

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03124

研究課題名(和文)メカニカルストレスに基づいた犬脊髄損傷に対する再生医療とリハビリテーションの融合

研究課題名(英文) Integration of regenerative therapy and rehabilitation for spinal cord injury in dogs based on mechanical stress

研究代表者

藤田 直己 (Fujita, Naoki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：10554488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：犬の骨髄脂肪細胞周囲細胞(BM-PACs)にシアストレスが加わることで、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現上昇が起こることを明らかにし、BM-PACsを用いた脊髄再生医療において、運動療法は移植されたBM-PACsにシアストレスを与え、血管新生作用を強化することで組織再生や機能改善の促進が期待された。実際に脊髄損傷による歩行困難を呈した犬に対し、BM-PACsの経静脈投与とリハビリテーションを組み合わせた治療の臨床試験を行ったところ、1例のみであったが、BM-PACs投与後、後肢随意運動の回復がみられ、さらにリハビリテーションを介入させることで、歩行可能なレベルへの改善がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、自発的な回復が期待できない脊髄損傷に対し、さまざまな幹細胞を用いた再生医療の開発が医療および獣医療で進められており、実際に臨床応用も行われるようになってきている。本研究は、そのような再生医療が発展し、適応されるようになっていながらも、リハビリテーションが重要な治療法でありうることを示し、また、再生医療によりもたらされる治療効果を相対的に向上させる可能性を示すものである。メカニズムについては十分な検討には至らなかったが、再生医療において細胞の機能性を高める因子として、リハビリテーション(運動療法)により発生しうるメカニカルストレスという新たな概念を提唱しうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was up-regulated in canine bone marrow peri-adipocyte cells (BM-PACs) after shear stress was imposed on the cells. This suggested that exercise after regenerative therapy using BM-PACs for spinal cord injury (SCI) impose shear stress on the transplanted BM-PACs and could promote histological and functional recovery through enhancing angiogenesis.

We actually applied the combination therapy of intravenous administration of BM-PACs and exercise to a dog with severe SCI. After 1 month of BM-PACs administration, the dog showed a minimum improvement in voluntary movement of the hindlimb. Further, after induced exercise therapy, further improvement was apparently observed and the dog regained to walk. Thus, we showed that rehabilitation plays an important role even after regenerative therapy is applied for SCI patients.

研究分野：再生医療

キーワード：犬 脊髄損傷 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、犬 SCI に対する MSC を用いた脊髄再生医療の開発を目指し、材料となる MSC の培養法や機能性の検討を重ねてきた。その結果、犬骨髄から幹細胞能に優れた間葉系幹細胞 (MSCs) である骨髄脂肪細胞周囲細胞 (BM-PACs) を分離・培養することに成功した。さらに、BM-PACs は損傷部への Homing 機能や、組織修復・血管新生因子の優れた分泌能を持つことを明らかにし、SCI モデルへの経静脈移植において有効性を示したことから、科学的根拠に基づいた脊髄再生医療として、犬 SCI 症例に対する臨床応用が期待された。

一方で、犬 SCI に対する再生医療が実現に至った場合でも、リハビリテーション(リハビリ)は依然重と考えられ、脊髄再生医療との併用方法やそれらの相互作用の有無を検討する必要がある。申請者らは、これまで、運動療法介入後の脊髄運動ニューロンにおいてセロトニン受容体がリガンド非依存的に内在化を起こすことを明らかにしており、運動により発生したメカニカルストレス (MS) が、脊髄の生理機能に影響を与える可能性を見出してきたが、MS は MSC の液性因子分泌能が促進することが知られており、SCI に対して MSC を移植したのち、リハビリを行うことで、MS の発生を介した治療効果の向上が期待された。

## 2. 研究の目的

以上から、本研究では犬 MSCs として BM-PACs を使い、MS が BM-PACs の血管新生作用を中心とした機能に与える影響を明らかにした後、BM-PACs を用いた脊髄再生医療に運動療法を導入させ、移植された BM-PACs で観察される変化から、脊髄における MS の存在を検証する。また、運動療法の頻度を調節し、BM-PAC の機能強化に適した条件を探索することで、「再生医療とリハビリを融合させた SCI の新たな治療戦略」を提案し、犬 SCI 臨床例で有用性を検証することを目的に実験を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) MS が BM-PACs に与える影響の評価

運動により脊髄周囲の間質液が流動することで脊髄に対する MS が発生すると仮定し、MS としてシアストレスを再現することで、BM-PACs における血管新生因子発現変化がみられるかを評価した。具体的には、プラスチックに BM-PACs を播種し、サブコンフルエントとなったのち、シェイカーを用いて、0, 30, 60, 120rpm の刺激頻度で 1 時間培養液を流動させ、シアストレスを与えた。血管新生因子としては、これまでの研究から重要と考えられた肝細胞成長因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF-2)、血小板増殖因子 (血小板由来増殖因子) に着目し、発現変化を qPCR で評価した。また BM-PACs がメカニカルストレスに反応しているかを、メカニカルストレスマーカーである p130Cas のリン酸化から評価した。

