

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890068  
 研究課題名（和文） 慢性期損傷脊髄に対する選択的細胞治療法の開発と神経栄養因子の併用効果  
 研究課題名（英文） Development of combination strategies with selective cell therapy and multilineurotrophin for spinal cord injury at chronic phase

研究代表者  
 榎本 光裕（ENOMOTO MITSUHIRO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座講師  
 研究者番号：90451971

研究成果の概要：成ラット胸髄に血管クリップを用いた圧挫損傷モデルを作製し、損傷 6 週で損傷脊髄部分に培養した FGF2 反応性神経前駆細胞の移植を行った。その結果、GFP 遺伝子導入の細胞移植群（対照群）より、NT3 と BDNF の作用を持った改変 NT3 をさらに p75 受容体に結合しにくい構造に改変した神経栄養因子遺伝子を導入した細胞移植群のほうが後肢運動機能の改善を認めた。移植細胞の生着は、対照群と比較して栄養因子導入細胞で 1.8 倍高く残存ミエリンも多かった。脊髄損傷慢性期での細胞移植は、細胞単独では機能回復に不十分であり本研究のように神経栄養因子を組み合わせた治療が必要なことが明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,270,000	0	1,270,000
2008年度	1,290,000	387,000	1,677,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,560,000	387,000	2,947,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

交通事故や転落など大きな外力による脊髄損傷は、骨折を伴う脊柱管の破綻によって脊髄の挫滅をきたし、上行・下行伝導路の障害を起こす。損傷後の機能回復は困難であり脊髄自身に直接作用するような薬剤は開発されていない。現在、残存機能の保持やリハビリテーション、姑息的機能再建や合併症に対する治療が中心となり、脊髄に対する根本

的な治療法の開発が望まれている。近年、cell biology の進歩によって神経幹細胞が注目され、中枢神経損傷によって失われた神経細胞とグリア細胞の補充の起源として注目を浴びるようになった。動物実験だけでなく海外でヒトに対して嗅神経上皮細胞や ES 細胞を利用した細胞移植治療が行われ、部分的な機能回復が示されている。しかし、移植細胞の移植後の動態や細胞移植によるホスト脊髄

に対する機能回復の機序は不明な部分も多く動物実験で十分検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

脊髄損傷に対する細胞移植治療の問題点として1)移植細胞の生存率の低さ(移植4週間後には移植細胞数に対して10パーセント以下との報告がある; Hill et al. abstract in the 36th annual meeting of the Society for Neuroscience 2006)、2)移植細胞のホストでの適合性(移植細胞がホスト脊髄にどのような影響を与えるか)がある。これら問題点を動物実験レベルで移植細胞の生存を向上させホスト脊髄との適合性を明らかにする必要がある。本研究では、ラットの慢性期脊髄損傷モデルを作製し、培養神経前駆細胞を移植することで失われた細胞を補充生着させ、さらに神経栄養因子の効果によって機能回復を得ることが目的である。

## 3. 研究の方法

1) 血管クリップを用いた脊髄損傷モデルの作製: 成ラット(200g)を麻酔し第9胸髄レベルの脊髄を露出し血管クリップで30秒間側方向にはさみ脊髄損傷を作製する。本法は、機能回復過程が安定しており慢性期には空洞を形成する。

2) 神経前駆細胞の培養および保存: ラット胎性16日の海馬を用いて分散培養でFGFを添加することによって自己増殖能を有する神経前駆細胞が単離可能である。FGFを除去することによって神経・グリア細胞に分化する。

3) 培養細胞への神経栄養因子の導入(神経栄養因子産生細胞の作製): マーカー遺伝子であるGFPを挿入したレンチウイルスを用いて一回継代した培養細胞に感染させて培養し細胞保存液に凍結保存を行う。細胞移植1週間前に培養を開始し後に神経栄養因子を導入したレンチウイルスベクターに再感染させて神経栄養因子産生細胞の作製を行う。

4) 組織学的評価: 移植後、8週間で灌流固定を行い、損傷部分を含んだ脊髄切片を作成する。HE染色やルクソールファーストブルーを用いたミエリン染色によって損傷脊髄及び空洞の体積、残存ミエリンの定量を行う。また、ホスト脊髄内でのGFP陽性細胞(移植細胞)数の定量と分布を行う。

5) 下肢運動検査と痛覚検査

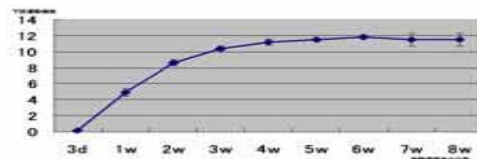
下肢機能はすでに確立している後肢運動機能評価法(BBB score)を経時的に行う。痛覚検査には、アセトンを利用した冷感検査、von Freyテストを施行して足底刺激の強さと足ひっこめの時間を計測して評価を行う。

## 4. 研究成果

1) 損傷脊髄の機能回復

本研究では、血管クリップを用いた胸髄損傷

を作製した。安定した機能回復を得られる脊髄損傷モデルに必要であり、下図のように損傷後運動機能(BBB)は6週目で後肢足底について歩行できるようになるが前肢との協調運動が少なく損傷6週以降は回復しない。



