

研究テーマ

脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子とヒト iPS 細胞由来神経幹
前駆細胞移植の併用による新規治療法の開発

研究代表者

施設名 : 慶應義塾大学医学部 整形外科

氏名 : 末松 悠

研究テーマ：脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子とヒトiPS細胞由来神経幹前駆細胞移植の併用による新規治療法の開発

所属先：慶應義塾大学医学部整形外科

氏名：末松 悠

● 目的と方法

脊髄損傷 (spinal cord injury; SCI) は、運動および感覚機能に深刻な障害をもたらし、患者の生活の質を大幅に低下させる重篤な疾患である。SCI は初期の物理的損傷 (一次損傷) に加え、炎症反応など (二次損傷) が加わることで、損傷部位の細胞死が進行し、神経再生が阻害される。これまでの研究では、再生医療の一環としてヒト誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来の神経幹/前駆細胞 (neural stem/progenitor cells; NS/PCs) の移植が SCI 後の運動機能回復に効果を示すことが報告されている。しかし、移植された細胞が生着し、効果を発揮するためには、損傷部位の微小環境が整備されている必要がある。特に、急性期の炎症反応や無血管野の存在は、移植細胞の生存率を低下させ、神経再生を妨げる要因となることが考えられる。そのため、SCI 治療においては、移植環境の改善が不可欠である。

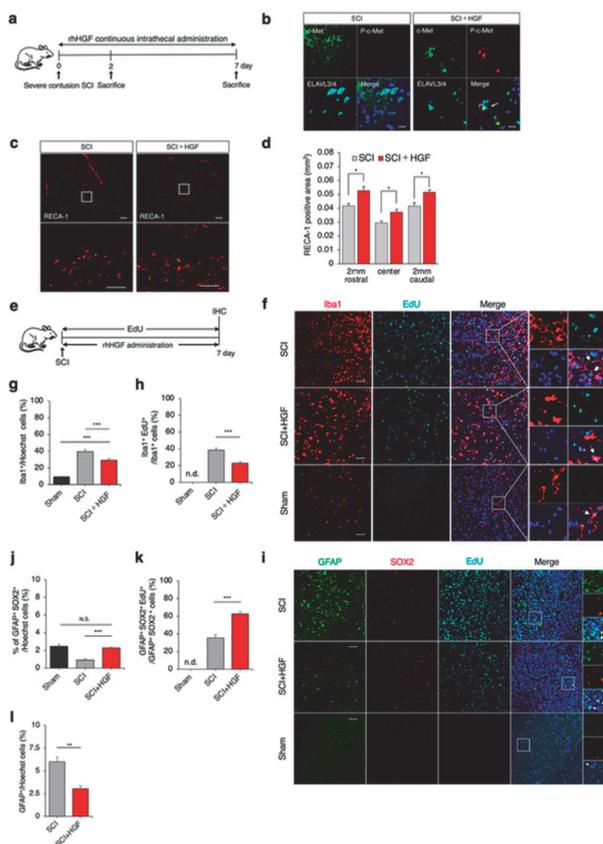
本研究では、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) を用いて SCI 後の脊髄微小環境の改善を試みた。HGF は抗炎症効果や血管新生促進効果を持ち、神経系の再生を促進することが報告されている。また、HGF は損傷部位での血管形成を促し、内因性神経幹細胞 (NSCs) の増殖を誘導する作用がある。このことから、HGF は SCI 治療において iPSC 由来の NS/PCs の移植効果を高める有望な候補と考えた。そこで、本研究では、HGF と NS/PCs の併用療法が SCI 後の運動機能回復に与える影響を評価し、両者の相乗効果を検証した。

