

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19500275
 研究課題名（和文） 嗅粘膜由来幹細胞とその嗅神経グリア分化誘導および脊髄損傷治療モデルの確立
 研究課題名（英文） Olfactory ensheathing cell differentiation for olfactory nervous glia, and establishment of the spinal cord injury treatment model

研究代表者
 松崎 有未（Matsuzaki Yumi）
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：50338183

研究成果の概要：

Olfactory ensheathing cell (OEC)は、脊髄損傷の移植療法として注目されているが、基礎的研究は不十分である。我々は OEC の基礎的性質を明らかにするために本研究を行った。その結果、OEC の治療効果は軸策伸展能の単独効果ではないこと、EC が神経堤由来である可能性が高いこと、嗅粘膜由来 sphere が OEC の供給源になりうることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅粘膜、OEC、神経堤

1. 研究開始当初の背景

Olfactory ensheathing cell (OEC)は、嗅板から発生するとされ、脊髄損傷の移植療法として注目されているが、その基礎的研究は不

十分である。OEC の発生起源の探索を初めとする基礎的性質を明らかにし、脊髄損傷を初めとする難治疾患に対する細胞源として有用であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、少量の嗅粘膜から神経幹細胞を樹立することで、*ex vivo*で細胞を増やして細胞ソースとする方法の確立をめざすことが主眼であり、移植する細胞としては、神経幹細胞だけではなく、神経、末梢グリア、OECなどへ分化誘導を行ったものについて評価検討した。

3. 研究の方法

1) OECの軸策伸展能力とその治療効果

ラット嗅粘膜から精製したOECを用いて限界希釈培養法でクローン群を作成し、神経細胞の軸策伸展を促す能力を調べた。軸策伸展能の高いクローンと低いクローンを選択し、ラット胸髄圧挫損傷モデルに移植した。移植後8週間は運動機能を評価し、その後免疫染色で組織を評価した。

2) OEC発生源の探求

神経堤由来の細胞がGFPを発現するWnt1-Cre/loxP EGFP transgenic mouseの嗅覚系を観察し、OECの発生源を探索した。

3) OECの*in vitro*培養増幅法の検討

嗅粘膜細胞を*in vitro*培養後、その未分化性、分化能などの性状を詳細に解析することにより、OECの*ex vivo*増幅方法の検討およびその細胞治療源としての可能性を検討した。

4. 研究成果

1) ラット嗅粘膜から精製したOECクローンを脊髄損傷部位に注入したところ、いずれも注入部付近に生着していた。軸策伸展能の高いクローンを移植した群は、培養液のみを注入した対照群より有意に高い運動機能回復を認めたが、伸展能の低いクローンを移植した群との有意差はみられず、OECの治療効果は軸策伸展能の単独効果ではないことが示唆された。

2) 神経堤由来の細胞がGFPを発現するWnt1-Cre/loxP EGFP transgenic mouseの嗅覚系を観察して、OECが存在する領域にGFPの発現を認めた。さらに免疫染色でこれらGFP陽性細胞がOECマーカーを発現していることから、OECが神経堤由来である可能性が高いことが示された。

3) 嗅粘膜細胞をneurosphere法で培養すると、継代可能なsphereが形成された。P0-CreおよびWnt1-Cre/loxP EGFP transgenic mouseの嗅粘膜から培養されたsphereはGFP陽性であり、RT-PCRで神経堤由来組織に認められるmRNAの発現が確認できたことから、sphere形成細胞が神経堤由来の細胞群で構成されることが判明した。このsphereを血清培地で培養すると、OECマーカーを発現する細胞の分化が認められ、嗅粘膜由来sphereがOECの供給源になりうることが示された。

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16件)

- Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, Iwakura Y, Suda T, Matsuo K. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem.* 2009 Mar 19. 査読有
- Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *BBRC* Feb 20; 379(4): 1114-1119, 2009. 査読有
- Funabiki T, Namiki J, Suzuki S, Matsuzaki Y, Aikawa N. Neovascularization promoted by mononuclear cell transplantation after transient cerebral ischemia in mice. *Inflammation and Regeneration.* 29(1): 66-72, 2009. 査読有
- Mabuchi Y, Morikawa S, Suzuki S, Sunabori T, Okano H, and Matsuzaki Y. Prospective isolation and identification of human mesenchymal

- stem cells by flow cytometry. *Inflammation and Regeneration*. 29(1): 3-78, 2009. 査読有
5. Ogawa D, Okada Y, Nakamura M, Kanemura Y, Okano HJ, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Ito M, Ikeda E, Tamiya T, Nagao S, Okano H. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: Properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res*. Feb 1;87(2):307-317, 2009. 査読有
6. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*. Apr 15; 22(8):986-991, 2008. 査読有
7. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. Apr 10; 2(4): 392-403, 2008. 査読有
8. Komori K, Fuchimoto Y, Morikawa Y, Obara H, Kawachi S, Tanabe M, Hoshino K, Shimazu M, Matsuzaki Y, Kitajima M. The role of graft and host accommodation in a hamster-to-rat cardiac transplantation model. *Transplantation*. Jan 15; 85(1):112-117, 2008. 査読有
9. Sunabori T., Tokunaga A., Nagai T., Sawamoto K., Okabe M., Miyawaki A., Matsuzaki Y., Miyata T., Okano H. Stage/Cell cycle phase specific nestin gene expression coordinated with the morphological alteration of embryonic cortical neural progenitor cells. *J. Cell Sci*. Apr 15; 121(Pt 8):1204-1212, 2008. 査読有
10. Ohta S., Ueda Y., Yaguchi M., Matsuzaki Y., Nakamura M., Toyama Y., Tanioka N., Tamaoki N., Nomura T., Okano H., Kawakami Y., Toda M.: Isolation and characterization of dendritic cells from common marmosets for preclinical studies on cell therapy. *Immunology*. 123(4): 566-574, 2008. 査読有
11. Ono M., Maruyama T., Masuda H., Kajitani T., Nagashima T., Arase Toru., Ito M., Ohta K., Uchida H., Asada H., Yoshimura Y., Okano H., Matsuzaki Y. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20; 104(47):18700-18705, 2007. 査読有
12. Hattori Y, Ohta S, Hamada K, Yamada-Okabe H, Kanemura Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M. Identification of a neuron-specific human gene, KIAA1110, that is a guanine nucleotide exchange factor for ARF1. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 28; 364(4):737-742, 2007. 査読有

13. Marumo T., Hishikawa K., Matsuzaki Y., Imai N., Takase O., Shimosawa T., Okano H., Fujita T.: Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents decrease in adult stem-like cells in kidney after ureteral obstruction. Eur. J. Pharmacol. Nov 14; 573(1-3):216-220, 2007. 査読有
14. Fujita J, Mori M, Kawada H, Ieda Y, Tsuma M, Matsuzaki Y, Kawaguchi H, Yagi T, Yuasa S, Endo J, Hotta T, Ogawa S, Okano H, Yozu R, Ando K, Fukuda K. Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor after Myocardial Infarction Enhances the Recruitment of Hematopoietic Stem Cell-Derived Myofibroblasts and Contributes to Cardiac Repair. Stem Cells. Nov; 25(11):2750-2759, 2007. 査読有
15. Imai N, Hishikawa K, Marumo T, Hirahashi J, Inowa T, Matsuzaki Y, Okano H, Kitamura T, Salant D, Fujita T. Inhibition of Histone Deacetylase Activates Side Population Cells in Kidney and Partially Reverses Chronic Renal Injury. Stem Cells Oct; 25(10):2469-2475, 2007. 査読有
16. Koide Y, Morikawa S, Mabuchi Y, Muguruma Y, Hiratsu E, Hasegawa K, Kobayashi M, Ando K, Kinjo K, Okano H, Matsuzaki Y. Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow. Stem Cells. May; 25(5):1213-1221, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 松崎有未・福田和正、ヒト胃癌幹細胞株における Side population (SP)細胞、第7回日本再生医療学会、癌幹細胞シンポジウム、名古屋、平成20年3月13日、名古屋国際会議場
2. 松崎有未、細胞表面抗原によるヒト間葉系幹細胞の分離とその性状解析、特定領域研究～幹細胞の可塑性と未分化性維持機構～成果公開シンポジウム、平成20年2月27日、学術総合センター
3. 松崎有未、フローサイトメトリーを用いたヒト間葉系幹細胞分離技術、慶應義塾先端科学技術シンポジウム、東京、平成20年2月4日、慶應義塾大学三田キャンパス西校舎ホール
4. Yumi Matsuzaki, Hideyuki Okano, Prospective identification of murine and human mesenchymal stem cells、慶應義塾大学21世紀COEシンポジウム、平成19年度11月29日、慶應義塾大学信濃町キャンパス
5. 松崎有未、ヒトMSCの新規分離方法、第10回日本組織工学会シンポジウム、平成19年11月9日、大手町サンケイプラザ
6. 松崎有未、間葉系幹細胞研究の展望、第28回日本炎症再生医学会、間葉系幹細胞ワークショップ、平成19年8月2日、京王プラザホテル
7. 松崎有未、ヒト胃癌細胞株におけるSP細胞の機能、第17回日本フローサイトメトリー学会学術集会、癌幹細胞シンポジウム、平成19年7月5日、サンルートプラザ東京
8. 松崎有未、ソーティングの原理とSP細胞分離、第17回日本フローサイトメトリー学会学術集会、平成19年7月5日、

サンルートプラザ東京

9. 松崎有未、間葉系幹細胞の分離・同定と発生系譜に関する考察、第5回幹細胞シンポジウム、平19年5月18日、兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

1. 特願 2007-231298 (国内)
発明の名称: ヒト間葉系幹細胞濃縮方法
発明者: 松崎有未、馬淵洋、森川暁、岡野栄之
特許出願人: 学校法人慶應義塾
平成19年9月6日出願

取得状況(計0件)

〔その他〕 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 有未(Matsuzaki Yumi)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 50338183

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし