

研究テーマ

脊髄損傷に対する CPTX 遺伝子導入 hiPS-NS/PCs を用いた
Ex vivo 遺伝子治療

研究代表者

施設名 : 慶應義塾大学医学部
整形外科学教室

氏 名 : 西條 裕介

研究テーマ：脊髄損傷に対するCPTX遺伝子導入hiPS-NS/PCを用いたEx vivo遺伝子治療

所属先：慶應義塾大学病院 整形外科教室

氏名：西條 裕介

脊髄損傷(Spinal cord injury: SCI)は組織の損傷とその後の二次的な炎症を引き起こし、損傷部位以下で神経機能の不可逆的な障害をもたらす。SCI後の動物モデルにおいてヒト多能性幹細胞由来神経幹/前駆細胞(hiPSC-NS/PCs)を使用した細胞移植治療は、運動機能の改善を示し有効な治療法として期待されている。ただし、hiPSC-NS/PCsの移植単独では機能的な回復が限定的であるため、現在、新たな治療アプローチを従来のhiPSC-NS/PCsの移植療法と組み合わせることで更なる運動機能改善を計画している。我々は 機能改善メカニズムの一つである、シナプスの形成を介する神経回路の再構築に着目した。近年では河合らは Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs(DREADDs) システムを使用して、移植細胞を連続的に6週間刺激し、従来の移植手法と比較してシナプス遺伝子発現の増加と運動機能の改善を実現した1)。これらの研究は、宿主と移植由来のニューロン間で強力なシナプス結合が機能的な運動回復において重要であることを示した。シナプス形成を促進させるものとして、cerebellin-1(Cbln1)および neuronal pentraxin-1(NP1)といったシナプス形成を誘導する特異的なタンパク質が知られている。これらは、活動依存的に神経細胞から分泌され、成熟した神経回路においてシナプス形成を迅速に誘導する。最近開発された人工シナプスオーガナイザーであるCPTXはこれらの内因性シナプスオーガナイザーを改変して作成され、多くの神経回路で外因性のシナプス形成を誘導することができる2)。この分子は、前シナプス領域で発現するneurexin (NRX)のスプライスサイト4 (NRXSS4)と、後シナプス膜上のAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA Rs)に結合するようにデザインされている。本研究では、ウイルスベクターによりCPTXを発現する hiPSC-NS/PCsを作成し、移植した効果を組織学的、行動学的および電気生理学的な分析で評価した。

【方法】

初めにhiPS-NS/PCsにCPTX遺伝子をhiPS-NS/PCsに導入するためのレンチウイルスを作成した。in vitroにおいてウイルス感染した神経細胞よりCPTXが発現していることを確認し、細胞毒性の少ないウイルス最適量を設定した。次に免疫不全ラット第10 胸髄圧挫損傷を作成、損傷後9日目(亜急性期に相当) に細胞移植を行なった。移植後13週間のフォローアップ期間を設け、CPTX発現hiPS-NS/PCs移植群(CPTX群)、ウイルス投与なしの細胞移植単独群(コントロール群)、PBS群を含む3群で各種評価を行った。

【結果】

CPTX群における組織学的評価では、移植中心部においてCPTXの発現が認められ、局在化していた。これらの所見は遺伝子導入により移植細胞から長期間にわたり持続的に局所発現していることが示された（図1）。続いて各神経系細胞への分化傾向を調べたところコントロール群と同様の比率で、ELAVL3/4陽性ニューロン、APC陽性オリゴデンドロサイト、GFAP陽性アストロサイトへ良好な分化を示した。次に、CPTXによる影響について移植細胞と宿主細胞とのシナプスを介する相互作用をシナプス関連タンパクを用いて評価した。CPTX群ではシナプス成熟マーカーとして知られる synaptophysin(ヒト特異的)がコントロールと比較し移植中心部において優位に増加していることが認められた（図2）。同様に興奮性シナプス関連タンパクである vesicular glutamate transporter 2(VGLUT2)、post-synaptic density(PSD95)が増加していた。また前シナプスマーカーと後シナプスマーカーの接点を定量化したところ、接点数がCPTX群において有意に増加していた。これらの所見より局所的なシナプス形成が促進されていることが確認できた。一方で上位回路との接続を調べるために、G欠損組み換え狂犬病を用いたトレーシング実験を行なった。投射された神経回路では脊髄固有ニューロンやその他の回路への接続を認めた。特に赤核脊髄路への投射においてCPTX群においては有意にその投射面積の増加を確認できた。その他の回路についてはその起源となる細胞への追跡まではできず、今後の課題とした。行動機能評価についてはBBBスケールおよびトレッドミル歩行解析で評価をした。BBBスケールについては細胞を移植した2群はPBS群と比較し有意に運動機能改善を認めた。しかし、CPTX群についてコントロールを上回るスコアであったが、有意差は認めなかった。歩行解析では後肢の角度(Paw angle)においてCPTX群が他群と比較し有意に改善を認めた。誘発筋電図を用いた電気生理学的評価においてCPTX発現細胞移植群において、他群と比較し振幅の増大を認めた（図3）。これらのアプローチに伴う有害事象評価についてはウイルスベクターにより遺伝子導入されたhiPSC-NS/PCsの腫瘍性増殖は認めず、またCPTX長期発現に伴うアロディニア兆候は観察期間内では認めなかった。

