ウェブサイト公開用

（様式 10）
（海外特別研究員事業）

令和　2　年　4　月　21　日

海 外 特 別 研 究 員 最 終 報 告 書

独立行政法人日本学術振興会 理事長　殿

採 用 年 度　平成 30 年度
受 付 番 号　201860541
氏　　名　横田和也

（氏名は必ず自署すること）

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：　トロント　（国名：　カナダ　）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
直接誘導型ヒト神経幹細胞を用いた新規脊髄損傷治療方法の確立

3. 派遣期間：平成　30　年　4　月　1　日　～　令和　2　年　3　月　31　日

4. 受入機関名及び部局名
Department of Neurosurgery, University of Toronto

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意　**書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**

（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）
（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

所期の背景と目的

これまでに申請者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。これらの問題を解決するために、派遣先機関のトロント大学が共同研究を行っている Fortuna Fix Inc.（FF）が、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 CD34 陽性造血幹細胞に特定の初期化遺伝子（FF 特許）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）を作成することができる。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成することが可能で、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。さらに drNPCs の誘導過程では、いかなる動物由来物質やウイルスを用いられていないことから、drNPCs の移植療法は臨床応用に繋がる可能性が高いと考えられる。Fortuna Fix Inc.は移植細胞の生着率と分化能を上げることができる hyaluronan/methylcellulose hydrogel (HAMC)という生体材料も開発している。HAMC は生体適合性が確認されており、生物内での分解が可能な物質で、細胞輸送およびタンパク質輸送材料として使用することが可能である。HAMC と細胞移植を併用することによって、移植細胞の生着率を向上させることが可能であり、同時にグリア瘢痕を除去する Chondroitinase ABC (ChABC)の薬剤投与も可能となる。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。本研究に際して、drNPC に対してさらに改良を加えられた、生着後に

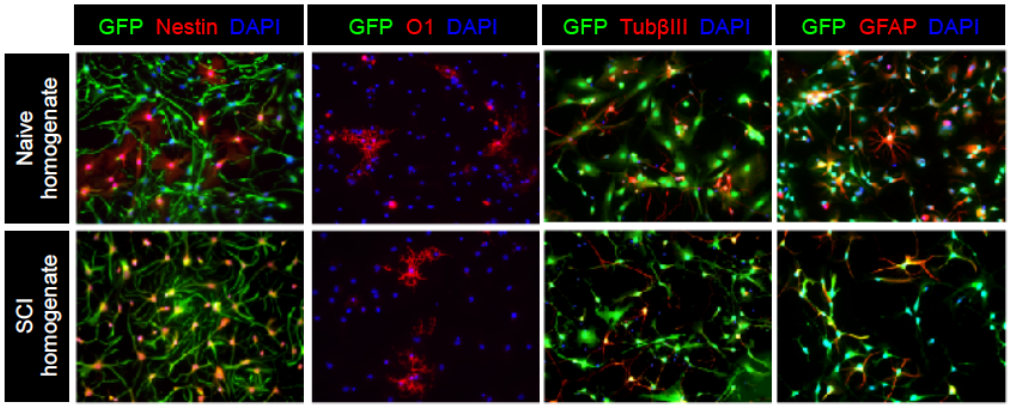
オリゴデンドロサイトの分化傾向が drNPC-oNPC（oligogendrogenic neural precursor cells）と呼ばれる神経幹細胞を使用した。また、本研究では移植に先行して、ChABC 含有の HAMC（HAMC-ChABC）を損傷部に投与することとした。

遂行状況及び成果

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、共焦点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（Figure 1）。

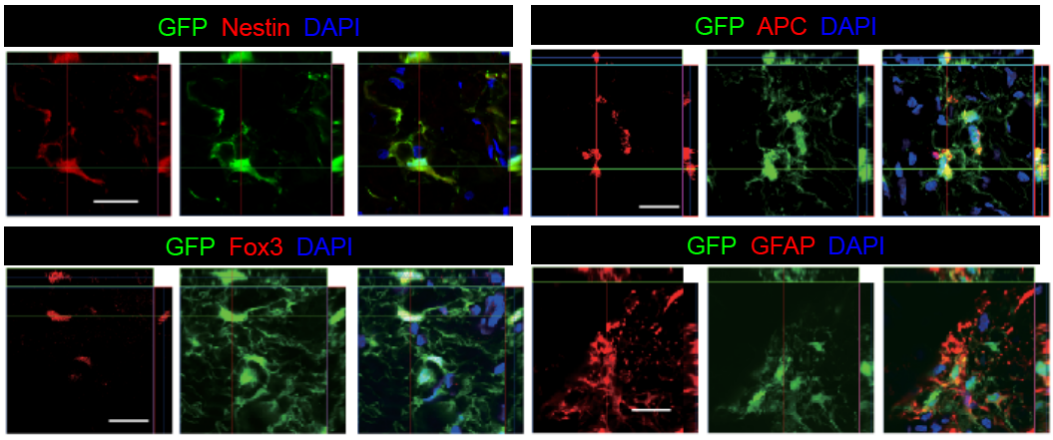
Figure 1



1. 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成した。免疫組織学的染色を行い、共焦点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（Figure 2）。

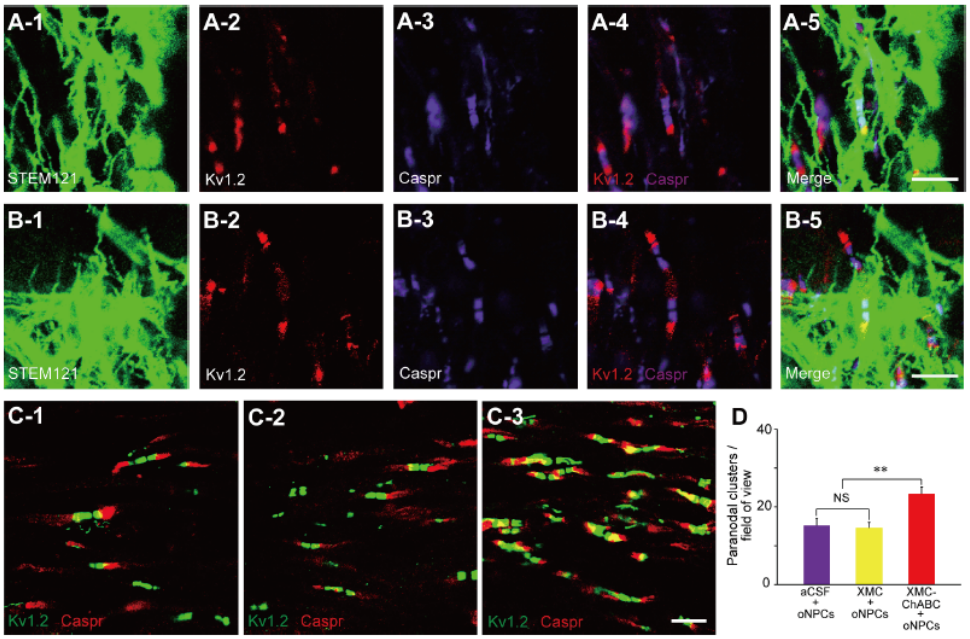
Figure 2



2. 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成した。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（Figure 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。また組織学的定量評価において、HAMC-ChABC と細胞移植を併用したグループにおける Kv1.2/Caspr 陽性の髄鞘髄鞘数は、ChABC を併用していない細胞移植のグループよりも有意に多いことが分かった。この結果は、ChABC が生着した移植細胞による髄鞘形成を促進させることを示している。

