慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	脊髄損傷後の神経幹細胞移植に対する免疫抑制剤の効果 : C5aアンタゴニストの有用性
Sub Title	Efficacy of C5a antagonist for human iPS-derived neural precursor cells transplanted into injured spinal cord
Author	名越, 慈人(Nagoshi, Narihito)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	脊髄損傷の急性期では炎症反応が強く、神経幹細胞の移植を行っても生着せず、効果が期待できない。本研究では、炎症反応を惹起する補体の抑制剤を投与することで、急性期にヒトiPS細胞由来神経幹細胞を移植したところ、細胞の生着率が向上し、運動機能の回復も認めた。補体抑制剤を用いることで、急性期の炎症性サイトカインの発現や炎症細胞の浸潤、さらには宿主の神経細胞のアポトーシスも抑制されており、移植細胞にとって良好な環境が整っていることが考えられた。 Because inflammatory reaction is intense at acute phase of spinal cord injury (SCI), cell transplantation therapy during this stage is not effective due to low survival rate of transplanted cells. In this study, by administrating complement receptor antagonist, transplanted human iPS cell-derived neural stem cells well survived and promoted motor functional recovery when grafted even at acute phase. The antagonist suppressed the expression of inflammatory cytokines, infiltration of inflammatory cells, and the apoptosis of neural cells in the spinal cord. This histological efficacy can contribute to making a favorable environment for the transplanted cells to survive. We believe that this study will lead to future clinical application as a treatment that enhances the effect of cell transplantation for SCI.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (B) (一般) 研究期間 : 2017 ~ 2019 課題番号 : 17H04318 研究分野 : 脊髄損傷
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17H04318seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｈ０４３１８

研究課題名（和文）脊髄損傷後の神経幹細胞移植に対する免疫抑制剤の効果-C5aアンタゴニストの有用性

研究課題名（英文）Efficacy of C5a antagonist for human iPS-derived neural precursor cells transplanted into injured spinal cord

研究代表者
名越　慈人（NAGOSHI, Narihito）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：１０３８３８３７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,000,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷の急性期では炎症反応が強く、神経幹細胞の移植を行っても生着せず、効果が期待できない。本研究では、炎症反応を惹起する補体の抑制剤を投与することで、急性期にヒトiPS細胞由来神経幹細胞を移植したところ、細胞の生着率が向上し、運動機能の回復も認めた。補体抑制剤を用いることで、急性期の炎症性サイトカインの発現や炎症細胞の浸潤、さらには宿主の神経細胞のアポトーシスも抑制されており、移植細胞にとって良好な環境が整っていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、脊髄損傷モデルに対してC5a受容体アンタゴニストを投与することにより、損傷急性期においても移植した神経幹細胞が生着し、運動機能が回復することを明らかにした。これまでの脊髄損傷における細胞移植治療は、炎症が収まる亜急性期での移植が有効とされているが、本研究により従来よりも早期の治療介入が可能になると考える。
C5aを阻害する薬剤は、臓器移植や神経変性疾患など臨床の現場で既に使用されている。本研究は、脊髄損傷に対する細胞移植の効果をより高める治療として、今後の臨床応用に繋がる研究成果と考える。

研究成果の概要（英文）：Because inflammatory reaction is intense at acute phase of spinal cord injury (SCI), cell transplantation therapy during this stage is not effective due to low survival rate of transplanted cells. In this study, by administrating complement receptor antagonist, transplanted human iPS cell-derived neural stem cells well survived and promoted motor functional recovery when grafted even at acute phase. The antagonist suppressed the expression of inflammatory cytokines, infiltration of inflammatory cells, and the apoptosis of neural cells in the spinal cord. This histological efficacy can contribute to making a favorable environment for the transplanted cells to survive. We believe that this study will lead to future clinical application as a treatment that enhances the effect of cell transplantation for SCI.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：ヒトiPS細胞　神経幹細胞　細胞移植治療　補体　神経炎症

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

iPS 細胞の発見以来、目的の細胞へ分化誘導して移植を行い、疾患や障害の治療に役立てようとする再生医療が注目を集めている。脊髄損傷に対しても、iPS 細胞から中枢神経系の神経幹細胞を誘導し移植を行うことで、損傷範囲が縮小し運動機能の回復が得られることが報告されている。[1,2] 神経幹細胞の至適な移植時期に関しては、これまでの研究から、損傷直後の急性期ではなく、炎症が収まる亜急性期（損傷後 1-2 週）と考えられている。[3] しかし、急性期には炎症細胞の浸潤や神経細胞のアポトーシスが亢進するため、たとえ炎症が収まったとしても脊髄の回復能力は低下し、細胞移植後の機能改善も限定的となる。もし急性期に炎症を抑え、残存する細胞を保護することができれば、脊髄損傷の程度も最小限にとどめることができ、より効果的な回復が望める。さらに、炎症過程を抑制することで、急性期に細胞移植を行うことも可能になると考える。

