

iPS 細胞を用いた脊髄損傷に対する再生医療

名越 慈人

慶應義塾大学医学部整形外科

(2023 年 3 月 31 日受付)

要旨：ヒト iPS 細胞を用いた臨床研究の開始と並行して、筆者は神経前駆細胞移植後の回復機序について、基礎研究レベルで詳細な解析を進めてきた。DREADD システムを用い、移植細胞の神経活動を選択的に抑制することで、運動機能が一時的に低下することを明らかにした。逆に、移植細胞に対して継続的な興奮性の刺激を加えると、宿主組織との間でシナプス関連因子が活性化し、電気生理学的にも移植と宿主間での神経伝達を確認され、運動機能の回復につながる事が分かった。さらに宿主の皮質脊髄路へ DREADD を導入し、興奮性刺激を加えることで、移植細胞における神経活動依存的な遺伝子の発現上昇が認められた。これら一連の解析は、脊髄損傷後に移植した神経前駆細胞が、宿主組織との間で神経回路を再構築し、それが運動機能の回復に寄与することを直接的に証明するものである。

さらに筆者は、慢性期脊髄損傷に対する研究にも取り組んでいる。慢性期の動物モデルに対して最適なりハビリテーションのプロトコルを作成し、継続的なトレッドミル訓練を行うことで、神経栄養因子やシナプス関連因子の上昇と機能回復が得られることが分かった。リハビリに細胞移植を組み合わせることでニューロン分化が促進し、より有効な回復が得られることを明らかにした。慢性期脊髄損傷は亜急性期に比べて患者比率が高く、有効な治療法の確率へ向けて、さらに研究を推進していく予定である。

(日職災医誌, 71:111—115, 2023)

—キーワード—

iPS 細胞, 細胞移植, 臨床応用

はじめに

脊髄損傷は、交通事故や転落、スポーツ外傷などが原因で脊椎の安定性が破綻して発生する。本邦における年間発生件数は約 6 千人、罹患数は 15 万人と言われていた。また近年では、高齢者における転倒などの軽微な外傷により、頸髄損傷の発生が増加している。実際、約半数以上の急性期脊髄損傷の患者が 60 歳以上の高齢者と考えられている。脊髄損傷に対する治療は、手術による脊柱の再建が主体であり、不可逆性変化を生じた脊髄神経に対する根本的治療法はない。

しかしながら、近年の幹細胞医学の発展により、損傷脊髄が修復・再生し得ることが明らかになってきた。我々も前臨床試験において、中枢神経系由来の神経前駆細胞を脊髄へ移植し、運動機能が回復することを報告してきた。そして 2021 年からは、臨床研究という形で亜急性期脊髄損傷の患者に対する細胞移植を開始した。本稿では、これまでの脊髄損傷に対する再生医療について、

細胞移植治療を中心に概説する。

神経前駆細胞と細胞移植研究

中枢神経系の神経前駆細胞は、継代を繰り返すことのできる自己複製能と、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 系統へ分化できる多分化能を有しており、増殖因子の下で培養し増殖させることが可能である。我々は過去に、齧歯類及び霊長類の動物モデルを用いて胎児組織由来の神経前駆細胞を損傷脊髄へ移植し、神経細胞への分化と運動機能の回復が得られることを証明してきた¹⁾。しかし、胎児組織を利用することの倫理的な議論は解決を見ない状況であり、再生医療への応用は困難であった。

そのような状況の中、2007 年に報告されたヒト iPS 細胞の発見は、再生医療を進めるにあたって画期的な報告となった。我々はヒト iPS 細胞から神経前駆細胞を分化誘導し、脊髄損傷の動物モデルへ移植することで、宿主のニューロンとのシナプス形成、軸索伸長、髄鞘の増

