

臍帯血，臍帯組織幹細胞を用いた新規細胞治療の開発

麦島秀雄¹⁾，松本太郎²⁾，藤井里奈¹⁾，谷ヶ崎博¹⁾，石毛美夏¹⁾，
小林寿美子³⁾，野呂知加子⁴⁾，鈴木 孝⁵⁾

Development of novel cell therapies using stem cells in umbilical cord blood and cord tissue

Hideo MUGISHIMA¹⁾，Taro MATSUMOTO²⁾，Hiroshi YAGASAKI¹⁾，Mika ISHIGE¹⁾，
Sumiko KOBAYASHI³⁾，Chikako NORO⁴⁾，Takashi SUZUKI⁵⁾

要旨

本研究では，種々の幹細胞マーカーを指標に臍帯に存在する幹細胞・前駆細胞のスクリーニングを行い，同定した細胞の形質解析，機能解析を行った。その結果，臍帯動静脈の内皮近傍や，臍帯動静脈筋層とWharton's jellyの境界部に異なった幹細胞マーカー発現プロファイルを示す細胞群が集族していることが明らかになった。これらの中からp75 neurotrophin receptor (p75NTR) 陽性で神経細胞やグリア細胞での分化能を示す神経堤幹細胞などが同定された。臍帯血や臍帯は分娩後，ほぼ無侵襲的に採取され，その利用に関しては倫理的な問題も少ないため，難治性神経疾患など多くの疾患に対する細胞治療への応用が期待される。

1. はじめに

臍帯血には，造血幹細胞以外にも間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) や，血管内皮前駆細胞といった幹細胞や前駆細胞が存在することが明らかになっている。最近米国において脳性麻痺の小児に自己臍帯血を移植して症状が改善されたことが報告され，日本でも臨床試験が開始されている。また臍帯や胎盤といった胎児付属物の中に存在する幹細胞・前駆細胞についても再生医療の細胞ソースとして研究が進められている。たとえば臍帯の結合組織であるWharton's JellyにはMSCが比較的豊富に存在し，骨，軟骨，脂肪といった間葉系に由来する細胞の他，神経系の細胞や肝細胞などへの分化能を有することが報告されている¹⁾。その一方でこれら胎児付属物に含まれる幹細胞・前駆細胞の種類や局在，特異的マーカーについては不明な点が多い。そこで本研究では，ヒト臍帯を種々の幹細胞マーカーを用いた免疫組織学的検討により幹細胞の局在解析を行った。そして神経堤由来細胞マーカーであるp75 neurotrophin receptor (p75NTR) を指標にした

免疫組織化学的検討や，神経堤に由来する細胞系列を追跡できる遺伝子改変マウスを用いた検討により，臍帯組織に神経堤由来未分化細胞が存在するかを検索し，さらにその細胞の形質や分化能を検討した。

2. 対象および方法

(1) 実験動物

動物実験は日本大学医学部動物実験運営内規に従って行った。神経堤由来細胞特異的にGFP (green fluorescent protein)を発現するP0-Cre/Floxed-EGFPダブルトランスジェニックマウスは慶応大学医学部岡野栄之博士より供与を受けた。遺伝子改変マウスの飼育・繁殖，実験に関しては，日本大学遺伝子組換え実験実施規程に定める学長の確認をうけて実施した。

(2) ヒト臍帯

ヒト臍帯は，横須賀市立市民病院，日本大学医学部附属板橋病院および愛和病院で妊婦から予め同意

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
3) 日本大学医学部内科学系血液膠原病内科学分野
4) 日本大学生産工学部応用化学科
5) 日本大学薬学部薬学科
麦島秀雄：mugishima.hideo@nihon-u.ac.jp

を得，妊娠36週から39週に帝王切開または経膈分娩に伴い生じた破棄予定の胎児付属物から採取した。採取した臍帯は生理食塩水内で保存し，採取24時間以内に実験に用いた。ヒト臍帯を用いたすべての実験は，横須賀市立市民病院倫理委員会および日本大学医学部附属板橋病院 臨床研究審査委員会の承認の下に行った。ヒト臍帯の写真と模式図を図1に示す。