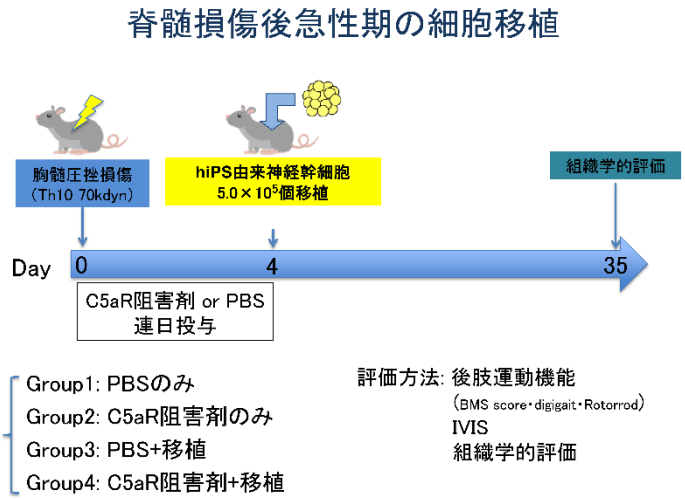
補体は、脊髄損傷後の病態に重要な役割を果たす。補体タンパク質は、様々な神経毒性サイトカインや炎症細胞を活性化し、神経損傷を悪化させる。中でも C5a は受容体を介して強力な炎症性サイトカインの活性と炎症細胞の浸潤を引き起こす。つまり、補体は炎症反応の初動に関わる因子であり、補体の活性を抑制することによって神経炎症を抑え、移植細胞にとって生着しやすい環境が整うことが予想される。

２．研究の目的

本研究では、脊髄損傷急性期における炎症に対して、C5a 受容体のアンタゴニストを投与して炎症反応を抑制し、ヒト iPS 由来神経幹細胞を移植して生着率が向上するかを評価した。さらに、このアンタゴニストの投与と細胞移植の併用療法が機能回復にもたらす影響を調べた。

３．研究の方法

動物は SCID-Beige マウスを用意した。このマウスは T, B, NK 細胞は欠如しているものの、補体の機能は残存しているため、本研究において相応の動物と判断した。脊髄損傷は、第 10 胸髄に圧挫モデルを作成し、損傷直後より C5a 受容体アンタゴニストまたは PBS（コントロール）を 4 日間投与し、その後損傷中心部へヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を移植した（右図）。移植後 5 週間、行動機能評価を行い、その後組織学的評価を行った。移植細胞にはルシフェラーゼが導入されているため、移植後も生着した細胞の観察が可能であった。



脊髄損傷後の炎症性サイトカインは、定量的 PCR や RNA シークエンスにより評価した。また浸潤する炎症細胞については、flow-cytometry を用いて定量評価した。

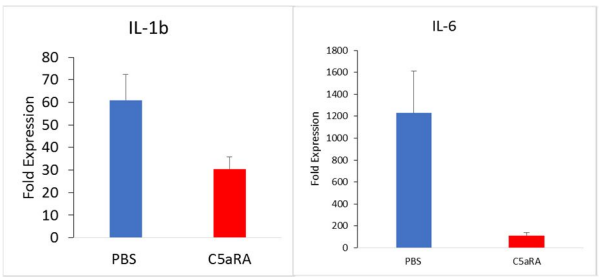
４．研究成果

（１）損傷脊髄における C5a および C5a 受容体の動態

脊髄損傷急性期における補体活性を評価するため、マウス脊髄損傷モデルを作成し、損傷後 1、4、7 日目における C5a およびその受容体の発現を ELISA で調べた。すると、損傷後 1 日目から双方の発現が有意に上昇し、さらに C5a は 7 日目までその発現が維持された。一方 C5a 受容体に関しては、損傷後 1 日目をピークに減少した。すなわち、C5a 受容体アンタゴニストの効果を期待するには、損傷直後から投与する必要があると考えられた。