細胞移植後の機能回復のメカニズム

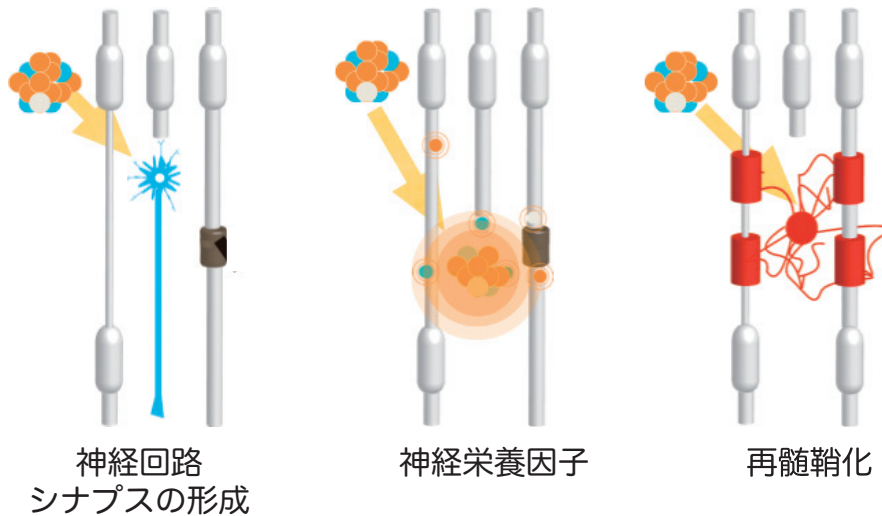


図1 脊髄損傷に対する神経前駆細胞移植の作用機序

主に3つの回復機序が考えられている。移植した細胞が、①ニューロンへと分化し、宿主組織とシナプスを形成する、②損傷内で栄養因子を分泌し脊髄を保護する、③オリゴデンドロサイトへと分化して脱髄した神経軸索に再髄鞘化する。

加と血管形成を認め、行動機能が回復することを明らかにした²⁾。臨床応用を見据え、霊長類であるコモンマモセットを用いた脊髄損傷の研究においても、同様のヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を移植すると、二次損傷の抑制と軸索の伸長が機能回復につながる事が分かった³⁾。

細胞移植後の回復機序

移植した神経前駆細胞がどのように機能回復に寄与するか、その機序については以下の3つが考えられている(図1)。①移植した細胞がニューロンへ分化し、宿主の神経と神経回路を形成する、②移植した細胞が栄養因子を分泌し、宿主組織を保護する、③移植した細胞がオリゴデンドロサイトへ分化し、脱髄した神経を再髄鞘化する。中でも我々の研究で用いているヒトiPS細胞由来神経前駆細胞はニューロンへの分化が豊富であり、上述の①が回復に大きく寄与しているのではないかと考えている。

この仮説を実証するために、我々は神経活動を人為的に操作できるDREADDシステムに着目した。DREADDには抑制性のM4と興奮性のM3の受容体があり、ともにCNOと呼ばれる人工のリガンドを投与することで、神経活動が抑制ないし興奮する。我々はまず、抑制性のM4受容体をレンチウイルスによりヒトiPS細胞由来神経前駆細胞に導入し、損傷脊髄へ移植した⁴⁾。移植した細胞はニューロン有意に分化し、CNOを加えることで運動機能が一時的に低下することを確認した。次に移植細胞に興奮性のM3を導入し、連日CNOを脊髄損傷マウスへ投与すると、細胞周囲の宿主の組織においてシナプス

関連遺伝子の発現が上昇し、脊髄組織が保護され、運動機能が回復することが分かった⁵⁾。これら一連の研究によって、移植した神経前駆細胞が宿主の組織と神経回路を形成し、機能回復に寄与することが明らかになった。

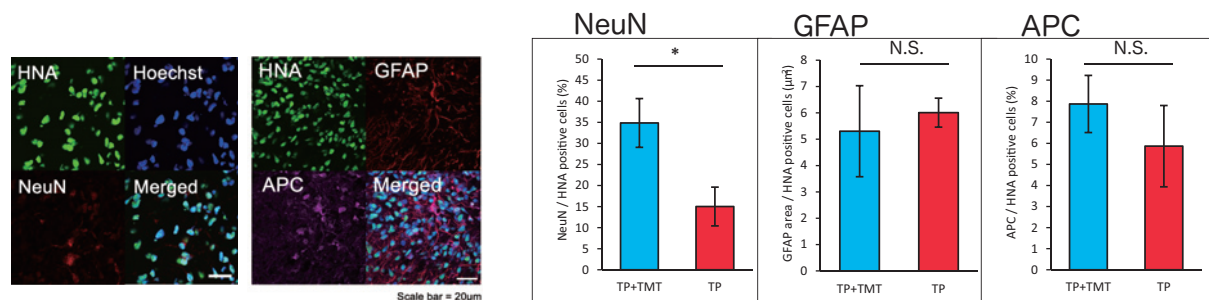
移植細胞の特性による効果の違い

これまで細胞移植の有効性を紹介してきたが、神経前駆細胞の特性はiPS細胞からの誘導法によって様々である。それぞれの細胞は、移植後の効果にも違いがあり、より効果的な移植治療を確立するには、脊髄損傷の病態に応じた移植細胞の選択が重要と考える。

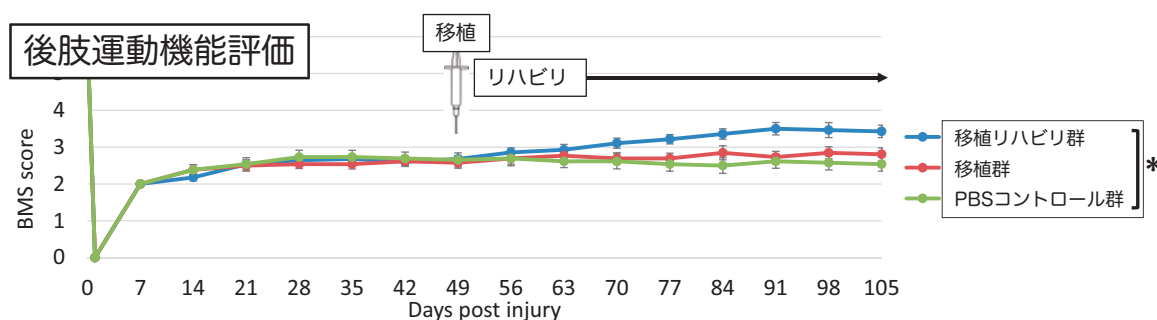
1) 脊髄型神経前駆細胞移植の有効性

神経前駆細胞は、中枢神経系の性質を保有する。しかし、中枢神経には脳と脊髄があり、その特徴は構造学的にも大きく異なっている。我々は、発生学的な神経軸に沿って、iPS細胞から前脳と脊髄の性質を持つ神経前駆細胞を作り分けることに成功した。この誘導は、従来の方法から培養期間を大幅に短縮し、iPS細胞からわずか18日で神経前駆細胞を作成することが可能である。これらの細胞を損傷脊髄に移植すると、脊髄型神経前駆細胞の方が宿主の神経伝導路と豊富なシナプスを形成し、移植細胞の生着に応じて運動機能が改善することが分かった⁶⁾。特に、皮質脊髄路と脊髄型神経前駆細胞との親和性が強く、移植細胞が宿主の伝導路に組み込まれ、機能回復に寄与している可能性が示唆された。現在は、この神経前駆細胞の領域特異性をさらに仔細に評価しており、脊髄損傷にとって最も適した細胞の特性を選定していく

移植とリハビリ併用における移植細胞分化と機能評価



リハビリ併用群ではNeuN+ニューロンが優位に増加



細胞移植とリハビリの併用で運動機能の改善を認めた

図2 慢性期脊髄損傷に対する細胞移植とリハビリテーションの併用効果

マウス慢性期脊髄損傷に対して細胞移植とトレッドミル訓練を施行すると、移植した細胞の生着率が向上し、ニューロンへの分化が有意に進む。結果として、運動機能の有意な回復が得られた。

