

令和 4 年 4 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17815

研究課題名(和文)毛包幹細胞を用いた神経系の再生医療

研究課題名(英文)Regenerative medicine of the nervous system using hair follicle stem cells

研究代表者

小原 宏哉(Obara, Koya)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：40596483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷の慢性期における治療法は確立しておらず、様々な幹細胞による再生医療が検討されてきているが、いまだ有効なものは明確にできていないのが現状である。我々は毛包幹細胞が特に神経細胞やグリア細胞に分化しやすいことを利用して、脊髄損傷慢性期のモデルマウスに毛包幹細胞を移植することで、有効性を証明できるか実験を通じて考察した。結果損傷脊髄内で、移植した毛包幹細胞は増殖し、ニューロンとグリア細胞に分化することを確認した。さらに運動機能評価においても毛包幹細胞移植によりスコアが改善することを示すことができた。以上から慢性期脊髄損傷の治療法として毛包幹細胞が有用である可能性を見出すことができたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷は非可逆的疾患であり、治療として有効な薬物療法が認められないことも含め、現在幹細胞を用いた再生医療は国内外で多数検討されている。しかしES細胞やiPS細胞は多分化能、再生能は優れているものの、倫理面や腫瘍化の問題のため生体内移植の実用化は難しいのが現状である。また生体組織幹細胞移植は多くは患者個人からの採取リスクが高く、また、他者の提供者由来の幹細胞移植は、移植後の拒絶反応という大きな問題をかかえている。我々が提唱する毛包幹細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比較して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic spinal cord injury (SCI) is a highly debilitating and recalcitrant disease with limited treatment options. Although various stem cell types have shown some clinical efficacy for injury repair they have not for SCI. Hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells have been shown to differentiate into neurons, Schwann cells and many other type of cells. In the present report, HAP stem cells from C57BL/6J mice were implanted into the severed thoracic spinal cord of C57BL/6J or athymic nude mice in the early chronic phase. After implantation, HAP stem cells differentiated to neurons, astrocytes and oligodendrocytes in the regenerated thoracic spinal cord of C57BL/6J and nude mice. Quantitative motor function analysis demonstrated a significant functional improvement in the HAP-stem-cell-implanted mice, compared to non-implanted mice. HAP stem cells therefore have greater clinical potential for SCI repair.

研究分野：皮膚科

キーワード：毛包幹細胞 脊髄損傷 再生医療 慢性期

1. 研究開始当初の背景

我々は毛包のうち、バルジ領域と脂腺付着部の間に分布している nestin 陽性、ケラチン 15 陰性の毛包幹細胞を発見し、神経細胞・グリア細胞・心筋細胞・角化細胞等に分化することを明らかにした。毛包幹細胞を用いた再生医療は、倫理面や拒絶反応の問題がなく、早期の臨床応用が期待される。本研究では nestin 陽性毛包幹細胞が特に神経細胞、グリア細胞に多く分化しやすい傾向を利用し、末梢神経や脊髄、大脳といった神経系への移植を行うことで構造、機能の回復を確認することを目標とする。神経損傷急性期に毛包幹細胞移植の有効性を示した後、亜急性期、慢性期の移植による効果発現の程度を評価していく。また移植実験はマウスより開始し、その後ラットなどへと種の拡大を図っていく。最終的に我々は、ヒトの損傷神経に対する毛包幹細胞自家移植を成功させることで神経再生医療の実現を目標にする。

2. 研究の目的

我々は皮膚毛包幹細胞に神経系幹細胞のマーカである nestin が強発現していることを見出すと共に、皮膚毛包から摘出した毛包幹細胞が神経細胞・グリア細胞・角化細胞・平滑筋等に分化することを明らかにし、それらのうち特に神経細胞・グリア細胞といった神経系への分化が顕著であったことを確認した(Y. Amoh et al. PNAS 102, p.5530-4, 2005)。このことから、毛包幹細胞移植による中枢および末梢神経の再生医療への実現に着想するに至った。

現在中枢神経、末梢神経に対する再生医療は国内外で多数検討されている。ES 細胞や iPS 細胞は多分化能、再生能は優れているものの、倫理面や腫瘍化の問題のため生体内移植の実用化は難しいのが現状である。また生体組織幹細胞移植は多くは患者個人からの採取リスクが高く、また、他者の提供者由来の幹細胞移植は、移植後の拒絶反応という大きな問題をかかえている。我々が開発した毛包幹細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比較して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待される。

そして我々は、既にマウスにおける脊髄損傷急性期への毛包幹細胞移植により、構造の再生と運動機能を改善することを確認している (Y. Amoh et al. Cell Cycle 7, p. 1865-9 2008, K. Obara, Y. Amoh et al. Stem Cell Reviews and Reports. 15, p59-66 2019)。一方で臨床における脊髄損傷の実情として、多くは早期に手術や薬物療法を行うも非可逆的な神経症状を残した患者について幹細胞による再生医療が望まれることとなる。その内容を基に、今回の研究の目的としてマウスにおける脊髄損傷慢性期への毛包幹細胞移植により、構造の再生と運動機能を改善させることを目標とした。それらが達成された場合、次なる目標として大脳への毛包幹細胞移植を検討することとし、その中で脳出血に対する毛包幹細胞移植の有効性について検討していく。

3. 研究の方法

【慢性期脊髄損傷】

- (1) 脊髄損傷モデルマウスを作成し、毛包幹細胞の移植は損傷後 21 日経過した慢性期に実施する。
- (2) まずグリーンマウス由来の毛包幹細胞を *in vivo* でヌードマウスの脊髄損傷部位に移植し、生着、増殖、分化の程度を評価した。特にグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア)やニューロンへの分化能の確認は凍結切片を用いた免疫組織染色法を行い、移植した毛包幹細胞の再生能を証明する。
- (3) 慢性期脊髄損傷マウスにおいて毛包幹細胞の自家移植群と非移植群で下肢運動機能の変化を比較し、移植群が有意に改善を認めることを確認する。

【脳出血】

- (1) 脳出血モデルマウスを作成し、毛包幹細胞の移植は出血後 7 日経過した時点で実施する。
- (2) まずグリーンマウス由来の毛包幹細胞を *in vivo* でヌードマウスの脳出血部位に移植し、生着、増殖、分化の程度を評価した。特にグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア)やニューロンへの分化能の確認は凍結切片を用いた免疫組織染色法を行い、移植した毛包幹細胞の再生能を証明する。
- (3) 脳出血マウスにおいて毛包幹細胞の自家移植群と非移植群で運動機能や体重の変化を比較し、移植群が有意に改善を認めることを確認する。

4. 研究成果

グリーンマウス由来の毛包幹細胞をヌードマウスに移植したところ、損傷部位で GFP 陽性細

胞が増殖・生着し、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンへの分化を認めた。一方ミクログリアへの分化は明確には確認できなかった。また毛包幹細胞をマウスにて自家移植したところ、BMS スコア上有意に移植群で下肢運動機能の改善を認めた。以上から脊髄損傷慢性期においても毛包幹細胞移植は有用な治療法となりえることを証明することができたと考える。さらに以上の成果を論文に掲載することができた (K.Obara, et al. PLoS One. 2022; 17: e0262755.)。この結果、特に脊髄損傷に対する毛包幹細胞を用いた再生医療を実臨床へ応用できる可能性が高まったと考える。そして現在は、脳出血マウスに対する毛包幹細胞移植の効果を検討している段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Obara K, Tohgi N, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Singh SR, Hoffman RM, Amoh Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Hair-follicle-associated pluripotent stem cells derived from cryopreserved intact human hair follicles sustain multilineage differentiation potential.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45740-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Singh SR, Hoffman RM, Amoh Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM) Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 stem cell reviews and reports	6. 最初と最後の頁 59-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12015-018-9856-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Koya Obara, Kyoumi Shirai, Yuko Hamada, Nobuko Arakawa, Michiko Yamane, Nanako Takaoka, Ryoichi Aki, Robert M Hoffman, Yasuyuki Amoh	4. 巻 17
2. 論文標題 Chronic spinal cord injury functionally repaired by direct implantation of encapsulated hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells in a mouse model: Potential for clinical regenerative medicine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0262755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262755.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koya Obara
2. 発表標題 Functional recovery of spinal cord injury promoted with hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells captured on polyvinylidene fluoride membranes (PFM)
3. 学会等名 11th World Congress for Hair Research（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------