

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10932

研究課題名(和文) iPS由来GABAergic neuron移植による難治性疼痛治療

研究課題名(英文) Treatment of chronic pain utilizing GABAergic neuron derived from iPS

研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI, Hidenori)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30393432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植によりホスト脊髄の神経系細胞と移植細胞由来の介在ニューロン、運動神経、感覚神経との間で新たなシナプスが形成されていることが確認された。頸髄髄節機能の回復に伴い、上肢運動機能の改善が得られることが確認された。感覚機能評価では、異常疼痛の軽減(withdrawal test, tail flip test)が得られていることを確認した。組織学的な定量評価を行い、NuN陽性の小型の抑制系ニューロンの損傷脊髄内の生着を確認するとともに、ホスト脊髄ニューロン間での抑制系のシナプス活動を確し、疼痛軽減効果にこのあらたな抑制系のシナプス活動が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疼痛である脊髄障害性疼痛に対し、新たな治療法の可能性を示せたことは、臨床上大きな意義があると考えている。動物実験段階から早期に前臨床試験に移行することが望まれる。

研究成果の概要(英文)：We revealed new synaptic formation between host spinal neurons and interneurons differentiated from grafted cells. We showed the recovery of upper limbs motor function following the recovery of cervical spinal segment. In the evaluation of sensory function, the treatment reduced allodynia and inhibitory neurons were migrated in the injured spinal cord in histological analysis. In patch clamp test, inhibitory synaptic activity were recorded between host spinal neurons and grafted interneurons. These restricted synaptic activity may effect on reducing allodynia in mice with severe spinal disorder.

研究分野：脊椎脊髄病

キーワード：脊髄損傷 疼痛 神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疼痛患者では、下降性抑制系を介した疼痛フィードバック機構が破綻しているとの報告が散見される(**Clin Exp Rheumatol (29)S109-17,2011**)。しかし、実臨床においては認知行動療法による治療介入のみであり、有効な治療手段を持ち合わせてない。この経路において、脊髄レベルで最終的に末梢の疼痛制御を行うのは、脊髄後角に存在する介在ニューロンである。しかしこれらの抑制系神経細胞の機能調整などに直接的に介入する治療法は、試みすら行われていないのが現状の慢性疼痛治療である。

末梢神経障害性疼痛に対する **GABAergic neuron** の移植治療の効果についてはわずかながら報告がなされているが(**Pain 2016.157(1):S42-7.**)、使用されてきたモデルが末梢神経障害モデルである点と、臨床応用的な観点からは移植細胞の安全性に関して大きな問題点を抱えている。一方、重度脊髄障害に対する再生医療については、細胞移植療法などの基礎的な研究成果により、臨床的にも新たな治療方法が現実のものとなりつつある。私達もこれまで脊髄損傷モデルに対する細胞移植、**scaffold** 移植、神経栄養因子補充などの研究成果を報告してきた。さらには、本研究で使用する移植細胞に関して、細胞の増殖能、分化能、腫瘍化のリスクを含めた安全性、さらには、実際の脊髄損傷モデルに対する移植実験などの結果を報告してきた(**Stem Cells Transl Med. 2015 Jul;4(7):743-54. Stem Cells Dev. 2013 Feb 1;22(3):383-96. J Cell Physiol. 2010 Mar;222(3):515-21.**)。

こうした私達のこれまでの研究成果とノウハウを踏まえ、脊髄損傷後の最も過酷な難治性疼痛に対する、新たな治療法の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

我が国では、実に **200** 万人以上の慢性疼痛患者が、いままさに耐え難い異常疼痛に苦しんでいる。革新的な医療技術が進歩しつつある現在でも根本的な治療法はなく、絶望的な状況に変化はない。本研究の目的は、難治性疼痛患者に対する新規治療法の開発である。我が国で開発された **iPS** 細胞技術を応用し、この困難な疾患に対しても新しい治療の可能性をもたらすことである。基本的な治療戦略は、脊髄後角レベルでの痛み入力制御を、移植細胞を介して行うことである。下降性抑制系を介した、脊髄レベルでの疼痛制御の主役は抑制系ニューロン(**GABAergic Neuron**)である。具体的には、**iPS** 細胞由来の神経幹細胞(**iPSCs-NPCs**)を培養・分化させ、頸髄損傷モデルに移植を行う前臨床研究である。

