

学位論文

「 Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells
Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM)
Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury. (ポリ
フッ化ビニリデン膜上で塊状に培養した多分化能を有す毛包幹
細胞は脊髄損傷の機能回復を促進する)」

指導教授名 天羽 康之

申請者氏名 小原 宏哉

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

我々は過去の研究で nestin 陽性の多分化能をもった毛包幹細胞，いわゆる hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cell（以後 HAP 幹細胞と呼称する）が毛包のバルジ領域に分布し，損傷した末梢神経，脊髄を修復できること，更には心筋細胞に分化することを証明した。今回我々は，マウスにおける急性期の脊髄損傷に対する HAP 幹細胞移植の有効性について検討を行った。まず脊髄損傷したヌードマウスに GFP 陽性マウスより分離した HAP 幹細胞をポリフッ化ビニリデン膜（polyvinylidene fluoride membranes; PFM）上で培養し同種移植したところ，脊髄内で毛包幹細胞が増殖し，神経細胞，グリア細胞に分化していることを確認した。この結果から PFM を利用して HAP 幹細胞を損傷した脊髄に移植すると，再接着を促進することが分かった。さらに BMS (Basso Mouse Scale for Locomotion) スコアを用いて，脊髄損傷マウスにおける HAP 幹細胞の自家移植群と非移植群とを比較したところ，有意差をもって移植群が改善した。我々は今までに HAP 幹細胞が容易に採取でき，奇形腫を発生せず，凍結保存後も分化能を保持できることを示してきた。よって HAP 幹細胞は iPS 細胞や ES 細胞に比べ，再生医療，特に脊髄損傷の治療に有用であると確信する。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 動物 -----	1
2-2. ヒゲ毛包の分離 -----	2
2-3. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞の移植 -----	2
2-4. 脊髄損傷モデルと移植 -----	2
2-5. ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色 -----	2
2-6. 免疫染色 -----	3
2-7. 免疫蛍光染色 -----	3
2-8. フローサイトメトリー -----	3
2-9. 運動機能解析 -----	3
2-10. 統計分析 -----	3
3. 結果	
3-1. HAP 幹細胞コロニーは PFM 上で神経細胞とグリア細胞に分化する ----	4
3-2. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞をヌードマウスの損傷脊髄内に移植 する と 神 經 細 胞 と グ リ ア 細 胞 に 分 化 す る -----	4
3-3. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを損傷脊髄に移植すると再 接合を促進する -----	4
3-4. マウスに移植した HAP 幹細胞は運動機能の回復を促進した -----	4
4. 考察 -----	5
5. 総括 -----	6
6. 今後の展望 -----	6
7. 謝辞 -----	7
8. 引用文献 -----	7
9. 業績目録 -----	11
10. 図表 -----	13

1. 序論

世界的に脊髄損傷患者は毎年約 50 万人発症していると推定されている^{1,2}。今日まで損傷した脊髄自体の修復や、歩行、膀胱直腸障害などの機能障害を元に戻す根本的な治療方法は確立していないのが現状である²。我々は以前、ネスチン遺伝子プロモーターを用いた緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作成し、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した^{2,3}。その毛包幹細胞は神経細胞・グリア細胞・角化細胞・平滑筋等に分化することを明らかにした⁴。このネスチン陽性毛包幹細胞を我々は hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cell (以後 HAP 幹細胞と呼称する) と名付けた。HAP 幹細胞はマウス、ヒトともに培養するとコロニーを形成し、ネスチン陽性、ケラチン 15 陰性であり、in vitro では様々な神経系細胞や非神経系細胞といった多分化能を示した³⁻¹⁶。

我々はまずマウス HAP 幹細胞をマウスの切断した坐骨神経に自家移植したところ、神経への再生と機能回復を確認した¹⁷。またヒト HAP 幹細胞をマウスの切断した坐骨神経に他家移植したところ、GFAP (glial fibrillary-acidic-protein) 陽性シュワン細胞に分化して既存の軸索の回復を促進し、結果として神経への再生と機能回復を認めた⁸。

以前我々は、免疫の正常な C57BL/6 マウスの胸髄を切断し、HAP 幹細胞を損傷部に自家移植した。我々は移植した HAP 幹細胞のほとんどがシュワン細胞に分化し、切断された脊髄の禍福を促進していることを確認した。さらに再接合した脊髄によって後肢運動機能の回復を認めた^{7,10}。

最近では、我々はマウス HAP 幹細胞をポリフッ化ビニリデン膜 (polyvinylidene fluoride membrane, 以後 PFM と呼称する) 上で増殖させた後、切断したマウスの坐骨神経に自家移植したところ、神経への再生と機能回復を認めた¹⁵。

今回我々はマウス HAP 幹細胞をヌードマウスと免疫の正常なマウスを用いて損傷脊髄に同種・自家移植することで、神経への再生と機能回復を証明した。特に過去の報告と異なる点は、細胞移植の効率化を図るため HAP 幹細胞を PFM といった無機物質上で培養し定着した後に脊髄損傷部に移植したことであった。

2. 材料と方法

2-1. 動物

トランスジェニック C57BL/6J-EGFP マウス (GFP マウス) は大阪大学微生物病研究所 (Osaka University, Osaka, Japan) から入手した。C57BL/6J マウスは CLEA ジャパンから入手した (Tokyo, Japan)¹⁸。Crlj : nu/nu マウス (ヌードマウス) はオリエンタル

バイオサービス (Tokyo, Japan) から入手した。全ての動物に対する手順はアメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health; NIH) のガイドラインに従い、北里大学医学部の動物実験倫理委員会による承認されている。動物の苦痛を最低限にし、使用する動物の数を減らすことに尽力した。

