

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16501

研究課題名（和文）脊髄離断モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞シート移植における移植時期の検討

研究課題名（英文）Examination of the timing about transplantation of bone marrow stromal cell sheets in transected spinal cord injury in rats.

研究代表者

増田 佳亮（Keisuke, Masuda）

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60790376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルス感染拡大の影響により実験の進行に大幅な遅れを認めた。予備実験の内容としては、脊髄離断モデルラットに対する急性期の骨髄間葉系細胞（BMSC）シートの移植による軸索再生、グリア瘢痕形成を評価した。過去の報告と同様にCD11b陽性マクロファージが脊髄断端に集簇し、GFAP陽性アストロサイトがマクロファージを取り囲んでいた。圧迫型の脊髄損傷と同様に離断型の脊髄損傷でも急性期の炎症、抗炎症反応が起こっていたと考えられる。BMSCシート移植群においてCD206陽性のM2マクロファージが断端部に早期に集簇しており、BMSCシートが急性期の抗炎症反応を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻痺を抱えて生活する重症脊髄損傷患者に対して現在治療法がない。現在国内外で行われている研究は基礎、臨床共に軽度から中等度の脊髄損傷に対する治療が主体であり、重症脊髄損傷に対する研究は少ない。本研究で行う新規再生医療の開発は麻痺改善や社会復帰を可能とし、中枢神経再生領域の治療法を飛躍的に進歩させる研究である。そのため、医学に与えるインパクトは極めて大きいものと確信する。

研究成果の概要（英文）：Due to the impact of the pandemic of COVID-19, my experiment was significantly delayed.

In the preliminary experiment, axonal regeneration and glial scar formation were evaluated by transplanting bone marrow stromal cell (BMSC) sheets into rats with a spinal cord transection model in the acute phase.

As in previous reports, CD11b-positive macrophages accumulated at the spinal cord stump, and GFAP-positive astrocytes surrounded the macrophages. It is thought that inflammatory and anti-inflammatory responses occurred in acute phase of transection-type spinal cord injury, as in compression-type spinal cord injury. In the BMSC sheet transplant group, CD206-positive M2 macrophages accumulated at the stump early on, suggesting that the BMSC sheet may promote an acute anti-inflammatory response.

研究分野：病態神経科学関連

キーワード：脊髄再生 脊髄離断モデル 骨髄間葉系幹細胞 シート

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- 成体哺乳類の損傷した中枢神経再生は不可能である (Cajal 1898) と言われてきた。近年、科学技術の進歩に伴い、iPS細胞、胚性幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞などを用いた細胞移植による中枢神経再生の報告が多くされている。しかし、iPS細胞では造腫瘍性、胚性幹細胞では倫理的問題、神経幹細胞では採取部位損傷などの問題点を抱えている。一方、間葉系幹細胞は骨髄、脂肪、血液などから採取できる易採取性という利点がある。
- 骨髄間葉系幹細胞を用いた中等度以下の脊髄損傷の治療法は、期限付きではあるものの保険適応の段階まで進展している。一方で、重度脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞移植は、**基礎実験で歩行能の獲得に至らず、臨床で治療法がない**。重症脊髄損傷の一形態である**脊髄離断**では脊髄の欠損部が生じてしまい、それを補填する**scaffold (足場) が必要**となる。どの人工材料をどのような形でどの細胞を搭載して移植するか、またその有用性が多く報告されている。(Takahito K, 2005、Bao-Ling Du, 2011、Carla Christina Medalha 2014、Bi-Qui Lai 2014)。

- 当教室では、骨髄から**骨髄間葉系間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC)**を採取培養し、骨芽細胞へ分化誘導をかけてシート状に採取する、『**骨形成細胞シート**』の移植法を報告してきた (Akahane M et al. JTERM 2008) (図1)。BMSCのシート化にも成功しており、**神経栄養因子 (BDNF)** や**血管新生促進因子 (VEGF)** を多量に発現していること、更に**軸索伸長を促進するラミニン**を細胞外基質として産生していることが分かっている。



図1 BMSC シート

- BMSCは、移植後2週まで移植部位に留まり残存脊髄の空洞化 (脊髄損傷の2次損傷) を防止する働き (抗炎症性) を示すことが報告されている (Wu S, 2003、Dasari VR, 2007、Isele NB, 2007、Abrams MB 2009)。我々が作成しているBMSCシートは、従来のBMSCの作用に加えて脊髄の欠損部を補填するscaffoldの役割も果たすため、軸索再生の点においてさらに有用である。当教室では、2mmの欠損を伴う**脊髄離断モデル (図2)**へのBMSCシート移植を行い、**軸索再生・講師運動機能の改善を認めた**ことを報告した (Okuda A, 2017)。