実験は免疫不全ラット (rnu/rnu) を用い、T10 レベルで重度圧挫損傷 (IH impactor:240kdyn) を誘発することでモデルを構築した。SCI 直後から HGF を 2 週間にわたり髄腔内に持続投与し、9 日後に hiPSC-NS/PCs を損傷部位へ移植した。治療群は (1) 対照群、(2) HGF 単独群、(3) 細胞移植単独群、(4) HGF と細胞移植の併用群の 4 つに分け、各群間の治療効果を比較した。評価には、Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) スコアを用いた運動機能の測定、歩行解析システムによる歩幅と協調運動の確認を行った。また、組織学的解析により、損傷部位での髄鞘形成と神経再生の程度を評価した。さらに、RNA シーケンシングと免疫染色を用いて、HGF が分子レベルで脊髄微小環境に与える影響を解析した。

● 結果

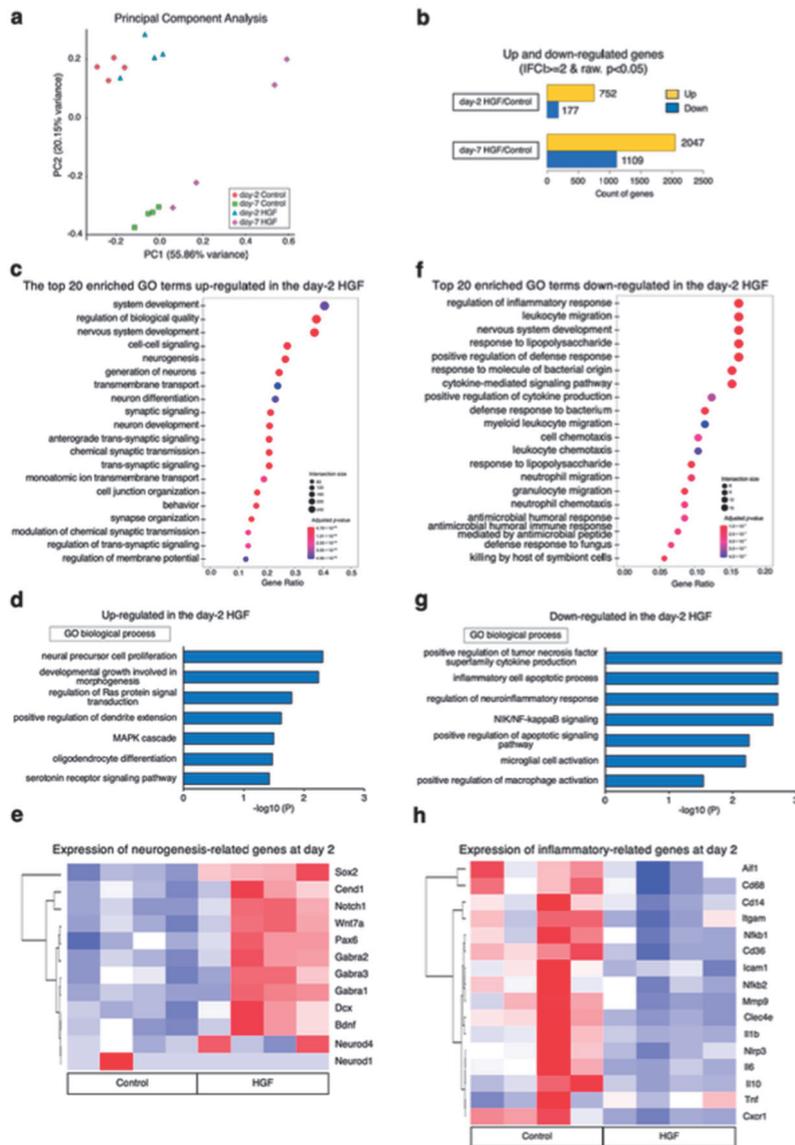
研究の結果、HGF の投与は急性期の損傷部位の炎症反応を効果的に抑制し、またこれまでの先行研究の通り、血管新生を促進することが確認された。HGF 投与群では、損傷部位で血管新生が著しく増加し、内因性 NSCs の増殖が増加した。(Fig. 1)。

