

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462215

研究課題名(和文) 新規自己組織由来オリゴデンドロサイト/シュワン前駆細胞による再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine by oligodendrocyte and schwann precursor cells

## 研究代表者

大西 諭一郎(Ohnishi, Yuichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00533811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘膜上皮に存在するHorizontal Basal cells (HBCs) は組織幹細胞であり、オルファクトリーニューロンの他、嗅粘膜を構成するボーマン嚢や支持細胞に分化する。申請者らはHBCがオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)マーカー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で、遺伝子工学的・細胞工学的手法を用いずに、HBC由来のOPCマーカーを発現する細胞集塊の作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The olfactory epithelial layer contains multipotent horizontal base cells(HBCs) that differentiate into olfactory sensory neurons. We have identified that HBCs express oligodendrocyte precursor cell (OPC) and astrocyte markers.

研究分野：脊椎脊髄

キーワード：嗅粘膜 神経幹細胞 オリゴデンドロサイト前駆細胞 GABAニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

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、オルファクトリーニューロンの他、嗅粘膜を構成するボーマン嚢や支持細胞に分化する。

申請者はこれまでに HBC がオリゴデンドロサイト前駆細胞である NG2 細胞マーカー (NG2、PDGFR、Olig2) 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で、遺伝子工学的・細胞工学的手法を用いずに、HBC 由来の NG2 細胞マーカーを発現する細胞集塊 (オルファクトリースフィア:OS) の作成に成功した。

もともと成体中枢神経系に広く存在する NG2 細胞は、オリゴデンドロサイトに分化することが確認されているが、シュワン細胞やニューロンへ分化しうることも示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、中枢・末梢神経再生医療においてオルファクトリースフィアの治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

移植された幹細胞は宿主環境に応じてその機能や分化運命を大きく変化させる。本研究では、安全で効果的な細胞移植治療の為に、中枢・末梢神経の病的環境モデルを作成し、OS 細胞のそれぞれの環境における生着 (生存)・分化 (運命) を明らかにする。また臨床応用へ向けヒト OS 細胞の樹立を目指す。最後にどのような外的シグナルが特定の分化を誘導するのか、その一端を明らかにする。

具体的には、脊髄損傷モデルラットにおける OS 細胞による機能回復の解析、末梢神経切断モデルラットにおける OS 細胞による機能回復の解析、OS 細胞のニューロンへの分化制御メカニズムの解明、ヒト OS 細

胞の樹立と解析を予定している。

## 3. 研究の方法

1) 脊髄損傷モデルラットにおける OS 細胞による機能回復の解析  
損傷脊髄ヘラット OS 細胞を移植し、その分化、軸索再生、ミエリン化および後肢運動機能を調べる。

2) 末梢神経切断モデルラットにおける OS 細胞による機能回復の解析  
ラット後肢末梢神経 (伏在神経) を切断し、5mm の間隙を作り、断端をシリコンチューブに、ラット OS 細胞とコラーゲンゲルとともに包埋する。

3) OS 細胞のニューロンへの分化制御メカニズムの解明  
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸 (VPA) による、*in vitro* と *in vivo* (側頭葉てんかんモデルラット) でラット OS 細胞のニューロンへの分化誘導を試みる。

4) ヒト OS 細胞の樹立と解析  
倫理委員会にて承認された臨床研究に則って、余剰検体のヒト嗅粘膜組織より、ヒト OS 細胞の樹立し、キャラクタライゼーションを行う。

## 4. 研究成果

1) ラット OS 細胞はオリゴデンドロサイトへ分化し、ラット損傷脊髄へ移植した際に下肢動機能の改善に働くことを明らかにした (Ohnishi et al. 2013)。

2) ラット OS 細胞をラット末梢神経切断モデルへ移植した際には、シュワン細胞へ分化し末梢神経軸索再生が改善することを明らかにした (Ohnishi et al.

2013)。

- 3) ラット OS 細胞はバルプロ酸によって GABA ニューロンへ分化誘導された。ラット OS 細胞をてんかんモデルラットの海馬へ移植しバルプロ酸を腹腔内投与した際には、ラット OS 細胞は GABA ニューロンへ分化誘導されることを明らかにした (Ohnishi et al. 2015a)。
- 4) ヒト嗅粘膜組織よりヒト OS 細胞の樹立に成功した。ヒト OS 細胞は、げっ歯類 OS 細胞と同様にオリゴデンドロサイト前駆細胞である NG2 細胞マーカーを発現していたが、興味深いことに、げっ歯類とは異なり、自律的にニューロンへ分化することが明らかとなった (Ohnishi et al. 2015b)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Ohnishi Y, Iwatsuki K, Ishihara M, Shikina T, Shinzawa K, Moriwaki T, Ninomiya K, Ohkawa T, Umegaki M, Kishima H, Yoshimine T. Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors. *Stem Cell Res.* 査読有 2015;15:23-9.
2. Ohnishi Y, Maruo T, Shinzawa K, Iwatsuki K, Moriwaki T, Oshino S, Kishima H, Yoshimine T. Olfactory sphere cells are a cell source for -aminobutyric acid-producing neurons. *J Neurosci Res.* 査読有 2015;93:1293-304.
3. Ohnishi Y, Iwatsuki K, Yoshimine T. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor by disuse muscle atrophy exacerbates the degeneration of alpha motor neurons in caudal regions remote from the spinal cord injury. *Neuroscience & Medicine* 査読有 2014;5:214-221.
4. Moriwaki T, Iwatsuki K, Mochizuki-Oda N, Ohnishi Y, Ishihara M, Umegaki M, Ninomiya K, Yoshimine T. Presence of Trans-Synaptic Neurons Derived from Olfactory Mucosa Transplanted After Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 査読有2014;39:1267-73.
5. Ishihara M, Oda N, Iwatsuki K, Kishima H, Ohnishi Y, Moriwaki T, Umegaki M, Yoshimine T. Primary olfactory mucosal cells promote axonal outgrowth in a three-dimensional assay. *J Neurosci Res.* 査読有 2014 Jul;92(7):847-55.
6. Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa K, Ishihara M, Moriwaki T, Umegaki M, Kishima H, Yoshimine T. Adult olfactory sphere cells are a source of oligodendrocyte and Schwann cell progenitors. *Stem Cell Res.* 査読有 2013;11:1178-1190.
7. Iwatsuki K, Yoshimine T, Sankai Y, Tajima F, Umegaki M, Ohnishi Y, Ishihara M, Ninomiya K, Moriwaki T. Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia. *J. Biomedical Science and Engineering* 査読有 2013;6:908-916.
8. Iwatsuki K, Yoshimine T, Sankai Y, Tajima F, Umegaki M, Ohnishi Y, Ishihara M, Ninomiya K, Moriwaki T, Oda N. Transplantation of Olfactory Mucosa as a Scaffold for Axonal Regeneration Following Spinal Cord Contusion in Rats. *Neuroscience & Medicine* 査読有2013;4: 112-116.

[学会発表](計 8 件)

1. 大西諭一郎 慢性期脊髄損傷に対する自己嗅粘膜移植術 第 67 回近畿脊髄外科研究会 2012 年 4 月 6 日 大阪
2. 大西諭一郎 オルファクトリースフィア細胞による中枢・末梢神経損傷治療の検討 第 28 回日本脊髄外科学会 2013 年 6 月 6 日 名古屋
3. Yu-ichiro Ohnishi THE STEM CELL PROPERTIES OF ADULT OLFACTORY HORIZONTAL BASAL CELLS Glia meeting

2013 2013/07/05 Berlin, Germany

4. 大西諭一郎 オルファクトリースフィア細胞による中枢・末梢神経損傷治療の検討 第 14 回日本分子脳神経外科学会 2013 年 10 月 18 日 横浜
5. 大西諭一郎 オルファクトリースフィア細胞による中枢・末梢神経損傷治療の検討 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日 京都
6. 大西諭一郎 オルファクトリースフィア細胞による中枢・末梢神経損傷治療の検討 第29回日本脊髄外科学会 2014 年6月13日 東京
7. Yu-ichiro Ohnishi INDUCTION OF GABAERGIC NEURON FROM ADULT RAT OLFACTORY SPHERE CELLS International Society For Stem Cell Research. 12<sup>th</sup> Annual Meeting 2014/06/19 Vancouver, Canada
8. 大西諭一郎 脊髄損傷への嗅粘膜移植術における再生軸索の画像診断 第 74 回日本脳神経外科学会 2015 年 10 月 16 日 札幌

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大西 諭一郎 (Ohnishi Yuichiro)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00533811

##### (2)研究分担者

吉峰 俊樹 (Yoshimine Toshiki)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：00201046

貴島 晴彦 (Kishima Haruhiko)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：10332743

新沢 康英 (Shinzawa Koei)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：00201046

岩月 幸一 (Iwatsuki Koichi)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80346204

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：