

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10915

研究課題名(和文) 神経幹細胞移植による慢性期脊髄損傷での神経回路再形成

研究課題名(英文) New neural circuit formation in chronically injured spinal cord by neural stem cell grafts

研究代表者

角家 健 (Kadoya, Ken)

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞をラット慢性期脊髄損傷部に移植した結果、亜急性期移植と同等の移植細胞の生着を認め、損傷部が新しい神経組織で再構成された。また、移植神経細胞は亜急性期移植と同等の旺盛な軸索伸展を示し、宿主神経細胞と神経回路を形成した。慢性的に損傷されていた皮質脊髄路軸索も移植細胞内へと再生し、神経回路を形成したが、その程度は亜急性期移植に劣っていた。神経幹細胞の慢性期脊髄損傷部への移植の結果、損傷部の瘢痕組織の低形成化を認めた。慢性期であっても、神経幹細胞移植は脊髄損傷部に神経回路を再形成することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット脊髄損傷の慢性期に、神経幹細胞を移植することで、損傷部を新しい神経組織で再構築できたことは、過去の報告から鑑みるに大きな成果だと考える。また、移植細胞が軸索を宿主内に伸展できたこと、宿主の軸索が移植内へと再生したこと、それらの軸索数が、亜急性期移植と遜色なかったことは、阻害的環境である慢性期であることを考慮すると、非常に興味深い結果と考える。これらの知見は、機能再生を達成するのが、非常に難しいとされている脊髄損傷慢性期の治療方法開発の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the potential of transplantation of neural stem cells at the chronic stage of spinal cord injury by comparing to sub-acute transplantation. Transplanted neural stem cells survived well in chronic lesion sites and generated many neurons. These neurons extended axons in host spinal cords in high numbers for long distances and connected to host neurons below injury. There was no significant difference of the number of extending axons between chronically and sub-acutely transplanted subjects. Further, chronically injured corticospinal tract axons regenerated into neural stem cells, though its extent was less robust than sub-acute transplantation. These findings indicate that early stage neural cells have a remarkable ability to extend axons over inhibitory environment at the chronic stage of spinal cord injury.

研究分野：整形外科学

キーワード：軸索再生 脊髄損傷 神経幹細胞 慢性期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### <背景>

外傷などにより脊髄を損傷すると、損傷高位以下の麻痺が発症する。本邦では毎年5千人が受傷し、すでに10万人以上の患者が麻痺とそれに付随する障害に苦しんでいる<sup>1</sup>。麻痺が回復しない理由として、一度死んだ神経細胞は再生しない、損傷した軸索は再生しないという、中枢神経特有の再生能の欠如がある<sup>2</sup>。また、中枢神経組織自体が軸索伸展に阻害的環境であり、損傷した神経回路を再形成させることは容易ではない<sup>3</sup>。近年の神経科学の発展により、脊髄損傷後急性期・亜急性期の介入により、ある程度の効果が期待される治療法が臨床試験あるいは前臨床試験中である<sup>4</sup>。しかし、慢性期に有効な治療法ははまだ開発されていない<sup>5</sup>。慢性期になると、損傷部を強力な軸索伸展阻害因子であるグリア瘢痕、コンドロイチン硫酸などが取り囲み、神経回路再形成により阻害的な環境になる<sup>6</sup>。幹細胞研究の進展にとともに、神経幹細胞の脊髄損傷治療への応用が進んできた。

