

東海大学 令和1年度 博士論文

椎間板由来体性幹細胞を用いた
神経系分化の基礎的研究

東海大学外科学系整形外科学
石井崇之

- ・この学位申請論文は、Regenerative Medicine に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

- ・ Regenerative Medicine 掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

【総括】

組織の恒常性の維持や損傷時の修復のために種々の成体幹/前駆細胞が生体内に存在することが報告されている。我々はメチルセルロース半固形培地を用い、球状コロニー形成が可能な高い増殖能と自己複製能を持つ髄核前駆細胞が存在し、Tie2 と GD2 がその特異的マーカーの一つであることを報告している。この髄核前駆細胞の椎間板内での役割は未知な部分が多いが、神経系マーカーの一つとされる GD2 が陽性であることは、神経とは異なる胚葉に属するとされる髄核細胞の神経系 lineage への分化能の可能性を示唆するものとも推察できる。本研究では、髄核前駆細胞の椎間板内での役割の解明の一助となることを期待して、髄核前駆細胞の遺伝子発現特性を検証し、さらに神経系 lineage の一つであるシュワン細胞への分化能を検証した。

マウス髄核前駆細胞の RT-PCR を種々の幹細胞マーカーを用い施行したところ Nestin、Musashi-1、Sox2、Notch-1、Nanog、Sox9 の発現を認めた。次に、既存のシュワン細胞誘導培養法を用いた髄核前駆細胞のシュワン細胞への分化誘導の検証では、誘導後髄核前駆細胞は、免疫染色においてシュワン細胞に特異的とされる GFAP と

anti-S100 が陽性で、且つ、形態的にも双極性で紡錘形のシュワン細胞に類似する形態変化を認めた。さらに、髄核細胞誘導後シュワン様細胞の機能的性質の評価のためマウス坐骨神経切断モデルへ移植し、その組織的・機能的回復を検証した。移植後 12 週の免疫染色と電顕の評価において軸索の再生とそれを取り囲む誘導後シュワン様細胞由来のミエリン鞘形成を認めた。また、移植後運動神経および感覚神経の機能回復を評価する Walking track analysis と Hot water behavior test においても有意な改善を認め、誘導後シュワン様細胞がシュワン細胞とその形態のみならず機能的にも同等のものであることが確認できた。

髄核は椎間板内に取り残された胎生期の脊索の遺残とされ、神経とは異なる中胚葉に由来するとされるが、本研究では髄核前駆細胞は神経系 lineage の一つであるシュワン細胞へ誘導が可能であった。これは単に髄核前駆細胞の未分化の証明に過ぎないのか、あるいは、近年散見される椎間板変性や椎間板ヘルニア等に起因する髄核組織由来の神経誘導因子の分泌から髄核細胞と神経系細胞との密接な関係性の指摘する報告を支持する事実となるものであるのか。今後追加的検証は必要であるものの、本研究結果は髄核前駆細胞の生体組織内での役割解明の一助となるものと考えている。

【研究背景】

生体組織内には、骨髓や脂肪組織由来幹細胞や毛包幹細胞、神経幹細胞など様々な成体幹/前駆細胞の報告が散見されるが、その多分化能は由来する組織の胚葉特異性も飛び越えて、様々な組織系統への分化も可能であることが証明されている。

成体幹/前駆細胞の特徴の一つとして球状コロニーを形成する能

力が挙げられるが、我々はメチルセルロース半固形培地を用いて、椎間板髄核細胞から球状コロニーの導出が可能であることを確認し、この球状コロニーを構成する髄核前駆細胞は高い増殖能と自己複製能を持ち、且つ、椎間板組織や脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞を含む多系統への分化能も持つことから、成体幹/前駆細胞として椎間板の恒常性維持のために重要な役割を担っている可能性を報告した。しかし、現段階ではこの髄核前駆細胞の椎間板内での実際の役割や存在意義については未知な部分も多く残される。一方で我々は、この椎間板髄核細胞のコロニー形成能を調べた実験において、全椎間板髄核細胞集団から細胞表面抗原の Tie2 陽性、且つ、GD2 陽性の細胞をソーテリングすることで、より高い確率で球状コロニーの作成が出来ることを確認し、この二つの表面マーカーのコンビネーションが髄核前駆細胞の特異的マーカーであることも報告している。この椎間板由来髄核前駆細胞において神経系マーカーの一つとされる GD2 抗原が陽性であるという事実は、神経とは異なる中胚葉に由来するとされる椎間板髄核細胞の神経系 lineage への分化能の可能性を示唆するものとも推察できる。実際に *in vivo* の研究において椎間板の変性や椎間板ヘルニア等に起因した髄核組織由来の神経誘導因子の分泌は確認されており、髄核細胞と神経系細胞との密接な関係性を指摘する報告も散見される。しかしながらこれまでに椎間板髄核細胞から胚葉特異性の異なる神経系 lineage への完全なる誘導の報告は少ない。

本研究では、髄核前駆細胞の椎間板内での役割の解明の一助となること、またその細胞の応用による再生医療技術開発を期待して、髄核組織から分離培養した髄核前駆細胞の RT-PCR を施行しその遺

伝的性質を検証し、さらに神経系 lineage の一つであるシュワン細胞への髄核前駆細胞の分化能力を検証した。

【考察と展望】

本研究では、種々の幹細胞マーカーを用いて髄核前駆細胞の RT-PCR を施行し遺伝子発現特性を確認したところ、Nestin、Musashi-1、Sox2、Notch-1、Sox9、Nanog の発現を認めていた。Nestin、Musashi-1、Sox2 は神経幹細胞のマーカーとしてしばしば用いられているが、近年、様々な臓器における成体幹/前駆細胞のマーカー候補ともされている。また、Notch-1、Sox9 は神経堤細胞のマーカーとされる遺伝子であるが、この RT-PCR の結果と髄核前駆細胞の自己複製能や多系統への分化能を考慮すると、髄核前駆細胞は神経幹細胞や神経堤細胞を含む神経系前駆細胞に類似した遺伝子発現を持つ成体幹/前駆細胞であることが示唆された。

次に、髄核前駆細胞の役割とその能力の検証のために、神経系 lineage の一つであるシュワン細胞への誘導を試みた。Dezawaらが報告した既存のシュワン誘導培養法を髄核前駆細胞へ用いシュワン細胞への分化誘導を施行したが、髄核前駆細胞は誘導後に分化誘導以前の細胞とは異なる双極性の紡錘状のシュワン細胞に類似した細胞へ形態変化し、さらに免疫染色においてもシュワン細胞に特異的とされるS100およびGFAPが陽性であり、髄核前駆細胞もシュワン細胞へ形態的に類似した細胞へと分化誘導できることを確認した。

シュワン細胞は、損傷神経において、その修復・再生の要となる細胞とされる。損傷された神経ではワラー変性と呼ばれるミエリン鞘の自壊と共にシュワン細胞の増殖と活性化が起こる。このシュ

ワン細胞は軸索の再伸長を促すThe neurotrophins nerve growth factor (NGF)やbrain derived neurotrophic factor (BDNF)といった神経栄養因子を産生すると同時に、自身がthe bands of Büngnerと呼ばれる再生軸索の足場を形成したり、再生軸索のミエリン鞘を形成する事で損傷神経の修復と再生を促すとされる。実験的に得られたシュワン様細胞が機能的にもこのシュワン細胞と同等のものであるかを確認するために本研究では、マウス坐骨神経切断部へ髄核前駆細胞誘導後シュワン様細胞を充填した人工神経管を移植し、その神経再生を組織学的に検証した。移植後12週の免疫染色では、神経切断中央部において、切断後に再生したと思われる軸索の再伸長を認め、加えてその周囲にも並列するGFP陽性の誘導後シュワン様細胞の生存・生着を認めた。これは移植後のシュワン様細胞が再生軸索のミエリン鞘を形成したものと考えられた。電子顕微鏡においても同様に移植細胞がシュワン細胞と同様に末梢神経の組織的修復と再生に寄与したことが確認された。

続いて、誘導後シュワン様細胞の神経切断部への移植後の神経機能の回復を、下肢運動機能を評価するFoot print test、および、感覚神経機能を評価するHot water behavior testで評価したが、いずれも良好な機能的回復を認め、髄核前駆細胞誘導後シュワン様細胞が通常のシュワン細胞と同じように、形態的のみならず機能的にも類似した性質を持ち、末梢神経再生に寄与したものと考えられた。

本当に髄核前駆細胞が神経系細胞への分化能を有するのか。この事実は単に髄核前駆細胞の未分化の証明に過ぎないのか、あるいは

生体内でも意味のある事なのか。この疑問に対する考察は、椎間板性疼痛や椎間板ヘルニアの病態からも可能である。椎間板性疼痛においては、変性椎間板内で、軸索の成長刺激や神経細胞による侵害受容に関係するとされる The neurotrophins nerve growth factor (NGF) や The brain derived neurotrophic factor (BDNF) といった神経栄養因子の上昇を認め、その作用により椎間板内の繊維輪や髄核へ侵害受容性神経の進入がおこり、その結果疼痛を認めることが報告されている。また、椎間板ヘルニア時の神経根性疼痛においては、突出した髄核組織による神経根への直接圧迫に起因した下肢痛に加えて、外部環境に突出し暴露された髄核組織から生じた NGF や BDNF 等のサイトカインによって血管-神経バリアーが破綻し、神経内部浮腫、血流の低下、神経根周囲の充血、血管透過性の亢進、内皮細胞の活性化が引き起こされることでも神経根由来の下肢痛が惹起されることが報告されている。いずれの病態においても発生期以降の厚い線維輪構造に取り囲まれ無血管で低酸素の免疫特権を持つ特異な椎間板周囲環境が、経年的あるいは外力等による変性や椎間板ヘルニアなどの病因によって破綻し髄核組織が周辺環境に暴露された結果、神経損傷時のシュワン細胞と同じように髄核組織由来の NGF や BDNF の産生がなされ、周辺環境にさらに変化を与えていくという病態が考えられる。この過程において、椎間板内に存在する髄核前駆細胞がシュワン細胞を含む神経系 lineage へ分化誘導され、その結果 NGF や BDNF といった神経栄養因子の分泌がなされ则认为るのは想像に難くない。この一連の流れが、椎間板組織の恒常性維持機構の中でどういった意味を持つ事象であるのかを解明していくのは今後の課題であるが、本研究結果は、椎間板の恒常性維持に

における髄核前駆細胞の機能的役割の解明の一助となるものと確信している。

本研究の限界として、マウス髄核細胞を用いた実験であり、動物種により髄核細胞の形質は異なるとする報告もあることから、今後、人を含む他の種でもさらなる実験・検討が必要であると考えている。

【結論】

椎間板由来髄核前駆細胞は神経幹細胞に類似した遺伝子発現を持っており、その神経系 lineage への分化能力を *in vivo* と *in vitro* において確認した。

本結果は、今後椎間板由来髄核前駆細胞の役割や機能を解明していく上での一助となると考える。