

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860966

研究課題名(和文)末梢神経障害回復におけるネスチン陽性毛包幹細胞の役割及び新しい治療法の確立

研究課題名(英文)The role of nestin-expressing hair follicle stem cells in the recovery of peripheral nerve injury and establishment of new treatment

研究代表者

三井 純雪(Mii, Sumiyuki)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80337948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経系幹細胞マーカーのネスチンを発現する細胞は、毛包の神経終末、および末梢神経に広く存在する。末梢神経を組織培養すると、ネスチン陽性細胞は増殖し、これらは神経軸索マーカーと、神経誘導因子を発現していた。この事象はマウスの末梢神経切断モデルでも確認された。末梢神経のネスチン陽性細胞は、神経障害時に神経細胞に分化し、中枢から延長する軸索の誘導を含めた末梢神経障害の回復に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cell marker nestin-expressing hair follicle stem cells can differentiate into neurons, Schwann cells, and other cell types. In the present study, nestin-expressing cells were located in the terminal end of hair follicle sensory nerve and peripheral nerves. Nestin-expressing cells proliferated in the injured nerves, the cells expressed neural axon marker and axon guidance factor. This phenomenon was observed not only in culture but in vivo study. Nestin-expressing cells appeared to play a major role in the recovery of peripheral nerve injury.

研究分野：末梢神経障害、幹細胞

キーワード：末梢神経障害 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、神経系幹細胞のマーカーである class VI 中間径フィラメント・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 (ネスチン-GFP マウス) を作成し、毛包バルジ領域に存在する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ともに、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、平滑筋細胞等に分化することを明らかにした (Amoh, Y. et al. *PNAS* 102, p.5530-4, 2005)。さらに、毛包から幹細胞を分離培養し、坐骨神経および脊髄の障害部位に細胞移植すると、移植した細胞がグリア細胞へ分化、中枢側からの神経軸索を誘導し、移植された個体の運動機能を回復することができた (Amoh, Y. et al. *PNAS* 102, p.17734-8, 2005, Y. Amoh et al. *Cell Cycle* 7, p. 1865-9 2008, Liu, F. et al. *Cell Cycle* 10, 830-9, 2011)。このように、毛包に存在するネスチン陽性の毛包幹細胞は神経機能の回復に大きな役割を持つことが明らかになった。

ネスチン陽性毛包幹細胞は末梢神経終末部に存在しており、神経付き毛包をスポンジゲル上で組織培養すると、ネスチン陽性毛包幹細胞から神経切断面にむけて突起を延長し、細胞が移動する。移動した細胞は末梢神経切断面で増殖、神経軸索マーカーの $\beta 3$ -tubulin 陽性神経細胞と GFAP 陽性グリア細胞に分化し、それらで構成される索状構造物を形成、神経切断面から延長する。また、切断面の反対方向に三叉神経、および坐骨神経を置くと、ネスチン陽性細胞は神経切断面に移動、増殖し、両神経は融合する。

さらに、マウス髭を有するスキNFLラップを起こし、各毛包を支配する三叉神経を切断後、スキNFLラップを戻し、1-2 週間の後に毛包-三叉神経-脳までを摘出、解析

したところ、ネスチン陽性の紡錘形細胞が神経切断部位より遠位の神経及び神経切断面で増殖しており、この細胞が *in vivo* においても末梢神経障害からの回復過程に何らかの役割を持っていることがわかった。

末梢神経障害において、障害を受けた遠位の神経軸索はワーラー変性を起こし消失し、シュワン細胞が損傷部位に増殖、その後神経節及び脊髄に存在する神経細胞体が軸索を標的の終末まで再延長して神経回復は完了すると考えられている。すなわち、神経回復の過程で、軸索の足場となるシュワン細胞は非常に重要な存在であるが、神経障害遠位部において神経細胞は役割を持っていない。しかし、幹細胞の特性を持ち神経細胞に分化する可能性のあるネスチン陽性細胞が損傷遠位の神経に増殖することは、末梢神経障害の回復に寄与していると考えられる。

2. 研究の目的

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。本研究期間内に、毛包に存在するネスチン陽性の毛包幹細胞が、創傷治癒機転で果たす役割を詳細に解明し、臨床応用に向け、毛包幹細胞による損傷した末梢神経機能回復能力を有する新しい損傷末梢神経と損傷皮膚の再生医療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

従来のディッシュを用いた培養法では平面の 2 次元培養であるが、スポンジゲル上での組織培養は 3 次元培養であり、より生体に近い条件で細胞の動態を観察することができる。さらにスポンジゲルは細胞の接着に良好な足場を提供し、神経細胞の分化

を誘導することができる。また、毛包幹細胞の組織培養に洞毛を用いることは以下のメリットがある。洞毛は厚いコラーゲンカプセルで覆われ、毛包幹細胞の存在する毛包上皮は静脈洞の中に保護される。事実、コラーゲンカプセルで保護された毛包は約2週間、組織培養下でも発毛を継続することができ (Li L, et al. **PNAS** 89: 8764-8, 1992)、毛包という組織が正常に保存され、細胞が生体内と同じ態度を示していることが示唆される。

神経細胞体を含んだ神経節と末梢組織幹細胞を含んだ神経付き毛包をスポンジゲル上で共培養し、末梢神経障害から回復までを再現した *in vitro* 実験系列を開発する。軸索が神経細胞体から延長する *in vitro* 実験系は多数の報告 (Wang. L. et al. *Nat Protoc.* 26; 7: 351-63, 2012) があり、それらの報告をベースに、軸索延長の標的器官を共培養した実験系を確立し、それにより神経細胞体より伸びる軸索の動態及び、末梢組織に存在するネスチン陽性の幹細胞の動態を観察する。これらの細胞の *in vitro*, *in vivo* における p75^{NTR}、TrkA, TrkB, TrkC などのニューロトロフィン受容体や、BDNF、NGF、NT-3、NT-4 などのニューロトロフィンの発現を比較検討する。神経付き毛包と神経を共培養するとそれぞれが融合し、1本の索状物となる。この索状物は神経であった部分であり、本来なら軸索はワーラー変性で消失し神経伝導機能は有さないはずである。しかし、我々は、この神経付き毛包と神経が融合した索状物に、軸索マーカーであるβ3-tubulin 陽性の細胞が増殖、充満することを見出した。再延長する軸索の先端には成長円錐があり、F-actin が細胞骨格として発現する。よって、このβ3-tubulin 陽性の細胞群が軸索の成長円錐を有するのかを、F-actin に特異的に結合する phalloidin を用いて確認する。

さらに、神経付き毛包 + 神経、神経付き毛包 + 神経節の組織培養で得られた、それぞれが融合した検体が神経伝導機能を有するかを検討する。北里大学生理学教室・河原克雅教授の協力の下で、活動電位を計測する。

毛包幹細胞から分化した神経細胞が、神経細胞体から延長する軸索を誘導するかを検討する。神経付き毛包 + 神経節の組織培養を行い、軸索が毛包の方へ誘導されるかを、条件を変えて比較検討する。神経付き毛包の組織培養を行い、軸索誘導因子である netrin や semaphorin の発現の有無を免疫化学法で確認する。

in vivo の末梢神経障害モデルを作成し、神経回復を段階を追って解析する。毛包を含むスキNFLラップを作成、支配神経を切断し、毛包幹細胞の動態、及びニューロトロフィン受容体やニューロトロフィンの発現を蛍光免疫法で比較検討する。

4. 研究成果

ネスチン陽性細胞は毛包バルジ領域だけではなく、末梢神経そのものにも存在することがわかった。ネスチン陽性細胞は末梢神経線維周囲に存在し、3-tubulin 陰性 p75^{NTR} 陽性であった。三叉神経、坐骨神経をスポンジゲル上で三次元培養すると、ネスチン陽性細胞は3日後に3-tubulin 陽性になり、融解するシュワン細胞のミエリン鞘の隙間を縫うように増殖、神経切断面から外方に突起を伸ばしながら増殖した。また、神経切断面には GFAP 陽性ネスチン陽性グリア細胞も増殖したが、グリア細胞の分化に従ってネスチン発現は消失した。これらネスチン陽性 3-tubulin 陽性細胞は、その先端に phalloidin に染色される F-actin を認め、軸索の成長円錐と考えられた。末梢神経を 35 mm dish 底面に固定し組織培養すると紡錘形のネスチン陽性細胞

が増殖するが、これらは N-type voltage-gated calcium channels、および syntaxin が陽性であり、ネスチン陽性 3-tubulin 陽性の錘形細胞は細胞間でシナプスを形成している可能性があった。

次にこれらの細胞が神経伝導能をもって
いるか、パッチクランプ法で電位を計測した。結果では電位は計測されず、現段階では、これらの細胞は神経細胞本来の役割である神経伝導能はもっていないと考えられる。

しかしながら、これらの細胞は軸索誘導因子 Netrin が強く陽性であった。このことから中枢から新生延長する軸索を誘導する役割ももつことが推察された。

さらに、神経節にも恒常的にネスチンを発現している細胞が存在していることがわかった。それは神経細胞体周囲に存在する衛星細胞であるが、この役割は不明であり、今後の課題である。

次に、ネスチン-GFP マウスの三叉神経を切断 (*in vivo*) したところ、1週間後に

3-tubulin 陽性のネスチン陽性細胞が神経障害部位と障害神経遠位部に増殖した。

この 3-tubulin 陽性ネスチン陽性細胞は Netrin も陽性であり、*in vitro* の結果と一致した。さらに、坐骨神経を切断、縫合し運動機能の回復した5週間後には、坐骨神経の神経損傷修復部位にネスチン陽性細胞が増加していた。一方、ネスチン陽性細胞が中枢神経である脊髄中心管周囲や脳に存在していることは既知であるが、興味深いことに、脳、脊髄の中枢神経内のネスチン陽性細胞は、末梢神経障害時は増殖しないことがわかった。このことは、末梢神経障害は回復するが、中枢神経障害は回復しない臨床の事象と一致するものと考えられた。

このように、脊髄から末梢組織である毛包までの末梢神経にひろく存在するネスチン陽性細胞が *in vitro* のみならず *in vivo*

においても神経細胞に分化し、末梢神経障害機能の回復に寄与している可能性が示唆された。毛包、末梢神経に存在するネスチン陽性で幹細胞の特性をもつ細胞群が、末梢神経障害時において果たす役割について、以下のように考えた。末梢神経障害時に障害を起こした神経の遠位側に増殖したネスチン陽性細胞は、一部はグリア細胞に分化し中枢側より伸びる軸索の足場となり、一方、神経細胞に分化した細胞は netrin などの誘導物質を産生し、軸索が正確に障害された末梢の標的まで到達することを支持する役割を持つ。

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 4 件)

Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, Saito N, Katsuoka K, Hoffman RM. Nestin-Expressing Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Promote Whisker Sensory-Nerve Growth in Long-Term 3D-Gelfoam® Histoculture. *Methods Mol Biol.* 査読無 1453, 2016: 39-47. doi: 10.1007/978-1-4939-3786-8_6.

Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. Comparison of nestin-expressing multipotent stem cells in the tongue fungiform papilla and vibrissa hair follicle. *J Cell Biochem.* 査読有 115, 2014: 1070-1076. doi: 10.1002/jcb.24696.

Mii S, Uehara F, Yano S, Tran B, Miwa S, Hiroshima Y, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. Nestin-Expressing Stem Cells Promote Nerve Growth in Long-Term 3-Dimensional Gelfoam®-Supported Histoculture. *PLoS One.* 査読有 8, 2013: e67153. doi: 10.1371/journal.pone.0067153.

Mii S, Duong J, Tome Y, Uchugonova A, Liu F, Amoh Y, Saito N, Katsuoka K, Hoffman RM. The role of hair follicle nestin-expressing stem cells during whisker sensory-nerve growth in long-term 3D culture. *J Cell Biochem.*

査読有 114, 2013: 1674-84. doi:
10.1002/jcb.24509.

三井 純雪 (Mii, Sumiyuki)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号: 80337948

〔学会発表〕(計 4 件)

三井純雪、末梢神経線維のネスチン陽性細胞は神経障害修復過程で神経細胞に分化する、第27回末梢神経学会学術集会、2016年8月26日-8月27日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

Sumiyuki Mii, The nestin expressing cells in the hair follicle innervated injured nerve differentiate into neurons in vitro and vivo, 9th World Congress for Hair Research, 2015年11月18日-2015年11月21日、マイアミ(アメリカ合衆国)

三井純雪、末梢神経にあるネスチン陽性細胞は神経障害時に神経細胞に分化する、第30回日本脊髄外科学会、2015年6月25日-6月26日、北海道立道民活動センターかでの(北海道札幌市中央区)

Sumiyuki Mii, The Role of Nestin-Expressing Cells During Whisker Sensory-Nerves Extension in Long-Term 3D Culture and In Vivo, The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2014年12月12日-12月14日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

(2)研究分担者

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

天羽 康之 (AMOH, Yasuyuki)
北里大学・医学部・教授

河原 克雅 (KAWAHARA, Katsumasa)
北里大学・医学部・教授

Robert M. Hoffman
University of California San Diego,
Professor, AntiCancer CEO

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者