2-2. ヒゲ毛包の分離

我々は過去の論文で示したように C57BL/6J マウスからヒゲ毛包を分離した⁶。移植に用いるヒゲ毛包を右もしくは左側より分離するのは、過去に示したように双眼顕微鏡下で解剖した¹⁵。

2-3. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞の移植

GFP もしくは非 GFP-C57BL/6J マウスより分離したヒゲ毛包の上部を 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS), 50mg/ml ゲンタマイシン (GIBCO, NY, USA), 2mM L-グルタミン (GIBCO), 10mM HEPES (MP Biomedicals, CA, USA) を加えた DMEM (Sigma-Aldrich, MO, USA) 培養液内で 4 週間培養した。増殖した HAP 幹細胞を分離し, 2% B-27 (GIBCO, NY, USA), 5ng/ml 線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) (Millipore, CA, USA) を加えた DMEM/F12 (GIBCO, NY, USA) 培養液に移動した。1 週間後、移動した細胞は HAP 幹細胞コロニーを形成した^{6,19}。HAP 幹細胞コロニーはその後、PFM (Millipore, Darmstadt, Germany) 上に定着させ DMEM 培養液内で 5 日間培養した。

2-4. 脊髄損傷モデルと移植

マウスの胸髄損傷は局所麻酔下で行った。マウスの背部に対し約 1.0cm の縦方向切開を行い、胸椎を露出した。剪刀によって第 10 椎弓を切除し、胸髄の硬膜を露出した。20 分間 20g の重りをつけた 18 ゲージ針で圧迫して胸髄を損傷した。HAP 幹細胞コロニーが定着した PFM を 3mm の円盤状にカットし、損傷胸髄に移植した (図 1)。コントロール群は PFM のみを損傷胸髄に移植したマウスと、脊髄損傷のみ行ったマウスの 2 群とした。切開線はナイロン糸を用いて閉創した。移植後、切除した椎弓の部位は傍脊柱筋群と筋膜で被覆した。その際筋膜と皮膚はそれぞれ縫合した。7 週間後、HAP 幹細胞コロニーを移植した損傷胸髄を摘出し、蛍光顕微鏡を用いて直接観察した。更にその神経サンプルは HE 染色と免疫染色を行った。

2-5. ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色

パラフィン切片の HE 染色は過去に示したように実施した¹⁵。

2-6. 免疫染色

免疫染色は過去に記載した通りに実施した¹⁵。パラフィン切片は抗 β IIIチューブリンマウスモノクローナル抗体 (1 : 500, Tuj1 clone; Convance, CA, USA) と抗 GFAP (glial fibrillary acidic protein) マウスモノクローナル抗体 (1 : 200 ; LAB VISON, CA, USA) でインキュベートし, Dako ChemMate ENVISION キット/HRP (Dako Japan, Tokyo, Japan) で処理した。その後パラフィン切片は DAB を用いて反応させ, また核染色のためにマイヤーズヘマトキシリン染色で染色した。

2-7. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は過去の記載した通りに行った¹⁵。凍結切片と PFM 上で培養した HAP 幹細胞コロニーは抗 β IIIチューブリンマウスモノクローナル抗体 (1 : 500, Convance, CA, USA) もしくは抗 GFAP チキンポリクローナル抗体 (1 : 300 ; Abcam, Cambridge, UK) でインキュベートし, その後 Alexa Flour 568@標識抗マウスヤギ・ポリクローナル抗体 (1 : 400, Molecular Probes, OR, USA) もしくは Alexa Flour 568@標識抗チキンヤギ・ポリクローナル抗体 (1 : 1500, Molecular Probes), さらに DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) でインキュベートした。

2-8. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは過去の記載した通りに行った¹⁵。PFM 上の HAP 幹細胞コロニーから分化した細胞は分離し, 1 次抗体として抗 β IIIチューブリンマウスモノクローナル抗体 (1 : 500) もしくは抗 GFAP チキンポリクローナル抗体 (1 : 300) でインキュベートした。2 次抗体は Alexa Flour 488@標識抗マウスヤギ・ポリクローナル抗体 (1 : 100, Molecular Probes) もしくは Alexa Flour 488@標識抗チキンヤギ・ポリクローナル抗体 (1 : 100, Molecular Probes) を用いた。細胞は FACSuite™ソフトウェア (BD Bioscience) を使用している FACS Verse (BD Bioscience, NJ, USA) によって解析した。フローサイトメトリーは 3 回繰り返し実施した。

2-9. 運動機能解析

マウスの運動機能は透明なケース (30×30cm) 内で観察した。脊髄損傷したマウスと HAP 幹細胞を移植したマウスの運動機能は Basso Mouse Scale for Locomotion (BMS) score で解析した²⁰。

2-10. 統計分析

実験データは平均値±標準偏差で表した。統計分析は unpaired Student's *t* test で実施し, P 値は $P < 0.05$ を有意とみなした。

3. 結果

3-1. HAP 幹細胞コロニーは PFM 上で神経細胞とグリア細胞に分化する

免疫蛍光染色では、PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーが神経細胞とグリア細胞に分化していることを示した (図 2A1, A2)。フローサイトメトリー分析では、PFM 上でコロニーから分化した細胞は 24.2%が神経細胞 (図 2B1), 72.8%がグリア細胞 (図 2B2) であった。

3-2. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞をヌードマウスの損傷した脊髄内に移植すると、神経細胞とグリア細胞に分化する

