

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09134
研究課題名(和文) SOCS由来ペプチドと血液脳関門透過性増強による脂肪由来幹細胞を用いた再生医療

研究課題名(英文) Regenerative medicine using adipose-derived stem cells with SOCS-derived peptides and enhanced blood-brain barrier permeability

研究代表者
菅野 洋 (KANNO, Hiroshi)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40244496
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)：本研究代表者は、神経分化誘導能を持つ遺伝子を導入して強発現させるか、神経分化誘導ペプチドを直接導入して、脂肪由来幹細胞(ADMSC)を神経細胞へ分化誘導したのち、脳・脊髄に局所移植することで、神経機能障害をより改善させることを示してきた。今回の研究ではSOCS蛋白由来のBC-box motifペプチドをADMSCへ導入後にADMSCを静脈内あるいは髄腔内へ投与することにより症状が改善するかを明らかにすること、脳血液関門透過性増強を併用した場合、更に効果が上がるかを検討した。また、SOCS7由来BCboxpeptideをADMSCへ導入して、コリン作動性ニューロンへの誘導に成功し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害や脊髄損傷に対する自己の脂肪由来幹細胞(ADMSC)を用いた再生医療は日本では厚労省認可による自由診療として行われているものの、再生医療を行っている医療機関はごく少なく、有意な症状の改善効果を示した論文はほとんどない。この理由は、脳血管障害や脊髄損傷では静脈内投与で行われるため、ほとんどは脳・脊髄内へ到達できず、機能障害の改善効果が軽微であるためと考えられる。本研究では、ADMSCをニューロンへ分化誘導後に脳・脊髄内への局所移植、髄腔内投与、局所的に動注あるいは静注する方法を提案し、ADMSCを用いた神経再生医療の実現のために有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator of this study has demonstrated that neurological dysfunction can be improved by inducing differentiation of adipose-derived stem cells (ADMSCs) into neurons by either introducing a gene capable of inducing neuronal differentiation and causing strong expression, or by directly introducing a neuronal differentiation-inducing peptide, and then transplanting the cells locally into the brain or spinal cord. In this study, we aimed to clarify whether symptoms could be improved by introducing a BC-box motif peptide derived from SOCS protein into ADMSCs and then administering the ADMSCs intravenously or intrathecally, and to examine whether the effect could be further improved by combining this with enhanced blood-brain barrier permeability. We also reported that we successfully induced ADMSCs to become cholinergic neurons by introducing a BC box peptide derived from SOCS7 into ADMSCs.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経再生医療 脂肪由来幹細胞 神経分化誘導ペプチド VHL SOCS BC-box motif 脳血管障害 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた神経再生医療は20世紀末の米国のカリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) の Fred Gage による成体の脳内の神経幹細胞の発見に始まる。研究代表者は、1998年のUCSDに留学し、神経幹細胞の分離方法を習得して、神経幹細胞をニューロンへ分化誘導する因子が腫瘍抑制遺伝子 VHL であることを突き止めて、帰国後、Cancer Research 誌に2000年に発表した。2003年にはVHL蛋白をウイルスベクターにて発現させた神経前駆細胞をパーキンソン病モデルラットへ移植して症状の改善と脳内でのドーパミンニューロンへの分化を示した(Ann Neurol 2003)。BC-box motif は、VHL蛋白やSOCS蛋白などが属するBC-box蛋白のelongin BCが結合する部位のアミノ酸配列[(A,P,S,T)LXXX(A,C)XXX(A,I,L,V)]であるが、研究代表者は2009年にVHL蛋白由来のBC-box motifが神経幹細胞をニューロンへ分化誘導することを明らかにし(Prot Pept Lett 2009)、BC-box motifを導入した種々のラット体性幹細胞を神経疾患(パーキンソン病、脊髄損傷、脳梗塞)モデルへの脳・脊髄内へ局所移植して、移植組織内でのニューロンへの分化と有意な機能改善が認められることを示してきた(Stem Cell Dev 2009, Neuroreport 2009, J Neurosurg 2010)。2018年には大部分のBC-box蛋白内のBC-box motifが皮膚由来間葉系幹細胞に対して神経分化誘導活性を持つことを示し(Int J Mol Sci 2018)、神経分化がBC-box motifによるJAK2/STAT3のユビキチン化とそれに続くプロテアソームによる分解を通じて、引き起こされることを明らかにした(Int J Mol Sci 2018)。また、アミノ酸配列の異なるBC-box motifはそれぞれ異なるニューロンを分化誘導することが判明し、VHL由来のBC-box motif'(VHLペプチド)は主にドーパミン作動性ニューロンへ(Stem Cell Dev 2019; J Neurosurg 2000)、SOCS6由来のBC-box motifはGABA作動性ニューロンへ(Int J Mol Sci 2020)分化誘導することを明らかにし、SOCS6由来のBC-box motifペプチドによりラット皮膚由来間葉系幹細胞をGABA作動性ニューロンへ分化誘導し、脳梗塞モデルラットの線条体へ移植すると空間認知能が改善することを報告した(Int J Mol Sci 2000)。また、SOCS7由来BC-box motifでは初めてヒトの脂肪由来間葉系幹細胞(ADMSC)のニューロンへ分化誘導に成功した(Int J Mol Sci 2023)。