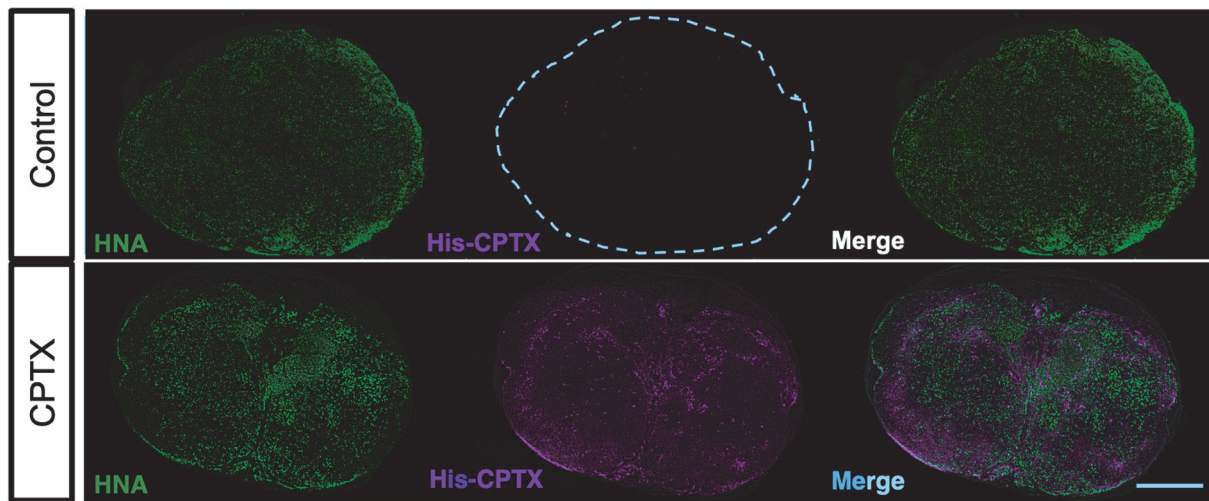


図 1 : CPTX発現iPS-NS/PCs移植後脊髓

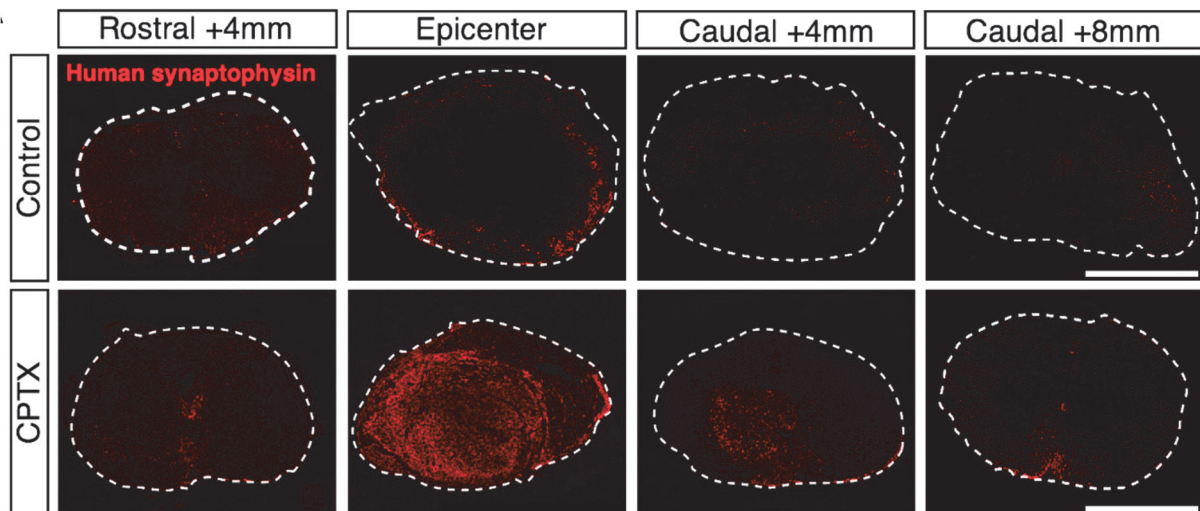


図 2 : シナプス成熟マーカー(human synaptophysin)の定量結果

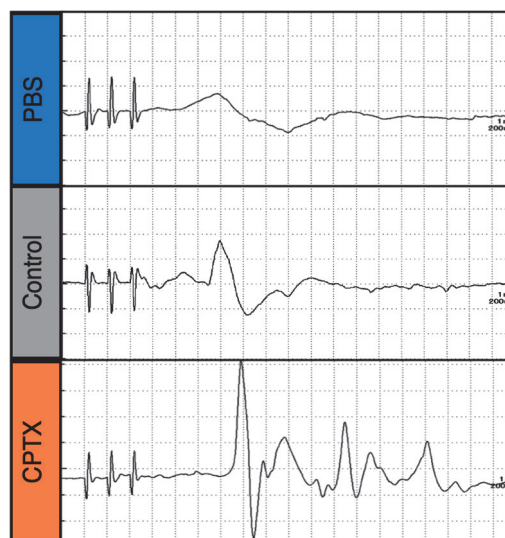


図3：MEPによる電気生理学的検査結果

【考察】

本研究では、CPTX遺伝子をウイルスベクターを介して導入したhiPSC-NS/PCsを用いた脊髄損傷治療への有効性を評価した。従来の移植法と比較し移植細胞周囲のシナプス形成と成熟が顕著に促進され、移植細胞由来のニューロンが宿主細胞由来の上位神経回路との接続も増加した。これらの結果、歩容の改善や脊髄伝導効率の改善に反映された。さらに、レンチウイルスとCPTXの長期発現は、観察期間内での腫瘍形成や痛覚過敏の悪化などの有害事象は認めなかった。したがって、この方法は将来の遺伝子治療の有用なツールとなり得る。従来の研究では、脊髄損傷後に移植細胞と宿主細胞とのシナプス形成の重要性が強調されてきた3)。移植細胞が、損傷した脊髄の下位神経回路または運動ニューロンと直接結合することが知られており4)、我々の研究では、CPTX遺伝子の導入により、移植細胞周囲の興奮性シナプス形成が劇的に促進された。この効果は、CPTXが移植細胞から分泌され、NRX(SS4)を発現する軸索末端を集積することで実現されたと考えられる。その一方でCPTXによる強力な興奮性シナプスの形成にも関わらず、特定の行動機能評価での効果が限定的であった。この理由の一つは、CPTXの分泌方法に関連していると考えている。外部からのCPTXタンパク質の投与と異なり、CPTXがニューロンで発現された場合、その分泌パターンに依存する。CPTX が軸索から不適切に分泌されると、移植細胞由来のニューロンの軸索は宿主神経回路とシナプスを形成できない可能性は考慮しないといけない。今後の研究では、CPTXの分泌パターンを最適化するための検討が必要である。また、我々が以前にも報告したように、SCI後の損傷部周囲へのCPTXタンパク質の単回投与により、迅速に運動機能が回復することを示している2)。一方、細胞移植は損傷によって空洞化し失った神経細胞を置き換えるために必要である。しかし、CPTXの受容体であるNRXsやAMPArsを発現するには、移植細胞が十分に成熟していない場合、それらは宿主の神経回路とシナプスを形成することは期待できず、本研究で開発したex vivoの遺伝子治療法は、宿主ニューロンと異なる発達段階の移植細胞とのシナプス形成を促進し、その欠点を補う利点がある。今後の研究では、異なるSCIの重症度や治療タイミングに応じてこれらのモダリティの特性を活用する方法についての検討が必要である。

【結語】

CPTX を組み合わせた治療法は、移植されたニューロンに対する興奮性シナプス入力の増加と、通常の移植法を上回る運動機能と脊髄伝導の改善をもたらした。これらのhiPS-NS/PCsを用いたex vivo遺伝子療法は、将来の臨床応用に向けて有望であると考えられる。

本研究は、2024年雑誌Stem Cell Reportsにてアクセプトされ掲載された。

<http://doi.orgg/10.1016/j.stemcr.2024.01.007>

【文献】

- 1) Momotaro K, Masaya N, Hideyuki O, et al. Longterm selective stimulation of transplanted neural stem/ progenitor cells for spinal cord injury improves locomotor function. Cell Reports 2021;37:
- 2) Kunimichi S, Takeuchi K, Michisuke Y, et al. A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits. Science 2020;369:
- 3) Takahiro K, Masaya N, Hideyuki O, et al. Modulation by DREADD reveals the therapeutic effect of human iPSC-derived neuronal activity on functional recovery after spinal cord injury. Stem Cell Reports 2022;17: 127–142.
- 4) Ken K, Mark T, Paul L, et al. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. Nature Medicine 2016;22:479– 487.