

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893035

研究課題名(和文)末梢神経損傷に対するiPS細胞由来Schwann細胞移植の効果

研究課題名(英文)Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells to neural crest stem cells

研究代表者

山内 かづ代(Yamauchi, Kazuyo)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30648069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷に対するシュワン細胞移植の効果が報告されiPSc由来神経堤幹細胞(NCSC)はシュワン細胞を作成するソースとして期待されている。ヒトiPScをRhoキナーゼ阻害薬添加medium,成長因子を含むKSR medium,神経系細胞培養液へ経時的に濃度を変え培養した。免疫化学染色及びフローサイトメトリーにおいてiPScはNCSC特有のp75,HNK-1陰性に対し,分化後の細胞では63%陽性であった。免疫不全マウスを用いた坐骨神経圧挫モデルを作成し分化させたNCSCを移植した。移植後短期の組織標本ではコントロールと比べ有意な差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have also shown that such sequelae affect neural stem cell and Schwann cell transplantation for nerves that have been damaged. Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) underwent monolayer culture on hiPSC maintenance medium on plastic dishes coated with Matrigel. Approximately 7 to 10 of these cells differentiated and were cultured further in Neural crest differentiation medium containing inhibitor. Markers of NCSCs; p75, Hnk1 were chosen as indicators of differentiation, while Sox2 was chosen as a marker for hiPSCs. After Immunocytochemistry and flow cytometry. It was found that the differentiated cells were negative for Sox2 and positive for p75 (65% ± 9%). Next, we performed that differentiated NCSCs transplanted to naked mouse sciatic nerve damage model. The specimen was not shown nerve degenerative findings.

研究分野：整形外科

キーワード：iPSC NCSC シュワン細胞 末梢神経損傷 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域において外傷等による末梢神経損傷は時に麻痺や知覚脱失・鈍麻などの重篤な後遺症を残し患者の activities of daily living や quality of life に多大な影響を及ぼす。過去の基礎研究では神経栄養因子や成長因子投与で末梢神経修復・再生の報告が散見されるが、その効果に一定の見解は得られていない。当教室における神経再生に関する最近の研究では、ラット embryo 由来神経軸索と newborn 由来 Schwann 細胞の共培養実験において LRP-1 (リポ蛋白受容体関連レセプター1) binding domain が髄鞘形成を促進したと報告した (Yamauchi et al. Gordon research conference 2010, ISSLS 2012)。また、ラット坐骨神経末梢神経損傷モデルに対し vein wrapping を行い vein から放出される血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) と肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) が髄鞘の形成を促進し行動学的評価を改善したと報告し (Murakami et al. Society for neuroscience 2011) 末梢神経機能の改善には髄鞘形成の促進が大きく関与することを示唆した。また、マウス iPS 細胞を Astrocyte へ分化させマウス脊髄損傷モデルに移植し中枢神経への影響を検証した研究を行っている (Hayashi et al. J Neurosurg Spine 2011)。京都大学山中教授らによる iPS 細胞の発見以来、我が国では iPS 細胞を用いた再生医療研究は発展の一途をたどっている。臨床応用に向け最新の研究では拒絶反応や悪性化の抑制等合併症への対策にも重点がおかれ、国際的に最もアドバンテージのある研究分野である。現段階では臨床応用に関しては対象疾患が限られているが、法制度の整備が進む現在、将来的

に必ずや裾野が広がるものと考え。また、本計画の如く iPS 細胞からの Schwann 細胞へ分化させ生体内における評価を得た基礎研究は未だ存在しない。iPS 細胞を用いた本計画の利点は臨床応用を念頭に置いた際、自家組織移植と異なり自家の組織を損傷することなく再生組織を供給できる、細胞バンクの設立により早期の安定供給が期待できる点にある。また、本研究の方法としては申請者の過去の研究を基盤としている。生後 7 日のラット後根神経節とヒト椎間板培養細胞を共培養し、感覚神経の伸長にはヒト椎間板培養細胞内における神経伸長因子の影響を見出した (Yamauchi et al. Spine 2009)。また、胎生 15 日のラットから後根神経節を採取し、primary の Schwann 細胞と共培養を行い、神経細胞生存能、神経伸長能および髄鞘形成能を有するかこの検証を目的とした研究を行った (Yamauchi et al. Gordon research conference 2010, ISSLS 2011)。以上より、神経細胞との共培養を研究材料とした神経成長因子の解析は独自性を持ってこれまで行った実績があり、本研究における iPS 細胞由来 Schwann 細胞の有する神経成長因子の作用を十分評価できると考える。本研究から有効な結果が認められた場合、将来的には末梢神経障害による機能不全や神経障害性疼痛を有する患者の長期苦痛を改善しうる発展性のある基礎研究計画であると考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はヒト iPS 細胞を Schwann 細胞へ分化させ、損傷末梢神経に移植することによる神経修復効果を検証することである。損傷した末梢神経は、中枢神経と比較し再生能が高いことがこれまで