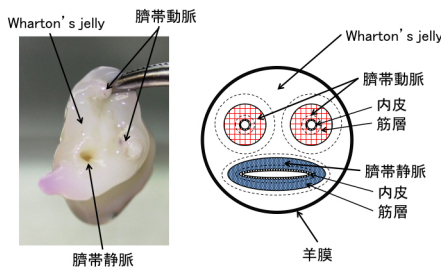


図1. 臍帯組織と模式図

(3) 免疫組織学的検討

ヒト臍帯組織は，4%パラホルムアルデヒドで固定後，OCTコンパウンドで包埋し，凍結組織切片標本を作製した。10%ヤギ血清，1%ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 Tris buffered saline (TBS) を1時間作用させ非特異的結合をブロックした後，一次抗体としてマウス抗ヒト p75NTR (1:100)，マウス抗ヒト CD90 (1:100)，ウサギ抗ヒト CD105 (1:100)，ウサギ抗ヒト CD146 (1:100)，ウサギ抗ヒト PDGFレセプターβ (PDGFRβ, 1:100)，ウサギ抗ヒトネスチン (1:100)，ウサギ抗ヒト von Willebrand factor (vWF, 1:5000)，ウサギ抗ヒト NG2 (1:100)，ウサギ抗ヒト CD34 (1:100)，マウス抗ヒト平滑筋αアクチン (ASMA, 1:100) 抗体を4℃下に一晩作用させた。二次抗体として Alexa 488ヤギ抗マウス IgG, Alexa 488ヤギ抗ウサギ IgG, Alexa 594ヤギ抗マウス IgG, Alexa 594ヤギ抗ウサギ IgG (すべて1:500) を室温下に1時間作用させた。5 μg/mlヘキスト 33342を室温下に15分間作用させ核染色を行った後，共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus Fluoroview FV10i) を用いてマーカー陽性細胞の局在や発現プロファイルを評価した。また臍帯組織から臍帯動脈を機械的に剥離後，酵素処理 (コラゲナーゼ type I : コラゲナーゼ type II : ディスパーゼ = 5 : 5 : 2) により細胞を単離

し，サイトスピン法を用いてスライドグラスに付着後，上記一次抗体および二次抗体を用いた蛍光免疫染色を行い，細胞の形質解析を行った。

(4) ニューロスフェアアッセイ

臍帯動脈から酵素処理をして単離した細胞を，ニューロスフェア培地に懸濁し，96 ウェル平底プレートに 1×10^4 / well の細胞密度で播種し，浮遊培養を行った。ニューロスフェア培地は B-27 supplement, 20 ng/ml 上皮成長因子 (EGF), 10 ng/ml 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2), 10 ng/ml 白血病阻止因子 (LIF) を添加した DMEM/F12 培地を用いた。培養7-10日目に形成されたスフェアを顕微鏡下に観察した。また形成されたスフェアをサイトスピン法を用いてスライドグラスに付着させた後，ネスチン，p75NTR に対する免疫細胞染色を行った。DAPIにて核染色を行った後，共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。また形成したスフェアの DNA 合成能を調べるため，スフェアへの 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) の取り込みを検討した。EdUアッセイは Invitrogen 社製のキットを用い，付属のプロトコールに従って実験を行った。

(5) 神経分化誘導

神経細胞への分化誘導は，臍帯動脈由来スフェアを96ウェル平底プレートに播種し，1 mM 2-メルカプトエタノール 添加 Minimum Essential Medium α (MEM α) 培地にて5% CO₂, 37℃で24時間培養した。その後，10% ウシ胎児血清 (FBS), 35 ng/ml オールトランスレチナール 添加 MEM α 培地にて3日間培養した。そして誘導開始5日目にフィブロネクチンコート8ウェルチャンバースライドに培養細胞を移し，10% FBS, 5 μM Forskoline, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml ヒト脳由来神経栄養因子 (BDNF) 添加 MEM α 培地で7日間培養した。4%パラホルムアルデヒドで4℃, 30分固定し，一次抗体としてマウス抗 microtubule associated protein 2 (MAP2, 1:100)，マウス抗 neurofilament 200 (NF200, 1:50)，マウス抗ヒトβIIIチューブリン (1:100)，マウス抗 oligodendrocyte marker O4 (O4, 1:50)，マウス抗ヒト glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:00) 抗体を4℃で一晩作用させた。二次抗体として Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG, Alexa 594 ヤギ抗マウス IgG

(すべて1:500) を室温下に1時間作用させた。DAPIを室温下に30分間作用させ核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。

