脊髄損傷に対する遺伝子改変神経幹細胞治療

西村由介 夏目敦至 原 政人 本村和也 若林俊彦

はじめに

脊髄損傷 (SCI) 後の神経再生は非常に制限され、損傷後に誘導される reactive astrocyte は急性期には損傷部を隔離して炎症の広がりを抑えるが、亜急性期にはコンドロイチン硫酸などの神経再生阻害因子を放出し、glial scar を形成し、神経再生の最大の障害の一つになる。この glial scar を制御することが脊髄損傷治療における大きなテーマである。

当教室は、現在までに IFN- β 遺伝子をリポソーム法にて脊髄損傷局所に投与することにより、グリア瘢痕の形成を抑制し、神経再生が導かれることを証明した¹⁾。また、SCI マウスモデルにおいて、静脈内投与した神経幹細胞 (neural stem cell: NSC) は、脊髄損傷部位に選択的に集積し、神経系細胞に分化することを示した²⁾。さらに、cytosine deaminase (CD) 遺伝子が 5-fluorocytosine (5-FC) を投与することにより働き (bystander 効果)、周囲の細胞を apoptosis に導く性質を利用して、マウスの脳腫瘍 glioma モデルにおいて腫瘍の増殖抑制効果を呈することを証明した³⁾。

これらの研究を統合し、IFN- β 遺伝子と CD 遺伝子を組み込まれた NSC (IFN-CD NSC) を静脈内投与し、脊髄機能回復がみられるか検討した。さらに、5-FC を投与してその効果が増幅されるかを検討した。

現在、進行中の研究であり、今回の報告は現時点での中間報告である。

方 法

Balb/C nude mouse (8~12 weeks) を用いた。SCI は、T9-10 level での背側 1 mm transaction model を作製した。

1. SCI 部位への NSC 集積評価

SCI 作成 1 週間後に Cell Tracker CM-DiI (Invitrogen) で label した *Escherichia coli lacZ* (β -galactosidase) gene を導入した NSC (lacZ-NSC) を tail vein より静脈内投与 (2.0×10^6 cells/PBS 100 μ l) し、その 1 週間後に安楽殺を行った。PBS (phosphate-buffered saline), 4% paraformaldehyde (PFA) で還流固定後、取り出した脊髄を切片とし、蛍光顕微鏡で観察して NSC の SCI 部位への集積を評価した。

2. SCI の脊髄機能回復評価

SCI を作成してから 1 週間後に①PBS のみ投与する群 (PBS 群; PBS 100 μ l), ②lacZ-NSC を投与する群 (lacZ 群; lacZ-NSC 2.0×10^6 cells/PBS 100 μ l), ③IFN- β ・CD 遺伝子を導入した IFN- β ・CD-NSC を投与する群 (CD. IFN 群; CD. IFN-NSC 2.0×10^6 cells/PBS 100 μ l), ④CD. IFN 群に 5-FC を投与する群 (5-FC 群; 5-FC を 900 mg/kg を SCI 48 時間後から連続 10 日間投与) を作成した。すべて tail vein より静脈内投与した。

脊髄機能評価として、Basso Mouse Score (BMS) (Fig. 1 a), inclined plane test (Fig. 1 b), transcranial MEP を用いた。Transcranial MEP は針電極を用いて経頭蓋刺激し、hamstrings muscle で針電極を用いて導出した (Fig. 1 c)。刺激は 12~15 mA とした。Amplitude により評価し、術前コントロール値に対する割合で検討した。

各群 n=5 とし、SCI 4 週間後までの結果を検討した。

脊髄再生評価に関しては、病理学的に免疫染色などを用い、2010 年 8 月現在進行中である。

結 果

1. SCI 部位への NSC 集積評価

DiI-labelled NSC が SCI 部位に集積していることが確

“Genetically-Engineered Neural Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury”

Yusuke Nishimura, M. D., Atsusi Natsume, M.D., Masahito Hara, M.D., Kazuya Motomura, M.D., Toshihiko Wakabayashi, M.D.

名古屋大学医学部脳神経外科・遺伝子再生医療センター／〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65 [連絡先: 西村由介]

Address reprint requests to: Yusuke Nishimura, M. D., Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Nagoya University, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8550, Japan

a

TABLE 1. SCORES AND OPERATIONAL DEFINITIONS FOR THE BASSO MOUSE SCALE FOR LOCOMOTION (BMS)

Score	
0	No ankle movement
1	Slight ankle movement
2	Extensive ankle movement
3	Plantar placing of the paw with or without weight support -OR- Occasional, frequent or consistent dorsal stepping but no plantar stepping
4	Occasional plantar stepping
5	Frequent or consistent plantar stepping, no coordination -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>some</i> coordination, paws <i>rotated</i> at initial contact <u>and</u> lift off (R/R)
6	Frequent or consistent plantar stepping, <i>some</i> coordination, paws <i>parallel</i> at initial contact (P/R, P/P) -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>rotated</i> at initial contact <u>and</u> lift off (R/R)
7	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> <i>rotated</i> at lift off (P/R) -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>severe</i> trunk instability
8	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>mild</i> trunk instability -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>normal</i> trunk stability and tail <i>down or up & down</i>
9	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>normal</i> trunk stability and tail <i>always</i> up.

b

The maximum inclination of the plane at which a mouse could maintain itself for 5 seconds.

c

Motor evoked potentials were elicited by transcranial electrical stimulation (15mA) of the motor cortex. Responses were recorded from the gastrocnemius muscle using needle electrodes

Fig. 1

a : Basso Mouse Scale (BMS).

(D. Michele Basso et al : Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. *J Neurotrauma* 23 (5), 635-659, 2006)

b : Inclined plane test.

c : MEP.

認められ、SCI 部位に migrate することが示唆された (Fig. 2).

2. 脊髄機能回復評価

1) BMS (Fig. 3 a)

CD. IFN 群では PBS 群、lacZ 群、5-FC 群と比較して SCI 4 週後に有意な改善がみられた。

5-FC 群では PBS 群、lacZ 群と比較して有意な改善はみられなかった。

2) Inclined plane test (Fig. 3 b)

CD. IFN 群では PBS 群、lacZ 群、5-FC 群と比較して SCI 4 週後に有意な改善がみられた。

5-FC 群では PBS 群、lacZ 群と比較して有意な改善はみられなかった。

3) Transcranial MEP (Fig. 3 c)

SCI 4 週間後の評価では、CD. IFN 群では PBS 群、

lacZ 群、5-FC 群と比較して MEP amplitude の有意な改善がみられた。

考 察

長らく脊髄損傷で傷ついた神経組織は再生することはないと考えられてきた。これは、失われた細胞を置き換える能力が中枢神経にないこと、神経軸索再生阻害因子の放出、glial scar の形成などが原因とされている。ここ最近ではこれらの問題を克服するため、embryonic stem cell-derived cells, mesenchymal stem cells, olfactory ensheathing cells, nestin-expressing multipotent hair follicle stem cells, neural stem cells などを用いた幹細胞治療の報告が相次いでいる。

今までの幹細胞治療の多くは local injection であるため、臨床応用は難しい。Local injection は direct surgery

Fig. 2

- a : Fluorescence microscopy revealed a large number of DiI-labelled cells in the lesion.
b : Hematoxylin and eosin stain.

Fig. 3

- a : BMS. The animals were evaluated for locomotor recovery on days 7, 14, 21, and 28. There was significant recovery in performance over 28 days post-injury in the IFN- β -treated group.
* : $p < 0.05$, compared to the PBS, lacZ-NSC, 5-FC groups. The data are expressed as means $\pm$ SD of 5 animals tested.
- b : Inclined plane test. The animals were evaluated for motor function by inclined plane test. The IFN- β -NSC-treated animals showed significant functional recovery at 2 weeks post-SCI.
* : $p < 0.05$, compared to the PBS, lacZ-NSC, 5-FC groups. The data are expressed as means $\pm$ SD of 5 animals tested.
- c : MEP ; Amplitude (Post-SCI 4wk). The longitudinal axis demonstrated proportion of amplitude to the pre-SCI. There was significant recovery in amplitude in the IFN group.
* : $p < 0.05$, compared to the PBS, lacZ-NSC, 5-FC groups. The data are expressed as means $\pm$ SD of 5 animals tested.

を必要とし、さらなる神経損傷が加わる可能性がある。また、局所の神経組織内に投与することにより NSC が有する migration ability が妨げられる可能性が高い。われわれは以前から静脈内投与した NSC が SCI の部位に選択的に migrate することを証明してきており、今回の研究でも、同様の結果を得た。

Reactive astrocyte は、SCI 急性期には損傷部位の縮小を導き、blood-brain barrier を修復する。また、炎症の拡大を防いで neuron や oligodendrocyte などを守り、脊髄機能回復につながる。SCI 1~2 週間後の亜急性期に reactive astrocyte により形成される glial scar が出現し始め、4 週間後に完成する。この亜急性期に reactive astrocyte の増殖を抑えて、glial scar formation を防ぐ

かが治療のポイントになる。われわれはこの glial scar が形成される時期で、静脈内投与した NSC が有効に SCI 局所に到達する SCI 1 週間後³⁾に NSC を静脈内投与した。

今回の検討では、IFN- β を導入しない NSC の投与では、PBS のみ投与した群と比較して機能回復は得られなかった。NSC は静脈内投与後に neuron に分化し、神経軸索再生に寄与するが、reactive astrocyte が形成する glial scar の抑制作用を有するわけではない。IFN- β は、SCI 後に上昇してくる pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-8, TNF- α) の産生を抑制し、anti-inflammatory cytokine (IL-10) を増加させることで、好中球の遊走を阻止し、SCI における炎症反応抑制効果を有するのに加え、JAK-

STAT pathway を活性化させ、細胞増殖を抑制するとされる。われわれは IFN 遺伝子を導入した NSC を使用して、神経再生を抑制する glial scar を IFN- β により抑えたことが機能回復につながったと考えている。

IFN・CD 遺伝子導入 NSC 投与群に 5-FC を加えたものは有意な改善をみなかった。Reactive astrocyte をより効率的に減少させるため、bystander 効果を試みたが、5-FC 投与により周囲の reactive astrocyte とともに NSC 自体も apoptosis に陥るため、IFN の効果が減弱してしまったことが改善をみなかった原因になっている可能性が考えられる。文献による報告では、SCI 1~2 週間後には神経軸索再生がみられており、これらの再生中の神経細胞自体を阻害した可能性もある。

今後は、これまでの結果を受けて、神経再生の評価、

IFN による reactive astrocyte の抑制効果の検証を行っていく予定である。

文 献

- 1) Ito M, Natsume A : Type I interferon inhibits astorocytic gliosis and promotes functional recovery after spinal cord injury by deactivation of the MEK/ERK pathway. *J Neurotrauma* **26** : 41-53, 2009
- 2) Takeuchi H, Natsume A : Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1-and HGF-dependent manner. *Neurosci Lett* **426** : 69-74, 2007
- 3) Ito S, Natsume A : Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. *Cancer Gene Ther* **17** : 299-306, 2010