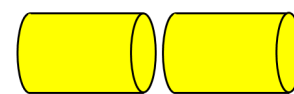


図2 硬膜の欠損を伴う脊髄離断された脊髄

重症脊髄損傷の治療には、

**脊髄欠損部を補填する BMSC シート、 M2 マクロファージの損傷部への遊走と、それに伴う抗炎症作用、**の必要性が見出される。

そこで我々は、脊髄離断モデルに対して適切な時期に BMSC シートを移植することで、より大きな神経再生・運動機能改善が得られる、との仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、**重症脊髄損傷モデル動物への BMSC シート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価、重症脊髄損傷モデル動物への BMSC シートの最適な移植時期の検討、細胞シート移植による抗炎症作用のメカニズムの解明、細胞シート由来の細胞の移植後動態の解明、**

を目的とする。

【研究期間内に何をどこまで明らかにするのか】

**重症脊髄損傷モデル動物へのBMSCシート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価**

脊髄離断モデルに対して、脊髄損傷直後の急性期の時点でBMSCシートを損傷部に移植し、亜急性期における軸索再生・グリア瘢痕形成・マクロファージの動態を評価することでBMSCシートの作用を解明する。

**重症脊髄損傷モデル動物へのBMSCシートの最適な移植時期の検討**

脊髄離断モデルに対して、脊髄損傷後数日経過した亜急性期の時点でBMSCシートを損傷部に移植することで、BMSCシートの最適な移植時期を決定する。

**細胞シート移植による抗炎症作用のメカニズムの解明**

リアルタイムPCRを用いて脊髄離断モデルでの遺伝子発現を定量化し、BMSCシート移植における抗炎症作用のメカニズムを解明する。

**細胞シート由来の細胞の移植後動態の解明**

全身の細胞が緑に光るよう遺伝子改変されたラット(GFPラット)の細胞を用いて細胞シートを作製し、上記の脊髄離断モデルに移植する。脊髄欠損部における**神経細胞への文化・神経回路の再構築、再髄鞘化**や、脊髄損傷後に起こる**二次損傷**の場(炎症反応やアポトーシス)へのBMSCやグリア細胞の集積、血管新生などを明らかにする。

3. 研究の方法

**重症脊髄損傷モデル動物へのBMSCシート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価**

**(1)BMSCシート作製**

我々の過去の報告に準じて行う(Akahane M, et al JTERM 2008)

7週齢のF344ラットの両側大腿骨からBMSCを採取し初期培養を行う。2週間後に、 $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>の細胞密度で培養皿に播種して継代する。アスコルビン酸(AscP;82 μg/ml)添加標準培地で二次培養を行い、2週間後にスクレパーを用いてBMSCシートを採取する。

**(2)脊髄離断モデル作製、細胞シート移植**

我々の過去の報告に準じて行う(Okuda A, et al JNS 2017)

全身麻酔下に8週齢F344ラットの第10胸椎(T10)椎弓切除を行い、脊髄を無傷で露出させる。その後脊髄を鋭利なメスを用いて離断し、1.5mmの欠損を作成する。その後BMSCシートを損傷部に移植する群と移植しない群の2群に分け、それぞれ閉創する。

**(3)移植後の評価**

移植後7日、10日、14日で灌流固定を行い、評価する。免疫組織学的評価を行い、BMSCシート移植群と非移植群とで比較する。

<免疫組織学的評価>: 軸索再生(Tuj-1抗体)、グリア瘢痕(GFAP抗体)、マクロファージ(CD11b, Iba1)、M2マクロファージ(CD206)

**重症脊髄損傷モデル動物へのBMSCシートの最適な移植時期の検討**

**(1)BMSCシート作製**

**(2)脊髄離断モデル作製、細胞シート移植**

前述(2)と同様に8週齢F344ラットの脊髄離断モデルを作成し、脊髄損傷後3日、7日、10日、14日の時点でBMSCシートを注射器で損傷部に注入する。

**(3)移植後の評価**

移植後 2 週、8 週で灌流固定を行い、評価する。

<免疫組織学的評価>: 軸索再生(Tuj-1, GAP43 抗体)、神経細胞(NeuN 抗体)、血管新生( SMA 抗体)、グリア瘢痕(GFAP, CS56 抗体)、再髄鞘化(MBP 抗体)、マクロファージ(CD68, Iba1)、M2 マクロファージ(CD206)

<移植動物の行動学的評価>:

後肢運動機能の回復評価: BBB(Basso, Beattie, Bresnahan)オープンフィールドテスト

後肢の 3 関節(股・膝・足)の可動域および前肢との協調運動を指標とした 22 段階の評価である。

痛覚過敏(allodynia)の評価: Von Frey テスト

プラスチックフィラメントを後肢足底に押し当て痛み刺激を与え、足を引っ込めるときの圧力を評価する方法である。

脊髄損傷後から灌流固定まで毎週 1 回テストを行い、統計学的評価を行う。

細胞シート移植による抗炎症作用のメカニズムの解明

前述 (2)と同様に 8 週齢 F344 ラットの脊髄離断モデルを作成し、移植後 1、2、8 週で灌流固定し脊髄を取り出す。リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現の定量を行う。

