

学位論文要旨

氏名 小原 宏哉



論文題目

「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)」

指導教授承認印

天羽 康之



「 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)」

氏名 小原 宏哉

【背景】

我々は、神経系幹細胞の重要なマーカーである class IV の中間径フィラメントである nestin 遺伝子プロモーターを用いた 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 nestin が強発現していることを見い出すと共に、皮膚毛包から摘出した毛包幹細胞が神経細胞・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、それらのうち特に神経細胞・グリア細胞といった神経系への分化が顕著であったことを確認した (Y. Amoh et al. PNAS 102, p. 5530-4, 2005)。さらにヒトにおいてもマウス同様に毛包幹細胞が *in vitro* において神経細胞, グリア細胞, 角化細胞, 平滑筋細胞, 色素細胞, 心筋細胞といった多分化能を有することを明らかにした (Y. Amoh et al. Cell Cycle 8, p.176-7, 2009, A. Yamazaki et al. Cell Cycle 15, p. 760-5, 2016)。我々は毛包幹細胞をマウスの切断坐骨神経及び脛骨神経間へ移植したところ、末梢有髄神経の再生を確認し (Y. Amoh et al. PNAS 102, p.17734-8, 2005), さらに脊髄損傷部への毛包幹細胞移植により、運動機能を改善することも確認した (Y. Amoh et al. Cell Cycle 7, p. 1865-9 2008)。これらの結果、多分化能を有する毛包幹細胞の末梢、中枢神経再生医療への応用の可能性が示唆された。

【目的】

本研究では、nestin 陽性毛包幹細胞が特に神経細胞、グリア細胞に多く分化しやすい特徴を利用し、自己毛包幹細胞より毛包幹細胞神経シートを作成する。これを末梢神経損傷や脊髄損傷といった神経系損傷部位への移植を行うことで構造、機能を回復させることを目標としている。今回我々は、マウスにおける急性期の脊髄損傷に対する毛包幹細胞移植の有効性について検討を行った。

【方法及び結果】

マウス髭毛包のバルジ領域を含む毛包上部を分離し、分化培養液 10%FBS-DMEM で培養した。培養開始後毛包周囲に細胞増殖を認め、28 日後に増殖した細胞をトリプシン処理にて回収し、幹細胞培養液 DMEM/F12 にて培養を続けた。その 1 週間後 (培養開始 35 日後) nestin 陽性毛包幹細胞コロニーを形成した。コロニーを PVDF 膜上にのせ、5 日間 10%FBS-DMEM でさらに培養したところ、コロニーの定着を確認した。髭毛包を採取したマウスから脊髄損傷モデルを作成した後、同日に PVDF 膜上で培養した毛包幹細胞コロニーを損傷脊髄の位置に移植した。

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毛包幹細胞を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。

続いて脊髄損傷モデルマウスに毛包幹細胞を自家移植し、1週間毎、計49日間BMS (Basso Mouse Scale for Locomotion)スコアで下肢運動機能の評価を行った。同時に脊髄損傷のみ行ったマウス、PVDF膜のみ移植したマウスのBMSスコアと比較した。結果、毛包幹細胞を移植した群の下肢運動機能は他の群と比較し、術後28日以降有意差をもって改善していた ($P < 0.05$)。また術後の脊髄を病理組織学的にそれぞれ観察すると、毛包幹細胞を移植した群のみ損傷部位内で神経細胞、グリア細胞に分化して増殖している像を確認した。

【結語】

以上からマウスにおいて急性期脊髄損傷に対しPVDF膜上で培養・定着した毛包幹細胞を移植したところ、脊髄の構造・機能ともに回復できることを証明できた。同時にPVDF膜といった無機物質上でも毛包幹細胞は増殖、分化可能であることが分かり、損傷部位に効率よく移植する方法の一手として次につながる結果となった。今後は亜急性期、慢性期の脊髄損傷に対して毛包幹細胞移植を成功させ、実臨床でヒトに対し新たな再生医療として導入していくことが目標である。近年話題になっているiPS細胞やES細胞が、腫瘍化の危険から臨床応用が難しいのと比較して、皮膚由来の幹細胞は腫瘍化等の危険性が極めて少なく、高い安全性が期待される。我々が開発した毛包幹細胞による再生医療は倫理面や拒絶反応の問題がなく、他部位の成体組織幹細胞と比較して、患者への採取リスクが低いことから、早期の臨床応用が期待される。