予定である。

2) オリゴデンドロサイト前駆細胞の移植

脊髄損傷の病態は複雑であり、損傷後に機能回復が得られない原因の一つとして、神経軸索の脱髄が挙げられる。従って、オリゴデンドロサイトを移植して再髄鞘化を行い、神経伝導の回復を得ることは、理に適った治療法といえる。既に我々は、臨床グレードのヒト iPS 細胞から、動物成分を使用しない培養条件下にオリゴデンドロサイトが豊富に分化する神経前駆細胞を誘導することに成功しており、この細胞を利用してマウス損傷脊髄に移植を行った⁷⁾。組織学的評価において、移植細胞の36%以上がオリゴデンドロサイトへ分化し、神経軸索を髄鞘化していることが確認された。これまで我々が誘導してきた神経前駆細胞では、移植後のオリゴデンドロサイトへの分化が約3%であり、本細胞ではその分化効率が飛躍的に増加していることが分かる。実際、移植後の脊髄に対して、電気生理学的な解析を行うと、神経伝導が有意に回復しており、結果として運動機能の改善を認めた。以上より、移植細胞による髄鞘化の重要性が改めて認識され、またより分化した状態で移植することにより、安全性が高められることも明らかとなった。現在は、本細胞を慢性期損傷の治療にも応用しようと研究を進めている段階である。

亜急性期脊髄損傷に対する臨床研究

これまでの研究成果をもとに、我々は亜急性期脊髄損傷患者を対象とした細胞移植の臨床研究を計画した⁸⁾。2019年には厚生科学審議会での承認を受けており、2020年から臨床研究を開始する予定であったが、Covid-19の感染拡大により、患者募集の延期を余儀なくされた。しかし2021年12月に、第1例目の移植を当院で施行した。移植後は村山医療センターと協力し、リハビリテーション治療を継続しながら、移植後1年間にわたって術後の経過を観察・評価する。目標症例数は4例であり、安全性を主要評価項目として研究を進めていく予定である。

慢性期損傷におけるリハビリテーションの重要性

これまでの研究は、損傷後亜急性期を対象としてきたが、実臨床では脊髄損傷患者のうち95%は慢性期の状態である。慢性期は急性期と異なり、空洞とそれを取り囲むグリア瘢痕が形成され、再生に不利な環境になっている。このような過酷な条件に対して、機能再建を目指したリハビリテーションは、運動機能の回復を促進する目的で欠かせない治療戦略の一つと考える。

我々は、リハビリテーションの最適化を試みる目的で、

慢性期マウス脊髄損傷モデルに対して4足歩行型トレッドミル訓練を用い、至適なりハビリテーションの強度を探索した⁹⁾。各個体の機能の状態に合わせてリハビリの負荷を変更し行ったところ、麻痺の程度によって適正な訓練強度が異なることが分かった。また、慢性期においても訓練を続けることで栄養因子やシナプス関連因子の発現が上昇し、運動機能が回復することが明らかになった。ヒト iPSC 細胞由来神経前駆細胞の移植を併用すると、リハビリ単独による効果よりもさらに運動機能の回復が認められた (図 2)¹⁰⁾。

さらに我々は、脊髄損傷患者に対するリハビリテーションの臨床研究も進めている。生体電位駆動型ロボット HAL (Cyberdyne 社) は、動作意思に伴い発生する皮膚表面の微弱な生体電位信号を読み取り、パワーユニットをコントロールすることで、患者の関節の動きと一体となってアシストする最新型ロボットスーツである。我々の研究結果では、この HAL を 1 回 50 分で 20 回施行することで、不全麻痺の患者において体幹筋力や歩行機能の向上が見られることを明らかにした¹¹⁾。今後は臨床応用へ向けて、この HAL と細胞移植を組み合わせた治療法の確立を目指し、さらに研究を推進していく予定である。

