

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18447

研究課題名（和文）羊膜由来幹細胞を用いた脊髄損傷治療の検討

研究課題名（英文）Amnion derived mesenchymal stem cell therapy for spinal cord injury

研究代表者

陰山 博人（Kageyama, Hiroto）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60461068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：マウス脊髄損傷モデルを作成し、3日後に羊膜由来間葉系幹細胞を投与した後、運動障害ならび感覚障害の程度を経時的に観察した。慢性期には歩行解析を行い、歩行能力を比較した。運動機能では大きな差は認めなかったが、感覚機能は細胞投与により、改善を認めた。歩行解析では、細胞を投与することで歩行速度は増し・歩数も増え・趾の位置が高いことが示され、歩行機能が改善していることが示された。PCRの検討では細胞投与することで脊髄損傷部位の炎症蛋白の抑制と神経保護因子の増加を示唆された。将来の脊髄損傷の治療につながる知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷への治療は自己骨髄由来間葉系幹細胞であるステミラック注が条件付き承認されたが、これは慢性期治療となる。我々は急性期に抗炎症を目的した他家移植を念頭においた研究を継続しており、より早い時期に投与できる。このことは従来の治療以外の選択肢となりうる社会的意義・ニーズの高い研究であった。その機序として、神経保護因子の増加や炎症抑制が確認されたことは学術的に興味深い結果であった。

研究成果の概要（英文）：A mouse spinal cord injury model was created, and after 3 days of administration of amnion-derived mesenchymal stem cells, the degree of motor and sensory impairment was observed over time. In the chronic phase, gait analysis was performed and walking ability was compared. No significant difference was observed in motor function, but sensory function was improved by cell administration. The gait analysis showed that the patients walked faster, took more steps, and had higher toe position after cell administration, indicating that motor function improved. The findings are relevant to the treatment of future spinal cord injuries.

研究分野：脊椎・脊髄疾患の治療

キーワード：脊髄損傷 間葉系幹細胞 羊膜由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は外傷により、脊髄にダメージを受けることにより、強い運動麻痺や感覚障害を引き起こし、回復が困難な疾患である。交通事故など若年でも受傷する可能性があり、その後遺症は社会生活を営む上で大きな障壁となりうる。脊髄損傷の機能改善治療の新規開発は、長年切望された続けたアンメット・メディカル・ニーズである。

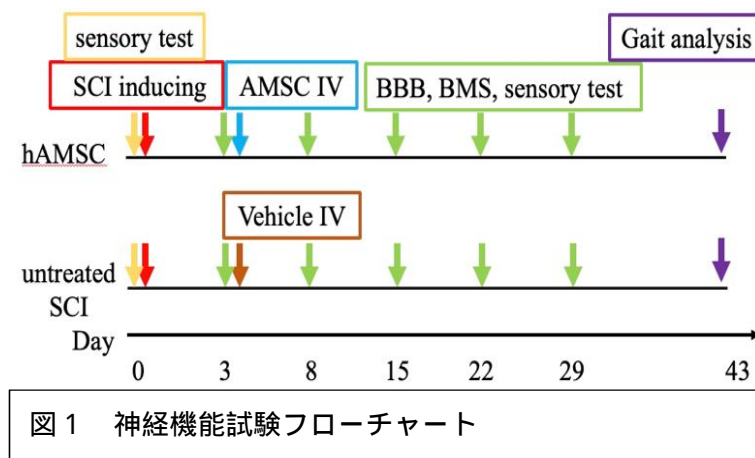
我々は間葉系幹細胞 (MSC) を用いた脊髄損傷後の後遺症治療の臨床応用を目指している。骨髄由来 MSC を用いた脊髄損傷に対する治療は条件付き認可の「ステミラック注」が存在するが自己骨髄からの採取が必要であり、費用的にも大きな問題となる。我々は以前から MSC を用いた脳梗塞や脳出血の治療を研究している。これを急性期脊髄損傷に応用できるのではと考え研究を開始した。最近ヒト羊膜由来 MSC (hAMSC) を用いている。羊膜は MSC を豊富に含有し、採取にかかる侵襲が無いことから MSC の有望な細胞源である。マウスの脊髄損傷モデルに羊膜由来 MSC の静脈投与の効果を実験解析中である歩行機能の改善ならび感覚障害の改善を認めている。本研究では脊髄損傷後の神経機能改善効果のメカニズムについて免疫反応を中心に解析した。

2. 研究の目的

現在有効な急性期治療法がない脊髄損傷に対する細胞治療の開発を目的とした基礎研究であり、hAMSC を用いたマウス脊髄損傷モデルに対する神経機能改善を確認し、その作用機序を免疫学的側面から明らかにすることである。この研究成果を基礎資料とし、次の臨床応用へと進む予定である。

3. 研究の方法

脊髄損傷モデルは C57BL/6 7-9 週齢のオスを全身麻酔下に TH10 周囲の椎弓切除をした後、0.2mm のギャップ (間隔) を設けた Forceps で 30 秒圧迫することで作成した。脊髄損傷作成し 3 日後に 10^5 個の hAMSC のまたは溶媒のみを静脈内投与したのち、投与後 4 週までは BBB scale と BMS score による運動機能評価、Tactile test による感覚機能評価を経時的に行った。4 週以降で



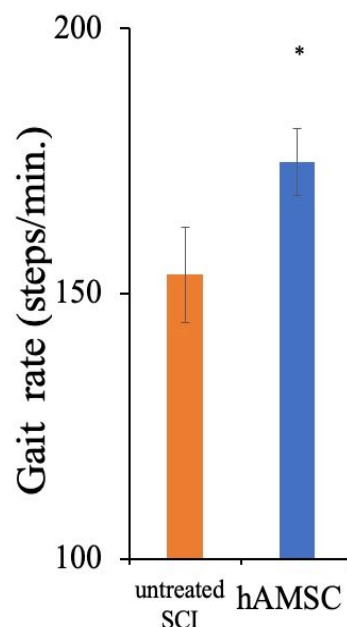
KinemaTracer for Animal (キッセイコムテック株式会社、日本) を用いた詳細な歩行解析を行い、各群の差を検討した。機序解析として、脊髄損傷部のウエスタンブロット、PCR で蛋白や mRNA の発現の違いを検討した。

4. 研究成果

(1) 脊髄損傷後の後遺症に対する羊膜由来 MSC 投与による神経機能改善の評価

BBB scale と BMS score では大きな差はなく、両群とも経時的に改善を認めた。感覚試験では 3 - 4 週間後で逃避反応を起こす力は hAMSC 投与群で有意に減少しており、感覚障害の改善を認めた。歩行解析では複数のパラメータで hAMSC を投与することで改善を認めた (図 2 : 歩数の比較。hAMSC 群で増加を認めた)。

我々のモデルでは完全下肢麻痺が継続するモデルでなく、経時的に改善を認める非重症モデルである。このため従来の研究で用いられている BBB scale や BMS score では差が出にくいと考えられた。しかし、感覚障害の改善ならび慢性期の歩行解析で改善を認めており、hAMSC に脊髄損傷後の神経機能を改善する作用を有している。また、我々が開発した先端にギャップを設けた Forceps を用いた脊髄モデルは非重症のケースを観察するには適していると考えられた。



(2) 脊髄損傷後の後遺症における羊膜由来 MSC 投与による作用機序

脊髄損傷部位には損傷関連蛋白が増加していることをウエスタンブロットで確認済みである(図3)。脊髄損傷後に hAMSC 投与または溶媒投与した3日後にサンプルを最終し様々な炎症蛋白や神経栄養因子を従来のウエスタンブロット法で何度か調べたが、差を認めなかった。このため、mRNA を抽出して、PCR で調べると TNF など炎症蛋白は hAMSC で抑制は確認できている。おそらく、脊髄は小さく、取れる蛋白がすくないため、従来のウエスタンブロットでは差がでないと考えられた。今後、より感度の高い全自動ウエスタンブロット機器を導入が予定されているため、これで再検討を計画している。

研究期間終了に、経時的な蛋白解析と mRNA 解析を行い、炎症と神経保護への hAMSC の効果を検討した後、論文を完成させ、英文誌に投稿予定である。

図2 歩行解析結果

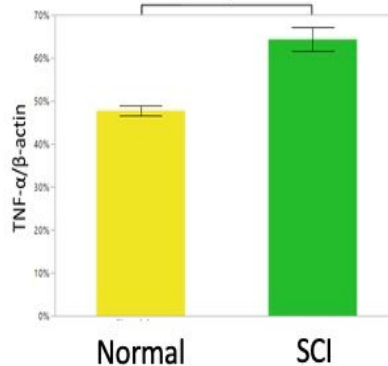


図3 TNF 発現

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
研究協力者	藏本 要二 (Kuramoto Yoji) (10604275)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

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