

令和元年6月26日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10417

研究課題名(和文)重症脊髄損傷に対する自家組織細胞シートを用いた新規再生医療技術の開発

研究課題名(英文) Development of new regenerative technology of spinal cord using autologous cell sheet for severe spinal cord injury.

研究代表者

田中 康仁 (Tanaka, Yasuhito)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30316070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系細胞(BMSC)・神経幹細胞/前駆細胞(NS/PC)の共培養シートを用いて完全離断型脊髄損傷の神経再生を目指した。Fisher 344(F344)ラット骨髄を採取、培養によりBMSCシートを獲得した。E18妊娠F344ラット胎仔脳のコルテックスからNS/PCを獲得し、BMSCシート上に播種して共培養シートを作成した。F344ラットの脊髄を離断し2mmの欠損を作成後、共培養シートを移植し、組織学的評価(Tuj1、GFAP、MBP)、後肢運動機能評価を行った。結果、BMSCシートよりも、共培養シートの方が神経細胞の神経突起の伸長、軸索再生と再生軸索の再髄鞘化を促進していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻痺を抱えて生活する重症脊髄損傷患者に対して現在治療法がない。本研究で行う新規再生医療技術の開発は麻痺改善や社会復帰を可能とし、中枢神経再生領域の治療法を飛躍的に進歩させる研究である。『他細胞搭載可能な新しいscaffoldとしての細胞シート』の側面もあり、他の再生医療領域への応用も期待され、医学に与えるインパクトは極めて大きいものと確信する。

研究成果の概要(英文)：Our study aimed to achieve neural regeneration of completely transected spinal cord injury by using co-culture sheets of bone marrow stromal cells (BMSC) and neural stem cells / progenitor cells (NS / PC). We used rat experimental model. Donor BMSC sheets were obtained from Fisher 344 (F344) rat bone marrow by cell culture in ascorbic acid-added standard medium. NS / PC were obtained from the cortex of fetal brain of E18 pregnant F344 rat. NS / PC was seeded on a BMSC sheet to make a co-culture sheet.

We transected spinal cord of F344 rat at T8 vertebra, and then 2mm defect was made. The co-culture sheet was transplanted to the defect site. Histological evaluation (Tuj1, GFAP, MBP, etc.) and hindlimb motor function evaluation (BBB score) were performed. As a result, it was found that the co-culture sheet promotes neurite outgrowth of neurons and promotes axonal regeneration and remyelination of regenerating axons more than BMSC sheets.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊髄再生 再生医療 間葉系細胞 神経幹細胞 細胞シート 脊髄損傷

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄間葉系幹細胞を用いた中等度以下の脊髄損傷の治療法は、臨床治験段階まで進展している。一方で、重症脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞移植は、基礎実験で歩行能の獲得に至らず、臨床で治療法がない。重症脊髄損傷の一形態である脊髄離断では脊髄の欠損部が生じてしまい、それを補填する scaffold(足場)が必要となる。どの人工材料をどんな形でどの細胞を搭載して移植するか、その有用性、などが報告されている

(2) 当教室では、骨髄から骨髄間葉系間質細胞(bone marrow stromal cell; BMSC)を採取培養し、骨芽細胞へ分化誘導をかけてシート状に採取する『骨形成細胞シート』の移植法を報告してきた。BMSC のシート化にも成功しており、神経栄養因子(BDNF)や血管新生促進因子(VEGF)を多量に発現していること、更に軸索伸長を促進するラミニンを細胞外基質として産生していることがわかっている。

(3) BMSC は、移植後 2 週まで移植部位に留まり残存脊髄の空洞化(脊髄損傷の 2 次損傷)を防止する働き(抗炎症性)を示し、その後は神経系細胞に分化しないと報告されている。BMSC が神経系細胞に分化しないため、より大きな神経再生を実現するには、神経細胞に分化する神経幹細胞の移植も必要である。そこで我々は、硬膜残存脊髄欠損モデルに神経幹細胞を搭載する BMSC シートを移植することで、より大きな神経再生・運動機能改善が得られる、との仮説を立てた。

2. 研究の目的

(1) BMSC が神経系細胞に分化しないため、より大きな神経再生を実現するには、神経細胞に分化する神経幹細胞の移植も必要である。本研究においては、BMSC シートに神経幹細胞を搭載し、脊髄離断モデルへと移植することで、神経再生の促進を図る技術の新規開発を目的とした。