HAP 幹細胞が定着した PFM を径 3mm の円盤状にカットし、マウスの損傷胸髄内に移植した (図 1)。移植 7 週間後、ヌードマウスの損傷胸髄を蛍光顕微鏡で直接観察したところ、GFP を発光する HAP 幹細胞が PFM から進展し、損傷胸髄を接合する所見を認めた (図 3A)。免疫蛍光染色も同様に損傷脊髄が接合し、HAP 幹細胞は神経細胞 (図 3B) とグリア細胞 (図 3C) への分化を示した。

3-3. PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを損傷脊髄に移植すると再接合を促進する

C57BL/6J マウスの損傷胸髄に対して、PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを移植したところ、7 週間後に胸髄は再接合した。HE 染色では胸髄の損傷部位に多数の紡錘形細胞が増殖していた (図 4A)。免疫染色では移植した HAP 幹細胞は神経細胞 (図 4B) とグリア細胞 (図 4C) に分化していた。一方、PFM のみ移植したマウス、移植なしのマウスはともに胸髄の損傷部位に肉芽組織がみられた (図 4D,G)。免疫染色上、その肉芽組織内では神経細胞 (図 4E,H) とグリア細胞 (図 4F,I) への分化が確認できなかった。

3-4. マウスに移植した HAP 幹細胞は運動機能の回復を促進した

C57BL/6J マウスの損傷胸髄に塊状にした HAP 幹細胞コロニーを移植後、7 週間にわたり BMS スコアでマウスの運動機能を定量化した。BMS スコアは幹細胞移植後 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 日目にそれぞれ評価した。我々は PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞を移植したマウス、PFM のみ移植したマウス、移植なしのマウスでそれぞれ BMS スコアを比較した (図 5)。

HAP 幹細胞移植群 vs. PFM 移植群の比較では 35 日目 ($P = 0.042$), 42 日目 ($P = 0.042$), 49 日目 ($P = 0.030$) でそれぞれ有意差を認めた ($P < 0.05$)。HAP 幹細胞移植群 vs. 移植なし群の比較では 28 日目 ($P = 0.032$), 35 日目 ($P = 0.032$), 42 日目 ($P = 0.013$), 49 日目 ($P = 0.015$) でそれぞれ有意差を認めた ($P < 0.05$) (図 5)。

4. 考察

胚細胞 (embryonic cells; EC) もしくは骨髄幹細胞 (bone marrow stem cells; BMSCs) による細胞置換療法は、動物モデルでの神経や脊髄の機能喪失や末梢神経損傷の回復に大きな可能性を秘めている^{18, 21-28}。加えて、近年は脊髄損傷治療に対して嗅神経鞘細胞 (olfactory ensheathing cells; OECs)、脂肪由来幹細胞 (adipose tissue-derived stromal cells; ASCs)、上衣幹細胞といった他細胞の移植効果もまた示されるようになった^{29,30}。これら幹細胞の治療効果は明らかだが、ヒトの神経幹細胞や ES 細胞の供給源として胎児組織を使用することに関する倫理的問題やヒト異種組織使用の際に付随する免疫応答、免疫抑制剤の使用など様々な問題があり対処する必要がある。さらに ES 細胞はまた奇形腫を発症する可能性がある³¹。最近人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) は、三つの胚葉全てに分化できる 4 つの転写因子を導入することにより、様々な細胞タイプから確立された。しかしながら、iPS 細胞もまた奇形腫を発症しうる³¹⁻³⁶。

神経幹細胞 (neuronal stem cells; NSCs) もしくは神経前駆細胞 (neural progenitor cells; NPCs) は脊髄損傷の修復に重要な役割を果たすことが示された³⁷⁻³⁹。Rosenzweig らは脊髄損傷後のアカゲザルにヒト脊髄由来の NPCs の移植に成功した⁴⁰。移植した NPCs はアカゲザル内で生存し、神経細胞とグリア細胞のマーカーを発現していた⁴⁰。Curtis らは近年、ヒト脊髄由来 NSC (NSI-566) を利用した脊髄損傷の治療として初めてのヒトに対する第一相臨床試験を行い、実現の可能性や安全性について検証した⁴¹。その結果、脊髄損傷患者に対するヒト NSI-566 細胞株の脊髄移植は安全であることがわかった³⁹。脊髄損傷に対する iPSCs は効果的であることも証明されている^{42,43}。Stmadel らは脊髄損傷したミニブタや他の動物の脊髄内で同系や同種の iPSC 由来 NPCs (iPSC-NPCs) が生存するかどうかを確認した。移植した細胞は長期生存し、成熟した神経細胞やグリア細胞に分化していた。彼らの結果は同種 iPSC-NPCs の生着を成功させるには短期的な免疫抑制が必要であることをより一層強調していた⁴⁴。

他の供給源からの幹細胞もまた損傷脊髄の回復を証明している。Yang らはヒト歯嚢由来幹細胞 (dental follicle stem cells; DFSCs) は完全切断した脊髄の修復と機能改善を促進する能力があることを示した⁴⁵。Najafzadeh らはラット毛包幹細胞を脊髄損傷ラットに移植すると、これらの細胞は生存し損傷脊髄の機能回復を促進するように分化することを発見した⁴⁶。Ohta らは凍結保存した脂肪組織から分離した脂肪幹細胞を脊髄損傷ラットに移植したところ、後肢運動の機能回復を確認した⁴⁷。Ramalho らは間葉系幹細胞が損傷脊髄の回復に有用であることをみつけた⁴⁸。

我々は過去に筒状の PFM 内に HAP 幹細胞を充填し損傷末梢神経に移植したところ、機能回復を促進することを証明した¹⁵。これは移植した細胞の傍分泌効果によるものの可能性がある。図 2 に示す通り、PFM 上の HAP 幹細胞は 24% が神経細胞、73% がグリア

