

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791596  
 研究課題名（和文） 自己組織由来神経幹細胞からの神経細胞分化誘導法の開発  
 研究課題名（英文） Adult Olfactory Sphere Cells are a Source of Oligodendrocyte and Schwann Cell Progenitors  
 研究代表者 大西 諭一郎  
 (Yu-ichiro Ohnishi)  
 大阪大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：00533811

研究成果の概要（和文）：オルファクトリースフィア（OS）細胞は、オリゴデンドロサイトとシュワン細胞の両方への分化を示した。OS 細胞は、有効な治療法のない中枢・末梢神経疾患に対する再生医療における、自己由来の有用な細胞ソースとなりえることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We show that both HBCs and OSs express OPC markers, and that OS cells differentiate into oligodendrocytes and Schwann cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

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：オルファクトリースフィア、オリゴデンドロサイト、嗅粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織より得られる未分化多能性幹細胞には、脂肪幹細胞や骨髄間質細胞が知られているが、神経細胞への分化には細胞工学的的手法が必要となり、臨床応用へは安全性の問題が障壁となる。神経幹細胞が存在する成体組織には海馬や脈絡叢があるが、海馬や脈絡叢の採取は侵襲と機能損失が大きく、臨床への応用は現実的ではない。また損傷中枢神経に胎児 NSC を移植しても、ほとんどがアストロサイトに分化する。

このような問題を鑑み、我々は嗅粘膜(OM)に

着目した。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、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。OM 由来の幹細胞を神経細胞に分化させる手法を開発すれば、中枢神経系の再生医療へ応用できる可能性が高い。

バルプロ酸（VPA）はヒストンアセチル化阻害剤であり、培養細胞のヒストンアセチル化を引き起こす他、胎児 NSC のアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化を抑制し、

神経細胞への分化誘導を 50%程高める。脊髄損傷(SCI)ラットへ胎児 NSC 移植と VPA 投与を併用すると、神経回路の構築と機能回復が促進される。

## 2. 研究の目的

ラット OM 由来幹細胞を樹立し、その特性を同定する。またラット OM 由来幹細胞に対する VPA の神経細胞分化誘導効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 嗅粘膜幹細胞評価

成体♂ラットより採取した嗅粘膜組織の免疫組織学的評価を行う。合わせて嗅粘膜組織を酵素処理して得られた分散細胞を Magnetic Cell Sorting System と fluorescence activated cell sorting にて解析する。

### 2) 嗅粘膜幹細胞(OS)の樹立と評価

ラット OM 由来幹細胞を樹立するため、成体♂ラットより採取した嗅粘膜組織を酵素処理し、浮遊培養を行った。これより OM 由来幹細胞集団(オルファクトリースフィア:OS)が得られた。OS を分散し、dish 上に播種し、培養液に VPA を添加し培養する。分化培養した OS 細胞を各種マーカーで免疫染色と RT-PCR を行う。また培養 OS 細胞のヒストンを抽出し、ウェスタンブロッティングより VPA のヒストンアセチル化効果を調べる。

### 3) モデルラットへの OS 細胞移植

IH impactor より胸髄に圧挫による脊髄損傷モデルラットを作製し、損傷後 9 日目に OS 細胞を移植する。また両側後肢伏在神経を切断し、末梢神経切断モデルラットを作る。

切断末梢神経断端をシリコンチューブ内にコラーゲンゲルとともに OS 細胞の存在または非存在下で封入する。移植後 4 週の脊髄と移植後 2 週の末梢神経を切り出し、各種マーカーの免疫染色を行い、移植 OS 細胞の分化能の組織学的検討を行う。

## 4. 研究成果

1) 嗅粘膜組織幹細胞である HBC がオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー(OPC)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、OPC マーカーを発現する OS の作成に成功した(特許出願中)。

2) *in vitro* 分化培養において、OS 細胞はオリゴデンドロサイトへの分化を示した。また VPA 投与によりニューロンへの分化能を有することを明らかにした。

3) 胸髄挫滅損傷ラットの損傷部位に EGFP ラット由来 OS 細胞を移植すると、軸索線維に沿って生着した。移植細胞は免疫組織染色よりオリゴデンドロサイトのマーカー(RIP、Olig2、MBP)を示した。またオリゴデンドロサイトの細胞形態を呈した。一方移植細胞はニューロンとアストロサイトのマーカーは示さなかった。

OS 細胞を移植した後肢伏在神経切断モデルラットにおいて、コラーゲンのみの再生線維は脆弱で、50%の個体でのみ確認された。一方コラーゲン+OSC の再生線維は肉眼的に明瞭で、すべての個体で認めた。再生軸索面積の断面積は有意に OSC 移植群で高かった。OS 細胞は末梢神経軸索線維の周囲に生着し、シユワン細胞マーカー(Krox20、Sox10、P0)を示した。

OS 細胞は遺伝子工学的手法を用いずに正常組織から作成される為、腫瘍化の可能性は低い。またオリゴデンドロサイト/シュワン前駆細胞であり、細胞工学的手法を用いずに自律的分化誘導が可能である。ニューロンへの分化に関しても、低分子化合物によって誘導が可能である。ヒト嗅粘膜は鼻腔より内視鏡下に採取され、嗅覚とともに再生されるため、自家ヒト OS 細胞の樹立にも実用性がある。OS 細胞は中枢・末梢神経再生医療における有用な細胞ソースとして期待される。

#### 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 7 件)

- 1: Ohnishi Y, Yuguchi T, Iwatsuki K, Yoshimine T. Entrapment of the fifth lumbar spinal nerve by advanced osteophytic changes of the lumbosacral zygapophyseal joint: a case report. Asian Spine J. 2012 Dec;6(4):291-3.
- 2: Fujimoto Y, Ohnishi Y, Wakayama A, Yoshimine T. Transient total mesencephalic locked-in syndrome after bilateral ptosis due to basilar artery thrombosis. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2012 Nov;21(8):909. e7-8.
- 3: Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa K, Nakai Y, Ishihara M, Yoshimine T. Disuse muscle atrophy exacerbates motor neuronal degeneration caudal to the site of spinal cord injury. Neuroreport. 2012 Feb 15;23(3):157-61.
- 4: Ishihara M, Mochizuki-Oda N, Iwatsuki K, Kishima H, Iwamoto Y, Ohnishi Y,

- Umegaki M, Yoshimine T. A new three-dimensional axonal outgrowth assay for central nervous system regeneration. J Neurosci Methods. 2011 Jun 15;198(2):181-6.
- 5: Iwatsuki K, Yoshimine T, Umegaki M, Yoshimura K, Ohnishi Y, Ishihara M, Moriwaki T. Percutaneous diode laser irradiation for lumbar discogenic pain: a clinical study. Photomed Laser Surg. 2011 Jul;29(7):459-63.
  - 6: Yoshimura K, Iwatsuki K, Ishihara M, Ohnishi Y, Umegaki M, Yoshimine T. Bow hunter's stroke due to instability at the uncovertebral C3/4 joint. Eur Spine J. 2011 Jul;20 Suppl 2:S266-70.
  - 7: Ohnishi Y, Iwatsuki K, Morii E, Kobayashi M, Hori Y, Moriwaki T, Ishihara M, Yoshimura K, Umegaki M, Yoshimine T. Histopathological study of spinal meningioma originating from the arachnoid villi. Brain Tumor Pathol. 2011 Feb;28(1):77-81.

[学会発表] (計 2 件)

大西諭一郎、慢性期脊髄損傷に対する嗅粘膜移植術、日本再生医療学会、2012 年 6 月 12 日 パシフィコ横浜

大西諭一郎、オルファクトリースフィア(OS)細胞のグリア細胞とニューロンへの分化の検討、日本再生医療学会、2013 年 3 月 22 日 パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

大西諭一郎、岩月幸一、吉峰俊樹、脊髄損傷慢性期に対する嗅粘膜移植法、中外医学社、Annual Review 神経 2011

[産業財産権]

○出願状況 (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：特許

番号：2012-206702

出願年月日：2012年09月20日

国内外の別：国内

○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 大西 諭一郎

(Yu-ichiro Ohnishi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00533811

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし