慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	げっ歯類および霊長類脊髄損傷に対する神経堤幹細胞移植治療の確立
Sub Title	Establishment of cell therapy for transplanting neural crest-derived stem cells into spinal cord injury model of rodent and mammalian
Author	名越, 慈人(Nagoshi, Narihito)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	神経堤幹細胞は成体の皮膚や骨髄から回収でき、また神経細胞へ分化するため、損傷脊髄に対する移植細胞の供給源として期待される。本研究では、マウス脊髄損傷モデルに神経堤幹細胞を移植したところ、移植細胞は損傷脊髄内で生着し、神経細胞へ分化することが明らかになった。また移植細胞は腫瘍化せず、神経堤幹細胞移植の安全性も確認された。さらに霊長類であるサルや人からも神経堤幹細胞の回収に成功した。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20791054 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20791054seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791054
研究課題名（和文）　げっ歯類および霊長類脊髄損傷に対する神経堤幹細胞移植治療の確立

研究課題名（英文）　Establishment of cell therapy for transplanting neural crest-derived stem cells into spinal cord injury model of rodent and mammalian

研究代表者
名越　慈人（NAGOSHI NARIHITO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10383837

研究成果の概要（和文）：神経堤幹細胞は成体の皮膚や骨髄から回収でき、また神経細胞へ分化するため、損傷脊髄に対する移植細胞の供給源として期待される。本研究では、マウス脊髄損傷モデルに神経堤幹細胞を移植したところ、移植細胞は損傷脊髄内で生着し、神経細胞へ分化することが明らかになった。また移植細胞は腫瘍化せず、神経堤幹細胞移植の安全性も確認された。さらに霊長類であるサルや人からも神経堤幹細胞の回収に成功した。

研究成果の概要（英文）：Neural crest-derived stem cells (NCSCs) are isolated from adult skin and bone marrow, and they have the ability to differentiate into neural cells. Therefore, NCSCs are expected as cell sources for transplantation into spinal cord injury. In our study, we transplanted NCSCs into spinal cord injury model of mice. We observed the transplanted NCSCs surviving in the injured spinal cord, differentiating into neural cells. Moreover, the transplanted NCSCs had no tumorigenesis, suggesting that transplantation of NCSCs are safe. We also isolated and characterized NCSCs from adult marmoset or human skin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
キーワード：再生医療、脊髄損傷、細胞移植、神経堤幹細胞、霊長類

１．研究開始当初の背景

中枢神経系の再生を目指した移植材料として対峙組織由来の神経幹細胞が注目されているが、臨床応用を考えた場合技術的・倫理的問題が障害となる可能性がある。そこで申請者は、自家組織由来の細胞供給源として神経堤幹細胞に着目した。神経堤幹細胞は、胎生期において神経管が閉塞する際にその背側から分離し、様々な組織へ遊走し、成体に至るまで各組織中に潜伏していると考え

られている。神経堤幹細胞は自己複製能およびニューロン、グリア、筋線維芽細胞の3系統へ分化する多分化能を有する組織幹細胞であり、また成体組織より採取可能であることから、脊髄損傷に対する理想的な細胞供給源と考えられる。

２．研究の目的

(1)げっ歯類および霊長類より神経堤幹細胞を回収し、その性質を同定することである。
(2)脊髄損傷モデル動物に対して、神経堤幹細胞を移植し、その有効性を評価することである。

３．研究の方法

(1)神経堤由来細胞を標識するマウスの用意：P0-Cre/Floxed-EGFPマウスは神経堤由来の細胞をGFPで標識できる。

(2)各組織由来神経提幹細胞の特性の同定：Flow cytometryを用いて各組織におけるGFP陽性細胞の回収・培養を行った。形成された細胞塊を分化誘導し、各組織間での分化傾向を比較検討した。RNAレベルでの神経堤マーカーの発現を検討した。

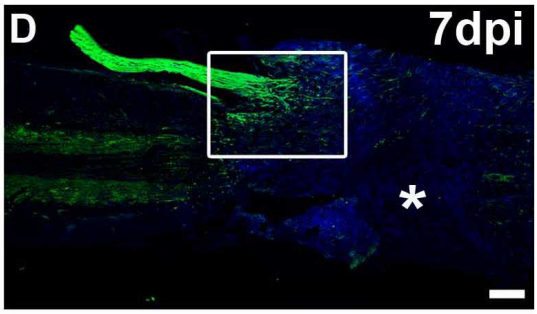
(3) マウス脊髄損傷モデルにおける内在性の神経堤由来細胞の関与：成体P0-Cre/Floxed-EGFPマウスの胸髄10番レベルに脊髄切断モデルを作成し、損傷へ侵入するGFP陽性細胞を経時的に観察した。これらGFP陽性細胞を免疫組織学的に評価した。

(4)神経堤細胞の移植：マウス第10胸髄レベルに圧挫損傷(60Kdye)を加え、損傷後9日目に各組織由来の神経堤幹細胞を移植し、組織学的評価を行った。

４．研究成果

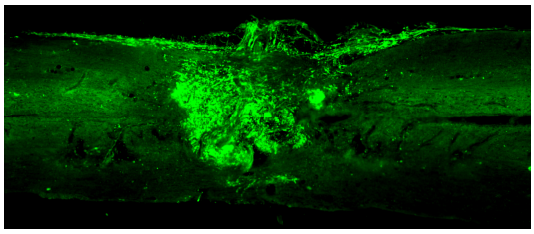
(1)P0-Cre 成体マウスにおける皮膚、後根神経節、骨髄よりGFP陽性細胞回収すると神経堤由来の細胞塊が形成された。各細胞塊を一定の条件下で培養すると、その多分化能や自己複製能は後根神経節由来の神経堤幹細胞で有意に高いことが分かった(図)。さらに、神経堤細胞の未分化マーカーである*Sox10*や*p75*の発現も由来する組織間で相違があり、神経堤幹細胞における組織特異性が明らかとなった。

(2) 損傷7日後にGFP陽性細胞が神経根から損傷脊髄内へ流入してくることを確認し(図)、流入するGFP陽性細胞は損傷56日後まで経時的に増加した。GFP陽性細胞は炎症細胞やニューロン、血管平滑筋細胞のマーカーは発現せず、そのほとんどがシュワン系の細胞であった。損傷脊髄と神経根の接合部に着目すると、内在性のP0+成熟シュワン細胞がp75+未熟シュワン細胞へと脱分化し損傷脊髄内へと動員されることが分かった。損傷56日後に未熟シュワン細胞は損傷脊髄内で再度成熟シュワン細胞へと分化し、損傷部周囲の軸索を再髄鞘化することが明らかになった。



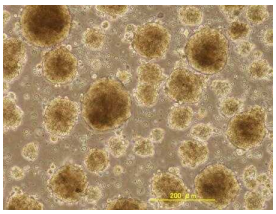
上図：P0-Cre成体マウス脊髄損傷7日目の組織切片。GFP陽性細胞は損傷部に隣接する末梢神経から侵入していることが分かる。

(3)損傷6週後の組織像において、移植した神経堤細胞は損傷脊髄内で生着し(図)、ニューロン、シュワン細胞へ分化していた。また移植した細胞の腫瘍化は認められず、神経堤幹細胞移植の安全性が明らかになった。



上図：脊髄損傷6週後の組織像。移植したGFP陽性の神経堤細胞は損傷中心部に生着していた。

(4)手術施行時の余剰な皮膚検体を用い、Neurosphere法に準じて培養を行い、ヒト皮膚由来の細胞塊の形成を認めた(図)。分化誘導された細胞はほとんどが筋繊維芽細胞で、ニューロンやグリア細胞はごくわずかであったが、3系統へ分化することが確認された。さらに、Flow-cytometryを用い、CD90陽性」およびCD271陽性の分画で回収を行うと、細胞塊を形成する細胞が3系統へ高率に分化することが分かった。



左図：ヒト皮膚由来細胞塊の形成。Neurosphere 法に準じて培養を行うと増殖能を示す細胞塊の形成を認めた。

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６件）
① Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H.; Neural crest-derived stem cells display a wide variety of characteristics. *Journal of Cellular Biochemistry* 107: 1046-1052, 2009 （査読有）

②Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, and Matsuzaki Y.: Prospective identification, isolation and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 206: 2483-2496, 2009 （査読有）

③Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, and Matsuzaki Y.: Development of mesenchymal stem cells partially originate from neural crest. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379:1114-1119, 2009 （査読有）

④Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, and Okano H.: ES cell-derived NS/PCs transplantation after spinal cord injury. *PLoS One* 4: e7706, 2009 （査読有）

⑤Nakamura M, Nagoshi N, Fujiyoshi K, Kaneko S, Toyama Y, Okano H.: Regenerative medicine for spinal cord injury: Current status and open issues. *Inflammation and Regeneration.* 29:198-203, 2009 （査読有）

⑥名越慈人、岡野栄之．損傷脊髄に対する幹細胞移植 最新医学　幹細胞研究の最近の進歩(後篇) 64、1404-16, 2009 （査読無）

〔学会発表〕（計４件）
①名越慈人、芝田晋介、中村雅也、松崎有未、戸山芳昭、岡野栄之 損傷脊髄における自己修復機構ー内在性シュワン細胞の寄与ー
第９回日本再生医療学会(広島、2010.3.19)

② Nagoshi N, Nakamura M, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H, Toyama Y: Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. Cervical Spine Research Society 37th Annual Meeting (Salt Lake City, UT, USA, 2009.12.5)

③名越慈人、芝田晋介、松崎有未、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也　損傷脊髄に対する神経堤由来細胞の寄与
第24回日本整形外科学会基礎学術集会(神奈川、2009.11.5)

④名越慈人 神経堤幹細胞の発生と多能性 -中枢神経の再生を目指して -
第10回運動器科学研究会(東京、2009.9.19)

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
名越　慈人（NAGOSHI NARIHITO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10383837

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし