様式Ｃ－１９

# 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年６月２０日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2011
課題番号：22791727

研究課題名（和文）医療応用に向けた移植脂肪由来幹細胞の生体内動態と末梢神経再生促進メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of peripheral nerve regeneration-promoting mechanism and in vivo kinetics of transplanted adipose-derived stem cells for clinical applications

研究代表者
素輪　善弘（SOWA YOSHIHIRO）
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：86468264

研究成果の概要（和文）：近年脂肪組織内に多能性を有する体性幹細胞（脂肪組織由来幹細胞：adipose tissue-derived stem cell、以下 ADSC）が存在することが明らかとなり、再生医療への応用が期待されている。末梢神経損傷モデルにおける ADSC の移植実験においても再生促進効果が報告されているが、その機序については不明な点が多かった。まずわれわれは ADSC が産生・分泌する神経栄養因子が末梢神経再生を促進させることを明らかにした。またこれらの効果は ADSC の採取部位・年齢に関係なく維持されていることを確認した。これらの結果は幅広い年齢層においてその採取部位を問うことなく ADSC を医療に応用し得る可能性を示していると考えられた。移植 ADSC の生体内動態についてはリポーター蛍光蛋白質で経時的にシュワン細胞への分化をモニタリングした結果、移植後 3 週間の移植細胞の生存が確認されたものの、シュワン細胞への分化は確認できなかった。このことから、移植した ADSC が細胞環境(niche)によってシュワン細胞に分化するというよりは、神経再生関連因子を産生・放出する molecular factory として機能することで末梢神経再生に寄与していることが示唆された。神経分化前後の ADSC について、生体内外の両者で末梢神経再生機能を比較したが、移植前にシュワン細胞に分化させることへの明らかな優位性は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：Adipose-derived stem cells (ADSCs) are attracting increased attention as a novel source in regenerative medicine. Transplantation of ADSCs promotes functional recovery in animal models of peripheral nerve injury, but the mechanism of enhanced nerve regeneration remains to be elucidated. In this study, we revealed that ADSCs promote peripheral nerve regeneration partly through paracrine secretion of trophic factors and regardless of donor age or anatomic site of origin. These results suggested that donor age and the anatomic site of origin don’t influence the behavior of ADSCs and allow us safe and effective clinical application of ADSCs in in a wide age range. As a result of the monitoring of differentiation into Schwann cells with time with the reporter fluorescent protein for kinetics of ADSC, the survival of transplanted cells 3 weeks after transplantation was confirmed, although differentiation into Schwann cells was not confirmed. These results indicated that ADSC contributes to peripheral nerve regeneration by acting as a molecular factory producing and releasing nerve regeneration-related factors rather than by differentiating Schwann cells in a particular kind of cellular environment (niche) We also demonstrated that both differentiated ADSC(dADSC) and undifferentiated ADSC (uADSC) exhibited comparable ability to support peripheral nerve regeneration, suggesting that uADSC can be an alternative source for autologous cell therapy against peripheral nerve injury.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1690,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学
キーワード：脂肪組織由来幹細胞　末梢神経　再生医療　体性幹細胞　シュワン細胞　神経分化

## 1.　研究開始当初の背景

(1)末梢神経再生は、形成外科領域においても、陳旧性顔面神経麻痺、外傷や悪性腫瘍切除後の四肢の神経再生、良好な知覚皮弁の作成などにおいて重要であるが、元来再生能力に乏しい組織のため、効果的に再生を促す治療法の確立が望まれている。従来よりゴールドスタンダードである自家神経移植はドナー・サイトの犠牲という問題があり、また自家移植を凌駕するほどの人工神経の作製は現在なお困難であることから、様々なアプローチで細胞移植による解決が試みられている。

(2)近年、脂肪組織内に多能性を有する体性幹細胞（脂肪組織由来幹細胞：adipose tissue-derived stem cell、以下 ADSC）が存在することが明らかになり、骨髄由来間葉系幹細胞と比較しても高い採取効率や低侵襲に獲得できるという利点から再生医療への応用が期待されている。

(3)末梢神経損傷モデルにおける ADSC の移植実験においても再生促進効果が報告されているが、その機序については不明な点が多い。ADSC は胚葉を超えて神経系細胞に分化する能力をもつとされるが、一方で創傷治癒に関連する多くの因子を放出していることも報告されている。

(4)最近では分化誘導を行わない undifferentiated ADSC (uADSC)も同様の能力を持つことが指摘され、神経分化誘導の必要性について議論となっている。

## ２．研究の目的

本研究において、ADSC の末梢神経再生メカニズムを解明することで、自家組織や人工神経を凌駕する有効なハイブリッド型神経の作成・臨床応用への発展を将来的に目指すものである。

(1)末梢神経に対する栄養因子産生・分泌作用および Schwann 細胞への分化能に着目し、その有効性を検証するとともにさらに臨床応用の可能性も視野に入れ、部位や年齢によるその能力の差異についても合わせて検証すること。

(2)脂肪由来幹細胞の Schwann 細胞への移植前分化誘導の有用性についての検討：このため、培養下でのマウス ADSC よりの Schwann

細胞への分化誘(differentiated ADSC: dADSC)の検討を行うとともに、有効かつ生理的なADSCの細胞治療の利用法について検討を行うこと。

(3)Schwann 細胞特異的な Cre-double reporter トランスジェニックマウスを用いて脂肪由来幹細胞の生体内移植後の動態および運命(生存・分化など)について追跡すること。

(4)以上の結果を踏まえて、in Vivoにおける、uADSCおよびdADSCの細胞移植による末梢神経再生効果について明らかにし、臨床応用に向けて ADSC の適切な利用法について検討を行うことである。

３．研究の方法

(1)本実験において用いた細胞はすべて初代培養のものとした。ADSCはマウスの鼠径部脂肪組織より Zuk PA (Tissue Eng,2001)らの方法で、Schwann細胞(以下SC)は同系統マウス坐骨神経より Wei (Cell Tissue Res,2009)らの方法で、またDRGnは同系統マウスの脊椎後根神経節より Sacha A (Nature Protocols,2007) らの方法で分散培養した。

(2)ADSC が分泌する液性因子が末梢神経再生を促進させるかを明らかにするために、培養SCの生存・増殖及び培養後根神経節細胞の生存・突起伸長への効果とそれらに関わると考えられる候補因子の発現を培養下に検討した。陽性コントロール細胞には3T3線維芽細胞、SCおよび星状膠細胞を用いた。また臨床応用に向けて、採取部位・年齢によってADSCの細胞特性及び由来液性因子の効果に違いがないかについても合わせて検証した。

(3)ADSCのSCへの分化能の分子生物学的確証について検討を行うため, dADSCとSCのそれぞれの細胞について免疫組織学的染色とRT-PCR を用いた遺伝子発現プロファイリングによる比較検討を行った。

(4)培養下での軸索伸長作用についての機能比較：uADSC、dADSC、SC (比較対照群)の培養上清を採取し、それぞれの後根神経節細胞に対する神経突起伸長促進効果の比較検討を行った。またそれぞれの群における神経保護因子(BDNF、NGF、VEGF)のmRNA発現量と培養上清中への蛋白放出量を測定し比較をおこなった。

(5)移植 ADSC の追跡及び生体内での SC への分化を２種類のリポーター蛍光蛋白質にて経時的にモニタリングすることが可能な遺伝子改変マウス (GFAP-Cre double Reporter、P0-Cre double reporter)より ADSC を採取し、坐骨神経欠損モデルへの移植実験を行い、移植ADSCが生体内でSCとして機能するか、SCへの分化と神経再生促進効果に相関があるかについて検討を行う。野生型マウスの坐骨神経幹に gap を作成した後、Cre double Reporter 由来 ADSC をゼラチンチューブに播種させたものを用いる。術後異なる期間をおいて、RFP及びGFPを指標にして移植ADSCの分布・SCへの分化・生着を組織学的に評価する。

(6)坐骨神経欠損モデルにおける uADSC、dADSC、SC(比較対照群) の末梢神経再生促進効果の検討:ADSC及びADSC由来SCが移植後にどのような動態を示し、神経再生にどのような影響を与えるかを、マウス坐骨神経欠損モデルを用いて検討する。このとき、uADSC、dADSC、シュワン細胞(SC：比較対照群)の３

種類を使用する。同時に、Sham マウスをコントロールに、神経再生促進効果を組織学的検索(架橋再生組織面積、axon 再生、髄鞘形成)、行動学的検索（Walking track analysi s），坐骨神経機能評価法(SFI)にて評価し、ADSC の SC への分化と再生促進効果とに相関性がみられるかを検討する。

４．研究成果

(1)ADSC の採取部位・年齢の細胞特性への影響についてはほぼ差がなく、すべての ADSC 群で均一な特性を維持していることがわかった。また、SC の生存・増殖または後根神経節細胞の生存・突起伸長を促す高い能力を有することが示され、実際にこれらの作用に関与すると考えられる候補分子の発現もみとめた。また、その中の数因子については SC や星状膠細胞より有意に高い発現がみられた。これらの点についても ADSC の採取部位・年齢に関係なく維持されており、幅広い年齢層においてその採取部位を問うことなく ADSC を医療に応用し得る可能性が示されたと考える。また今回、ADSC が末梢神経再生を促進させる液性因子を産生・分泌するという新知見を得たことで末梢神経損傷後の神経再生への新たな治療戦略を提唱し得ると考えられた。

(2)ADSC の SC への分化能の分子生物学的確証の検討については、シュワン分化誘導を行うことにより成熟シュワン細胞発現マーカー(P75NTR、s100・・の強発現が確認されたが、GFAP の発現はみられず、培養シュワン細胞に比較してはるかに発現が低かった。同様の結果が、遺伝子発現においても確認された。シュワン分化関連遺伝子(*Sox10, OCT-6, Crox20* )についても、シュワン分化誘導過程においてその発現の上昇は確認されなかった。

(3)培養下での軸索伸長作用についての機能比較では、uADSC 、dADSC はともに SC に匹敵する高い神経突起伸長促進能を示したが、両者の比較では dADSC の方がより高い効果を示す傾向がみられものの、その差は著明ではなかった。また、NGF と VEGF の発現・産生は dADSC で有意に高かったが、BDNF については差異を認めなかった。以上より、シュワン様細胞に分化誘導することで、ADSC における幾つかの神経栄養因子の発現の上昇がみられたが、神経突起伸長は両群ともに高い効果を示し、uADSC でも十分臨床応用が期待できることが示唆された。

(4)次にin vivoにおける組織学的、行動学的検討からも、uADSCによる高い神経再生効果が確認されたものの、それに対するdADSCの明らかな優位性は認められなかった。２種類のリポーター蛍光蛋白質で経時的にシュワン細胞への分化をモニタリングした結果、移植後3週間の移植細胞の生存が確認されたものの、シュワン細胞への分化は確認できなかった。このことから、移植したADSCが細胞環境(niche)によってシュワン細胞に分化するというよりは、神経再生関連因子を産生・放出するmolecular factoryとして機能することで末梢神経再生に寄与していることが示唆された。

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 5 件）

①**素輪善弘**、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、西野健一．脂肪組織由来幹細胞を用いた末梢神経再生にシュワン細胞への分化誘導は有用

か-in vitroにおける検討.日本形成外科学会誌 33 (2013)(査読有)

②Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. Stem Cells and Development 1852-1862 (2012) (査読有)

③素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、西野健一、伏木信次. 脂肪組織由来幹細胞の神経分化誘導は末梢神経再生治療に有用か-培養下での基礎的検討. Peripheral Nerve.2012; 23: 279-280 (2012) (査読無)

④素輪善弘.″Adipose -derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin(脂肪組織由来幹細胞は末梢神経再生を促進する因子を産生する：幹細胞採取年齢と部位による影響の検討.) 第809回学術集談会抄録 (2012) (査読有)

⑤素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、西野健一、伏木信次. 脂肪組織由来幹細胞培養上清による末梢神経再生効果と採取年齢・部位による差異の検討. Peripheral Nerve.2011; 22: 313-314 (2011) (査読無)

〔学会発表〕(計9件)

①素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、武田孝輔、西野健一、伏木信次. シュワン分化誘導は脂肪組織由来幹細胞分泌因子を用いた末梢神経再生に有用か-in vitroにおける検討.
第21回日本形成外科学会基礎学術集会.2012年10月4日(猪苗代)

②素輪善弘、井村哲也、沼尻敏明、西野健一、伏木信次.脂肪組織由来幹細胞の神経分化誘導は末梢神経再生治療に有用かー培養下での基礎的検討.第２３回日本末梢神経学会学術集会.2012年8月31日(福岡)

③素輪善弘、井村徹也、沼尻敏明、伏木信次、西野　健一神経分化誘導の有無による脂肪組織由来幹細胞の末梢神経再生促進能への影響第33回日本炎症・再生医学会2012年7月5日(福岡)

④素輪 善弘、井村 徹也、沼尻 敏明、伏木 信次、西野 健一.脂肪組織由来幹細胞液性因子を用いた末梢神経再生応用の可能性についての検討.日本形成外科学会基礎学術集会.2011年10月6日　(東京)

⑤素輪善弘、井村哲也、沼尻敏明、西野健一、伏木信次.脂肪組織由来幹細胞培養上清による末梢神経再生効果と採取年齢・部位による差異の検討. 第２２回日本末梢神経学会学術集会.2011年9月3日(沖縄)

⑥素輪 善弘、沼尻 敏明、西野 健一
形成外科領域における脂肪組織由来幹細胞液性因子を用いた再生医療の可能性　京滋創傷治癒研究会2011年7月21日(京都市)

⑦素輪 善弘、井村 徹也、沼尻 敏明、西野 健一、伏木 信次.In vitro evaluation of factors secreted by adipose-derived stem cells for peripheral nerve regeneration 日本神経病理学会総会2011年6月3日 (京都)

⑧素輪善弘、井村哲也、沼尻敏明、伏木信次、

西野健一．脂肪幹細胞による神経再生アプローチ．日本再生医療学会．2011 年 3 月 11 日（ 東京都）．

⑨**素輪善弘**、井村哲也、沼尻敏明、 伏木信次、 西野健一．脂肪組織由来幹細胞のシュワン細胞に対する生存及び増殖促進効果についての検討．第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会．横浜市．2010 年 9 月 16 日

６．研究組織

(1)研究代表者

素輪　善弘（SOWA TOSHIHIRO）

京都府立医科大学・医学研究科 ・助教

研究者番号：80468264

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　　）

研究者番号：