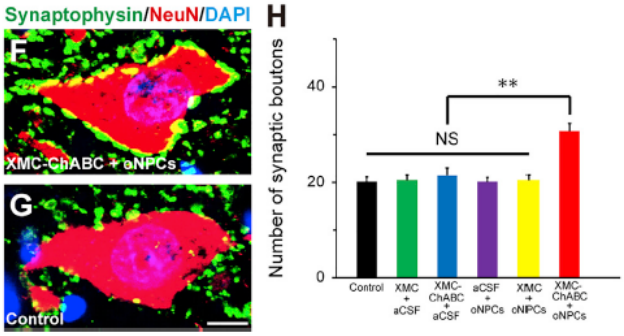
Figure 3



3. 神経幹細胞移植が、脊髄損傷後のシナプス形成を増加させ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成した。免疫組織学的染色で、損傷部の尾側に位置するニューロンに接続しているシナプス分子の数を定量した。HAMC-ChABC と細胞移植を併用したグループにおける神経細胞に接続する Synaptophysin 陽性 bouton の数（軸索終末）は、ChABC を併用していない細胞移植のグループよりも有意に多いことが分かった（Figure 4）。この結果は、ChABC が生着した移植細胞によって、脊髄損傷後のシナプス形成が促進されることを示している。

Figure 4



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。派遣先機関では、再現性の高いラット頚髄圧挫損傷モデルが確立されており（Forgione et al., Journal of Neurotrauma, 2014）、この損傷モデルを用いて細胞移植の効果を検討することで、臨床応用に向けた効果的な研究デザインを構築することが可能であると考えられる。

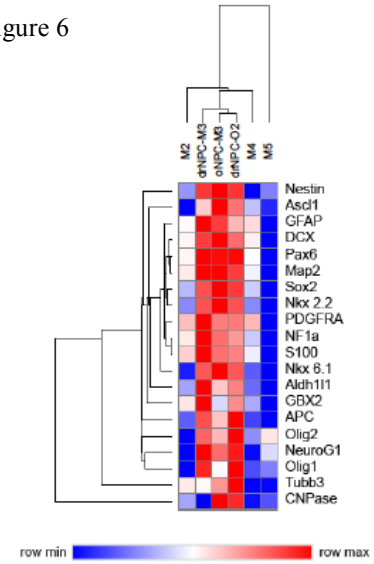
4.異なる培養条件の神経幹細胞移植を比較し、候補を 3 つに絞り込んだ。

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（Figure 5 and 6）、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。

Figure 5

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

Figure 6



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（Figure 7 and 8）。

Figure 7

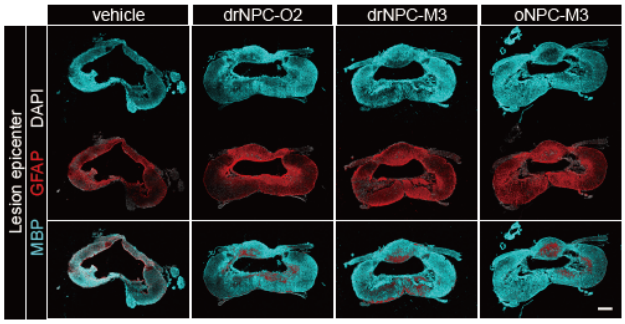
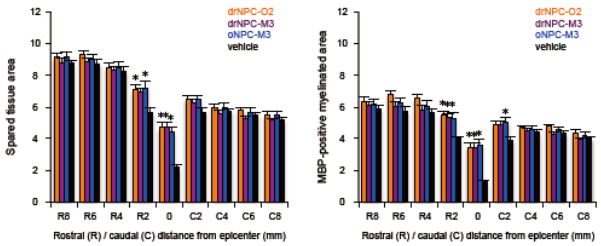


Figure 8



さらに組織学的評価の結果、生着した神経幹細胞（STEM121 陽性細胞）は MBP 陽性を示し、NF200 陽性の軸索を取り囲んでいた。この所見は、分化した移植細胞が髄鞘の再生に直接的に寄与していることを示している（Figure 9 and 10）。

