

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791374

研究課題名（和文） 膜貫通タンパクを用いた神経分化に関わる細胞内シグナルの制御と応用

研究課題名（英文） Control of intracellular signaling, involved in neuronal differentiation by using protein transduction domain and its application

研究代表者

久保 篤彦（KUBO ATSUHIKO）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80525030

研究成果の概要（和文）：

自然再生しない脳（神経）組織のダメージに対して、神経幹細胞移植を施すことで組織の修復が期待される。本研究は①細胞源として皮膚由来幹細胞のポテンシャル、②神経分化に関わる因子の制御などについて明らかにし、再生治療効果の向上と安定化を目的とした。皮膚由来幹細胞は神経分化能を有することを確認した。単離から移植にいたるまでに細胞に対する遺伝子操作は一切必要ないところに利点があった。神経分化誘導因子は細胞内シグナルであり、細胞障害性が少なく細胞内導入することが移植細胞には求められる。そこで膜貫通タンパクを用いた手法でシグナルを制御するようペプチドを設計した。今回、再生医療の一手法として皮膚細胞の活用と神経分化誘導ペプチドの利用が有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

As central nervous system is not regenerated naturally, reproduce of the damaged brain/neuron is expected by transplant of neuronal stem cells. Topics clarified in this study are 1; neuronal differentiation potential of skin-derived precursor cells 2; control of an intra-cellular factor involved in neuronal differentiation by using peptide. We identified the skin-derived precursor cells had neuronal differentiation ability and the advantage that there was no necessary of gene manipulation for the cells from isolation to transplant procedure. I designed the peptide, there was little cytotoxicity, which introduced to control intracellular signaling enrolled of neuronal differentiation inducing factor. It was thought that the utilization of the skin-derive precursor cells were useful as exclusive law of the regenerative medicine at this time

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：神経分化、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、パーキンソン病、脊髄損傷などの中枢神経疾患に対し、生体のもつ自然治癒力は期待し難く、増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞移植による再生医療が応用されつつある。移植細胞候補は、iPS 細胞、ES 細胞をはじめ多種存在するが、それぞれに倫理上の問題、侵襲的な細胞採取、腫瘍性変化、生着性の問題、そしてとりわけ遺伝子導入の必要性や移植細胞の生体内での機能が解明されていないことが実用面で大きなハードルとなっている。我々は低侵襲・低リスクで採取可能で自家細胞移植の可能性をもつ多分化能を有する皮膚由来幹細胞に焦点をあて、移植治療への応用を模索することとした。同時に、神経分化に関わる因子が同定されておらず、移植細胞を神経分化に向かわせる細胞内シグナル制御の手法が確立されていないため、これを明らかにし、ペプチド化することとした。

2. 研究の目的

皮膚由来幹細胞に対して細胞工学的工夫を施すことにより神経分化・再生治療効果をもたらすと結論づけられれば、中枢神経疾患に対する幹細胞移植治療への自家移植細胞候補として、名乗りをあげることとなる。特に iPS 細胞が現在のところ話題をさらっているが、皮膚由来幹細胞は初代培養（単離）から移植にいたるまでに細胞に対する遺伝子操作は一切必要ないところに利点があり、とってかわれる要素がある。また、神経分化に関わる細胞内シグナル因子が全体像でないとしても、特に JAK/STAT 系の情報伝達系について解析結果が明らかになり、このシグナル伝達系を膜貫通タンパクの利用で制御可能となれば、幹細胞の機能改変・増強の面で一つ課題を克服し、優れた移植治療効果を期待できるようになると考えられる。さらに、この制御因子を創薬できれば、「遺伝子改変を必要としない再生医療」を、グローバルに（いつでも、どこでも）提供可能な体制となり得るとともに、腫瘍成長制御にも一石を投じることとなると思われる。

従って、本研究の目的は皮膚由来幹細胞の再生医療への応用の可能性と問題点を明らかにすることと、神経分化誘導物質の機能と役割を明確にした上での創薬の二点となる。

3. 研究の方法

ラットの皮膚細胞を初代培養し、増殖因子存在下無血清培地でニューロスフェア法を用いて神経分化能をもつ幹細胞を単離・純化する。幼若神経マーカーである nestin 陽性である事を免疫染色法で確認する。この細胞を用いて細胞内シグナリング、特に JAK/STAT 系についてのリン酸化の状態、分化の過程に

おけるその変化とタンパク発現をウェスタンブロット法で、その下流の核内シグナルの変化を RT-PCR 法で検討する。次に JAK/STAT 系シグナリングの変化と他の細胞内シグナル伝達系との相補的關係を明らかにする。その後、神経分化に関わるシグナル伝達系を制御できるタンパク構造を明らかにし、それに膜貫通タンパクを融合させた生理活性型ペプチドを作製する。ペプチドの細胞内導入効率を免疫染色法、FACS 法で、ペプチドの経時的細胞内局在をタイムラプス法で確認し、同時に ATP アッセイでペプチドの細胞毒性を検討する。ペプチドを導入した皮膚由来幹細胞に対してその神経分化能を免疫染色法、ウェスタンブロット法、パッチクランプ法により形態的機能的解析を行い、様々な液性因子に暴露した時の細胞分化への影響について検討する。最終的にペプチド導入皮膚由来幹細胞を中枢神経疾患モデルラット（脳梗塞/パーキンソン病）に移植し、行動学的解析とスライスパッチクランプ法、免疫染色法、microdialysis 法を用いて機能的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞培養：生後 0-3 日ラットの背部皮膚より neurosphere 法により皮膚由来幹細胞を単離・純化した。具体的には、DMEM/F12 に 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 40 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), B27 を添加したメEDIUM中で浮遊細胞塊の継代培養を行った。継代培養を行い、増殖能と分化能を評価した。平均 6.9 日で倍加し、幼若神経マーカーである nestin 陽性である事を免疫染色法で確認できた。さらに神経、グリア、平滑筋、脂肪への多分化能を保持していた。樹立された細胞株は存在するが、今回は再び初代培養から取り組み、なるべく臨床応用に近い状態とした。