細胞に分化していた。神経細胞とグリア細胞は神経伝達物質を分泌する。過去の我々の研究では移植細胞の傍分泌効果について検討しておらず、今後の実験の目標としたい。

我々は以前の研究で、内在する神経細胞と HAP 幹細胞との間に機能的に接続したことを確認した^{7,10}。この研究で我々は、PFM 上の HAP 幹細胞が脊髄に内在する神経細胞と自家の HAP 幹細胞との間に機能的接続を促進したことを証明した。

この研究で我々は、マウスに PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞を移植することで、損傷脊髄の再接合を促進しグリア瘢痕の形成を伴わないことを示した。それゆえ、HAP 幹細胞の早期移植によって、損傷脊髄の再接合を促し、さらにはグリア瘢痕形成の抑制が期待できると考える。よって HAP 幹細胞は、脊髄損傷の治療に対して臨床応用できる可能性がある。

5. 総括

今回の研究では、PFM といった無機物質上で HAP 幹細胞を培養することが可能であること、さらには HAP 幹細胞を急性期脊髄損傷マウスに PFM を用いて自家移植することで損傷部の構造の再生と運動機能の回復を証明できた。この結果は、脊髄損傷患者における HAP 幹細胞による再生医療の臨床応用への第一歩となることを確信する。

6. 今後の展望

脊髄損傷の病態は、損傷後の経過時間により大きく変化する。急性期は脊髄損傷部における出血や炎症反応が強く、亜急性期にかけて沈静化する。さらに慢性期になると損傷部にグリア瘢痕が形成され、損傷範囲の縮小をもたらす一方で、軸索の再生を阻害する。幹細胞移植は急性期、亜急性期、慢性期と移行するにつれ、機能改善効果が乏しくなるといわれている。しかし臨床ではほとんどが脊髄損傷患者は慢性期の状態であり、また幹細胞の培養にも時間を要するため慢性期での移植の有用性の証明が非常に重要となる。今回の研究によって急性期の HAP 幹細胞の移植の有効性を示すことができたため、今後は亜急性期、慢性期での移植実験へと移行していくことを検討する。

さらにそれぞれの時期の幹細胞移植による効果発現の機序については、組織保護と修復・再生促進などが挙げられ、それらのメカニズムを解明することが必要である。

最終的には、マウスで HAP 幹細胞移植により神経再生や運動機能回復を確認した後、ラットや将来的にはコモンマーモセットなどさらに高等動物を用いた移植実験へと広げていくことで、ヒトに対する臨床試験を実現させることが目標である。

7. 謝辞

この研究において、ご指導賜りました北里大学医学部皮膚科学天羽康之教授ならびにカルフォルニア大学サンディエゴ校医学部外科学Robert M. Hoffman教授に深謝致します。また、研究にお力添え頂きました北里大学医学部皮膚科学教室の諸先生方、技術員の皆様に厚く御礼申し上げます。

8. 引用文献

1. Holmes D. Repairing the neural highway. *Nature* 2017; 552, S50–S51.
2. Kuhl E. Mechanical cues in spinal cord injury. *Biophys J* 2018; 115, 751–753.
3. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100, 9958–99561.
4. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101, 13291–13295.
5. Hoffman RM. The hair follicle as a gene therapy target. *Nat Biotechnol* 2000; 18, 20–21.
6. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102, 5530–5534.
7. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle* 2008; 7, 1865–1869.
8. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Hamada Y, Kawahara K, Sato Y, et al. Human hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells promote regeneration of peripheral-nerve injury: An advantageous alternative to ES and iPS cells. *J Cell Biochem* 2009; 107, 1016–1020.
9. Amoh Y, Mii S, Aki R, Hamada Y, Kawahara K, Hoffman RM, et al. Multipotent nestin-expressing stem cells capable of forming neurons are located in the upper, middle, and lower part of the vibrissa hair follicle. *Cell Cycle* 2012; 11, 3513–3517.
10. Liu F, Uchugonova A, Kimura H, Zhang C, Zhao M, Zhang L, et al. The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem

- cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle* 2011; 10, 830–839.
11. Kajiura S, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Cryopreservation of the hair follicle maintains pluripotency of nestin-expressing hair follicle associated pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2015; 21, 825–831.
 12. Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. From hair to heart: Hair follicle stem cells differentiate to beating cardiac muscle cells. *Cell Cycle* 2015; 14, 2362–2366.
 13. Yamazaki A, Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, et al. Isoproterenol directs hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to differentiate in vitro to cardiac-muscle cells which can be induced to form beating heart muscle tissue sheets. *Cell Cycle* 2016; 15, 760–765.
 14. Yamazaki A, Hamada Y, Arakawa N, Yashiro M, Mii S, Aki R, et al. Early –age-dependent selective decrease of differentiation potential of hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to beating cardiac muscle cells. *Cell Cycle* 2016; 2, 848–861.
 15. Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, et al. Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in poly-vinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. *Cell Cycle* 2017; 16, 1927–1932.
 16. Tohgi N, Obara K, Yashiro M, Hamada Y, Arakawa N, Mii S, et al. Human hairfollicle associated pluripotent (hHAP) stem cells differentiate to cardiac-muscle cells. *Cell Cycle* 2017; 16, 95–99.
 17. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102, 17734–17738.
 18. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. ‘Green mice’ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 1997; 407, 313–319.
 19. Yashiro M, Mii S, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Kawahara K, et al. Protocols for efficient differentiation of hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells to beating cardiac muscle cells. *Methods Mol Biol* 2016; 1453, 151–159.
 20. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal

- cord injury in five commonmouse strains. *J Neurotrauma* 2006; 23, 635–659.
21. Faden AI. Pharmacotherapy in spinal cord injury: A critical review of recent developments. *Clin Neuropharmacol* 1987; 10, 193–204.
 22. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2002; 177, 306–313.
 23. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005; 25, 4694–4705.
 24. Jarocha D, Milczarek O, Wedrychowicz A, Kwiatkowski S, Majka M. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplant* 2015; 24, 661–672.
 25. Fandel TM, Trivedi A, Nicholas CR, Zhang H, Chen J, Martinez AF, et al. Transplanted human stem cell-derived interneuron precursors mitigate mouse bladder dysfunction and central neuropathic pain after spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 2016; 19, 544–557.
 26. Ruven C, Li W, Li H, Wong WM, Wu W. Transplantation of embryonic spinal cord derived cells helps to prevent muscle atrophy after peripheral nerve injury. *Int J Mol Sci* 2017; 18, E511.
 27. Zhang XM, Ma J, Sun Y, Yu BQ, Jiao ZM, Wang D, et al. Tanshinone IIA promotes the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal-like cells in a spinal cord injury model. *J Transl Med*, 2019; 16, 193.
 28. Khan IU, Yoon Y, Kim A, Jo KR, Choi KU, Jung T, et al. Improved healing after the co-transplantation of HO-1 and BDNF overexpressed mesenchymal stem cells in the subacute spinal cord injury of dogs. *Cell Transplant* 2018; 27, 1140–1153.
 29. Gomes ED, Mendes SS, Assunção-Silva RC, Teixeira FG, Pires AO, Anjo SI, et al. Co-transplantation of adipose tissue-derived stromal cells and olfactory Ensheathing cells for spinal cord injury repair. *Stem Cells* 2018; 36, 696–708.
 30. Alastrue-Agudo A, Rodriguez-Jimenez FJ, Mocholi EL, De Giorgio F, Erceg S, Moreno-Manzano V. FM19G11 and ependymal progenitor/stem cell

- combinatory treatment enhances neuronal preservation and Oligodendrogenesis after severe spinal cord injury. *Int J Mol Sci* 2018; 19, E200.
31. Wichterle H, Lieberm I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002; 110, 385–397.
 32. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102, 14069–14074.
 33. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel, JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282, 1145–1147.
 34. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448, 313–317.
 35. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322, 949–953.
 36. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5, 237–241.
 37. Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stemcells after severe spinal cord injury. *Cell* 2012; 150, 1264–1273.
 38. Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, et al. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 2013; 342, 637–640.
 39. Stenudd M, Sabelström H, Frisén J. Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol* 2015; 72, 235–237.
 40. Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, et al. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord. *Nat Med* 2018; 24, 484–490.
 41. Curtis E, Martin JR, Gabel B, Sidhu N, Rzesiewicz TK, Mandeville R, et al. A first-in-human, phase I study of neural stem cell transplantation for chronic spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 2018; 22: 941–950.
 42. Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent

stem cells for spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107, 12704–12709.

43. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, et al. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: Oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. Stem Cell Reports 2015; 4, 360–373.
44. Strnadel J, Carrromeu C, Bardy C, Navarro M, Platoshyn O, Glud AN, et al. Survival of syngeneic and allogeneic iPSC-derived neural precursors after spinal grafting in minipigs. Sci Transl Med 2018; 10, eaam6651.
45. Yang C, Li X, Sun L, Guo W, Tian W. Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord. J Neural Eng 2017; 14, 026005.
46. Najafzadeh N, Nobakht M, Pourheydar B, Golmohammadi, MG. Rat hair follicle stem cells differentiate and promote recovery following spinal cord injury. Neural Regen Res 2013; 8, 3365–3372.
47. Ohta Y, Takenaga M, Hamaguchi A, Ootaki M, Takeba, Y., Kobayashi T, et al. Isolation of adipose-derived stem/stromal cells from cryopreserved fat tissue and transplantation into rats with spinal cord injury. Int J Mol Sci 2018; 19, E1963.
48. Ramalho BDS, Almeida FM, SalesCM, de Lima S, Martinez AMB. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. Neural Regen Res 2018; 13, 1046–1053.

9. 業績目録

(I) 原著

- 1. Shirai K, Obara K, Tohgi N, Yamazaki A, Aki R, Hamada Y, Arakawa N, Singh SR, Hoffman RM, Amoh Y : Expression of anti-aging type-XVII collagen (COL17A1/BP180) in hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells during differentiation. Tissue Cell, 59:33-38, 2019.
- 2. Obara K, Tohgi N, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Singh SR, Hoffman RM, Amoh Y : Hair-follicle-associated pluripotent stem cells derived from cryopreserved intact human hair follicles sustain multilineage differentiation potential. Sci Rep, 27:9:9326, 2019.

- ◎ 3. Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Singh SR, Hoffman RM, Amoh Y: Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM) Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury. Stem Cell Rev Rep, 15:59-66, 2019.
- 4. Yamazaki A, Obara K, Tohgi N, Shirai K, Mii S, Hamada Y, Arakawa N, Aki R, Hoffman RM, Amoh Y: Implanted hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells encapsulated in polyvinylidene fluoride membrane cylinders promote effective recovery of peripheral nerve injury. Cell Cycle, 16:1927-1932, 2017.
- 5. Tohgi N, Obara K, Yashiro M, Hamada Y, Arakawa N, Mii S, Aki R, Hoffman RM, Amoh Y: Human hair-follicle associated pluripotent (hHAP) stem cells differentiate to cardiac-muscle cells. Cell Cycle, 16:95-99, 2017.