Figure 9

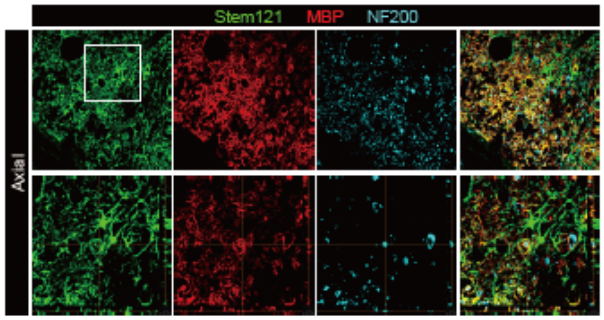
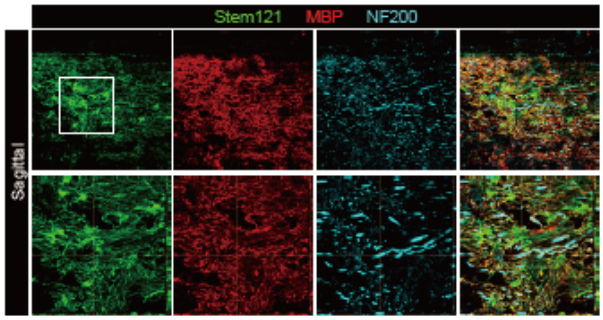
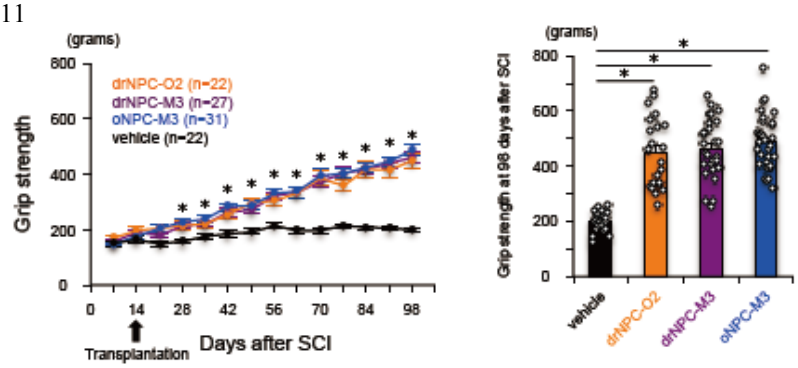


Figure 10



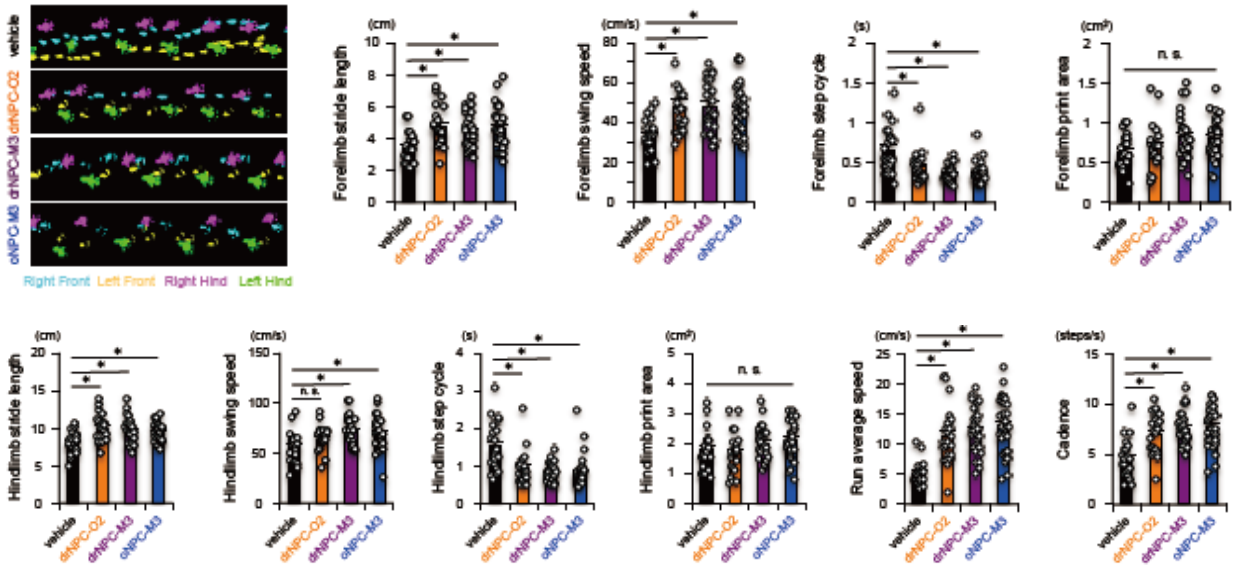
また、頚髄損傷モデルのラットに細胞移植を行い、移植後 3 ヶ月の時点まで運動機能解析を行った。Grip strength test では、細胞移植群が対照群に比較して有意な運動機能回復を示した（Figure 11）。