Fig. 1



また、RNA-seq の解析により、HGF の投与が神経再生と炎症抑制に関連する多くの遺伝子の発現を調節していることが示された。2 日目の RNA-seq 解析では、HGF 群で 929 個の遺伝子が対照群と比較して有意に変動しており、7 日目では 3156 個の遺伝子が変動していた。特に、神経前駆細胞の増殖、軸索伸長、MAPK カスケードに関連する遺伝子が上方制御されていた。また、炎症応答の抑制に関与する「NIK/NF- κ B シグナル経路」や「グリア細胞の活性化」に関する遺伝子は下方制御され、炎症の進行と癒痕形成が抑えられていることが示唆された (Fig. 2)。

Fig. 2



次に HGF と hiPSC-NS/PCs の併用治療に関する研究を行った。その結果、HGF による環境改善が移植細胞の生存率を向上させ、損傷部位での神経再生と髄鞘形成を促進する効果が示された。さらに、併用療法群では、移植された NS/PCs が効率的に宿主神経とシナプスを形成し、神経線維の再生が促進された。(Fig. 3, 4, 5)

Fig. 3

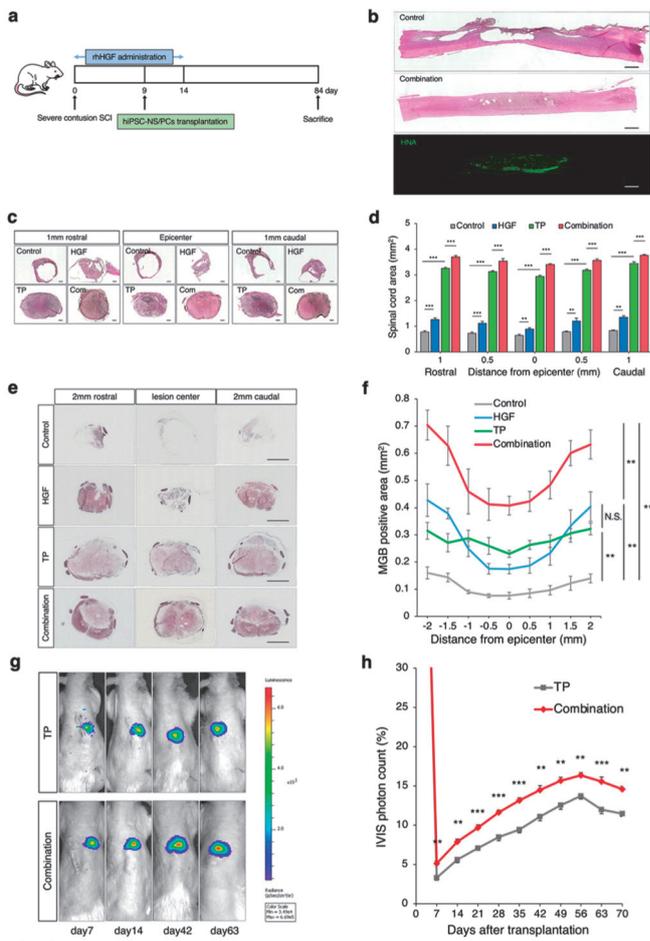


Fig. 4

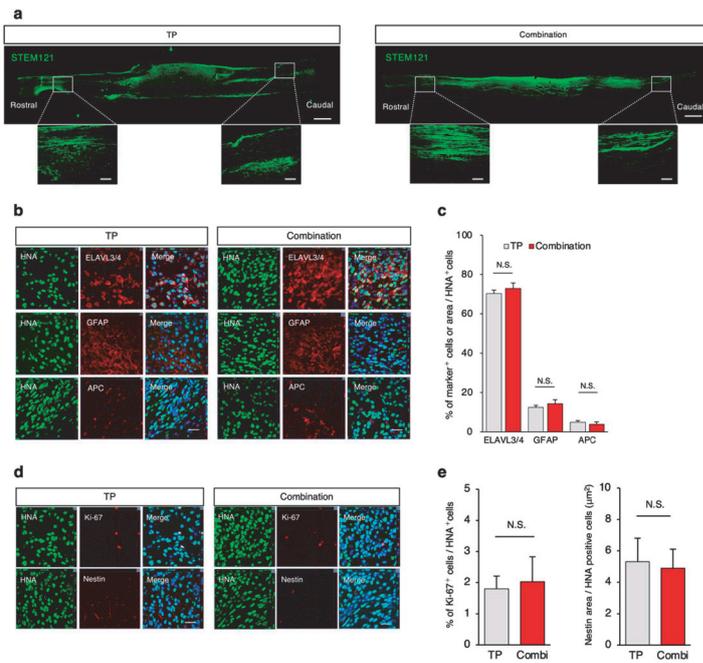
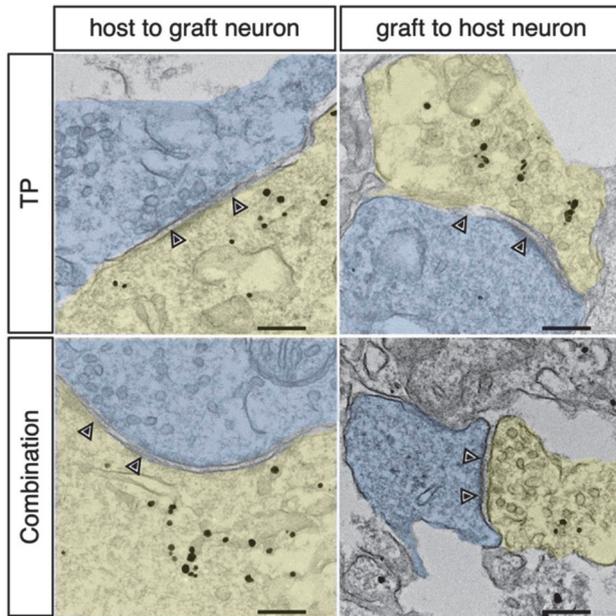
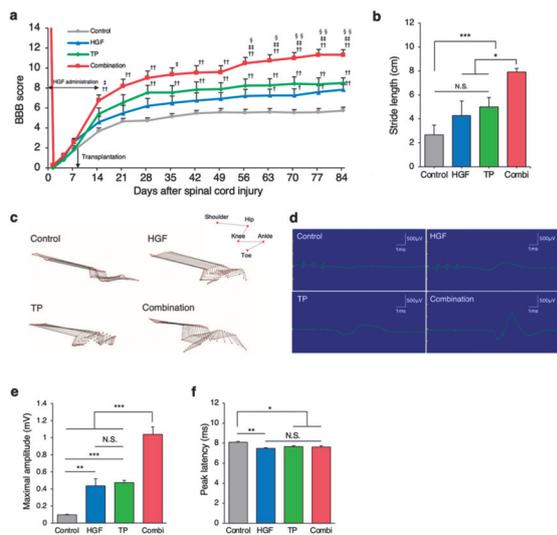


Fig. 5



また運動機能評価では、BBB スコアの評価において、併用群は他の群よりも有意に高い運動機能の改善を示した。特に、歩行解析では、併用群の歩容が大きく改善され、協調的な歩行が観察された (Fig. 6)。

Fig. 6



● 考察

本研究は、HGF と NS/PCs の併用がもたらす相乗効果について検討を行った。HGF は、NF- κ B シグナル経路を抑制することで、炎症反応の制御に寄与し、微小環境の改善をもたらします。これにより、移植細胞の生存率が高まり、神経再生が促進されることが考えられる。さらに、RNA シーケンシングの結果から、HGF は神経再生に関連する遺伝子の発現を活性化し、脊髄微小環境を整えることによって SCI 後の神経機能の回復が大幅に向上した。

本研究の結果から、HGF と NS/PCs の併用療法は、SCI に対する新しい治療戦略として非常に有望であることが示された。HGF の投与は損傷部位の環境を整え、NS/PCs 移植の効果を相乗的に高めることが明らかになった。今後は、SCI の重症度に応じた個別化治療プロトコルの確立が求められる。また、画像診断やバイオマーカーを用いた予後予測の改善が期待され、HGF と NS/PCs の併用療法が標準治療として確立される可能性がある。さらに、今後の大規模な臨床試験により、本研究の成果が再現性をもって確認され、安全性と有効性が評価されることが必要である。

● 結論

本研究は、HGF と NS/PCs の併用療法が SCI 後の神経再生と運動機能回復に寄与することを示した。この併用療法は、神経系再生医療の分野における新しい標準治療の確立に向けた重要な一歩となる可能性がある。

- 1 Nori, S. *et al.* Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16825-16830 (2011). <https://doi.org:10.1073/pnas.1108077108>
- 2 Kamata, Y. *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). <https://doi.org:10.1002/sctm.20-0269>
- 3 Kobayashi, Y. *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).
<https://doi.org:10.1371/journal.pone.0052787>
- 4 Sugai, K. *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). <https://doi.org:10.1016/j.reth.2021.08.005>
- 5 Lu, P. *et al.* Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron* **83**, 789-796 (2014).
<https://doi.org:10.1016/j.neuron.2014.07.014>
- 6 Yokota, K. *et al.* Engrafted Neural Stem/Progenitor Cells Promote Functional Recovery through Synapse Reorganization with Spared Host Neurons after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports* **5**, 264-277 (2015).
<https://doi.org:10.1016/j.stemcr.2015.06.004>
- 7 Lu, P. *et al.* Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* **150**, 1264-1273 (2012).
<https://doi.org:10.1016/j.cell.2012.08.020>
- 8 Nishimura, S. *et al.* Global gene expression analysis following spinal cord injury in non-human primates. *Exp Neurol* **261**, 171-179 (2014).
<https://doi.org:10.1016/j.expneurol.2014.05.021>
- 9 Nakamura, T. *et al.* Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440-443 (1989). <https://doi.org:10.1038/342440a0>
- 10 Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G. F. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 915-925 (2003).
<https://doi.org:10.1038/nrm1261>

- 11 Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 834-848 (2010). <https://doi.org:10.1038/nrm3012>
- 12 Lee, Y. S., Funk, L. H., Lee, J. K. & Bunge, M. B. Macrophage depletion and Schwann cell transplantation reduce cyst size after rat contusive spinal cord injury. *Neural Regen Res* **13**, 684-691 (2018). <https://doi.org:10.4103/1673-5374.230295>
- 13 Nguyen, H. X. *et al.* Systemic Neutrophil Depletion Modulates the Migration and Fate of Transplanted Human Neural Stem Cells to Rescue Functional Repair. *J Neurosci* **37**, 9269-9287 (2017). <https://doi.org:10.1523/JNEUROSCI.2785-16.2017>
- 14 Nicoleau, C. *et al.* Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *Stem Cells* **27**, 408-419 (2009). <https://doi.org:10.1634/stemcells.2008-0226>
- 15 Bussolino, F. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol* **119**, 629-641 (1992).
- 16 Ito, W. *et al.* Hepatocyte growth factor attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 268-280 (2005). <https://doi.org:10.1165/rcmb.2004-0058OC>
- 17 Giannopoulou, M. *et al.* Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-kappaB signaling. *Am J Pathol* **173**, 30-41 (2008). <https://doi.org:10.2353/ajpath.2008.070583>
- 18 Kitamura, K. *et al.* Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. *PLoS One* **6**, e27706 (2011). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0027706>

- 19 Kitamura, K. *et al.* Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* **85**, 2332-2342 (2007).
<https://doi.org:10.1002/jnr.21372>
- 20 Kitamura, K. *et al.* Application of Hepatocyte Growth Factor for Acute Spinal Cord Injury: The Road from Basic Studies to Human Treatment. *Int J Mol Sci* **20** (2019).
<https://doi.org:10.3390/ijms20051054>
- 21 Nagoshi, N. *et al.* 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. *J Neurotrauma* **37**, 1752-1758 (2020). <https://doi.org:10.1089/neu.2019.6854>
- 22 Okada, S. *et al.* In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* **19**, 1839-1841 (2005). <https://doi.org:10.1096/fj.05-4082fje>