

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06430

研究課題名(和文) 中枢神経障害に対する幹細胞治療とロボットを使用したリハビリテーションの併用効果

研究課題名(英文) Robot assisted rehabilitation after stem cell transplantation in central nervous system disorders

研究代表者

猪村 剛史 (Imura, Takeshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(保)・助教

研究者番号：80760016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脊髄損傷モデル動物に対し間葉系幹細胞を移植することで運動機能回復に寄与するか否か検討した。細胞移植を行うことで移植を行わない群と比較して運動機能が改善することが分かった。移植後の脊髄組織では、炎症に関連する遺伝子発現が減少しており、運動機能改善に影響を与えた要因のひとつと考える。さらに、免荷型歩行補助装置を用いた介入を行ったところ、荷重下では自発運動がみられない時期においても、免荷をすることで自発運動を観察できたが、長期的な自発運動の持続には至らず、移植との併用効果については今後の課題となった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to determine mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation improves functional defects observed in rat spinal cord injury model. Rats in the group of MSCs transplantation showed more improvement compared with those in control group. The mRNA expression of inflammatory associated genes was lower in the group of MSCs transplantation than those in control group. Moreover, robot assisted rehabilitation was performed after injury. We could observe voluntary movement in the early phase after spinal cord injury by using assisted device. We need to examine the effect of robotic rehabilitation after MSCs transplantation.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：再生医療 リハビリテーション ロボット

1. 研究開始当初の背景

再生医療研究の発展により、これまで治療が極めて困難と考えられてきた疾患の治療が可能となってきた。神経再生医療分野においても、脳卒中や脊髄損傷患者を対象に、自家骨髄由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) を用いた臨床試験が始まっている。ところが、臨床試験が進むにつれ、細胞治療だけでは運動麻痺等の改善に限界があり、すべての症例で良好な運動機能改善を示さない事も分かってきた。

研究代表者らのこれまでの研究成果より、単に細胞移植を施すのみでなく、細胞移植後に運動介入 (リハビリテーション) を併用することで、治療効果をより高めることがわかってきたが、適切なリハビリテーション介入の手段については明らかでない。特に、重度の運動障害を呈す脊髄損傷に対するリハビリテーション介入では、麻痺した下肢に対して適切な荷重量の調整と運動補助を行い、効果的な運動を促通することが重要となる。

近年、歩行支援ロボットの開発が飛躍的に進んでおり、リハビリテーション分野でもロボット技術が応用されつつある。脊髄損傷による重度運動障害に対し MSCs を用いた細胞治療を行うとともに、歩行支援ロボットを使用したリハビリテーション介入を行うことで、細胞移植の効果を最大限に引き出せる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、脊髄損傷モデルラットに対し MSCs を移植することで運動機能回復に寄与するか否かを検討した。さらに、細胞治療の効果を高めるため、脊髄損傷モデル動物に対し、MSCs を移植する再生医療とロボットを用いたリハビリテーションを併用した介入を行い、運動機能改善に与える効果を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の培養

MSCs は直径 100 mm の培養皿を用いて培養した。MSCs 増殖用培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium - Low Glucose に 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin を添加したものをを用いた。播種から 72 時間後、培地交換により浮遊細胞を除去し、培養皿底面に接着した細胞を MSCs とした。培地交換は 3 日に 1 回の頻度で行った。培養条件は、気温 37 度、CO₂ 濃度 5% とした。

(2) 脊髄損傷モデルラットの作製

脊髄損傷モデルの作製には SD ラットを用い、Weight dropping method により損傷モデルを作製した。ラットの胸腰部の皮膚を正中切開し、第 9~11 胸椎レベルの椎弓切除を行い脊髄を露出した。第 10 胸椎レベル上に直径 2 mm の impactor rod を設置し、50 mm の高さから、10 g の錘を自由落下させ損傷を加えた。

損傷モデル作製後は、1 日 2 回の排尿管理と後肢の拘縮予防のための関節可動域運動を行った。また、損傷後のリハビリテーションとして、免荷装置を用いた運動を行った。

(3) 細胞移植

細胞懸濁液を回収した後、 1×10^6 cells/300 μ L となるように MSCs を PBS に懸濁した。細胞移植は脊髄損傷 24 時間後に尾静脈経路で行った。

(4) 運動機能評価

運動機能評価として、自発運動を評価する BBB scale およびラットを角度可変式の板上に乗せ、姿勢保持が可能な最大角度を測定する Inclined plane test を用いた。

