

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10822

研究課題名(和文) 先端接着技術と神経幹細胞を併用した脊髄損傷の新たな治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) Development of novel spinal cord injury treatment using advanced bonding technology and neural stem cells

研究代表者

杉本 佳久 (Sugimoto, Yoshihisa)

岡山大学・医学部・助教

研究者番号：80423309

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)：組織への先端接着技術を応用した改変成長因子CBD-HGF及び可視光硬化型ゼラチンを用いた脊髄損傷治療につき、マウス脊髄損傷モデルを用いて検討を行った。運動機能及び脊髄の組織学的に脊髄再生を認め、脊髄損傷治療に臨床応用できる可能性が示された。神経幹細胞については、マウス胎児を用いた幹細胞培養技術は確立できたが脊髄損傷モデルへの移植までは到達できなかったため、これらの方法を組み合わせ研究を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後の特殊な環境において細胞および生体材料を組み合わせた治療は未だ確立されていない。本研究では、ペプチド進化分子工学などの先端材料・技術と神経幹細胞を併用することにより、損傷脊髄の再生につながる新たな治療法開発に挑戦する。ペプチド進化分子工学の手法を用いて肝細胞増殖因子(HGF)にコラーゲン結合因子を組み込んだ改変成長因子(CBD-HGF)を作成し、神経幹細胞の移植と組み合わせた。その結果、脊髄圧迫損傷マウスモデルを用いた検討では、電気生理学的検査において有意な改善が見られた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the usefulness of novel spinal cord injury (SCI) treatment using engineered hepatocyte growth factor with a collagen binding domain (CBD-HGF) and visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin in spinal cord injury model of mice. In motor recovery and immunohistochemical analyses, therapeutic effects were identified. CBD-HGF combined with the hydrogel scaffold may be promising for the treatment of serious SCI. About neural stem cells (NCS), we established stem cell culture technology using mouse embryos, however we could not reach transplantation into spinal cord injury model. We plan to continue the study by combining these methods.

研究分野：脊椎外科

キーワード：脊髄損傷 可視光硬化型ゼラチン 成長因子 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄は再生能力に乏しいため、外傷や疾患により損傷すると重篤な後遺症を残し、患者に多大な肉体的・精神的苦痛を与える。脊髄再生の研究においては薬剤、細胞、生体材料は三本柱であり、各々開発が進められてきた。薬剤・神経栄養因子の投与や細胞移植療法は既に一部で臨床応用されているものもある。

肝細胞増殖因子(HGF)は神経栄養因子の一つであり、脊髄損傷治療において有望な成長因子である。我々は、HGFの抗炎症作用に着目し、脊髄損傷急性期におけるHGFの有用性について明らかにしてきた(図1)。

また、HGFは神経幹細胞に対して神経細胞やオリゴデンドロサイトへの分化を促進する報告もある。このようにHGFは薬剤として移植細胞にも影響を及ぼす可能性を秘めている。今回、進化分子工学の手法を用いてHGFにコラーゲン結合因子を組み込んだ改変成長因子(CBD-HGF)を作製した。CBD-HGFは組織表面に固定され、その場に留まり長期間に渡って情報伝達系を活性化するため、質的に異なる刺激をもたらすことが期待される。これらの成果を組み合わせ応用すれば現状よりさらに進んだ脊髄再生治療も期待できる。

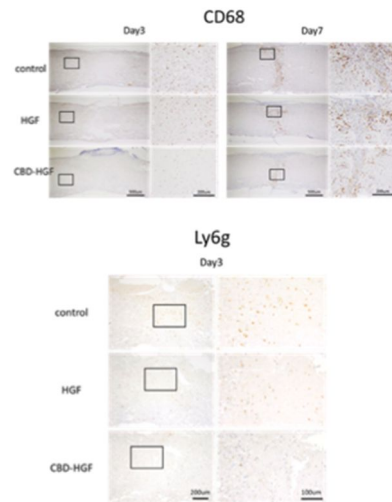


図1：HGFによって脊髄損傷後に損傷部への炎症細胞(マクロファージ、好中球)の集積が抑制された。

2. 研究の目的

損傷した中枢神経は再生しないと長く信じられてきたが、昨今の神経科学の進歩により脊髄再生は全くの夢物語ではなくなりつつある。神経幹細胞や人工多能性幹細胞(iPS細胞)、さらには薬剤を併用した治療は脊髄再生にとって必要不可欠な条件である。しかし、脊髄損傷後の特殊な環境において薬剤、細胞、生体材料を組み合わせた治療は未だ確立されていない。