おわりに

既に亜急性期脊髄損傷患者に対する細胞移植が始まっている段階であり、長年のエビデンスの蓄積によってようやく再生医療への第一歩が踏み出せた形である。それと同時に、我々は次世代の細胞移植を見据え、より効果的な治療開発を目指して基礎研究にも取り組んでいる。その一方で多くの患者を救うためには、慢性期における治療法の確立も重要な課題である。脊髄損傷に対する再生医療を発展させるためには、リハビリテーションを中心に、今後も基礎と臨床の両側面から研究を推進することが大切である。

[COI 開示] 本論文に関して開示すべき COI 状態はない

文 献

- 1) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80: 182—190, 2005.
- 2) Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al: Grafted human-

induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 16825—16830, 2011.

- 3) Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, et al: Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One* 7: e52787, 2012.
- 4) Kitagawa T, Nagoshi N, Kamata Y, et al: Modulation by DREADD reveals the therapeutic effect of human iPSC-derived neuronal activity on functional recovery after spinal cord injury. *Stem Cell Reports* 17: 127—142, 2022.
- 5) Kawai M, Imaizumi K, Ishikawa M, et al: Long-term selective stimulation of transplanted neural stem/progenitor cells for spinal cord injury improves locomotor function. *Cell Rep* 37: 110019, 2021.
- 6) Kajikawa K, Imaizumi K, Shinozaki M, et al: Cell therapy for spinal cord injury by using human iPSC-derived region-specific neural progenitor cells. *Mol Brain* 13: 120, 2020.
- 7) Kamata Y, Isoda M, Sanosaka T, et al: A robust culture system to generate neural progenitors with gliogenic competence from clinically relevant induced pluripotent stem cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med* 10: 398—413, 2021.
- 8) Sugai K, Sumida M, Shofuda T, et al: First-in-human clinical trial of transplantation of iPSC-derived NS/PCs in subacute complete spinal cord injury: Study protocol. *Regen Ther* 18: 321—333, 2021.
- 9) Shibata T, Tashiro S, Shinozaki M, et al: Treadmill training based on the overload principle promotes locomotor recovery in a mouse model of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol* 345: 113834, 2021.
- 10) Shibata T, Tashiro S, Shibata S, et al: Rehabilitative Training Enhances Therapeutic Effect of Human-iPSC-Derived Neural Stem/Progenitor Cells Transplantation in Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med* 12: 83—96, 2023.
- 11) Okawara H, Sawada T, Matsubayashi K, et al: Gait ability required to achieve therapeutic effect in gait and balance function with the voluntary driven exoskeleton in patients with chronic spinal cord injury: a clinical study. *Spinal Cord* 58: 520—527, 2020.

別刷請求先 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
慶應義塾大学医学部整形外科
名越 慈人

【設問】

脊髄損傷の病態と治療について、正しいものを一つ選びなさい。

- ①日本において新規に発生する脊髄損傷は、年間およそ500人である。
- ②細胞移植に胎児組織由来の細胞を用いることは、本邦でも認められている。
- ③細胞移植の効果の一つとして、損傷脊髄内でニューロンへ分化し、宿主の組織と神経回路を形成することが挙げられる。
- ④脊髄損傷において、急性期も慢性期も病態は同様である。
- ⑤慢性期脊髄損傷に対してリハビリテーションを行っても、回復は見込めない。

(答え) ③

- ①×およそ5000人である。
- ②×倫理的に認められていない。
- ③○移植細胞のニューロン分化のほか、神経栄養因子の分泌や再髄鞘化も効能と考えられている。
- ④×慢性期は急性期に比べ、グリア瘢痕や空洞の形成が認められる。
- ⑤×慢性期にリハビリテーションを施行することにより、栄養因子の分泌上昇やシナプス形成が促進し、神経回路の構築が進んで機能の回復が見込める。