

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

神野 崇生

専攻分野：脳神経外科学

コース：

指導教授：田中 雄一郎

主論文の題目：

Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex.

(ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞による脳皮質損傷モデルマウスへの移植応用)

共著者：

Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Tasuku Umehara, Asako Saito, Yuji Ueda, Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Takuo Hashimoto, Yuichiro Tanaka, Noboru Suzuki

緒言

脳血管障害患者は現在増加の一途をたどり、「寝たきりになる原因」の30%程度を占める。要介護原因でも脳血管障害が一位であり、22%近くを占めている。近年、幹細胞研究が飛躍的に進み iPS 細胞の導出に至り、失われた神経機能への再生医療が近未来の実現可能性を帯びて世界的に期待されている。今回我々は脳血管障害に対する神経細胞移植の臨床応用を目指し、脳卒中モデルマウスへのヒト iPS 細胞由来神経細胞移植の有効性を検証した。

## 方法・対象

①神経分化：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)、 $\beta$  III tubulin、皮質運動神経分化マーカーである Fezf2、Crim1、FoxP2、CTIP2 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：凍結金属を使用し脳損傷を来たした、脳卒中モデルマウスを作製した。その 7 日後に分化誘導後 8 日の上記神経細胞を細胞浮遊液の状態にして損傷部位直下の線条体内に移植した。片麻痺作成翌日より移植後 21 日まで運動機能評価 (Beam walking test、及び Rota rod test) を実施し、さらに移植後 3、7、21 日の移植脳の病理学的評価 (HE 染色および上記神経分化マーカーの免疫染色) を行った。

統計処理は MANOVA にて、 $p < 0.05$  を有意とした。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認を得たものである (承認番号：TG121119-1)。

## 結果

① 神経分化：神経分化培養細胞の遺伝子発現の検討では培養開始 8 日後において、NFM、 $\beta$  III tubulin、Fezf2、CTIP2 が陽性であった。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。

分化誘導培養開始 11 日後には、皮質運動神経分化マーカー蛋白 (NFM、 $\beta$  III tubulin、Crim1、FoxP2) の高発現を認めた。

②細胞移植：運動機能は両試験ともに有意差を持って改善した。この改善は移植後数日より観察された。病理学的には、移植細胞は移植部位より損傷部位へ遊走していた。また同細胞はCrim1 およびCtip2 が陽性であった。さらにヒト NCAM、NFM 共陽性移植神経細胞と、ヒト NCAM 陰性、NFM 陽性マウス固有神経細胞が、損傷部位において密接に共存している像を観察した。

## 考察

我々はヒト iPS 細胞より、比較的短時間で皮質運動神経を作成することに成功した。また同細胞浮遊液の脳内移植によって、脳卒中モデルマウスの片麻痺は有意差を持って改善した。

我々の過去のマウス胚性幹 (ES) 細胞およびマウス iPS 細胞を使用した研究で、レチノイン酸、Noggin、Sonic hedgehog の 3 因子を添加した培養方法において皮質運動神経細胞誘導が効率よく誘導されることを確認したが、この誘導方法はヒト iPS 細胞への応用が可能であった。

脳血管障害後の回復には、脳内神経回路の可塑性と、新たに作成された神経回路の果たす役割は極めて重要であると考えられている。我々は過去の研究の中で、損傷部位よりも直下の線条体に神経移植を実施し、移植細胞の遊走能を利用すると片麻痺の改善が著しいことを発見した。移植神経細胞は損傷部位へと遊走するが、我々はこの作用が損傷部位の残存細胞から分泌されるケモカインによることも明らかにしている。今回の研究でも移植細胞の損傷部位への遊走が同様に観察された。

脳卒中モデルマウスの片麻痺の改善は、移植後数日より観察されている。移植直後より、遊走中のヒト iPS 細胞由来移植神経細胞と、損傷部残存細胞との間に密接な関係が存在することが推察される。我々は神経移植による脳卒中モデルマウスの運動機能改善には、分子学的に二種類

の機序があると推察している。すなわち、(1) 移植後 1 週間程度までの早期では主に移植細胞とマウス固有細胞の間のケモカイン・成長因子等の液性因子を介した回復、及び (2) 移植後 2 週間以降の後期では損傷部位に到達した神経細胞とマウス固有細胞との細胞間因子を介した回復である。(1) の作用は損傷脳内の神経回路の可塑性に果たす役割が大きいと考えられ、また (2) の作用は新しい神経回路の形成に重要と考察する。

近年、米国では脳血管障害患者に対するヒト神経幹細胞の移植が実際に行われつつあるが、そのトランスレーションには移植細胞の確保や評価の困難性が指摘されている。本研究はそのいずれにも貢献できうる可能性を持つため、さらなる解析を進めたい。

## 結論

ヒト iPS 細胞由来皮質運動神経細胞移植は脳血管障害患者の治療法になり得る可能性がある。