

主論文の要旨

**Human umbilical cord-derived mesenchymal
stromal cells promote sensory recovery
in a spinal cord injury rat model**

〔ヒト臍帯由来間葉系間質細胞は脊髄損傷モデルラットにおいて
知覚回復を促進する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

滝川 幸子

【緒言】

脊髄損傷により傷害部位以下の運動機能障害と感覚障害が生じることは広く知られている。神経損傷に伴う神経障害性疼痛は一般に、刺激を伴わず持続する疼痛と、弱刺激にて疼痛が誘発されるアロディニアや痛覚過敏に分類される。この神経障害性疼痛は病態が複雑で多様なため治療困難であり、QOLに大きく関与する。

近年 ES 細胞や iPS 細胞を始め、安全性や倫理面での議論がなされる中、様々な幹細胞を用いた神経再生が多く研究されており、運動機能の回復も報告されている。臍帯由来間質細胞(hUCMSCs)は、自己再生能と多分化能を有し、胎児性幹細胞と成体幹細胞の両方の性質を併せ持つ細胞集団である。脊髄損傷モデルラットに対して hUCMSCs の移植を行ったところ、知覚過敏の回復を認めた。これまでの研究から、 γ -アミノ酪酸(GABA)の長期投与により神経障害性疼痛に効果を認めたとの報告があり、hUCMSCs 移植後の神経障害回復に GABA が関与している可能性を考え、hUCMSCs の GABA 産生能について解析を行った。

【方法】

インフォームド・コンセントのもと、選択的帝王切開術時に臍帯を採取し、hUCMSCs の分離、培養を行った。定量的 PCR および FACS により、神経細胞系譜マーカーの発現解析、神経幹細胞に発現する転写因子群の遺伝子発現解析を行い、hUCMSCs の性質を確認した。また、高速液体クロマトグラフィーにより、培養上清中に含まれる GABA などの神経伝達物質の濃度を測定した。

生後 7 週齢の雌ラットを麻酔下に第 9-10 胸椎部位で左半切断した脊髄損傷モデルラットを作製し、 1×10^6 個の hUCMSCs を切断部位に 3 カ所に分け移植した (Fig. 3A)。コントロール群には PBS のみ投与した。移植後 8 週間にわたり、温熱過敏を評価するため tail immersion test を、機械的刺激に対する過敏性を評価するため von Frey test を行い、下肢知覚異常を観察した。さらに組織学的解析により、hUCMSCs 移植後の脊髄損傷部位の組織学的変化を検討した。

【結果】

FACS の結果より、hUCMSCs は神経幹細胞および神経前駆細胞に特有な細胞内タンパクマーカーである Nestin、GFAP、Tuj-1 の発現を認めた (Fig. 1)。さらに、hUCMSCs を浮遊培養し sphere 形成することにより、神経幹細胞に発現する転写因子である *NEUROD1*、*NEUROGENIN1* および *NEUROGENIN2* の発現がそれぞれ 2.5 倍、6.7 倍および 16.7 倍と著明に上昇した (Fig. 2)。これらの結果より、hUCMSCs は神経系譜に分化しうる可能性を持つ細胞集団であると考えられた。

脊髄損傷モデルラットに対して、sphere 培養処理を行った hUCMSCs を移植した結果、移植後 2 週目から触刺激や温熱刺激に対する知覚過敏の改善を認め、移植後 6 週目には非損傷群と同等レベルまで回復を認めた (Fig. 3B・3C)。移植後 8 週、脊髄組織の免疫組織染色を行った。生着した hUCMSCs をヒト特異的抗核抗体で標識したところ、そ

の 80%以上の細胞がグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD65) 抗体陽性を示し、hUCMSCs が GABA 産生能を有した状態で生着していると考えられた (Fig. 4A)。さらに、PBS 群と比較し、NeuN 陽性の神経細胞、GFAP 陽性のアストロサイトおよび CNPase 陽性のオリゴデンドロサイトが損傷部位周囲に有意に生存しており (Fig. 4B・4C・4D)、神経組織が温存されていた。

さらに、*in vitro*における hUCMSCs の GABA 産生能についてヒト骨髄間葉系幹細胞 (hBMSCs) と比較検討した。培養上清中には約 2 倍の GABA が検出された (Fig. 5A)。hUCMSCs の約 8 割の細胞が GAD65 陽性 (Fig. 5B・5C) であり、PCR 法でも hBMSCs と比較し hUCMSCs が GAD65 を強く発現していることが示された (Fig. 5D)。また、GABA 作動性ニューロンの運命決定や分化に関与しているとされる遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて比較した (Fig. 5E・5F・5G)。発生期に大脳皮質において GABA 作動性ニューロンへの分化を誘導する Achaete-scute complex homolog 1 (*ASCL1*) は hBMSCs の 4.8 倍の発現を示した。中脳腹側において *ASCL1* と協調的に働く HES/HEY-like transcription factor (*HELT*) および、小脳に発現する pancreas specific transcription factor (*PTF1A*) は、それぞれ 5.4 倍および 3.2 倍の発現を認めた。これらの結果から、hUCMSCs は hBMSCs と比較し、GABA 作動性細胞としての性質を有していることが示された。

【考察】

脊髄損傷モデルラットに hUCMSCs を移植することにより、神経障害性知覚過敏の改善が認められた。これまでの研究では、くも膜下腔や脊髄に GABA 作動性細胞を移植することにより機械的刺激に対するアロディニアが減弱すると報告されており、今回の結果は hUCMSCs が GABA 作動性細胞として機能している可能性を示唆している。

間葉系幹細胞は免疫調整能を有しており、サイトカインやケモカイン等を産生するパラクラインメカニズムにより組織保護作用や抗炎症作用に働くことが期待されている。hUCMSCs は間葉系幹細胞としての性質を有しているため、脊髄損傷部位に移植・生着後、神経細胞をアポトーシスから保護し、脊髄組織を温存していると考えられる。さらに、この抗炎症効果により hUCMSCs が脊髄損傷後の活性化ミクログリアの浸潤を抑制し癒痕形成を予防している可能性が考えられる。また、活性化したミクログリアに過剰発現した P2X4 受容体が刺激されることによりアロディニアが誘発されると近年提唱されており、hUCMSCs が活性化ミクログリアの浸潤を阻止することによりアロディニアの発症を予防する可能性が考えられる。

脊髄損傷部位に移植した hUCMSCs は生着後も GAD65 陽性を発現しており、*in vitro* で確認されたような GABA 作動性細胞としての性質を保ち続け、移植組織に持続的に GABA やサイトカインを供給し続けていると考えられる。hUCMSCs の GABA 作動性細胞としての性質は誘導培養を必要とせず特有であり、ES 細胞、iPS 細胞や他の幹細胞と同様に治療的価値を有すると考えられる。

【結論】

間葉系幹細胞と神経幹細胞様の性状を併せ持つ細胞集団である hUCMSCs に着目し、
脊髄損傷部位に移植することにより神経障害性疼痛の改善が期待できることを示した。
hUCMSCs は GABA 産生能を有し、移植組織において生着後も GABA 作動性細胞として機能する可能性を示した。