



2021 年 10 月 15 日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

## 神経再生促進物質 LOTUS の遺伝子導入により脊髄損傷に対する ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療の効果を改善

慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之教授、同整形外科教室の中村雅也教授らの研究グループは、横浜市立大学医学群・大学院生命医科学研究科の竹居光太郎教授らとの共同研究により神経の再生を促進する Nogo 受容体-1 (NgR1) アンタゴニスト LOTUS (注 1) をヒト iPS 細胞から樹立した神経幹/前駆細胞 (注 2) に遺伝子導入することで、脊髄損傷に対する移植細胞による運動機能回復効果が向上することを発見しました。

これまで、脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞の移植の有効性が報告されていますが、損傷脊髄内は NgR1 リガンド (注 3) などの産生により神経軸索の伸長が阻害され、神経再生に過酷な環境となっているため、その治療効果は未だ限定的なものであり、治療効果の改善が望まれてきました。

本研究グループでは、すでに遺伝子改変動物実験により、NgR1 アンタゴニストである LOTUS が損傷脊髄において神経保護作用・軸索再生促進作用を持ち、運動機能回復に寄与することを報告しました。しかし、LOTUS はタンパク製剤としての精製が技術的に困難であり、脊髄損傷への投与方法が課題でした。今回、LOTUS 遺伝子を導入した神経幹細胞を用い、いわゆる *Ex vivo* 遺伝子治療 (注 4) の手法を活用して、その治療効果を検証しました。具体的には、レンチウイルスベクター (注 5) を用いて LOTUS をヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞に遺伝子導入し、背傷損傷亜急性期モデル動物に移植しました。LOTUS を遺伝子導入した神経幹/前駆細胞は軸索伸長が促進し、NgR1 リガンドによる軸索伸長阻害やアポトーシス (細胞死) を抑制し、神経栄養因子の発現が増加していました。さらに、損傷脊髄への細胞移植では、移植細胞の生着率が向上し、移植細胞の神経線維の伸長が促進し、脊髄内の縫線核脊髄路神経線維が増加しました。結果として、通常の細胞移植療法よりも、優れた運動機能回復を示しました。

今回の研究は、ヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞移植療法に *Ex vivo* 遺伝子治療を応用して損傷脊髄に LOTUS を体外から投与した初めての報告であり、細胞移植療法の治療効果向上において非常に大きな成果であると考えます。

本研究成果は、2021 年 10 月 15 日 (日本時間) に、国際幹細胞学会 (ISSCR) の公式ジャーナルである『Stem Cell Reports』のオンライン版に掲載されました。

### 1. 研究の背景

近年、脊髄損傷に対する薬物療法や細胞移植療法の研究が国内外で盛んに行われており、再生医療に注目が集まっています。本研究グループでは、ヒト iPS 細胞から樹立された神経幹/前駆細胞

を、脊髄損傷を加えた背傷損傷亜急性期モデル動物に移植することにより、移植細胞が神経細胞に分化し、良好な運動機能回復が得られることを報告しました。しかし、その治療効果は未だ限定的なものであり、治療効果のさらなる改善が望まれています。

損傷後の脊髄内では Nogo などの軸索再生阻害因子が産生され、それらは神経細胞に存在する Nogo 受容体-1 (NgR1) と結合して軸索伸長を阻害するため、神経再生を困難にする原因として知られています。そのため、NgR1 やその下流シグナルをターゲットとした治療法の研究が世界中で行われておりますが、未だ有効な治療薬は開発されておられません。

横浜市立大学の竹居光太郎教授らは、嗅覚情報を伝える 2 次伝導路である「嗅索」と呼ばれる神経回路の形成に重要な分子として神経回路形成因子 LOTUS を 2011 年に発見しました。さらに、LOTUS は強力な NgR1 拮抗物質として Nogo をはじめとした軸索再生阻害因子と NgR1 の相互作用を阻害することにより、それらの軸索伸長阻害作用を抑制することを明らかにしました。

本研究グループでは、同教授との共同研究として、2018 年に LOTUS 過剰発現マウスに対する脊髄損傷実験から、LOTUS が損傷脊髄において神経保護作用・軸索再生促進作用を持ち、運動機能回復に寄与することを報告しました。従って、LOTUS は細胞移植と併用することによりその移植効果を増強する可能性があると考えられました。しかし、現在 LOTUS はタンパク製剤としての精製には解決すべき課題が残っています。そこで、Ex vivo 遺伝子療法の手法を応用し、LOTUS を遺伝子導入したヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞を亜急性期脊髄損傷モデルに移植し、その有効性を検証しました。

## 2. 研究の概要と成果

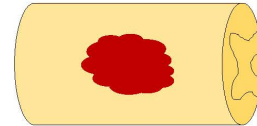
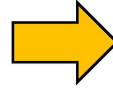
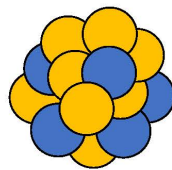
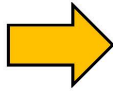
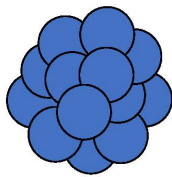
ヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞 (Control-NS/PCs) にレンチウイルスで LOTUS を遺伝子導入し、LOTUS-NS/PCs を作成しました。各細胞を分化誘導し、軸索伸長、遺伝子解析、NgR リガンド存在下での軸索伸長阻害、アポトーシス誘導について評価しました。さらに、マウスの脊髄損傷モデル (損傷後 9 日目 (亜急性期相当)) に、LOTUS を遺伝子導入した LOTUS-NS/PCs (LOTUS 群) を損傷中心部に移植しました。その対照実験として、通常の NS/PCs および、細胞を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与し、LOTUS-NS/PCs による治療効果を明らかにするために、これら 3 群を比較検討しました。その結果、以下のことが明らかとなりました。

- (1) LOTUS-NS/PCs は分化誘導した際に、軸索伸長が促進し、NgR1 リガンドによる軸索伸長阻害とアポトーシスが抑制されていきました。PCR 検査による遺伝子解析では、神経栄養因子の発現が増加していました。
- (2) 移植実験では、LOTUS 群は、対照群と比較し、移植した細胞の生着率が向上し、脊髄内での神経線維の頭尾側への伸長が向上しました。LOTUS 群では、マウスでの運動機能回復に重要である、セロトニン神経の線維が増加していました。
- (3) 損傷後低下したマウスの後肢運動機能は、対照群、PBS 群と比較し、LOTUS 群で有意な機能回復が認められました。

以上の結果から、レンチウイルスベクターを用いて LOTUS を遺伝子導入したヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞をマウス脊髄損傷亜急性期モデルに移植すると、神経栄養因子の発現が上昇し、NgR1 リガンドによる軸索再生阻害とアポトーシスの影響を受けにくくなり、移植細胞が脊髄内で軸索を伸ばすことにより、運動機能の回復傾向が増強したことが明らかになりました (図 1)。

LOTUS過剰発現ヒトiPS細胞  
由来神経幹/前駆細胞

亜急性期脊髄損傷



レンチウイルス遺伝子導入

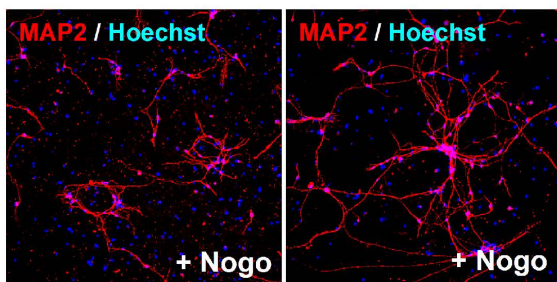
細胞移植

- 軸索伸長阻害 ↓
- アポトーシス ↓
- 神経栄養因子 ↑

- 移植細胞の生着率 ↑
- 移植細胞の神経線維伸長 ↑
- 縫線核脊髄路神経線維 ↑

Control

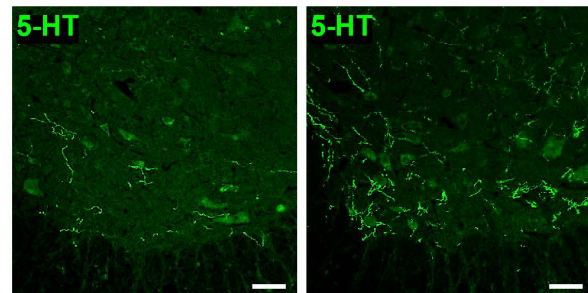
LOTUS



NgR1リガンドによる軸索伸長阻害の抑制

Control

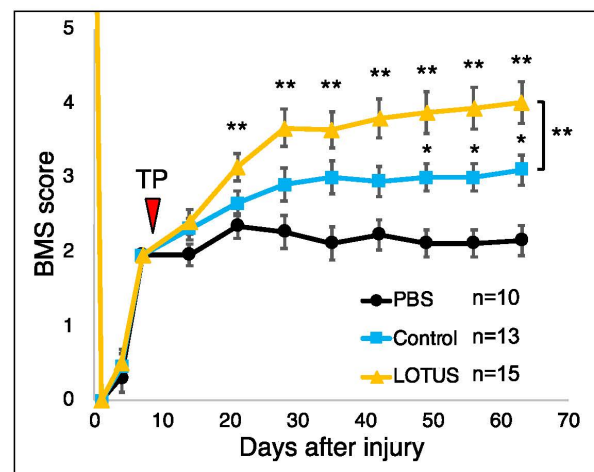
LOTUS



損傷脊髄内での縫線核脊髄路神経線維の増加



運動機能回復の向上



【図 1】 LOTUS の Ex vivo 遺伝子導入が細胞移植療法に及ぼす効果

### 3. 研究成果の意義・今後の展開

本研究は、遺伝子導入を施した神経幹細胞の移植、いわゆる Ex vivo 遺伝子治療の手法を用いて、LOTUS という神経再生促進物質を体外から損傷脊髄に投与し、細胞移植療法の効果を向上すること

とを示した初めての報告です。脊髄損傷患者へのヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞移植療法の治療効果向上のための大きな一歩であり、脊髄損傷のみならず脳梗塞など中枢神経系の疾患に対する治療戦略としても期待されています。

#### 4. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 AMED・再生医療実現拠点ネットワークプログラム疾患・組織別実用化研究拠点・拠点 A「iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療」（慶大）、および JSPS 科研費 JP17H03561（横浜市大）の支援によって行われました。

#### 5. 論文

英文タイトル : LOTUS overexpression via ex vivo gene transduction further promotes recovery of motor function following human iPSC-NS/PC transplantation for contusive spinal cord injury.

タイトル和訳: LOTUS を Ex vivo で遺伝子導入して過剰発現させると脊髄損傷に対するヒト iPSC-NS/PC 移植後の運動機能の回復を促進する

著者名 : 伊藤修平、名越慈人、鎌田泰裕、小島孝太、海苔 聡、松本守雄、竹居光太郎、中村雅也\*、岡野栄之\* (\*Corresponding authors)

掲載誌 : Stem Cell Reports (オンライン版)

DOI : 10.1016/j.stemcr.2021.09.006

#### 【用語解説】

- (注 1) LOTUS : マウスの嗅覚情報の二次伝導路である嗅策 (lateral olfactory tract : LOT) の神経を束ねるために欠かせない分子として LOT usher substance (LOTUS) が発見されました。LOTUS は神経細胞上に存在する NgR1 と結合し、そのリガンドである Nogo, MAG, OMgp, BLys, CSPGs と呼ばれる軸索再生阻害因子の受容体結合を阻害し、神経細胞の再生を促進します。
- (注 2) 神経幹/前駆細胞 : 未分化な状態を保ったまま増殖することが可能な自己複製能と、中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 系統の細胞へと分化することができる多分化能を併せ持つ細胞です。脊髄損傷や脳梗塞などへの再生医療への応用が期待されています。
- (注 3) NgR1 リガンド : Nogo 受容体-1 (NgR1) に結合するタンパク質。損傷後の脊髄の細胞から Nogo, MAG, OMgp, BLys, CSPGs などのタンパク質が産生され、神経細胞に存在する NgR1 と結合することで神経の再生を阻害する。
- (注 4) Ex vivo 遺伝子治療 : 患者の細胞に直接遺伝子を導入する治療を体内 (In vivo) 遺伝子治療と呼ぶ。一方、遺伝子導入した細胞を患者の体に移植し間接的に遺伝子導入をする方法を体外 (Ex vivo) 遺伝子治療と呼ぶ。
- (注 5) レンチウイルスベクター : 遺伝子情報を細胞内に伝えるためのツール (いわゆる運び屋) である。さまざまな種類のウイルスベクターが開発されており、すでに遺伝子治療に使用されている。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

---

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 生理学教室

教授 岡野 栄之（おかの ひでゆき）

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL : 03-5363-3747 FAX : 03-3357-5445 E-mail : hidokano@keio.jp

慶應義塾大学医学部 整形外科学教室

教授 中村 雅也（なかむら まさや）

TEL : 03-5363-3812 FAX : 03-3353-6597 E-mail : masa@a8.keio.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL : 03-5363-3611 FAX : 03-5363-3612 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp

<http://www.med.keio.ac.jp>

※本リリースのカラー版をご希望の方は【本リリースの配信元】までご連絡ください。