

タイトル

筋萎縮性側索硬化症に対する幹細胞由来運動ニューロン移植治療の試み

氏名

京都大学 井上治久

派遣期間援助

2004年4月1日～2005年3月31日

研究機関

Neuroregeneration Laboratories and Center for Neuroregeneration Research at McLean Hospital/Harvard Medical School

研究指導者

Prof. Ole Isacson

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位および下位運動ニューロンの進行性変性・減少・消失を病理学的特徴とし、運動および呼吸機能の障害を生じる成人期発症の神経変性疾患である。また、大脳皮質および脊髄に存在する約30%の小介在ニューロンも変性する。以上のことから、ALSで変性し、減少・消失する運動ニューロンや小介在ニューロンを、胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES細胞) から、あるいは、胎児脊髄組織中の神経前駆細胞から作製されるニューロンを移植することによって補うことができれば、病気の進行を遅らせ、失われたニューロンの機能を補完できる可能性がある。

方法

私達はまず、レポーター遺伝子として Green fluorescent protein (GFP) を発現する運動ニューロンを ES細胞から作製し、実際に、ラット脊髄移植後の生存状況、周辺細胞とのネットワーク形成について調べた。GFPを発現によって、移植後に移植細胞の宿主組織中での可視化、宿主組織と移植細胞との区別が容易になる。移植前の培養状況下では、Sonic hedgehog と retinoic acid を培養液

中に加えることによって、ES 細胞から運動ニューロンへの分化効率は促進されることを確認した。運動ニューロンへ分化させ、さらに 1 個ずつにバラバラにした細胞を、正常の成体ラットの腰髄へと移植した。

さらに、ALS のモデルラットとして広く用いられている変異 SOD1 トランスジェニックラット（変異 SOD1 ラット）腰髄へ、胎児脊髄神経前駆細胞を移植した。移植前に胎児脊髄神経前駆細胞は、レンチウイルスベクターによって、プレシナプスタンパクである synapsin と GFP の融合タンパク（synapsin-GFP）を導入した。synapsin-GFP の発現によって、移植細胞が周辺とシナプスを介した機能的ネットワークを形成した場合に、ホスト組織中でのシナプスの可視化が可能になる。

結果

細胞移植後ラットを安楽死後、解析した。ES 細胞から作製し（図 1）、移植したニューロンは、移植後 5 週間後にも生存していた（図 2）。また、移植された細胞はニューロンの組織学的マーカーを発現し、周辺組織へ神経突起を伸長していた（図 2）。

一方、変異 SOD1 ラットへ移植された神経前駆細胞は、ニューロンのマーカーを発現し、炎症反応も惹起していなかった（図 3, 4）。

結論

以上の結果から、ES 細胞から、あるいは神経前駆細胞からできたニューロンは、移植後長期にわたり生存可能であることがわかった。さらに、移植された細胞はニューロンとして神経突起を周辺組織に伸ばし、シナプスを形成していたことから、ホスト組織と機能的なネットワークを形成していると考えられた。

図の説明

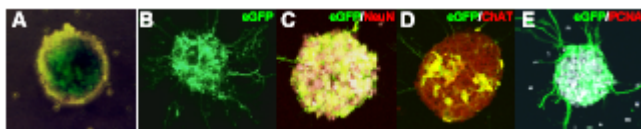


図 1. Hb9-eGFP 細胞は Sonic hedgehog と retinoic acid 刺激により運動ニューロンへ分化。

A. 20~30%の細胞が運動ニューロンへ分化し、GFP を発現していた。

- B. 細胞体と樹状突起で GFP 発現を認めた。
- C. GFP 陽性細胞は神経マーカーである NeuN (赤色) 陽性であった。
- D. GFP 陽性細胞は運動ニューロンマーカーの1つである ChAT (赤色) 陽性であった。
- E. 分化後は PCNA 陽性 (赤色) 増殖細胞はほとんど認めなかった。

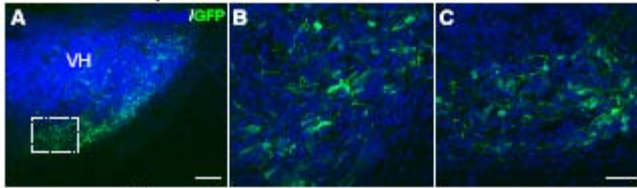


図 2. Hb9-eGFP ニューロンを 8 週令の ALS モデル (SOD1 G93A) ラットの腰髄前角へ移植。

- A. B. C. 移植ニューロンの長期間の生存を確認した。

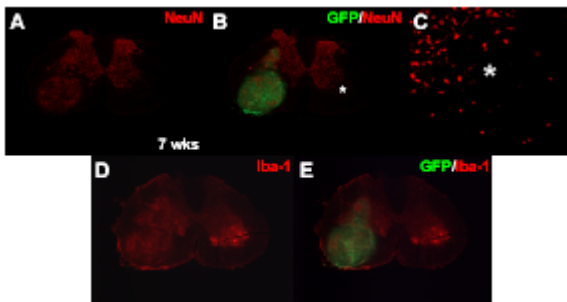


図 3. GFP 発現神経前駆細胞を ALS モデルラットの腰髄前角へ移植。

- A. B. 多くの移植細胞は神経マーカーである NeuN (赤色) を発現。
- C. 非移植側では 神経細胞を認めなかった。
- D. E. 非移植側では Iba-1 陽性ミクログリアの浸潤が認められたが、移植側ではミクログリアは認められなかった。

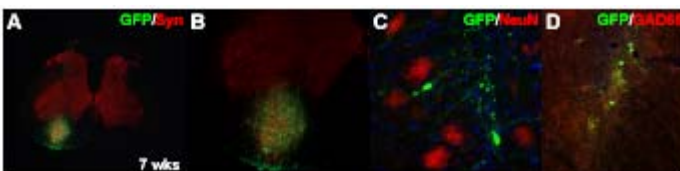


図 4. 次に神経細胞に分化すると synapsin-GFP を発現するレンチウイルスに感染した神経前駆細胞を ALS モデルラットの腰髄前角へ移植。

- A. B. 長期間に渡ってその生存は観察された。
- C. 周囲の細胞とシナプスを形成していた。
- D. 移植後のニューロンは、glutamate decarboxylase 65 (GAD65) 陽性であった。

学会発表

1. Hedlund E., Cizkova D., Kakinohana O., Inoue H., Hefferan M., Ferree A., Marsala M., Isacson O.: “Implantation of pre-differentiated embryonic stem (ES) cells or primary spinal cord precursors to restore function in the SOD1G93A rat model of ALS” 7th International Congress of the Cell Transplant Society, Boston, USA, Nov. (2004).

2. Hedlund E., Cizkova D., Ferree A., Kakinohana O., Hefferan M., Inoue H., Marsala M., Isacson O.: “Implantation of pre - differentiated embryonic stem (ES) cells or primary spinal cord precursors to restore function in the SOD1G93A rat model of ALS” 34th Ann. Meet. of Soc.for Neuroscience, San Diego, USA, Oct. (2004).