

主論文の要旨

**Functional Reconstruction of Denervated Muscle by
Xenotransplantation of Neural Cells from Porcine to Rat**

〔ブタからラットへの異種神経細胞移植による脱神経筋の機能再建〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 手の外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

佐伯 総太

【緒言】

神経損傷や神経変性疾患は脱神経による不可逆的な筋萎縮が問題になる。麻痺治療を目的として、脊髄への神経幹細胞移植が国内外で盛んに行われているが有効な治療法はいまだに確立していない。また、末梢神経をターゲットにした研究も以前から行われており、一定の成果を上げている。今後の臨床応用に向けて、ブタ胎児由来神経幹細胞をドナー細胞とした異種移植に注目した。本研究の目的は、ブタ胎児由来神経幹細胞を免疫不全ラットの末梢神経内に移植し、その効果を評価することで神経幹細胞の至適な採取時期や分離方法などの移植条件を検討することである。

【方法】

8 週齢のヌードラットの腓骨神経を大腿レベルで切断し、脱神経モデルラットを作成した。1 週間後、7 頭の妊娠マイクロミニブタ(妊娠 22 日目が 3 頭、妊娠 27 日目が 2 頭、妊娠 45 日目が 2 頭)から子宮を摘出した。子宮内のそれぞれのブタ胎児の脊髄から神経幹細胞を分離し、得られた細胞数に応じて脱神経モデルラットへ割り振り、片側の腓骨神経の遠位断端へ移植した。その結果、妊娠 22 日目の神経細胞投与ラットを 8 匹(E22 群)、妊娠 27 日目を 5 匹(E27 群)、妊娠 45 日目を 4 匹(E45 群)作成した。神経細胞を含まない培地のみを移植したラット 5 匹を対照群とした。

細胞移植から 12 週間後、各群で電気生理学的評価を行った。細胞移植部位の腓骨神経の遠位断端を露出させ、電気刺激装置(ニューロパック S 1、日本光電工業)を用いて刺激を行い、前脛骨筋の複合筋活動電位(CMAP)を測定後、各群の足関節の背屈角度を記録した。機能評価後、長母趾伸筋を採取し 4% PFA で灌流固定した。また、腓骨神経を採取し、近位部と遠位部に分けた。細胞移植部位を含む腓骨神経の近位半分を凍結包埋とし、腓骨神経の遠位半分を EPON 包埋とした。

腓骨神経の組織学的評価のため、抗 β 3-チューブリン抗体、抗 GFAP 抗体で免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。神経筋接合部の評価のため採取した長母趾伸筋をスライドガラスで圧迫し、4% PFA で固定した。その後抗 β 3 チューブリン抗体、抗 SMI-312 抗体、 α -Bungarotoxin で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。EPON 包埋した腓骨神経の遠位半分を薄切し、切片をトルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。そして、有髄軸索の数と面積を ImageJ/Fiji ソフトウェアを用いて測定した。

【結果】

電気生理学的評価では、E 22 群と E 27 群の CMAP の平均振幅はそれぞれ 1.47 mV と 3.64 mV であった(図 1 a)。E 45 群と対照群の全ラットで振幅は 0 mV であった。いずれの群でも CMAP の振幅に有意差は認められなかった。E22 群では 8 匹中 4 匹、E27 群では 5 匹中 4 匹のラットで、腓骨神経の電気刺激により足関節の背屈運動が見られた。E45 群と対照群では 4 匹とも足関節の背屈運動は見られなかった。いずれの群も足関節背屈角度に有意差はなかった(図 1 b)。

全ての移植群で細胞移植部位である腓骨神経断端が腫大していた(図 2 a)。一方、対

照群では断端の腫大は認められなかった(図 2 b)。組織学的評価では、蛍光免疫染色で全ての移植群で細胞移植部位の末梢神経に β 3-チューブリン陽性のニューロンと GFAP 陽性のアストロサイトが認められた(図 2 c)。また、E22 群と E27 群では再生された神経筋接合部を確認した(図 3 a)。E 45 群と対照群では、運動終板に到達した軸索はなかった(図 3 b)。トルイジンブルー染色により、全ての移植群の腓骨神経に有髄軸索の存在が確認された(図 4 a-d)。各群の有髄軸索数は E 27 群が最も多かったが、群間差は有意ではなかった(図 4 e)。各群の有髄軸索の平均断面積は E22 群で E27 群 ($p<0.01$) および E 45 群 ($p<0.01$) よりも有意に低かった(図 4 f)。各群の有髄軸索径の分布に有意な群間差はなかった(図 4 g)。

【考察】

本研究では、全ての移植群でブタ胎児由来の神経細胞がヌードラットの末梢神経内に生着しており、髄鞘化された軸索を確認した。このことから、ブタ胎児由来神経細胞が異種であるヌードラットの末梢神経内に生着することが示された。また、E22 群と E27 群では、腓骨神経の電気刺激により足関節の背屈運動が見られた。胎児を採取する時期によって移植成績に違いが見られ、神経幹細胞の至適な採取時期は妊娠 27 日目に近いという事が示唆された。

ラットの胎児由来神経細胞を中枢神経系から切り離された末梢神経に移植する研究は、Erb らが 1993 年に最初に報告した。同様の研究はこれまで他にマウスやヒトの iPS 細胞を用いたものはあったが、ブタ胎児の神経細胞を異種の末梢神経に移植した研究は初めてである。

ラットにおける胎児脊髄由来ニューロンの採取の最適な時期は、ニューロンへの分化が最も進む妊娠 14 日目とされている。また、ラット胎児のドーパミン作動性ニューロンも、妊娠 14 日目が移植に最適とされている。ブタの胎児のドーパミン作動性ニューロンの採取は、妊娠 26 日から 27 日目が最適とされる。これらの報告に基づくと、ブタ脊髄由来ニューロンの最適な採取時期は妊娠 27 日目頃と予測され、これは今回の実験結果と一致しており、妊娠 27 日目の細胞がニューロンへの分化が最も進んでいることを示唆している。電気生理学のおよび組織学的評価の結果から、E45 群のニューロンは、生着し軸索伸長はしたが機能的な神経筋接合部を形成しないことを示した。

本研究の限界として、まずサンプル数が少ないことが挙げられる。より多くのサンプルがあれば、胎児の妊娠期間の違いによる移植の効果の差がより明確にできたかもしれない。また、今後の臨床応用のためには移植条件を検討しさらに改善する必要がある。Deshpande らは、末梢神経への神経栄養因子の投与が筋への軸索成長を促進することを証明した。またいくつかの研究では、末梢神経内での運動ニューロンの生存を改善する因子が調査されている。このような知見をふまえ、今後さらなる研究が必要である。

【結論】

本研究では、ブタ胎児神経幹細胞の末梢神経への異種移植により脱神経筋の機能回復が可能であることを示した。この技術を医療工学と組み合わせることで、麻痺の新しい治療法の開発に役立つと考えられる。