## 3. 研究の方法

(1)脊髄障害性疼痛モデル: 10 週齢の C57/BL/6J mice を使用する。全身麻酔下(吸入麻酔)に、第 5-6 頸椎椎弓を展開し、これを椎弓切除した後、圧挫損傷を脊髄に加え、頸髄損傷マウスを作成する。マウスの全身管理と疼痛管理を行いながら、1 ヶ月の飼育を行い慢性期頸髄損傷マウスモデルを作成する。治療開始前に感覚機能評価を行い、疼痛過敏・異常疼痛の程度が正規分布に従う個体のみを事前に selection する。これにより各種評価の際の統計学的なばらつきを抑制し、必要最小数での実験評価を得られるよう努力する。予備実験として、脊髄障害性疼痛モデルとして最も妥当な損傷程度を数種類の脊髄損傷モデルを作成して検証する。

(2)細胞培養: mouse **iPS** 細胞由来の神経幹細胞(**iPSCs-NPCs**)を使用した(STEM CELLS AND DEVELOPMENT 22(3):383-396)。PiggyBac Transposon という遺伝子導入を行わない方法で **iPS** 細胞が作成されており、安全性の高い手法が用いられている。またすでに GFP labeling にて標識されているとともに誘導された NSC は未分化性が非常に低く腫瘍化の危険性が極めて低い cell

line である。iPSCs-NPCs 細胞の expansion には特殊な操作や技術は必要なく、一般的な神経幹細胞の培地での継代培養を継続する。GABAergic ニューロンへの分化についても過去の報告のプロトコール(Nature Protocols 8, 1670-9, 2013)に従って移植細胞の準備を行う。

(3)細胞移植: iPSC 細胞から誘導された抑制系介在ニューロンは、各マウス頸髄に 10 万×4 が所移植とし、移植には micro injection 用の装置を使用する。また移植後は免疫抑制剤 (cyclosporine) の継続的な使用が必要である。正常群、PBS 移植群、細胞移植群の 3 群を作成とする。

(4)感覚機能評価・行動学的評価: 運動・感覚機能評価として、治療前・後、各週での評価を行う。評価項目は von Frey test、Thermal test、BMS score、Inclining test である。これにより臨床現場で実際に評価を行っている神経学的所見を網羅できる。脊髄損傷後 4 ヶ月目まで(細胞移植後 2 ヶ月)経時的に評価を継続する。その後、得られたデータについての統計学的な処理を行う。

(5)電気生理学的評価: In vivo patch clamp 法: 頸髄スライスを作成し、還流液中で GFP 発色している移植細胞の patch clamp を施行する。シナプス電位などの活動電位測定を行い、ホストニューロンとのシナプス形成について確認する。また、移植細胞が実際に抑制系の介在ニューロンとして脊髄後角ニューロンとシナプス結合を生じた上で、脊髄組織内にて抑制系神経系伝達を行っているのかについても評価を行う。

(6)組織評価: 還流固定を施行した後、頸髄の連続凍結切片を作成する。

LFB/HE staining: 形態計測、髄鞘化面積の計測を行う。

Immunohistochemistry: 各種神経系細胞マーカー、また未分化マーカー、腫瘍化マーカーを染色し、移植細胞の動態、分化能、腫瘍化の評価を行う。cell count を施行してすべてのマーカーにおいて定量的な評価を行う。また host 脊髄の評価として、GABA や CGRP などのマーカー染色を行い、体積計測を行うことで、疼痛抑制効果についての定量的な評価を行う。

#### 4. 研究成果

ChABC による細胞移植前の前治療により、CS56 で染色される CSPG 領域は著明に縮小していた(図 1)。ChABC 前治療を細胞移植前(iPS-NSC+ChABC 群)に行うことにより、神経前駆細胞移植単独群(iPS-NSC 群)と比較して、より良好な移植細胞の生着が確認された(図 2)。

