

## 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25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790181

研究課題名（和文）

細胞分化調節による脊髄損傷治療法開発の試み—グリア新生を神経新生へ—

研究課題名（英文）

Neurogenesis in the adult spinal cord by cell fate control

研究代表者

北田 容章（KITADA MASAOKI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80324614

研究成果の概要（和文）：私たちは成体脊髄に内在するグリア前駆細胞に着目して研究を行ってきた。本研究では、グリア前駆細胞から神経細胞を生じ得る可能性を探索した。脊髄上衣細胞は特定因子 A を発現している事や、この因子 A が脊髄損傷後に持続する発現亢進を示す事を見出した。この因子 A に対する microRNA 発現アデノウィルスベクターを構築し脳室内へ導入すると、上衣細胞由来神経細胞が観察された。こうした遺伝子発現調節という手法により、脊髄上衣細胞からの神経細胞新生が可能となる事が示された。

研究成果の概要（英文）：We have studied the property of the glial progenitor cells in the adult spinal cord. The ependymal cells in the intact spinal cord expressed the factor A, which was up-regulated after spinal cord injury. We created an adenovirus vector encoding microRNA targeted to the factor A and injected into the ventricle. We found the ependymal cell-derived neurons. The ependymal cells in the adult spinal cord are demonstrated to produce neurons by this cell fate control method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：脊髄損傷、グリア前駆細胞、上衣細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、神経細胞新生

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄が損傷を受けると切断された軸索は伸長を試みるが、この試みは様々な原因により阻まれ、結果として脊髄の神経機能は失われる。崩壊髄鞘や反応性グリアによるグリオシス等が代表的な抑制因子として知られており、これらの抑制作用を打破する試みの

一部は臨床研究へと至っている。しかし、これらの手法は多少の解剖学的・神経機能学的回復をもたらす事が示されつつあるが、大幅な神経機能回復をもたらす事はない。また、崩壊髄鞘とその軸索再生抑制機構については詳細な研究がなされつつあるが、グリオシスの発生機序や、その構造を形成する細胞

の由来等については未解決の問題が山積している。ましてや、正常成体脊髄においてグリア細胞のターンオーバーが存在するのかわかすら、定かではなかった。こうした観点から、申請者らは、まず正常脊髄におけるグリア細胞新生の証明と、グリア細胞新生を生じる細胞の同定を進めてきた。正常成体脊髄における分裂細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞と上衣細胞とが知られているが、これらを遺伝学的・分子生物学的に特異的に標識し、これらの分化能を検討した。その結果、正常成体脊髄のアストロサイト新生の一部をこれらの細胞が担っている事を明らかとした。そして上衣細胞の細胞分裂・アストロサイト新生・細胞移動のメカニズムについては、Notch-1 の機能が重要である事を明らかとした。Notch-1 は神経幹細胞の幹細胞性維持や一過性分裂細胞 (Transient Amplifying Cells) からのアストロサイト新生に関与する事が知られている。上記の脊髄上衣細胞における Notch-1 の機能は神経幹細胞におけるそれと酷似しており、この事から、成体脊髄上衣細胞は神経幹細胞として機能し得るのではないかと推察されていた。

一方で、魚類や両生類の脊髄損傷では脊髄上衣細胞が賦活化し、細胞増殖・上皮間葉移行・細胞移動・再生軸索支持・神経細胞新生等の多彩な機能を示し、これにより脊髄損傷後の解剖学的・神経機能学的にはほぼ完全な回復をもたらす事が知られている。

上記の事から、魚類・両生類の上衣細胞の示す機能を哺乳類の上衣細胞において模倣させる事で、哺乳類における脊髄損傷からの機能回復が可能なのではないかと考察していた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、成体脊髄に存在するグリア前駆細胞である上衣細胞、およびオリゴデンドロサイト前駆細胞から神経細胞新生を生じせしめる事が可能であるかについて、検討を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 神経細胞新生・グリア細胞新生転換に関わる因子のグリア前駆細胞における発現動態の観察
- (2) 神経細胞新生・グリア細胞新生転換に関わる因子の microRNA 発現アデノウイルスベクターの構築
- (3) microRNA 発現アデノウイルスベクターを用いた正常脊髄におけるグリア前駆細胞からの神経細胞新生誘導
- (4) microRNA 発現アデノウイルスベクターを用いた脊髄損傷におけるグリア前駆細胞からの神経細胞新生誘導の検討

## 4. 研究成果

発生段階において神経上皮細胞は神経幹細胞として機能するが、発生初期においては神経細胞新生を、発生後期においてはグリア細胞新生を生じる事が知られている。この神経細胞新生・グリア細胞新生の転換期には様々な因子の発現調節が行われており、ここでは BMP シグナリング、Wnt シグナリング、Shh シグナリング等が重要とされている。本件においてはこれらシグナリングの下流で機能する転写因子に着目し、その成体脊髄における発現を観察した。すると、特定因子 A が脊髄上衣細胞において恒常的に発現しており、脊髄損傷後に発現が亢進する事、そして損傷後 2 週間を経ても引き続きが発現が亢進している事を見出した。この因子 A は上記神経細胞新生・グリア細胞新生の転換期に発現が始まる事が知られている。

この因子に対する microRNA ベクターを Invitrogen 社 BLOCK-iT PolII miR RNAi 発現ベクターキットを用いて作成した。また、それぞれの microRNA 認識配列を含むホタル Luciferase 発現ベクターを作成し、293 細胞に遺伝子導入し microRNA による特定配列の認識とそれによる Luciferase のノックダウン効果を確認した。対照としては Renilla Luciferase 発現ベクターを用いた。次に、特定因子 A を恒常的に発現しているラット C6 グリオーマ細胞を用い、microRNA 発現による特定因子 A のノックダウンを、mRNA レベル、蛋白レベルについてそれぞれ確認した。これらの実験により、5 種類の特定因子 A に対する microRNA ベクターを確立した。

こうして確立した特定因子 A に対する microRNA ベクターを用い、microRNA 発現アデノウイルスベクターを作成し、第四脳室に投与した。脊髄上衣細胞は中心管と呼ばれる脳脊髄液で満たされる空間に面しており、この空間は脳室系の続きである。また、上衣細胞はコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体を発現している。これらの事から、脳室内にアデノウイルスを投与する事で、上衣細胞特異的に遺伝子導入を行う事が可能である。特定因子 A に対する microRNA を発現するアデノウイルスベクターのラット第四脳室への投与を行う事で、脊髄上衣細胞における特定因子 A のノックダウンとその効果を観察した。アデノウイルス感染脊髄上衣細胞は EGFP を発現すると共に、徐々に特定因子 A の発現を失った。この EGFP 陽性細胞は上衣細胞層近傍に存在したが、一部の細胞は非常に細く長い突起を有していた。こうした細胞の細胞系譜マーカー発現を確認すると、Olig2 陰性、GFAP 陰性であったが、PSA-NCAM 陽性、NeuN 陽性であった。これらの事から、特定因子 A に対する microRNA を発現するアデノウイルスベクターに感染した上衣細胞

は、神経細胞へと分化する事が明らかとなった。脊髄損傷におけるアデノウイルス導入においても同様の結果が得られたが、現状ではEGFP 発現アデノウイルス感染細胞が非常に少ない為、上衣細胞から分化する神経細胞の数も少ない事が問題と考えられる。これはmicroRNA 発現アデノウイルスベクターの構造上の問題でウイルスのタイターが上昇しづらい事にその原因があると考えられる為、ウイルスベクターの構造に工夫を施し、ウイルスタイターを向上させる事で上衣細胞からの神経細胞新生の割合を向上させる事が必要と考えられる。

#### 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 16 件)

1. Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Riera J J, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant* 掲載確定 (2013) Epub ahead of print 査読有
2. Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest* 123: 272-284. (2013) DOI: 10.1172/JCI62516. 査読有
3. Wakao S, Kitada M, Dezawa M. The elite and stochastic model for iPS cell generation: multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells. *Cytometry A* 83: 18-26. (2013) Review paper DOI: 10.1002/cyto.a.22069. 査読有
4. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Ogura F, Murakami T, Niwa A, Dezawa M. Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 7: e48677. (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0048677. 査読有
5. Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model. *Cell Mol Life Sci* 69: 3739-3750. (2012) Review paper DOI: 10.1007/s00018-012-0994-5. 査読有
6. Kitada M, Dezawa M. Parkinson's Disease and Mesenchymal Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy. *Parkinson's Disease*, 873706. (2012) Review paper DOI: 10.1155/2012/873706. 査読有
7. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M. Isolation of adult human pluripotent stem cells from mesenchymal cell populations and their application to liver damages. *Methods Mol Biol* 826: 89-102. (2012) Review paper DOI: 10.1007/978-1-61779-468-1\_8. 査読無
8. Matsuse D, Kitada M, Ogura F, Wakao S, Kohama M, Kira J, Tabata Y, Dezawa M. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and basic fibroblast growth factor releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A* 17: 1993-2004. (2011) DOI: 10.1089/ten.TEA.2010.0585. 査読有
9. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9875-9880. (2011) DOI: 10.1073/pnas.1100816108. 査読有
10. Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M. Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. *Anat Rec (Hoboken)* 294: 305-321. (2011) DOI: 10.1002/ar.21311. 査読有
11. Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsuse 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: 537-547. (2011) DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.01.022. 査読有

12. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 59: 369-378. (2011) Review paper DOI: 10.1007/s00005-011-0139-9. 査読有

13. Kitada M. Mesenchymal cell populations: development of the induction systems for Schwann cells and neuronal cells and finding the unique stem cell population. Anat Sci Int 87: 24-44. (2011) Review paper DOI: 10.1007/s12565-011-0128-4. 査読有

14. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and umbilical cord as sources for Schwann cell differentiation: their potential in peripheral nerve repair. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal 4: 54-63. (2011) Review paper DOI: 10.2174/1875043501104010054. 査読無

15. 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, Nebeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 8639-8643. (2010) DOI: 10.1073/pnas.0911647107. 査読有

16. 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. J Neuropathol Exp Neurol 69: 973-985. (2010) DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181eff6dc. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 北田 容章、成体ラット脊髄上衣細胞の生体内細胞運命調節の試み、第 118 回 日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 03 月 29 日、高松市

2. 北田 容章、内在性幹・前駆細胞の賦活化による新規脊髄損傷治療法の開発、第 1 回 In vivo 再生研究会、2013 年 03 月 24 日、東京

都

3. Kitada M、Cell fate intervention of the progenitor cells in the adult rodent spinal cord、Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology、2013 年 01 月 20 日～2013 年 01 月 24 日、名古屋市

4. 北田 容章、哺乳類における脊髄再生への挑戦 - 「発生学的に正しい」再生への道 -、日本動物学会 第 83 回大会 2012 大阪(招待講演)、2012 年 09 月 14 日、大阪市

5. 北田 容章、成体ラット脊髄上衣細胞の分裂・移動様式の解明、第 11 回 日本再生医療学会総会、2012 年 06 月 13 日、横浜市

6. 北田 容章、遺伝学的手法を用いない生体内細胞系譜追跡実験法、日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会、2012 年 05 月 14 日、つくば市

7. 北田 容章、成体ラット脊髄上衣細胞の正常時・損傷時における動態、第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 03 月 28 日、甲府市

8. Kitada M、Stem/progenitor cell property of the ependymal cells in the adult rodent spinal cord、The 21st CDB Regeneration biology Study Group Meeting #1、2011 年 11 月 24 日、Kobe

9. 北田 容章、成体ラット脊髄 DM-20 発現細胞のオリゴデンドロサイト系譜前駆細胞としての可能性、日本顕微鏡学会 第 67 回学術講演会、2011 年 05 月 16 日、福岡市

10. 北田 容章、Muse 細胞 - 新たな多能性幹細胞の発見 -、日本顕微鏡学会 第 54 回シンポジウム、2010 年 11 月 12 日、金沢市

11. 北田 容章、成体脊髄に存在する新たなオリゴデンドロサイト系譜前駆細胞の同定、日本解剖学会 第 56 回東北・北海道連合支部学術集会、2010 年 9 月 25 日、旭川市

12. 北田 容章、成体脊髄におけるグリア前駆細胞の動態解析、日本顕微鏡学会 第 66 回学術講演会、2010 年 5 月 24 日、名古屋市

[図書] (計 2 件)

1. 北田 容章・出澤 真理、朝倉書店、第 11 章 間葉系幹細胞・Muse 細胞を用いた再生医療/再生医療叢書 第 7 巻 神経系、2013、163-187.

2. 北田 容章・出澤 真理、公益財団法人 長寿科学振興財団、視覚障害者の再生医療 視神経の再生/高齢者の視覚障害とそのケア  
Advances in Aging and Health Research  
2011、2012、209-219.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北田 容章 (KITADA MASA AKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：8 0 3 2 4 6 1 4

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：