

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	伊藤 啓太郎
主 論 文 題 名				
Histological effects of combined therapy involving scar resection, decellularized scaffolds, and human iPSC-NS/PCs transplantation in chronic complete spinal cord injury (慢性期脊髄完全損傷に対する、瘢痕切除と脱細胞化ハイドロゲルを併用したヒトiPS細胞由来神経幹前駆細胞移植の組織学的効果)				
(内容の要旨)				
脊髄損傷の慢性期は神経細胞死による空洞形成やグリア瘢痕、線維性瘢痕が生じ、神経軸索伸長を阻害する。急性期と比較して慢性期は課題が多く、多面的な治療が必要である。本研究の目的は、慢性期脊髄完全損傷に対する新たな治療アプローチを評価することであり、瘢痕切除、脱細胞化ハイドロゲル、およびhuman iPS cell-derived neural stem progenitor cell (hNS/PCs) 移植を組み合わせた治療法の有効性を検証した。空洞病変への足場材 (scaffold) として注目した脱細胞化骨格は、生体由来の臓器から細胞を機械的・化学的に取り除き、残った細胞外マトリックスを利用するものである。高い生体親和性や免疫拒絶反応リスクの低さなどが利点である。当初、概念通りに脱細胞化脊髄の利用を試みたが、動物中枢神経に由来するプリオン病リスクを否定できないことから、他臓器由来の脱細胞化骨格の利用を検討した。先行研究にて脱細胞化腎臓骨格上で有効な神経軸索伸長が得られた報告があり、今回は脊髄損傷の足場材として脱細胞化腎臓ハイドロゲルの利用を試みた。 まず、in vitroでは脊髄後根神経節dorsal root ganglia (DRG) を用いて、脱細胞化腎臓ハイドロゲルの濃度検証と有効性の検証を行った。結果、コントロール群と比較して8 mg/mlの脱細胞化ハイドロゲルで良好な軸索伸長を確認した。In vivoでは、ヌードラット (8週齢雌) に対して第10胸髄完全切断モデルを作成し、損傷6週目の慢性期にhNS/PCs移植 (1×10^6個) と脱細胞化ハイドロゲル注入を試行した。細胞移植3ヶ月後に脊髄組織を免疫染色で解析すると、移植単独群、ハイドロゲル併用群ともに瘢痕、特に線維性瘢痕の存在により損傷中心での移植細胞生着、遊走は認めなかった。治療が確立しつつあるグリア瘢痕と比較して、線維性瘢痕の治療は確立されたものが少なく、今回は外科的に線維性瘢痕への介入を追加する方針とした。瘢痕切除の効果を確認するため、損傷6週目の慢性期に瘢痕切除を施し、治療介入から1週間後の環境を免疫染色とRNA-sequencingで評価した。瘢痕切除1週間後の組織では、神経保護型マーカーの出現を確認した。RNA-seqでも軸索進展阻害因子 (Sema3b, EphrinB3, Robo1, Rtn4r) の減少と神経保護型マーカー (Arg1, NGF) の増加を確認し、瘢痕切除後に細胞移植に適した脊髄微小環境がもたらされたことを確認した。瘢痕切除とscaffoldを併用した群では、組織学的に血管内皮細胞CD31陽性領域増加、RNA-seqのGene Ontology解析で血管新生の項目がup regulateしていることを確認した。瘢痕切除による脊髄微小環境改善と、血管新生を伴う足場が形成された初期治療介入から1週目にhNS/PCs移植を施した。細胞移植+瘢痕切除+scaffold併用群では損傷中心で移植細胞生着が得られ、それに伴う宿主神経軸索の再生を得ることができた。今回の研究デザインでは、宿主神経軸索に対して一定の効果を確認できたが、損傷中心部の移植細胞遊走や移植細胞由来の軸索伸長には制限があり、下肢運動機能の改善は困難であった。今後、scaffoldへの薬剤併用療法やリハビリテーションの追加などさらなる研究継続が必要である。				