

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

梅原 亮

専攻分野：再生医学・免疫病態医学

コース：

指導教授：鈴木 登

主論文の題目：

Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice

(脊髄完全離断による脊髄損傷モデルマウスに対するヒト iPS 細胞由来運動神経細胞の移植)

共著者：

Nagisa Arimitsu, Masahiro Iinuma, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Asako Saito, Takao Kono, Yuji Ueda, Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Moroe Beppu, Noboru Suzuki

緒言

脊髄損傷は外傷などにより脊髄実質が損傷を受けることで、損傷部以下の知覚・運動・自律神経系の麻痺を呈する病態である。脊髄損傷を生じる病態には、外傷性の他に脊髄腫瘍などがあり、脊髄自体に病因がある場合は直接的・間接的な治療が困難な状況がある。哺乳類の中枢神経系は一度損傷を受けると再生能力は極めて低いため、それを補う再生医療に多大な期待が寄せられている。本研究では脊髄を1椎体分全切除し、その損傷部位にヒト iPS 細胞由来運動神経細胞を移植し、運動神経の再生に伴う下肢運動能力の回復を評価した。これにより、脊髄病変による脊髄損傷治療としての有効性について検討した。

方法・対象

①神経分化：まずヒト iPS 細胞を浮遊培養法で胚様体細胞 (Embryoid Body: EB) を形成させた。さらにその EB をファイブロネクチン固相下のディッシュ内で、レチノイン酸+Noggin+Sonic hedgehog の刺激下にて培養して神経細胞を得た。分化度は、神経分化マーカーである neural cell adhesion molecule (NCAM)、 Neurofilament M (NFM)、 β III tubulin、運動神経分化マーカーである HB9 の遺伝子発現および免疫細胞染色にて評価を実施した。

②細胞移植：マウスの Th12 椎弓を切除、脊髄を 1 椎体分全切除して脊髄損傷モデルマウスを作成した。脊損作成 9 日後にヒト iPS 細胞由来神経細胞を切除部位へ移植を行った (n=10)。コントロール群としては脊髄損傷のみのマウス (n=10) 及び正常マウスを用いた。

移植後は経時的に 6 ヶ月まで運動機能を、Basso Mouse Scale (BMS) スコアを指標に観察した。すなわち、観察基準として(1)足趾, (2)足関節, (3)膝関節, (4)股関節レベルでの運動の可・不可にて分類した。

評価終了後に脊髄をとりだし、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施し、十数椎体分の脊髄の俯瞰的観察と、移植局所の観察を詳細に行った。

動物実験委員会 承認 (TG121119-1 号)

結果

①神経分化：神経分化培養細胞の RT-PCR を用いた遺伝子発現の検討では培養開始 19 日後において、NFM、 β III tubulin、HB9 が陽性であった。さらにリアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子発現の半定量実験の結果では、未分化 iPS 細胞に比較して、培養 19 日目の神経分化細胞の HB9 遺伝子発現は 25 倍以上上昇していた。

同細胞の細胞浮遊液（移植に用いる形態）を用いた、フローサイトメーターでの NCAM 陽性細胞は 72.5%であった。

細胞免疫染色では、分化誘導培養開始 8 日後では神経幹細胞マーカーである Nestin が高発現していたが、19 日目には発現は減少した。一方培養開始 19 日目では神経分化マーカーおよび運動神経分化マーカー蛋白 (NFM、 β III tubulin、HB9) 双方の高発現を認め、適切な分化誘導方法であることを証明した。

②細胞移植：移植群は脊損後 16 日ころから下肢運動を認め始め、100 日ころ脊髄損傷のみの群との差が有意差を持って最大となり、固定された (MANOVA $P < 0.05$)。移植前のマウスでは、下肢は弛緩性の麻痺を生じており、各下肢の関節の運動は認めなかったが、移植後観察したマウスでは、足関節、膝関節、股関節の屈曲伸展の運動を認めるマウスが観察された。しかし、歩行に有用な支持機能としての回復までには至らなかった。

HE 染色での組織学的評価では、移植マウスの脊髄損傷部に、正常マウスと異なる形態の細胞（大型で核細胞質比も大きい）を多数認めており、iPS 細胞由来運動神経が定着したと考えた。さらに、その移植細胞の存在部位には、線維性成分がほとんど見られないのに対して、脊髄損傷のみのコントロールマウスでは損傷部分の周囲に多数のエオジン好性の線維性分とみられる所見を認めた。

考察

マウス発生時には、神経管由来の神経上皮細胞から脊髄運動神経が形成される。その神経分化は脊索から分泌される Sonic hedgehog に厳密に支配される。神経上皮細胞はレチノイン酸の刺激によく反応し、レチノイン酸の欠乏は神経管欠損につながる。さらには Noggin が神経分化

を促すことを鑑み、このレチノイン酸、Noggin、Sonic hedgehog の三因子をヒト iPS 細胞の培養刺激に使用し脊髄発生を模倣することで、我々は短時間で効率よく運動神経を作成した。

そのヒト iPS 細胞由来運動神経細胞を、脊髄の連続を完全に離断したモデルマウスへ移植することで、一定の運動機能の回復を示すことが可能であった。組織学的な解析により移植群において損傷部位に同細胞の生存が確認できたため、損傷部位へ定着し損失した脊髄の代替となっている可能性がある。最近の iPS 細胞を使用した脊髄損傷移植実験において、脊髄損傷部位の線維化およびグリア細胞の増殖が移植細胞遊走を著しく阻害し機能を低下させていることが明らかにされている。本研究にて移植神経細胞生着部分にほとんど線維性成分を認めなかったことは、移植神経細胞の残存神経細胞との関係に大きな影響を及ぼしたと推測する。その組織学的な自由度は、たとえば追加移植の可能性も考えられた。

結論

ヒト iPS 細胞由来運動神経移植は完全脊髄離断に対して有効であり、運動機能を回復させた。