(Ⅱ) 著 書
な し

(Ⅲ) 総説・講座
な し

(Ⅳ) 症例・臨床治験・その他
な し

10. 図表

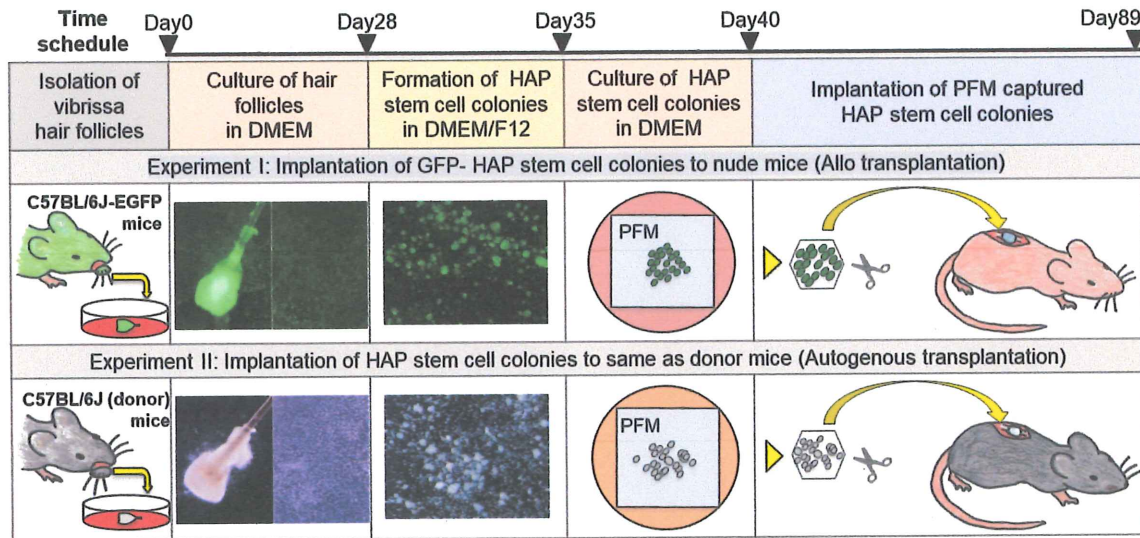


図. 1

PFM 上で培養した HAP 幹細胞を、ヌードマウス（同種移植）と免疫の正常なマウス（自家移植）の切断した脊髄に移植した。実験 1：GFP マウスの毛包から採取した HAP 幹細胞コロニーを PFM 上で培養し、ヌードマウスの切断した胸髄に同種移植した。実験 2：C57BL/6 マウスの毛包から採取した HAP 幹細胞コロニーを PFM 上で培養し、同様のマウスの切断した胸髄に自家移植した。

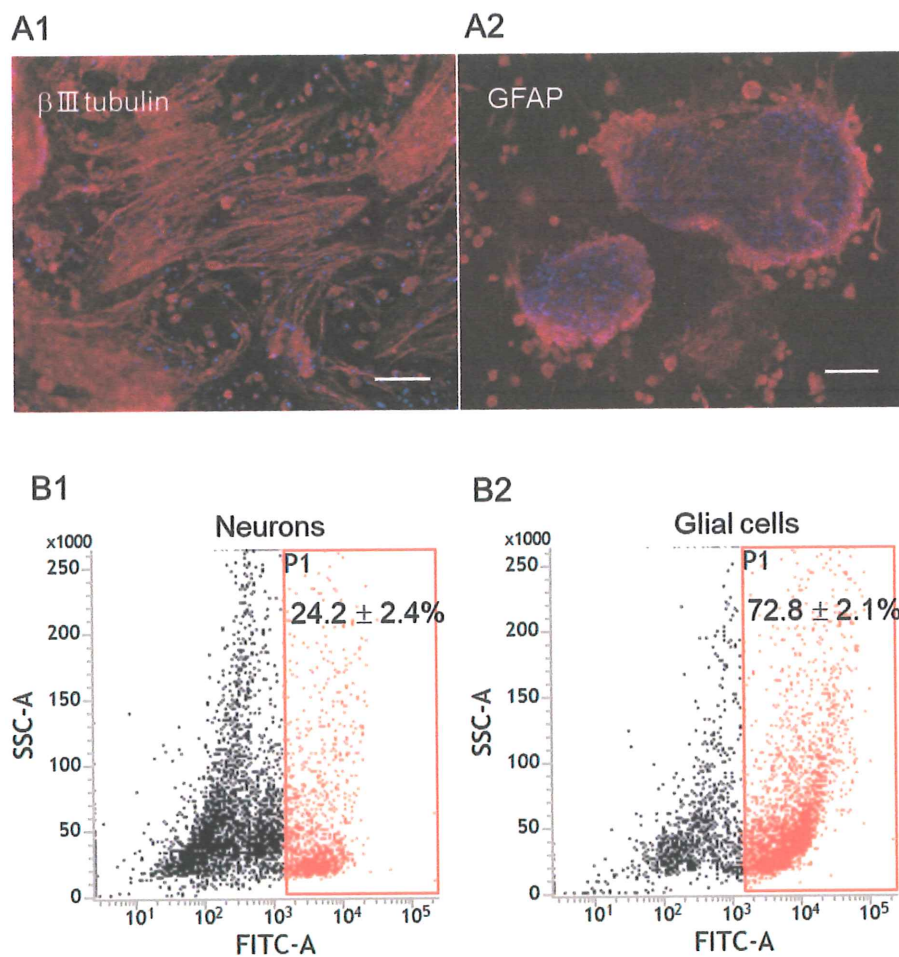


図. 2

HAP 幹細胞コロニーはPFM上で5日間培養した後、神経細胞とグリア細胞に分化した(A1, A2)。赤 = β IIIチューブリン (左), GFAP (右); 青 = DAPI。HAP 幹細胞コロニーは神経細胞に 24.2% (B1), グリア細胞に 72.8% (B2) 分化した。

