

一般演題1-1

ヒト脊髄幹細胞の移植による脊髄空気塞栓ラットの運動機能の回復について

垣花 脩¹⁾ Martin Marsala¹⁾ Kirl Johe²⁾

- | |
|--|
| 1) Univ. of California, San Diego, Anesthesiology,
Neuroregeneration Lab., La Jolla, CA |
| 2) Neural Stem Inc. Rockville, MD |

脊髄損傷の治療としてヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES cells) や人工多能性細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS cells) の移植療法は運動機能回復の有力な手段として期待されている。我々はすでに脊髄虚血性痙性麻痺ラットや外傷性麻痺ラット等にhNT細胞 (human neuroteratocarcinoma cells) やヒト脊髄幹細胞 (human spinal stem cells; HSSCs) の脊髄移植を行い運動機能の回復を報告している。

また我々は脊髄空気塞栓ラットモデルを作製し、これが組織学的にも減圧症と似たモデルであることを報告した。今回このモデルを用いて、HSSCs (RSC566; Neuralstem Inc., MD) を脊髄内移植し、運動機能の回復を見たので報告する。

【方法】

SDラット (雄, 350-375g, n=18) を用い2%イソフルレン麻酔下で2F Fogarty バルーンカテーテルを左大腿動脈より下行性大動脈へカテーテルの先端が腹腔動脈のすぐ上に届くまで (7.5cm) 挿入した。次いでPE10カテーテルを左内頸動脈より下行性大動脈へTh7-8の位置まで挿入し (5cm) ヘパリン (200IU) を注入した。腎臓や腸管の塞栓を防ぐ為、生理食塩水 (0.05ml) でバルーンを膨らませた後、PE10カテーテルより空気を注入し (0.2ml/kg, 0.05ml/分), 空気塞栓による脊髄損傷モデルを作製した。

2週間後再度イソフルレン麻酔下でTh13-L1の脊椎除去術を、歯科用ドリルを用いて行い (脊髄レベルL2-L6), 次いでガラス細管 (O.D.<0.1mm) を用いてGFP (green fluoroprotein) をラベルしたHSSCsを5-6層の深さ (D-V; 0.9mm) で両側にそれぞれ10ヶ所ずつ注入した (1.0ml/inj., 30,000個/ml)。その後生食で脊髄表面を洗浄し感染予防のためpenicillin/streptomycin溶液を塗布した後3.0-絹糸で筋肉と皮

膚を縫合した。

「NSI-566RSC」と呼ばれるHSSCは8週齢のヒト胎児の頸椎から培養された神経芽細胞の一種でNeuralstem Inc. (Rockville, MD, USA) により作製されセルバンクに登録されている。NIHとFDAのガイドラインに沿って作製されており、カリフォルニア大学サンディエゴ校のHuman Research Protection Programの審査を受けて今回の研究も行われている。GFPはヒトのユビキティンCプロモーターで発現されるようレンチウイルスをベクターとして挿入されている。GFP (+) HSSCsは移植日の前日にNeuralstem Inc.から低温保存4℃で発送され移植日は生存率 (>90%) を確認して移植した。

移植3日前から免疫抑制剤としてFK506 1.0mg/kg (Tacrolimus, プログラフ®, アステラス製薬) を移植後3ヶ月間、ラットを還流固定するまで毎日腹腔内投与した。

運動機能の回復はBBBスコア (0=完全麻痺, 21=普通歩行), MEPs (motor evoked potentials) とH-反射 (Hoffman-reflex) を測定して評価した。BBBスコアは毎週評価し, MEPsとH-反射はモデル作製前, 移植前そして還流固定前に測定した。MEPsは脳を横断刺激し (8mA), 腓腹筋より測定した。H-反射は腓腹筋を刺激し足底筋より測定した。刺激の強さを0.1mAから10mAまで少しずつ上げて最大のH-波とM-波を測定し, その比率H/M比を計算して評価した。

組織学的解析は還流固定後の脊髄切片にヒト特異的 (NUMA, NSE, hSyn) と非特異的 (DCX, MAP2, NeuN) な抗体を用いて免疫蛍光染色し蛍光顕微鏡にて解析した。

【結果】

移植細胞生存群のBBBスコア ($6.8 \pm 0.6 \rightarrow 14.8 \pm 6.8$) は非生存群 ($4.7 \pm 0.5 \rightarrow 5.5 \pm 1.0$) と比較して有意に高く運動機能の回復を示したが, MEPsとH/M比に有意差はなかった。移植したHSSCsは樹状突起や軸索を伸ばし神経のマーカーに陽性であった。

【結論】

脊髄幹細胞の移植は減圧症のような脊髄損傷の治療に有効な手段と考えられる。