最近の研究で、われわれは神経幹細胞を脊髄損傷部に移植すると、下記の4つが達成できることを報告した<sup>7,8</sup>。1) 損傷空洞部を新しい神経組織で再構築、2) 宿主の損傷軸索が再生し、移植細胞と神経回路を形成、3) 逆に移植神経細胞が軸索を宿主内へと伸展させ、宿主の神経細胞と新しい神経回路を形成、4) 運動機能の回復。本方法は神経回路を再形成するので、本質的に損傷脊髄を治すことにつながる画期的なものである<sup>9</sup>。神経幹細胞を脊髄損傷の亜急性期に移植すると、移植細胞は損傷部を神経組織で再構築し、宿主と神経回路を形成し、運動機能の回復を促進させる。しかし、慢性期に移植した場合、同様の解剖学的、機能学的有効性が得られるかは、いまだ不明である。また、上記研究は、神経幹細胞移植が2つの点で、慢性期脊髄損傷に対しても有効である可能性を示唆している。1) 移植神経細胞が中枢神経の環境に由来する阻害因子の影響を受けなかったこと、2) 移植により、損傷部の阻害性瘢痕の形成が有意に抑制されたこと。これらの知見により、“慢性期であっても、神経幹細胞移植は損傷脊髄に神経回路を再形成することができる”という着想を得るに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性期に移植した神経幹細胞の解剖学的再生効果を亜急性期移植と比較して検討することである。

### 3. 研究の方法

8週齢以上の成雌 Fisher ラットに、過去の報告と同様に wire-knife を使用して、C4 脊髄後索切断を作成した<sup>10</sup>。同系 GFP 陽性の胚性脊髄 (embryonic day 14) から、神経幹細胞を作成した<sup>7,8</sup>。脊髄損傷2週間後 (亜急性期) または6ヶ月後 (慢性期) に、損傷部に神経幹細胞を移植した。移植に際して、細胞はフィブリン糊と growth factor cocktail を混ぜ合わせ、pulled glass needle を使用して移植した<sup>8</sup>。移植細胞は  $2 \times 10^5$  cells/  $\mu$ l の細胞液を  $3 \mu$ l を注入した。瘢痕の切除、硬膜の切開などの手術操作は併用しなかった。一部の動物は、移植1ヶ月後に、RFP 遺伝子を持つアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus-2) を大脳皮質に注入して、皮質脊髄路軸索を RFP にて標識した。移植後2ヶ月で4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、クライオスタットにて脊髄の矢状断切片 ( $30 \mu$ m) を作成した。これら脊髄組織に4重蛍光免疫染色 (GFP, RFP, NeuN, ChaT, GFAP, CS56, Phosphacan, Brevican, Synaptophysin) を施行した。また、GFP で免疫染色 (light-level DAB) した組織切片を電子顕微鏡によって観察した。

### 4. 研究成果

#### <移植細胞の生着と神経組織形成>

慢性期に移植された神経幹細胞は、亜急性期移植と同様に、損傷部を多数の神経細胞を含む新しい神経組織で再構築した。移植細胞による新規組織の大きさ、神経細胞の密度は、亜急性期と慢性期の間で有意な差はなかった (図)。

#### <移植細胞から宿主への軸索伸展>

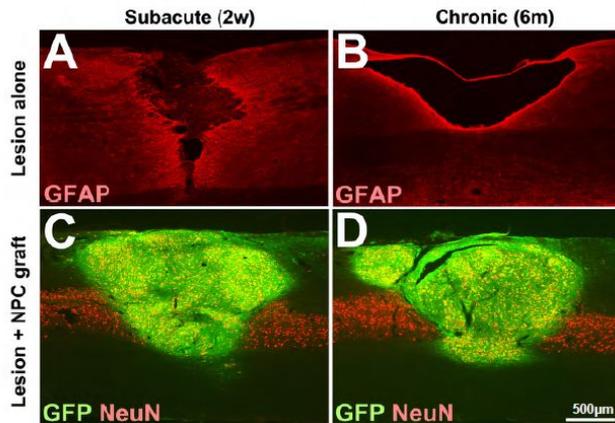
GFP に対する免疫染色によって、移植神経細胞が旺盛にその軸索を宿主内で伸展させる様子が観察された。移植/宿主の境界から3mmの位置で存在する軸索を定量すると、亜急性期移植と慢性期移植の間において、有意な差を認めなかった。また、移植由来の軸索 (GFP) が宿主の脊髄運動神経 (ChaT) を取り囲み、前シナプスのマーカー (Synaptophysin) を表出しているようすが共焦点レーザー顕微鏡で観察された。免疫染色透過電子顕微鏡によって、移植神経細胞由来の軸索が宿主神経細胞とシナプス形成していることも観察された。

#### <宿主軸索の移植細胞への軸索再生>

宿主軸索の再生には、RFP で標識された皮質脊髄路軸索で評価した。皮質脊髄路軸索は随意運動をつかさどり、運動機能回復のために、重要とされている軸索である。RFP と GFP に対する二重免疫染色により、GFP 陽性の細胞内に存在する RFP 陽性軸索を再生軸索と定義した。慢性期移植であっても、皮質脊髄路軸索は移植細胞内へと再生していた。しかし、その軸索再生の量を定量すると、亜急性期移植と比較して、有意に劣っていた。

< 損傷部の癒痕組織 >

慢性期の損傷部は空洞を形成し、免疫染色では、グリア癒痕(GFAP)、コンドロイチン硫酸(CS56、Phosphacan、Brevican)によって空洞との境界部が覆われていた。神経幹細胞移植により、空洞部に神経組織が充たされると、これらの癒痕組織有意に減少していた。



図：亜急性期または慢性期の損傷部に移植された神経幹細胞

(引用文献)

- 1 新宮彦助. 全国脊髄損傷登録統計. 日本脊髄障害医学会雑誌 18, 271-274 (2005).
- 2 Lu, Y., Belin, S. & He, Z. Signaling regulations of neuronal regenerative ability. *Curr Opin Neurobiol* 27, 135-142, doi:10.1016/j.conb.2014.03.007 (2014).
- 3 Tuszynski, M. H. & Steward, O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 74, 777-791 (2012).
- 4 Badner, A., Siddiqui, A. M. & Fehlings, M. G. Spinal cord injuries: how could cell therapy help? *Expert opinion on biological therapy* 17, 529-541, doi:10.1080/14712598.2017.1308481 (2017).
- 5 Ruff, C. A., Wilcox, J. T. & Fehlings, M. G. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Experimental neurology* 235, 78-90, doi:10.1016/j.expneurol.2011.02.010 (2012).
- 6 Fawcett, J. W. The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. *Progress in brain research* 218, 213-226, doi:10.1016/bs.pbr.2015.02.001 (2015).
- 7 Kadoya, K. et al. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nature medicine* 22, 479-487, doi:10.1038/nm.4066 (2016).
- 8 Lu, P. et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* 150, 1264-1273 (2012).
- 9 Lu, P., Kadoya, K. & Tuszynski, M. H. Axonal growth and connectivity from neural stem cell grafts in models of spinal cord injury. *Current opinion in neurobiology* 27, 103-109, doi:10.1016/j.conb.2014.03.010 (2014).
- 10 Kadoya, K. et al. Combined intrinsic and extrinsic neuronal mechanisms facilitate bridging axonal regeneration one year after spinal cord injury. *Neuron* 64, 165-172 (2009).
- 11 Wang, D., Ichiyama, R. M., Zhao, R., Andrews, M. R. & Fawcett, J. W. Chondroitinase combined with rehabilitation promotes recovery of forelimb function in rats with chronic spinal cord injury. *J Neurosci* 31, 9332-9344 (2011).
- 12 Tashiro, S. et al. Functional Recovery from Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation Combined with Treadmill Training in Mice with Chronic Spinal Cord Injury. *Scientific reports* 6, 30898, doi:10.1038/srep30898 (2016).
- 13 Liu, K. et al. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci* 13, 1075-1081, doi:10.1038/nn.2603 (2010).
- 14 Blackmore, M. G. et al. Kruppel-like Factor 7 engineered for transcriptional activation promotes axon regeneration in the adult corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7517-7522 (2012).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 角家健、Mark Tuszynski、岩崎倫政	4. 巻 59
2. 論文標題 神経前駆細胞移植による脊髄損傷後の皮質脊髄路の再生	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 北海道整形災害外科学会誌	6. 最初と最後の頁 1-5
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 該当する
1. 著者名 角家健	4. 巻 31
2. 論文標題 慢性期と急性期での脊髄損傷における神経回路の再生	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 579 587
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 角家健、Mark Tuszynski、岩崎倫政	4. 巻 92
2. 論文標題 亜急性期と慢性期脊髄損傷への神経幹細胞/前駆細胞移植が持つ解剖学的および機能学的再生効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 743 - 748
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 該当する
1. 著者名 Adler A, Lee-kubli C, Kumamaru H, Kadoya K, M Tuszynski.	4. 巻 Jun 6;8(6)
2. 論文標題 Comprehensive monosynaptic rabies virus mapping of host connectivity with neural progenitor grafts after spinal cord injury.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Report	6. 最初と最後の頁 1525-1533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2017.04.004	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Patel A, Li Z, Canete P, Strobl H, Dulin J, Kadoya K, Gibbs D, Poplawski GHD.	4. 巻 9;19(1):8
2. 論文標題 AxonTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of axon regeneration in spinal cord tissue.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12868-018-0409-0	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 Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, Weber JL, Liang JJ, Moseanko R, Hawbecker S, Huie JR, Havton LA, Nout-Lomas YS, Ferguson AR, Beattie MS, Bresnahan JC, Tuszynski MH.	4. 巻 May;24(4):
2. 論文標題 Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 484-490.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4502.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Dulin JN, Adler AF, Kumamaru H, Poplawski GHD, Lee-Kubli C, Strobl H, Gibbs D, Kadoya K, Fawcett JW, Lu P, Tuszynski MH.	4. 巻 Jan 8;9(1):84.
2. 論文標題 Injured adult motor and sensory axons regenerate into appropriate organotypic domains of neural progenitor grafts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02613-x.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kumamaru H, Lu P, Rosenzweig ES, Kadoya K, Tuszynski MH	4. 巻 26
2. 論文標題 Regenerating Corticospinal Axons Innervate Phenotypically Appropriate Neurons within Neural Stem Cell Grafts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Report	6. 最初と最後の頁 2329-2339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.01.099	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

