

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08975

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞移植による、上位中枢神経における可塑性亢進の解析

研究課題名(英文) Analysis of accelerating plasticity in the brain following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in spinal injury

研究代表者

岡 真一 (OKA, SHINICHI)

札幌医科大学・その他部局等・講師

研究者番号：70789453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷等の神経損傷に対して自家骨髄間葉系幹細胞(MSC)を経静脈的投与することによって、神経機能が回復することが明らかとなっている。投与した細胞の作用は、損傷部位の局所的修復のみならず、より上位の脊髄、脳を賦活するメカニズムが考えられている。今回我々は、ヒトおよび動物実験モデルにおける脊髄損傷に対するMSC投与後のMRI解析、動物モデルについては組織学的解析を同時に実施し、神経回路の再編成が生じていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷や脳梗塞等の神経損傷疾患の後遺症に対しては、これまで有効な治療法がなく、多くの人々の社会復帰を妨げる要因となっている。我々は自家骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による神経機能回復に着目し、急性期～亜急性期の脊髄損傷患者を対象とした医師主導治験を実施し、既に極めて高い有効性を示した。現在、期限・条件付きで薬機承認が得られ実際に治療にあたっている。神経機能回復は多段階にわたる機序が想定されているが未だ不明な点が多く、特に損傷局所から離れた脳の賦活が生じることが、重要な役割を果たしている可能性が示唆され、その解明は本治療のさらなる発展に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurofunctional recovery in spinal cord injury following intravenous infusion of Mesenchymal stem cells has been reported. It is one of the most important mechanisms of functional improvement that remote responses occur in the brain as well as in the injured spinal cord. Therefore, we performed MRI analysis after MSC administration for spinal cord injury in patients and animal experimental models, and histological analysis for animal models at the same time, and clarified that neural circuit rearrangement occurred.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 脊髄損傷 diffusion tensor imaging brain connectivity

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の自然回復過程において、損傷部位のみならず、さらに中枢側に位置する脊髄、脳において、plasticityの賦活化が生じ、新たに神経回路が再構築されることが重要な役割を果たしていることが知られている(Bareyre et al., 2004; Ghosh et al., 2012; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2016)。さらにMSCの移植がplasticityの賦活化を加速させ、機能回復を増幅させると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。近年、神経回路のplasticityを評価するために、体積などの形態的MRI評価であるVoxel-Based Morphometry(VBM)、さらにDiffusion Tensor Imaging(DTI)、functional MRI(fMRI)などの機能的MRIを用いた解析手法が急速に発達してきており、これらの最新の解析手法を用いた脊髄損傷後の神経回路の再構築が報告されている。

## 2. 研究の目的

MSCを経静脈的に移植することによって、多段階に亘る回復メカニズムが相乗的に効果をもたらすと考えられている。特に損傷から離れている遠隔領域においてもplasticityを促すという効果の検証は、本投与方法の有用性を検討する上でもおおいに貢献するものとする。本研究では、神経機能画像の解析を中心に組織学的、分子生物学解析等も併せて、MSC移植後のplasticityを解析し、その部位や程度などの特定を目指す。すなわち、脊髄損傷症例のMSC移植前後のMRI、運動機能評価データを経時的に収集する。得られたMRIデータから既存の脳白質神経回路の個々の検討および網羅的な脳connectome解析により、plasticity亢進に寄与する脳皮質間接続を同定する。臨床で得られて知見を踏まえて、ラット脊髄損傷モデルに対して、MSC(対照群にはVehicle)を経静脈的に投与して、脳におけるplasticityの変化を、MRI ex vivo DTI法、fMRI法、軸索トレース法、軸索・樹状突起の形態解析等、種々の神経解剖学的解析、免疫組織学的解析、分子生物学的解析を行う。

## 3. 研究の方法

### 方法1: 脊髄損傷症例のMRI、運動機能評価データの収集、解析

MSCによる治療を目的に札幌医科大学病院に入院した全ての頸髄損傷症例について、入院時、投与直前、投与1ヶ月後、投与3ヶ月後、投与6ヶ月後の時点での頸髄および脳のT1強調画像、T2強調画像、DTI、resting-state fMRIの撮影を行い、さらに同一の時点での神経機能評価(ASIA機能障害尺度、ISCSI、SCIM-)を併せて行う。

MRIデータは、これまでも多数報告されている標準的な方法により解析する。すなわち、T1強調画像など解剖学的MRIデータは、標準的な脳画像解析ソフトであるSPM(Statistical Parametric Mapping, UCL)にて、標準化、segmentation等の処理を行う。脳DTIデータは、最も標準的なDTI解析ソフトであるFSL(FMRIB Software Library, Oxford)による、FA、MD、ADC画像への変換、SPMでの標準脳空間へのregistrationを行った後、tractographyを作成し、グラフ理論を元に各種パラメータを算出する。resting-state fMRIデータについても同様にSPMを用いてデータ解析を行う。

### 方法2: 脊髄損傷動物モデルにおける、MSC投与による損傷上位の脊髄・脳のplasticity解析

ラット用脊髄損傷作成装置(IH-0400 Impactor; PSI社製)を用いて、SDラットのTh9に実験的脊髄損傷を作成する(Morita et al., 2016)。脊髄損傷作製後1週目にラットから採集・培養したMSCを経静脈的に移植し、行動学的評価をしながら、観察期間終了後(4週)まで飼育する。行動学的評価は、Basso Beattie Bresnahan (BBB) スコアとRotarod testを用いる。なお、対照群にはVehicleを投与し、比較検討する。

#### 2-1. In vivo MRI データの解析

動物実験用高磁場 MRI (7T) を用いて撮像を行う。左前脚電気刺激を Task とし task-fMRI (Suzuki et al., 2013) を撮像する。データは臨床例と同様に解析を行う。

## 2-2. Ex vivo MRI データの解析

動物実験用高磁場 MRI (7T) を用いて撮像を行う。撮像項目は、T1 および T2 強調画像、脳 DTI (図 1: 長濱, 予備データ)、脊髄 DTI である。これらのデータも臨床例と同様に解剖学的、機能的な解析を行う。

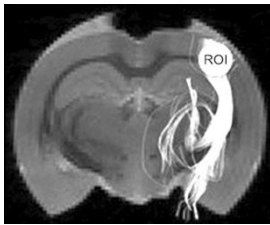


図 1: ラット慢性期脊髄損傷に MSC を経静脈的に移植後、10 週後に施行した脳の Ex vivo DTI。大脳皮質運動感覚野に ROI を設定している。大脳皮質からの神経線維が、描出されており、脳の plasticity が検出可能である。(予備データ)。

## 2-3. 軸索トレース法による神経解剖学的比較解析

MSC を移植後、右大脳皮質運動感覚野に順行性トレーサである biotinylated dextran amines (BDA) を局所注入し、皮質脊髄路ニューロンのトレースを行なう。

## 2-4. 軸索・樹状突起棘(dendritic spine)の形態解析

MSC を移植後の大脳皮質切片において、neuron のゴルジ染色を行い、その形態変化を解析する。

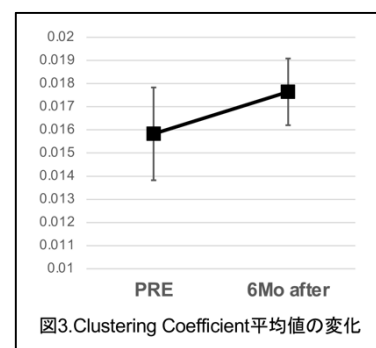
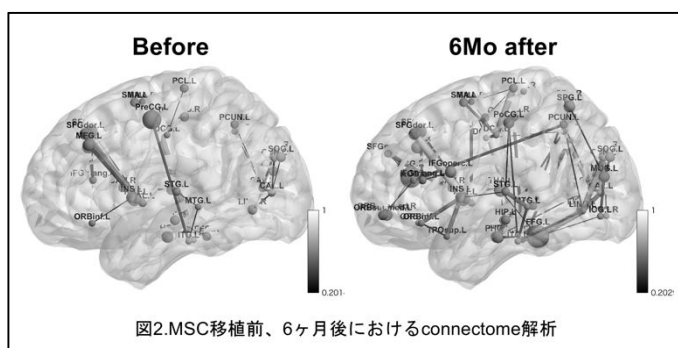
## 2-5. 大脳皮質運動野における、遺伝子発現レベルの解析

MSC 投与群、vehicle 投与群、コントロール群における、大脳皮質運動野組織における遺伝子発現レベルを網羅的に RT-PCR にて解析し、MSC 投与によって賦活化される、運動機能回復に関連している遺伝子を検討する。

# 4. 研究成果

## 成果 1: 脊髄損傷症例の MRI、運動機能評価データを収集、解析

MSC による治療を目的に札幌医科大学病院に入院した全ての頸髄損傷症例について、頭部および脊髄の MRI データを収集した。当院入院時 (投与前) 投与 1 ヶ月後、投与 4 ヶ月後および可能であれば投与 6 ヶ月後の時点での頸髄および脳の T1 強調画像、T2 強調画像、DTI、resting-state fMRI の撮影を行い、さらに同一の時点での神経機能評価 (ASIA 機能障害尺度、ISCSI、SCIM-) を併せて行った。MRI データを元に実施した大脳 connectome 解析において、大脳各種ネットワーク指標に変化が生じており、大脳神経回路の構成に変化が生じていることが示唆された (図 2, 3)。また損傷した頸髄の DTI tractography 解析にて、構成する個々の tract の長さの割合が投与後に大きく変化が生じることも示された (図 4)。



