

幹細胞を用いた脳梗塞/認知症に対する再生医療の研究

菅野 洋¹, 篠永 正道¹, 永山 正雄²

¹国際医療福祉大学熱海病院脳神経外科,

²国際医療福祉大学医学部神経内科

2017年国際医療福祉大学学術大会

筆頭演者は本演題の発表に際して開示すべきCOIはありません。

GABA作動性ニューロン (GABAnergic neurons)

▪ 癲癇の修復/再生に関与

- Baraban SC, et al. PNAS, 2009
- Shetty AK, Upadhy D. Neuroscience Biobehav Rev, 2016
- Wang Q, et al. Sci Rep, 2016

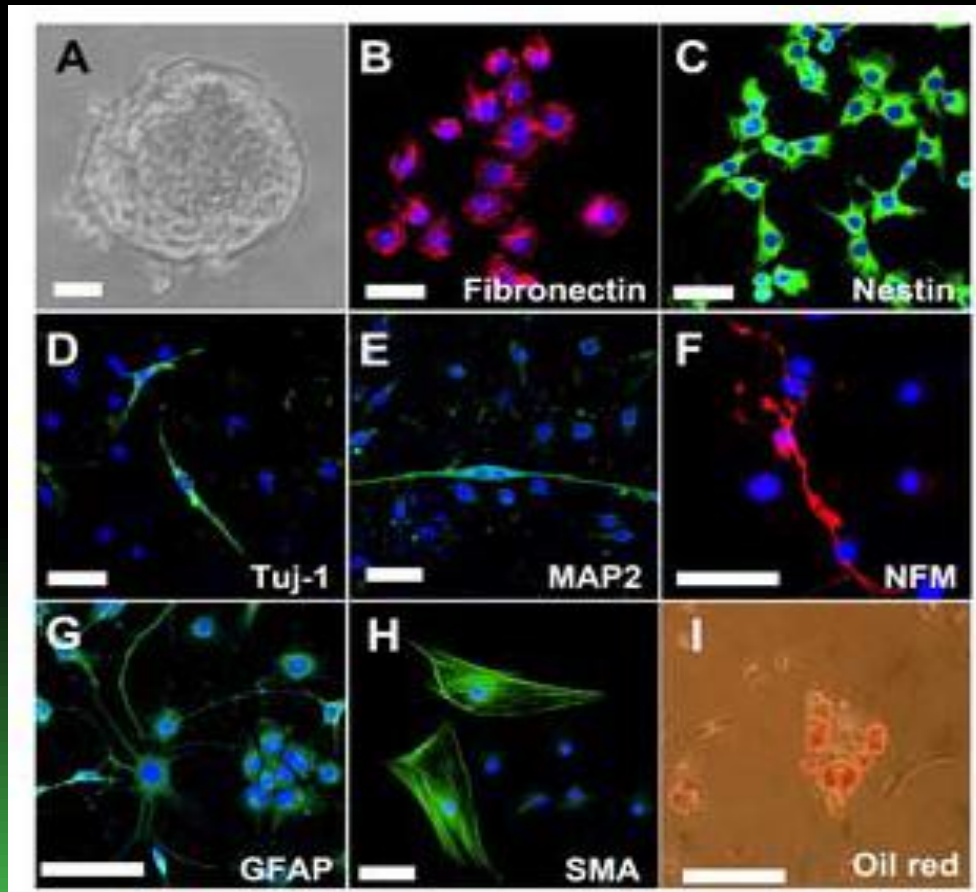
▪ 脳虚血/認知機能障害の修復/再生に関与

- Wang H, et al. Brain Res, 2015
- Benitez SG, et al. Plos One, 2014
- Lee JC, et al. Brain Pathology, 2016

幹細胞をGABA作動性ニューロンへ分化誘導して再生医療に使用できる可能性が示唆

皮膚由来間葉系幹細胞 Skin-derived mesenchymal stem cells (SMSCs)/Skin-derived precursors (SKPs)