脊髄再生研究では薬剤の投与方法や細胞の移植方法が重要である。これまで報告されている多くの実験で用いられている注射器を使った直接局所投与方法では、脊髄周囲には絶えず髄液の環流があるため、損傷部周囲に薬剤を留めることは困難とされてきた。また全身的経静脈投与やクモ膜下腔投与などは、局所投与と比較すると損傷局所への誘導効率の低さが問題となる。よって損傷局所に薬剤や細胞を安全かつ有効に留める手法が必要となってくる。本研究における、進化分子工学技術を活用した脊髄再生研究は、従来法の問題点を踏まえた新たな発想に基づくものである。進化分子工学の手法を応用して結合性を改変した成長因子を創製することにより、神経の再生に関わる成長因子や、薬剤を損傷局所に固定する。固定された成長因子は、その場に留まり長期間に渡って情報伝達系を活性化するため、質的に異なる刺激をもたらす。さらに神経幹細胞移植を併用することにより、その成長因子の刺激は神経幹細胞にも影響を及ぼすことが可能であり、相乗的な治療効果が期待される。

本研究では、ペプチド進化分子工学を用いてコラーゲン結合因子を組み込んだ改変成長因子CBD-HGFと、薬剤や細胞を含有でき可視光を用いてin situで硬化させることができる可視光硬化型ゼラチン(gelatin-FA)など理化学研究所の先端材料・技術と神経幹細胞を併用することにより、損傷脊髄の再生につながる新たな治療法開発につき検討した。

3. 研究の方法

(1)リボソーム・ディスプレイ法を用いたペプチド進化分子工学による結合性改変成長因子(コラーゲン結合性成長因子:CBD)を創製した。マウス脊髄内に、蛍光ラベリングを行ったCBD-HGF及びHGFをそれぞれ局所注射し、1日後・3日後・7日後に同部の切片を作成、蛍光

顕微鏡で CBD-HGF 及び HGF の脊髄組織での動態を観察した。

(2) 神経幹細胞の培養

マウス胎児大脳皮質より神経幹細胞を採取し、培養した。分化した細胞が神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することを蛍光免疫染色で評価した。

(3) マウス脊髄損傷モデルを用いた検討

マウス脊髄圧迫損傷モデル及び脊髄切断モデルを用いて CBD-HGF の局所療法の有効性を検討した。血管クリップを使用して第9胸髄レベルの圧迫損傷モデルを作製し、損傷後に HGF 投与した群と、CBD-HGF 投与した群を作成した。脊髄切断モデルにおいては脊髄切断後に HGF 単独投与した群、CBD-HGF 単独投与群、及びフルルイルアミンを含有したゼラチン(gelatin-FA)と CBD-HGF を併用した群を作成した。損傷及び切断後1週で、非投与群を対照群とし、HGF 投与群、CBD-HGF 投与群を作成し比較を行った。損傷後6週まで経時的な後肢運動機能評価を行い、脊髄採取後に組織学的評価を行なった。

4. 研究成果

(1) CBD-HGF は注射後7日経過しても脊髄内に留まっていた(赤色部分)が、HGF は早期に消失していた(図2)。

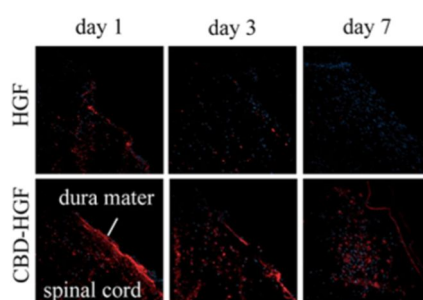


図2：蛍光顕微鏡を用いた CBD-HGF 及び HGF の脊髄組織での動態観察。CBD-HGF は HGF と比較し、脊髄内に長時間留まっていた。

(2) マウス胎児大脳皮質より神経幹細胞を採取し、培養した。分化した細胞が神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することを蛍光免疫染色で確認し、脊髄損傷治療に応用可能な分化能を持った神経幹細胞が培養できていることを確認した(図3)。

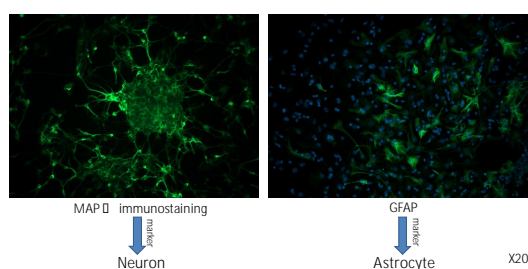


図3：抗 MAP2 抗体及び抗 GFAP 抗体を用いた蛍光免疫染色により、神経幹細胞の神経細胞及びグリア細胞への分化能を確認した。

(3) 圧迫損傷モデルにおいては、Basso mouse scale (BMS)を用いた後肢運動機能評価(図4)、MEP 解析を用いた電気生理学的検査でも有意な改善が見られた(図5)。

免疫組織学的検査で、神経再生を示す GAP-43 と MBP 陽性面積の有意な増加を認めた(図6)。脊髄切断モデルにおいては、CBD-HGF 単独では損傷脊髄部の回復効果は促進されなかったが、gelatin-FA と CBD-HGF 併用群では治療効果が確認された(図7)。

