

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H03793  
研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する骨髄幹細胞治療でダイナミックに再構築された神経回路の機能解析  
  
研究課題名(英文) MSC therapy for spinal cord injury  
  
研究代表者  
佐々木 祐典 (Sasaki, Masanori)  
  
札幌医科大学・医学部・准教授  
  
研究者番号：20538136  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は脊髄損傷動物モデルに対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈的投与による機能回復のメカニズムとして、“損傷局所”における神経保護作用、血液脊髄関門の安定化、損傷軸索の sproutingや、損傷軸索の再生、再有髄化、シナプス新生等が多段階的に作用することを明らかにしてきた。本研究では、順行性神経軸索トレーサーによる神経解剖学的トレーシング法などを駆使して、病変部の上方から下方に向かって走る個々の軸索の分布を可視化した結果、深部後索と lateral funiculusを走行する皮質脊髄路の軸索が、病巣の中心から吻側と尾側の両方で増加し、機能回復に寄与する可能性があることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
脊髄損傷に対する細胞移植療法の研究は、これまでに長い歴史があり、特に損傷局所における再生のメカニズムに関する報告は多い。しかし、MSCによる治療効果発現のメカニズムとして、損傷局所周囲における神経回路のダイナミックな再構築、という点に注目した研究はなかった。従って、本研究で明らかにした軸索ネットワークの増加は、MSC治療による、これまでに示されていなかった新たな治療メカニズムと考えられ、脊髄損傷に限らず、他の神経疾患に対しても惹起されることが期待できるため、本研究の学術的意義は高く、社会的な波及効果も期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of MSCs in spinal cord injury promotes functional recovery through a multistep process. This includes neuroprotection, blood-spinal cord barrier stabilization, axon sprouting and regeneration, remyelination, and synaptogenesis. We aimed to investigate neuronal circuit reconstruction after MSC treatment using axonal tracers. By visualizing axon distribution, we observed increased communication between corticospinal tract and lateral funiculus axons both above and below the injury site. This enhanced axonal network may contribute to functional recovery by providing significant input below the injury.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷 (SCI) 後には、限定的ではあるが運動機能の自然回復が観察される。この機能改善は徐々に起こり、SCI 後、数ヶ月から、さらには数年にわたって示されることがある。この内因性の機能回復を誘発する基本的なメカニズムはまだ明らかではなく、現在の知見では、損傷を免れて温存された軸索における複数の形態の軸索成長が、回路の再編成や、自然回復に寄与する可能性のある迂回経路または中継経路をもたらすことが明らかになっている。この仮説は、主に、すべての哺乳類において主要な下行運動経路である皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) の研究から導かれたものである。CST には複数の pathway があり、背側 CST (dorsal CST) は大脳皮質から脊髄への主要な投射で、下行 CST 軸索の約 90% から 95% を含むことがわかっている。ラットでは、dCST 軸索は延髄において錐体交差を横切り、脊髄の背側舟状体深部に下降する。他の 2 つの minor な pathway は、腹側 CST (ventral CST: vCST) と背外側皮質脊髄路 (dorsolateral CST: dlCST) である。vCST は錐体部では交差せず、腹側索状体 (Ventral funiculus) の腹内側で同側へ下降する。しかし、vCST 軸索は脊髄の神経支配のレベルで局所的に交差することができる。dlCST は Lateral Funiculus (LF) の背側を走行し、交叉する。これらによく知られた CST の minor pathway は、内因性の機能回復に重要な役割を果たすと考えられている。

我々は、これまで骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) の経静脈的投与が、脊髄損傷モデルに対して治療効果を有することを報告してきた (Sasaki et al., 2001, 2004, 2006, 2007, 2009, 2011; Lankford and Sasaki et al., 2008, Osaka et al., 2010)。治療効果を発揮するメカニズムとして、MSC の産生する神経栄養因子による神経栄養・保護作用、損傷軸索の再生、損傷ミエリンの修復、免疫調節作用、ペリサイトを含む血液脊髄関門 (blood spinal cord barrier: BSCB) の安定化と修復、血管新生作用などが協奏的に作用することを明らかにしてきた (Sasaki et al., 2007, 2009, 2011; Matsushita et al., 2015; Morita et al., 2016)。また、脊髄損傷ラットモデルに MSC 治療を行うと、損傷局所だけではなく、大脳皮質運動野の複数の遺伝子の発現に変化を認め、これらの多くが神経再生、plasticity の賦活化に関与する可能性があることを明らかにした (Oshigiri et al., 2019)。

しかし、脊髄損傷に対する MSC の経静脈的投与後に生じる詳細な CST の形態的变化に関する検討はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

これらの背景から本研究においては、脊髄損傷に対する MSC の経静脈的投与によって著しい運動機能の持続的な改善を得る原因として、損傷局所周囲における神経回路の再構築が生じるかどうかを CST に着目して検討することとした。

## 3. 研究の方法

本研究では、SCI モデルラットに MSC を静脈内投与した後、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用

いた神経解剖学的手法により、脊髄における CST の分布パターンの違いを検討した。実験的脊髄損傷は、SD ラットに対して、IH インパクト (IH-0400, Precision Systems and Instrumentation) を用いて作製した。SCI 作製 1 日後に BBB スコアが 0 点を表示したラットのみを本研究に組み入れた。BBB スコアが 0 点を示した SCI ラットを無作為に抽出し、SCI 作製の 1 日後に大腿静脈から 1.0mL の fresh DMEM ( $n = 10$ ) または  $1.0 \times 10^6$  細胞の MSCs (1.0mL の fresh DMEM に懸濁) を静脈内投与した ( $n = 10$ )。年齢をマッチさせたラットを対照群として使用した ( $n = 10$ )。すべてのラットにシクロスポリン A (10 mg/kg、IP) を毎日注射した。SCI 誘導後 14 日目に、AAV ウイルスを局所注入した。SCI 作製から 8 週間後に組織学的解析を行った。

#### (1) 行動学的評価：

経時的に Basso Beattie. Bresnahan (BBB) スコアを用いて行った。

#### (2) 神経解剖学的軸索追跡法：

-アクチン (CAG) プロモーターを有する緑色蛍光タンパク質 (GFP) -エンコード AAV および CAG プロモーターを有する tdTomato-エンコード AAV (AAV-8-CAG-GFP / tdTomato) を Vector Biolabs (Malvern, PA) から使用した。SCI 作製後 14 日目に、ケタミン (75mg/kg) およびキシラジン (10mg/kg) の麻酔下で、ラットを定位フレームに配置した。SCI 後 14 日目に開頭し、感覚運動野を露出させた。GFP をエンコードした AAV は右半球に注入した。tdTomato をエンコードした AAV は左半球に注入した。グループあたり 5 匹のラット (対照群の 5 匹、vehicle 群 15 匹、MSC 群 15 匹) に、AAV-8-CAG-GFP/tdTomato の両方を注入した。各半球について、皮質に対する 6 回の注射 (AAV ;  $4.0 \times 10^{10}$  ゲノムコピー/ $\mu$ L、1 部位あたり 0.5  $\mu$ L) を以下の座標で実施した：ナノリットル-インジェクター (World Precision Instrument Inc., Sarasota, FL) を用いて、プレグマの外側 1.0 mm、深さ 1.5 mm、および -1.0 mm、0 mm、1.0 mm 後方で行った。この研究で用いた方法により、脳の局在領域にウイルスベクターを正確にマイクロデリバリーすることができた。針は次の部位に移動する前に 3 分間その場に留めた。

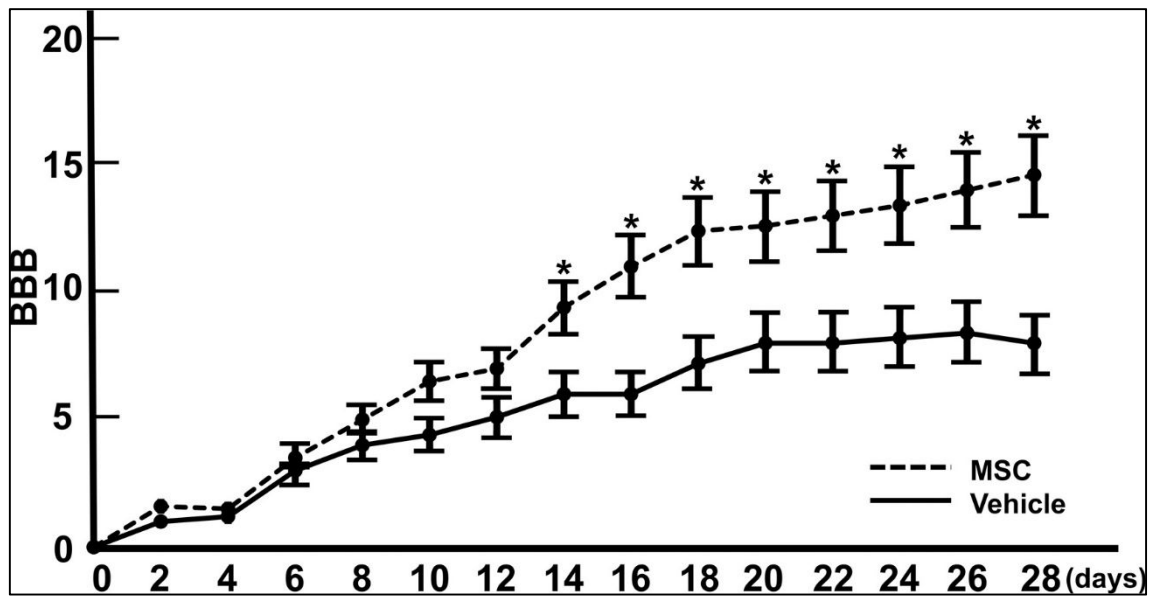
#### (3) 組織学的解析

軸索トレーサー注入の 6 週間後、ラットを、ケタミン (75mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) による深麻酔下で、リン酸緩衝食塩水 (PBS) と 4% パラホルムアルデヒドで経心臓的に灌流した。脊髄を採取し、凍結切片を作製した。これらの切片を 0.1% Tween20 を含む PBS (PBS-T) 中で 3 回洗浄した。切片を共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM780 ELYRA S.1) を用いて観察した。GFP または tdTomato シグナルの強度は、ImageJ ソフトウェアを使用して定量化した。

## 4 . 研究成果

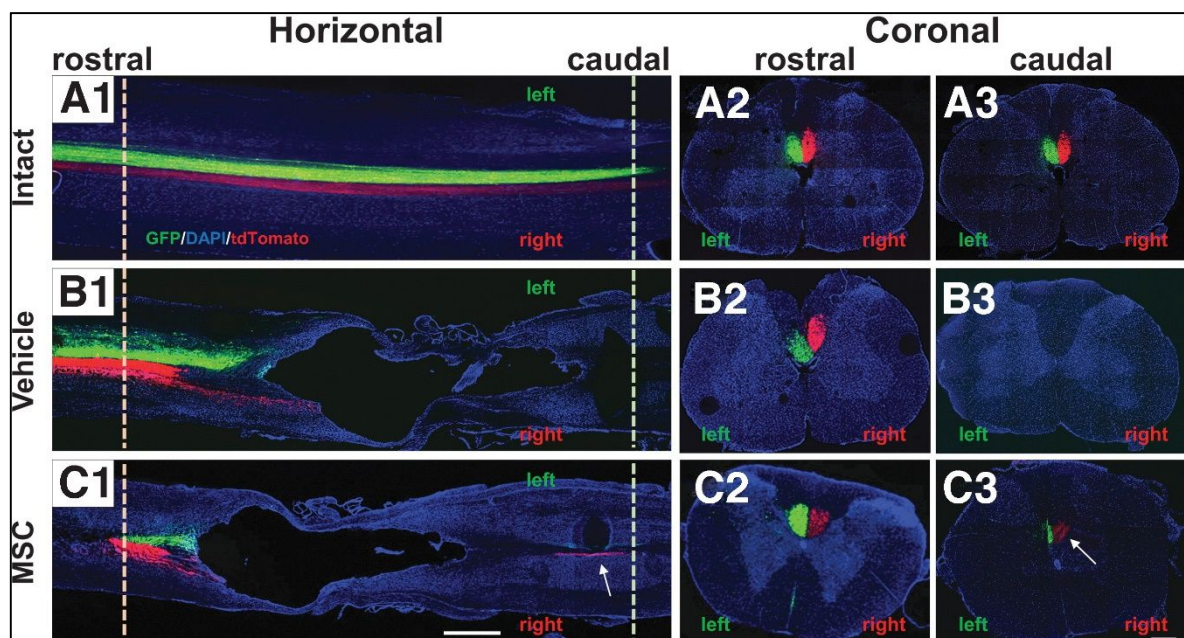
#### (1) 行動学的評価：

脊髄損傷に対する MSC 治療後の運動機能は MSC 治療群で有意に改善を認め、投与後 14 週目から統計学  
有意差を呈した (Hirota et al., 2021)。



(2) 神経解剖学的軸索追跡法：

脊髄の CST 軸索を可視化するために、AAV-8-CAG-GFP ウイルスを右皮質に、AAV-8-CAG-tdTomato を左皮質に局所注入した。6 週間後、intact 群のラット脊髄から得た水平凍結切片では、dCST (左 ; GFP、右 ; tdTomato) の両側 CST 軸索がしっかりと標識されていた (A1)。intact の脊髄の冠状切片 (T9-10) でも、脊髄後索の基部に位置する明確な dCST 軸索が観察されている。Vehicle 群では、損傷後 8 週間までに、主 CST のほぼすべての線維が損傷部位の遠位で失われ、病巣中心部にかなりの空洞が形成された (B1)。病巣中心部の吻側では、intact 群と同様に脊髄後索基部に明瞭に dCST 軸索が認められた



が (B2)、病巣の尾側には dCST 軸索が認められなかった (B3)。一方、intact の脊髄よりも数は少ないものの、MSC 群では、病変中心部から尾側に明確な dCST 軸索が観察された (C1、C3、矢印)。これらの CST 軸索は、dCST の位置とほぼ同じように脊髄後索基部に収束しており、MSC を投与したラットにのみ観察された。(スケールバー = 1mm (A1、B1、C1)、300  $\mu$ m (A2、A3、B2、B3、C2、C3)) (Hirota et al., 2021)

以上より、本研究では、脊髄損傷に対する MSC の経静脈的投与後に、脊髄損傷部局所の神経回路の再構築が惹起されていることを神経軸索トレーサーなどを駆使して明らかにした。脊髄損傷に対する細胞移植療法の研究はこれまでに長い歴史があり、特に損傷局所における再生のメカニズムに関する報告は多い。しかし、MSC による治療効果発現のメカニズムとして、損傷局所周囲における神経回路のダイナミックな再構築という点に注目した研究はなかった。従って、本研究で明らかにした軸索ネットワークの増強は、MSC 治療による、これまでに示されていなかった新たな治療メカニズムと考えられ、脊髄損傷に限らず、他の神経疾患に対しても生じることが期待できるため、本研究の学術的意義は高く、社会的な波及効果も期待できると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirota Ryosuke, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Oshigiri Tsutomu, Kurihara Kota, Fukushi Ryunosuke, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Yoshimoto Mitsunori, Kocsis Jeffery D., Yamashita Toshihiko, Honmou Osamu	4. 巻 39
2. 論文標題 Enhanced Network in Corticospinal Tracts after Infused Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1665 ~ 1677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2022.0106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木祐典
2. 発表標題 神経疾患に対する骨髄間葉系幹細胞による治療
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科コンgres総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木祐典
2. 発表標題 神経疾患に対する骨髄間葉系幹細胞による治療メカニズム
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会 第41回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木祐典
2. 発表標題 脊髄損傷などの神経疾患に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による治療メカニズム
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木祐典
2. 発表標題 神経疾患に対する再生治療
3. 学会等名 第20回日本組織移植学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井 一、齊藤延人、若林俊彦	4. 発行年 2022年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 440
3. 書名 最新主要文献でみる 脳神経外科学レビュー 2023-' 24	

〔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	廣田 亮介 (Hirota Ryosuke) (10815434)	札幌医科大学・医学部・助教  (20101)	
研究分担者	栗原 康太 (Kota Kurihara) (20855803)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	小原 尚 (Hisashi Obara) (20919732)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	横山 貴裕 (Takahiro Yokoyama)  (60896116)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	押切 勉 (Tsutomu Oshigiri)  (70754612)	札幌医科大学・医学部・訪問研究員  (20101)	
研究分担者	岡 真一 (Shinichi Oka)  (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・講師  (20101)	
研究分担者	佐々木 優子 (Yuko Kataoka-Sasaki)  (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教  (20101)	
研究分担者	寺島 嘉紀 (Yoshinori Terashima)  (20438005)	札幌医科大学・医学部・講師  (20101)	削除：2021年10月14日
研究分担者	本望 修 (Osamu Honmou)  (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授  (20101)	削除：2021年10月14日

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



米国	Yale University			
----	-----------------	--	--	--