

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：飯沼 雅央

専攻分野：整形外科

コース：

指導教授：仁木 久照

主論文の題目：

Induction of Neural Cells with Spinal Motoneuron Phenotype from Human iPS cells and the Transplantation to Totally Transected Spinal Cords in Mice. (脊髄全切断マウスにおけるヒト iPS 細胞由来神経細胞移植後の脊髄再生メカニズムの検討)

共著者：

Tasuku Umehara, Nagisa Arimitsu, Jun Shimizu, Hiroko Misawa, Kenji Takai, Naruyoshi Fujiwara, Atsushi Fujii, Yuji Ueda, Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Chieko Hirotsu, Moroe Beppu, Noboru Suzuki.

緒言

脊髄損傷は中枢神経系の再生能力の乏しさより、根本的治療はなく、対症療法のみが行われてきた。しかし、近年の再生医療の発展は、神経細胞移植が脊髄損傷の失われた神経を補う根本治療となる可能性を示唆している。我々は、脊髄損傷モデルマウスでの運動機能改善に対するヒト iPS 細胞 (Human Induced Pluripotent Stem cell) 由来分化神経細胞移植の有効性を検討した。

方法・対象

①神経分化:ヒト iPS 細胞を浮遊培養法で胚様体細胞を形成させた後にファイブロネクチン固相培養皿を用いて、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、HB9、Islet の遺伝子発現及び免疫細胞染色で評価を実施した。

②脊髄損傷マウスへの細胞移植：マウス (C57BL/6 系 5-12 週齢) の飼育は、the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8<sup>th</sup> Edition に基づき、聖マリアンナ医科大学遺伝仕組み換え実験安全委員会の承認を得たものである (承認番号 TG101126-TG11112)。マウスに麻酔を行い、Th11 レベルの椎弓切除を行い、脊髄を露出した後に先尖メスにて完全に 1 椎体分摘出を行った。摘出後スパーテルを用いて、脊髄が完全に切断されていることを確認、閉創した。脊髄損傷後 9 日目に、再度麻酔下に創部を展開、細胞移植群ではヒト iPS 細胞由来の運動神経細胞  $4.0 \times 10^5$  個を、対照群では、phosphate buffered saline (PBS) を投与した。細胞または、PBS 投与後は Thermo-reversible gelatin polymer (TGP)、骨セメントにて覆い閉創した。両群共に、他種免疫の予防のため免疫抑制剤を投与した。膀胱直腸障害に対しては、1 日 1 回手動的に腹圧排尿を行った。下肢運動障害により生じる下肢拘縮に対しては、連日下肢を 50 回程度他動的に運動させ、予防した。

③行動解析は Basso Mouse Scale (BMS) を用いて、脊髄損傷後第 1、3、6、8、9、13 日、その後は 2 週間ごとに評価を行った。また、細胞移植後 1 カ月及び 6 カ月目に、組織の病理学的評価 (HE 染色および神経分化マーカーの免疫染色) を行った。また、順行性のトレーサー Cholera Toxin  $\beta$ -subunit (CT  $\beta$ ) を、損傷部上部 Th10 レベルに投与し、24 時間後の移動評価を行った。統計処理は Multivariate analysis of variance (MANOVA)、Tukey 検定を用いて P 値 0.05 以下を有意とした。

## 結果

ヒト iPS 細胞を分化誘導すると運動神経系関連遺伝子の発現上昇が確認された。移植マウスでは歩行回復までには至らなかったが、足指の運動から始まり、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。BMS を用いて評価を行うと、移植群と脊髄損傷対照群に比べて、有意に下肢運動機能の回復を認めた ( $P < 0.05$ )。また、 Kaplan-Meier 曲線より、移植群では対照群と比較し有意に生存期間が延長した ( $P < 0.01$ )。

移植後一カ月目の組織を用いた HE 染色より、損傷部にマウスの脊髄由来の小さな丸い核を持つ細胞と、ヒト iPS 細胞由来の大きな紡錘形の細胞が認められた。免疫化学染色では、移植群において、ヒト核および NFM を共発現するヒト iPS 細胞由来の移植細胞を認めた。また、移植部位において神経系のマーカーである  $\beta$  III Tubulin、synaptophysin が損傷部に発現していた。グリア瘢痕を形成する Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 発現は、脊髄損傷対照群と比較し移植群で、発現が抑えられていた。また、移植群では Gal-C 陽性細胞が損傷部分で多く認められた。神経トレーサーである CT  $\beta$  により損傷上部から神経損傷部を乗り越えて尾部に向けての神経経路の流れを調べると、移植群・正常群のみ、尾側で CT  $\beta$  が確認できた。

#### 考察

我々はヒト iPS 細胞より、運動神経を作成することに成功し、同細胞浮遊液の脊髄損傷部位への移植によって、脊髄損傷モデルマウスの歩行障害は有意差を持って改善した。

脊髄損傷後の回復には、損傷部位での炎症、再生に対してグリア瘢痕に代表される阻害的減少を停止させることと、移植細胞により形成された神経回路による回復が寄与していると考えられるが、移植群での組織学的解析より、移植 1 カ月から GFAP の発現が抑えられていることより、グリア細胞の損傷部位の減少が見られ、損傷部のグリア瘢痕の形成が抑えられていると考えられた。また、損傷部位における神経系マーカーを発現するヒト由来細胞の存在から、移植細胞が神経細胞として定着し、再生に寄与していると考えられた。さらに移植部位において正常群と同等に HB-9 が発現しており、切断部に存在する Gal-C が移植群で多く発現を認めていることより、髄鞘の再構築の可能性が示唆された。

移植 6 カ月後において順行性のトレーサーとして CT  $\beta$  を損傷部上位に投与する検証では、移植部位を乗り越えて尾側へ移動が観察され、細胞

間の物質移動が移植群で起きている可能性が示唆された。

#### 結論

ヒト iPS 細胞から移植に適した運動神経を分化誘導することができ、この神経細胞を移植することで、脊髄損傷部位での神経修復と再生を目指すことが可能であることが示唆された。