

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06251・19K21345

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞とオプトジェネティクスによる運動機能再建と横隔膜ペーシングへの応用

研究課題名(英文) Reconstruction of motor function with human iPS cells and optogenetics and application to diaphragmatic pacing

研究代表者

佐伯 将臣 (SAEKI, MASAOMI)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40822292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来運動ニューロンに、レンチウイルスベクターを用いてChR2(H134R)を導入した。青色光の照射により、ChR2(H134R)を導入した運動ニューロンにおいて活動電位が誘発されることを多電極アレイを用いて確認した。ラット坐骨神経切断モデルにChR2(H134R)を導入したヒトiPS細胞由来運動ニューロンを移植した。移植後12週の組織学的解析では、移植細胞の生着と移植細胞由来の軸索がラットの筋内で神経筋接合部を形成していることが確認され、電気刺激により、約半数の動物で筋収縮と筋活動電位が確認された。一方で、光刺激では十分な筋活動電位は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的電気刺激は実臨床において利用されている技術であり、当グループでの末梢神経損傷モデルにおける筋収縮も電気刺激により誘発された。しかし電気刺激は細胞特異的に刺激することが不可能であり、運動神経と感覚神経を含む横隔神経の刺激では、筋収縮のみでなく、不快感を誘発する。これに対し、光刺激は、移植前にあらかじめ細胞にChR2を導入しておくことで、低侵襲で、細胞特異的な刺激が可能である。末梢神経をターゲットとした運動機能再建において機能的電気刺激から機能的な光刺激への移行は、臨床応用へ向けた重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：ChR2 (H134R) was introduced into motor neurons derived from human iPS cells using a lentiviral vector. Using a multi-electrode array, it was confirmed that blue light irradiation induced action potentials in motor neurons to which ChR2 (H134R) was introduced. Human iPS cell-derived motoneurons introduced with ChR2 (H134R) were transplanted into a rat sciatic nerve transection model. Histological analysis 12 weeks after transplantation confirmed that engraftment of the transplanted cells and axons derived from the transplanted cells formed neuromuscular junctions in the muscles of rats, and muscle contraction and muscle action potentials were confirmed in approximately half of the animals by electrical stimulation. On the other hand, sufficient muscle action potentials were not observed with light stimulation.

研究分野：整形外科

キーワード：末梢神経損傷 iPS細胞 末梢神経再生 オプトジェネティクス チャネルロドプシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経損傷や運動ニューロン疾患による運動麻痺に対する有効な治療法が求められており、再生医療は新たな治療技術の開発を期待されている。脊髄損傷や ALS を対象とした再生医療研究の多くは脊髄内に多能性幹細胞もしくは多能性幹細胞由来の細胞を移植する方法で行われている。しかし、中枢神経系の複雑な神経回路網を再形成するのは未だ困難な状態にある。一方、末梢神経における神経再生では複雑な神経回路網を再構築する必要がなく、中枢での再建と比較し、必要となる移植細胞数が少ない。また神経筋接合部までの距離が短く機能回復までの期間が短い点からも、末梢神経は理想的な治療ターゲットと考えられる。

研究代表者らの研究グループでは、運動神経を末梢神経に移植し、脱神経筋の再支配による運動機能の再建を目指してきた。末梢神経損傷モデルラットに胎児由来の脊髄前角細胞を移植し、電気刺激による筋収縮と組織学的に再生軸索による脱神経筋の再支配を認めた (Kurimoto S 2013, Kato S 2015)。多能性幹細胞を用いた研究として、マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞から分化誘導した運動神経前駆細胞を末梢神経損傷モデルに移植し、運動機能の再建に成功している (Shinkai H in preparation、 Niwa S in preparation)。

2. 研究の目的

ChR2 を導入したヒト iPS 細胞由来運動神経前駆細胞をラットの坐骨神経損傷モデルに移植し、脱神経筋の再支配と光刺激による運動機能再建を行う。また、光刺激による神経刺激・筋収縮制御システムを構築する。

3. 研究の方法

ChR2 を発現するヒト iPS 細胞株の樹立

ヒト iPS 細胞 (201B7) に、チャンネルロドプシン (Ubc-ChR2-EGFP) を導入し、定常発現する iPS 細胞株を樹立する (201B7-ChR2)。樹立した 201B7-ChR2 を運動神経へと分化誘導し、465nm 青色光の照射により活動電位が誘発されることを多電極アレイ (Multi electrode array : MEA) を用いて確認する。

ChR2 発現ヒト iPS 細胞の末梢神経への移植による運動機能の再建

201B7-ChR2 から誘導した運動神経前駆細胞を、坐骨神経損傷モデルラットに移植する。移植部位への青色光の照射による支配筋の筋収縮を評価する。併せて組織学的評価も行う。

4. 研究成果

(1) 光感受性チャンネルロドプシン (ChR2(H134R)) を発現するヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの作成

ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンに、レンチウイルスベクター (pLenti-Synapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE) を用いて ChR2(H134R) を導入した。ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンで ChR2(H134R) が発現していることを、免疫染色と Western-blotting で確認した。青色光の照射により、ChR2(H134R) を導入した運動ニューロンにおいて活動電位が誘発されることを多電極アレイ (Multi electrode array : MEA) を用いて確認した。

光刺激により低侵襲に、しかも細胞種特異的に刺激するという本研究の臨床応用に向けた課題において、光刺激により活動電位が誘発される運動ニューロンの作成は、重要性が高いと考える。

(2) ChR2 発現ヒト iPS 細胞由来ニューロンの末梢神経への移植による運動機能の再建
ラット坐骨神経切断モデルに、ChR2(H134R) を導入したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンを移植した。in vivo bioluminescence imaging (BLI) で移植細胞のイメージングを行い、細胞の生着を観察した。移植後 12 週の組織学的解析では、移植細胞の生着と移植細胞由来の軸索がラットの筋内で神経筋接合部を形成していることが確認され、電気刺激により、約半数の動物で筋収縮と筋活動電位が確認された。一方で、光刺激では十分な筋活動電位は観察

されなかった。ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの移植により脱神経筋の再支配が可能であることを示しており、重要な結果であると考え。ChR2(H134R)を導入した運動ニューロンを移植し、光刺激による筋収縮を得るには更なる条件の検討が必要であると考え。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----