

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04358

研究課題名(和文) 脊髄損傷後の新規再生治療法の開発: 大脳損傷メカニズムの解明と骨髄細胞を用いた修復

研究課題名(英文) Mechanism of brain injury caused by spinal cord injury

研究代表者

鈴木 義久 (Suzuki, Yoshihisa)

滋賀医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：30243025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脊髄損傷に対して大脳レベルでの障害を考慮した新規治療法開発を目的とする。昨年は緑色蛍光色素を発現する骨髄を得て、同系統正常マウスに骨髄移植した脊髄損傷モデルマウスの作成に成功。本年度はそれを用いて脊髄損傷時に脳内に移行し、運動知覚支配領域の骨髄由来細胞の役割を解明した。脊髄損傷1日後骨髄細胞の運動野への集積が観察され、損傷後7日目それは観察されず、帯状回皮質、第三脳室、側脳室に集積した。損傷後28日目には扁桃体付近、傍梨状核付近に観察された。このダイナミックな骨髄細胞の集積の変動が観察され、骨髄細胞は体の部位に損傷が起こった時の学習記憶に関係している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、脊髄に加わった損傷により大脳に骨髄細胞が集積するという新しい現象が見出された。しかも、骨髄細胞の集積部位は損傷後の経過時間によりダイナミックに変化した。この現象の詳細な意義は将来の研究の課題であるが、大脳と脊髄は直列臓器であることを考えると、大脳に集積する骨髄細胞を利用することにより、現在は治療が極めて困難である脊髄損傷患者に対し、新しい治療を確立できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study is to develop a new treatment method for spinal cord injury considering the damage at the cerebral level. Last year, we obtained bone marrow expressing green fluorescent dye and succeeded in creating a spinal cord injury model mouse in which bone marrow was transplanted to a normal mouse of the same strain. This year, we used it to elucidate the role of bone marrow-derived cells that migrate into the brain during spinal cord injury and are involved in motor sensory control. Accumulation of bone marrow cells in the motor cortex was observed 1 day after spinal cord injury, but not on day 7 after injury, and accumulated in the cingulate cortex, third ventricle, and lateral ventricle. On the 28th day after the injury, it was observed near the amygdala and near the parapyramidal nucleus. This dynamic variation in the accumulation of bone marrow cells was observed, suggesting that the bone marrow cells may be involved in learning and memory when the body site is damaged.

研究分野：骨髄細胞

キーワード：脊髄損傷 骨髄細胞 大脳 記憶

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、主として事故やスポーツ等による外傷により突然発症し、受傷下位の運動および感覚機能が失われる。患者だけでなく、「脊髄損傷は治らない」と絶望感と諦念に打ち拉がれている家族及び医療従事者も少なくない。このような状況を打破し、脊髄損傷の機能回復を究極の目標に、申請者は、自家骨髄単核球の髄腔投与療法が脊髄損傷に一定の効果があることをいち早く動物実験で実証した。さらに2015年の再生医療等安全確保法の施行以前から、脊髄損傷患者の治験に取り組んできた。現在、当該治療は国内のみならず、ベトナムのダナン病院でも治験施行中である。

しかし、当治療が脊髄損傷患者の運動/感覚機能を改善することは動物実験により証明できたものの、そのメカニズムは、移植単核球が分泌するサイトカインが、損傷された神経細胞を修復させるという考察で停まっていた。けれども申請者が施行している治療法を含め、脊髄損傷の完全治癒を将来目指すためには、脊髄損傷という疾患自体の詳細な病態メカニズムを明らかにすることが喫緊の課題であった。

脊髄損傷の病態は、連絡が脊髄で絶たれることにより、求心性/遠心性線維の断絶が生じることが脊髄損傷の本態である。そこで本研究では、脊髄は中枢にて脳と連続している「直列臓器」であることに注目すると、断絶された脊髄のみを治療するのではなく、中枢部、すなわち脳にも治療を施すことで、新しい治療法の可能性が開けると仮説を立てた。

2. 研究の目的

申請者は長年、骨髄細胞を用いた脊髄損傷患者における再生医療を行ってきた。従って、骨髄細胞の治療に関する経験を生かして、脊髄損傷患者において脳が治療標的となるかを検証する。申請者がこれまで行なっていた動物モデルはラットを用いた実験だが、本目的を達成するためには、治療標的遺伝子が定めれば、即遺伝子改変動物が利用できるマウスの方が適している。従来、マウスの脊髄損傷モデル作成は、損傷させる脊髄が小さいため、損傷程度が安定せず極めて困難とされていた。さらに脳において骨髄細胞を可視化するためには、骨髄移植をしたのち、脊髄損傷を作成しなければならない。骨髄移植マウスは刺激に弱く、当該実験モデル作成は非常に難しい。この課題を本研究では克服し、骨髄移植かつ脊髄損傷マウス(以下、BMT-SIマウス)を作成して、脳の解析を行う。

3. 研究の方法

骨髄細胞を可視化するために、GFP-UBCマウスの大腿骨から骨髄細胞を 1×10^6 採取する。野生型マウスに10グレイの放射線を照射して骨髄細胞を払拭したのち、GFPマウスからの骨髄を尾静脈注射して移植した。骨髄細胞が安定化した約1ヶ月後、インパクトを用いてTh8-9を損傷させた。しかし、従来のインパクトはマウスには大きすぎて脊髄を超えて広範囲に損傷を与えてしまうため、再現性に乏しかった。よって特注の小さいインパクトを作成し、まず野生型マウスで損傷程度を検証することから始めた。損傷程度の確認は、Basso Mouse Scale Score (BMS score)とトレッドミル運動で評価した。この条件が整い、再現性の得られる脊髄損傷マウスを安定して作成できるようになったのちに、BMT-SIマウスの作成に移った。対照群として、骨髄移植マウスの脊髄を露出して損傷を与えないマウス(以下BMT-shamマウス)を用いた。評価項目は、野生型マウスで脊髄損傷を与えた場合と同様のMouse Scale Scoreおよびトレッドミル運動を行った。さらに組織評価のため、麻酔液を腹腔内投与後、PBSで灌流脱血を行った後、ホルムアルデヒドで灌流固定を実施し、脳を採取して脳切片を咲せいた。GFP陽性細胞の集積を脊髄損傷後1、37、14、28日で解析し、さらに血管内皮細胞との関連をみるためにCD31染色を行った。

4. 研究成果

申請者らはマウスで安定した脊髄損傷の条件を見出すことに成功した(インパクト20gx90s)。この条件では、脊髄損傷翌日からBMT-SIマウスのBMSスコアは、BMT-shamマウスと比較して有意に低下し、処置後28日まで安定して低下していた。一方、トレッドミル評価ではBMT-SIマウスはBMT-shamマウスと比較して解析したどの損傷日数でも有意差が得られなかった。すなわち、BMT-SIマウスおよびBMT-shamマウス両群において処置後1日目より運動機能が低下したが、経過時間とともに比例して回復傾向を示し、処置後28日では両群は処置前と同レベルに回復した。両群とも同じ経過を示したということは、マウスの学習効果によるところが大きいと解釈した。そこで、BMSスコアが7以下のBMT-SIマウスを脊髄損傷が効果的になされたマウスと判定し、それらの組織学解析を行って同様の経過時間を経たBMT-shamマウスと比較した。

脊髄損傷1日後、BMT-SIマウスの脳では、骨髄細胞が運動野に集積が観察できた。さらにCD31陽性の血管から遊走しつつある骨髄細胞も観察された。一方、BMT-shamマウスでは脳において骨髄細胞は観察できなかった。損傷後7日、BMT-SIマウスの脳では、骨髄細胞は運動野には散見される程度で、むしろ認知、自律に関する感覚野に見られた。そのほか、側脳室や第3脳室にも骨髄細胞が観察できたが、これらは運動野から感覚野に移動

する途中の骨髄細胞と考えられた。処置後7日後のBMT-shamマウスの脳では、運動野および脳表面にごく少数の骨髄細胞が見られた。損傷後14日目のBMT-SIマウスの脳においては、梨状皮質、尾状核被殻、海馬に特異的に骨髄細胞の集積が見られ、運動野には骨髄細胞はほとんど観察されなかった。これらは嗅覚から危険を察知し、即座に対応できるように生体が柔軟に対応していると解釈している。一方、BMT-shamマウスの脳の骨髄細胞の集積は運動野、外側中隔核、脳梁に見られた。これは、トレッドミルの結果がBMT-SIマウスと変わらなかった結果と合わせると、学習効果によって、運動野に骨髄細胞が集積していると推察している。損傷後28日後、BMT-SIマウスの脳では扁桃体、海馬に骨髄細胞が見られた。これは何らかの刺激に対する拒否反応が集まっていると考えられたが、興味ふかいことに、28日目では、これまでのBMT-SIマウスの脳で観察された骨髄細胞の形態と異なり、骨髄細胞が有意に長いかつ多くの樹状突起を出し、脳神経細胞に接触している形態が観察できた。同日経過のBMT-shamマウスの脳でも海馬に骨髄細胞がCD31で染色できる血管から遊走する像が観察されたが、樹状突起は見られなかった。

以上の結果は、脊髄損傷という病態に対し、確かに直列臓器として的大脑が反応し、その反応は骨髄細胞が関与している可能性を示唆している。また、今回は脊髄損傷の評価としてトレッドミルを用いたが、損傷を与えていないBMT-shamマウスでも処置後経過とともに骨髄細胞が見られるようになったため、トレッドミルの結果と合わせて考察すると骨髄細胞が学習にも関与するという興味ふかい結果が得られた。

今後は、この骨髄細胞を利用した大脳治療によって、脊髄損傷の程度が回復するかどうかの検証を行っていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terashima T, Ogawa N, Suzuki Y, Okano J et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Gene therapy for neuropathic pain through siRNA-IRF5 gene delivery with homing peptides to microglia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular therapy	6. 最初と最後の頁 203-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2018.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terashima T, Ogawa N, Suzuki Y, Okano J et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Stem cell factor induces polarization of microglia to the neuroprotective phenotype in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 837-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018.e00837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kagekiyo K, Nakano N, Humma T, Suzuki Y et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of multiple injection of bone marrow mononuclear cells on spinal cord injury of rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 3003-3011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2016.4841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kagekiyo K, Wakabayashi T, Nakano N, Suzuki Y et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of intrathecal injection of the conditioned medium of bone marrow stromal cells on spinal cord injury of rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 521-532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2017.5201.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木義久、小橋修平、中江由希、櫻美和子、岡野純子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 脊髄組織および脊髄内細胞標的化遺伝子輸送システムの開発と神経疾患への分子治療
3. 学会等名 日本再生医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻美和子、寺島智也、中江由希、岡野純子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 糖尿病性神経障害を作り出す異常な造血幹細胞の同定
3. 学会等名 日本再生医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中江由希、岡野純子、寺島智也、櫻美和子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 傷害された皮膚に遊走する骨髄由来細胞の機能解析
3. 学会等名 日本再生医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田加奈、岡野純子、鈴木義久
2. 発表標題 顔面劇症型A群溶血性連鎖球菌感染症後に生じた閉瞼障害に対し前額正中皮弁を用いて治療した一例
3. 学会等名 日本創傷外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野純子、石川奈美子、井出千束、鈴木義久
2. 発表標題 チューブ構造でなくシート状の人工神経の開発
3. 学会等名 日本形成外科基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木義久、石川奈美子、井出千束、岡野純子、小島秀人、寺島智也ら
2. 発表標題 脊髄損傷の自家骨髄由来細胞を用いた治療法の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺島智也、小橋修平、岡野純子、鈴木義久、小島秀人ら
2. 発表標題 SCF刺激によるマウス初代培養ミクログリア細胞の細胞保護型への誘導
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡野純子、鈴木義久、櫻美和子、小島秀人ら
2. 発表標題 糖尿病表皮の機能・分化異常は血糖コントロールにより治療可能である
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中江由希、岡野純子、櫻美和子、寺島智也、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 傷害された表皮に遊走する骨髄細胞の解析
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木義久、石川奈美子、岡野純子、武田耕司、井出千束ら
2. 発表標題 自家骨髄由来細胞移植による脊髄損傷再生治療
3. 学会等名 日本形成外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木義久、石川奈美子、岡野純子、武田耕司、井出千束ら
2. 発表標題 管状構造でないゲル状の人工神経材料によるヒト指神経の再建
3. 学会等名 日本形成外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 秀人 (Kojima Hideto) (00225434)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 奈美子 (Isikawa Namiko) (00462276)	公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・主任研究員 (74314)	
研究分担者	寺島 智也 (Terasima Tomoya) (40378485)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	
研究分担者	岡野 純子 (Okano Junko) (50447968)	滋賀医科大学・医学部・講師 (14202)	