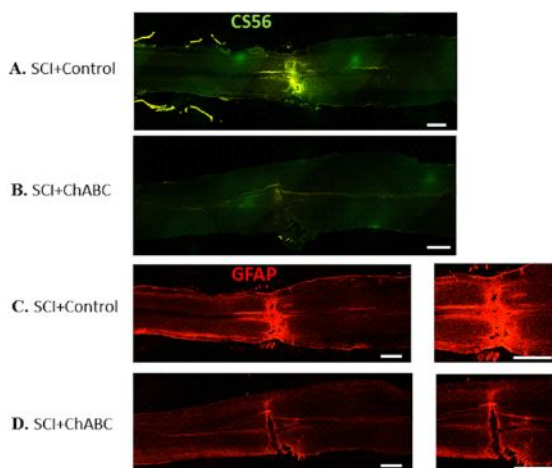


図 1 CSPG 領域の縮小とグリオシスの抑制

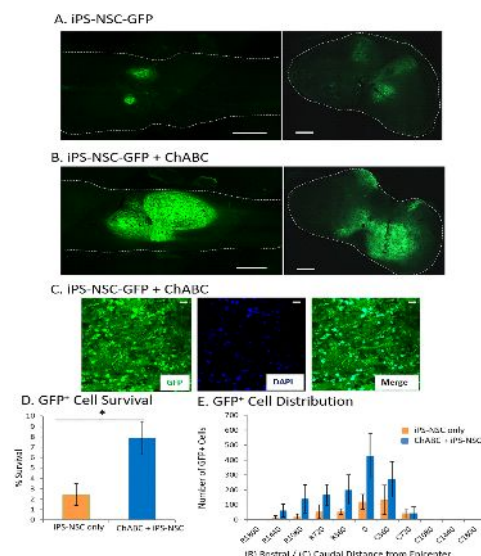


図 2 併用療法により、より多くの移植細胞が生着グリーンがラベルされた移植細胞

免疫電顕による解析から、移植細胞はホスト脊髄とシナプスを形成しており（黒ドットが細胞由来の GFP）、移植細胞由来の神経細胞神経突起を逆にホスト由来のオリゴデンドロサイトが取り囲み髄鞘化をサポートしている様子が観察された（図 3）。組織学的には移植細胞とホスト脊髄間にて新たなシナプス形成が確認されたが、このシナプスが本当に神経回路として活動を行っているのかどうかについて確認を行うこととした。Ex vivo patch clamp テストを行うと、この新たなシナプスは、グルタミン受容体やアセチルコリン受容体といった、興奮性/抑制性シナプス活動を積極的に行っていることが示された（図 4）。

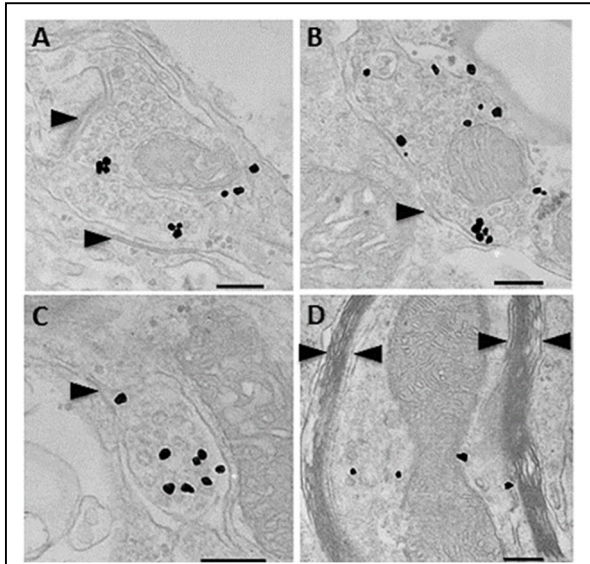


図 3 免疫電顕によるシナプス評価。黒い部分が移植細胞由来のもの。A-C:ホストと移植細胞由来の神経細胞が新たなシナプスを形成（黒ドット）

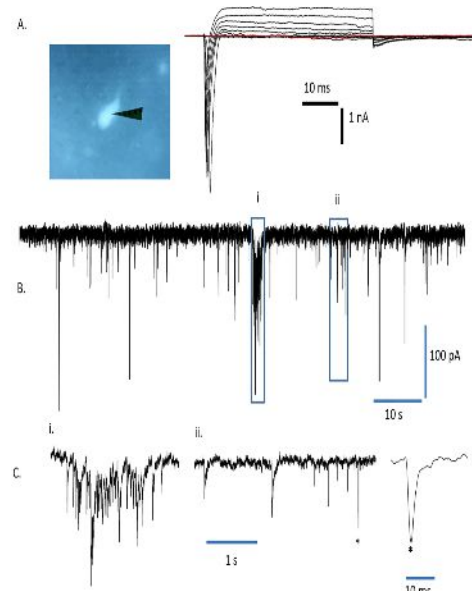


図 4 ex vivo patch clamp test により、移植細胞から分化誘導した運動神経のシナプス活動を測定した。i/ の 2 種類のシナプス活動が確認できる。

すなわち、移植細胞が神経細胞に分化し、本来脊髄に存在した神経細胞との間に新たなシナプス形成を生じ、新たな神経ネットワークを構築していることが示されたわけである。さらに電気生理学的な評価として Motor Evoked Potential (MEP) を、C2 脊髄刺激にて小指外転筋で MEP を測定すると、細胞移植群と ChABC 併用群にて有意に電位の回復が得られていた（図 5）。細胞移植に伴う局所神経回路の回復と髄鞘機能の改善が得られた結果であろうと考えている。

移植細胞は主にはオリゴデンドロサイトとニューロンに分化しており、その一部は再髄鞘化に寄与していた。過去の報告でもこの移植細胞は髄鞘化による機能再建に大きく関与していることが報告されている 4)。

最後に、各種の運動機能評価を行うと、上肢機能の指標として、握力 (Grip strength) が治療に伴い改善していた。また CatWalk といわれる歩行解析の結果、上肢 (Forelimbs) の swing speed が改善しており、上肢に力をいれて素早く動かす動作を、治療に伴い獲得できていたことが示された（図 7）。併せて、痛覚過敏の評価である、Tail Flip test にて、治療群にて有意にアロデニアの抑制効果が認められた（図 6）。

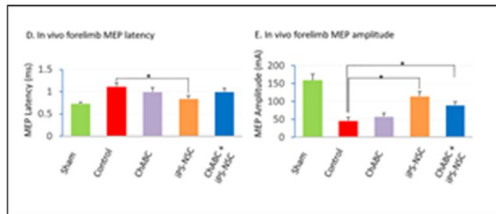


図5 電気生理学的評価 (Motor Evoked Potential)

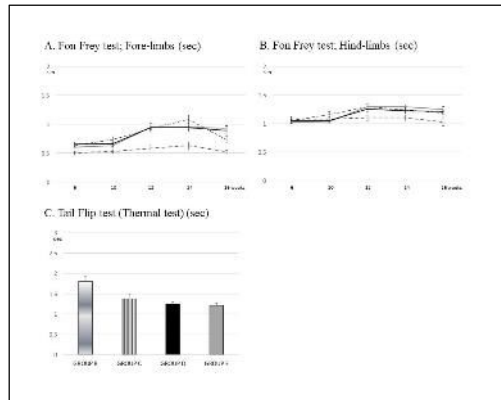


図6 アロデニアの軽減

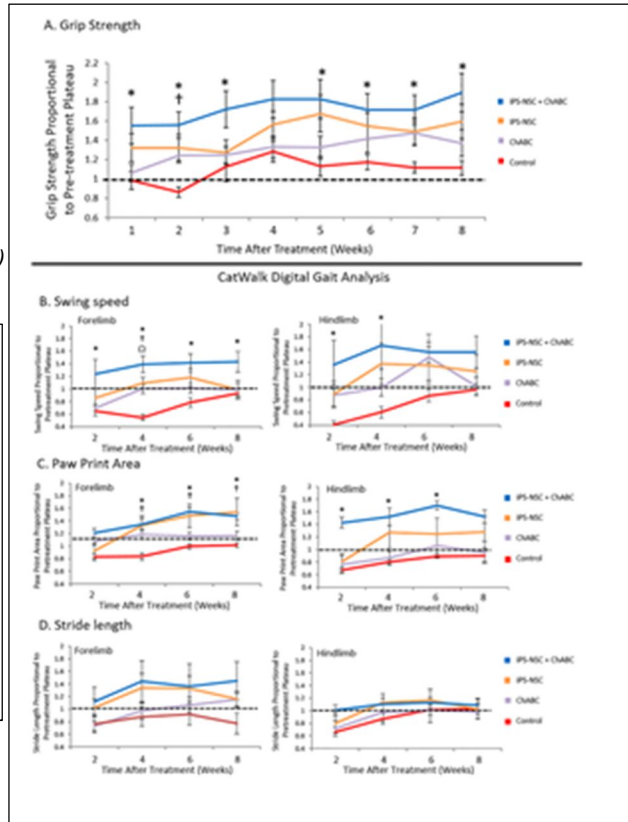


図7 運動機能の改善。握力(grip strength)と上肢を動かす素早さ (forelimb swing speed) が治療に伴い改善していた。

参考文献

- 1) Suzuki H, Ahuja CS, Salewski RP, Li L, Satkunendrarajah K, Nagoshi N, Shibata S, Fehlings MG.: Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury. PLoS One. 2017 Aug 3;12(8):e0182339.
- 2) <https://spinalnewsinternational.com/spinal-news-international-issue-46-march-2018/>
- 3) Salewski RP, Buttigieg J, Mitchell RA, van der Kooy D, Nagy A, Fehlings MG. The generation of definitive neural stem cells from PiggyBac transposon-induced pluripotent stem cells can be enhanced by induction of the NOTCH signaling pathway. Stem Cells Dev. 2013; 22(3):383-96.
- 4) Salewski RP, Mitchell RA, Li L, Shen C, Milekovskaia M, Nagy A, Fehlings MG. Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Mediate Functional Recovery Following Thoracic Spinal Cord Injury Through Remyelination of Axons. Stem Cells Transl Med. 2015 4(7):743-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hidenori Suzuki, Shuichi Aono, Shinsuke Inoue, Yasuaki Imajo, Norihiro Nishida, Masahiro Funaba, Hidenori Harada, Aki Mori, Mishiya Matsumoto, Fumihiro Higuchi, Shin Nakagawa, Shu Tahara, Satoshi Ikeda, Hironori Izumi, Toshihiko Taguchi, Takahiro Ushida, Takashi Sakai	4. 巻 15(3)
2. 論文標題 Clinically significant changes in pain along the Pain Intensity Numerical Rating Scale in patients with chronic low back pain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0229228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 秀典, 田口 敏彦	4. 巻 40
2. 論文標題 【痛みのインターベンショナル治療up to date】診断的治療 非特異性腰痛の診断と疫学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ペインクリニック 40(別冊春)	6. 最初と最後の頁 S3-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木秀典、寒竹司	4. 巻 31(6)
2. 論文標題 慢性期グリア瘢痕の克服と細胞移植	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脊椎脊髄ジャーナル	6. 最初と最後の頁 571-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidenori Suzuki, Christopher S. Ahuja, Ryan P. Salewski, Lijun Li, Kajana Satkunendrarajah, Narihito Nagoshi, Shinsuke Shibata, Michael G. Fehlings	4. 巻 Aug 3
2. 論文標題 Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PlosOne	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182339">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182339</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 鈴木秀典	4. 巻 69(4)
2. 論文標題 iPS細胞を用いた慢性期の頸髄損傷治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 334-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 鈴木秀典, 寒竹司, 田口敏彦, Christopher S. Ahuja, 名越滋人, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 慢性期頸髄損傷に対する細胞移植療法
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木秀典, 寒竹司, 田口敏彦, Christopher S Ahuja, Ryan P. Salewski, Li Lijun, Kajana Satkunendraraja, 名越滋人, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 iPS 細胞を用いた慢性期の頸髄損傷治療
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenori Suzuki, Christopher S. Ahuja, Ryan P. Salewski, Lijun Li, Kajana Satkunendrarajah, Narihito Nagoshi, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury
3. 学会等名 International Spinal Cord Society (ISCOS) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidenori Suzuki, Christopher S. Ahuja, Ryan P. Salewski, Lijun Li, Kajana Satkunendrarajah, Narihito Nagoshi, Tsukasa Kanchiku, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury
3. 学会等名 Neuro Trauma 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木秀典, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 iPS細胞を用いた慢性期の頸髄損傷治療
3. 学会等名 第29回日本末梢神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木秀典、寒竹司、Christopher S Ahuja、Ryan P. Salewski、Li Lijun、Kajana Satkunendraraja、名越滋人、田口敏彦、Michael G. Fehlings
2. 発表標題 iPS 細胞を用いた慢性期の頸髄損傷治療
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木秀典 他
2. 発表標題 iPS細胞を用いた慢性期の頸髄損傷治療
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Hidenori Suzuki , Christopher S. Ahuja , Ryan P. Salewski , Li Lijun, Kajana Satkunendrarajah, Narihito Nagoshi , Toshihiko Taguchi, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidenori Suzuki , Christopher S. Ahuja , Ryan P. Salewski , Li Lijun, Kajana Satkunendrarajah, Narihito Nagoshi , Toshihiko Taguchi, Michael G. Fehlings
2. 発表標題 Neural stem cell mediated recovery is enhanced by Chondroitinase ABC pretreatment in chronic cervical spinal cord injury
3. 学会等名 Annual Meeting of Cervical Spine Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寒竹 司  (KANCHIKU Tsukasa)  (30464324)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授   (15501)	
研究分担者	田口 敏彦  (TAGUCHI Toshihiko)  (40179594)	山口大学・大学院医学系研究科・教授   (15501)	
研究分担者	篠田 晃  (SHINODA Koh)  (40192108)	山口大学・大学院医学系研究科・教授   (15501)	