

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09231

研究課題名（和文）脊髄損傷に対する次世代型エクソソームを用いた革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative treatment for spinal cord injury using next-generation exosomes

研究代表者

廣田 亮介（Hirota, Ryosuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10815434

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）：脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）治療後に皮質脊髄路（corticospinal tract: CST）の再構築が惹起されることを示した。ラット胸髄に圧挫損傷を作製した翌日にMSCを経静脈的に投与し、神経解剖学的手法および組織透明化技術を用いてCSTの状態を解析した。MSC投与群では損傷頭側でmajor CSTが脊髄外側や腹側を走るminor CSTに向かって軸索が伸長し、損傷部を迂回して、損傷尾側に残存するmajor CSTへと再収束していた。MSC投与により、皮質脊髄路が損傷部を迂回する神経回路の再構築が賦活化されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究者らは、骨髄間葉系幹細胞（MSC）治療が脊髄損傷の運動機能を改善し、顕著な治療効果があると報告している。これまでの良好な結果を踏まえて、2019年、「脊髄損傷の治療に用いる自己骨髄間葉系幹細胞治療」として、「条件及び期限付承認」を取得した（製品名：ステミラック注）。本研究で見られたMSC治療後の神経回路再編は、機能回復を惹起するメカニズムの一つと考えられ、特に細胞投与後比較的時間が経過してから自然回復とは逸脱したタイミングで発生する神経症状の改善に関連していると考えられる。細胞投与により引き起こされる本現象の病態解明を進めることは更に効果的な神経再生医療の実践につながる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that mesenchymal stem cell (MSC) therapy induces the reconstruction of the corticospinal tract (CST) following spinal cord injury. Rats were subjected to thoracic contusion injury and received intravenous MSC administration the following day. Using neuroanatomical techniques and tissue clearing technology, we analyzed the state of the CST. In the MSC-treated group, axons of the major CST extended towards the minor CST running along the lateral and ventral spinal cord above the injury site, bypassing the lesion, and reconverging into the major CST below the injury. It was suggested that MSC administration activates the reconstruction of neural circuits that circumvent the injury site in the corticospinal tract.

研究分野：脊髄損傷、神経再生

キーワード：神経トレーサー 軸索伸長 アデノ随伴ウイルス 神経回路再編 脊髄損傷 骨髄間葉系幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当初は遺伝子改変骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)由来のエクソソーム (MSCexo) 投与の脊髄損傷モデルに対する治療効果を解析することを目的とした。研究を進める中で、特に MSC 投与後の神経回路再構築を多角的に解析することを主眼とした。

### 2. 研究の目的

脊髄損傷 (spinal cord injury: SCI)後の限定的な自然回復のメカニズムはこれまで皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST)を対象とした研究から、温存された軸索の伸長が回路の再編成を惹起し、迂回経路や中継経路を形成することで機能改善に貢献していることを示してきた。ラットの CST は大脳皮質運動野から投射し、延髄で交差した後に脊髄へ下行する。CST は、脊髄後索の深部を通る主要な major CST に加え、腹側・外側を通る minor CSTs で構成され、運動機能に関与すると言われている。一方、我々の先行研究では、実験的 SCI モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)の経静脈的投与(MSC 治療)が、運動機能の改善に有効であることを報告してきた<sup>6,7)</sup>。本研究では、MSC 治療後の実験的 SCI ラットにおける CST に惹起される軸索の再生パターンを神経解剖学的手法で詳細に解析した。

### 3. 研究の方法

雄性ラット(SD, 250-300g)の胸髄にIHインパクト (Precision Systems and Instrumentation, LLC, Lexington, KY)を用いて脊髄に150kdynの挫滅を加え、脊髄損傷モデルを作製した。MSC群に対しては、受傷翌日にMSCs  $1.0 \times 10^6$  cellsを大腿静脈から単回投与した。MSC治療の2週後に神経トレーサー (AAV-8-CAG-GFP/tdTomato)を大脳皮質に局所注入し、6週間の観察期間終了後にMSC治療後に惹起される損傷脊髄組織におけるCSTの変化を共焦点顕微鏡で解析した。さらに、組織透明化技術と光シート顕微鏡を併用して脊髄損傷部周囲のCSTの詳細な走行を立体的に観察した。運動機能の評価は、Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) locomotor rating scaleを用いた。

### 4. 研究成果

#### 【結果】

MSC 治療群で運動機能の有意な改善を認めた。共焦点顕微鏡を用いた解析により、MSC 投与群では損傷中心の頭側で後索を走る major CST から脊髄外側や腹側へ軸索が伸長・分枝しており、損傷尾側で脊髄後索の深部の major CST へ分枝していた軸索が再収束していることがわかった。光シート顕微鏡での三次元的解析では、損傷部頭側で軸索が major CST から脊髄側索と腹側へ伸長・分枝し、損傷部を迂回して再度脊髄後索深部の major CST へ再収束する様子を捉えることができた。これらの SCI 後に生じた損傷脊髄における CST に認められた特異的な現象は MSC 投与群に特徴的であった。

#### 【考察】

本研究は、神経トレーサーを用いた神経解剖学的手法および組織透明化技術を用いて脊髄損傷後の MSC 治療により発現する神経の再構築を三次元的に解析した。その結果、MSC 治療後に

脊髄損傷部位より頭側で傷害を受けた CST の major component が、CST の minor component との間に強化された軸索ネットワークを形成することを示した。これは MSC 治療が既存の CST を増強し、神経系の代償機構を活性化し、新たな神経回路を再構築することを示唆している。これらの知見は、MSC 治療によって、神経組織の代償機構を活性化し神経疾患に対する治療効果を引き起こすというコンセプトと一致していると考えられた。

**【結論】**

本研究は SCI に対する MSC 治療が機能回復を惹起する新たなメカニズムとして、損傷軸索が賦活化されて再構築された神経回路が貢献している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 廣田亮介、佐々木祐典、山下敏彦、本望修
2. 発表標題 脊髄損傷における間葉系幹細胞投与後の皮質脊髄路のネットワーク再生
3. 学会等名 第57回脊髄障害医学会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 廣田亮介、佐々木祐典、山下敏彦、本望修
2. 発表標題 脊髄損傷における間葉系幹細胞投与後の皮質脊髄路のネットワーク再生
3. 学会等名 第41回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2022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	福士 龍之介 (Fukushi Ryunosuke)  (00894065)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	佐々木 祐典 (Sasaki Masanori)  (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授  (20101)	
研究分担者	栗原 康太 (Kurihara Kota)  (20855803)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	
研究分担者	山下 敏彦 (Yamashita Toshihiko)  (70244366)	札幌医科大学・医学部・教授  (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu)  (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授  (20101)	
研究分担者	小原 尚 (Obara Hisashi)  (20919732)	札幌医科大学・医学部・研究員  (20101)	

## 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2件

国際研究集会 61st ISCoS Annual Scientific Meeting, Vancouver, Canada, 15-18 September 2022.	開催年 2022年～2023年
国際研究集会 48th ISSLS Annual Meeting -Boston, USA on May 9-13, 2022	開催年 2022年～2023年

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