(2) シグナル伝達の解析：単離した皮膚由来幹細胞の局所移植が奏功するには、移植前に神経分化誘導されていることが必要で、その因子として我々のグループが報告した既知の VHL タンパクに焦点を絞って検討した。JAK/STAT 系の負の制御が神経分化を導くであろうことを予測し、神経幹細胞の未分化維持機構として知られている Notch/HES のシグナル伝達系との cross talk があるかをさらに検索した。すなわち、HES が活性化している状態では、分化傾向にむかわないが、HES を不活性化させ、神経分化にいたる過程のメカニズムとして JAK/STAT 系、SOCS の関与を検討した。経時的なウェスタンブロット法を用いて、JAK/STAT 系のシグナル経路を中心に、リン酸化状態およびタンパク発現を検討した結果、未分化維持機構と分化促進には細胞

内シグナルである STAT3 の関与が示唆された。さらに VHL タンパクの構造は N 末端のユビキチン化するタンパク質結合部位である β ドメインと C 末端の Elongin B, C, Cullin-2, Rbx1 と複合体を形成する α ドメインからなるが、Elongin B, C の結合部位に相当する構造が神経分化誘導能を有していた。

(3) ペプチド合成：上記の神経分化誘導因子は細胞内シグナルであり、細胞障害性が少なく細胞内導入することが移植細胞には求められる。そのため、膜貫通タンパク (PTD) という構造物を用いて細胞内シグナルを制御すべくペプチドの合成を行った。PTD の一種である HIV-TAT (YGRKKRRQRRRD)あるいは Anntenapedia (KGRQVKVWFQNRMRKWK)を先に検討した生理活性ドメインに接合し、免疫沈降法用に FLAG (YKDDDDK)もしくはタイムラプス・FACS 法用に FITC でラベルしたペプチドを合成した。作成したペプチドは ATP アッセイで細胞毒性を検討し、ほぼ細胞毒性のないことを確認できた。ペプチドは投与 1 時間で 98.3%の細胞に細胞内導入され、6 時間で核内移行を認めた。STAT3, SOCS3 などの細胞内シグナル伝達物質が神経分化へ関与することを示唆する結果を得られたため、これらを有効に制御できるペプチドのコンピュータ上で三次元的な構造をシュミレーションして設計を行った。アミノ酸を配列したペプチドは構造上不安定性があることとタンパク構造ではシグナル物質と結合してもその一部を切り取ったペプチド配列では三次元的な構造の変化が生まれ、思惑通り (臨床応用上の有効レベル) の制御を得られ難いために、ペプチド設計は現在進行形にある。

(4) 疾患モデル動物への移植実験：パーキンソン病モデルラット：ネブタールで麻酔をした後、定位脳手術後にラットの頭部を固定し、6-hydroxydopamine (6-OHDA) を左 medial forebrain bundle に注入し、パーキンソン病モデルラットを作成した。2 週間後には①ペプチド導入皮膚由来幹細胞移植群、②ペプチド局所投与群、③皮膚由来幹細胞移植群、④コントロールの 4 群に分け、細胞移植を左側線条体に移植し、アポモルフィン誘発回転運動を 2 週毎に計測した。この結果、ペプチド導入皮膚由来幹細胞移植群において有意な行動学的改善を認めた。

まとめ

皮膚由来幹細胞、神経分化誘導ペプチドを用いれば、「遺伝子改変を必要としない自己細胞を利用した再生医療」の実現が可能となる。手法の一端がみえたことは再生医療にとって影響は大きいと考えられた。

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 5 件)

- ① Higashida T, Jitsuki S, Kubo A, Mitsushima D, Kamiya Y, Kanno H, Skin-derived precursors differentiating into dopaminergic neuronal cells in the brains of Parkinson disease model rats., 査読有, J Neurosurg. 2010;113(3):648-55.
- ② 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., 査読有, Neuroreport. 2010;21(4):287-92.
- ③ 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., 査読有, Protein Pept Lett. 2009;16(11):1291-6.
- ④ 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., 査読有, Neuroreport. 2009;20(17):1559-63.
- ⑤ 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., 査読有, Stem Cells Dev. 2009;18(10):1523-32.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 菅野洋, 久保篤彦, 東田哲博, 伊藤典彦, 多能性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医療の開発, 第 12 回日本分子脳神経外科学会, 2011/10/14, パシフィコ横浜 (横浜)

- ② 菅野洋, 久保篤彦, 東田哲博, 川原信隆, 小林菜穂子, 吉田徹彦, 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69回日本脳神経外科学会学術総会, 2010/10/27, 福岡コンベンションセンター(福岡)
- ③ Kubo A, Yokoyama T, Mimura T, Kanno H., Peptide Treatment Determinate the Neural Fate of Skin-derived Precursors and Its Application into Parkinson's Disease., 14th World Cong. Of Neurological Surgery of the WFNS, 2009/8/30, Boston, MA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 篤彦 (KUBO ATSUHIKO)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：80525030

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

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