報告されている。末梢神経の再生には、再生軸索の足場としての Schwann 細胞の存在と Schwann 細胞から生ずる種々の成長因子が重要である。本研究ではまず Schwann 細胞を作成するソースとして着目されている iPS 細胞由来神経堤細胞 (NCSC; neural crest stem cell) を分化誘導し、免疫不全マウスの生体における作用を評価検討することを目的とした。

### 3 . 研究の方法

人工多能性幹細胞ヒト iPS 細胞 (253G1; 千葉大学細胞分子学講座より供与) を , Menendez らの方法 (Nature prot.2013) により、Matrigel コーティングしたプラスチックディッシュ上で Rho キナーゼ (ROCK) 阻 害 薬 を 添 加 し た ips maintenance medium を用いて 2 週間単層培養を施行 . KSR medium へ交換して 4 日間培養したのち , KSR medium から神経系細胞培養液へ徐々に濃度を変化させていき , 約 12 日で分化させた。BMP アンタゴニストである Noggin および ALK 阻害剤である SB431542 は分化誘導中同じ濃度で継続して添加した。分化の指標として NCSC のマーカーである p75, HNK-1, iPSC のマーカーである SOX2 について免疫細胞化学染色ならびにフローサイトメトリーによる評価を行った。

### 4 . 研究成果

免疫化学染色では、iPS 細胞は p75 と HNK-1 が陰性、SOX2 が陽性であったのに対し、分化後の細胞は p75 と HNK-1 が陽性、SOX2 が陰性であった。同様に、フローサイトメトリーにおいても iPS 細胞は p75、HNK-1 とともに陰性であったのに対し、分化後の細胞では両者ともに陽性である細胞が 63% 存在した。以上の結果より、iPS 細胞が NCSC へ分化したと考えられた。

次に、免疫不全マウスである NOD/SCID マウスの坐骨神経圧挫モデルを作成、分化させた NCSC を移植した。移植群と非移植群を移植後 1,2 週で圧挫部を HE 染色し比較したところ、形態に有為差は認めなかった。一方、腫瘍形成も認めなかった。今回簡便な方法で iPS 細胞から NCSC へ分化させることに成功した。今後更なる長期フォローおよび各タイムコースでのタンパク、mRNA レベルでの解析、組織学的、行動学的評価が必要である。iPS 細胞由来 NCSC の移植は末梢神経損傷治療への効果が期待される。

### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

- 1) Abe R, Kuniyoshi K, Suzuki T, Yamauchi K, Akasaka K, Ohtori S: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into neural crest stem cells *in vitro*. 70th Annual Meeting of American Society for Surgery of the Hand (Seattle, WA, USA). 2015 SEP 10-12
- 2) Abe R, Yamauchi K, Orita S, Suzuki M, Inage K, Kubota G, Saino T, Sato J, Fujimoto K, Takahashi K, Kuniyoshi K, Ohtori S: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into neural crest stem cells *in vitro*. 42nd International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting (San Francisco, CA, USA). 2015 JUN 8-12
- 3) 安部玲, 山内かづ代, 國吉一樹, 鈴木

崇根,小林朋子,助川浩士,上野啓介,  
赤坂朋代,金塚彩,大鳥精司,高橋和  
久: Feeder cell を用いないヒト iPS  
細胞からの神経堤幹細胞移植. 第 29 回  
日本整形外科学会基礎学術集会, 城山  
観光ホテル( 鹿児島県鹿児島市 ). 2014  
OCT 9-10

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山内 かづ代 (YAMAUCHI, Kazuyo)  
千葉大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号: 30648069

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: