

令和元年5月12日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20048

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来運動神経細胞を用いた神経再支配による麻痺筋の新規治療戦略

研究課題名(英文) New Strategy for Reconstruction of Denervated Muscles Using Motor Neuron Progenitors Derived from Mouse ES Cells

研究代表者

新海 宏明(Shinkai, Hiroki)

愛知医科大学・神経内科・客員研究員

研究者番号：50770898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：下位運動ニューロンの機能障害に対し、末梢神経内にES細胞由来運動神経前駆細胞(MNPCs)を移植することで、筋の神経再支配による機能改善を検討してきた。ラット・マウスの坐骨神経を切断後に断端神経管内へMNPCsを移植し、異種移植の場合はFK506投与による免疫抑制を行った。移植部の細胞生着についての組織学的評価、神経断端の電気刺激による腓腹筋収縮の有無、腓腹筋湿重量の測定を行い、ラットはin vivo imaging system: IVISによる移植細胞の経時的変化も解析した。結果、概ねMNPCs移植によると思われる末梢神経の機能改善を認めた。今後、更なる解析を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異種移植での免疫抑制下における細胞移植によって末梢神経機能再建が得られた。免疫抑制は神経再生に重要で、免疫のコントロール次第で移植細胞の生着もしくは腫瘍化が生じるものと考えられる。組織学的に移植部分に移植細胞を認めずとも神経刺激による筋収縮を認めた。さらに移植のための免疫抑制のよりよい方法、腫瘍化をきたす未分化細胞の除去を行うこと、移植細胞の動態を調べることで、最終的にはヒト神経細胞のヒト末梢神経への移植により、ヒトの末梢神経障害による麻痺筋の機能再建をなすことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to re-control the denervated muscle in case of lower motor neuron dysfunction by the transplantation of ES cell-derived motor neuron progenitors (MNPCs) into the injured peripheral nerve.

After the transection of the sciatic nerve of rats / mice, MNPCs were implanted into the nerve stump. In case of xenotransplantation, immunosuppression by FK506 was also used. We performed histological evaluation of cell engraftments in transplanted area, functional analysis of the contraction of gastrocnemius muscle by electrical stimulation of nerve stump, and measurement of gastrocnemius muscle wet weight. Functional improvement of peripheral nerves were considered to be accomplished by MNPCs transplantation, though further analysis is required.

研究分野：手外科

キーワード：末梢神経機能再建 運動神経前駆細胞 細胞移植 脱神経筋の神経再支配

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床における末梢神経損傷に対しては、主に自家神経移植、同種神経移植(免疫抑制薬使用)、人工神経移植、神経移行術が行われているが、損傷神経の欠損が長い場合(霊長類では3cm以上、ラットでは1cm以上)では、手術的治療による完全回復は困難であるといわれる(Siemonow, M., & Brzezicki, G. *Int Rev Neurobiology*, 2009)。

申請者の所属する研究室では、末梢神経損傷モデルラットの末梢神経管内に胎児由来運動神経細胞を移植し、末梢レベルでの運動機能再建を目指した研究がおこなわれていた。そこでF344/NJcl8週齢ラットの坐骨神経を切断後1週間の急性末梢神経損傷モデルを作成し、神経の遠位末梢断端へ胎生14日目のラット胎児由来運動神経細胞を 1×10^6 個移植し、12週後に筋湿重量、電気刺激による筋収縮にて評価を行った。その結果、移植後12週で機能的電気刺激(FES)によって有効な筋収縮を得ることができた。その歩容の変化や神経の組織学的評価を行い、胎児由来運動ニューロンの移植治療の有用性について報告している(Kurimoto, S., *J Tissue Eng Regen Med* 2013)。また、脱神経筋と切断した末梢神経を組織学的に評価し、脱神経筋の神経再支配を確認した(Kato, S., *Nagoya J. Med. Sci.* 2015.)。胎児由来運動ニューロンの移植治療を行ったラットの筋湿重量の有意差から、神経再支配した筋肉の萎縮が抑制されたことも示されている。これらの結果は、末梢神経損傷モデルにおいて胎児由来運動ニューロンの移植治療が、運動機能の回復に有効な治療となり得ることを示していた。しかし胎児由来細胞は、十分な細胞数が得られないこと、倫理的な問題などから、臨床応用するために多能性幹細胞(胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞))の利用を検討した。

近年、神経再生のための細胞のリソースとしてiPS細胞の利用が期待され、特に脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経幹細胞の移植の有用性が報告されている(Nori et al., *PNAS* 2009, Kobayashi et al., *PloSOne* 2010)。多能性幹細胞は、前述の胎児由来神経細胞の利用における問題点を解決し得るのみならず、発生初期段階の胚盤胞における内部細胞塊に相当する、高い可塑性を持つ細胞であるため、運動ニューロンのような発生の初期に生み出される投射型ニューロンをも効率的に大量に誘導し得るという利点を持つ。したがって、申請者が目指している末梢レベルでの運動機能再建において、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から分化誘導した運動神経細胞は、より実用的な移植細胞のソースとなり得ると考えられ、運動機能の再建に効率的に寄与し得ると考えた。そこで、前述の多能性幹細胞を用いた脊髄損傷治療の研究において、慶應義塾大学の研究チームにおいて移植用の多能性幹細胞由来神経幹細胞の開発を行った実績を持つ、愛知医科大学の岡田洋平准教授の研究チームとの共同研究により、プロジェクトを推進することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢神経損傷モデルの動物に対して、中枢から連続性を絶たれている末梢神経への運動神経細胞移植により運動単位を機能させ、機能的電気刺激によって機能再建を成すという新しいコンセプトの麻痺治療を打ち立てることである。

3. 研究の方法

これまで報告されているマウスES細胞株(EB3)にCAG-EGFPやCAG-CBR-IRES-Venusを導入したマウスES細胞株(Okada et al., *Stem Cells* 2008, Kumagai, G. et al. *PLoS One*, 2009)をレチノイン酸(RA)とPurmorphamine(Shhアゴニスト)の存在下で運動神経細胞へと分化誘導する(Okada et al., *Dev Biol* 2004)。接着分化1,2,4週目に細胞を固定し、Hb9やIsl-1などの運動ニューロンマーカー、ChAT(Choline acetyl transferase)のような成熟運動ニューロンのマーカーに対する免疫染色を行い、誘導した運動ニューロンの評価を行った。また、マウスES細胞株間の分化誘導効率の違いも検討した。予備実験では、分化誘導後1週間で約20%のHB9陽性運動ニューロンを誘導できることを確認した。

動物はマウス・ラットの脛骨神経切断モデルを過去の報告(Batt et al., *J Vis Exp.* 2013)に準じて脛骨神経を切断し、近位断端を筋層内に埋没させた。先行実験でこのモデルの腓腹筋湿重量の経過について明らかにした。移植実験を進めるうちに、hostの動物の差異によって結果がまちまちであったため、免疫機能の観点から用いた動物はCD1マウス、NOD-scidマウス、129X1/SvJmsマウス、C57BL/6マウス、FK506を投与したF344/NJclラットである。

マウスES細胞(CAG-EGFPまたはCAG-CBR-IRES-Venus)から分化誘導した運動神経細胞を、切断した遠位側の脛骨神経へ移植し、経時的にIn vivo imaging system (IVIS)にて移植細胞の生着を評価した。また、移植後1・2・4週目に腓腹筋湿重量(筋萎縮を反映)、電気刺激による腓腹筋収縮力評価、NCV(amp,DL)評価、神経組織評価、免疫染色(HB9, Isl-1, ChAT, SMI-32, NFなど移植細胞の評価)、筋肉組織評価、HE染色(atrophy評価)、免疫染色(神経特異的マーカー-tubulin、蛍光標識aBTXなど神経筋接合部の評価)を評価した。

4. 研究成果

CD1マウスにおいては、免疫染色において移植の1週間後にGFPで標識された移植細胞を神経内に認めたと、時間とともに減少した。一部のマウスでは、電気刺激により腓腹筋の収縮が観察された。移植後56日目に、筋萎縮は対照群と比較して有意に抑制された。

NOD-scidマウスは、免疫染色にて移植後1および4週目にGFPで標識された移植細胞が神経

内に見出された。 -BTX を用いた神経筋接合部の染色では、 -tubulin と merge する GFP で標識したニューロンが腓腹筋の神経筋接合部に接続したところを確認した。この群では電気刺激による腓腹筋収縮は観察されず、また腓腹筋湿重量は、非移植群と比較して有意差を認めなかった。移植後 10 週目に左下肢が腫脹し、移植細胞の腫瘍形成が疑われた。免疫染色において、大多数の腫瘍細胞は GFP 陽性を示し、HE 染色による評価では、腫瘍内に 3 つの胚葉成分に分化した細胞がみられ、奇形腫の形成が疑われた。

129X1 / SvJms マウスでは、組織学的評価により GFP で標識された移植細胞を神経内に認めた。さらに、移植後 12 週間で電気刺激による腓腹筋の収縮が観察された。腓腹筋の湿重量は、移植後 12 週で、非移植群に比べて優位に改善しており、腓腹筋萎縮予防が示唆された。

C57BL / 6 マウスでは、組織学的評価において GFP で標識された移植細胞は移植後 1 週間まで神経に認められた。移植された細胞は、移植後 4 週間では観察することができず、シナプスおよび SMI32 にて標識された神経突起を経時的に認めた。さらに電気刺激によって腓腹筋の収縮が、移植後 4、12 週間で観察された。腓腹筋湿重量では、非移植群に比べて有意に改善しており、筋萎縮が対照群と比較して有意に抑制されたことが示された。

FK506 の投与による F344 /Njcl ラットへの移植については、マウスと同じプロトコルを用いて行われた。移植された細胞は移植初期で IVIS によって観察されたが、移植細胞は経時的に減少し、移植後 4 週間までは神経内に見出されたものの、移植後 12 週では IVIS および免疫染色のどちらでも確認できなかった。神経筋接合部周辺では、 -tubulin 陽性神経突起は -BTX 陽性神経筋接合部で標的骨格筋と接合しており、移植細胞による神経筋接合部の形成が示唆された。腓腹筋の収縮は、移植後 12 週間で 1 匹のラットにのみ電気刺激によって観察された。腓腹筋の湿重量比は、筋萎縮が対照群と比較して抑制されなかった。

全体の実験系において、概ね移植早期では組織学的解析・IVIS にて移植早期の細胞生着を確認できたが、移植後 12 週も経過すると組織学的にラベルされた移植細胞は消失し、IVIS でも検出できなかった。しかし断端神経刺激による腓腹筋の収縮を認めた個体もあった。

MNPCs が移植後運動神経細胞に分化し機能再建を成すことを予想していたが、本研究では機能再建を得られてもその機能させた細胞を特定するには至らなかった。特に異種移植においては免疫抑制剤を使用することで細胞の異種移植も可能となることを示し、現段階では MNPCs の移植効果と考えられる脱神経筋の神経再支配が可能であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

現在投稿準備中

〔雑誌論文〕(計 1 件)

新海宏明、丹羽智史、佐伯将臣、平田仁、岡田洋平 ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建 整形外科、69-13、1322、2018 年 12 月

〔学会発表〕(計 8 件)

Shigeru Kurimoto, Tomonori Nakano, **Hiroaki Shinkai**, Satoshi Nina, Masahiro Tatebe, Hitoshi Hirata Transplanted Neurons in Peripheral Nerve Provide a Novel Treatment Strategy for Paralyzed Muscles, 71 Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand, Austin, 2016/9/29-10/1

Shinkai H, Niwa S, Kurimoto S, Okada Y, Hirata H. Reconstruction of motor function by mouse ESC-derived motor neurons, 2017 ORS, San Diego, 2017/3/20-22

新海宏明、丹羽智史、栗本秀、岡田洋平、平田仁、ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建、日本手の外科学会、名古屋、2017/4/27-28

新海宏明、丹羽智史、中野智則、栗本秀、岡田洋平、平田仁、ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建、日本末梢神経学会、名古屋、2017/8/25-26

新海宏明、丹羽智史、佐伯将臣、中野智則、栗本秀、岡田洋平、平田仁、ES 細胞由来運動神経細胞移植による末梢神経の運動機能再建、日本整形外科学会基礎学術集会、沖縄、2017/10/26-27

新海宏明、丹羽智史、佐伯将臣、中野智則、岡田洋平、平田仁、異種移植における末梢神経への ES 細胞由来運動神経細胞移植による運動機能再建、日本手の外科学会、東京、2018/4/26-27

Onodera K, Ito T, Shimojo D, Ishihara Y, Doyu M, Katsuno M, Okano H, Sobue G, **Okada Y**. Pathophysiological analysis of spinal and bulbar muscular atrophy using disease-specific iPSCs、本神経学会学術大会、札幌、2018/5/23

丹羽智史、佐伯将臣、**新海宏明**、栗本秀、平田仁、岡田洋平、末梢神経損傷におけるヒト iPSC 細胞由来運動神経前駆細胞を用いた運動機能再建、日本再生医療学会総会、神戸、2019/3/23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡田 洋平

ローマ字氏名：Okada Yohei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。