

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591664  
 研究課題名（和文）皮膚由来の多能性幹細胞の分化誘導実験及び 損傷脳・末梢神経への移植実験  
 研究課題名（英文）Skin-derived stem cells transplanted into cerebral ischemia and injured hypoglossal nerve in mice  
 研究代表者  
 高井 敬介（TAKAI KEISUKE）  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：70376424

## 研究成果の概要（和文）：

皮膚由来の幹細胞は、虚血後の脳に生着したが、梗塞全体に遊走移動している所見は認められず、脳の修復には寄与しなかった。挫滅損傷後の末梢神経には移植細胞が生着し、軸索周囲にシュワン様細胞に形態分化した。しかし、これらのシュワン様細胞が末梢神経の軸索再生と末梢神経伝導速度の改善に影響を与える証拠は得られなかった。皮膚由来幹細胞は、生体内での生着や分化の条件が限定されると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Skin-derived stem cells transplanted into cerebral ischemia in mice had survived, however, they didn't migrated into all the ischemic area and didn't contribute the recovery from ischemic damage. These cells transplanted into injured hypoglossal nerve in mice also had survived and differentiated into Schwann-like cells. These Schwann-like cells didn't contribute axonal regeneration and the recovery from myelin-deficient peripheral nerve. These cells transplanted into injured sciatic nerve in myelin-deficient mice didn't survived. Skin-derived stem cells survive and differentiate under limited condition.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 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・脳神経外科学

キーワード：移植、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、損傷した臓器・組織の治療方法として、移植治療が注目されている。損傷した臓器・組織の中でも、中枢神経（脳・脊髄）および末梢神経障害に対する薬物治療は保護療法

にすぎず、これら神経障害の再生と機能回復は容易ではない。神経障害の損傷回復・機能再建のための有力な治療の選択肢の一つとして、移植治療の開発研究は重要である。現在までに、神経由来の多能性幹細胞<sup>1,2</sup>・胚

性幹細胞<sup>3,4</sup>・骨髄由来の多能性幹細胞<sup>5,6</sup>が報告され、これらの細胞は、中枢神経への移植実験において神経系細胞への分化を認めている。しかし、これらの細胞は、細胞採取の困難さや免疫抑制剤の使用など、倫理的・臨床的に大きな問題をかかえている。

最近、皮膚由来の幹細胞<sup>7</sup>、脂肪由来の間葉系幹細胞<sup>8</sup>が報告された。また、ヒト皮膚から、CD133陽性細胞を単離し、細胞球を形成させて、SCIDマウスの側脳室に移植すると、astrocyteと内皮細胞に分化したという事が報告された<sup>9</sup>。さらに、マウス皮膚由来の幹細胞を損傷した坐骨神経に移植すると、シュワン細胞に分化したという事が報告された<sup>10</sup>。これらの皮膚・脂肪由来の細胞は、組織採取の容易さと、自家移植が可能のため免疫抑制剤が不要という、大きな利点を持つ。中でも、皮膚は体表全体に存在しているため、移植治療のソースとして、他の組織と比較し組織採取が極めて容易であり、移植治療の倫理的・臨床的問題を解決できる突破口となりうる。皮膚由来の幹細胞が、損傷した中枢神経・末梢神経に生着し、神経系細胞に分化し、さらに機能回復に結びつく事が証明されれば、新規移植治療へ向けた開発研究として、臨床的に極めて意義の深いものとなる。

そこで、この皮膚由来の幹細胞 (Skin derived precursors) を、損傷した中枢神経・末梢神経の移植治療として使用できるかどうかを、これらの培養細胞と、脳虚血モデル・脳神経損傷モデルを用いて検証するという、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

皮膚由来の幹細胞は、一定の条件下で、神経系細胞の抗原性を示す事が報告されている。本研究は、この皮膚由来の幹細胞を、損傷した脳・末梢神経に移植した場合、生着

するかどうか、また、生着した場合、神経系の細胞に分化するかどうかという課題に対して、脳虚血モデル<sup>11</sup>・脳神経損傷モデル<sup>12</sup>を用いて、検証する事を目的とする。

細胞が生着・分化した場合、神経機能の回復に寄与するかどうかを明らかにする、という課題に対して、脳虚血モデル・舌下神経損傷モデルにおける神経機能を評価する事を第2の目的とする。

## 3. 研究の方法

### 実験 1

C57BL/6 マウス由来の GFP マウス耳介皮膚から、多能性幹細胞を分離培養する。これらの細胞は GFP 蛍光を発するため、野生型マウスに移植した場合、蛍光顕微鏡下に、移植細胞の識別が容易である。

マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデル<sup>11</sup>を用いて、野生型C57BL/6 マウスに脳虚血をかける。同種移植のため免疫抑制剤を使用しない。虚血手術1週間後に、梗塞脳の線条体に、定位脳手術装置とHamilton注射器を用いて、上述の皮膚由来の多能性幹細胞を注射移植する。移植細胞は 100,000cells/2 $\mu$ l/マウスの濃度とする。移植手術4週間後にマウスを灌流固定する。灌流固定した脳を20-30%Sucroseで脱水し、凍結標本作製、cryostatを用いて、移植部位の線条体の病理切片を作成する。病理切片で移植細胞の生着の有無を確認し、細胞が生着していたら神経系細胞の抗体を用いて免疫染色する。

### 実験 2

C57BL/6マウス由来のGFPマウス耳介皮膚から、多能性幹細胞を分離培養する。マウス舌下神経損傷モデル<sup>12</sup>を用いて、野生型C57BL/6マウスの舌下神経に挫滅損傷を与える。舌下神経挫滅部位に、Hamilton注射器

に連結したglass pipetteを用いて、上述の皮膚由来の多能性幹様細胞を注射移植する。同種移植のため免疫抑制剤を使用しない。移植手術後5週間後に4%paraformaldehyde/PBSを用いて、マウスを灌流固定する。

まず、損傷舌下神経への移植細胞生着の有無、神経系細胞への分化の有無を形態学的、免疫組織学的に検討する。灌流固定後、細胞移植した舌下神経を4%paraformaldehyde/PBSを用いて一晩固定し、20-30%Sucroseで脱水し、凍結標本を作製、cryostatを用いて移植舌下神経の病理標本を作製し、移植細胞の生着の有無を観察する。移植細胞が生着していた場合、生着細胞を神経系細胞の抗体を用いて免疫染色する。

次に、移植細胞が生着した場合、神経機能の回復に寄与するかどうかを検討する。灌流固定した脳を20-30%Sucroseで脱水し、凍結標本を作製、cryostatを用いて、舌下神経核の病理切片を作成する。われわれは、舌下神経を切断すると、切断部位よりも中枢側の運動神経細胞体の脱落が起こる事を報告している<sup>12</sup>。舌下神経核の運動神経核の数をカウントし、損傷舌下神経の再生が舌下神経核の脱落を防ぎ得たかどうかを検討する。われわれは、舌下神経を切断すると、切断部位よりも末梢側にウオーラー変性（遮断された軸索と髄鞘の遠位部に起こる変性変化）が起き、舌萎縮が起こる事を報告している<sup>12</sup>。灌流固定したマウスの舌萎縮の有無を評価し、移植細胞が軸索再生に寄与したかどうかを検討する。

また、ミエリン欠損マウス（Trembler-Jマウス）に全身麻酔下で坐骨神経に挫滅損傷を与える。挫滅部位に、皮膚由来の多能性幹様細胞を注射移植する。5週間経過後に、全身麻酔下に坐骨神経の神経伝導速度を測定する。測定後マウスを安楽死させ、坐骨神経を摘出し、移植

後の細胞を組織学的に解析する。Trembler-Jマウスは、末梢神経の髄鞘形成不全のため、末梢神経の軸索は正常であるが、野生型と比較し神経伝導速度が低下している特徴をもつ。本実験により、分化したシュワン様細胞が神経伝導速度を改善するかどうかを検証できる。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1

虚血損傷後に細胞移植した、移植4週間後のマウス脳冠状断（図1）には、移植細胞が生着生存していた（矢印）。移植細胞は、穿刺針の腔に沿って1ヶ所に集簇して存在しており、梗塞に陥った線条体全体に遊走移動している所見は認められなかった。

移植細胞の蛍光写真（図2）では、移植細胞は密に集簇し、周囲を取り囲まれた構造でGFP蛍光を示した。

これらの細胞を、神経系細胞の抗体であるNeuN、GFAPで蛍光染色したが、いずれも染色されなかった。移植生存細胞は、マウスの神経症状（片麻痺）を改善しなかった。

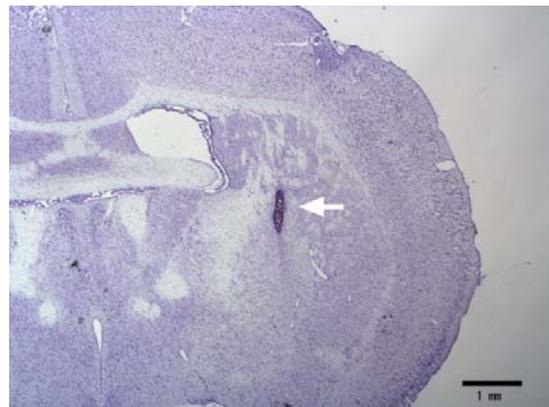


図 1

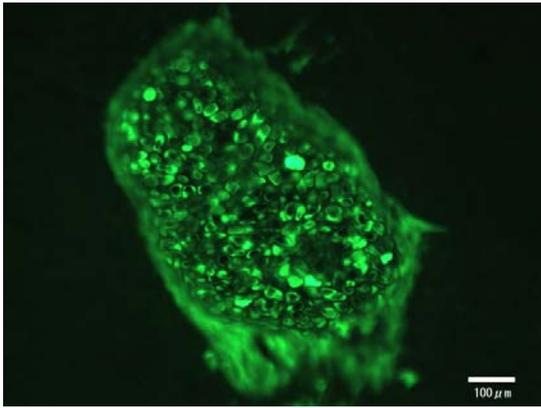


図 2

### 実験 2

神経損傷後に細胞移植した、移植 5 週間後の舌下神経の光学写真 (図 3) と同じ神経の蛍光写真 (図 4) を示す。矢印頭が細胞移植された舌下神経、矢印が対側の正常舌下神経である。舌下神経には、移植 5 週間後に移植細胞が生着生存し GFP 蛍光を示した。移植細胞は、神経挫滅部位全体に分布していた。

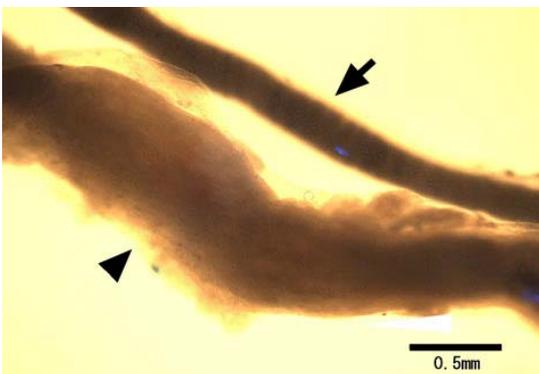


図 3



図 4

細胞移植された舌下神経の断面図 (図 5) では、生存した細胞は、舌下神経の横断面のほぼ全てに分布していた。

これらの神経の断面図において、移植細胞と舌下神経の軸索の関係を観察するために、軸索を  $\beta$  III-tubulin で蛍光染色した所、生存した細胞は、軸索の周囲を取り囲み、解剖学的にシュワン細胞の構造を示した (図 6)。

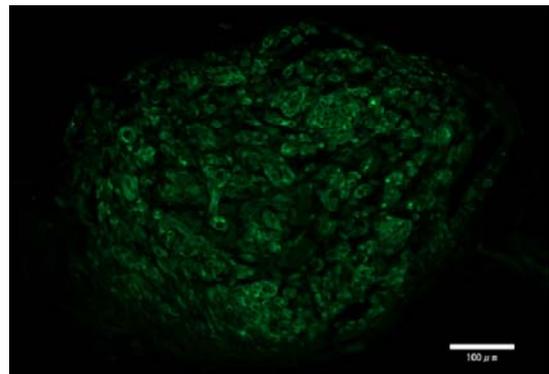


図 5

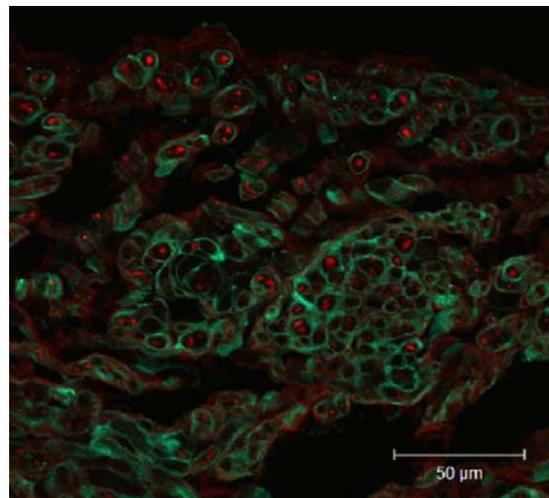


図 6

移植後生着した細胞が軸索再生に与える影響を調べるために、脳幹舌下神経核の運動神経核の数を数え、正常対側との比を計算した所、移植群 (図 7) は  $78.5 \pm 4.6\%$ 、コントロール群 (図 8) は  $69.1 \pm 0.5\%$  で、統計的な有