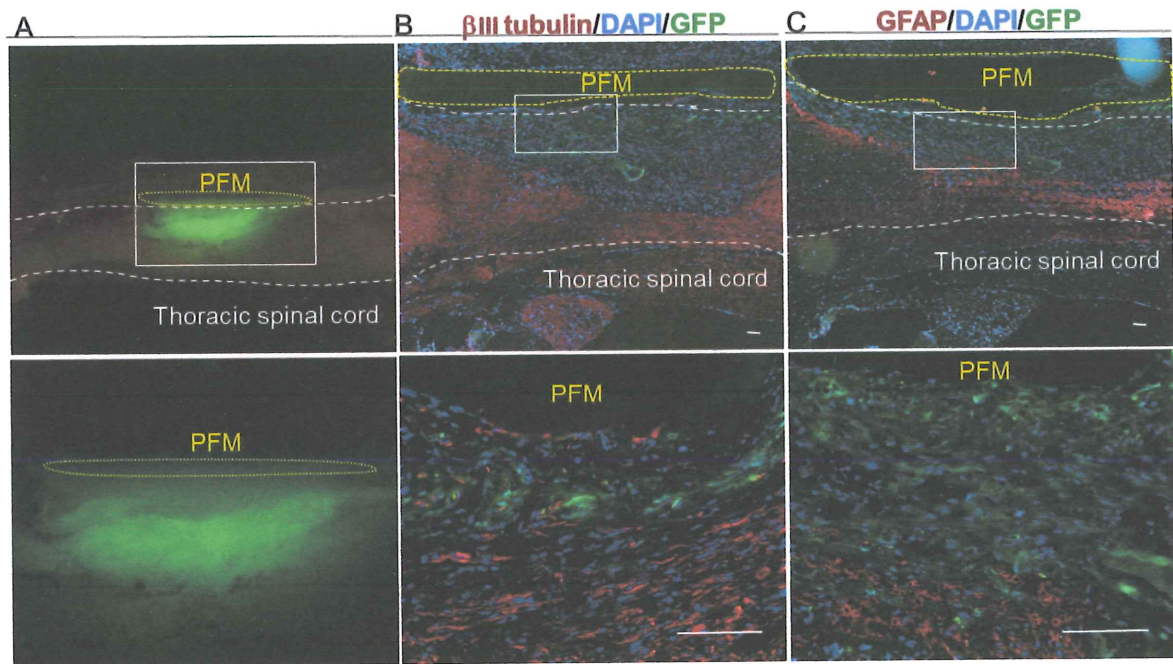


図. 3

ヌードマウスの切断胸髄に GFP 発現 HAP 幹細胞を移植した 7 週間後、蛍光顕微鏡で直接観察すると幹細胞は PFM から増殖・拡大し、切断胸髄を接合していた (A)。上パネル＝低倍率。下パネル＝白杵部の高倍率。免疫蛍光染色ではまた、HAP 幹細胞が神経を接合し、神経細胞 (B) とグリア細胞 (C) に分化していた。赤＝ β III チューブリン (B), GFAP (C) ; 緑＝GFP ; 青＝DAPI。上パネル＝低倍率。スケール＝100 μ m。下パネル＝白杵部の高倍率。スケール＝100 μ m