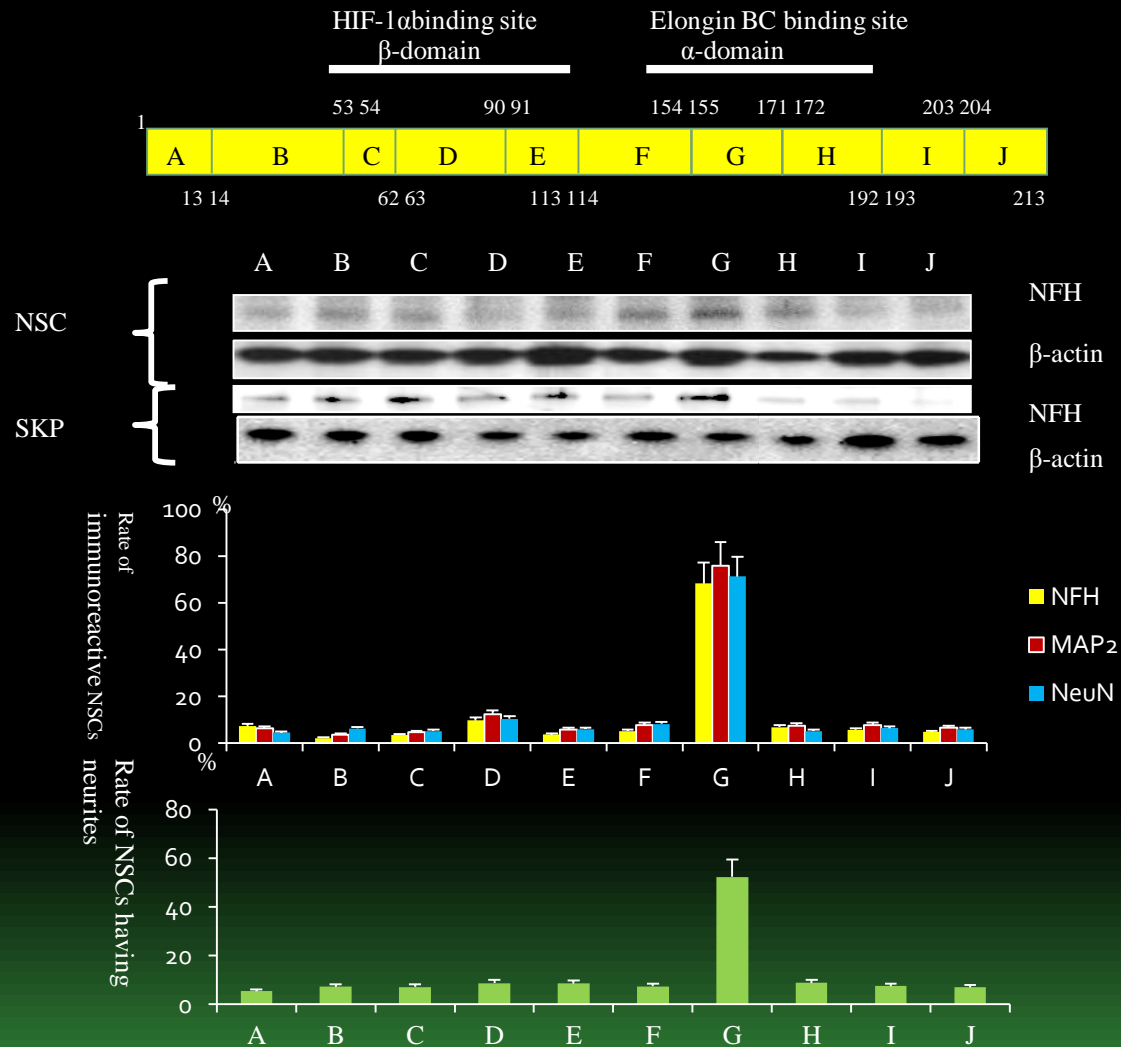
Wistar rat back derm-originated multipotent stem cells



【皮膚由来間葉系幹細胞からGABA作動性ニューロンの分化誘導】

1. BC-box proteinにおけるneuronal differentiation domain (神経分化ドメイン)を同定
 - 1) BC-box proteinの一種であるVHL proteinを10分割し、各分画のアミノ酸配列からなるpeptideを合成し、これを皮膚由来幹細胞へ導入。それぞれの分割の神経分化誘導活性を検討
 - 2) この検討の結果、BC-box motifを含む分割に最も高い神経分化誘導活性を認めた

Identification of neuronal differentiation domain in BC-box protein



Fraction G includes neuronal differentiation domain

3) 最も高い神経分化活性を認めた分画をさらに細かく分析し, neuronal differentiation domain(神経分化ドメイン, NDD)を絞り込んだ

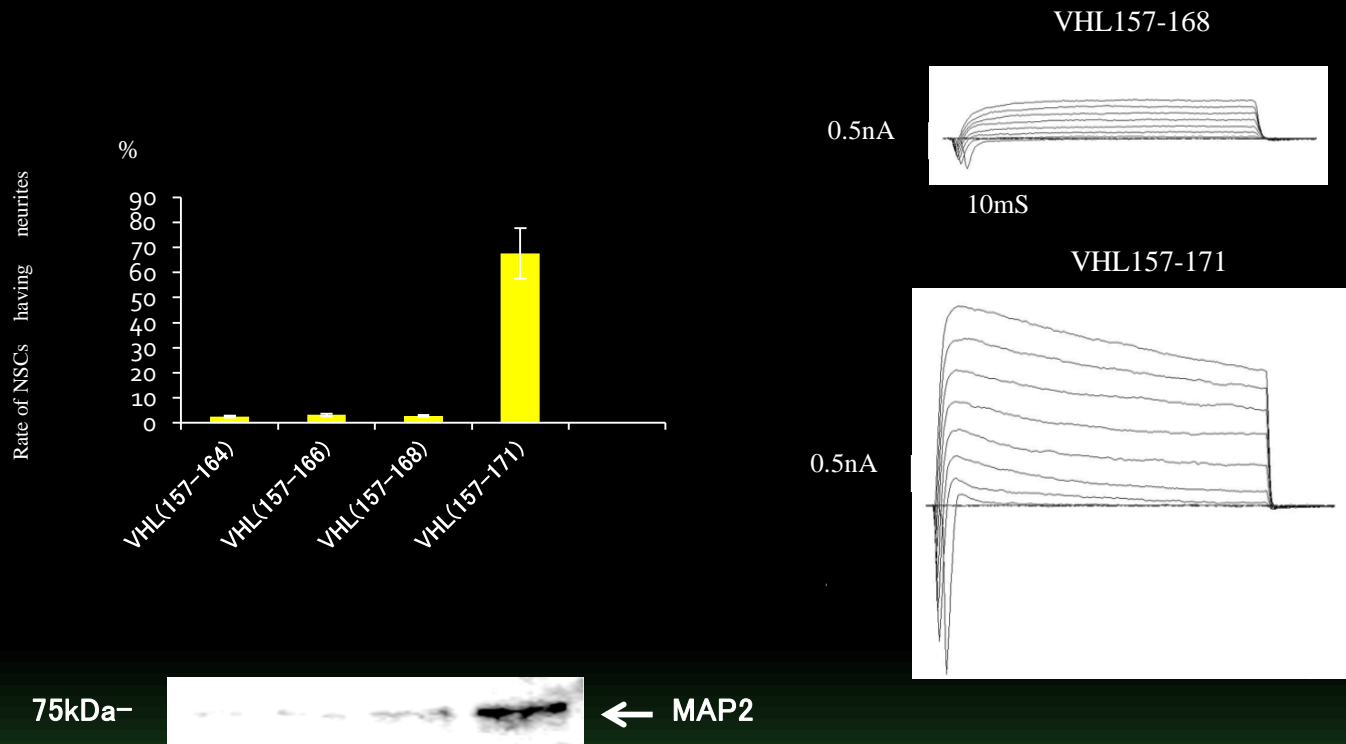
→その結果, VHL(157-171)がNDDと同定

4) NDDとeloin Cとの結合およびNDDとelongin Aとの関係を免疫沈降法, ITC法にて検討

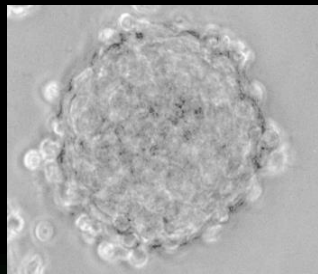
→NDDはelongin Cとの強い結合を示すが, NNDからC末端の3残基を除くと, elongin Cとの結合は極めて弱くなった.