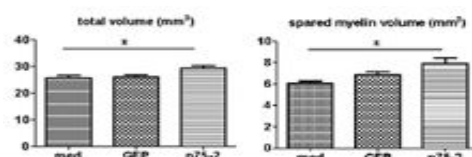
2) 神経前駆細胞の培養および保存

神経前駆細胞培養にはFGF2が必要であるが、グリア前駆細胞の増殖に關与するPDGFを加えて培養した。しかしPDGF単独では細胞増殖が不十分であったためFGF2を併用することによって細胞増殖活性が上昇した。同因子を除去することによって神経・グリア細胞への分化能を示すが、FGF2とPDGFを併用した場合アストロサイトへの分化傾向が強かった。アストロサイトは、グリア瘢痕形成の一因でありPDGFを添加するより移植細胞として未分化細胞として維持されるFGF2単独を使用した培養神経前駆細胞を移植細胞として使用した。同細胞は、無血清タイプのセルバンカー(細胞保存液)を使用して保存可能であった。

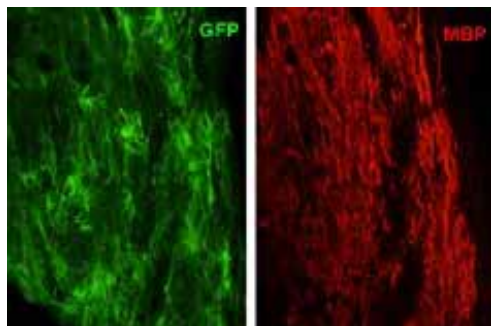
3) 培養細胞への神経栄養因子の導入(神経栄養因子産生細胞の作製)

NT-3はtrk受容体に結合するが、今回我々が使用したのは、NT-3とBDNF両方の作用を持つD15Aというアミノ酸配列を変更した神経栄養因子である。またNT-3はp75受容体結合して細胞死に關与している。細胞死を抑制するためにP75受容体に結合するD15Aアミノ酸配列を変更して新規神経栄養因子(p75-2)を開発した。同構造をレンチウイルスベクターに組み込んで培養細胞に感染させた。新規栄養因子は、基本的にNT-3の構造を持つために培養上清内のNT-3をELISAで定量可能であった。持続的に栄養因子を産生する神経前駆細胞を作製することができた。

4) 組織学的評価: 移植後8週間で損傷部位を含む脊髄切片を作製して各種染色を行い定量した。また、免疫染色を行いホスト脊髄内でのGFP陽性細胞(移植細胞)数の定量を行った。下図にあるようにp75-2群のほうが損傷脊髄の体積の維持(左図)と残存ミエリン領域(右図)が高かった。



GFP 抗体を用いた免疫染色を行うと空洞周囲の白質部分を中心に GFP 陽性細胞を確認することが出来た（下図：左 GFP 陽性細胞、右 myelin basic protein ミエリン）。GFP 陽性の領域は、GFP 遺伝子導入細胞と比較して神経栄養因子導入細胞群では GFP 群より 1.8 倍大きかった。



#### 5) 下肢運動検査と痛覚検査

下肢機能は後肢運動機能評価法（BBB score）を経時的に行った。対照群よりも神経栄養因子群のほうが移植後前肢と後肢の協調運動が可能となった。痛覚検査（触覚・冷感）では対照群と比較して差を認めなかった。痛覚過敏はいずれの群でも観察されなかった。

#### 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)

Fukushima K, Enomoto M, Tomizawa S, Takahashi M, Wakabayashi Y, Itoh S, Kuboki Y and Shinomiya K.

The axonal regeneration across a honeycomb collagen sponge applied to the transected spinal cord J Med Dent Sci 2008; 55: 71-79

Nojiri Y, Takeda S, Enomoto M, Nishitsuji H, Masuda T, Sotome S and Shinomiya K.

Co-overexpression of GDNF and GFR $\alpha$ 1 induces neural differentiation in neural progenitor cells in comparison to bone marrow stromal cells J Med Dent Sci 2008; 55: 121-128

〔学会発表〕(計 4 件)

The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience 2008/11/18

Enomoto M, Grumbles RM, Almeida VW, Tsoulfas P, Casella GTB, Wang Y, Wood PM, and

Thomas CK. Schwann cells improve survival of embryonic neurons transplanted into the axotomized eibial nerve and promote muscle reinnervation

The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience 2007/11/6

Enomoto M and Tsoulfas P. A multifunctional neurotrophin missing the p75NGFR activity, enhances Schwann cell survival and axon growth after spinal cord injury

草野和生, 榎本光裕, 早乙女進一, 四宮謙一

Clip compression によるラット胸髄損傷の運動機能回復と組織学的評価

第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008/10/24

榎本光裕, 四宮謙一, Pantelis Tsoulfas

損傷脊髄に対するシュワン細胞移植と異なるレセプター結合能をもつ NT-3 の効果

第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007/10/25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

榎本光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：9 0 4 5 1 9 7 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし