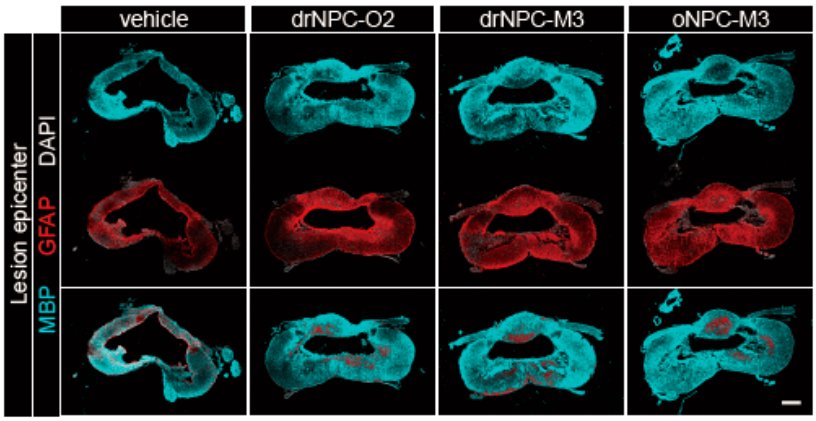
192　ヒト体細胞由来神経幹細胞移植による脊髄再生	横田　和也

【目的】これまでに我々は脊髄損傷に対する幹細胞移植の治癒機転メカニズムの一部を明らかにしてきた。しかし、過去の研究で用いられてきた胎児由来組織の神経幹細胞を再生医療へ応用するためには、倫理的問題が解決されない限り困難であると考えられる。iPS 細胞や ES 細胞を代表とする多能性幹細胞も脊髄損傷に対する細胞移植療法の細胞源として候補に挙げられるが、移植後に腫瘍形成の危険性を孕んでおり、安全性が担保されているわけではない。腫瘍化しない安全な多能性幹細胞由来の神経幹細胞導入方法も未だ確立されていない。我々はヒト体細胞から神経幹細胞への直接誘導法（Direct reprogramming）を開発した。この手法は、ヒト血液中の造血幹細胞に特定の初期化遺伝子を導入することで、2 週間という短い培養期間かつ 40%という非常に高い効率で神経幹細胞（drNPCs : directly reprogrammed neural precursor cells）を作製することができる。この手法を用いれば、iPS 細胞に比べて、効率よく短い期間で神経幹細胞を作製することが可能で、かつ胎児組織由来の神経幹細胞が有する倫理的問題も解決することができる。本研究の目的は、脊髄損傷に対するヒト体細胞由来神経幹細胞移植の効果を明らかにすることである。

【方法】メス成体の免疫不全ラットを使用し、脊髄損傷モデルラットを作製した。脊髄損傷 2 週後に drNPC を損傷部周囲（頭側に 2 箇所、尾側に 2 箇所）に移植した。免疫組織学的解析・遺伝子発現解析で神経幹細胞の性質や細胞移植の効果について調査した。運動機能評価で損傷後ラットの運動機能の推移を調査した。

【結果】1. 神経幹細胞が *in vitro* で 3 系統に分化することを確認した。2. 神経幹細胞が *in vivo* で 3 系統に分化することを確認した。3. 移植した神経幹細胞が生着し、脊髄損傷後の髄鞘再生に寄与していることを明らかにした。4. 異なる培養条件の神経幹細胞移植を比較し、候補を 3 つに絞り込んだ。5. 神経幹細胞移植が、脊髄損傷後の残存髄鞘を増加させることを明らかにした。6. 神経幹細胞移植が、頚髄損傷後の機能回復を促進させることを明らかにした。今回、我々はヒト体細胞由来神経幹細胞移植が脊髄損傷後の組織修復や機能回復を促進することを明らかにした。移植された drNPC は移植後 3 ヶ月経過した時点でも損傷脊髄内に生着しており、免疫拒絶を受けることなく生着し得ることが確認できた。また生着した移植細胞による腫瘍形成も認められなかった。神経幹細胞はヒト体細胞から直接誘導されて形成された細胞で、神経系の細胞へ分化誘導し易く、臨床応用を考慮する上で有用だと考えられる。生着した細胞は、オリゴデンドロサイトやニューロンに分化することで、脊髄損傷後の髄鞘形成を高める働きをしていた。また、移植細胞が神経系の細胞に分化し、組織的な再生に寄与しただけではなく、移植した細胞が発現する液性因子が損傷脊髄に対して保護的に機能した可能性も考えられた。