また、生体内に近い環境を再現することを目的とし、マイクロ流路を作製してシアストレスを再現した系を用い、(1)と同様の検証を行った。

### (2) 犬 SCI 症例に対する臨床試験

BM-PACs の静脈内投与を行なったのち、投与後 1 ヶ月からリハビリ介入を行い、定期的に MRI 検査、運動機能評価を行い、脊髄再生医療とリハビリの併用療法の安全性・有効性評価を行なっ

た。

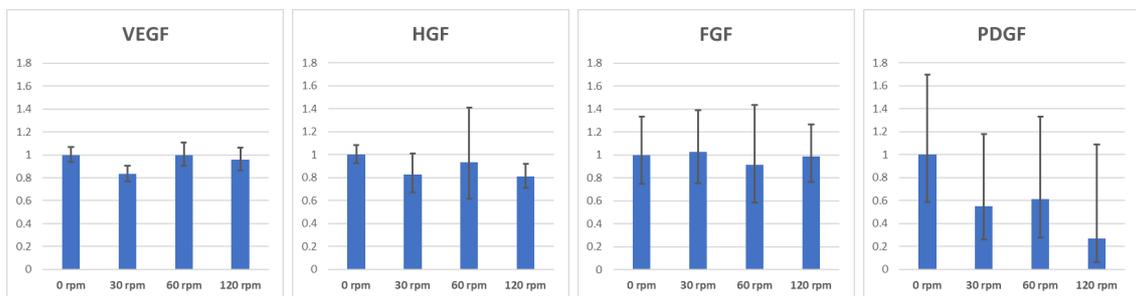
#### 4. 研究成果

##### (1) シアストレスを与えた BM-PACs の血管新生因子関連遺伝子変化

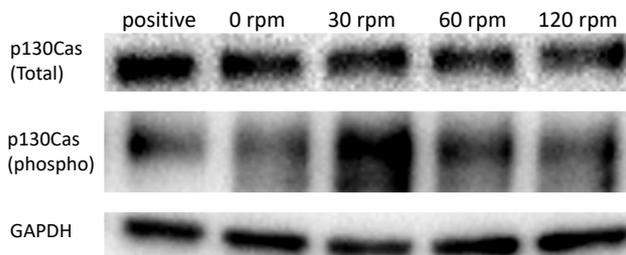
qPCRの結果、いずれの刺激条件においても、各因子の発現に有意な変化はみられなかった(図1)、また、Western Blotの結果、30rpm以上の刺激頻度により p130Cas のリン酸化の亢進がみられた(図2)。

次に、シアストレスを生体内の環境により近似させたマイクロ流を作製し(図3)、BM-PACs に60分間シアストレスを与え、同様の検討を行なった結果、HGF 発現には変化がみられなかったが、VEGF 発現の有意な上昇が見られた(図4)。

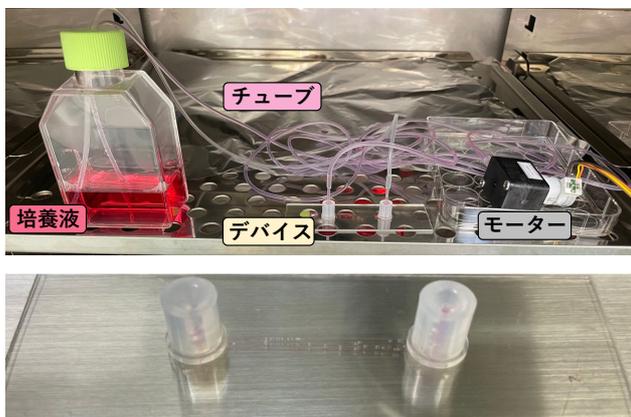
以上から、BM-PACs にシアストレスを与えることで、VEGF の発現が上昇することが明らかとなり、移植後のリハビリが BM-PACs による血管新生効果に促進的に働く可能性が示唆された。



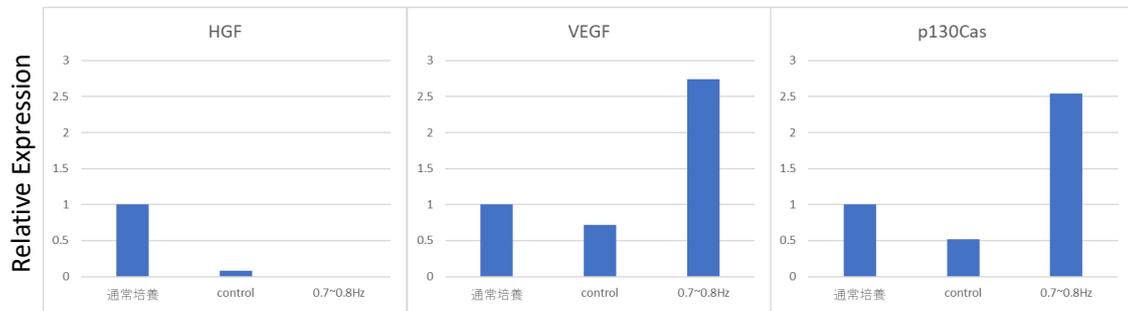
【図1】 シアストレスの刺激時間の違いによるBM-PACsの各種血管新生関連因子の遺伝子発現変化



