またアストロサイトへの分化を促進する転写因子 Stat3 の発現が阻害され、ニューロンへの分化に必須の NueoD の発現を誘導することが判明したがまだ明らかではない。

更に、この神経分化ドメインのペプチドを細胞内へ導入した幹細胞を神経疾患 (パーキンソン病、脊髄損傷、脳梗塞) モデル動物の脳・脊髄に移植することにより、神経症状の

改善を認めており、パーキンソン病モデルラットにおいては、神経分化ドメインペプチドを導入した皮膚由来幹細胞を移植すると脳内のドーパミンの濃度の上昇を認めている。また、移植した幹細胞は高率に脳・脊髄内でニューロン特異的蛋白の発現することが明らかとなっている。幹細胞はこれまで大部分はラット由来の細胞を用いてきたが、ヒト由来細胞においても同様な結果を得ている。

また神経分化ドメインペプチドを体内に投与（局所、全身）することで、パーキンソン病モデルマウスの症状が改善し、網膜変性疾患モデルでは網膜の神経細胞死が押さえていることから、神経保護作用も有することが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究においては以下の事項を遂行することを目的とした。

1) 幹細胞の神経分化ドメインの同定

幹細胞のニューロンへの分化に関わるドメインは、BC ボックス蛋白群の中の BC-box motif であることが判明したが、BC ボックス蛋白群として報告されているのは、SOCS-box superfamily 蛋白群に属するものだけである。BC-box motif に相同の構造を含む蛋白は、他にも存在し、その中には、Notch など神経分化に関わる蛋白も存在する。本研究においては、様々な蛋白群に神経分化ドメインが存在する部位を同定し、それぞれの活性について明らかにしてゆく。

2) 幹細胞の神経分化ドメインによる神経分化誘導のメカニズムの解明

これまで判明していることは①で述べた通りであるが、アストロサイトへの分化に関わる Stat3 は神経ドメインペプチド導入によりユビキチン/プロテアソーム系で分解されることが示唆されており、その機構を解明する。また、その機構とニューロンへの分化に

関わる NeuroD の発現誘導機構を明らかにし、幹細胞の神経分化のメカニズムそのものの解明に迫る。

3) 神経分化ドメインペプチドを導入した幹細胞をドナー細胞とした神経再生医療の開発

神経分化ドメインペプチドを幹細胞の細胞内へ導入するとニューロンへの分化が誘導され、その細胞を脳・脊髄に移植すると、神経疾患動物では神経症状の改善が得られているが、実際に移植した細胞が生体内でどのようなタイプのニューロンとして機能しているかは明らかではない。また、これまで動物モデルは齧歯類に限られていたが、臨床応用を視野におき霊長類も含めた検討を行う。

4) 神経分化ドメインペプチドの直接生体内投与（全身、局所）による効果の検討

神経分化ドメインペプチドの直接投与で、内在性の幹細胞が賦活化されてニューロンへ分化誘導されるか、あるいは、そのペプチドそのものに神経保護作用があるかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、①幹細胞の神経分化ドメインを BC ボックスモチーフのアミノ酸配列を含む蛋白群において同定し、神経分化ドメインによる神経分化誘導のメカニズムを解明することを計画する。BC ボックスモチーフを含む蛋白群は、全蛋白質の中から探索し、同定する。そのアミノ酸配列を明らかにし、そのアミノ酸配列のペプチドを合成し、幹細胞に導入して神経分化活性を調べる。このうちでもっとも神経分化活性の高いアミノ酸配列を明らかにし、そのアミノ酸配列のペプチドを以下の研究に用いる。神経分化ドメインによる神経分化誘導メカニズムの解明については、神経分化ドメインペプチドを導入した幹細胞内で引き起こされる反応を明らかにする。神経分化ドメインペプチドが Elongin BC

