

主論文要旨

論文提出者氏名：友近 顕

専攻分野：整形外科学

指導教授：仁木 久照

主論文の題目：

Transplantation of Human iPS Cell-derived Neural Cells with an Artificial Nerve Conduit Leads to Cellular Retention in the Transplanted Area and Improves Motor Function in a Mouse Spinal Cord Injury Model

(マウス脊髄損傷モデルにおける人工神経導管併用ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植は、移植部の細胞を保持し運動機能を改善する)

共著者：

Nagisa Arimitsu, Masanori A. Murayama, Chieko Hirotsu, Kazufumi Nagata, Kenji Takai, Jun Shimizu, Tsutomu Akazawa, Yoshiaki Torii, Tasuku Umehara, Masahiro Iinuma, Hisateru Niki, Noboru Suzuki

緒言

重度の脊髄損傷は、不可逆的な神経障害を惹起する。近年、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)を用いた脊髄損傷に対する再生医療の研究が行われ、臨床研究が始まっている。我々は過去に、胚性幹細胞およびヒト iPS 細胞から運動ニューロンを誘導、マウスへの移植実験において下肢運動機能の回復を報告している。本研究では脊髄損傷 (Spinal Cord Injury: SCI) モデルマウスを作成し、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞/前駆細胞(neural stem/progenitor cells: NSPCs)および人工神経導管 (Artificial Nerve Conduit: ANC) を併用することによる治療効果を評価した。

方法・対象

移植細胞は、ヒト iPS 細胞を 4 日間浮遊培養法にて胚葉体を形成し、フィブロネクチン固相培養皿で 4 日間培養した。1 μ M レチノイン酸、10 nM noggin-Fc、および 10 nM Sonic hedgehog protein の刺激下に培養し神経細胞を得た。SCI モデルマウスは次の手順で作成した。8-10 週

齢野生型雌性マウス (C57BL / 6J) の第 11 胸椎を腹腔内麻酔下に椎弓切除術し、直視下に脊髄を 3mm のブロック状に切断し摘出した。切断後 1 週間で移植手術を行った。ANC を併用し NSPCs を移植した群 (cell+conduit 群: n = 19)、NSPCs のみを移植した群 (cell 群: n = 34)、ANC のみを移植した群 (conduit 群: n = 18)、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) のみを投与した群 (PBS 群: n = 23) の 4 群にランダムに割り当てた。他種免疫反応の予防のため、免疫抑制薬を投与した。運動機能をオープンフィールドの Basso Mouse Scale (BMS) を用いて、SCI 前、翌日、以後 1 週間毎に 7 週目まで評価した。マウスは 7 週目に灌流固定し、厚さ 30 μ の脊髄薄切標本を作成した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および Neuro filament M (NFM)、ヒト核抗原 (hNuc) に対する抗体とともに免疫染色し観察した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学実験動物委員会より承認 (承認番号 TG180529-4) を受け、実験動物の管理と使用に関する指針第 8 版に則り実施した。統計は平均±標準偏差または中央値とし、グループ間の差を Steel-Dwass 検定により解析した。統計解析は JMP 8.0.2 を使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

各群の SCI 後 7 週目時点での BMS は cell+conduit 群: 2.79 ± 0.20 、cell 群: 1.68 ± 0.14 、conduit 群: 1.11 ± 0.14 、PBS 群: 0.7 ± 0.10 であり、cell+conduit 群は他の 3 群と比較し有意に高値を示した ($p < 0.0001$)。cell 群は PBS 群に対し有意に高値 ($p < 0.001$) であったが、conduit 群対 cell 群、conduit 群対 PBS 群では有意差を認めなかった。HE 染色において cell+conduit 群の脊髄内の細胞密度は cell 群と比較して高かった。免疫組織学的分析では、cell+conduit 群の脊髄内の NFM 陽性細胞の割合は $51.9 \pm 6.3\%$ であり、cell 群: $26.4 \pm 3.7\%$ ($p = 0.037$)、conduit 群: $2.83 \pm 0.66\%$ ($p = 0.028$)、PBS 群: $0.60 \pm 0.40\%$ ($p = 0.048$) と比較し有意に高値であった。同様に、損傷部における hNuc 陽性細胞の割合は cell+conduit 群は $55.8 \pm 7.4\%$ であり、cell 群: $29.3 \pm 3.3\%$ ($p = 0.037$)、conduit 群: $1.23 \pm 0.50\%$ ($p = 0.028$)、PBS 群: $0.40 \pm 0.24\%$ ($p = 0.027$) と比較し有意に高値であった。

考察

ANC の移植は、末梢神経領域において自家神経移植と同等の治療効果を示すことが知られており、ANC とヒト iPS 細胞の併用は、腫瘍形成なしに軸索再生と髄鞘形成を促進することが報告されている。本研究では SCI モデルマウスに ANC を足場として NSPCs を移植した。後肢運動機能は NSPCs に ANC を併用することで向上することが明らかになった。また

ANC 内に多くの hNuc 陽性細胞が存在し、移植細胞の定着が示唆され、さらに半数以上の細胞において NFM を発現していたことから、ANC 内で移植細胞の神経軸索に分化が促され、後肢機能の改善に寄与したのではないかと考えた。

結論

NSPCs 含有 ANC の移植は損傷した神経の再生を促し運動機能を改善させた。ANC を併用した神経細胞移植は、SCI 患者の治療の選択肢となり得る。