

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10352

研究課題名(和文) 局所薬剤送達方法-CED法を駆使した脊髄損傷に対する新規治療方法の開発

研究課題名(英文) New concept of local chemo- and cell-therapy for spinal cord injury using convection-enhanced drug delivery

研究代表者

杉山 慎一郎 (Sugiyama, Shinichiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30623152

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)：脊髄損傷は、現代の医療においても治療が難しい。その理由の一つとして、脊髄には血液-脳脊髄関門があり、十分な量の薬を投与することが難しいことが挙げられる。この研究では、convection-enhanced delivery (CED) 法という新しい薬剤投与方法を脊髄に応用することで、脊髄損傷部位に十分な薬を投与することに成功し、従来の薬物治療に勝る治療効果が得られることを証明した。さらに、脊髄損傷に対するMuse細胞(multilineage-differentiating stress enduring cell)を用いた幹細胞治療についても、その効果を検証した。

研究成果の概要(英文)：Spinal cord injury has dismal prognosis even in this modern era. Convection-enhanced delivery (CED) is a method for distributing small and large molecules locally in the interstitial space of the spinal cord. Delivering these molecules to the spinal cord is otherwise difficult due to the blood spinal cord barrier. This study revealed that regional infusion of drugs into the spinal cord via CED is a promising strategy for treating spinal cord injury. In addition, we investigated the safety and efficacy of stem cell transplantation (multilineage-differentiating stress enduring cell (Muse cell) transplantation) in spinal cord injury.

研究分野：神経外科学

キーワード：drug delivery cell therapy

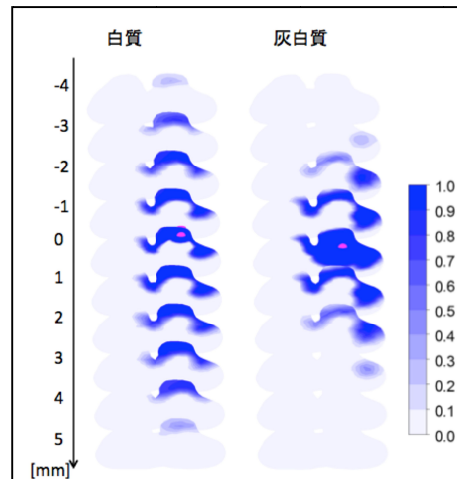
### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊髄損傷は、外的損傷に伴う神経線維断裂により、受傷部位以下の運動・感覚神経機能がすべて障害される重篤な疾病である。重度の運動・感覚麻痺を後遺した脊髄損傷患者の生活の質および社会的生産性は、著しく低下してしまう。しかし、現時点においては、急性期の安静およびステロイド投与、慢性期のリハビリテーションといった保存的加療が中心であり、ときに外科的減圧術が行われるものの、その効果は限定的である。脊髄損傷においては、灰白質と白質がともに障害されるが、ここで主な治療ターゲットとなるのは、白質における軸索再生である。損傷部位によって断絶している軸索を標的細胞へと伸展・誘導し、シナプス形成およびミエリン化を促進しなければならないが、しかし、脊髄損傷における障害部位は、軸索再生に不利な環境にあることが明らかにされている。すなわち、炎症反応の存在、グリア瘢痕の形成、および軸索損傷後のミエリン由来軸索再生阻害因子の存在であるが、このような環境は、生体が損傷部位に対して生来の修復機転を働かせている結果でもある。よって、脊髄損傷における軸索再生を達成するためには、グリア瘢痕につながる生来の修復機転をブロックし、軸索再生につながる治療機転を働かせる、という2つの治療戦略を同時に行う必要がある。

(2) Convection-enhanced delivery (CED)法は、持続陽圧下に、薬剤を神経組織間隙に注入し、広範囲の薬剤分布を達成することのできるドラッグ・デリバリー法である。本研究グループは、CED法を用いた悪性脳腫瘍に対する治療方法開発のための基礎研究を2005年より開始し、ラットを用いた動物実験において、その有用性を証明した(Sugiyama S (研究代表者) et al, J Neurooncol, 82: 41-47, 2007) (Sugiyama S et al, Neurol Res, 30: 960-967, 2008)。その後、東北大学病院倫理委員会の承認を経て、2008年より脳および脳幹における再発神経膠腫に対して臨床応用を開始し、従来、治療法が皆無であった脳幹部神経膠腫に対する劇的な治療効果を報告している (Saito R (連携研究者) et al, J Neurosurg Pediatr, 7: 522-526, 2011)。さらに、本研究グループは、脳白質および脳幹組織のみに用いられていたCED法の脊髄への応用について、基礎研究を行った(平成24年度基盤研究(C)「脊髄への定位的局所薬剤送達方法の開発」課題番号24592151)。その結果、脊髄灰白質および白質における薬剤分布の特徴を明らかにし、さらに、コンピュータ・シミュレーションを用いて、その薬剤分布を予測する方法を確立した(図1)。CED法による薬剤送達は、血液-脳脊髄関門を介さないため、脊髄損傷治療に有効と考えられる薬剤を十分な濃度で送達できる。局所において毒性を現さない範囲であれば、極めて高濃度の薬剤投与