(6) P0-Cre/Floxed-EGFPマウス胎仔血と臍帯の解析

雄性のP0-Cre/Floxed-EGFPマウスと雌性のCrlj:CD1 (ICR) マウスを交配し、妊娠15.5日 (E15.5) に胎仔を帝王切開で取り出した。2 mM EDTA添加 phosphate buffered saline (PBS) 1 mlが入った12ウェルディッシュに胎仔を入れ、臍帯を切断した。数分後、ディッシュに貯まった胎仔血をピペットで回収した後に臍帯を採取した。胎仔血は2mM EDTA添加PBS中に浮遊させ、溶血試薬を用いて溶血後、有核細胞を回収し、FACSCaliburフローサイトメーターとCellQuestソフトウェアを用いて、GFP陽性細胞の解析を行った。アイソタイプコントロールとして、ウサギIgG1を使用した。胎仔臍帯の免疫組織学的検討は、E15.5胎仔臍帯より凍結切片標本を作製し、抗原賦活後、1% BSA, 0.5% Triton X-100含有TBSにて透徹を行い、10%ヤギ血清, 1% BSA含有TBSにてブロッキングを行った。そして一次抗体としてウサギ抗GFP (1:1000) およびウサギ抗ラットp75NTR (1:5000) 抗体を4°Cで一晩作用させた。二次抗体としてAlexa 594ヤギ抗ウサギIgG (1:500) を室温下に1時間作用させた。ヘキスト33342を室温下に30分間作用させ核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像解析を行った。

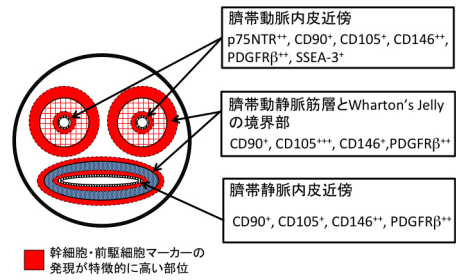


図2. 臍帯における幹細胞・前駆細胞マーカーの高発現部位

CD105, CD146, PDGFR β 陽性を示す細胞は臍帯動脈内皮近傍および筋層内に認められ、特にCD146およびPDGFR β 強陽性を示す細胞が臍帯動脈内皮直下に集簇していた。またWharton's jellyにおける幹細胞・前駆細胞の局在は、CD90, CD146陽性を示す細胞が、臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部に偏在して検出された。一方、CD105はWharton's jellyを構成する大部分の細胞にびまん性に発現が認められた。臍帯組織から酵素処理により単離した細胞の形質解析を行った結果、MSCマーカーとして知られるCD90, CD105, CD146を共発現する細胞や、Multipotent-differentiating stress enduring (MUSE) 細胞のマーカーとして知られるCD105, SSEA-3を共発現する細胞などが同定された (図3)。以上の結果より、臍帯動脈およびWharton's jellyには、異なった局在や幹細胞マーカー発現プロファイルを示す、数種類の幹細胞・前駆細胞が存在することが示唆された。

3. 結果

(1) ヒト臍帯の免疫組織学的検討

ヒト臍帯組織より凍結切片を作製し、神経堤由来細胞マーカー p75NTRや、MSCマーカー CD90, CD105, CD146, PDGFR β の発現や局在を検討した。血管構造との位置関係を明確にするために、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞をそれぞれ抗vWF抗体および抗ASMA抗体を用いて共染色を行った。その結果、検討した幹細胞・前駆細胞マーカーが重複して高発現する部位は、臍帯動脈の内皮近傍および臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部であった (図2)。p75NTR陽性を示す細胞は、臍帯動脈の内皮細胞直下のみに限局して認められた。CD90,

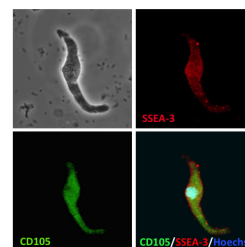


図3. 臍帯組織から単離・同定されたSSEA-3⁺ CD105⁺細胞

(2) 臍帯動脈p75NTR陽性細胞の形質解析

臍帯動脈内皮下に局在するp75NTR陽性細胞に注目して、MSCマーカー (PDGFR β , CD90, CD146)

や血管周皮細胞マーカー (NG2) の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、p75NTR陽性細胞は、PDGFR β 、CD90、CD146、NG2いずれのマーカーも共発現していることが明らかとなった。次にp75NTR陽性細胞の形質をより明確にするため、機械的に剥離した臍帯動脈から酵素処理により単離した細胞に対して蛍光免疫染色を行った。その結果、p75NTR陽性細胞の中には、小型球形でp75NTR強陽性を示す細胞と、それよりも大型で紡錘形のp75NTR弱陽性を示す細胞が存在することが明らかになった。いずれのp75NTR陽性細胞も、PDGFR β 、CD90、NG2陽性を示した。一方、これらの細胞は血管内皮細胞マーカーvWFや造血幹細胞マーカーCD34は陰性であった。以上の結果より、臍帯動脈内皮下に存在するp75NTR陽性細胞は、MSCや血管周皮細胞の形質を有していることが明らかになった。

(3) 臍帯動脈由来細胞のスフェア形成能および神経分化能の検討

次に臍帯動脈から単離した細胞が、神経幹細胞様の自己複製能と分化能を有するかを検討した。臍帯動脈より酵素処理により単離した細胞をニューロスフェア法にて浮遊培養を行った結果、培養2日目頃より、複数のスフェアが出現し、スフェアは徐々に増大し、培養7、8日目には直径約100 μ mに達した。スフェアを構成する細胞は細胞核に一致してEdUの取り込みが認められたことから、DNA複製能を有することが明らかとなった。スフェアの免疫組織染色を行った結果、スフェアを形成する大部分の細胞が神経幹細胞マーカーであるネスチンおよびp75NTRを発現していることが明らかになった。以上の結果より、臍帯動脈に由来する細胞にニューロスフェア形成能を有する神経幹細胞様の形質をもった細胞が存在することが明らかになった。形成されたスフェアをさらに神経分化誘導培地で培養した結果、神経細胞マーカーであるNF200、 β IIIチューブリン、MAP2陽性を示す双極性に長い突起を伸ばした細胞が認められるようになった。またグリア細胞分化誘導培地で培養を行った結果、アストロサイトマーカーであるGFAPやオリゴデンドロサイトマーカーであるO4陽性の紡錘型の形態を呈する付着細胞が誘導された。以上の結果より、臍帯動脈細胞に

由来するニューロスフェアが神経細胞およびグリア細胞への分化能を有することが示された。

(4) P0-Cre/Floxed-EGFPマウス胎仔を用いた神経堤由来細胞の局在解析

神経堤に由来する細胞をトレーシングできるP0-Cre/Floxed EGFPマウスの胎仔血を採取し、フローサイトメトリ解析を行った結果、胎仔血有核細胞中の約0.05%にGFP陽性細胞が検出された。また、P0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔の臍帯から凍結組織切片を作製し、抗GFP抗体にて免疫組織染色を行った結果、GFP陽性細胞が臍帯動脈内皮下に局在している所見が認められた (図4)。GFP陽性細胞の多くは内皮細胞に隣接するように存在していたが、内皮細胞にはGFPの発現は認められなかった。連続切片標本を用いた検討では、GFP陽性細胞の局在部位に一致してp75NTR陽性細胞が同定された。以上の結果より、出生直前のマウス胎仔血および臍帯動脈内皮下には、p75NTR陽性の神経堤に由来する細胞が存在することが明らかになった。

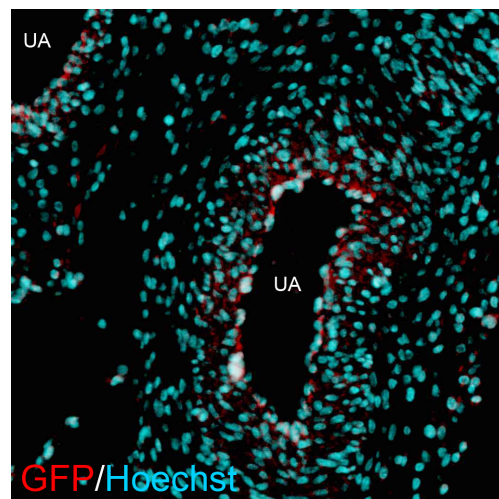


図4. 臍帯動脈内皮下に同定されたGFP+神経堤由来細胞 (UA: 臍帯動脈)

4. 考察

本研究では、免疫組織化学的検討により臍帯に存在する幹細胞・前駆細胞の形質と局在を明らかにした。MSCはプラスチックディッシュへの接着性と高い増殖能を有し、骨、軟骨、脂肪など間葉系細胞系列に分化できるという機能から定義された細胞である。国際細胞治療学会が定めたminimal criteria

