

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790814

研究課題名 (和文) ヒト頭部皮膚由来毛包幹細胞を用いた神経障害を伴う損傷皮膚の再生

研究課題名 (英文) Regeneration of the injured nerve in the skin by human hair follicle stem cells

研究代表者

天羽 康之 (AMOH YASUYUKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：10306540

研究成果の概要 (和文)：我々は、皮膚由来毛包幹細胞を移植することによる切断坐骨、脛骨神経や挫滅した末梢神経の再生能力と皮膚由来毛包幹細胞による移植部皮膚の知覚改善効果の確認について免疫不全動物を用いて詳細に検討するとともに、毛包幹細胞由来神経及び皮膚の安全性 (機能異常や腫瘍化) について明らかにした。さらに、毛包幹細胞を培養皮膚に組み込んで皮膚移植を行う検討では、毛包幹細胞によって損傷皮膚の再生能が亢進される可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We previously showed that the stem cell marker nestin is expressed in hair follicle stem cells which suggested their pluripotency. We subsequently showed that the nestin-expressing hair-follicle pluripotent stem (hfPSC) cells can differentiate in culture to neurons, glial cells, keratinocytes, and other cell types and can promote regeneration of peripheral nerve and spinal cord injuries upon injection to the injured nerve or spinal cord. We certified that the direct transplantation of the uncultured upper part of the hair follicle containing the hfPSC area was an important method to promote the recovery of peripheral nerve injuries and had significant clinical potential. Furthermore, we try to make the new cultured skin with hfPSC cells. The new cultured skin with hfPSC cells promotes the regeneration of the injured skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：移植再生医療, 再生医学, バイオテクノロジー, 細胞・組織, 生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

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。今まで

に我々は、毛包幹細胞をマウスの切断坐骨神経及び脛骨神経間へ移植した場合、末梢有髄神経を再生する能力があることを確認した。今回我々は、毛包幹細胞による末梢神経や皮膚付属器の再生能をさらに解明すると共に、

創傷治癒における毛包幹細胞による再生過程の詳細な解明を行い、培養皮膚に毛包幹細胞を組み込んだシートを作製し、末梢神経の再生、毛包脂腺組織の再生を誘導する能力を有する、新しい皮膚潰瘍治療方法の開発を目標として研究を行った。

2. 研究の目的

我々は世界に先駆けて、皮膚毛包から分離した毛包幹細胞が毛包幹細胞は神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、メラノサイトに分化する能力を持つことを明らかにした。

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して患者に対する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。我々は、神経系幹細胞の重要なマーカーとなる class VI 中間径フィラメントのネスチン遺伝子のプロモーターを用いた GFP 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作成し、皮膚毛包幹細胞にネスチン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毛包幹細胞は神経細胞、グリア細胞、角化細胞、平滑筋細胞、メラノサイトに分化する能力を持つことを明らかにした。また、毛包幹細胞をマウスの切断坐骨神経及び脛骨神経間へ移植した場合、末梢有髄神経が再生されることを確認した。さらに脊髄損傷部への毛包幹細胞移植により、下肢運動機能が改善することも確認した。これらの結果、多分化能を有する毛包幹細胞の末梢、中枢神経再生医療への応用の可能性が示唆された。さらに最近我々は、ヒトにおいてもマウス同様に毛包幹細胞が多分化能を有することを、インフォームドコンセントに基づいて得られたヒト頭部皮膚を用いた検討で明らかにした。

今回我々は、毛包幹細胞による末梢神経や皮膚付属器の再生能をさらに解明すると共に、創傷治癒における毛包幹細胞による再生過程の詳細な解明を行い、培養皮膚に毛包幹細胞を組み込んだシートを作製し、末梢神経の再生、毛包脂腺組織の再生を誘導する能力を有する、新しい皮膚潰瘍治療方法の開発を目標とした研究を行った。さらに basic fibroblast growth factor collagen-binding domain (bFGF-CBD) による毛包幹細胞を介した創傷治癒への関与を明らかにし、新しい皮膚潰瘍治療剤としての有効性を同時に検討した。

