

「シュワン性幹細胞が器官形成・神経再生に果たす機能の解明」

神戸大学大学院医学研究科

榎本 秀樹

1 研究の背景と目的

本研究では、成体組織内に広く存在するシュワン細胞の幹細胞としての生理機能を解析する。我々は最近、遺伝学的細胞標識法により、シュワン細胞の一部が生後に神経細胞に分化転換し、腸管神経系の一部を構成することを世界に先駆けて発見した (J Neurosci 2015)。我々のこの発見ならびに最近の集学的知見により、シュワン細胞は単に末梢のグリアではなく、様々な細胞に分化できる幹細胞的な性質を内包した細胞であるという新たな概念が浮かび上がっている (以後、この幹細胞的性格を保持したシュワン細胞をシュワン性幹細胞と呼ぶ)。本研究では、シュワン性幹細胞が器官形成に果たす役割を総括的に理解し、シュワン性幹細胞が多分化能を発現する機構を分子レベルで解明する。さらに、生理的に高い神経再生能を示す腸管神経系において、神経細胞再生におけるシュワン細胞の寄与を解明する。

2 研究方法・研究内容

①シュワン細胞の多分化能の網羅的探索

グリア細胞特異的に Cre または誘導型 Cre を発現するマウス (Dhh-Cre, GFAP-CreERT2 マウス) と Cre 依存的に細胞を標識できる RosaCAGG-stop loxP-tdTomato レポーターマウスの交配により、シュワン細胞の恒久標識を行った。発生後期の胎児、新生仔、成体マウスの各組織を採取後、tdTomato およびシュワン細胞のマーカーである Sox10 の二重免疫組織化学法による解析を行った。tdTomato 陽性 Sox10 陰性細胞についてさらに神経、色素細胞、脂肪細胞、筋細胞、骨、軟骨などの各種分化マーカーの発現解析を行い、シュワン細胞の分化能のスペクトラムを解析した。

②シュワン細胞の多分化能を制御する分子機構解明

我々は既にシュワン細胞を恒久標識したマウスから単離したシュワン細胞が様々な細胞に分化する培養系を確立している。この系を用い、各種増殖因子やシグナル経路特異的阻害剤を用いて、特定の細胞種に分化誘導するためのシグナル経路を探索した。特に神経-シュワン細胞間相互作用で働いているとされる分子群 (Notch, ErbB/Neuregulin, Cadherin など) の活性化および阻害を行い、シュワン細胞の分化転換に与える影響を解析した。

③神経傷害時におけるシュワン細胞由来神経分化の解明

シュワン細胞は、外来性神経線維にそって腸管壁内に侵入する。外来性神経線維の傷害変性によりシュワン細胞を神経線維から遊離させ、シュワン細胞からの神経細胞分化の変動を解析する。

3 研究成果

①シュワン細胞の多分化能の網羅的探索

Dhh-Cre と RosaCAGG-stop loxP-tdTomato レポーターマウスの交配により、シュワン細胞の恒久標識を行った結果、成体マウスにおいて多数の tdTomato 陽性 Sox10 陰性細胞が認められ、これらの細胞の多くは神経線維から離れたところで観察され、形態的に

もシュワン細胞と異なることから、シュワン細胞が様々な他系譜の細胞に分化している可能性が示唆された(図1)。これらの Sox10 陰性細胞における tdTomato の発現が、成体組織における Dhh-Cre の異所性の活性(シュワン細胞以外による Cre の発現)によって起きている可能性を排除するために、GFAP-Cre マウスを用いて同様の細胞群が検出されるかを解析中である。さらに、Dhh プロモーターがシュワン細胞特異的に活性化する胎生期に細胞標識を行って検証を進めることとした。この目的のために Dhh-CreERT2 マウスをデザインしマウス作出のためのベクター構築を行った。現在、ベクターはマウス胚に injection され、トランスジェニックマウスの誕生を待っている状態である。

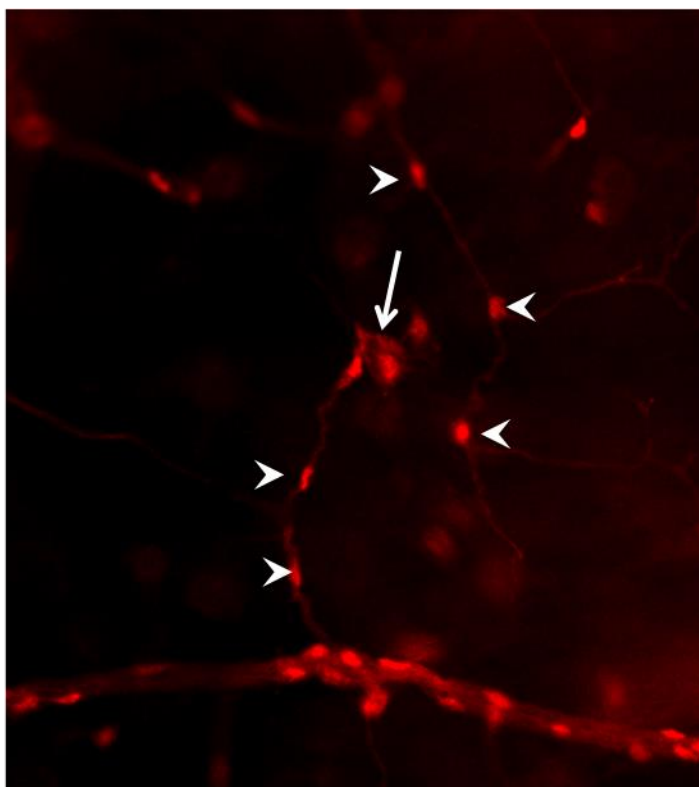


図1：心臓組織に検出されたシュワン細胞からの他系譜細胞への分化

Dhh-Cre/ RosaCAGG-stop-loxP-tdTomato マウス(生後一ヶ月)の心臓において、神経線維にそって存在するシュワン細胞(矢頭)の近傍に神経線維と接触のない扁平な細胞が観察される。

②シュワン細胞の多分化能を制御する分子機構解明

Dhh-Cre と RosaCAGG-stop loxP-tdTomato レポーターを持つマウスから抗p75抗体を用いてシュワン細胞を単離し、FGF含有培地で培養するとtdTomatoで標識されたシュワン細胞の数パーセントが神経細胞に分化することが観察された。このシステムに、様々な成長因子や細胞間シグナルを作用させた結果、Neuregulin存在下でシュワン細胞数が増加すると同時に神経細胞への分化能を持った未分化な細胞(神経・シュワンの二方向性の分化能を持った細胞)の出現を認めた。この結果よりNeuregulinはシュワン細胞の増殖と生存を高めるとともに、シュワン細胞を未分化状態に誘導するシグ

ナルとして働いている可能性が示唆された。一方、Notch の抑制によっては、シュワン細胞から神経細胞分化能の有意な誘導は検出されなかった。Cadherin をはじめとする接着分子の解析は現在進行中である。

以上の実験と平行して、疾患モデルマウスを用いてシュワン細胞からの神経細胞誘導能の変化を解析した。Sox10 遺伝子が片アレル不活化された Sox10^{+/-}マウスでは、Sox10 の発現減少により腸管遠位部で神経系が欠損するヒルシュスプルング病様のフェのタイプが誘導される。Sox10^{+/-}マウスにおいて Dhh-Cre, RosaCAGG-stop loxP-tdTomato によりシュワン細胞由来神経形成を解析したところ、内在性の腸管神経細胞が減少している部位でシュワン細胞由来神経細胞の割合が増加していることが見出された。この結果から、内在性の神経細胞の存在はシュワン細胞からの神経細胞分化を抑制する可能性が考えられ、神経源性的神経分化抑制因子の存在が示唆された。

③神経傷害時におけるシュワン細胞由来神経分化の解明

腸管に投射する主要な外来神経線維の一つである交感神経の傷害系を立ち上げた。新生児期の交感神経細胞の生存は神経成長因子 (NGF) に依存していることから、NGF 中和抗体を新生仔マウスに腹腔内投与した。投与後数週後に腸管神経系を解析したところ、NGF 中和抗体投与群では交感神経線維の細かい分岐が消失し部分的な神経変性が起きていた。この部分に一致してシュワン細胞由来の神経細胞数の増加が検出された。以上の結果から、神経変性によりシュワン細胞が神経線維との接触を断つと神経分化が誘導されやすくなる可能性が示唆された。現在、椎体前神経節から腸間膜に投射する神経線維を切断する傷害系を確立して、交感神経線維の物理的傷害によりシュワン細胞由来神経分化が増強されるかを解析中である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の遂行により、シュワン細胞が様々な系譜の細胞に分化出来る可能性を強く支持するデータが取得出来た。この知見は、シュワン細胞が組織幹細胞的な性質を内包した細胞であることを示唆している。シュワン細胞の細胞系譜を超えた分可能の解析がさらに進めば再生医療に応用可能な細胞ソースとしてシュワン細胞がより着目されるようになり、新たな産業の発展につながることも期待される。

また本研究により、シュワン細胞の多分化能誘導に対して神経細胞や神経線維は抑制性に働くことが示され、神経細胞由来の抑制分子の存在が強く示唆された。一方、神経細胞から分泌される Neuregulin はシュワン細胞の増加と他系譜への分化を同時に促進したことから、Neuregulin/ErbB を介した細胞内シグナルの制御によりシュワン細胞の幹細胞性を効率的に誘導出来る可能性が提示された。以上の知見は、将来シュワン細胞性幹細胞を応用した医療の確立に有用な知見となることが期待される。

最後に、ひょうご科学技術協会の研究助成により本研究を確実に前に進めることが出来ました。心より感謝申し上げます。