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

Title	脊髄損傷における自己修復機構の解明 : 内在性シュワン細胞の寄与
Sub Title	Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage cells
Author	名越, 慈人(Nagoshi, Narihiro)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、神経堤由来の細胞を標識できるトランスジェニックマウスに脊髄損傷モデルを作成することにより、損傷脊髄内におけるシュワン細胞の動態を経時的に評価した。末梢神経の損傷において、シュワン細胞が脱分化/再分化する現象はWaller変性の過程として認識されているが、中枢神経損傷におけるシュワン細胞の可塑性を評価した報告はない。損傷脊髄におけるシュワン細胞の動態を詳細に把握することにより、生体が本来備えている修復機構を明らかにし、中枢神経系の再生医療に結びつけることが本研究の目的である。
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2010 ~ 2011 課題番号 : 22791398 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_22791398seika

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

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22791398
研究課題名（和文）　脊髄損傷における自己修復機構の解明－内在性シュワン細胞の寄与－

研究課題名（英文）　Schwann Cell Plasticity after Spinal Cord Injury Shown by Neural Crest Lineage Cells

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）：本研究では、神経堤由来の細胞を標識できるトランスジェニックマウスに脊髄損傷モデルを作成することにより、損傷脊髄内におけるシュワン細胞の動態を経時的に評価した。末梢神経の損傷において、シュワン細胞が脱分化/再分化する現象は Waller 変性の過程として認識されているが、中枢神経損傷におけるシュワン細胞の可塑性を評価した報告はない。損傷脊髄におけるシュワン細胞の動態を詳細に把握することにより、生体が本来備えている修復機構を明らかにし、中枢神経系の再生医療に結びつけることが本研究の目的である。

研究成果の概要（英文）：After spinal cord injury (SCI), various cell types are recruited to the lesion site, including Schwann cells, which originate in the neural crest. Here, we investigated the differentiation states, migration patterns, and roles of neural crest derivatives following SCI, using a transgenic mouse line carrying neural crest-specific reporters, P0-Cre/Floxed-EGFP. This study draws on the advantages offered by transgenic mouse lines bearing a genetic cell-lineage marker and extends previous work by describing the origins and behavior of the neural crest-derived cells that contribute to endogenous repair after SCI. This process is a novel repair mechanism for the lesioned mammalian spinal cord.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総　計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：①脊髄損傷　②シュワン細胞　③再生医療

１．研究開始当初の背景

中枢神経系である脊髄は再生能力が非常に低く、一度損傷を受けると再生は困難であると考えられてきた。しかしながら、損傷部では反応性アストロサイトが浸潤する炎症細胞をブロックしたり(Okada et al. Nat Med, 2006)、血管新生が起こったりしており(Loy et al. J comp Neurol, 2002)、脊髄の再生に関わる様々な反応が起こっていることが近年明らかになってきている。中でも、末梢

神経系のシュワン細胞が損傷部へ侵入し神経線維の再髄鞘化に関わることが指摘されている。しかしこれまでの研究は、シュワン細胞を組織学的あるいは形態学的に単一マーカーで追跡しているのみであり(Wang et al. Acta Neuropathol, 1996; Brook et al. J Neurosci Res, 1998)、シュワン細胞がどこから侵入し、どのような分化系譜や移動形式、役割を示すかについては明らかにされていない。そこで我々は、神経堤由来の細胞を標識するトランスジェニックマウスを用い、神経堤由来のシュワン細胞が損傷脊髄内でどのように振舞うかを本研究で明らかにした。神経堤は脊椎動物の胎生期に特徴的な組織であり、神経管が閉鎖する際に神経堤細胞が全身へ移動しシュワン細胞を含め様々な細胞へ分化する。損傷脊髄内におけるシュワン細胞の動態を詳細に解析することにより、生体が本来備えている修復機構を明らかにし、中枢神経系の再生医療に結びつけたいと考えている。

２．研究の目的

これまでの研究では脊髄損傷後において、p75やNCAM陽性のシュワン細胞が損傷部へ動員されることが、げっ歯類においてもヒトにおいても観察されている(Wang et al. Acta Neuropathol, 1996; Brook et al. J Neurosci Res, 1998; Brook et al. Eur J Neurosci, 2000)。p75やNCAMは、未分化なシュワン細胞に発現することが知られているが(Taniuchi et al. Pro Natl Acad Sci USA, 1986; Jessen et al. Development, 1990)、正常な成体において存在しないと考えられている未分化シュワン細胞が、どの組織でどのようなメカニズムで生み出されるかについては不明であった。また、脊髄損傷部に侵入してきたp75陽性の未分化シュワン細胞が、時間の経過とともに減少していくことも報告されているが(Brook et al. J Neurosci Res, 1998)、p75のみの単一マーカーでしか追跡を行っていないため、なぜ減少するのかを明らかにすることは困難であった。さらに、成熟シュワン細胞のマーカーであるP0陽性細胞が脊髄損傷後の損傷中心部に存在することも報告されているが(Kaneko et al. Nat Med, 2006)、本来中枢神経に存在しない成熟シュワン細胞がどのような過程を経て損傷部に動員され髄鞘化に関わるかについては明らかではなかった。末梢神経の損傷において、成熟シュワン細胞が未分化なシュワン細胞へと脱分化し、再生過程で再び成熟細胞へ再分化する現象は、Waller変性の過程の一部として認識されているが(Griffin et al. WB Saunders, 1993)、中枢神経損傷におけるシュワン細胞の可塑性を詳細に解析した報告はなく、またその現象を明らかにする手段も困難であったと考える。そこで我々は、神経堤由来の細胞を特異的に標識できるトランスジェニックマウス P0-Cre/Floxed-EGFP を用いることで(Yamauchi et al. Dev Biol, 1999; Kawamoto et al. FEBS lett, 2000)、ラベルされたシュワン細胞を追跡することが可能ではないかと考えた。P0プロモーターは胎生早期の神経堤細胞に発現するため、Cre/loxP システムを用いることで神経堤細胞が永続的にGFPを発現し続けることが可能である。この P0-Cre/Floxed-EGFP マウスに対して脊髄損傷モデルを作成することで、GFP でラベルされた神経堤由来のシュワン細胞を経時的に観察することが可能であり、さらに p75 や NCAM、P0 をマーカーとして用いることでGFP陽性シュワン細胞の可塑性を評価し、損傷脊髄内におけるシュワン細胞の動態を把握することが本研究の目的である。

３．研究の方法

本研究の具体的な方法としては、まず始めに、P0-Cre/Floxed-EGFP成体マウスの正常脊髄における神経堤由来細胞(神経軸索)の分布を確認した。次に、脊髄切断モデルを胸髄10番レベルに作成し、シュワン細胞がどこから損傷部へ侵入するかを、隣接する末梢神経と骨髄に絞り検証した。侵入するシュワン細胞は、未分化(p75)および成熟(P0)な状態を経時的に変化させること分かったため、それぞれのマーカーを用いてシュワン細胞の可塑性を追跡した。また、侵入するシュワン細胞の移動様式を調べるため、分裂・増殖マーカーを用いて評価した。さらに、侵入したシュワン細胞が損傷脊髄内で成熟し再髄鞘化する過程を免疫電顕を用いて評価した。最後に、P0-Creマウス以外に神経堤由来細胞を標識するマウスを用いて、同様の研究を行い、結果を追試した。

４．研究成果

<u>(1)損傷前の正常脊髄における GFP 陽性細胞の評価</u>：発生学的に、神経管の背側から移動した神経堤細胞の一部は後根神経節に集積し、そこから脊髄神経へ向かって感覚神経軸索を投射することが知られている(Bronner-Fraser et al.J Craniofac Genet Dev Biol, 1991)。我々の研究結果においても、P0-Cre/Floxed-EGFP成体マウスの脊髄後索において、GFP, RT97 二重陽性の神経軸索が存在することが確認された。これらが感覚神経線維であることを確認するために、触覚受容感覚神経のマーカーである Parvalbumin、および温痛覚受容感覚神経のマーカーであるCGRPの抗体を用いて、GFPと共に免疫染色を行った。88.6%の GFP 陽性神経軸索が Parvalbumin 陽性であり、また CGRP 陽性の

GFP 陽性神経軸索も散見された。従って、正常脊髄内における神経堤由来感覚神経軸索のほとんどが GFP を発現していることが確認された。

(2)損傷脊髄内へ侵入する神経堤由来細胞の特性の同定：シュワン細胞が損傷脊髄へ侵入してくることは知られているが、どこから動員されるかについては明らかになっていなかった。組織学的に評価すると、GFP 陽性細胞は損傷脊髄に隣接する神経根から侵入することが明らかになった。また神経根のうち、前根および後根の双方から GFP 陽性細胞が移動してくる様子も観察された。我々は骨髄における神経堤細胞の存在を突き止めており (Nagoshi et al. Cell Stem Cell, 2008)、末梢神経以外にシュワン細胞が侵入するもう一つの経路として、損傷後に骨髄から血液を介して移動してくることも考えられた。そこで、flow-cytometry を用いて損傷後 7 日目以内の血液中の GFP 陽性細胞の有無を調べたが、血液中には全く認められなかった。さらに損傷脊髄内における GFP 陽性細胞は血液細胞のマーカーである MAC1 や Iba1 を発現しておらず、損傷部へ集積する神経堤由来細胞は主に、隣接する神経根から侵入することが明らかになった。

(3)シュワン細胞の脱分化/再分化の動態：損傷部の組織学的評価を行うと、脊髄損傷後 7 日目において、損傷部における GFP 陽性細胞の全てが p75 陽性の未分化なシュワン細胞であり、P0 陽性の成熟シュワン細胞は存在しないことが明らかになった。また、同時期の神経根を観察すると、GFP ようせいさいぼうの大部分は P0 陽性の成熟名シュワン細胞から p75 陽性の未分化なシュワン細胞へ脱分化しており、シュワン細胞が未分化性を保持した状態で損傷脊髄へ侵入することが分かった。シュワン細胞が脱分化する際、AP-1 転写因子複合体の重要なコンポーネントである c-Jun の発現が上昇することが知られている (Parkinson et al. J Cell Biol, 2008)。本研究においても、脊髄損傷後の神経根内における GFP 陽性のシュワン細胞は c-Jun を発現しており、シュワン細胞が未分化な状態へ脱分化することを確認した。

神経根から損傷部へ移動する未分化シュワン細胞は、細胞分裂マーカーである Ki67 や BrdU を発現しており、シュワン細胞が増殖しながら損傷部へ侵入することが明らかになった。

損傷脊髄へ侵入した GFP 陽性のシュワン細胞数は経時的に増えていくことが組織学的に明らかになった。しかしその詳細を観察すると、損傷部の GFP 陽性細胞のうち、p75 陽性の未分化シュワン細胞は損傷後 14 日までは 90%以上認められるものの、損傷後 28 日以降ではその割合は次第に減少していった。それに対して、P0 陽性の成熟シュワン細胞の割合は、損傷後 7 日目では一切認められないものの、損傷後 14 日目以降では急激に増加することが分かった。従って、侵入した未分化シュワン細胞は、損傷部内において経時的に成熟シュワン細胞へ再分化することが明らかになった。

(4)損傷内部での再髄鞘化の評価：発生学的に、未分化なシュワン細胞は成熟する過程において Sox10 や Oct6 を発現することが知られている (Jaegle et al. Science, 1996; Ghislain et al. EMBO Rep, 2006)。損傷後の再生過程でも同様の現象が観察されるか否かを検証するため、損傷後 28 日目において GFP 陽性細胞とこれらのマーカーを組織学的に評価した。僅かではあるが、GFP 陽性細胞が Sox10 や Oct6 を発現することが確認された。また、GFP 陽性のシュワン細胞が RT97 陽性の神経軸索を髄鞘化する様子も組織学的にとらえることができた。さらに損傷部において再分化したシュワン細胞が髄鞘化していることを確認するため、免疫電顕を用いて GFP 陽性のシュワン細胞を観察した。シュワン細胞の髄鞘の特徴であるラメラ構造を有する GFP 陽性細胞が多数存在することを、損傷後 56 日目において観察した。以上より、損傷脊髄へ侵入した未分化シュワン細胞が、損傷内で再分化して成熟シュワン細胞となり、残存する神経軸索を髄鞘化することが明らかになった。

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 8 件）（全て査読有）

1. Nagoshi N, Shibata S, Hamanoue M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.: Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. Glia. 59: 771-84, 2011

2. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura KI, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M.: Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. J Clin Invest. 121: 3981-90, 2011

3. Kubota Y, Takubo K, Hirashima M, Nagoshi N, Kishi K, Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Sano K, Murakami M, Ema M, Omatsu Y, Takahashi S, Nagasawa T, Shibuya M, Okano H, Suda T.: Isolation and function of mouse tissue resident vascular precursors marked by myelin protein zero. J Exp Med. 208: 949-60, 2011

4. Takagi T, Ishii K, Shibata S, Yasuda A, Sato M, Nagoshi N, Saito H, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Schwann-Spheres Derived from Injured Peripheral Nerves in Adult Mice -Their In Vitro Characterization and Therapeutic Potential. PLoS One. 6: e21497, 2011

5. Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.: The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. Mol Brain. 4: 34, 2011

6. Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H.: Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. Mol Brain. 3: 31, 2010

7. Aihara Y, Hayashi Y, Hirata M, Ariki N, Shibata S, Nagoshi N, Nakanishi M, Ohnuma K, Warashina M, Michiue T, Uchiyama H, Okano H, Asashima M, Furue MK.: Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. Int J Dev Biol. 54: 1287-94, 2010

8. Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H.: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci USA. 107: 12704-9, 2010

〔学会発表〕（計 6 件）
国際会議における発表
1. Nagoshi N, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H, Toyama Y, Nakamura M.: Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. The 2nd Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section. Korea, April 29, 2011

2. Nagoshi N, Shibata S, Matsuzaki Y, Okano H, Toyama Y, Nakamura M.: Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing. Society for Neuroscience 2010. USA, Nov 17, 2010

国内学会における発表
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: 神経堤幹細胞: 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 46 回脊椎脊髄障害医学会.大阪,2011 年 11 月 18 日

4. 名越慈人、芝田晋介、松崎有未、中村雅也、戸山芳昭、岡野栄之: 神経堤幹細胞: その多能性と再生医療における有用性. 第 53 回歯科基礎医学会学術集会　サテライトシンポジウム.岐阜,2011 年 9 月 30 日

5. 名越慈人、芝田晋介、松崎有未、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 神経堤幹細胞: 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 64 回国立病院総合医学会.福岡,2010 年 11 月 26 日

6. 名越慈人、芝田晋介、松崎有未、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也: 神経堤幹細胞: 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 39 回日本脊椎脊髄病学会.高知,2010 年 4 月 23 日

〔図書〕（計 0 件）　なし

〔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