も可能である。

図1 CED法を用いた薬剤分布のコンピュータ・シミュレーション  
赤点は、薬剤注入部位を示している。脊髄白質の薬剤分布は灰白質のそれと比較して長軸方向に広い。



(3) また、本研究グループは、幹細胞移植による軸索再生の可能性についても積極的に研究を進めてきた。骨髄由来神経前駆細胞について、脊髄損傷モデルにおける治療効果を検証したほか、多能性幹細胞である Muse 細胞 (multilineage-differentiating stress enduring cell) による白質再建について、脳梗塞モデルでの研究を進めている。とくに、Muse 細胞は、iPS 細胞と比較して腫瘍化の危険性が低い一方、高い神経再生能力を有することが期待されている。我々は、ラット脳梗塞モデル (中大脳動脈閉塞モデル) に移植した Muse 細胞が、間葉系幹細胞よりも高い生着率を示し、かつ、高率に神経細胞へと分化することを見出していた。幹細胞移植を行う時期として、損傷部位がグリア瘢痕で置換される前の脊髄損傷急性期、亜急性期が考えられるが、前述のごとく、この時期には活発な炎症反応やミエリン由来軸索再生阻害因子の存在など、幹細胞の生着・軸索再生に極めて不利な細胞外環境が存在している。CED法により、標的部位の細胞外環境を最適化し、幹細胞移植治療の効果を増強できると予想された。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、脊髄損傷に対する軸索再生治療法の開発である。

(2) 動物モデルを用い、脊髄損傷に対するCED法を用いた薬剤局所投与の脊髄保護効果、および Muse 細胞移植による神経再生について概念実証研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷ラットに対するCED法による薬剤投与と薬剤分布範囲測定

CED法を用い、脊髄損傷ラットに色素を注入する。色素の分布範囲は、脊髄の連続凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下に観察する。

#### (2) コンピュータ・シミュレーションによる薬剤分布予測

ラット脊髄の3次元データから、計算に用いるための脊髄モデルをコンピュータ上で再構築する。画像を解析・加工し、実際の実験に使用すると同サイズの仮想カニュラを脊髄モデル内に構築した後、周囲に計算格子を設定する。脊髄実質を多孔質媒体と仮定し、連続の式とDarcyの法則を連立させた流体計算を、商用ソルバを用いて行う。

#### (3) CED法による薬剤局所投与

ラット脊髄損傷モデルに対する治療効果を、神経保護薬(ステロイド)を用いて検討する。CED治療群、腹腔内投与群、対照群の3群(各群n=30)で治療効果判定を行う。行動学的検査(下肢運動機能評価、Von Frey Hairを使用した体幹下肢の感覚機能、神経疼痛閾値を計測)を行い、それぞれの群での神経疼痛の程度、運動感覚機能回復について評価を行う。組織学的検討では、対照群と治療群(腹腔内投与、CED群)について脊髄損傷後の組織損傷、空洞ならびに瘢痕形成の評価、神経軸索温存あるいは再生程度の評価から、CED法による治療効果を検討する。

#### (4) Muse細胞治療

ラット脊髄損傷モデルに対する治療効果を対照群と比較検討する。インパクトを用いた脊髄損傷モデルラットに、受傷後14日に細胞治療を行う。上述の行動学的検査を行い、それぞれの群での運動感覚機能回復について評価する。蛍光免疫組織学的手法を用いて、投与したMuse細胞の損傷部位における存在を確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) 脊髄損傷ラットに対するCED法による薬剤投与と薬剤分布範囲測定

まず、実験系で用いるラット脊髄損傷モデルについて、インパクトを用いた既存のモデルに加えて、独自の疾患モデルを確立した。すなわち、バルーンカテーテルを用い、圧挫損傷の程度を変更することで、重症度の異なるモデルを作成することに成功した。

次に、これらの疾患モデルに対してCED法による蛍光色素投与を行った。その後の組織学的検討の結果、損傷した組織における薬剤分布には、正常脊髄組織とは異なる二つの重要な特徴が分かった。まず、第一に、損傷組織における薬剤分布容積は、正常脊髄組織におけるよりも大きかった。第二に、損傷部位における薬剤分布容積は受傷時から薬剤投与までの経過時間とともに減少した。すなわち、時間経過とともに損傷部位における薬剤分布体積が減少し、正常脊髄組織への薬剤

漏出が顕著になった。

#### (2) コンピュータ・シミュレーションによる薬剤分布予測

前項(1)における実験結果を反映すべく、我々が研究を進めてきた脊髄における薬剤分布シミュレーション手法において、脊髄組織を多孔質媒体と仮定した透水係数を調整した。その結果、CEDによる薬剤投与と開始初期の分布容積を予測できた。ただし、薬剤分布容積が広がるにつれて、実験結果とシミュレーションとが明らかに解離した。これを改善するためには、正常脊髄組織との境界を含め損傷部位の広がりや不均一性を伴う透水係数分布の妥当な設定手法の大きく二つについて研究を進める必要があることが分かった。

#### (3) CED法による薬剤局所投与

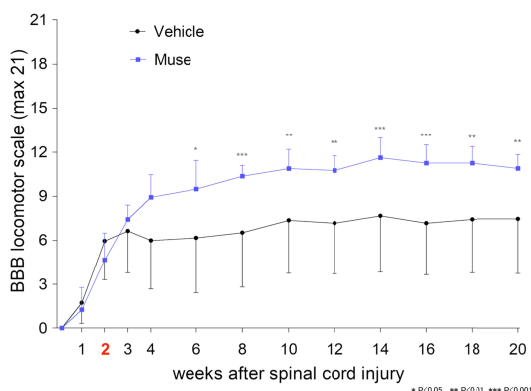
CEDを用いたステロイド局所投与の治療効果について、CED治療群と対照群および腹腔内注射による全身投与群との比較を行った。その結果、CED治療群は対照群よりも運動機能回復が速やかかつ良好であることが分かった。一方、CED群と腹腔内投与群との有意差は認めなかった。

#### (4) Muse細胞治療

ラット脊髄損傷モデルにおいて、Muse細胞移植治療群は対照群と比較して有意に運動感覚機能回復が良好であった。図2に、BBB locomotor scaleを用いた後肢運動機能回復に関する検討結果を示す。受傷後6週目(細胞治療後4週目)より、両群に有意差を認めた。

さらに、蛍光免疫組織学的検討において、損傷部位におけるMuse細胞の存在が確認された。

図2 Muse細胞治療による運動機能回復



#### (5) 今後の展望

本研究の結果から、脊髄損傷に対するCEDを用いた脊髄への局所薬剤投与およびMuse細胞を用いた細胞治療の有用性が証明された。また、本研究期間中に、Muse細胞の薬剤としての調整方法が確立された。脊髄損傷に対するMuse細胞を用いた細胞治療につい

ては、臨床治験において、その安全性と有用性を確認する予定である。

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. Toshiki Endo, Yasushi Fujii, Shin-ichiro Sugiyama, Rong Zhang, Shogo Ogita, Kenichi Funamoto, Ryuta Saito, Teiji Tominaga. Property of convective delivery in the spinal cord gray matter: Laboratory investigation and computational simulations: *Journal of Neurosurgery, spine* **30**:1-8, 2015. DOI: 10.3171/2015.5.SPINE141148 査読有
2. Shogo Ogita, Toshiki Endo, Shin-ichiro Sugiyama, Ryuta Saito, Tomoo Inoue, Akira Sumiyoshi, Hiroi Nonaka, Ryuta Kawashima, Yukihiko Sonoda, Teiji Tominaga. Convection-enhanced delivery of a hydrophilic nitrosourea ameliorates deficits and suppresses tumor growth in experimental spinal cord glioma models. *Acta Neurochir (Wien)* **159**: 939-946, 2017. DOI: 10.1007/s00701-017-3123-2 査読有

[学会発表]

なし

[その他]

ホームページ

<http://www.nsg.med.tohoku.ac.jp/research/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 慎一郎 (SUGIYAMA, Shin-ichiro)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：30623152

(2) 研究分担者

遠藤 俊毅 (ENDO, Toshiki)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：00535370

新妻邦泰 (NIZUMA, Kuniyasu)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：10643330

船本 健一 (FUNAMOTO, Kenichi)  
東北大学・学際科学フロンティア研究所・准教授  
研究者番号：70451630

坂田洋之 (SAKATA, Hiroyuki)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：80722305