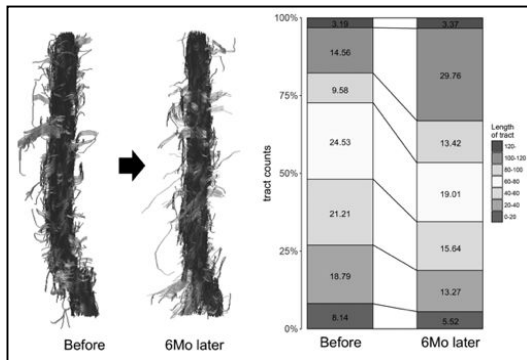


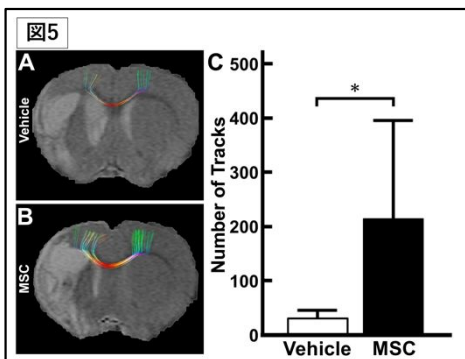
図 4: 頸髄損傷症例における、移植前および移植 6 ヶ月後の頸髄 DTI Tractography と tract 長の profile 解析。投与 6 ヶ月後では、投与前と比較して、長い tract の割合が増加していることが分かる。(Oka, 未発表)

### 成果 2: 脊髄損傷モデルラットにおける MSC 投与後の脳 plasticity の賦活化亢進の解析

急性期脊髄損傷モデルラットに対して、MSC 投与群、vehicle 投与群、コントロール群における、大脳皮質運動野において遺伝子発現レベルを比較検討した結果、神経再生、plasticity の賦活化に關与する可能性がある複数の遺伝子において、MSC 投与により有意に発現量に変化が生じていた(Oshigiri et al., 2019)。このことは、MSC 投与によって引き起こされる運動機能の回復において、損傷局所とは離れた大脳皮質における組織再構築が回復の一つの要因となっていることが示唆される結果である。

### 成果 3: 脳梗塞モデルラットにおける MSC 投与後の脳 plasticity の賦活化亢進の解析

脊髄損傷と関連して、同様に神経損傷疾患である脳梗塞モデルラットに対して、MSC 投与群、vehicle 投与群における ex vivo 脳 DTI 解析を実施した。結果、脳梁を介して両側大脳皮質を連絡する Tract の描出数が MCA 投与群において有意に増加していた(図 5: Nagahama et al., 2018)。この研究は、ラットにおける脳 DTI 解析において、撮像条件の設定や、解析方法、今後 connectome 解析方法を確立していく上で非常重要的な位置づけと考えられた。



### 国内外における位置づけと、今後の展望

本学では、これまでの各種神経疾患に対する移植研究の成果を受けて、急性期脊髄損傷患者を対象とする、自己培養 MSC 投与の医師主導治験を実施した。治験では、極めて高い有効性を示唆する結果が得られたことから、2018 年 12 月に期限・条件付き薬機承認が得られ、2019 年 5 月から実臨床における使用が開始されている(ステミラック注®)。本治療は国内で唯一本学にて実施されており、さらに大脳に生じる plasticity の変化を、MRI を用いて検討する試みは、過去に報告がみられていない。我々は、脊髄損傷治験症例における MRI 解析で、脳および脊髄の神経回路の再構築を示唆するデータを得ていることに加え、脊髄損傷動物モデルにおける MSC 移植実験での大脳、脊髄における plasticity の賦活化を報告している(Morita et al., 2016; Oshigiri et al., 2019; Oka 未発表)。臨床データと基礎実験を総合的に解析・検討し、MSC 移植による機能回復のメカニズムを解明する試みは世界初であり、今後も MRI データの蓄積を継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshigiri Tsutomu, Sasaki Toru, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Nakazaki Masahito, Oka Shinichi, Morita Tomonori, Hirota Ryosuke, Yoshimoto Mitsunori, Yamashita Toshihiko, Hashimoto-Torii Kazue, Honmou Osamu	4. 巻 36
2. 論文標題 Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Alters Motor Cortex Gene Expression in a Rat Model of Acute Spinal Cord Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 411 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2018.5793	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 該当する

1. 著者名 Nagahama Hiroshi, Nakazaki Masahito, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Namioka Takahiro, Namioka Ai, Oka Shinichi, Onodera Rie, Suzuki Junpei, Sasaki Yuichi, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 1695
2. 論文標題 Preservation of interhemispheric cortical connections through corpus callosum following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat model of cerebral infarction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 37 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.05.033	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡真一
2. 発表標題 脊髄損傷患者に対する自家培養骨髄間葉系幹細胞(MSC)の静脈投与におけるDTI-MRI を用いた脊髄・脳 plasticity 解析
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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	本望 修 (HONMOU Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授  (20101)	
研究分担者	佐々木 祐典 (SASAKI Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・講師  (20101)	
研究分担者	佐々木 優子 (SASAKI Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教  (20101)	
研究分担者	中崎 公仁 (NAKAZAKI Masahito) (70722461)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	鈴木 淳平 (SUZUKI Junpei) (00572596)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	長濱 宏史 (NAGAHAMA Hiroshi) (20725676)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関