(2) 脊髄離断モデルへの BMSC シート移植により、軸索再生、後肢運動機能改善を認めたが、移植後の抗炎症作用の機序は明らかになっていない。そこで、本研究では移植後早期の細胞の動態解析を行うことで、シート移植の効果を探求することを目的とした。

(3) BMSC シート移植において、脊髄の損傷形態や、シートに搭載する BMSC に含まれている軸索伸長阻害因子の有無などにより神経再生の度合いが変化すると考えられる。そこで、本研究においては、損傷形態別重症脊髄損傷へのシート移植や、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)などの軸索再生阻害因子の分解処理などにより、新規の損傷形態モデル、BMSC シートモデルの作成技術を確立し、シート移植の効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄離断モデルラットに対する BMSC シート移植による神経再生効果の検証

BMSC シートに用いる骨髄由来の間葉系細胞には Fisher 344 ラットを用いた。7 週齢の Fisher 344 ラットの両側大腿骨から骨髄を採取し、2 週間の初期培養の後に継代する。アスコルビン酸添加標準培地で二次培養を行い、2 週後にスクレパーを用いて BMSC シートを採取した。脊髄離断モデルラットには Fisher 344 ラットを用いた。Fisher 344 ラットの T8 高位の脊髄を完全に離断し 2mm の欠損部を作製した。BMSC シート移植群(シート群)、ゼラチンスポンジ移植群(GS 群)の 2 群を作成し、両群間で、術後 2 週・8 週での組織学的評価(Tuj1、GFAP、MBP など)、後肢運動機能評価(BBB score)を行った。

(2) 脊髄離断モデルラットに対する神経幹細胞と BMSC の共培養シートによる神経再生促進効果の検証

神経幹細胞/前駆細胞(NS/PC)には Fisher 344 ラットを用いた。E18 妊娠 Fisher 344 ラットの胎仔脳の cortex を採取し、1 週間の初期培養の後に trypsinize を行い、primary neurospheres を獲得した。また、BMSC シートに含まれる CSPG を分解処理するため、BMSC シートを ChABC(x100, 2h)処理し、ChABC-BMSC シートを作成した。ChABC-BMSC シート上に primary neurospheres を播種し、3 日間の培養後に BMSC と NS/PC の共培養シートを作成した。Fisher 344 ラットの T8 高位の脊髄を完全に離断し 2mm の欠損部を作製した。作成した共培養シートを欠損部に移植し、術後 2 週、術後 8 週での組織学的評価(Tuj1、GFAP、MBP など)、後肢運動機能評価(BBB score)を行った。

(3) 脊髄離断モデルラットへの BMSC シート移植後早期における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価

BMSC シートに用いる骨髄由来の間葉系細胞には Fisher 344 ラットを用いた。7 週齢 Fisher 344 ラット両側大腿骨から骨髄を採取し BMSC シートを作成した。脊髄離断モデルラットには Fisher 344 ラットを用いた。Fisher 344 ラットの T10 高位の脊髄を完全に離断し 1.5mm の欠損部を作成した。BMSC シート移植群(シート群)、離断のみの群(離断群)の 2 群間で、術後 1

週での組織学的評価(Tuj1, GFAP など)を行った。

4. 研究成果

(1) 脊髄離断モデルラットに対する BMSC シート移植による神経再生効果の検証

移植後 8 週におけるシート群の BBB score は、GS 群と比較して有意に高かった (シート群 : GS 群 = 5.25 : 3) (図 1)。

移植後 2 週目のシート部においても Tuj-1 および GFAP 陽性軸索が多数見られた。移植後 2 週では再生軸索数に有意差は認めなかったが、8 週ではシート群で有意に多かった (図 2)。脊髄断端部における GFAP 強陽性の reactive astrocyte が 2 週・8 週ともにシート群で有意に少なく、その形がシート群で凹凸に変化していることが分かった (図 3)。しかし、BMSC シート移植後 8 週においても明らかな再髄鞘化は見られなかった。

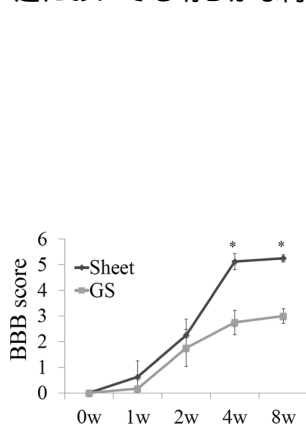


図 1 : 後肢運動機能

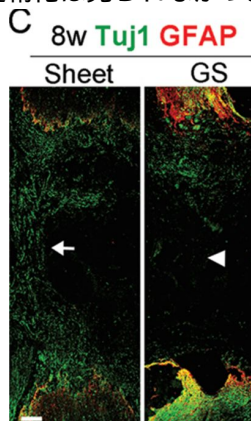


図 2 : Tuj1 陽性軸索

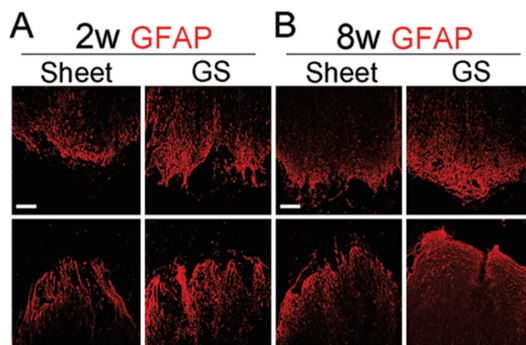


図 3 : reactive astrocyte

(2) 脊髄離断モデルラットに対する神経幹細胞と BMSC の共培養シートによる軸索再生効果の検証

In Vitro で、BMSC シートよりも、共培養シートの方が有意に神経細胞の神経突起の伸長を促進することが分かった (図 4)。BMSC シート移植よりも、軸索再生と再生軸索の再髄鞘化を促進し (図 5、図 6)、同等のグリア瘢痕形成抑制機能を有していたが、後肢運動機能改善は同等であった。

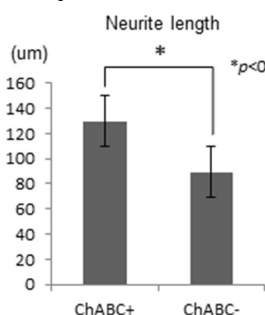


図 4 : 神経突起の伸長

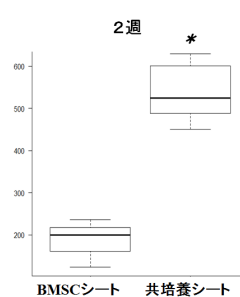


図 5 : 軸索再生 (Tuj1)

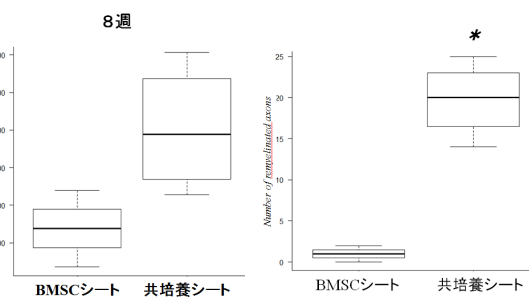


図 6 : 再髄鞘化 (MBP)

(3) 脊髄離断モデルラットへの BMSC シート移植後早期における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価

CD11b 陽性マクロファージは脊髄断端部に集簇しており、GFAP 陽性反応性アストロサイトがマクロファージの周囲を取り囲むように集簇していた。CD206 陽性 M2 マクロファージは損傷後 7 日と損傷後 10 日においてシート群で有意に断端部に集簇していたが、損傷後 14 日では両群間に有意差を認めなかった (図 7)。Iba1 陽性マクロファージはどの時点においても脊髄断端部への集簇に差が見られなかった (図 8)。

BMSC シートの効果として、急性期に M2 系マクロファージを脊損部の周囲に集積させることで抗炎症反応を示していることが示唆された。

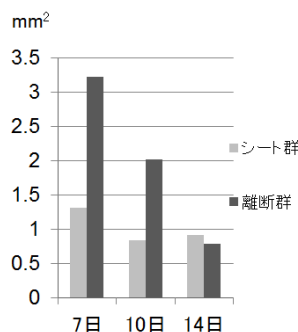


図 7 : CD206 陽性 M2 マクロファージ

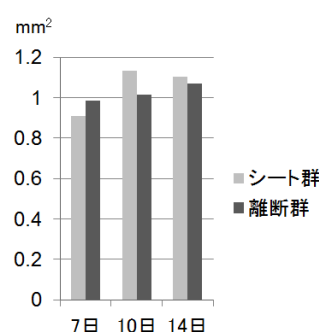


図 8 : Iba1 陽性マクロファージ

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Okuda Akinori, Horii-Hayashi Noriko, Sasagawa Takayo, Shimizu Takamasa, Shigematsu Hideki, Iwata Eiichiro, Morimoto Yasuhiko, Masuda Keisuke, Koizumi Munehisa, Akahane Manabu, Nishi Mayumi, Tanaka Yasuhito, Bone marrow stromal cell sheets may promote axonal regeneration and functional recovery with suppression of glial scar formation after spinal cord transection injury in rats, Journal of Neurosurgery Spine, 査読有, 26(3), 2017, 388-395

奥田哲教、堀井謹子、清水隆昌、重松英樹、岩田栄一朗、森本安彦、増田佳亮、赤羽学、西真弓、田中康仁、骨髄間葉系細胞・神経幹細胞共培養系による細胞シートの開発、Journal of Spine Research、査読有、8巻、2017、117-122

[学会発表](計17件)

奥田哲教、完全離断脊髄損傷ラットに対する骨髄間葉系細胞シート移植は軸索再生や後肢運動機能改善を起こすが再髄鞘化は起こさない、第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年

奥田哲教、脊髄離断モデルラットへの骨髄間葉系細胞シート移植による軸索再生・運動機能改善、第44回日本脊椎脊髄病学会、2015年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹細胞の共培養細胞シートの開発と脊髄損傷ラットへの移植効果、第45回日本脊椎脊髄病学会、2016年

奥田哲教、完全離断脊髄損傷ラットに対する骨髄間葉系細胞シート移植は軸索再生や後肢運動機能改善を起こすが再髄鞘化は起こさない、第89回日本整形外科学会学術集会、2016年

Akinori Okuda、Axonal Regeneration And Hindlimb-functional Recovery By Transplantation Of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Sheet After Completely Transected Spinal Cord Injury In Rats, Orthopedic Research Society 2016 annual meeting (国際学会)、2016年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養細胞シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化、第36回整形外科バイオマテリアル研究会、2016年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹細胞の共培養細胞シートの開発と脊髄損傷ラットへの移植効果、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、2016年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養細胞シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化、第90回日本整形外科学会学術集会、2017年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養細胞シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化、第46回日本脊椎脊髄病学会、2017年

Akinori Okuda、Remote Axonal Regeneration and Remyelination After Completely Transected Spinal Cord Injury In Rats, Orthopedic Research Society 2017 annual meeting (国際学会)、2017年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養細胞シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化、第32回日本整形外科学会基礎学術集会、2017年

Keisuke Masuda, Akinori Okuda, Yasuhito Tanaka, Relationship of Macrophages and Reactive Astrocytes and the Anti-inflammation Effect of Bone Marrow Stromal Cell Sheet at Acute Phase of Transected Spinal Cord Injury in Rats, the annual meeting of Orthopaedic Research Society 2018 (国際学会)、2018年

奥田哲教、骨髄間葉系細胞シートを用いた脊髄損傷治療、第33回日本整形外科学会基礎学術集会、2018年

増田佳亮、奥田哲教、田中康仁、脊髄離断モデルラットへの骨髄間葉系細胞シート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価、第33回日本整形外科学会基礎学術集会、2018年

増田佳亮、奥田哲教、田中康仁、脊髄離断モデルラットへの骨髄間葉系細胞シート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価、第91回日本整形外科学会学術総会、2018年

増田佳亮、奥田哲教、田中康仁、脊髄離断モデルラットへの骨髄間葉系細胞シート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価、第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会、2018年
Keisuke Masuda, Akinori Okuda, Yasuhito Tanaka, Relationship of Macrophages and Reactive Astrocytes and the Anti-inflammation Effect of Bone Marrow Stromal Cell Sheet at Acute Phase of Transected Spinal Cord Injury in Rats, the annual meeting of Orthopaedic Research Society 2019 (国際学会)、2019年

[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：西 真弓
ローマ字氏名：Nishi Mayumi
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40295639

研究分担者氏名：赤羽 学
ローマ字氏名：Akahane Manabu
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00418873

研究分担者氏名：清水 隆昌
ローマ字氏名：Shimizu Takamasa
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：70464667

研究分担者氏名：堀井 謹子
ローマ字氏名：Horii Noriko
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：80433332

研究分担者氏名：奥田 哲教
ローマ字氏名：Okuda Akinori
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部

職名：助教
研究者番号（8桁）：80646167

研究分担者氏名：増田 佳亮
ローマ字氏名：Masuda Keisuke
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部附属病院
職名：医員
研究者番号（8桁）：60790376

(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。