

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09248

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞由来神経細胞による胸腹部大動脈術後虚血性対麻痺に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Advancement of Ischemic Paraplegia Treatment following Thoracoabdominal Aortic Surgery by Utilizing Neurons Derived from Adipose Stem Cells

研究代表者

清水 雄介 (SHIMIZU, YUSUKE)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10327570

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)：予備実験として野生型ラットから脂肪を採取し脂肪幹細胞を抽出して安定的に培養する技術確立した。次に胸部大動脈虚血性脊髄障害を生じるラットモデルを安定的に作製する技術確立した。一方、脂肪幹細胞由来神経細胞の安定的な作製はできなかった。本実験では合計で12体の虚血性脊髄障害モデルラットを作成し、6体に野生型ラットから採取した脂肪幹細胞を脊髄軟膜下へ直接移植、6体には対照として生理食塩水を脊髄軟膜下へ投与した。その結果、脂肪幹細胞を移植した6体では対照群に比べて下肢運動機能が有意に回復した。このことから脂肪幹細胞の脊髄軟膜下移植により脊髄虚血障害を回復させる可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄虚血による対麻痺に対して脂肪幹細胞を脊髄軟膜下投与することで、下肢の運動機能回復の可能性が認められた。本研究は小動物であるラットによる研究であったが、今後さらなる追実験を実施して再現性を確認した後、ブタ、サルなどの大動物での実験を経て、ヒトへの応用がなされれば、脊髄虚血後の対麻痺をきたした患者に対する大きな福音となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop an innovative strategy for treating ischemic paraplegia after thoracoabdominal aortic surgery. Our focus was on using neurons derived from adipose stem cells (ADSCs) to restore motor function in the lower extremities. We successfully isolated ADSCs from rats and established cell cultures. We also induced spinal cord ischemic injury (SCI) in a rat model by targeting the thoracic aorta. However, generating neurons from ADSCs consistently proved challenging. Nonetheless, we created 12 rat models with SCIs. Six rats received ADSC transplantation beneath the spinal pia, while the other six received normal saline as the control. Rats receiving ADSC transplantation showed significant recovery in lower extremity motor function compared to the control group. This finding supports subpial transplantation of ADSCs as a potential treatment for spinal neuropathy and functional restoration.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪幹細胞 細胞移植 対麻痺 脊髄虚血 脊髄軟膜下投与

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈遮断による脊髄虚血は胸腹部大動脈手術後の重篤な合併症である対麻痺をきたす。大動脈手術が成功しても術後に膀胱直腸障害、下肢運動障害、固縮を認めた患者のQOLは著しく低下する。大動脈手術後の対麻痺の発生率は約5 - 30%と報告されている(我々が報告した国内発生率は6.5% ; Anesth Analg. 2018)。また近年は大動脈ステント内挿術の普及により術後合併症としての対麻痺が急増し深刻な問題となっている。しかし、この脊髄虚血による対麻痺の病態解明や治療法は十分に確立していない。

この点に関し、我々是对麻痺による運動障害の原因は分水嶺に存在する神経細胞死であり、抑制性神経伝達物質の放出を増加させることにより異常運動(固縮)を改善できることを報告してきた(Exp Neurol. 2018, PLoS One. 2012, Br J Pharmacol. 2010)。またラット脊髄虚血モデルを用いた研究を進め、脊髄軟膜下投与法を用いた新たな遺伝子治療法を開発して対麻痺による異常運動(固縮)の改善に成功してきた(Stem Cells Transl Med. 2020, Exp Neurol. 2018, Exp Neurol. 2012, Neurosci Lett. 2006)。

一方、琉球大学では近年の再生医療研究で注目を集めている脂肪幹細胞を用いた国内初の顔面陥凹性病変に対する培養脂肪幹細胞移植(第 種再生医療)を実施してきた。脂肪幹細胞は様々な細胞に分化することが知られている。体表のどこからでも安全に採取でき、臨床応用しやすい細胞である。本研究では脊髄虚血後の対麻痺に対して脂肪幹細胞由来の抑制性神経細胞を移植することにより脊髄機能が回復するか検証することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的はラットを対象として「脂肪幹細胞由来の抑制性神経細胞を脊髄軟膜下へ移植することで、脊髄虚血後の対麻痺による固縮症状を緩和できるか」を検証することである。

具体的には

- (1) 野生型ラットから脂肪を採取し、脂肪幹細胞を抽出、培養する
- (2) 脂肪幹細胞から抑制性神経細胞へ分化誘導させる
- (3) 分化誘導した神経細胞を脊髄虚血後痙性麻痺モデルラットの脊髄軟膜下へ移植することで対麻痺をきたしたラットの固縮症状を緩和することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、野生型ラット脂肪幹細胞とラット脊髄虚血後痙性麻痺モデルを用い「野生型ラット脂肪幹細胞由来の神経細胞をラット脊髄虚血モデルに移植することで、脊髄虚血後の運動障害を緩和するか」を検証した。

- (1) 脂肪採取、脂肪幹細胞抽出、培養

SDラットの背部から少量の脂肪を採取し、酵素処理を加えて脂肪幹細胞を抽出し、脂肪幹細胞増殖培地を用いて脂肪幹細胞を安定的に培養する。また凍結、解凍の技術を確立する。

- (2) 脂肪幹細胞から抑制性神経細胞への分化誘導

抽出、培養された脂肪幹細胞に対して神経細胞誘導培地を用いて培養を行い、神経細胞への誘導を目指す。分化誘導した神経細胞の機能評価のために NeuN, β III-tubulin などの神経細胞発現マーカーの観察をする。

(3) 脊髄虚血後痙性麻痺モデルラットの脊髄軟膜下への細胞移植

痙性対麻痺モデルの作成：雄性 SD ラットを 2F Fogarty カテーテルによる大動脈の遮断と左内頸動脈からの脱血で低血圧 (40mmHg) とすることで脊髄虚血とし、痙性対麻痺を呈したラットを作成する。

脂肪幹細胞由来神経細胞移植：痙性麻痺をきたしたラットを麻酔後、椎弓固定器による固定後に第 10・11 胸椎の椎弓を切除する。切除後に硬膜切開を加え、その後軟膜を切開する。軟膜切開部位より軟膜下注入用 30G 鈍針を 5mm 程度挿入し、脂肪幹細胞由来神経細胞を注入する (図 1)。

痙性対麻痺の評価：運動機能評価法である BBB score を用いて評価する。

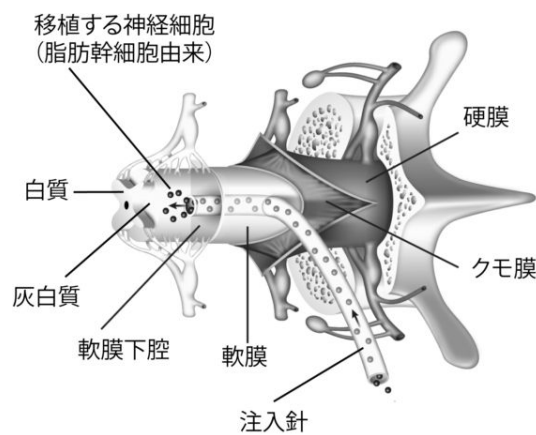


図 1 脊髄軟膜下移植による細胞移植治療

顕微鏡下にラット脊髄硬膜、軟膜を切開し、軟膜下腔に細胞を移植する

4. 研究成果

(1) 脂肪採取、脂肪幹細胞抽出、培養

麻酔下の SD ラット肩甲骨周囲から脂肪組織を採取し、脂肪幹細胞を抽出した。抽出した脂肪幹細胞 (図 2) を凍結保存し、移植の前に解凍継代して細胞移植に用いる状態にできる安定的な技術を確立した。

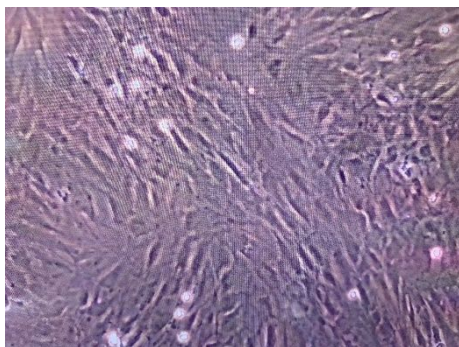


図 2 ラット脂肪幹細胞

(2) 脂肪幹細胞から抑制性神経細胞への分化誘導

脂肪幹細胞から神経細胞への分化誘導に成功できたという過去の論文報告をもとに、脂肪幹細胞を神経細胞へ分化させる試みを行った。複数の神経細胞誘導培地を用いて繰り返し実験を行ったが、いずれも安定的な神経細胞への分化を再現することはできず、神経細胞発現マーカーの確認もできなかった。そこで本研究では以降、脂肪幹細胞由来神経幹細胞を用いるのではなく、脂肪幹細胞自体を脊髄軟膜下へ移植する形に切り替えた。

(3) 脊髄虚血後痙攣性麻痺モデルラットに対する細胞移植

まず雄性 SD ラットを 2F Fogarty カテーテルによる大動脈遮断と左内頸動脈からの脱血で低血圧(40mmHg)とすることで脊髄虚血とし、BBB3 点以下のラット(Taira-Marsala Model) (図3) を安定的に作成する技術を確認した。



図3 脊髄虚血後に対麻痺をきたしたラット

また痙攣性麻痺をきたしたラットを麻酔し、椎弓固定器による固定後に第10・11胸椎の椎弓切除を実施し、軟膜下腔に脂肪幹細胞を安定的に移植する技術を確認した(図4)。

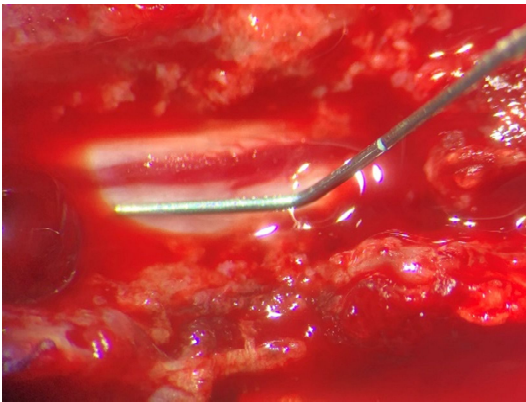


図4 脊髄軟膜下への脂肪幹細胞移植

脊髄虚血後痙攣性麻痺ラットモデルの作成と脊髄軟膜下への脂肪幹細胞移植を安定的に実施できる技術を確認した後、比較対照実験を実施した。すなわち合計で12体の脊髄虚血後痙攣性麻痺ラットモデルを作成し、6体には脂肪幹細胞(1.1~1.4x10⁷cells/mlx10 μ l)を脊髄軟膜下移植し、対象群の6体には生理食塩水を脊髄軟膜下投与して比較した。

結果として脊髄軟膜下移植後2週間の時点で脂肪幹細胞投与群は対照群に比べて有意にBBB scoreが改善した(図5)。

Result

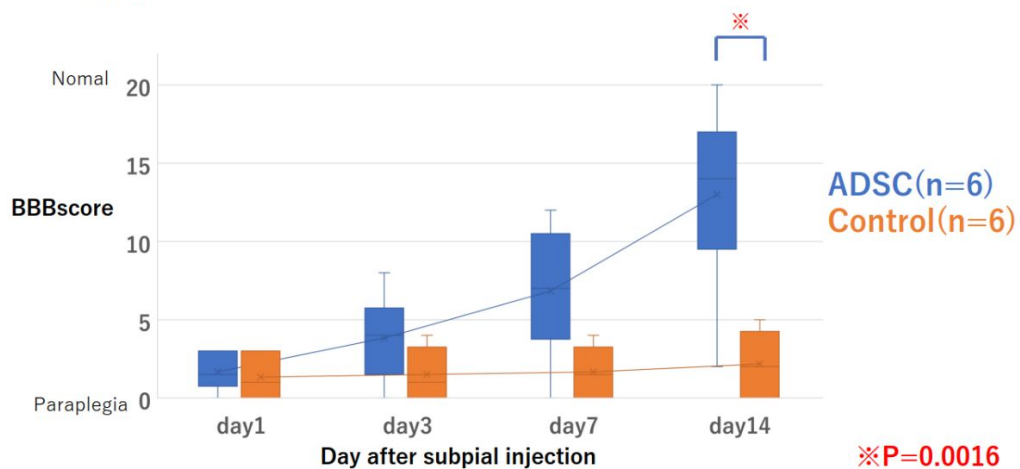


図5 脊髄軟膜下移植後の BBB score
ADSC; 脂肪幹細胞移植群
Control ; 生理食塩水投与群

以上の結果から、脂肪幹細胞の脊髄軟膜下移植により脊髄虚血障害を回復させる可能性があることが示唆された。今後はさらなる追実験を実施し、再現性を確認していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高原英作、神里興太、垣花学、角南寛、喜瀬勇也、古川浩二郎、清水雄介
2. 発表標題 脊髄病変に対する幹細胞の新しい投与経路 ラット脊髄虚血モデルに対する脂肪幹細胞の脊髄軟膜下投与
3. 学会等名 第21回 日本心臓血管外科再生治療研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高原英作、神里興太、垣花学、角南寛、喜瀬勇也、古川浩二郎、清水雄介
2. 発表標題 ラット大動脈遮断脊髄虚血モデルに対する脂肪組織由来幹細胞移植の試み
3. 学会等名 第53回 日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2023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	神里 興太 (Kamizato Kota) (10554454)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	
研究分担者	角南 寛 (Sunami Hiroshi) (50374723)	琉球大学・医学部・特命准教授 (18001)	

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
---------	---------