(5) 遺伝子発現解析

real-time PCR により各群の脊髄組織の遺伝子発現を解析した。サンプリングは、移植 24 時間後に行った。解析には、炎症関連マーカーとして知られる腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α : *Tnfa*) や腫瘍壊死因子受容体 (Tumor necrosis factor receptor superfamily 1 α : *Tnfrsf1a*) を用いた。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の樹立と評価

細胞播種から数日で接着細胞が観察され、その後培養を継続することで増殖培養が可能であった。樹立された細胞は紡錘形の形態を示した (図 1)。

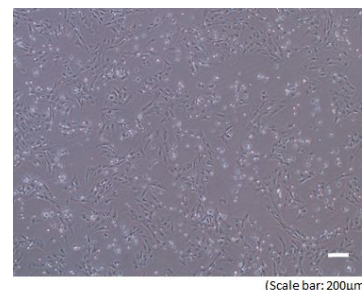


図 1 樹立した間葉系幹細胞

(2) 脊髄損傷モデル

Weight dropping method を用いることで、再現性の高い脊髄損傷モデルの作製が可能であった。損傷後に、脊髄組織を観察すると横断面 (図 2A)、縦断面 (図 2B) とともに損傷が確認された。

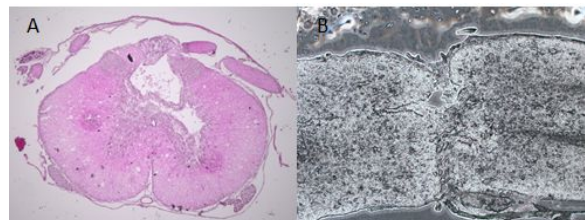


図 2 損傷脊髄の横断面像(A)と縦断面像(B)

(3) 運動機能の変化

BBB scale, Inclined plane test とともに治療を行わないコントロール群と比較して、細胞移植を行う群で運動機能が改善した (図 3)。

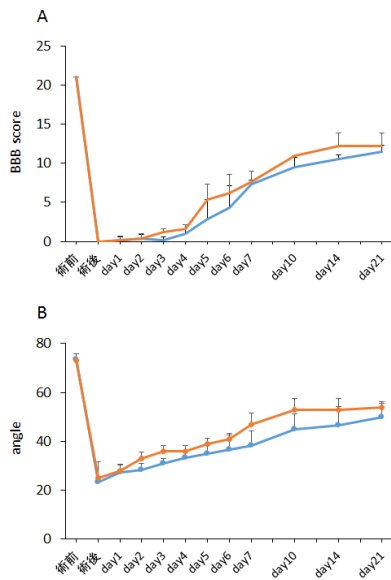


図3 運動機能の変化 (A:BBB scale B: Inclined plane test, 青線: コントロール群, 赤線: 細胞移植群)

(4) 脊髄損傷領域における遺伝子発現

炎症関連マーカーである *Tnfa* および *Tnfrsf1a* の発現は MSCs の移植を行った群において、移植を行わない群と比較して低値を示した。

(5) 免荷装置の脊髄損傷モデルへの使用

重度運動障害を呈したラット脊髄損傷モデルに対し、免荷補助装置を使用した歩行運動を実施した (図 4)。荷重下では自発運動がみられない時期においても、免荷をすることで自発運動を観察できたが、長期的な自発運動の持続には至らなかった。免荷程度等の条件検討に時間を要し、細胞移植との併用効果を明らかにすることは本研究では十分に行えず、今後の課題となった。



図4 脊髄損傷モデルに対する免荷歩行運動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Imura T., Tomiyasu M., Otsuru N., Nakagawa K., Otsuka T., Takahashi S., Takeda M., Shrestha L., Kawahara Y., Fukazawa T., Sueda T., Tanimoto K., Yuge L.: Hypoxic preconditioning increases the neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. *J Stem Cell Res Ther*, 2017 (査読有)
2. 弓削類, 猪村剛史, 中川慧: 再生医療とリハビリテーションの動向. *総合リハビリテーション*, 45:1, 5-11, 2016 (査読無)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 猪村剛史, 中川 慧, 大塚貴志, Looniva Shrestha, 品川勝弘, 河原裕美, 長谷川森一, 高橋信也, 末田泰二郎, 栗栖 薫, 弓削 類: ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の無血清培地での樹立および培養方法の検討. 第 16 回日本再生医療学会総会. 仙台. 2017 年 3 月 9 日.
2. 中川 慧, 高橋信也, 猪村剛史, 大塚貴志, 富安真弓, Looniva Shrestha, 末田泰二郎, 河原裕美, 弓削 類: 脊髄虚血再灌流モデルラットに対する間葉系幹細胞移植効果の検討. 第 16 回日本再生医療学会総会. 仙台. 2017 年 3 月 9 日.
3. 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, Looniva Shrestha, 品川勝弘, 高橋信也, 末田泰二郎, 栗栖 薫, 河原裕美, 弓削 類: 微小重力環境で培養したヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護効果. 第 16 回日本再生医療学会総会. 仙台. 2017 年 3 月 8 日.
4. Nakagawa K., Imura T., Otsuka T., Shrestha L., Shinagawa K., Takahashi S., Sueda T., Kurisu K., Kawahara Y., Yuge L.: The effects of simulated microgravity on neural

- differntiation of human cranial bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 32nd American Society for Gravitational and Space Research (ASGSR), Cleveland, OH, USA, October 26, 2016
5. Kawahara Y., Saito M., Imura T., Nakagawa K., Otsuka T., Shrestha L., Yuge L.: Myoblast differentiation is controlled by gravity force. 32nd American Society for Gravitational and Space Research (ASGSR), Cleveland, OH, USA, October 26, 2016
 6. Imura T., Nakagawa K., Otsuru N., Tomiyasu M., Otsuka T., Baba T., Kawahara Y., Shinagawa K., Takahashi S., Sueda T., Kurisu K., Yuge L.: Isolation of mesenchymal stem cells derived from human cranial bone marrow. 14th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), San francisco, CA, USA, June 22, 2016
 7. 大塚貴志, 富安真弓, 猪村剛史, 大鶴直史, 齋藤幹剛, 松尾直, 武田正明, 高橋信也, 中川慧, 谷本圭司, 河原裕美, 弓削類: 低酸素培養による間葉系幹細胞の神経保護効果. 第51回日本理学療法学会大会. 札幌. 2016年5月29日
 8. 猪村剛史, 馬場達也, 大鶴直史, 中川慧, 富安真弓, 齋藤幹剛, 大塚貴志, 河原裕美, 品川勝弘, 高橋信也, 末田泰二郎, 栗栖薫, 弓削類: ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の樹立方法の検討および多分化能評価. 第51回日本理学療法学会大会. 札幌. 2016年5月29日
 9. 大倉優之介, 深澤賢宏, 大塚貴志, 富安真弓, 猪村剛史, 大鶴直史, 河原裕美, 籾拓郎, 弓削類: 頭蓋骨由来ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養上清および移植効果の検討. 第51回日本理学療法学会大会. 札幌. 2016年5月28日
 10. 富安真弓, 大塚貴志, 猪村剛史, 大鶴直史, 中川慧, 齋藤幹剛, 松尾直, 武田正明, 高橋信也, 谷本圭司, 河原裕美, 弓削類: 低酸素培養による間葉系幹細胞の神経保護効果. 脊髄損傷モデルラットでの検討. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪. 2016年3月17日.
 11. 大塚貴志, 富安真弓, 猪村剛史, 大鶴直史, 齋藤幹剛, 松尾直, 高橋信也, 中川慧, 谷本圭司, 河原裕美, 弓削類: 低酸素培養による間葉系幹細胞の神経保護効果. NG108での検討. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪. 2016年3月17日
 12. 大鶴直史, 谷本圭司, 猪村剛史, 中川慧, 富安真弓, 齋藤幹剛, 大塚貴志, 高橋信也, 河原裕美, 弓削類: 低酸素環境がヒト間葉系幹細胞の神経分化に及ぼす影響. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪. 2016年3月17日
 13. 猪村剛史, 馬場達也, 大鶴直史, 中川慧, 富安真弓, 齋藤幹剛, 大塚貴志, 河原裕美, 品川勝弘, 高橋信也, 末田泰二郎, 栗栖薫, 弓削類: ヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の樹立方法の検討. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪. 2016年3月17日
 14. 中川慧, 猪村剛史, 大鶴直史, 富安真弓, 齋藤幹剛, 大塚貴志, 品川勝弘, 高橋信也, 末田泰二郎, 栗栖薫, 河原裕美, 弓削類: 重力環境の違いが頭蓋骨由来ヒト間葉系幹細胞の分化に与える影響. 第15回日本再生医療学会総会. 大阪. 2016年3月17日
 15. Kawahara Y., Furukawa T, Fukazawa T., Tanimoto K., Otsuru N., Imura T., Takahashi S., Sueda T., Kurisu K., Kumei Y., Yuge L.: Epigenetic regulation of the myoblast differentiation under simulated microgravity. 31th Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research(ASGSR), Alexandria, Virginia, USA, November 11 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪村 剛史 (IMURA TAKESHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：80760016

(4) 研究協力者

余 永 (YONG YU)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・
教授
研究者番号：20284903