では、MSCの陽性マーカーとしてCD105, CD73, CD90をあげている。この基準は培養MSCに当てはまるものであり、生体内に存在するMSCにこれらのマーカーがすべて発現しているとは限らない。今回の検討でも、各種幹細胞マーカーの局在部位は一致せず、それぞれ異なった分布を示した。このことから、臍帯組織には、その形質や発現マーカーが異なる複数の幹細胞・前駆細胞が存在することが示唆された。生体内におけるMSCマーカーとしてCD146²⁾やPDGFRβ³⁾が報告されている。PDGFRβはMSCの機能性マーカーとして有用であることも報告されている⁴⁾。p75NTRは神経堤由来細胞のマーカーとして知られているが、近年、生体内MSCマーカーとして有用であることも報告されている⁵⁾。今回の検討においてにおいて、p75NTR, CD90, CD105, CD146, PDGFRβといった複数のマーカーが陽性を示す細胞が観察された部位は、臍帯動脈内皮近傍と臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部であった。臍帯動脈筋層とWharton's jellyの境界部ではCD90, CD105, CD146陽性の細胞が集簇していたが、その部位はhuman umbilical cord perivascular cell (HUCPVC)として同定されている細胞の局在部位に一致した。HUCPVCは、骨髄MSCと類似した形質を示すが、骨髄MSCより増殖活性が高く、免疫原性が低いことが報告されている⁶⁾。既報によると、ヒト臍帯には骨、軟骨、脂肪といったMSCに特徴的な分化能を示す細胞のみならず、皮膚⁷⁾や、血管内皮⁸⁾、神経系^{9,10)}、肝細胞¹¹⁾などに分化する細胞が存在することが報告されている。さら

に免疫寛容性を示す細胞¹²⁾や、造血幹細胞ニッチとしての機能を持つ細胞¹⁾の存在も報告されている。今後、幹細胞マーカーの発現プロファイルを指標にこれらの幹細胞群を選別、増殖させ、その特性や機能を明確にすることにより、様々な疾患を対象とした細胞治療に応用していくことが期待できる(表1)。近年、MSCの一部には、ストレス耐性でES細胞に類似した多能性細胞(MUSE細胞)が存在することも明らかになっている¹³⁾。本研究において、臍帯動脈内皮下にMUSE細胞のマーカーとして知られているSSEA-3, CD105二重陽性細胞が少数ながら同定された。この所見は、臍帯組織にもES細胞様の多能性を有した幹細胞が存在する可能性を示唆している。

臍帯組織の免疫組織化学的検討により、臍帯動脈内皮下に限局してp75NTR陽性細胞が検出された。p75NTRは神経堤由来細胞のマーカーとして知られており、この細胞が胎生期の神経堤に由来する未分化細胞であれば、神経疾患などに対する治療用細胞ソースとしての臨床応用が期待できる。本研究により、p75NTR陽性細胞は、PDGFRβ, CD90, CD146, NG2といったマーカーを発現しており、MSCや血管周皮細胞の形質を有していることが明らかになった。Crisanら³⁾は骨格筋、膵臓、脂肪組織、胎盤など多くの組織で、血管内皮下にMSC活性を持つ細胞が存在し、この細胞の特徴としてCD146, PDGFRβ, NG2を発現していることを報告している。p75NTRはcolony-forming unit fibroblast (CFU-F)活性が高い生体内骨髄MSCのマーカーとしても知られてい

表1. 臍帯由来幹細胞・前駆細胞を用いた細胞治療の可能性

細胞種	マーカー分子	対象疾患
神経堤由来細胞	p75NTRなど	脊髄損傷、パーキンソン病、脳性麻痺
間葉系幹細胞 (治療用免疫制御細胞)	CD146, PDGFRβ, CD105など	GVHD、慢性炎症性腸疾患
造血ニッチ細胞 (臍帯血移植生着促進細胞)	SDF-1, Jagged1, nestinなど	再生不良性貧血
ES様多能性細胞	Oct3/4, Nanog, SSEA-3*/CD105*など	重症心不全、糖尿病など

ることから, 今後, p75NTR陽性細胞を単離し, CFU-F活性やMSCのような多分化能があるか検討する必要がある。

神経堤由来細胞をGFPでトレースできるP0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔を用いて, 解析を行った結果, マウス出生直前の臍帯動脈内皮下には, 神経堤に由来する細胞が存在することが明らかになった。この遺伝子改変マウスの結果より, ヒト臍帯動脈内皮下に存在するp75NTR陽性細胞も, 神経堤に由来する未分化細胞である可能性が高いと思われる。今後, Pax3, Twist, Sox10, Wnt1などの神経堤マーカーの発現を評価し, この細胞が神経堤由来細胞であることを確認するとともに, どのような分化段階にあるかを明らかにする必要がある。最近, Nagoshiらは, マウス発生の途中において神経堤由来細胞がaorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域から遊走して血中に入り, 胎仔肝に運ばれさらに出生直前には多分化能を維持したまま骨髄に分布していくことを明らかにした¹⁴⁾。今回の検討では, どのような経路で神経堤由来細胞が臍帯動脈内皮下に到達したか明らかではないが, P0-Cre/Floxed EGFPマウス胎仔の胎仔血中にもGFP陽性細胞が検出されたことから, 末梢血中に入った神経堤由来細胞が, 血管内皮を介して内皮下に遊走し定着した可能性が示唆される。

臍帯動脈から単離した細胞の自己複製能と分化能を検討した結果, ニューロスフェアアッセイにてスフェアを形成し, さらに神経細胞やグリア細胞への分化能を有することが明らかとなった。神経堤に由来する未分化細胞は, 神経堤由来幹細胞 (neural crest-derived stem cell: NCSC) と呼ばれ, 自己複製能と神経堤由来細胞への多分化能を有するといった特性を持つ¹⁵⁾。NCSCは胎児組織に豊富に存在するほか, 成体組織においても, 骨髄, 毛包, 脊髄後根神経節, 腸管, 皮膚などに微量に存在することが明らかにされている。NCSCに特異的なマーカーは確定していないが, p75NTRはNCSCをプロスペクティブに判定する良いマーカーであると考えられている。今回の実験にて形成されたスフェアは, 神経幹細胞に特徴的なネスチンとともに, p75NTRを発現していた。この所見は, 臍帯動脈組織中にもNCSCが存在することを示唆している。神経堤由来細胞, 特にNCSCは, その発生学的特徴から, 神経再生医

療への応用が期待される。一方, 成体組織中に存在するNCSCは非常に少なく, また採取が可能な組織も骨髄や皮膚に限られている。今回, 臍帯組織に神経堤由来未分化細胞を同定したことは, 胎児付属物由来幹細胞を用いた再生医療を目指す上で非常に意義深いと思われる。臍帯は, 分娩後は不必要な組織であり, 検体の採取に侵襲や倫理的問題はほとんど生じない。母体由来細胞の混入がなく, 免疫寛容性が高い。成体組織よりも未分化で増殖活性の高いNCSCが採取できる可能性が高いため, 増幅培養が容易であると思われる。今後, 効率的な細胞単離法や, 至適培養条件を確立することにより, 体外増幅法が確立すれば, 神経再生医療の強力な新規戦略となる可能性がある。

5. 結語

ヒト臍帯組織の免疫組織化学的検討により, ヒト臍帯組織には異なった形質を有するMSCが存在することが明らかになった。また神経堤由来細胞を系譜追跡できる遺伝子改変マウスを用いた検討などにより, 臍帯動脈内皮下にp75NTR陽性を示す神経堤由来未分化細胞の存在が明らかになった。臍帯組織はその採取に際し, 侵襲や倫理的問題がほとんどないため, 難治性神経疾患など様々な疾患を対象とした再生医療や細胞治療に応用していくことが期待できる。

謝辞

本研究は, 日本大学学術研究助成金総合研究 (総11-017継続 総10-027) による助成を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; **44 Suppl 1**: 60-69.
- 2) Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, *et al.* Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 2008; **36**: 1035-1046.
- 3) Crisan M, Yap S, Casteilla L, *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 301-313.
- 4) Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, *et al.* PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 1519-1528.
- 5) Bühring HJ, Battula VL, Treml S, *et al.* Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1106**: 262-271.

- 6) Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, *et al.* Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol* 2008; **86**: 121-136.
- 7) Schneider RK, Pullen A, Kramann R, *et al.* Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differentiation* 2010; **79**:182-193.
- 8) Alaminos M, Perez-Kohler B, Garzon I, *et al.* Trans-differentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2010; **223**: 640-647.
- 9) Fu YS, Cheng YC, Lin MY, *et al.* Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; **24**: 115-124.
- 10) Zhang HT, Fan J, Cai YQ, *et al.* Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation* 2010; **79**: 15-20.
- 11) Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 2009; **11**: 548-558.
- 12) Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, *et al.* Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 2865-2874.
- 13) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 8639-8643.
- 14) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, *et al.* Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2008; **2**: 392-403.
- 15) Nagoshi N, Shibata S, Nakamura M, *et al.* Neural crest-derived stem cells display a wide variety of characteristics. *J Cell Biochem* 2009; **107**: 1046-1052.