ヒト体細胞由来神経幹細胞移植が脊髄損傷部の髄鞘修復を促進する。



192. ヒト体細胞由来神経幹細胞移植による脊髄再生

横田　和也

労働者健康安全機構 総合せき損センター 整形外科

Key words：脊髄損傷，細胞移植，神経再生

緒　言

これまでに我々は脊髄損傷に対する幹細胞移植の治癒機転メカニズムの一部を明らかにしてきた［1］。しかし、過去の研究で用いられてきた胎児由来組織の神経幹細胞を再生医療へ応用するためには、倫理的問題が解決されない限り困難であると考えられる［2，3］。iPS 細胞や ES 細胞を代表とする多能性幹細胞も脊髄損傷に対する細胞移植療法の細胞源として候補に挙げられるが、移植後に腫瘍形成の危険性を孕んでおり、安全性が担保されているわけではない［4］。腫瘍化しない安全な多能性幹細胞由来の神経幹細胞導入方法も未だ確立されていない。我々はヒト体細胞から神経幹細胞への直接誘導法（Direct reprogramming）を開発した。この手法は、ヒト血液中の造血幹細胞に特定の初期化遺伝子を導入することで、2 週間という短い培養期間かつ 40%という非常に高い効率で神経幹細胞（drNPCs：directly reprogrammed neural precursor cells）を作製することができる。この手法を用いれば、iPS 細胞に比べて、効率よく短い期間で神経幹細胞を作製することが可能で、かつ胎児組織由来の神経幹細胞が有する倫理的問題も解決することができる。本研究の目的は脊髄損傷に対する drNPCs 移植の効果を明らかにすることである。

方　法

1.　実験動物

成体（8 週齢、メス）の免疫不全ラットを使用した。

2.　脊髄損傷作製

ラットを全身麻酔後、第 7 胸髄圧挫損傷モデル・第 6 頚髄圧挫損傷モデルを作製した。損傷後、傍脊柱筋を縫合し、皮膚を縫合した。麻酔から覚醒し、体温が元に戻るまで体温管理を専用チャンバーで行った。脊髄損傷 2 週後に drNPC を損傷部周囲（頭側に 2 箇所、尾側に 2 箇所）に移植した。

3.　免疫組織学的解析

再度麻酔下に経心臓的に生理食塩水で実験動物を脱血後、4%パラホルマリンで還流固定した。採取した脊髄をさらに 4%パラホルマリンを用いて 4℃で 24 時間固定した。その後 10%スクロース 24 時間、30%スクロース 24 時間で脱水し、OCT コンパウンドで包埋し、液体窒素で凍結後－20℃で使用するまで保存した。脊髄の凍結切片はクライオスタットで 20 μm の厚さで作製し、スライドガラスに付着させて作製した。免疫染色のために 10%ヤギ血清を含む 0.01% TritonX-100 で 60 分ブロッキング後に一次抗体と反応させた。一次抗体を 12 時間 4℃で反応させた。切片をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、Alexa Fluor 蛍光標識二次抗体と反応させた（Invitrogen、Carlsbad、USA）。核染色は DAPI を使用した。画像は BZ-9000 顕微鏡システム（Keyence、Osaka、Japan）もしくは蛍光顕微鏡（BX51：Olympus、Tokyo、Japan）で撮影した［5］。

4.　定量的 PCR

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit（Qiagen、Hilden、Germany）を用いて RNA を抽出した。採取された RNA は Oligo-dT プライマーと反応後、Primer Script Reverse Transcriptase（Takara、Shiga、Japan）を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA に変換して－30℃で保存した。定量的 RT-PCR は目的遺伝子特異的なプライマー、SYBR Premix Dimmer-

Eraser（TaKaRa）、相補的 DNA の混合液 20μl で行った。各遺伝子の発現レベルは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）で補正して比較を行った。

5. 定量的解析

頚髄損傷後の組織切片を上記の通りに作製した。矢状断脊髄組織切片上の髄鞘面積を BZ-9000 顕微鏡システム（Keyence）と BZⅡ-Analyzer（Keyence）を用いて定量化した

6. 運動機能評価

脊髄損傷後は 1 週おきに経時的な運動機能評価（Grip strength test）を行った［6］。

7. 統計解析

髄鞘面積については one-way factorial analysis of variance（ANOVA）with post-hoc Tukey-Kramer テストを用いて、$p<0.05$ を有意差ありとした。経時的な運動機能評価については two-way repeated-measures ANOVA with post-hoc Tukey-Kramer テストを用いて、$p<0.05$ を有意差ありとした。各データは平均±標準誤差で表示した。

結　果

1. 神経幹細胞が *in vitro* で 3 系統に分化することを確認した

神経幹細胞を培養後に免疫組織学的染色を行い、蛍光顕微鏡で撮影を行った。Nestin 陽性の分化能を維持する細胞が存在する一方で、O1 陽性のオリゴデンドロサイト、βⅢ-Tubulin 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイト、3 系統にそれぞれ分化することを確認できた（図 1）。

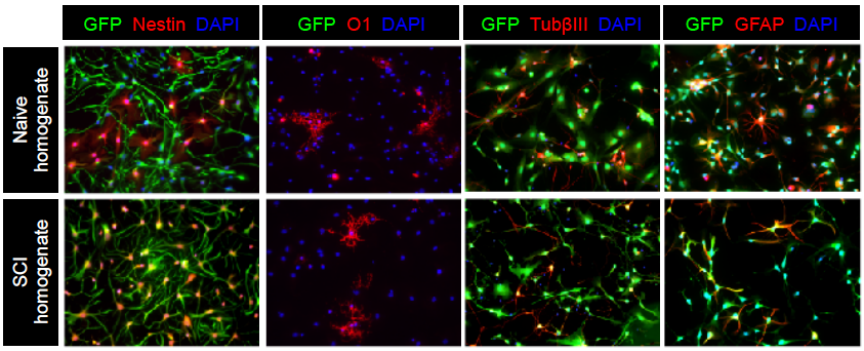


図 1. 神経幹細胞が *in vitro* で 3 系統へ分化能を有する

採取した神経幹細胞は Nestin 陽性の分化能を有する細胞であり、O1 陽性のオリゴデンドロサイト、βⅢ-tublin 陽性のニューロン、GFAP 陽性の細胞へと分化することを明らかにした。スケールバー：50μm。

2. 神経幹細胞が *in vivo* で 3 系統に分化することを確認した

胸髄損傷後の成体ラットに神経幹細胞を移植し、移植後 3 ヶ月の時点で脊髄の組織切片を作製した。免疫組織学的染色を行い、蛍光顕微鏡で撮影を行った。Nestin 陽性の分化能を維持する細胞が存在する一方で、APC 陽性のオリゴデンドロサイト、Fox3 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイト、3 系統にそれぞれ分化することを確認できた（図 2）。

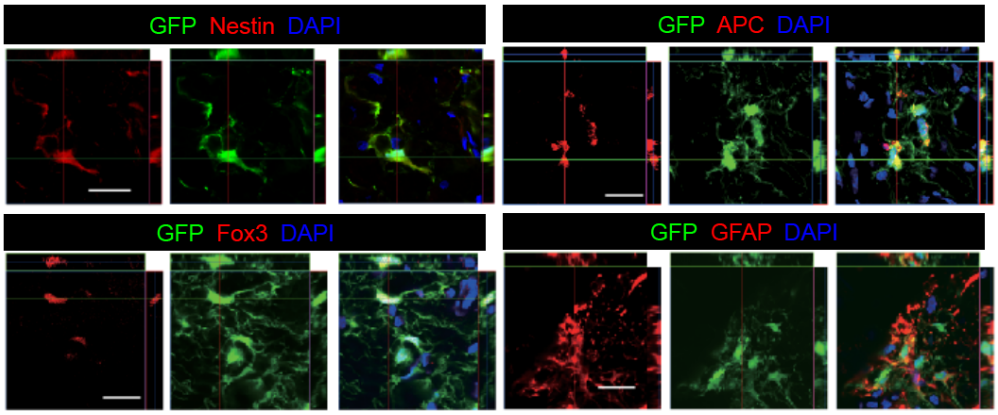


図 2. 神経幹細胞が *in vivo* で 3 系統へ分化能を有する

生着した神経幹細胞は Nestin 陽性の分化能を有する細胞であり、APC 陽性のオリゴデンドロサイト、Fox3 陽性のニューロン、GFAP 陽性の細胞へと分化することを明らかにした。スケールバー：20μm。

3. 移植した神経幹細胞が生着し、脊髄損傷後の髄鞘再生に寄与していることを明らかにした

胸髄損傷後の成体ラットに神経幹細胞を移植し、移植後 3 ヶ月の時点で脊髄の組織切片を作製した。免疫組織学的染色で、生着した神経幹細胞（STEM121 陽性細胞）の一部は、髄鞘のマーカーである Kv1.2 と Caspr が陽性であった（図 3）。移植された神経幹細胞は脊髄損傷後の髄鞘再生に寄与していると考えられた。

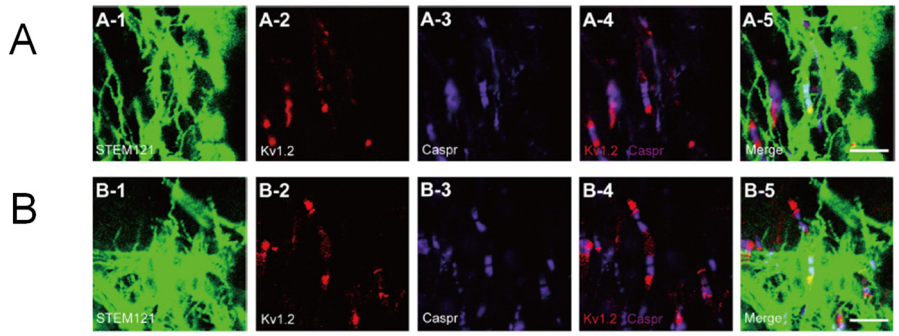


図 3. 神経幹細胞が髄鞘の再生に寄与している

STEM121（ヒト細胞マーカー）陽性である神経幹細胞は生着後にＫｖ1.2 陽性かつ Caspr 陽性を示しており、髄鞘形成を促進していることが推測された。スケールバー：5μm。

さらに我々は、この drNPC を実際にベッドサイドへ臨床応用するのに際して、適切な培養条件を調べるため、様々な培養条件下で神経幹細胞を培養し、その治療効果について比較した。また、この研究には脊髄損傷モデルとして、頚髄圧挫損傷モデルを採用した。これまでの報告では、動物モデルの脊髄損傷は中位から下位の胸髄損傷が採用されてきた。しかし、実際の臨床現場では脊髄損傷患者のうち約 60%が頚髄損傷患者と言われている。頚髄損傷後には、下肢機能だけではなく上肢機能や体幹機能も障害を受けるため、ヒトの臨床症状に即した研究を進めるためには頚髄損傷モデルへの細胞移植が必要であると考えた。頚髄損傷モデルを用いて細胞移植の効果を検討することとした。

4. 異なる培養条件の神経幹細胞移植を比較し、候補を 3 つに絞り込んだ

定量的 PCR の結果、オリゴデンドロサイトへの分化能の観点から、候補となる神経幹細胞の培養条件を 3 つ（drNPC-M3、drNPC-O2、oNPC-M3）まで絞り（表 1、図 4）、これら 3 種の神経幹細胞をラットの損傷頚髄に移植し、移植後の組織学的評価および細胞移植後の運動機能について調べた。

表 1. 候補となる神経幹細胞の各培養条件

Name of stem cells	Description of differences
M1(drNPC-M3)	EC23 + Shh + Vitronectin
M2	EC23 + Shh + Matrigel
M3 (oNPC-M3)	EC23 + Shh + Vitronectin (animal free version of B27 and N2)
M4	Rapid protocol to obtain M1-type cells
M5	drNPC spinal cord precursor cells

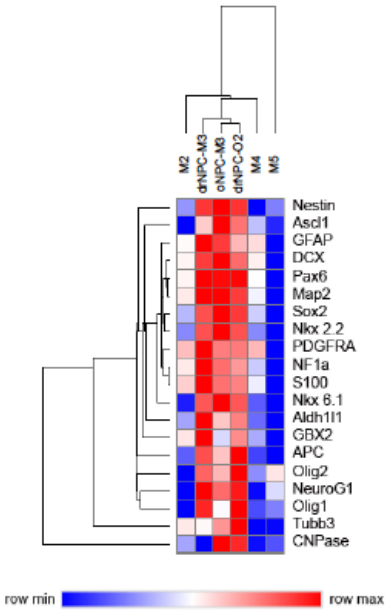


図 4. 神経幹細胞の遺伝子発現解析結果のヒートマップ
オリゴデンドロサイトの分化傾向が高いと思われる 3 種類の神経幹細胞グループを移植細胞の候補とした。

5. 神経幹細胞移植が、頚髄損傷後の残存髄鞘を増加させることを明らかにした

組織学的評価の結果、細胞移植によって残存面積は対照群（細胞移植なし）に比較して有意に多く、また残存髄鞘面積も多かった（図 5、6）。

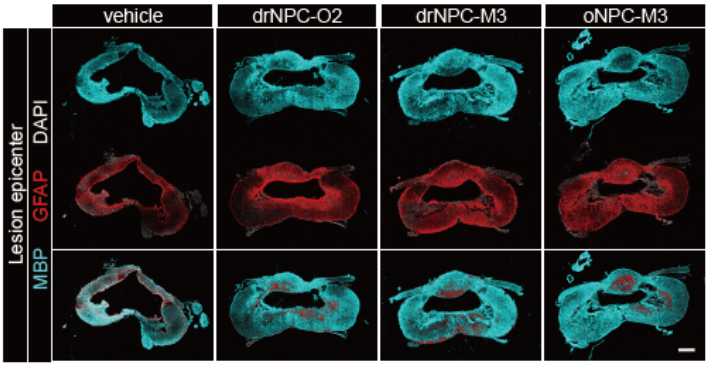


図 5. 神経幹細胞が脊髄損傷後の髄鞘修復を促進する
髄鞘マーカーである MBP ならびにアストロサイトマーカーである GFAP の各抗体を用いた免疫組織染色の結果を示している。損傷中央部では移植後の髄鞘面積が有意に増加している。スケールバー：500 μ m。

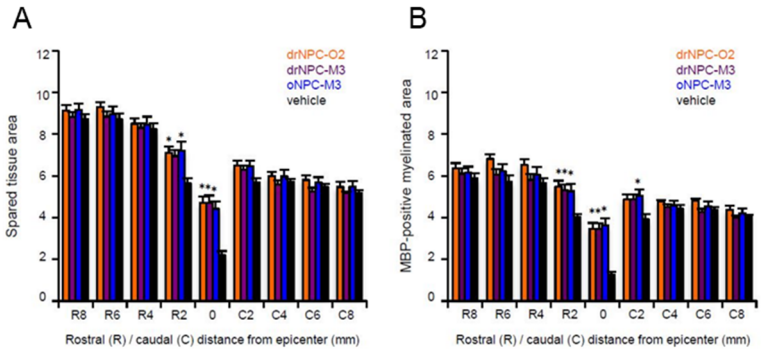


図 6. 神経幹細胞が脊髄損傷後の髄鞘修復を促進する。
残存する脊髄横断面面積（A）と横断面の MBP 陽性面積（B）の比較を示している。one-way factorial analysis of variance（ANOVA）with post-hoc Tukey-Kramer テストを用いて、$p<0.05$ を有意差ありとした。

6. 神経幹細胞移植が、頚髄損傷後の機能回復を促進させることを明らかにした

また、頚髄損傷モデルのラットに細胞移植を行い、移植後 3 ヶ月の時点まで運動機能解析を行った。Grip strength test では、細胞移植群が対照群に比較して有意な運動機能回復を示した（図 7）。

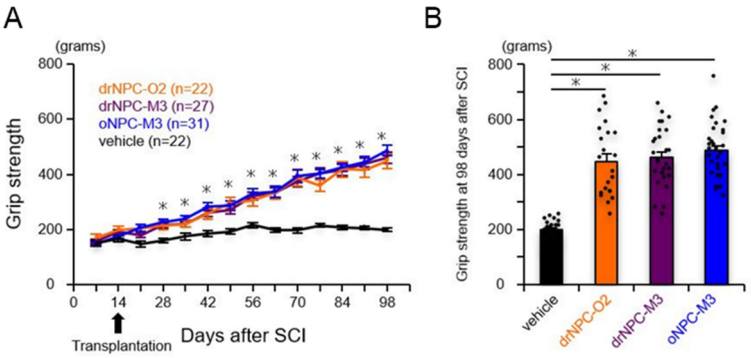


図 7. 神経幹細胞移植が脊髄損傷後の機能回復を促進する
A) Grip strength test を用いた運動機能評価による運動機能の推移を示している。神経幹細胞移植を施行された 3 グループでは有意な運動機能の改善を認めている。
B) 細胞移植後 3 ヶ月の時点での各群における Grip strength test の結果を示している。two-way repeated-measures ANOVA with post-hoc Tukey-Kramer テストを用いて、$p<0.05$ を有意差ありとした。

考　察

今回我々は drNPC を損傷脊髄に移植し、その治療効果の一部を明らかにした。移植された drNPC は移植後 3 ヶ月経過した時点でも損傷脊髄内に生着しており、免疫拒絶を受けることなく生着し得ることが確認できた。また生着した移植細胞による腫瘍形成も認められなかった。神経幹細胞はヒト体細胞から直接誘導されて形成された細胞で、神経系の細胞へ分化誘導し易く、臨床応用を考慮する上で有用だと考えられる。

生着した細胞は、オリゴデンドロサイトやニューロンに分化することで、脊髄損傷後の髄鞘形成を高める働きをしていた［7～9］。また、移植細胞が神経系の細胞に分化し、組織的な再生に寄与しただけではなく、移植した細胞が発現する液性因子が損傷脊髄に対して保護的に機能した可能性も考えられた［10］。

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶応義塾大学医学部電子顕微鏡研究室の芝田晋介先生である。

文　献

1) Yokota K, Kobayakawa K, Kubota K, Miyawaki A, Okano H, Ohkawa Y, et al. Engrafted Neural Stem/Progenitor Cells Promote Functional Recovery through Synapse Reorganization with Spared Host Neurons after Spinal Cord Injury. Stem cell reports. 2015;5(2):264-77. Epub 2015/07/21. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.004. PubMed PMID: 26190527; PubMed Central PMCID: PMCPMC4618657.

2) Nagoshi N, Tsuji O, Nakamura M, Okano H. Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells. Regenerative therapy. 2019;11:75-80. Epub 2019/06/28. doi: 10.1016/j.reth.2019.05.006. PubMed PMID: 31245451; PubMed Central PMCID: PMCPMC6581851.

3) Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, Momoshima S, Nakamura M, Okano H. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2011;8(4):668-76. Epub 2011/09/13. doi: 10.1007/s13311-011-0063-z. PubMed PMID: 21909829; PubMed Central PMCID: PMCPMC3250290.

4) Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, et al. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. Stem cell reports. 2015;4(3):360-73. Epub 2015/02/17. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.006. PubMed PMID: 25684226; PubMed Central PMCID: PMCPMC4375796.

5) Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, et al. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. Molecular brain. 2019;12(1):4. Epub 2019/01/11. doi: 10.1186/s13041-018-0422-3. PubMed PMID: 30626449; PubMed Central PMCID: PMCPMC6327522.

6) Forgione N, Karadimas SK, Foltz WD, Satkunendrarajah K, Lip A, Fehlings MG. Bilateral contusion-compression model of incomplete traumatic cervical spinal cord injury. Journal of neurotrauma. 2014;31(21):1776-88. Epub 2014/06/21. doi: 10.1089/neu.2014.3388. PubMed PMID: 24949719; PubMed Central PMCID: PMCPMC4186801.

7) Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, Itakura G, Kobayashi Y, Nishiyama Y, et al. Grafted Human iPS Cell-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells Contribute to Robust Remyelination of Demyelinated Axons after Spinal Cord Injury. Stem cell reports. 2016;6(1):1-8. Epub 2016/01/05. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.013. PubMed PMID: 26724902; PubMed Central PMCID: PMCPMC4719132.

8) Nagoshi N, Khazaei M, Ahlfors JE, Ahuja CS, Nori S, Wang J, et al. Human Spinal Oligodendrogenic Neural Progenitor Cells Promote Functional Recovery After Spinal Cord Injury by Axonal Remyelination and Tissue Sparing. Stem cells translational medicine. 2018;7(11):806-18. Epub 2018/08/08. doi: 10.1002/sctm.17-0269. PubMed PMID: 30085415; PubMed Central PMCID: PMCPMC6216444.

9) Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, et al. Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. Stem cells (Dayton, Ohio). 2011;29(12):1983-94. Epub 2011/10/27. doi: 10.1002/stem.767. PubMed PMID: 22028197.

10) Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, Fehlings MG. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. Stem cells and development. 2012;21(12):2222-38. Epub 2011/11/17. doi: 10.1089/scd.2011.0596. PubMed PMID: 22085254; PubMed Central PMCID: PMCPMC3411361.