脂肪由来間葉系幹細胞(ADMSCs)は、間葉系幹細胞のうちでは腹部皮下などから比較的low侵襲で大量に採取できるだけでなく、骨髄間葉系幹細胞と比較して多分化能に優れるとされ、膝関節症の関節内に直接注入することにより、関節内で軟骨細胞へ分化し、疼痛緩和、機能改善効果が報告されている。日本においても数多くの整形外科クリニックにおいて自由診療の幹細胞治療として行われ、数多くの論文で発表されている。これに対して、日本ではADMSCsを用いた脳梗塞などの神経疾患に対する治療は行われているものの、行っている医療機関は膝関節症に比べて圧倒的に少なく、その治療成績も統計学的に有意な有効性を示した報告はほとんどない。これは、膝関節症ではADMSCsを関節内へ直接注入し、膝関節内に投与されたADMSCsの軟骨細胞への分化が確認されているのに対し、脳梗塞などの神経疾患ではADMSCsを静注法で投与されるとそのほとんどは肺にトラップされて、ごく一部しか脳や脊髄まで到達せず、しかも、脳には血液脳関門(BBB)があるため、脳内実質内までは入らないため、ADMSCsから分泌される trophic factor の効果などによるためと考えられている。

2. 研究の目的

ADMSCを用いた神経疾患に対する幹細胞治療を膝関節症のように一般化するため、本研究ではニューロンへの分化誘導作用を持つBC-box motifペプチドをADMSCsへ導入後にADMSCsを血管内(静脈内か動脈内)あるいは髄腔内へ投与することにより、神経疾患の症状が改善するかを、明らかにすることを目的とする。研究代表者の用いるペプチド導入法は、約1時間で導入が完了し、約4時間後より分化が始まる。すなわち、分化する前のペプチド導入完了まで遊走能の高い幹細胞の状態での目的臓器まで到達させることが可能である。このような蛋白導入ドメインを用いた蛋白導入法により、幹細胞を分化誘導する方法は他にはみられないが、今回はこれに加えて、COVID-19 mRNAワクチンで使用された細胞内蛋白発現法を用いてBC-box motifのmRNAを合成して、これをADMSCsへ導入する方法も比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

蛋白導入ドメイン付加BC-box motifペプチド合成

蛋白導入ドメイン(protein transduction domain, PTD)であるTATを結合した30残基の2種類のBC-box motifペプチド(SOCS6, SOCS7)を合成委託した。ペプチド配列は以下の通りである。SOCS6: SLQYLRCFVIRQYTR, SOCS7: SLQHLCRFRIRQLVR。

脂肪由来間葉系幹細胞の分離、培養

ヒトの腹部または臀部の手術の際に得られる余剰の脂肪組織0.1g程度を採取し、脂肪由来間葉系幹細胞分離キット(フナコシ)を用いて、ポリエチレン-ポリプロピレン(PE-PP)芯鞘構造の不織布でできた三次元構造基材に、脂肪組織をトラップしてMSC NutriStem® XF培地で培養し

て、脂肪由来間葉系幹細胞(ADMSCs)を分離し、培地交換せずに1週間培養する。1週間から10日で、基材の線維上に組織から線維芽細胞様のADMSCsが増殖しているのを確認した。1~2週間後、ADMSCsが基材の10~20%を占めるようになったら継代培養し、この細胞を以下の実験に用いた。

BC-box motif ペプチドによる脂肪由来間葉系幹細胞の神経分化誘導と分化メカニズム解明
化学合成されたSOCS6由来BC-boxペプチドとSOCS7由来BC-boxペプチドをADMSCsへ導入して神経分化を確認する。SOCS6はJAK2/STAT3のコピキチン化とそれに続く分解を通じてGABA作動性ニューロンを分化誘導することが判明しているが、SOCS7はコリン作動性ニューロンへの分化誘導メカニズムはまだ明らかでないので、特にJAK/STAT経路の抑制に絞ってこれを免疫沈降法とWestern blot法により解析した。

神経疾患モデル動物の作成
神経疾患モデル動物の作成は、以前に報告したように脳梗塞/認知症モデルラットおよび慢性脊髄圧迫モデルラットを作成した。

神経疾患モデル動物へのBC-box motif peptide 導入 ADMSCs の投与
ADMSCsに予めPKH Linker Kits(Sigma-Aldrich)にて赤色蛍光に染色後、TATを結合した15残基のBC-box motif peptideを5mMの濃度でADMSCsの培地へ加えて、1時間後に神経疾患モデルラットに10⁶個尾静脈より静脈内投与するか、大漕より髄腔内投与した。

ADMSCsの脳血液関門(BBB)透過性増強
ADMSCsのBBB透過性を増強するために、tetramethylpyrazine (TMX)を神経疾患モデル動物へのADMSCs投与時に同時に投与するか、あるいはタンパク質導入試薬にてADMSCsにCCR2を導入した。

神経疾患モデル動物の行動学的解析
ADMSCsを移植した神経疾患モデル動物を1週間毎に8週間行動学的解析を行った。行動学的解析の方法はすでに報告した解析方法による。

ADMSCsを移植した神経疾患モデル動物の病理学的解析
移植1ヶ月後または2カ月後に神経疾患モデルラットの脳または脊髄を灌流固定後、病理学的に解析した。

4. 研究成果

研究代表者は、神経分化誘導能を持つVHLを遺伝子導入して強発現させるか、VHL由来のペプチドを直接導入して、幹細胞を神経細胞へ分化誘導したのち、局所投与(移植)することで、明瞭な神経再生効果が得られることを報告してきた。間葉系幹細胞を用いた脳梗塞や脊髄損傷患者に対する治療の大部分は、骨髄間質細胞や脂肪由来間葉系幹細胞をそのまま静脈内投与して行われているが、これでは、脳血液関門(BBB)を超えての脳や脊髄内への細胞の移動(migration)率は低く、細胞の生着率も低いため、ごくわずかな症状の改善を見るにすぎない。これらの点を克服するため、細胞のBBB透過性を高める因子としてSDF-1とCCR4が同定されて、これらの因子を活性化する物質であるtetramethylpyrazine(TMP)を骨髄由来幹細胞と同時に投与すると、骨髄由来幹細胞が脳梗塞モデルの脳内の病巣へ集積し、症状の改善を示したという報告がされている。また、CCR2を過剰発現させるとBBBを超えての移動率が高まり、脳梗塞モデルの症状が改善したという報告もなされている。このため、本研究ではBC-box motifペプチドをADMSCsへ導入後にADMSCsを静脈内あるいは髄腔内へ投与することにより、神経疾患の症状が改善するかを、明らかにすることを目的とすると同時に、ADMSCsのBBB透過性増強処理も併用した場合、さらに効果があるかを検討した。これと共に、本研究では、SOCS7由来BC-box peptideを脂肪由来間葉系幹細胞ADMSCへ導入して、コリン作動性ニューロンを誘導することができたので、論文(Int J Mol Sci 2023)で発表したほか、現在、関連論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kanno Hiroshi, Matsumoto Shutaro, Yoshizumi Tetsuya, Nakahara Kimihiro, Shinonaga Masamichi, Kubo Atsuhiko, Fujii Satoshi, Ishizuka Yasuyuki, Tanaka Masaki, Ichihashi Masamitsu, Murata Hidetoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 SOCS7-Derived BC-Box Motif Peptide Mediated Cholinergic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2786 ~ 2786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032786	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 Kanno Hiroshi, Matsumoto Shutaro, Yoshizumi Tetsuya, Nakahara Kimihiro, Kubo Atsuhiko, Murata Hidetoshi, Shuin Taro, U Hoi-Sang	4. 巻 24
2. 論文標題 Role of SOCS and VHL Proteins in Neuronal Differentiation and Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3880 ~ 3880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043880	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 Miyazaki Kazuki, Kanno Hiroshi, Yamada Sachiko, Sagehashi Yuuki, Matsumoto Shutaro, Takahashi Satoru, Kim Yongson, Namiki Keiko, Fujii Satoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Clinical Features and Treatment of Patients Infected With SARS-CoV-2 Omicron Variant While Hospitalized Due to Stroke: A Single Center Study in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7759/cureus.54760	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 Kanno Hiroshi, Department of Neurosurgery, Asahi Hospital, Tokyo 121-0078, Japan.	4. 巻 3
2. 論文標題 Excellent Outcome Following Very Severe Traumatic Brain Injury with Bilateral Acute Traumatic Intracranial Hematomas: A Case Report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal on Surgery	6. 最初と最後の頁 1120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.52768/2691-7785/1120	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 Yoshizumi Tetsuya, Murata Hidetoshi, Kanno Hiroshi, Shinonaga Masamichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Efficacy of Supraclavicular Scalenotomy Followed by External Neurolysis without Rib Resection for Post-traumatic Neurogenic Thoracic Outlet Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 E632 ~ E638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000003859	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菅野 洋, 中原公宏, 山田幸子, 藤井聡, 山本哲哉, 蓮見壽司, 矢尾正祐
2. 発表標題 VHL病に伴う中枢神経系血管芽腫の遺伝子解析と病態との関連
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第82回学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中原公宏, 菅野 洋, 石塚 保行 バイオ未来工房、八木良樹
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞を用いた神経疾患に対する再生医療の基盤技術開発
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菅野 洋, 中原公宏, 山田幸子, 宮本倫行, 藤井 聡, 村田英俊, 石塚保行, 田中勝喜, 市橋正光
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞による脳卒中に対する神経再生医療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中原 公宏、菅野 洋、上利 崇、松野 彰
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞を用いた脳卒中に対する再生医療の基盤技術開発
3. 学会等名 第49回日本脳卒中学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菅野 洋、中原公宏、善積哲也、篠永正道、久保篤彦、村田英俊、藤井聡、石塚保行、田中勝喜、市橋正光
2. 発表標題 脂肪組由来幹細胞のSOCS7ペプチドによるコリン作動性ニューロンへの分化誘導
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野 洋、善積 哲也、篠永 正道、山田幸子、藤井 聡、村田 英俊、山本 哲哉
2. 発表標題 von Hippel-Lindau病の血管芽腫における遺伝子変異に応じたprecision neurosurgery
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021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	村田 英俊 (Murata Hidetoshi) (40398524)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授 (32713)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中原 公宏 (Nakahara Kimihiro) (80279207)	国際医療福祉大学・国際医療福祉大学熱海病院・准教授 (32206)	

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