3. 研究の方法

(1) 毛包から分離した毛包幹細胞を損傷神経

に直接移植し、再生能を確認する実験

グリーンマウス髭毛包の毛包幹細胞領域を分離し、培養することなくヌードマウスの末梢神経損傷部に直接移植し、グリア細胞や神経系細胞への分化能を免疫組織染色法で確認した。神経細胞やグリア細胞への分化の確認は凍結切片を用いた免疫組織染色法を行った。末梢神経損傷部移植による機能回復は再生部上流の電気刺激を行い下流の筋肉収縮能から明らかにした。

(2) 培養皮膚に毛包幹細胞を組み込んだシートの作製実験

グリーンマウス髭毛包由来幹細胞のコロニーを、bFGF-CBD を用いて作製した培養皮膚に組み込み、ヌードマウスへの皮膚移植を行い、培養皮膚による損傷組織の再生能を蛍光顕微鏡下と凍結切片を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 毛包から分離した毛包幹細胞を損傷神経に直接移植し、再生能を確認する実験

多分化能を有するグリーンマウス由来毛包幹細胞 (図 1) を含む毛包幹細胞領域をマウスの切断した坐骨神経間に直接移植したところ、移植しないものがグリア瘢痕となつて軸索がほとんど再生しないのと比較して有意に損傷部の軸索再生が促進され、下流の腓腹筋収縮能も改善することを明らかにした (図 2)。

図1

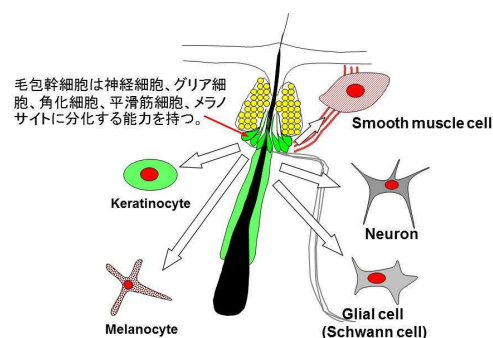


図 1 毛包幹細胞は多分化能を持つ。

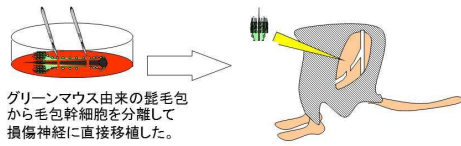


図2 グリーンマウス由来の髭毛包から分離した毛包幹細胞を培養なしで損傷神経に直接移植しても、損傷神経の再生能力を示した。

(2) 培養皮膚に毛包幹細胞を組み込んだシート
の作製実験

グリーンマウス髭毛包由来幹細胞のコロニーbFGF-CBDを用いて作製した培養皮膚に組み込み、ヌードマウスへの皮膚移植を行ったところ、損傷皮膚の治癒効果を有することを確認した。さらに、培養皮膚の作成時点で、毛包幹細胞から分化させたグリア細胞を組み込んだ培養皮膚を作成し、ヌードマウスに移植したところ、損傷皮膚に生着し、損傷皮膚を再生することを確認した。ただ、グリア細胞の損傷皮膚における神経等の再生の所見は明らかにできなかったため、現在、培養皮膚の作成時点における毛包幹細胞の移植方法の検討を再度行っている。

本研究期間中に我々は、皮膚由来毛包幹細胞を移植することによる切断坐骨、脛骨神経や挫滅した末梢神経の再生能力と皮膚由来毛包幹細胞による移植部皮膚の知覚改善効果の確認について免疫不全動物を用いて詳細に検討し、毛包幹細胞由来神経及び皮膚の安全性(機能異常や腫瘍化)について明らかにした。多分化能を有するグリーンマウス由来毛包幹細胞を有する毛包幹細胞領域を培養期間なしでマウスの切断した坐骨神経間に直接移植したところ、移植しないものがグリア瘢痕となって軸索がほとんど再生しないのと比較して有意に損傷部の軸索再生が促進されることを確認した。移植半年間までの検討では毛包幹細胞による再生部位に腫瘍化の所見は認められなかった。今回の我々の研究成果は、今までの実験系のような分離培養期間を必要としないことから、より臨床応用に近い成果と考えられた。一方、毛包幹細胞を培養皮膚に組み込んで皮膚移植を行う検討では、損傷皮膚の再生能が亢進される可能性は示唆されたが、毛包幹細胞が皮膚の感覚神経や運動神経等の損傷末梢神経を再

生する所見は明らかにできなかった。現在、培養皮膚の条件を変えながら再度検討を行っている。今後も、毛包幹細胞の血管新生能を生かした潰瘍再生能力に優れた新しい培養皮膚の作製方法について検討を進めていく予定である。我々は基礎研究と臨床研究を並行して進めていながら臨床応用に適した再生医療を確立するため、現在も検討を続けている。

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3件)

- ① 天羽康之、勝岡憲生、Robert M. Hoffman
‘The advantages of hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells over ES and iPSCs for regenerative medicine’
Journal of Dermatological Science 60(3), 2010, pp.131-137
- ② 天羽康之、安藝良一、河原克雅、浜田祐子、Robert M. Hoffman、勝岡憲生
‘Direct transplantation of uncultured hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote the recovery of peripheral nerve injury.’
Journal of Cellular Biochemistry 110(1), 2010, pp.272-277
- ③ 天羽康之、狩野真帆、新山史朗、浜田祐子、河原克雅、佐藤雄一、Robert M. Hoffman、勝岡憲生
‘Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: An alternative to ES and iPSCs.’
Journal of Cellular Biochemistry 107 (5), 2009, pp.1016-1020

[学会発表] (計6件)

- ① 天羽康之、安藝良一、河原克雅、浜田祐子、Robert M. Hoffman、勝岡憲生
‘Direct transplantation of upper part of hair follicle containing hair follicle stem cell area (hfPSA) promote the recovery of peripheral nerve injury’ (Oral presentation)
日本研究皮膚科学会 第35回年次学術大会・総会 (The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology) (2010.12.3,4) 和歌山
- ② 天羽康之、勝岡憲生、Robert M. Hoffman
‘Regeneration therapy by multipotent nestin-positive hair follicle stem cells’
The sixth Intercontinental Meeting of Hair Research Societies (2010.6.16~6.19) Cairns, Queensland, Australia

- ③ 天羽康之、狩野真帆、浜田祐子、新山史朗、田辺健一、三井純雪、河原克雅、Robert M.Hoffman、勝岡 憲生
‘Nestin-expressing hair follicle pluripotent stem cells (hfPS) can promote regeneration of impinged peripheral-nerve injury.’
(Plenary oral presentation)
日本研究皮膚科学会 第 34 回年次学術大会・総会 (The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology)(2009.12.4~12.5) 福岡
- ④ 天羽康之、前島英樹、新山史朗、齊藤典充、浜田祐子、勝岡憲生
‘円形脱毛症と萎縮性脱毛症における幹細胞マーカー発現の検討’(Oral presentation)
第 17 回毛髪科学研究会 (The 17th Annual Meeting of the Society for Hair Science Research (SHSR))(2009.11.28) 東京
- ⑤ 天羽康之、狩野真帆、河原克雅、Robert M. Hoffman、勝岡 憲生
‘ネスチン陽性の毛包幹細胞は挫滅末梢神経の再生を促進する。’(Oral presentation)
第 15 回毛髪科学研究会 (The 15th Annual Meeting of the Society for Hair Science Research (SHSR))(2008.11.29) 福岡
- ⑥ 天羽康之、狩野真帆、新山史朗、浜田祐子、河原克雅、勝岡憲生、Robert M. Hoffman
‘Multipotent nestin-positive human hair follicle stem cells isolated from the top of bulge area can promote regeneration of peripheral-nerve injury.’(Poster)
The Fifth International Investigative Dermatology 2008(第 5 回国際研究皮膚科学会)(2008.5.14~5.17)Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天羽 康之 (AMOH YASUYUKI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：10306540