Figure 11



さらに CatWalk を用いた歩行解析においても、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（Figure 12）。

Figure 12



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やシナプス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。今後はこの drNPC 移植を臨床応用するために、ブタ・サルをはじめとした、より大型の動物種への応用を考慮している。

申請者は今回の研究期間中に、脊髄損傷の病態ならびに脊髄損傷に対する幹細胞移植・バイオマテリアルを用いた治療方法の進歩についての総説を作成し、英文雑誌に発表した。

（掲載された総説より）

Figure: 急性期・亜急性期・慢性期における損傷脊髄の病態についての説明

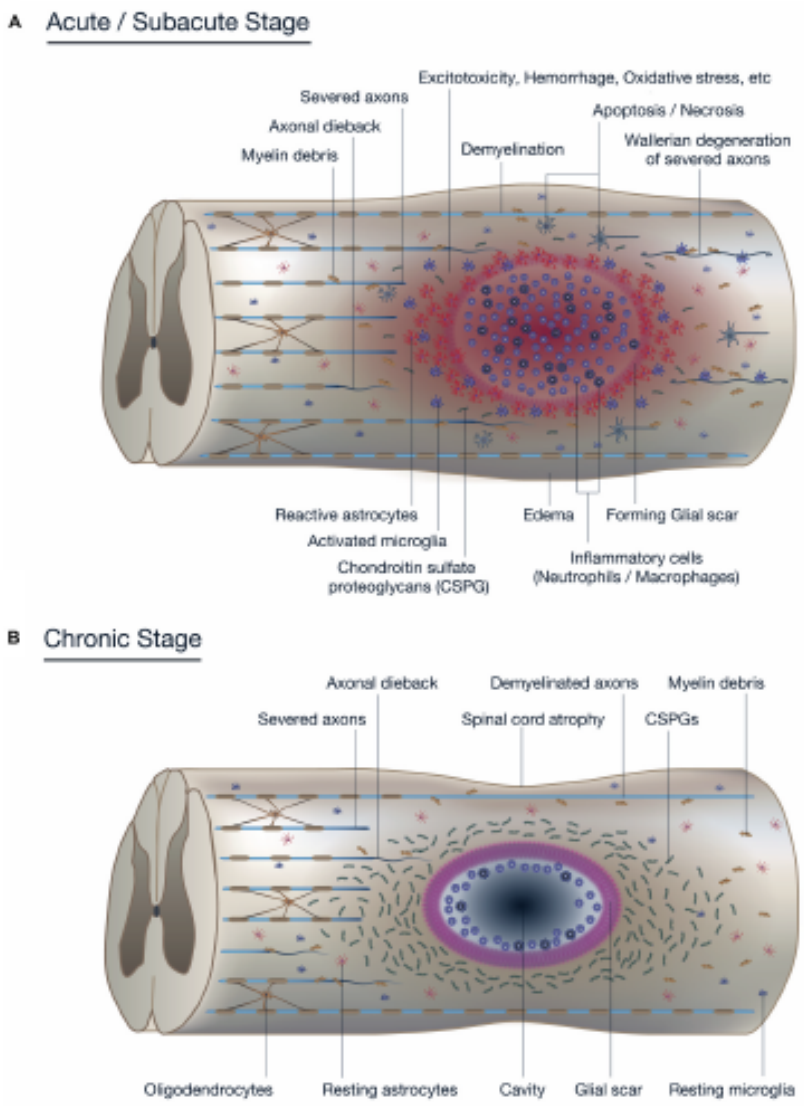


FIGURE 1 | Pathophysiology of spinal cord injury (SCI). **(A)** The diagram shows the pathophysiological events occurring around the lesion site during the acute to subacute phase of SCI. The primary and secondary injury mechanisms lead to inflammation, hemorrhage, apoptosis, and necrosis. Resident neurons, oligodendrocytes, and astrocytes near the lesion are forced into apoptosis or necrosis, resulting in anterograde (Wallerian degeneration) and retrograde (axonal dieback) axonal degeneration. Reactive astrocytes and other glial cells secrete chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), which acts as a physical and chemical barrier that impedes endogenous tissue repair processes such as axonal sprouting and synaptic reorganization. **(B)** The diagram shows the pathophysiological events in the chronic phase of SCI. In the epicenter of the lesion, a cavitation has occurred that is surrounded by connective scar tissues and contains cerebrospinal fluid (CSF). The phenotype of reactive astrocytes has changed into scar-forming astrocytes that impede regenerating axons from crossing the lesion. Some inflammatory immune cells remain around the lesion even in the chronic phase of SCI.