（２）C5a 受容体アンタゴニスト投与による炎症抑制効果の検証

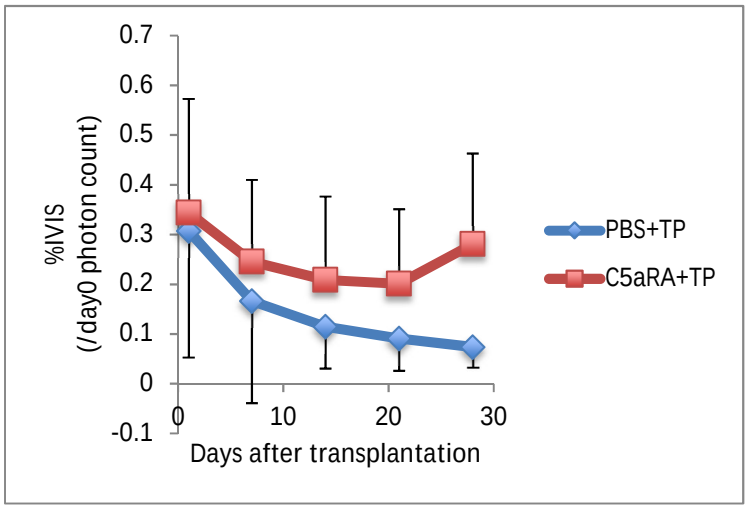
次に、脊髄損傷直後の炎症反応を評価するために、PCR を用いて RNA の発現を定量的に解析した。炎症性サイトカインである IL-1b や IL-6 は損傷後 6-12 時間でピークに達し、その後減少していた。しかし、C5a 受容体アンタゴニストを投与すると、双方のサイトカインは同時間帯において有意に減少していた（下図）。同時に、RNA sequence を用いて種々のケモカインの発現を評価したが、やはり同様に損傷後 12 時間において、C5a 受容体アンタゴニストを投与した群で有意な低下を認めた。興味深いことに、脊髄損傷後のマクロファージや好中球の



浸潤、宿主の神経細胞のアポトーシスも抑制されており、C5a による反応を抑えることで、急性期の炎症反応を包括的に抑制できることが明らかになった。

（3）C5a 受容体アンタゴニスト投与による移植細胞の生着率の評価

C5a 受容体アンタゴニストを脊髄損傷急性期に投与することによって、神経炎症が有意に抑制されることが分かったため、脊髄損傷モデルを作成して損傷直後よりアンタゴニストを投与し、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を損傷後 4 日目に移植して、細胞の生着率を評価した。移植後 5 週間まで観察したところ、C5a 受容体アンタゴニストを投与した群で、有意な細胞生着率の向上を示した（右図赤線）。また組織学的評価を行ったところ、生着した移植細胞の面積はアンタゴニスト投与群で有意に広がっていた。以上より、損傷急性期の炎症反応を抑えることで、同時期に細胞移植を行っても良好な生着が得られることが分かった。



（4）炎症抑制効果と移植細胞の分化傾向の関連性

C5a 受容体アンタゴニスト投与による炎症反応の抑制効果が、移植細胞の分化傾向に与える影響を調べるために、組織学的な定量評価を行った。移植細胞はアンタゴニストの投与の有無にかかわらず、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 系統へ分化していた。しかし、その分化傾向の比率は両群間で差を認めなかった。すなわち、炎症反応を抑制しても細胞の分化能には変化がないことが明らかになった。

（5）細胞移植後の運動機能評価

C5a アンタゴニストを投与した群で、良好な細胞の生着率が得られることが分かったため、運動機能評価を行った。細胞移植と C5a 受容体アンタゴニストを併用した群では、無治療の群に比べて有意に機能回復が認められた。また歩行の際の歩幅や下肢の接地角においても、良好な改善を認めていた。

（6）得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

本研究では、脊髄損傷モデルに対して C5a 受容体アンタゴニストを投与することにより、損傷急性期においても移植した神経幹細胞が生着し、運動機能が回復することを明らかにした。これまでの脊髄損傷における細胞移植治療は、炎症が収まる亜急性期での移植が有効とされているが、本研究により従来よりも早期の治療介入が可能になると考える。

C5a を阻害する薬剤は、臓器移植や神経変性疾患など臨床の現場で既に使用されている。本研究は、脊髄損傷に対する細胞移植の効果をより高める治療として、今後の臨床応用に繋がる研究成果と考える。

＜引用文献＞

1. 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* 2011;108:16825-30.

2. Nagoshi N, Okano H. iPSC-derived neural precursor cells: potential for cell transplantation therapy in spinal cord injury. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2018;75:989-1000.

3. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *Journal of neuroscience research* 2002;69:925-33.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Nagoshi Narihito、Tsuji Osahiko、Nakamura Masaya、Okano Hideyuki	４．巻 11
２．論文標題 Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Regenerative Therapy	６．最初と最後の頁 75～80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.05.006	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 －

１．著者名 Nagoshi Narihito、Tsuji Osahiko、Kitamura Kazuya、Suda Kota、Maeda Takeshi、Yato Yoshiyuki、Abe Takayuki、Hayata Daichika、Matsumoto Morio、Okano Hideyuki、Nakamura Masaya	４．巻 -
２．論文標題 Phase I/II Study of Intrathecal Administration of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor in Patients with Acute Spinal Cord Injury: A Double-Blind, Randomized Clinical Trial of Safety and Efficacy	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Neurotrauma	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2019.6854	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 －

１．著者名 Okawara Hiroki、Sawada Tomonori、Matsubayashi Kohei、Sugai Keiko、Tsuji Osahiko、Nagoshi Narihito、Matsumoto Morio、Nakamura Masaya	４．巻 58
２．論文標題 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	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Spinal Cord	６．最初と最後の頁 520～527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41393-019-0403-0	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 －

１．著者名 Hoshino Yutaka、Nishide Kenji、Nagoshi Narihito、Shibata Shinsuke、Moritoki Nobuko、Kojima Kota、Tsuji Osahiko、Matsumoto Morio、Kohyama Jun、Nakamura Masaya、Okano Hideyuki	４．巻 9
２．論文標題 The adeno-associated virus rh10 vector is an effective gene transfer system for chronic spinal cord injury	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46069-z	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 －

1．著者名 Tanimoto Yuji、Yamasaki Tomoteru、Nagoshi Narihito、Nishiyama Yuichiro、Nori Satoshi、Nishimura Soraya、Iida Tsuyoshi、Ozaki Masahiro、Tsuji Osahiko、Ji Bin、Aoki Ichio、Jinzaki Masahiro、Matsumoto Morio、Fujibayashi Yasuhisa、Zhang Ming‐Rong、Nakamura Masaya、Okano Hideyuki	4．巻 9
2．論文標題 In vivo monitoring of remnant undifferentiated neural cells following human induced pluripotent stem cell‐derived neural stem/progenitor cells transplantation	5．発行年 2020年
3．雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6．最初と最後の頁 465～477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/sctm.19-0150	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 －

〔学会発表〕　計10件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 Nagoshi N
2．発表標題 Regenerative medicine for spinal cord injury using iPS cells - from bench to bedside
3．学会等名 ASNTR Conference（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 名越慈人
2．発表標題 脊髄損傷に対する再生医療 -現状と今後の展望
3．学会等名 第2回痛みを学ぶ会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 名越慈人
2．発表標題 iPS細胞を用いた脊髄損傷に対する再生医療
3．学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会
4．発表年 2019年

１．発表者名
名越慈人

２．発表標題
急性脊髄損傷患者に対する肝細胞増殖因子を用いた第Ⅰ/Ⅱ相試験

３．学会等名
第54回日本脊髄障害医学会

４．発表年
2019年

１．発表者名
名越慈人

２．発表標題
脊髄損傷モデル動物を用いた再生医療の確立 -基礎から臨床へ

３．学会等名
第34回日本整形外科学会基礎学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
名越慈人

２．発表標題
iPS細胞を用いた脊髄損傷に対する再生医療

３．学会等名
第56回日本リハビリテーション医学会学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
名越慈人

２．発表標題
iPS細胞を用いた脊髄損傷に対する再生医療

３．学会等名
第56回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会

４．発表年
2019年

１．発表者名
柴田玲生，名越慈人，梶川慶太，鎌田泰裕，伊藤修平，松本守雄，岡野栄之，中村雅也

２．発表標題
急性期脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の検討-炎症抑制効果と細胞生着率の向上を目的としたC5a阻害剤の有用性

３．学会等名
第38回日本運動器移植・再生医学研究会

４．発表年
2019年

１．発表者名
柴田玲生，名越慈人，伊藤修平，辻収彦，松本守雄，岡野栄之，中村雅也

２．発表標題
急性期脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の検討 炎症抑制効果と細胞生着率の 向上を目的とした C5a 阻害剤の有用性

３．学会等名
第34回日本整形外科学会基礎学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
柴田玲生，名越慈人，伊藤修平，松本守雄，岡野栄之，中村雅也

２．発表標題
急性期脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の検討-炎症抑制効果と細胞生着率の向上を目的としたC5a阻害剤の有用性

３．学会等名
第54回日本脊髄障害医学会

４．発表年
2019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