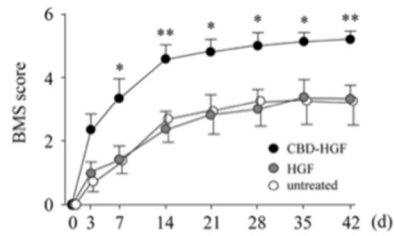


図 4 : Basso mouse scale(BMS)を用いた後肢運動機能評価。CBD-HGF 群では優位な運動機能改善を認めた。

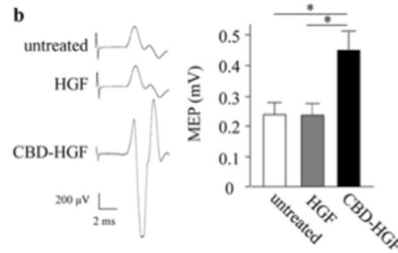


図 5 : Motor evoked potential (MEP)解析を用いた電気生理学的評価。CBD-HGF 群では優位な運動機能改善を認めた。

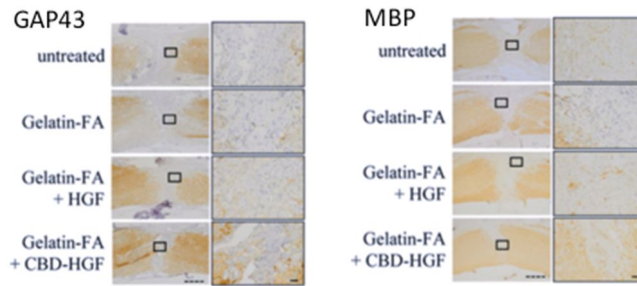


図 6 : 脊髄圧迫損傷モデルにおける免疫組織学的検査。CBD-HGF 群で、神経再生を示す GAP-43 と MBP 陽性面積の有意な増加を認めた。

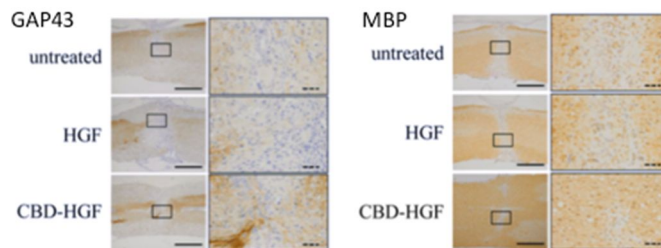


図 7 : 脊髄切断モデルにおける免疫組織学的検査。gelatin-FA と CBD-HGF 併用群で治療効果が確認された。

本研究において先端接着技術を応用した CBD-HGF 及び可視光硬化型ゼラチンによる脊髄損傷治療は今後臨床応用できる可能性が示された。神経幹細胞については、ここまでの実験で、マウス胎児を用いた幹細胞培養技術の確立、また神経細胞やグリア細胞への分化は確認できたが、脊髄損傷モデルへの移植までは到達することができなかった。可視光硬化型ゼラチンは有機溶媒を用いないため、細胞毒性を最小限に抑え、神経幹細胞の scaffold として脊髄損傷の治療に臨床応用できる可能性が考えられ、これらを併用して引き続き研究を続けていく予定である。

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 4 件)

Yamane K, Mazaki T, Shiozaki Y, Yoshida A, Shinohara K, Nakamura M, Yoshida Y, Zhou D, Kitajima T, Tanaka M, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A. Collagen-Binding Hepatocyte Growth Factor (HGF) alone or with a Gelatin- furfurylamine Hydrogel Enhances Functional Recovery in Mice after Spinal Cord Injury. Sci Rep. 2018;8(1):917. doi: 10.1038/s41598-018-19316-y. 査読有

Morita T, Sugimoto Y, Takigawa T, Misawa H, Ito Y, Ozaki T. Venous Thromboembolism in Patients with Acute Thoracolumbar Spinal Cord Injury. Acta Med Okayama. 2018;72(4):375-378. doi: 10.18926/AMO/56173. 査読有

Komatsubara T, Tokioka T, Sugimoto Y, Ozaki T. Minimally Invasive Cervical Pedicle Screw Fixation by a Posterolateral Approach for Acute Cervical Injury. Clin Spine Surg. 2017; 30(10):466-469. doi: 10.1097/BSD.0000000000000421. 査読有

Sugimoto Y, Hayashi T, Tokioka T. Minimally invasive cervical pedicle screw fixation via the posterolateral approach for metastatic cervical spinal tumors. Spine Surg Relate Res 2017; 1(4): 218-221. doi.org/10.22603/ssrr.1.2016-0025. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

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 : 尾崎 敏文

ローマ字氏名 : (OZAKI, Toshifumi)

所属研究機関名 : 岡山大学

部局名 : 医歯薬学総合研究科

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 40294459

研究分担者氏名 : 松川 昭博

ローマ字氏名 (8 桁) : (MATSUKAWA, Akihiro)

所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：90264283

研究分担者氏名：塩崎 泰之
ローマ字氏名：(SHIOZAKI, Yasuyuki)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：00596041

研究分担者氏名：瀧川 朋亨
ローマ字氏名：(TAKIGAWA, tomoyuki)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：80613166

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。