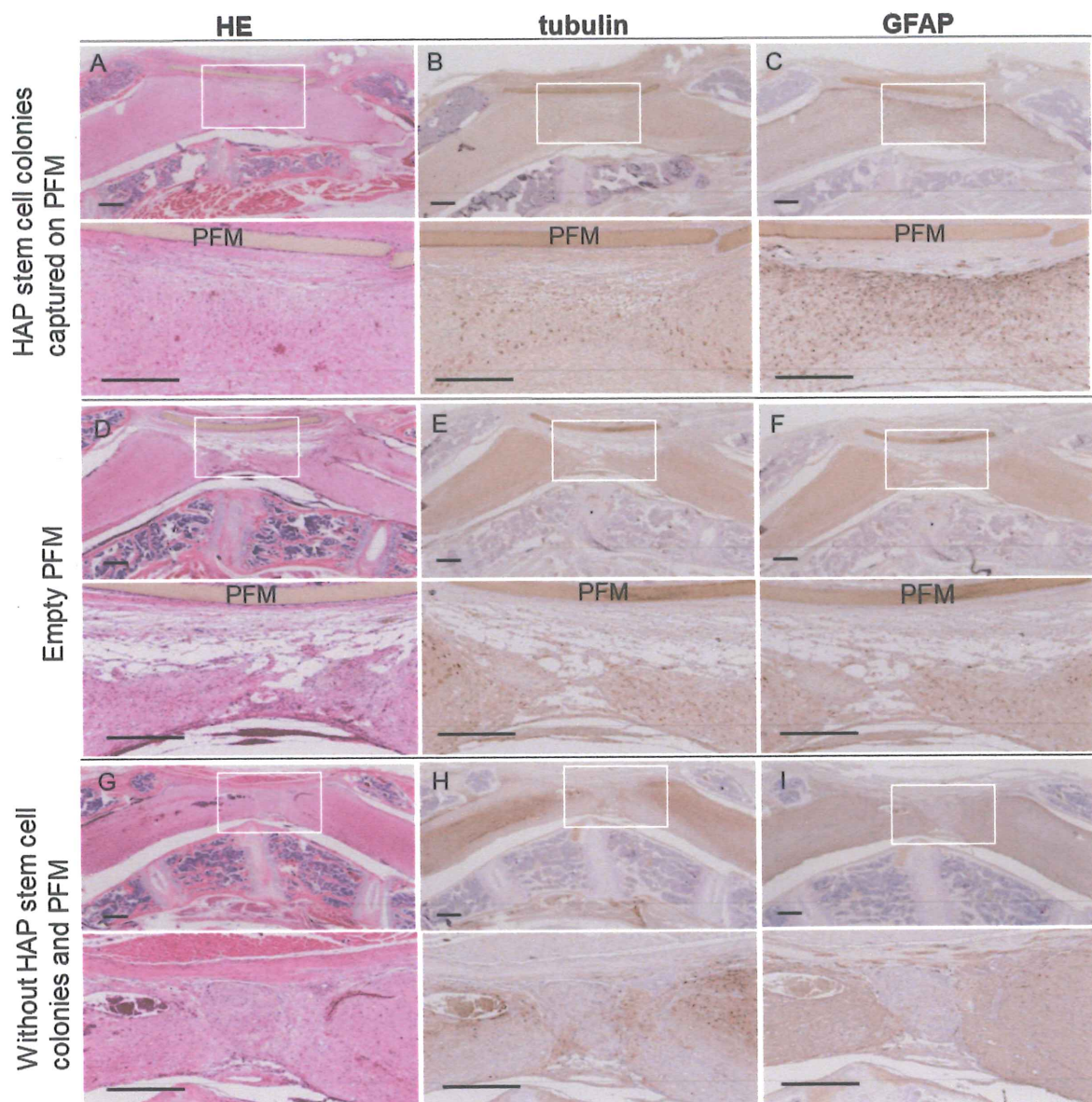


図. 4

HE 染色では、PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーを C57BL/6J マウスの切断胸髄に移植したところ、再接合を認めた (A)。免疫染色では、PFM 上で培養した HAP 幹細胞コロニーを移植して 7 週後、切断した胸髄内で神経細胞 (B) とグリア細胞 (C) に分化していたことを示した。PFM のみもしくは移植なしのマウスは胸髄の再接合はみられず、胸髄の切断部にグリア瘢痕を形成していた (D,G)。胸髄切断部では神経細胞やグリア細胞の分化はみられなかった (F,I)。上パネル=低倍率。スケール=500 μ m。下パネル=白粋部の高倍率。スケール=500 μ m

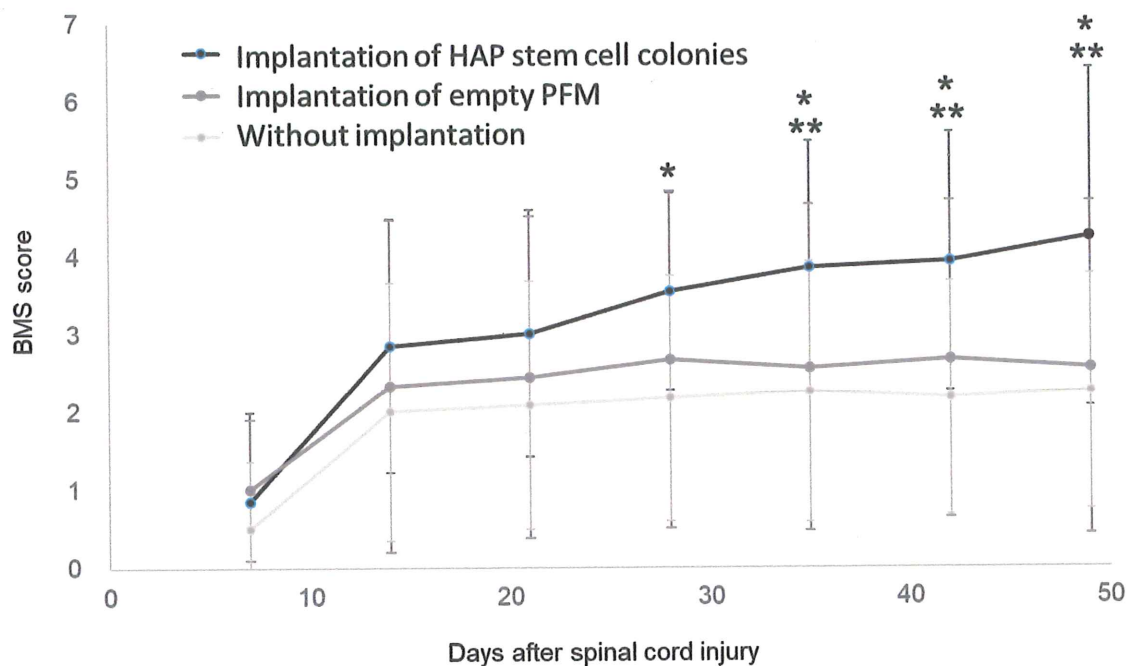


図. 5

PFM 上で培養し定着した HAP 幹細胞コロニーをマウスの切断胸髄に移植すると、下肢運動機能が回復した。HAP 幹細胞を移植したマウスの BMS スコアは移植なしのマウスと比較し、4 週目以降で有意に改善した (* $P < 0.05$)。; PFM のみ移植したマウスと比較したところ、5 週目以降で有意に改善した (** $P < 0.05$)。我々はマウスの左下肢を観察し BMS スコアを評価した。 $n=13$ HAP 幹細胞を移植したマウス ; $n=9$ PFM のみ移植したマウス ; $n=12$ 移植なしのマウス