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 角家健、Mark Tuszynski、岩崎倫政
2. 発表標題 中枢神経軸索再生における転写因子cJunの役割
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健、Mark Tuszynski、岩崎倫政
2. 発表標題 中枢神経軸索再生における転写因子cJunの役割
3. 学会等名 第33回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 脊髄損傷・末梢神経損傷に関する最近の知見
3. 学会等名 第16回北海道関節疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 神経幹/前駆細胞を使用した脊髄損傷後神経回路形成
3. 学会等名 第11回神経発生討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 神経幹/前駆細胞を使用した脊髄損傷後神経回路形成
3. 学会等名 第23回グリアクラブ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 慢性期脊髄損傷への神経幹細胞移植が持つ解剖学的および機能学的再生効果
3. 学会等名 第32回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 慢性期脊髄損傷への神経幹細胞移植
3. 学会等名 第46回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 慢性期脊髄損傷への神経幹細胞移植
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 中枢神経軸索再生における転写因子cJunの役割
3. 学会等名 第133回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 中枢神経軸索再生における転写因子cJunの役割
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ken Kadoya
2. 発表標題 Neural Progenitor Cells Overcome Extrinsic Inhibitors and Extend Axons in Chronically Injured Spinal Cord.
3. 学会等名 The annual meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 神経幹/前駆細胞を使用した脊髄損傷後神経回路形成
3. 学会等名 第23回グリアクラブ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角家健
2. 発表標題 神経幹/前駆細胞を使用した脊髄損傷後神経回路形成
3. 学会等名 第11回神経発生討論会
4. 発表年 2018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
研究協力者	チュシンスキー マーク (Tuzynski Mark)	カリフォルニア大学サンディエゴ校・Dept. of Neurosciences・Professor	