意差を認めなかった。舌萎縮の有無を観察した所、移植群、コントロール群ともに萎縮を認めなかった。

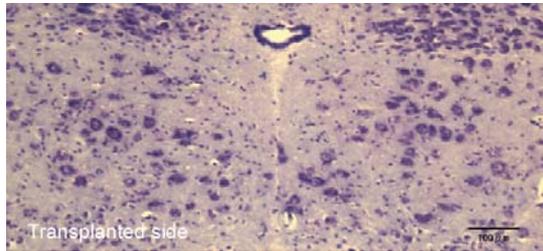


図 7

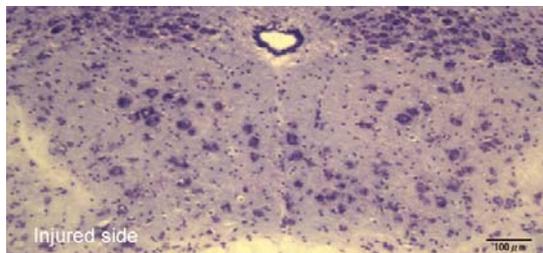


図 8

移植後生着した細胞が軸索再生に与える影響を調べるために、ミエリン欠損マウスを確保し、分化した皮膚由来幹様細胞の末梢神経伝導速度を測定する実験を進めたが、様々な条件下でも、移植した細胞が生着しなかったため、神経伝導速度を計測することができなかった。

#### 考察

皮膚由来の幹様細胞は、虚血損傷後の脳に移植後 4 週間生存したが、穿刺針の腔に沿って 1 ヶ所に集簇して存在しており、梗塞に陥った線条体全体に遊走移動している所見は認められなかった。また、神経系細胞への分化も認めなかった。

皮膚由来の幹様細胞は、損傷した脳神経に移植後 5 週間生存し、舌下神経軸索をとりかこみ、形態的にシュワン細胞に分化した。これ

らの移植細胞が軸索再生に寄与するかどうかを、脳幹の舌下神経核の生存運動神経細胞数で評価した所、移植群とコントロール群で統計学的有意差を認めなかった。

皮膚由来の幹様細胞は、虚血損傷後の脳の修復には寄与しなかったが、挫滅損傷後の末梢神経の軸索周囲にシュワン様細胞に形態分化した。しかし、これらのシュワン様細胞が末梢神経の軸索再生と末梢神経伝導速度の改善に影響を与える証拠は得られなかった。皮膚由来幹様細胞は、組織採取の容易さと、自家移植が可能のため免疫抑制剤が不要という、大きな利点を持つが、生体内での生着や分化の条件が限定されると考えられた。

#### 参考文献

1. Reynolds BA et al:Science 255:1707-1710, 1992
2. Clarke DL et al:Science 288:1660-1663, 2000
3. McDonald JW et al:Nature Med. 5:1410-1412, 1999
4. Brustle O et al:Science285:754-756, 1999
5. Pittenger MF et al:Science 284:143-147, 1999
6. Prockop DJ et al:Science 276:71-74, 1997
7. Toma JG et al:Nat. Cell Biol. 3:778-784, 2001
8. Soo KK et al:Exp. Neurology183:355-366, 2003
9. Belicchi M et al:J Neurosci. Res. 77:475-486, 2004
10. Ian AM et al:J Neurosci. 26(24):6651-6660, 2006
11. Furuya K, Kawahara N et al:J Neurosurg. ;100(1):97-105, 2004
12. Kirino T et al:J Neurosci. 3(5):915-923, 1983

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0件)

[学会発表] (計2件)

①Keisuke Takai, Hitoshi Okochi, Nobutaka Kawahara, Takaaki Kirino, Nobuhito Saito: Skin-derived stem cells transplanted into cerebral ischemia in mice. NEURO-COE retreat (Hakone) 2006. 6. 30

②Keisuke Takai, Hitoshi Okochi, Nobutaka Kawahara, Takaaki Kirino, Nobuhito Saito: Skin-derived stem cells transplanted into injured hypoglossal nerve in mice. NEURO-COE retreat (Hakone) 2007. 6. 17

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 敬介 (TAKAI KEISUKE)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70376424

(2) 研究分担者

齊藤 延人 (SAITO NOBUHITO)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：60262002

(3) 連携研究者

大河内 仁志 (OKOUTI HITOSHI)  
国立国際医療研究センター研究所・  
細胞組織再生医学研究部・部長  
研究者番号：30185235

桐野 高明 (KIRINO TAKAAKI)  
国立国際医療研究センター・理事長  
研究者番号：90126045