

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10785

研究課題名(和文) ヒト嗅粘膜組織由来神経前駆細胞による脊髄損傷治療法の開発

研究課題名(英文) Application of human adult olfactory sphere cells as a cell source for treatment of spinal cord injury

研究代表者

大西 諭一郎 (Ohnishi, Yu-ichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00533811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトOS細胞は神経前駆細胞の特徴があり、自律性にニューロンに分化する一方、増殖能は低く、治療対象患者へ継代培養によって待機的に準備しておくことは困難であると考えられた。OS細胞樹立後1週間ほどであれば、ニューロンの補充療法を目的とした細胞ソースとして有用であり、増殖能も低いことから癌化の可能性も低く、自家細胞移植には適していると考えられた。しかし、機能効果をもたらす為には移植細胞数を確保する必要があり、OS細胞を使用する課題と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経の再生医療では失われたニューロンをどこから得るか、またいかにして分化させるかが大きな課題である。成体中枢神経系は再生能力に乏しいが、嗅粘膜は終生ニューロンの再生が繰り返されるユニークな組織である。嗅粘膜上皮に存在するHorizontal Basal cell (HBC) は組織幹細胞であり、オルファクトリーニューロンの他、嗅粘膜を構成するボーマン嚢や支持細胞に分化する。申請者らはHBCがオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)マーカーを発現していることを見いだした。そして嗅粘膜組織より無血清培地で、遺伝子工学的・細胞工学的手法を用いずに、OPCマーカーを発現する細胞集塊の作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Olfactory sphere cells (OSCs) are stem cells generated by culturing olfactory mucosa. Various culture conditions generate OSs that have different progenitors or stem cell characteristics. We previously reported that adult rat OSCs express oligodendrocyte progenitor cell (OPC) markers, and differentiate into oligodendrocytes in vitro and vivo. In this study we generated adult human OSCs, and analyze their characteristics. human OSCs autonomously differentiated into neurons in vitro, and had potential to be as a cell source of neurons for their own regenerative grafts, avoiding the need for immuno-suppression and ethical controversy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脊髄損傷 嗅粘膜 神経前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の脊髄損傷患者は毎年約5,000人以上発生している。受傷原因としては、交通事故と高所転落が多いとされてきたが、近年では転倒などの外傷を契機とする高齢患者が増加している。多くの脊髄損傷患者は車椅子やベッド上での日常生活を余儀なくされ、社会的損失と負担は大きい。脊髄損傷は未だエビデンスのある十分有効な治療法がなく、日本せきずい基金などの患者団体や学会はその開発を注目している。ヒト両下肢完全運動麻痺を呈する慢性期脊髄損傷患者への自家嗅粘膜移植術は、慢性期完全対麻痺患者においても部分的ではあるが筋力回復をもたらすことのできた初めての治療法といえる。しかし、(1) 全例で機能回復がみられるものではない、(2) 機能回復をもたらされたとしてもその程度は限定的である、(3) 移植後長期間リハビリを続けることが必要である、などの課題が残されている。一方、急性期から亜急性期の脊髄損傷の治療法は、これまでに多くの臨床研究が終了しているが、有効性を示すデータには至っていない。

2. 研究の目的

中枢神経の再生医療では失われたニューロンをどこから得るか、またいかにして分化させるかが大きな課題である。成体中枢神経系は再生能力に乏しいが、嗅粘膜は終生ニューロンの再生が繰り返されるユニークな組織である。嗅粘膜上皮に存在する Horizontal Basal cell (HBC) は組織幹細胞であり、オルファクトリーニューロンの他、嗅粘膜を構成するボーマン嚢や支持細胞に分化する。

申請者らは HBC がオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) マーカーを発現していることを見いだした。そして嗅粘膜組織より無血清培地下で、遺伝子工学的・細胞工学的手法を用いずに、HBC 由来の OPC マーカーを発現する細胞集塊 (オルファクトリースフィア:OS) の作成に成功した。

これまでに、以下の点を明らかにしている。

- (1) ラット OS 細胞はオリゴデンドロサイトへ分化し、ラット損傷脊髄へ移植した際に下肢動機能の改善に働くことを明らかにした (Ohnishi et al. 2013)。
- (2) ラット OS 細胞をラット末梢神経切断モデルへ移植した際には、シュワン細胞へ分化し末梢神経軸索再生が改善することを明らかにした (Ohnishi et al. 2013)。
- (3) ラット OS 細胞はバルプロ酸によって GABA ニューロンへ分化誘導された。ラット OS 細胞をてんかんモデルラットの海馬へ移植しバルプロ酸を腹腔内投与した際には、OS 細胞は GABA ニューロンへ分化誘導されることを明らかにした (Ohnishi et al. 2015a)。
- (4) ヒト嗅粘膜組織よりヒト OS 細胞の樹立に成功した。ヒト OS 細胞は自律的にニューロンへ分化することが明らかとなった (Ohnishi et al. 2015b) (図 1)。

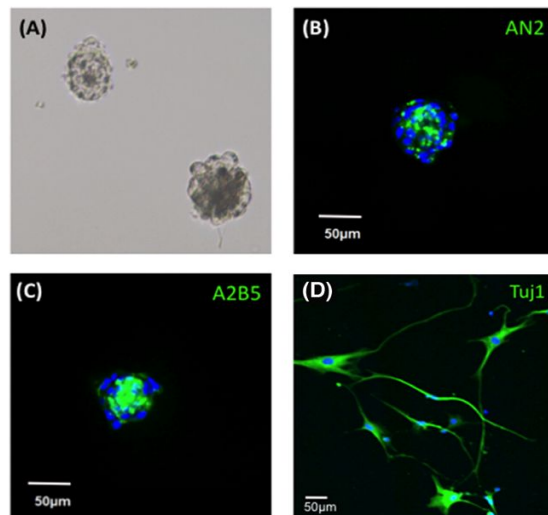


図 1 ヒト OS 細胞はニューロンへ自律的に分化する。(A) 明視野での OS。(B, C) OS は OPC マーカーを発現する。(C) ニューロンマーカーを発現し、樹状突起と細胞体の形態を認める。

(参考文献)

1. **Ohnishi et al.** Adult olfactory sphere cells are a source of oligodendrocyte and Schwann cell progenitors. *Stem Cell Res.* 2013;11:1178-1190.
2. **Ohnishi et al.** Olfactory sphere cells are a cell source for γ -aminobutyric acid-producing neurons. *J Neurosci Res.* 2015;93:1293-304.
3. **Ohnishi et al.** Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors. *Stem Cell Res.* 2015;15:23-29.

3. 研究の方法

移植された幹細胞は宿主環境に応じてその機能や分化運命を大きく変化させる。本研究では、安全で効果的なヒト OS 細胞移植の為に、正常脊髄と損傷脊髄における生着(生存)・分化(運命)を明らかにする。そして OS 細胞の基礎研究から脊髄損傷の再生医療へと臨床応用に展開することが目的である。本研究の研究項目は以下の通りである。

(1)ヒト OS 細胞の正常組織での生着と分化の解明：ヒト OS 細胞をマウス正常脊髄に移植する。そして移植細胞の生存分化・腫瘍形成等を評価する。また下肢運動機能への影響を評価する。

(2)ヒト OS 細胞の損傷脊髄での生着と分化の解明：ヒト OS 細胞をマウス亜急性期または慢性期挫滅損傷脊髄に移植する。そして移植細胞の生存分化・腫瘍形成等を評価する。また下肢運動機能への影響を評価する。

(3)ヒト OS 細胞の培養と保存方法の検討：ヒト OS 細胞は primary culture において 3-4 週間で増殖効率が減弱していく。そのため治療への time window に限界がある。そこでより長期間培養が可能な条件を検討する他、凍結保存の検討も行う。

4. 研究成果

ヒト嗅粘膜組織は、2つの臨床研究『慢性期脊髄損傷患者に対する自家嗅粘膜組織による脊髄機能再生』と『副鼻腔手術における切除嗅粘膜組織からのヒト OS 細胞の樹立』に則り、余剰検体を使用した。余剰嗅粘膜の量はバラツキが多く、ヒト OS 細胞の樹立に至った検体は少数例であった。

ヒト OS 細胞を無血清培地で継代培養を行った。培養後 1-2 週間では sphere 形成も良好であったが、2-3 週間すると増殖効率が減弱し、sphere 形成に至らなくなった。OS 細胞の治療への time window に限界があると考え、血清培地や液性因子の添加など長期間培養が可能な条件を検討したが、継代は困難であった。

研究目的(3)の凍結保存の検討も行ったが、1ヶ月間-80 で凍結保存後のヒト OS 細胞を再び起こすことは困難であった。研究目的(1)(2)では、移植する細胞数を確保することが困難であった。

受傷前より免疫抑制剤 (FK506) をマウス

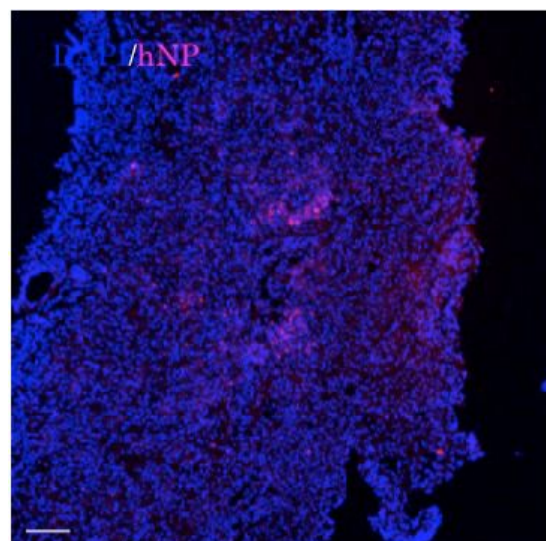


図2マウス挫滅損傷脊髄でのヒト移植OS細胞。抗hNP抗体にて免疫染色。青;DAPI、赤; human nuclear protein。

に投与し、IH impactor を用い、50kdyn にて T8 高位に脊髄挫滅損傷モデルマウスを作成した。受傷後 6 日目にヒト OS 細胞を 1×10^3 個 μ インジェクターにて移植した。移植後も免疫抑制剤を投与し、2 週間後に灌流固定を行い、凍結切片を作成した。DAPI 染色と hNP での免疫染色を行い、移植ヒト OS 細胞の生着を確認した (図 2)。

ヒト OS 細胞は神経前駆細胞の特徴があり、自律性にニューロンに分化する一方、増殖能は低く、治療対象患者へ継代培養によって待機的に準備しておくことは困難であると考えられた。OS 細胞樹立後 1 週間ほどであれば、ニューロンの補充療法を目的とした細胞ソースとして有用であり、増殖能も低いことから癌化の可能性も低く、自家細胞移植には適していると考えられた。しかし、機能効果をもたらす為には移植細胞数を確保する必要があり、OS 細胞を使用する課題と考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. **Ohnishi YI, Iwatsuki K,** Ishihara M, Ohkawa T, Kinoshita M, Shinzawa K, Fujimoto Y, Yoshimine T. Promotion of astrocytoma cell invasion by micro RNA-22 targeting of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. J Neurosurg Spine. 2017;26(3):396-403. (査読有)
2. 細見晃一、押野悟、貴島晴彦、Mohamed Ali、**大西諭一郎**、**岩月幸一**、柳澤琢史、吉峰俊樹、齋藤洋一 脊髄神経根引き抜き損傷後疼痛に対する脳神経外科的治療の治療成績 Functional Neurosurgery 2017;56:36-40. (査読有)
3. Takenaka T, **Ohnishi YI,** Oshino S. Journal of Surgical Case report. A case of T2 radiculopathy after anterior C5-6 fusion. J Surg Case Rep. 2016;2016(5): 095. (査読有)
4. Ninomiya K, Iwatsuki K, **Ohnishi YI,** Ohkawa T, Yoshimine T. Significance of the Pars Interarticularis in the Cortical Bone Trajectory Screw Technique: An In Vivo Insertional Torque Study. Asian Spine J. 2016;10(5):901-906. (査読有)
5. Ninomiya K, Iwatsuki K, **Ohnishi Y,** Yoshimine T. Asian Spine J. Radiological Evaluation of the Initial Fixation between Cortical Bone Trajectory and Conventional Pedicle Screw Technique for Lumbar Degenerative Spondylolisthesis. Asian Spine J. 2016;10(2):251-7. (査読有)
6. Iwatsuki K, Tajima F, **Ohnishi YI,** Nakamura T, Ishihara M, Hosomi K, Ninomiya K, Moriwaki T, Yoshimine T. A Pilot Clinical Study of Olfactory Mucosa Autograft for Chronic Complete Spinal Cord Injury. Neurol Med Chir (Tokyo). 2016;56(6): 285-292. (査読有)
7. **Koichi Iwatsuki, Yu-ichiro Ohnishi,** Koshi Ninomiya, Toshika Ohkawa, Toshiki Yoshimine. Feasibility of the Posterior Approach for Removal of Ventrolateral Extended Intradural Tumors. INDIAN JOURNAL OF RESEARCH. 2016;5(3):74-77. (査読有)
8. **Koichi Iwatsuki,** Fumihito Tajima, Yoshiyuki Sankai, **Yu-ichiro Ohnishi,** Takeshi Nakamura, Masahiro Ishihara, Koichi Hosomi, Koshi Ninomiya, Takashi Moriwaki & Toshiki Yoshimine. Motor evoked potential and voluntary EMG activity after olfactory mucosal autograft transplantation in a case of chronic, complete spinal cord injury: case report. Spinal Cord Ser Cases. 2016;2:15018. (査読有)
9. 完全損傷患者に対する神経再生術後の理学療法 櫻井雄太、吉岡和泉、坂野元彦、**大西諭一郎**、他 理学療法学 2016;0947. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. **大西諭一郎** 嗅粘膜組織由来幹細胞のニューロンへの分化誘導の検討 第 17 回日本分子脳神経外科学会 2016 年 8 月 27 日

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：オルファクトリースフィア細胞の単離方法、該オルファクトリースフィア細胞を用いた脱髄疾患治療剤及び末梢神経軸索再生増強剤の製造方法

発明者：大西諭一郎

権利者：大西諭一郎

種類：登録特許

番号：第 6243675 号 JP6243675B2

取得年月日：2017 年 11 月 17 日

国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩月 幸一

ローマ字氏名：Koichi Iwatsuki

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80346204

研究分担者氏名：鷹羽 良平

ローマ字氏名：Ryohei Takaha

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部付属病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：70774686

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されま