

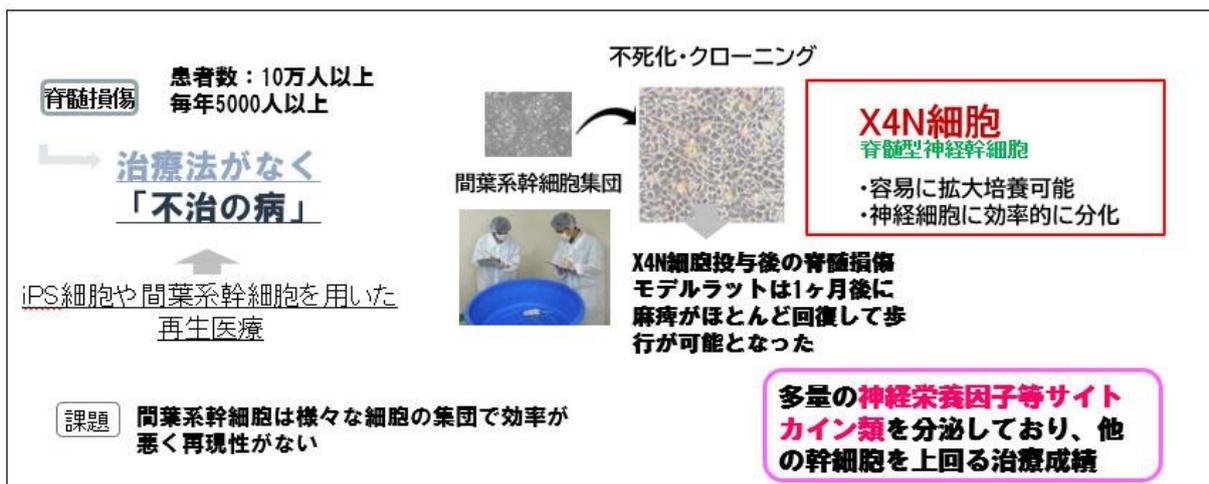
## 2024年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

### 「新規神経前駆細胞からの産生物質投与による低コスト脊髄損傷治療技術の開発」

[ 岡山大学学術研究院医歯薬学域・准教授 ] [ 中野 敬介 ]

#### 1. はじめに

脊髄損傷 (Spinal Cord Injury: SCI) は、事故等で脊髄に損傷を受け、脊髄中の運動神経や感覚神経が傷つくことで、そこから下部の運動や感覚における障害が発生する神経障害をいう。現在、日本には10万人以上の脊髄損傷患者がおり、毎年5千人以上の新たな患者が生じている状況である。運動神経のような中枢神経は、一度損傷を受けると二度と再生しないので、この脊髄損傷は不治の病と言われてきた。現在、この疾患の治療に iPS や間葉系幹細胞の移植による治療法が検討されている。一方、iPS 細胞や人工的に幹細胞化を施した細胞は特定の細胞への分化誘導のコントロールが非常に困難で、正確な分化誘導コントロールには課題がある。また分化誘導に際して単一細胞レベルでヘテロな細胞集団を生じ、腫瘍化の危険性を伴うことが知られている。安定した分化状態を保った細胞、高機能の組織再生能力を持った細胞、そしてそれらの安全な使用法が求められている。



#### 2. 概要

多能性幹細胞を利用した脊髄損傷の治療において、人工幹細胞移植に依存しない安全かつ効果的な治療方法の開発を目的とする。基本的に、複雑な分化誘導処理が不要な細胞で、強力な組織再生修復能を有する細胞から細胞の産生物を高濃度に抽出し、脊髄損傷の治療に用いる。具体的には疾患部および血中に細胞からの産生物を疾患モデル動物に投与し、細胞移植と同等の治癒効果のある治療法を開発する。

研究代表者はこれまで、骨髄移植による組織再生修復の研究に従事してきた。また、研究分担者の高島清文、河合穂高らは、細胞分化のコントロールを薬剤や遺伝子導入などによらない細胞環境の制御による制御が可能であることを見出している。また、実験動物を用いた骨髄移植において、様々な条件下で移植細胞を制御する方法を開発しており、骨髄から間葉系幹細胞を選択的に採取する方法について特許も取得している。また、移植した骨髄由来の間葉系幹細胞が傷害を受けた部位に移動して様々な細胞に分化することを確認している。本提案では iPS 細胞や人工的に作成した幹細胞の実用化のハードルとなっている、細胞そのものを脊髄損傷治療に用いる方法に対して、人工的に作成した幹細胞の産生物質を使用して組織再生を図るものである。本研究と同様の研究は国内外においてみられない。

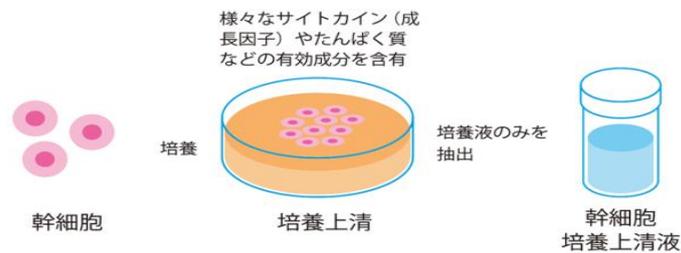
### 3.研究成果および今後の課題

#### 1) 移植治療用培養上清の作製 無血清培養、培養細胞の安定性の評価

X4N 細胞を  $10^6$ - $10^7$  個程度まで無血清培養し、問題なく増殖すること、細胞性格の変化なく、継代維持可能であることを確認した。X4N 細胞を長期に拡大しても変化がほとんどないこと、培養上清の定量定性分析を行い、培養上清中の有効成分が維持されていることを確認した。

#### 2) 培養上清の分析と調整 成分の最適化

X4N 細胞を無血清培養し培養上清の分離と成分の分析を行った。成分分析については、通常の培養上清及び神経分化した2種培養上清中の網羅的エクソソーム成分(miRNA 成分)とタンパク質成分(1000種類サイトカイン等)について分析を行った。X4N 細胞の培養液には強力な再生因子やエクソソームが含まれている(iPS 細胞の30倍も多い神経修復 BDNF や血管新生 VEGF が含まれている)ことが明らかになった。各種ウイルス陰性、マイコプラズマフリー、発熱性物質も含まれていないことを確認した。また、X4N 細胞ゲノム DNA 中にテロメラーゼ DNA 挿入物がないことを合わせて確認した。



#### 3) X4N 細胞培養上清を用いた脊髄損傷モデルラットの治療

脊髄損傷モデルラットを使用して、培養上清投与群(異なる2種類の投与方法を実施)、および培地コントロール群で治療効果を比較した。実験群は各群8匹を使用した。培養上清を用いて治療をおこなったラットのうち歩行可能なものが現れた。

#### 4. おわりに

この X4N 細胞は、神経機能を高めるサイトカイン BDNF を iPS 細胞の 40 倍も多く産生し、なおかつ有用なエクソソームをも産生する。この X4N 細胞を亜急性及び慢性のラット脊髄損傷モデルに移植すると、亜急性のみならず慢性のモデルにおいても、ラットの歩行が回復し、組織レベルでも神経機能の回復が確認されている。今回、我々は X4N 培養上清の有効成分を分析し、培養上清の製剤利用のための基盤を確立するとともに、培養上清を用いた脊髄損傷モデルラットの一部の治療に成功した。

#### 5. 本研究の今後の計画

##### 残課題

##### ① X4N 培養上清の効果的な投与方法の検討

投与量、投与回数を検討する。治癒効果との関係を調べ効果的な投与方法を検討する。

##### 追加課題

##### ② 他の疾患に対する効果についての検証

下顎神経、舌神経の損傷の回復、放射線障害による神経の回復について応用を検討する。

## 6. その他

(1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)  
なし

(2) 投稿論文(タイトル・学会名等)  
なし

(3) 本研究会の参加企業・団体名  
リジェネフォーティイ(株)