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

Title	神経堤幹細胞を用いた脊髄損傷治療法の確立
Sub Title	Transplantation of neural crest stem cells for spinal cord injury
Author	中村, 雅也(NAKAMURA, MASAYA) 戸山, 芳昭(TOYAMA, YOSHIAKI) 石井, 賢(ISHII, KEN)
Publisher	
Publication year	2009
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2008.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究により、神経堤幹細胞は成体に至るまで胚葉を超えて各組織に潜伏しており、骨髄等において胚葉転換と表現されている組織幹細胞の多くが実は神経堤由来である可能性が示唆された。臨床応用を考えた場合、神経堤幹細胞は患者の組織から採取することが可能であり、倫理的問題や免疫拒絶反応を回避でき、さらに正常組織から回収するため腫瘍化の可能性も低く、脊髄損傷に対する自家細胞移植の新しい細胞供給源として有用と考えられる。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2007～2008 課題番号：19390400 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_19390400seika

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２１年　６月１６日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19390400
研究課題名（和文）　神経堤幹細胞を用いた脊髄損傷治療法の確立

研究課題名（英文）　Transplantation of neural crest stem cells for spinal cord injury

研究代表者
中村　雅也（NAKAMURA MASAYA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30217898

研究成果の概要：本研究により、神経堤幹細胞は成体に至るまで胚葉を超えて各組織に潜伏しており、骨髄等において胚葉転換と表現されている組織幹細胞の多くが実は神経堤由来である可能性が示唆された。臨床応用を考えた場合、神経堤幹細胞は患者の組織から採取することが可能であり、倫理的問題や免疫拒絶反応を回避でき、さらに正常組織から回収するため腫瘍化の可能性も低く、脊髄損傷に対する自家細胞移植の新しい細胞供給源として有用と考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
年度			
年度			
総　計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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：脊髄損傷、神経堤幹細胞、再生、移植

１．研究開始当初の背景

われわれは、ラット脊髄損傷に対するラット神経幹細胞移植、さらには霊長類であるコモンマーモセット脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性を報告してきた。これらの結果は、脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の有効性を示唆するものであり、臨床応用に向けた大きな一歩であった。しかし、われわれが使用した細胞は胎生期の脳室下層・海馬・脊髄に存在する神経幹細胞であるために倫理的な問題が大きな障壁となり、臨床応用が困難な状況であった。事実、厚生労働省が 2006 年に公表したヒト幹細胞を用いた臨床治験のガイドラインでも胎児由来の組織に関しては継続審議となってしまった。

このような状況を鑑み、移植細胞としてより倫理的問題の少ない組織を模索し、自家組織由来の細胞供給源として神経堤幹細胞（Neural crest stem cell）に着目した。神経堤細胞は胎生期において神経管が閉鎖する際に全身へ移動し様々な組織へ分化するが、移動した組織内で未分化な状態を維持した神経堤幹細胞として各臓器に存在し、成体においても多能性を有する細胞として潜在していると考えられている。なかでも神経堤幹細胞は Neuron や Glia へ分化する神経系幹

細胞であるため、中枢神経系の再生医療への応用の可能性も非常に期待できると考えている。

２．研究の目的

P0 Cre/loxp EGFP マウス(Kawamoto et al, 2000 Yamauchi et al, 1999)および Wnt1 Cre/loxp EGFP マウス(Danielian et al, 1998)は神経堤由来の細胞を GFP で標識できるため、FACS を用いて各組織より神経堤細胞を効率良く回収することが可能である。そこで、これらのマウスを用いて各組織由来の神経堤細胞の特性を同定することが本研究の第一の目的である。さらに、これまでわれわれが行ってきた損傷脊髄に対する神経幹細胞移植と同様の手技を用いて、マウスさらにはサル損傷脊髄に対する神経堤幹細胞移植の有効性を明らかにすることが第二の目的である。

３．研究の方法

１）神経堤幹細胞の回収・培養と分化解析：Flow cytometry を用いて、P0 Cre/loxp EGFP マウスの各組織の GFP 陽性細胞を回収しニューロスフェアー法で培養を行った。形成される GFP 陽性の細胞塊に対して、多分化能や自己複製能、RNA レベルでの神経堤幹細胞マーカーの発現を解析し、*in vitro* における各組織間で神経堤幹細胞の性質を比較検討した。

２）マウス脊髄損傷における内在性神経堤幹細胞の関与： P0-Cre/Floxed-EGFP 成体マウスに完全切断モデルを作製し、経時的に損傷脊髄内の GFP 陽性細胞を観察した。これら GFP 陽性細胞の phenotype を免疫組織学的に検討した。

３）マウス脊髄損傷モデルに対する神経堤幹細胞の移植と有効性の検討：C56B1/6J 成体雌マウスを用いて、第 10 胸髄レベルに IH impactor(60Kdye)による圧挫損傷モデルを作製した。損傷後 9 日目に各組織由来細胞塊を損傷中心部に移植し(移植群)、対照群では PBS を注入した。移植後 6 週まで下肢運動機能評価を行い、その後各種免疫染色による組織学的検討を行った。

４）ヒト神経堤幹細胞の培養法の分化誘導法の確立：患者へのインフォームドコンセントに基づき、整形外科・皮膚科・形成外科の手術の際に生じた余剰な皮膚を酵素処理し、Neurosphere 法に準じて培養を行い、ヒト皮膚由来細胞塊の自己複製能及び多分化能を検討した（慶應義塾大学医学部倫理委員会承認済み)。

４．研究成果

１）成体における後根神経節、皮膚、骨髄から GFP 陽性細胞を回収すると細胞塊が形成されたが、GFP 陰性細胞からは細胞塊は形成されず、各組織に増殖能力を持つ神経堤幹細胞が存在することが確認された。各細胞塊を一定の条件下で培養すると、後根神経節由来の細胞においてニューロン、グリア、筋線維芽細胞の 3 系統へ同時に分化する分化能力の高い細胞塊が多く存在した。また自己複製能を評価する secondary sphere forming assay においても、後根神経節由来の細胞塊形成能力が有意に高かった。さらに real time PCR において、神経堤幹細胞のマーカーである *p75* や *sox10* の発現を各組織由来細胞塊で比較すると、後根神経節における発現が有意に高いことが確認され、後根神経節が他の組織に比べて神経堤幹細胞を多く含んでいることが明らかになった。

２）マウス脊髄損傷における内在性神経堤幹細胞の関与： P0-Cre/Floxed-EGFP 成体マウスに完全切断モデルを作製し、経時的に損傷脊髄内の GFP 陽性細胞を観察した。これら GFP 陽性細胞の phenotype を免疫組織学的に検討した。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、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。今後、これら神経堤由来の未熟シュワン細胞を損傷脊髄に移植することにより脊髄再生が促進できるかを検討予定である。

３）マウス脊髄損傷モデルに対する神経堤幹細胞の移植と有効性の検討：各組織由来細胞塊をマウス脊髄損傷モデルへ移植すると、後根神経節由来の細胞移植群が他の細胞移植群や対照群に比べて良好な行動機能回復が得られた。組織学的にも、損傷脊髄内において後根神経節由来の細胞塊はニューロンやグリア細胞へ有意に分化しており、脊髄の修復に寄与していると考えられた。

４）ヒト神経堤幹細胞の培養法の分化誘導法の確立：手術施行時の余剰な皮膚を酵素処理し、Neurosphere 法に準じて培養を行いヒト

皮膚由来細胞塊の形成を確認した。分化誘導後の細胞では、多くが筋線維芽細胞への分化を示し、ニューロン、グリアへの分化はごく少数で、ある程度 linage の制限された細胞が多くを占めていることが考えられる。そこで、FACS を用いて CD90 および CD271 陽性細胞を sorting した後に sphere を形成させると３系統に分化する多能性幹細胞を効率よく回収することが可能となった。

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 2 件）

1.Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. Cell Stem Cell 2:392-403, 2008.査読あり

2.名越慈人, 中村雅也, 岡野栄之：【進みつづける細胞移植治療の実際　再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解　細胞移植治療の現状とその周辺環境】 治療を目的とした細胞移植　前駆細胞、組織幹細胞損傷脊髄に対する細胞移植研究　遺伝子医学 MOOK:57-62,2008　査読なし

〔学会発表〕（計 11 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：骨髄由来神経堤幹細胞の発生と多様性. 第 8 回日本再生医療学会（2009.3.5 東京）
2. Nagoshi N, Nakamura N, Shibata S, Kugamai G, Matsuzaki Y, Okano H, ToyamaY: Characterization of neural crest stem cells as the source oftransplantation for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society(Austin, USA 2008.12.5)
3. 名越慈人，芝田晋介，熊谷玄太郎，松崎有未，岡野栄之，戸山芳昭，中村雅也：マウス損傷脊髄に対する神経堤幹細胞移植の検討　日本整形外科学会基礎学術集会（2008.10.23 京都）
4. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura N, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mousebone marrow The 6th International Society for Stem Cell Research (Philadelphia 2008.6.11-14)
5. 名越慈人，中村雅也，芝田晋介，熊谷玄太郎，松崎有未，岡野栄之，戸山芳昭：マウス脊髄圧挫損傷モデルに対する神経堤幹細胞移植の有効性の検討　日本脊椎脊髄病学会（2008.4.23 東京）
6. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: Isolation and characterization of neural crest stem cells in adult rodents. 54th ORS annual meeting (San Francisco, CA, 2008,3.2-5)
7. Nagoshi N, Nakamura N, Shibata S, Kugamai G, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: Characterization of neural crest stem cells as the source of transplantation for spinal cord injury. Society for Neuroscience2008(Washington,USA2008. 11.15-19)
8. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Multipotent neural crest-derived stem cells in bone marrow, dorsal root ganglia, and facial skin in adult rodent. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, (San Diego, CA, USA, 2007.11.3-7)
9. 名越慈人，芝田晋介，松崎有未，岡野栄之，戸山芳昭，中村雅也：損傷脊髄に田尾する神経堤幹細胞の移植治療　第 26 回日本運動移植再生医学研究会(2007,10.27 静岡)
10. 名越慈人，芝田晋介，中村雅也，松崎有未，戸山芳昭，岡野栄之：中枢神経再生へ向けた神経堤幹細胞の可能性　第 28 回日本炎症再生医学会（2007,8.2 -3 東京）
11. Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, Nagai Y, Okano JH, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Isolation and characterization of neural crest stem cells in adult rodent. 5th Annual meeting of International Society for Stem cell research (Cairns, Australia, 2007,6.17-20)

〔図書〕（計 1 件）

1. 名越慈人，中村雅也，岡野栄之，戸山芳昭：神経堤幹細胞を用いた移植研究～神経再生を目指して～.臨床整形、医学書院 43(7): 688-691, 2008.

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
受賞
Nagoshi N, Nakamura N, Shibata S, Kugamai G, Matsuzaki Y, Okano H, ToyamaY: Characterization of neural crest stem cells as the source oftransplantation for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society Basic research award (2008.12.5 Austin, USA)

６．研究組織
(1)研究代表者:
中村　雅也　（NAKAMURA MASAYA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30217898

(2)研究分担者
戸山　芳昭　（TOYAMA YOSHIAKI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40129549

石井　賢　（ISHII KEN）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00276289

(3)連携研究者