また, NDD導入の場合は, elongin Cとelongin Aは結合が阻害されるが, NDDからC末端の3残基を除いた場合は, elongin CとelonginAの強い結合を認めた.

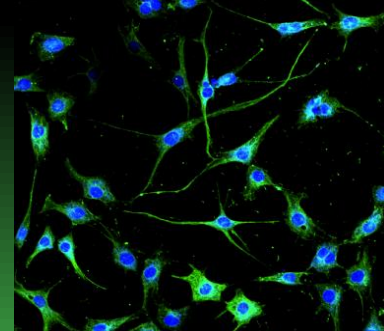
BC-box motif [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)] +5 amino acids was identified as neuronal differentiation domain



BC-box motif [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)] +5 amino acids makes neuronal differentiation of skin-derived mesenchymal stem cells (SMSCs)



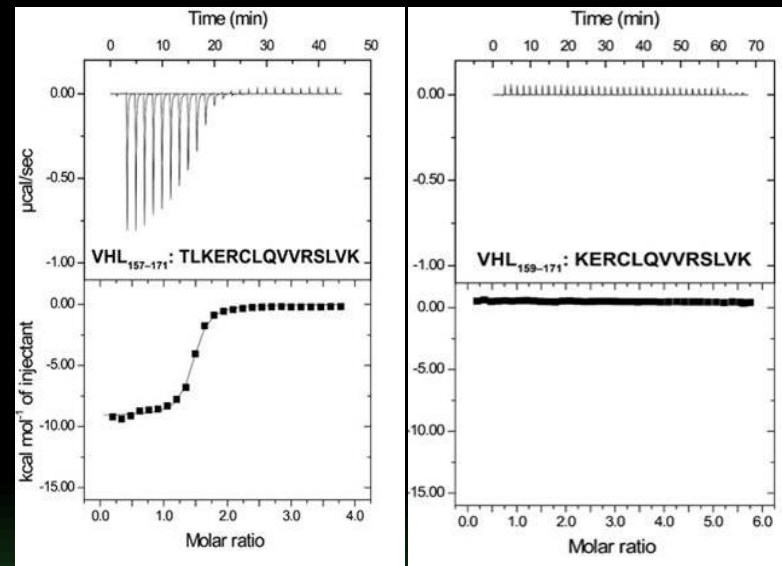
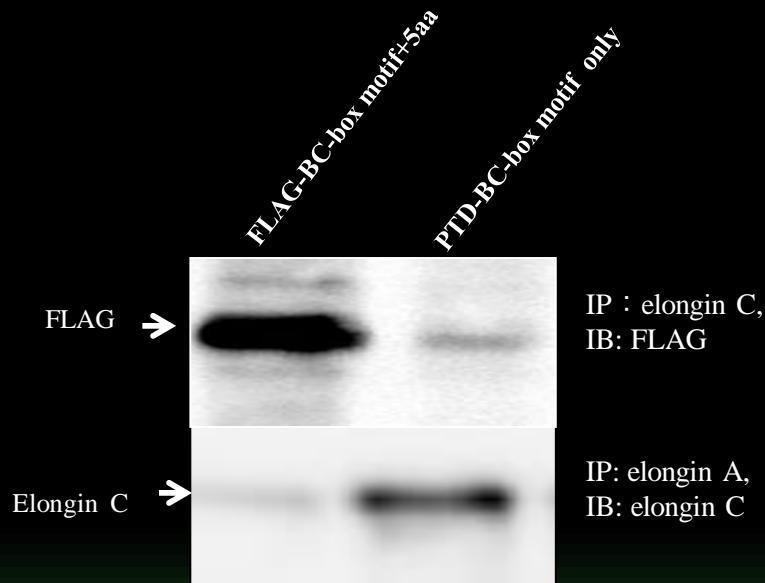
BC-box motif +5aa



NFH

BC-box motif [(A,P,S,T)LXXX (A,C) XXX(A,I,L,V)] +5 amino acids binds to elongin C, but is competitive to elongin A

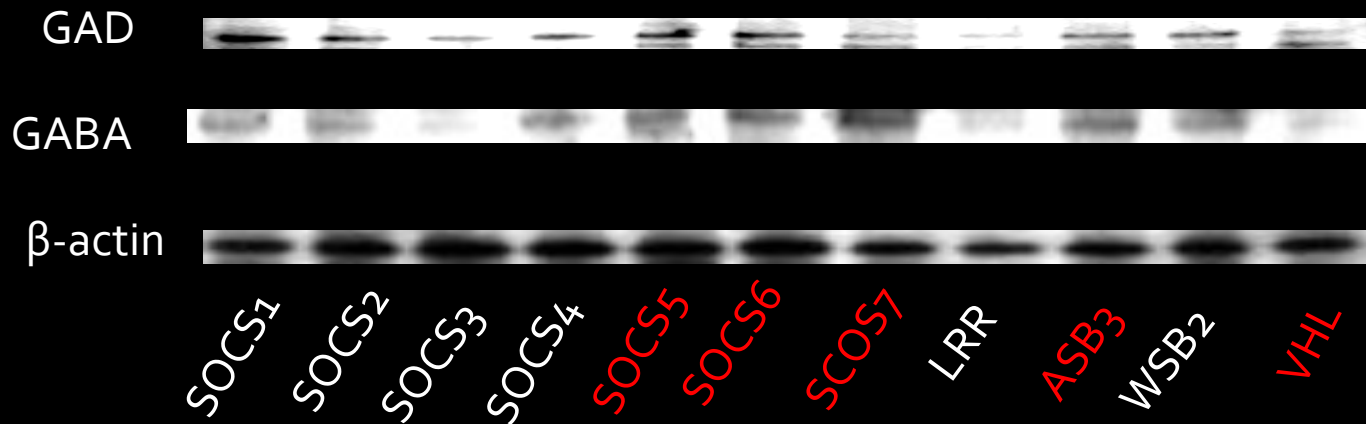
Isothermal titration calorimetry (ITC)



BC-box motif -5aa

BC-box motif alone

Neuronal-differentiation-domain-in-BC-box-protein (BC-box motif + five amino acids) mediated neuronal differentiation in skin-derived mesenchymal stem cells (SMSCs)/Skin-derived precursors (SKPs)



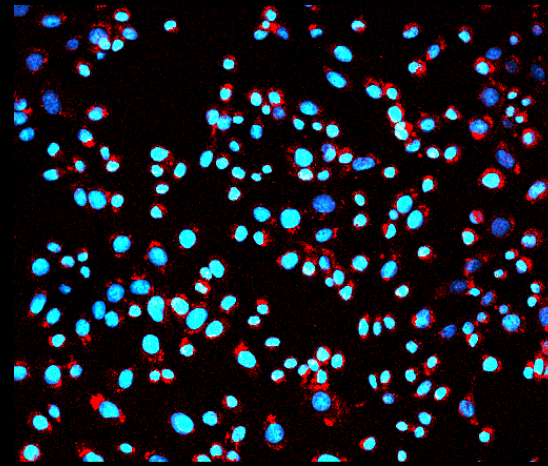
SOCS5, SOCS6, SOCS7, ASB3, and VHL-derived peptides (BC-box motif + 5 amino acids) induced GAD and GABA expressing cells

Confocal Immunocytochemistry for BC-box-protein-derived neuronal-differentiation-domain –medicated SMSCs/SKPs



control

No-peptide-treatment

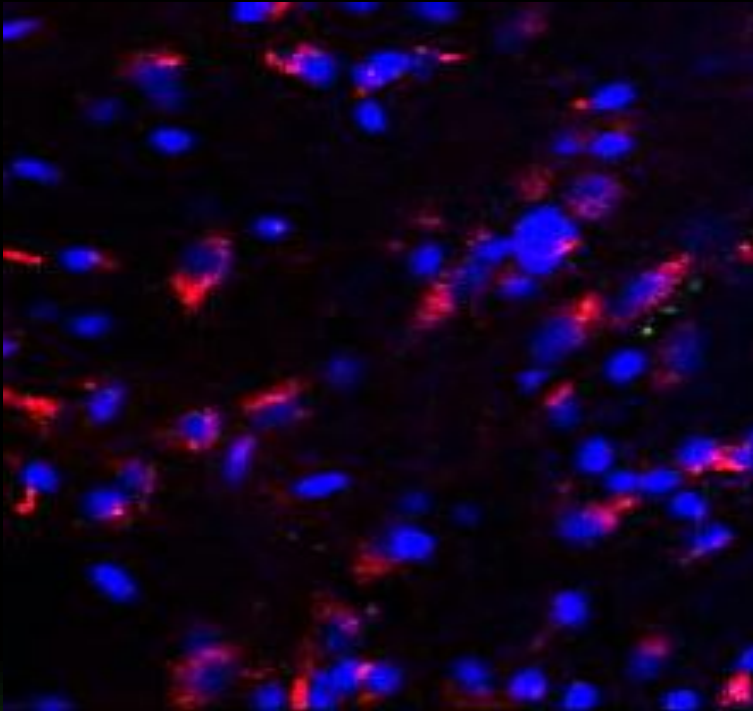


SOCS5

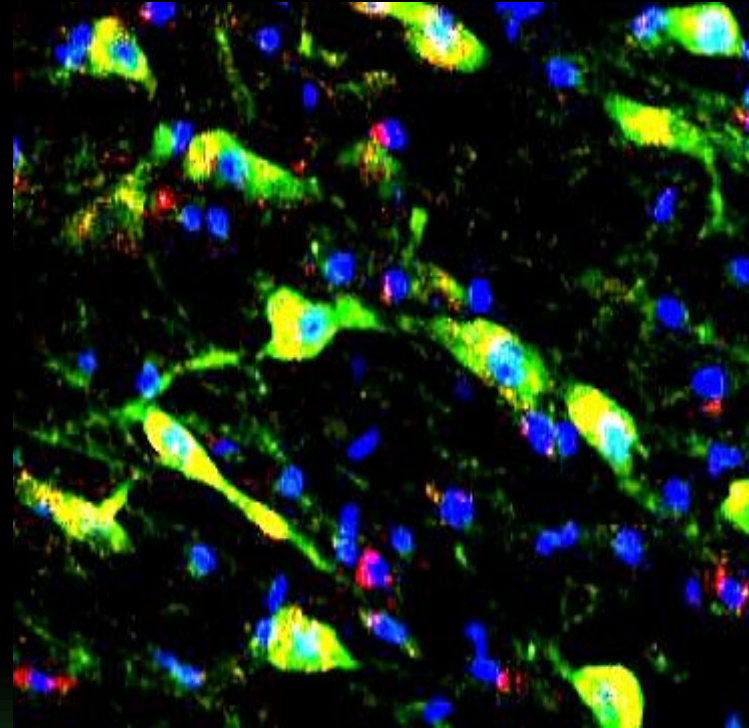
SLQYICRAVICRCTT

Nuclear : DAPI (blue), GABA: red
Underline: BC-box motif

SMSCs/SKPs implanted into focal cerebral ischemia



Transplantation of SCOS5-peptide-non-delivered SKPs (GAD negative)



Transplantation of SOCS5-peptide-delivered SKPs (GAD positive)

Implanted cells : PTH, red; Nuclei: DAPI, blue; GAD: FITC, green

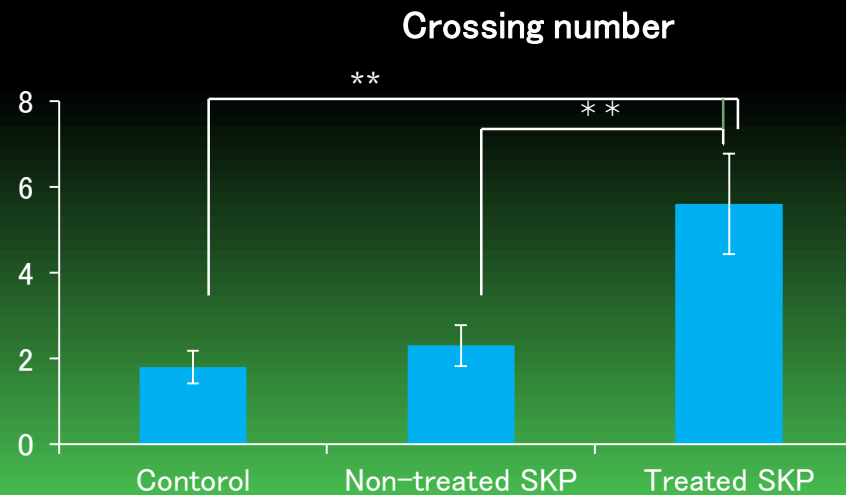
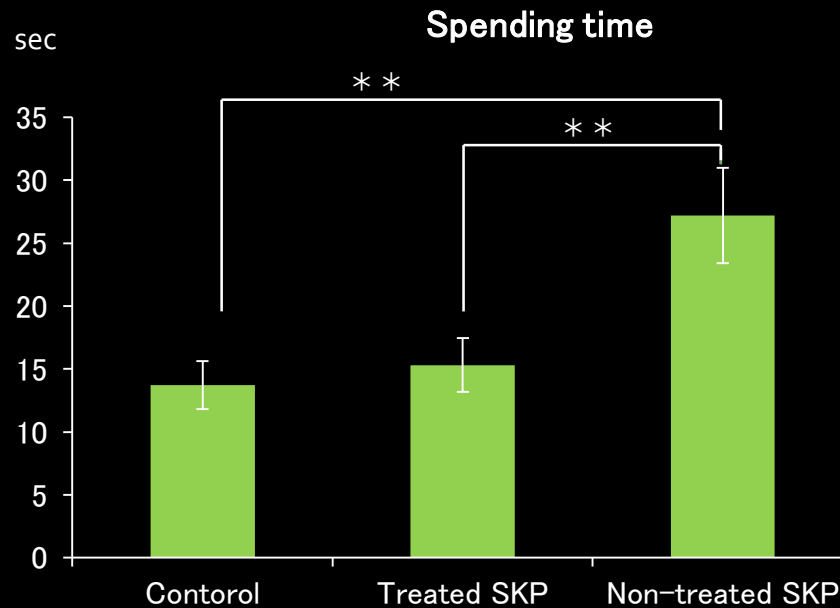
Moris water maze test



Transplantation of non-treated SMSCs/SKPs



Transplantation of treated SMSCs/SKPs



【結果のまとめ】

- BC-box蛋白より神経分化ドメイン(NDD)をBC-box motif+ α と同定した
- 神経分化ドメイン(NDD)の一種SOCS5由来ペプチド導入により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た
- NDD導入皮膚由来間葉系幹細胞を移植した群では、脳内でのGABA作動性ニューロンへの神経分化を認め、Moris water maze test(モリス水迷路試験)でも有意に好成績を示し、脳機能が再生したと考えられた

【結語】

- ・神経分化ドメイン(NDD)ペプチドの一種SOCS5由来のペプチド導入により皮膚由来間葉系幹細胞はGABA作動性ニューロンへ分化誘導された
- ・GABA作動性ニューロンへ分化誘導された皮膚由来間葉系幹細胞の脳への移植は脳梗塞/認知症に対する神経再生医療に有用と考えられた