（掲載された総説より）
Figure: 脊髄損傷に対する移植細胞の働きについての説明

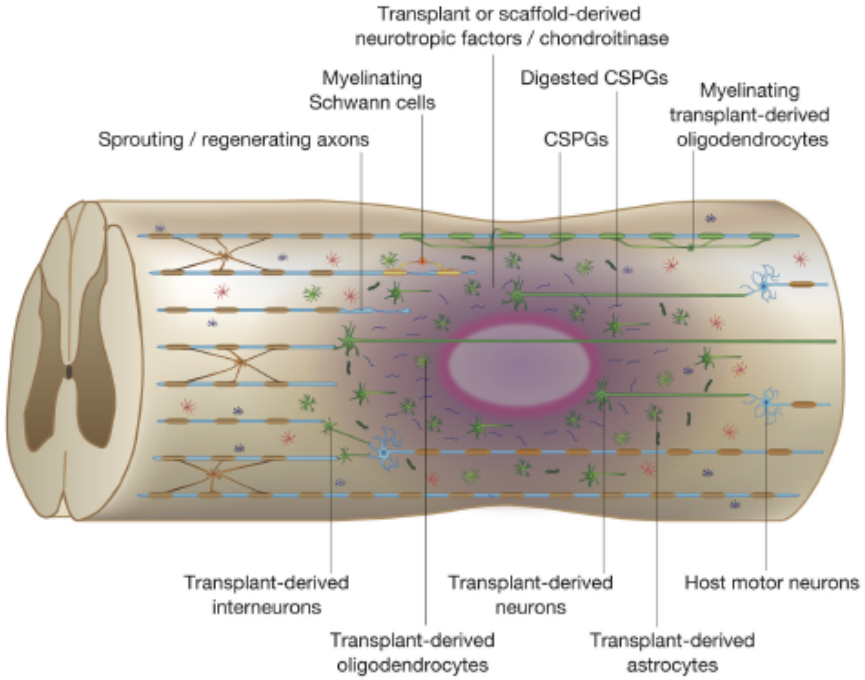


FIGURE 3 | Potential mechanisms of spinal cord repair by stem cell transplantation. The diagram shows potential mechanisms of regeneration brought about by stem cell transplantation. The transplanted stem cells differentiate into neural cells of the three lineages: neurons, astrocytes, and oligodendrocytes (shown in green). The transplanted stem cells and differentiated cells secrete neurotrophic factors that reduce inflammation, degrade CSPGs, and promote endogenous tissue repair. Differentiated oligodendrocytes remyelinate denuded axons. The grafted neurons form synapses with propriospinal neurons and lumbar motor neurons, which reorganize the neuronal circuits by forming *de novo* synaptic connectivity between host and grafted neurons. The regenerated neuronal circuits bridge the lesion by creating a detour route that passes through areas more favorable to regenerating axons. Transplant-derived interneurons indirectly connect the host injured neural tracts through the propriospinal circuits, whereas transplant-derived neurons participate in the regeneration of the injured corticospinal tract (CST) and directly activate muscle contraction.

上記研究プロジェクトの推進と並行して、脊髄損傷に対する手術治療方法に関するシステマティックレビュー、ならびに脊髄損傷に対する急性期治療の Textbook chapter の執筆を派遣期間中に行った。