細胞シート由来の細胞の移植後動態の解明

(1)GFP 陽性 BMSC シートの作製

GFP 発現遺伝子改変 F344 ラット(F344-Tg(CAG-EGFP)Ncco(以下 GFP ラット))を用いて作成する。脊髄離断モデルラットに移植を行い、移植後 1、2、8 週で灌流固定し脊髄を取り出す。前述 (3)と同様に免疫組織学的に移植後動態を調べる。

GFP ラットは紫外線照射で全細胞が緑に発色するように遺伝子改変された F344 ラットであり、文部科学省が管轄する「ナショナルバイオリソースプロジェクト『ラット』」から供与を受ける予定である。

#### 4. 研究成果

新型コロナウイルス感染拡大の影響により実験の進行に大幅な遅れを認めた。

重症脊髄損傷モデル動物へのBMSCシート移植における軸索再生とグリア瘢痕形成の評価

両群共に損傷部位での Tuj1 陽性軸索を認めず、急性期において脊髄損傷部位での軸索再生を認めないことが分かった(図 3)。両群共に CD11b 陽性マクロファージは経時的に断端部に集簇したが、集簇したマクロファージの数は両群間で有意差を認めなかった。GFAP 陽性反応性アストロサイトはマクロファージの周囲を取り囲むように存在していた(図 4)。脊髄損傷後 7 日、10 日において、BMSC シート移植群は対照群と比較して CD206 陽性マクロファージが脊髄断端部に

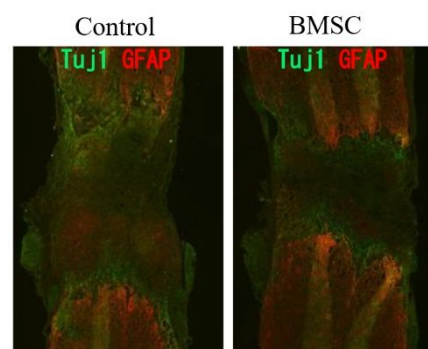


図 3 Tuj1 陽性軸索

に有意に集簇していた。Iba1 陽性マクロファージの脊髄断端部への集簇は両群間で有意差を認めなかった。

本研究では、過去の報告と同様に CD11b 陽性マクロファージが脊髄断端に集簇し、GFAP 陽性アストロサイトがマクロファージを取り囲んでいた。圧迫型の脊髄損傷と同様に離断型の

脊髄損傷においても急性期の炎症、抗炎症反応が起こっていたと考えられる。BMSC シート移植群は、対照群に比べて CD206 陽性の M2 マクロファージが脊髄断端部に早期に集簇しており、BMSC シート移植は移植後早期に M2 マクロファージを脊髄断端に集簇させることで抗炎症作用をもたらしている可能性が示唆された。

現在上記の内容に関して論文作成中である。

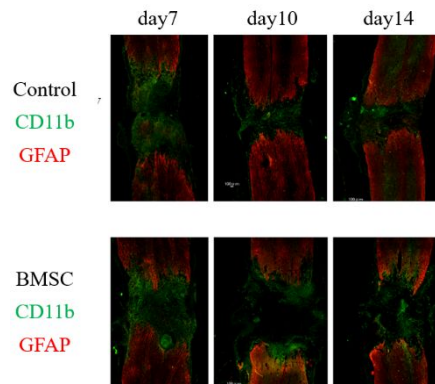


図 4 CD11b 陽性マクロファージと GFAP 陽性反応性アストロサイト

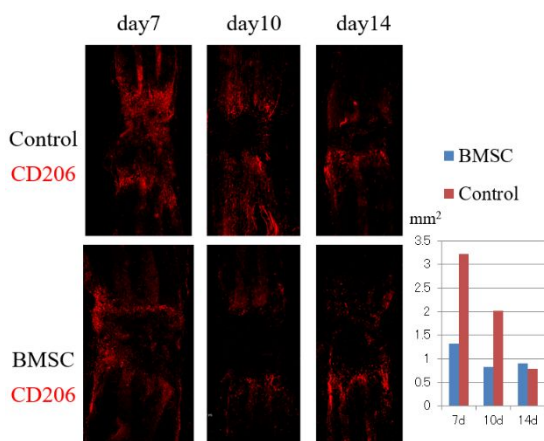


図 5 CD206 陽性 M2 マクロファージ

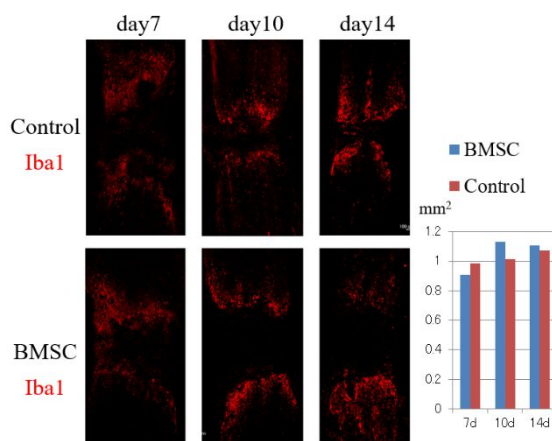


図 6 Iba1 陽性マクロファージ

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

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