と結合し複合体を形成したのち、その複合体が Stat3 の発現の阻害を引き起こすことが、幹細胞からニューロンへの分化を誘導している可能性があり、それらの反応が実際に幹細胞で起こっているか (Stat3 の発現阻害に関してはユビキチン/プロテアソーム系が関与していると可能性がある) を検証すると同時にこれまで報告されてきた神経分化のメカニズムとの関連について検討する。②上記の方法で同定された様々な蛋白における神経分化ドメインのうちで、今後の幹細胞を用いた神経再生医療に用いるのに適したもの (神経分化活性が高く、生体内に投与して副作用等のないもの) を選別し、その神経分化ドメインからなるペプチドに細胞膜透過性を与えるために蛋白導入ドメイン (PTD) を結合して幹細胞内へ導入してニューロンへ分化誘導させる。用いる幹細胞としては、神経幹細胞、皮膚由来幹細胞、脂肪幹細胞、骨髄間質細胞等を用いるが、最も非侵襲的に採取可能で神経分化ドメインペプチドによる分化高率は神経幹細胞に匹敵する皮膚由来幹細胞を用いた検討を中心に行う。次に、これらのニューロンへ分化誘導させた幹細胞を各種神経疾患動物モデルの脳・脊髄へ移植し、移植細胞の機能性ニューロンへの分化、モデル動物の症状改善等について検討する。用いる神経疾患モデルは、パーキンソン病モデル (ラット)、脊髄損傷モデル (ラット)。

4. 研究成果

これまで神経細胞への分化能を有する多能性幹細胞に関して、研究代表者は神経幹細胞へ VHL 遺伝子を導入することで高率に神経細胞への分化誘導を示し (Cancer Res 2000)、研究分担者と研究代表者らは、骨髄間葉系幹細胞へ神経栄養因子と共に Notch 遺伝子を導入することで高率に神経細胞への分化誘導を示してきたが (J Clin InV 2003)、今回は

更に、研究代表者は VHL 蛋白の中で神経分化に関わるドメインを蛋白全長の中から蛋白構造解析に基づいて elongin BC の結合部位のアミノ酸配列であると同定し、そのドメインのアミノ酸配列からなるペプチド (神経分化ペプチド) を合成した (Portein Pept Lett 2009)。更に、この神経分化ペプチドを種々の多能性幹細胞 (神経幹細胞、皮膚由来幹細胞、骨髄間葉系幹細胞) に導入して、高効率に神経細胞へ分化誘導することに成功し、これらの分化誘導された多能性幹細胞を神経疾患モデル動物 (パーキンソン病・脊髄損傷) の脳・脊髄へ移植して、移植された細胞が神経細胞として機能して神経疾患モデル動物の症状が改善することを報告した (Neuroreport 2009; Stem Cell Dev 2009; Neuroreport 2010; J Neurosurg 2010)。これらのことから、神経系に分化しうる多能性組織幹細胞には神経分化ペプチドを導入することで、神経細胞へ分化誘導可能で、分化誘導された細胞をドナー細胞として用いた細胞移植治療は神経再生医療として期待できるものと考えられた。

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 10 件)

- 1). Yamazaki Y, Kanno H, Maeda K, Yoshida T, Kobayashi N, Kubo A, Yamaguchi Y, Saito T. Engrafted VHL peptide-delivered bone marrow stromal cells promote spinal cord repair in rats. Neuroreport. 21:287-292, 2010.
- 2). Higashida, T, Jitsuki S, Kubo A, Mitsushima D, Kamiya Y, Kanno H, Skin-derived precursors differentiate into dopaminergic neuronal cells in the brains of Parkinson's disease model rats.

- J Neurosurg 113(3) :648-55, 2010.
- 3) Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *Neuropathol Exp Neurol.* 69(9):973-985, 2010
 - 4) Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D, Teramoto N, Ose T, Itokazu Y, Koshino K, Watabe H, Iida H, Takamoto T, Tabata Y, Dezawa M. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 223(2):537-547, 2010
 - 5) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(19):8639-8643, 2010
 - 6). Kanno H, Nakano S, Kubo A, Mimura T, Tajima N, Sugimoto N. Neuronal differentiation of neural progenitor cells by intracellular delivery of synthetic oligopeptide derived from Von Hippel-Lindau protein. *Protein Pept Lett.* 16 :1291-1296., 2009
 - 7) Kubo A, Yoshida T, Kobayashi N, Yokoyama T, Mimura T, Nishiguchi T, Higashida T, Yamamoto I, Kanno H. Efficient generation of dopamine neuron-like cells from skin-derived precursors with a synthetic peptide derived from von Hippel-Lindau protein. *Stem Cells Dev.* 18: 1523-1532, 2009
 - 8) Maeda K, Kanno H, Yamazaki Y, Kubo A, Sato F, Yamaguchi Y, Saito T. Transplantation of Von Hippel-Lindau peptide delivered neural stem cells promotes recovery in the injured rat spinal cord. *Neuroreport.* 20 :1559-15563, 2009
 - 9) Hayase M, Kitada M, Wakao S, Itokazu Y, Nozaki K, Hashimoto N, Takagi Y, Dezawa M. Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(8):1409-20, 2009
 - 10) Nagane K, Kitada M, Wakao S, Dezawa M, Tabata Y. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells using spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A.* 15(7):1655-1665., 2009
- [学会発表] (計 6 件)
- 1) Kanno H, Kubo A, Higashida T, Kawahara N: Neuronal differentiation of stem cells by transfer of VHL peptide and regenerative therapy 9th International Medical Symposium on VHL, リオデジャネイロ, 2010年10月
 - 2) 菅野 洋, 久保篤彦, 東田哲博, 川原信隆 : 多能性体性幹細胞の神経分化を誘導する

機能性ペプチドの開発とそれを用いた神経再生医療，第70回日本脳神経外科学会総会、福岡、2010年10月

- 3) 菅野 洋、久保篤彦、川原信隆、三上太郎、前川二郎：ヒト成人皮膚よりの多能性幹細胞の分離と機能性VHLペプチド導入による神経分化誘導、第9回日本再生医療学会、広島、2010年3月
- 4) 菅野 洋、久保篤彦、川原信隆、三上太郎、前川二郎：ヒト成人皮膚よりの多能性幹細胞の分離と機能性BC-boxペプチド導入による神経分化誘導，第10回日本分子脳神経外科学会，岡山、2009年9月（シンポジウム）
- 5) 菅野 洋、久保篤彦、東田哲博、西口隆雄、川原信隆、増田順一、小林菜穂子、吉田徹彦：機能性BC-boxペプチドによる組織幹細胞の神経細胞への分化誘導とその神経再生医療への応用．第9回日本分子脳神経外科学会，京都、2008年8月
- 6) 菅野 洋，久保 篤彦，東田 哲博，西口隆雄，川原 信隆，小林 菜穂子，増田順一，吉田 徹彦：組織幹細胞の神経分化を誘導する機能性ペプチドを用いた神経再生療法の開発，第68回日本脳神経外科学会総会．盛岡、2008年10月

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計2件）

- 1) 名称：神経分化抑制ペプチド及びその利用

発明者：菅野 洋，吉田徹彦，小林菜穂子

権利者：菅野 洋、東亜合成株式会社

番号：特許第4677319号

取得年月日：2011年2月4日

国内外の別：国内

- 2) 名称：VHLペプチド

発明者：菅野 洋，吉田徹彦，小林菜穂子

権利者：菅野 洋、東亜合成株式会社

番号：特許第4494863号
取得年月日：2010年4月16日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 洋 (KANNO HIROSHI)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：40244496

(2) 研究分担者

齋藤知行 (SAITO TOMOYUKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30170517

伊藤典彦 (ITO NORIHIKO)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：80264654

水木信久 (MIZUKI NOBUHISA)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90336579

出澤真理 (DEZAWA MARI)
東北大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号：50272323

(3) 連携研究者

()

研究者番号：