

令和元年6月12日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01378

研究課題名(和文) 脊髄損傷部に移植された嗅粘膜由来幹細胞の機能獲得の研究

研究課題名(英文) The neurogenerating capacity of olfactory stem cells in spinal cord lesion

研究代表者

佐々木 誠一 (SASAKI, Sei-Ichi)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50153987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔下の動物の脊髄を頸髄のレベルで半切し3か月後の半切側で延髄呼吸中枢から呼吸ニューロンの脊髄下行性軸索が嗅粘膜上皮細胞を移植した脊髄で切断面で再生し、再生した軸索が切断面を超える可能性について調べた。また移植された組織から神経細胞が分化する可能性を調べた。吸息性ニューロンと呼息性ニューロン共に半切部の吻側の脊髄を電気刺激すると細胞体に逆行性活動電位が誘発されたが、半切部よりも下位の脊髄を電気刺激しても逆行性活動電位は誘発されなかった。呼吸運動は脊髄の半切後約3か月で回復するが、半切後3か月経過した時点でも半切側を下行する呼吸中枢からの下行路は切断面を軸索が超えないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験の結果は嗅粘膜上皮細胞を脊髄損傷部へ移植した脊髄では延髄呼吸ニューロンの軸索は切断面を超えないことが示された。また、半切部では呼吸リズムを持つ介在ニューロンの活動も記録できなかった。脊髄損傷からの機能回復は嗅粘膜上皮細胞自体が神経細胞に分化し機能回復の主体となることは考えにくく、脊髄損傷からの機能回復は脊髄内の既存の神経回路の可塑的な変化が必要であることが示唆された。移植医療を進める際に移植された組織自体が分化して神経回路に組み込まれるのではないことは移植による神経回路の修復を目指す脊髄損傷の治療の概念を再考する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We examined olfactory mucosa cells transplantation in spinal cord lesion results in functional recoveries of respiratory movements and axon sprouting after spinal cord injury. Spinal cord had been hemisected at the cervical spinal cord three months in advance. The recovery of discharge activities after 3 months with the phrenic nerve was confirmed in inspiratory phase. Extracellular spikes were recorded from inspiratory neurons in the brainstem. Antidromic activation was not induced by electrical stimulation below the spinal level of lesion. No respiratory interneurons were recorded in the area of spinal cord lesion. Our findings indicate that olfactory mucosa cells do not survive after transplantation and suggest that olfactory mucosa cells have mechanisms that promote a supportive environment for axon regeneration after spinal cord injury.

研究分野：脊髄損傷後の呼吸運動回復に関わる脳幹 - 脊髄の神経機構の修復過程の研究

キーワード：脊髄損傷 嗅粘膜上皮 呼吸運動 脊髄 機能回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の脳と脊髄では障害を受けると神経細胞は再生しないと考えられてきた。近年、幹細胞、ips 細胞などから誘導された細胞を損傷部位に移植し機能回復を図る研究が進められている。自己の嗅粘膜に含まれる再生可能な神経細胞に分化する幹細胞と軸索の伸展・再髄鞘化を促す嗅神経鞘細胞 (Olfactory Ensheathing Cells:OECs) を障害部位に移植する手法は倫理的な問題もなく、ガン化する確率も少ないと思われる。ヒトの嗅粘膜由来幹細胞と嗅神経鞘細胞を脊髄損傷部に自家移植する臨床研究もおこなわれ、治療成果が報告されている。また ips 細胞の医療への応用が活発に研究がおこなわれている。臨床への応用については、嗅粘膜由来の幹細胞と鞘細胞をヒトの脊髄損傷患者に移植する試みがなされているが、術後の長期の訓練が必要であり機能訓練の方法やプログラムの確立も必要である。機能回復の実験系として動物の脊髄損傷部に幹細胞等を移植し機能回復のモデルとして用いられている。しかしながら、主にマウス・ラットを用いて行われているので移植された細胞が複雑な中枢神経回路にどのように組み込まれ機能するかについては生理学的な解析をすることは困難である。中枢神経系の機能回復の実験系に呼吸運動系を用いる。研究手法は個々のニューロン活動を直接解析できるガラス管微小電極を用いた電気生理学手法と組織学的手法を用い、シナプス結合から形態まで解析する。呼吸駆動運動系はすでに多くの脳幹-脊髄の研究成果があり、脊髄損傷モデルと組み合わせれば脊髄損傷部位に幹細胞を移植して呼吸運動がどのように回復するかを細胞レベルまで解析できる。

2. 研究の目的

中枢神経系の損傷部に幹細胞、ips 細胞(induced pluripotent stem cells, 人工多能性幹細胞)などが移植され機能回復を目指す研究が活発に進められている。しかし、移植された細胞が神経細胞へと分化誘導され、神経伝導路あるいは局所的な神経回路に組み込まれてどのように機能を獲得するかは十分な知見は得られていない。本研究ではネコの脊髄半切部に嗅粘膜に含まれる嗅神経に再生可能な幹細胞と嗅神経鞘細胞を移植し、中枢神経内でどのように分化し、生理学的な機能を獲得するか調べることを目的とする。

3. 研究の方法

脊髄半切動物を作成し、3 か月後に延髄からの興奮性下行路の可塑的变化を電気生理学的手法で解析する。嗅粘膜幹細胞を採取し、脊髄半切部に移植する。嗅粘膜幹細胞を移植した部位より細胞外記録を行い、移植された細胞が脊髄でどのように分化し、生理学機能を獲得するかを調べる。実験には動物実験施設で育成した成ネコを用いる。笑気、酸素、セボフルレンの混合気で十分な麻酔深度になってから胸部で心電図を記録する。気管に挿管チューブを挿入し人工呼吸を施せるようにする。手術は無菌的に十分深い麻酔下で行い、実験終了まで深麻酔を維持する。横隔神経核の存在する第5頸髄と第6頸髄の正中部を切断する。

脊髄半切後3か月経過してから、手術用顕微鏡を用いて、動物の鼻腔背側にある鼻粘膜を採取する。笑気、酸素、セボフルレンの混合気で十分な麻酔深度になってから胸部で心電図を記録する。気管に挿管チューブを挿入し人工呼吸を施せるようにする。手術は十分深い麻酔下で行い、実験終了まで深麻酔を維持する。鼻腔表面をポピドンヨード液で消毒し、血管収縮剤を塗布する。鼻粘膜をスパーテルで削ぎ落とし、必要量を確保した後、ゼラチンフォームで止血する。採取した幹細胞と嗅神経鞘細胞は直接脊髄の半切部に移植する。脊髄半切時と同様に頸部背側の皮膚を切開し筋を左右に分け、半切した第3頸髄と第4頸髄移行部の硬膜を切開し脊髄を半切した部分を約2mm切除し、鼻粘膜から採取した幹細胞を移植する。硬膜を縫合し頸部背側部の皮膚を閉じる。半切した第3頸髄と第4頸髄移行部の硬膜を切開し脊髄を半切した部分を約2mm切除し、鼻粘膜から採取した幹細胞を移植する。硬膜を縫合し頸部背側部の皮膚を閉じる。幹細胞の移植後、横隔膜筋電図の記録を行い、半切側の筋電図が出現し、対照側と同程度に回復するかどうかを確認する。ガラス管微小電極により半切した側の対側の延髄呼吸中枢の単一吸息性ニューロンの細胞外記録を行う。脊髄への軸索投射様式を調べるためにボール電極で半切側の脊髄外側部の表面を刺激する。横隔神経隔核での軸索投射を調べるためにタングステン微小刺激電極を用いて第4頸髄から第6頸髄にある両側の横隔神経核を200 μ Aを上限として微小電流刺激する。誘発される逆行性スパイクの潜時、刺激電流の強さを系統的に調べ半

切側および健常側の横隔神経核における軸索側枝の分布を解析する。両側の横隔神経を頸部において剖出し、小型カフ電極を装着し電気刺激と神経発射の記録をできるようにする。第1頸髄から第8頸髄まで椎弓切除を行なう。手術後1週間、1か月、3か月、1年生存の3群の慢性動物について切断側の横隔神経核の周辺より呼吸性のスパイク発射活動を示す分化した幹細胞をガラス管微小電極を用いて記録する。横隔神経発射と比較して吸息性が呼息性を区別する。介在ニューロンであることは同側の横隔神経を刺激して逆行性スパイクが誘発されないことで同定する。

4. 研究成果

1) 麻酔下の動物の脊髄を頸髄のレベルで半切し3か月後の半切側での横隔膜の回復を調べた。脊髄を半切し3か月後に再度、ネンプタル麻酔し、自発呼吸下で食道内圧の陰性圧を吸息相の指標とした。開腹し双極針電極を半切側の横隔膜へ刺入して単一運動単位の発射活動を記録した。半切側の横隔膜は目視でも良く収縮しているのが観察できた。運動単位の発射は吸息相で発射活動が見られ呼息相で発射が停止した。半切側運動単位の発射活動様式は正常側と同様な活動が見られたことより半切側の横隔膜運動機能は正常側とほぼ同程度に回復したことが分かった。食道内圧の陰性圧の開始時点を吸息相の開始時点として運動単位の発射活動の開始時点との時間差を調べると運動単位によって発射活動の開始時点に差が認められた。脊髄を半切し3か月後に横隔膜の運動単位の発射活動は正常とほぼ同様な活動が認められたが個々の運動単位によって活動電位の発射開始に差が認められたことは横隔神経運動ニューロンへの呼吸性入力脊髄半切によって遮断され、3か月後にシナプス入力が回復する時にも正常と同じように小型運動ニューロンから大型運動ニューロンへと参加の序列があることが示唆された。

2) 麻酔下の動物の脊髄を頸髄のレベルで半切し3か月後の半切側で延髄呼吸中枢から呼吸ニューロンの脊髄下行性軸索が切断面で再生し、再生した軸索が切断面を超える可能性について調べた。吸息性ニューロンと呼息性ニューロンは共に細胞体から出た脊髄下行性軸索は細胞体のある側の対側の脊髄を下行する。単一呼吸ニューロンの細胞外活動をガラス管微小電極で記録し、半切側よりも下位の脊髄を電気刺激して呼吸ニューロンに逆行性電位が誘発されるかどうか調べた。吸息性ニューロンと呼息性ニューロン共に半切部の吻側の脊髄を電気刺激すると細胞体に逆行性活動電位が誘発されたが、半切部よりも下位の脊髄を電気刺激しても逆行性活動電位は誘発されなかった。この結果は半切後3か月経過した時点でも半切側を下行する呼吸中枢からの下行路は修復されないことを示す。

3) 脊髄を半切することによって障害側の脊髄を下行する延髄からの伝導路が完全に除外されることが本研究によって確かめられた。しかしながら呼吸運動は約3か月で回復することが分かり、脊髄半切部に移植された嗅粘膜組織が呼吸運動に関与する神経回路に新たにどのような役割を担うかについて実験を行った。麻酔下の動物の脊髄を頸髄のレベルで半切し同一個体の嗅粘膜上皮細胞を採取して脊髄半切部に移植した。3か月後の半切側で延髄呼吸中枢から呼吸ニューロンの脊髄下行性軸索が切断面で再生し、再生した軸索が切断面を超える可能性について調べた。脊髄の半切後、3か月経過した動物を用いてペントバルビタル麻酔下で吸息性ニューロンと呼息性ニューロンからの単一呼吸ニューロンの細胞外活動をガラス管微小電極で記録し、半切側よりも下位の脊髄を電気刺激して呼吸ニューロンに逆行性電位が誘発されるかどうか調べた。嗅粘膜を移植した脊髄レベルよりも吻側で脊髄を刺激すると細胞体に逆行性に活動電位が誘発されたが、移植した部位よりも尾側を刺激しても逆行性活動電位は誘発されなかった。このことは延髄にある吸息性ニューロンと呼息性ニューロン共に半切部で嗅粘膜上皮細胞を移植した部位を軸索は超えないことを示している。半切後嗅粘膜上皮細胞を移植して3か月経過した時点でも半切側を下行する呼吸中枢からの下行路は修復されないことを示し、脳幹からの呼吸性の下行路は切断面を超えないことが分かった。半切後3か月経過すると半切側の横隔神経発射は回復することが分かっているため移植された嗅粘膜上皮細胞が分化し、新たに介在ニューロンの機能を獲得し延髄からの下行路の中継核として機能することも示唆された。

4) 脊髄半切部に移植された嗅粘膜上皮組織が呼吸運動に関与する神経回路に新たにどのような役割を担うかについて実験を行った。半切後嗅粘膜上皮細胞を移植して3か月経過した時点でも半切側を下行する呼吸中枢からの下行路は修復されないことを示し、脳幹からの呼吸性の下

回路は切断面を超えないことが分かった。半切部位の組織学的な解析を行うと切断部位には結合組織が認められるがニューロンは認められなかった。半切後3か月経過すると半切側の横隔神経発射は回復するので呼吸中枢の健常側を下行する主軸索からの軸索側枝が正中を超えて半切側の横隔神経運動ニューロンにシナプス結合することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

奥野裕佳子、富田和秀、庄司亮介、佐々木誠一、脊髄損傷後の横隔膜運動単位の発射活動、運動障害、査読有、26巻、2016年、111 - 114.

M.Niwa, K.Mueamatsu, K.Nakayama, S.-I.Sasaki, Electrophysiological properties of Ia excitation and recurrent inhibition in cat abdominal motoneurons, 査読有, 69巻, 2019年, 253-262.

〔学会発表〕(計4件)

奥野裕佳子、富田和秀、古家宏樹、佐々木誠一、脊髄半切後の横隔膜運動単位の活動、第50回日本運動障害研究会、2015年

S.Sasaki, M.Niwa, Firing properties of medullary expiratory neurons during induced defecation in cats, Neuroscience2015, 2015

Y.Okuno, R.Shoji, S.-I.Sasaki, K.Sasaki, K.Kawamura, K.Tomita, Recovery of diaphragm motor units activities after cervical hemisection of the spinal cord, Neuroscience2017, 2017.

R.Takei, K.Kawamura, Y.Sedaka, K.Sasaki, S.-I.Sasaki, K.Tomita, Discharge activities of diaphragm motor units during inspiratory load, 9thFAOPS congress2019, 2019.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：富田 和秀

ローマ字氏名：(TOMITA, kazuhide)

所属研究機関名：茨城県立医療大学

部局名：保健医療学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00389793

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。