【図2】 シアストレスの刺激時間の違いによる BM-PACs の p130Casリン酸化



【図3】 シアストレス発生を目的としたマイクロ流路 (上) デバイス全体の構成 (下) チャンバー



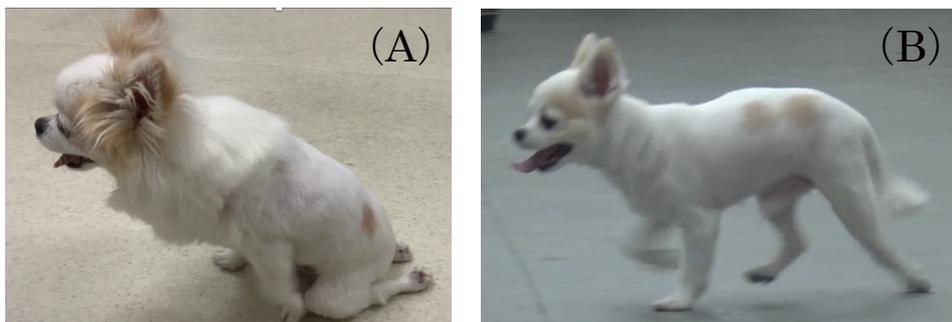
【図4】マイクロ流路で再現したシアストレス(0.2パスカル、0.8ヘルツ、60分)に対するBM-PACsの反応

## (2) 犬臨床例に対する BM-PACs 経静脈内移植とリハビリテーション併用療法

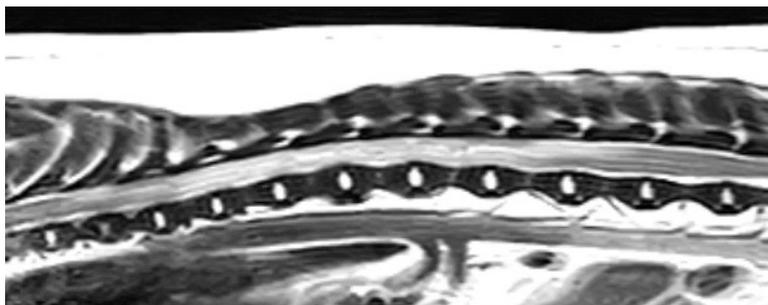
脊髄損傷後の梗塞と診断され、後肢起立、歩行困難に陥った犬一例で臨床試験を行なった(図5A)。症例はチワワ、雄、3歳齢であり、発症後のMRI検査により胸髄から腰髄の広範囲における梗塞性病変を認めた(図6)。家庭で可能なリハビリを継続したものの、受傷から2ヶ月経過したが機能回復が認められないため、インフォームドコンセントを行なったのち、臨床試験を開始した。

細胞投与時は、後肢の随意運動の明らかな残存はなく、痛覚も消失していた。細胞投与から1ヶ月後、後肢の随意運動の明らかな回復はみられなかったが、脊髄反射の一部(引っ込め反射)で改善がみられた。2週間のリハビリテーション(理学療法、トレッドミルを用いた運動療法)を行なった結果(図7)、自力起立、歩行機能の改善がみられた(図5B)。投与後3、6、12ヶ月後のMRI検査では、損傷部における明らかな変化は認められなかった。

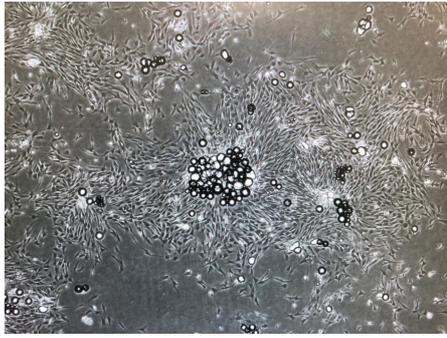
コロナ禍の影響もあり、1例のみの実施にとどまったが、本試験よりBM-PACs経静脈内移植とリハビリの併用が犬SCIに対する治療として有用かつ安全であり、歩行機能回復を目的とした革新的な治療法となりうることを期待された。また、リハビリが細胞移植効果をさらに高める可能性が示唆された。



【図5】治療前(A)と治療後(B)の症例の歩様



【図6】治療開始時の症例のMRI T2強調像(胸腰部矢状断面)



【図 7】 症例から採取・培養した BM-PACs (培養 3 日後) 培養 6 日後に回収し、体重当たり  $1 \times 10^6$  個の細胞を経静脈投与した。



【図 8】 トレッドミルトレーニングの併用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大松 勉  (Ohmatsu Tsutomu)  (60455392)	東京農工大学・農学部・准教授   (12605)	
研究分担者	西村 亮平  (Nishimura Ryohei)  (80172708)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	

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