

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591736

研究課題名（和文） 脊髄損傷における bFGF 徐放ゼラチンゲルと骨髄間質細胞由来シュワン細胞移植の効果

研究課題名（英文） Effects of bFGF-incorporated gelatin hydrogel and bone marrow-derived Schwann cell transplantation after spinal cord contusion injury in rats

研究代表者

大河 昭彦 (Okawa Akihiko)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30312945

研究成果の概要（和文）：ラット脊髄損傷モデルに対して、1 週後損傷脊髄に bFGF-gelatin hydrogel を注射し 9 週間下肢行動学的評価を BBB スコアにて行った。また 5, 7, 9 週時点でアロジニアの試験を行った。BBB スコアは bFGF-gelatin hydrogel グループで良好な回復であったが有意差は得られなかった。7 週時点で bFGF-gelatin hydrogel グループで有意にアロジニアが低下していた。当研究から bFGF-gelatin hydrogel の脊髄注入により脊髄損傷後のアロジニアを有意に低下させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of a sustained-release system of bFGF from gelatin hydrogel in a rat spinal cord contusion model.

One week after spinal cord contusion, gelatin hydrogel (GH) containing bFGF (20µg) was injected into the lesion epicenter of rats. Locomotor recovery was assessed over nine weeks by BBB testing. Sensory abnormalities in the hind paws of all the rats were evaluated at five, seven, and nine weeks.

Although BBB scores were better in the bFGF-GH and GH groups than in the saline group, the differences did not reach statistical significance. The bFGF-GH group showed significantly less sensory abnormalities than the saline group at seven weeks.

Our study findings suggest that bFGF-incorporated gelatin hydrogel could have therapeutic potential for alleviating mechanical allodynia following spinal cord injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：spinal cord injury; gelatin hydrogel; bFGF; allodynia; BBB score; BDA

1. 研究開始当初の背景

【背景・目的】これまでのラット脊髄損傷に対して骨髄間質細胞、骨髄間質細胞由来シュワン細胞移植を行ってきた。これらの移植実験によってある一定の回復はみられるもの

の、下肢運動機能評価（BBBスコア）にて荷重歩行ができるかできないかのレベルまで回復することは困難であった。最終評価時の組織学的検討においても、残存細胞はごくわずかであり、特に骨髄間質細胞移植の際

は、細胞がごくわずか損傷中心に束になって残存していた。これらより、移植細胞が生き残り、移動するためには、細胞の足場（スカフォールド）が必要と考えるにいたった。

basic fibroblast growth factor (bFGF) 徐放ゼラチンハイドロゲルは血管新生作用と細胞増殖作用を有するbFGFを徐放することができ、毛髪再生、臓器再生に有用であるといわれている。特に心筋の再生、血管の再生は臨床治療にも用いられており、ラット脊髄損傷に有効であることが確認されれば、生体親和性のあるマテリアルであるため脊髄損傷の手術や、脊髄の髄内腫瘍の手術時など臨床面での利用を早急に検討することができると考えた。

2. 研究の目的

今回われわれはラット損傷脊髄モデルに対するbFGFの徐放ゼラチンハイドロゲルの効果をbFGFを含まないゼラチンハイドロゲルのみと、生食のみのコントロール群と比較検討し、細胞移植のスカフォールドになりえるかどうか検討した。当研究でスカフォールドの役目だけでなく、栄養因子を徐放することにより神経保護作用、軸索伸展作用があることがわかれば、骨髄由来神経幹細胞を移植細胞として、移植することも考えている。

3. 研究の方法

雌性SDラット（8週齢）の第9-10胸椎を椎弓切除後、IH Impactor (200Kdyn) を用いて脊髄圧挫モデルを作成した。損傷から1週後、損傷中心部に、bFGFを20 μ g含んだゼラチンハイドロゲル0.4mgを顕微鏡下に注入した。対照としてbFGFを含まないゼラチンハイドロゲル単独群および生食投与群を作成した。下肢運動機能をBBBスコアにて9週間測定、9週時点でロータロッド、Inclined plane testを行った。知覚機能を熱刺激と圧刺激テストに分けて損傷から5,7,9週目に測定した。9週時点で両皮質脊髄路のトレーシングを行い、損傷11週後に灌流固定を行った。組織学的検討においては皮質脊髄路のBDAトレーシングを比較検討、損傷部位の大きさとして空洞面積の大きさを比較した。感覚神経のマーカーとしてCGRPの染色を行い両群間で比較した。

4. 研究成果

【結果】行動学的評価では生食コントロール群に比べてbFGFゼラチンハイドロゲル群およびゼラチンハイドロゲル単独治療群で改善傾向を認めるも統計学的な有意差は得られなかった(Fig.1)。Inclined plane test, ロータロッドにおいて各群間に有意差は得られなかった。損傷後7週時点においてbFGF徐放投与群は

生食コントロール群と比し疼痛刺激に対して知覚過敏状態の改善を認めた(Fig.2)。

5, 7, 9週時点で熱刺激テストに対して3群間の有意差は得られなかった(Fig.3)。

皮質脊髄路のBDAによるトレーシングの結果の定量において、bFGF徐放ゼラチンハイドロゲル群でBDA陽性線維数が多かったが、各群間に有意差は得られなかった(Fig.4)。

空洞面積とCGRPの染色において有意差は得られなかった。

【考察・結論】今回の研究では、bFGF徐放ゼラチンハイドロゲルとゼラチンハイドロゲル単独群との下肢運動機能の回復はほぼ同程度であった。生食群とはBBBスコアで2点ほど高得点が得られた。特に生食群では後肢の荷重歩行が不能であったのに対して、ゼラチンハイドロゲル注入群においては可能になった個体が多かった。

また7週時点で圧刺激に対する閾値の低下が有意に抑えられていることから、bFGF徐放投与は脊髄損傷に対する有用な治療法の1つになりうる可能性が示唆された。また有意差こそなかったが、BDA陽性線維が多かったことからbFGFゼラチンハイドロゲルは徐放キャリアとしてだけでなく細胞のスカフォールドとしての効果も期待できると考えた。

現在われわれはこのbFGF徐放に加え、細胞移植を併用した研究を行っている。特に細胞を骨髄由来の神経幹細胞を移植することにより、bFGF徐放スカフォードとの効果により、オリゴデンドロサイトに分化した、再髄鞘化が起こるかどうか検討していく予定である。

Fig.1

BBBスコアにおいてbFGF徐放ゼラチンハイドロゲルとゼラチンハイドロゲル単独群において生食注入群に比し良好な改善がみられたが、有意差は得られなかった。

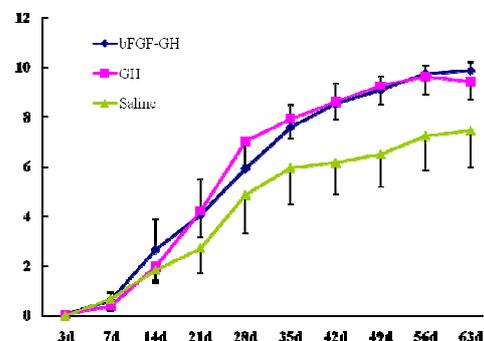


Fig.2

圧刺激テストにおいてbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル群においては下肢の閾値の低下が7週時点で有意に軽かった。5, 7, 9週時点では生食群に比し、bFGF徐放ゼラチンハイドロゲル群、ゼラチンハイドロゲル群とも閾値の低下は軽度である傾向があった。

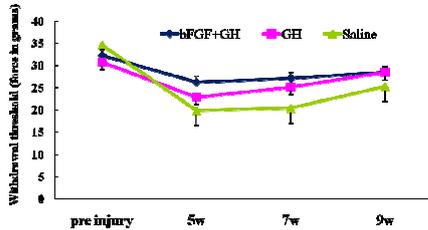


Fig.3
熱刺激テストにおいて5, 7, 9週時点で3群間に有意差は得られなかった。

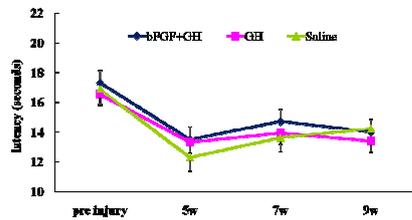
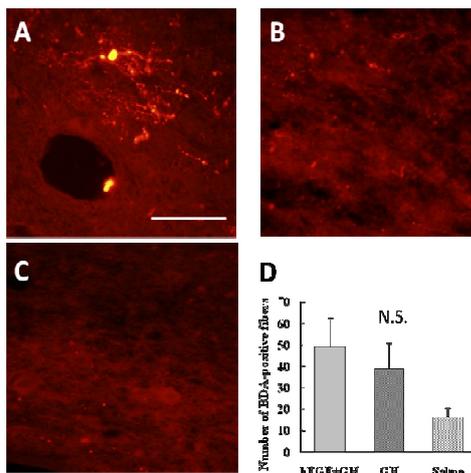


Fig. 4
9週時点で両側大脳皮質にBDAトレーサーを注入し、11週後還流固定を行った。AはbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル群、Bはゼラチンハイドロゲル単独群、Cは生食注入群である。DのグラフのようにbFGF徐放ゼラチンハイドロゲル群で線維数が多かったが有意差は得られなかった。



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)

① Hayashi K., Hashimoto M., Koda M., Naito A., Murata A., Okawa A., Takahashi K., Yamazaki Y. Transplantation of murine induced pluripotent stem (iPS) cell-derived astrocytes increases sensitivity to mechanical stimulus in a rat spinal cord injury model
J Neurosurgery Spine in press 査読有り

② Kamada T., Okawa A., Yamazaki M. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived Schwann cells reduces cystic cavity and promotes functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord.
Neuropathology 31:48-58, 2011 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

① EFFECTS OF BFGF INCORPORATED GELATIN HYDROGEL AND BONE MARROW STROMAL CELL-DERIVED NEURAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION IN A RAT SPINAL CORD CONTUSION MODEL

Hashimoto M., Furuya T., Koda M., Murata A., Okawa A., Yamazaki M., Dezawa M., Matsuse D., Tabata Y., Takahashi K.
Neurotrauma Sep. 7-11, 2009
Santa Barbara, California

② ラット脊髄圧挫損傷モデルにおける bFGF 徐放ゼラチンハイドロゲル移植の検討
古矢丈雄 橋本将行 国府田正雄 村田淳 大河昭彦 山崎正志 出澤真理 松瀬大田畑泰彦 高橋和久
日本整形外科学会基礎学術集会 2008, 10, 23 京都

③ Effects of bFGF incorporated gelatin hydrogel transplantation in a rat spinal cord contusion
Furuya T., Hashimoto M., Koda M., Murata A., Okawa A., Yamazaki M., Dezawa M., Matsuse D., Tabata Y., Takahashi K.
JULY 27 - 30, 2008
Orlando, FL

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河 昭彦 (Okawa Akihiko)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30312945

(2) 研究分担者

山崎 正志 (Yamazaki Masashi)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：50281712

村田 淳 (Murata Atsushi)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20344997