

令和 7 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K09361

研究課題名（和文）脊損に対する骨髄幹細胞治療で介在ニューロンの関与で再構築された神経回路の解析

研究課題名（英文）Analysis of reconstructed neural circuits involving interneurons following mesenchymal stem cells for spinal cord injury

研究代表者

小原 尚 (Obara, Hisashi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20919732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷後の神経回路の再構築を検討するために、異なる高位で脊髄半切断を行う損傷モデル（SLモデル）に対しMSCを投与して行動学的解析、神経解剖学的解析を行った。行動学的解析ではBBBスコアは、MSC投与群が有意に高値であった。神経解剖学的解析では、軸索追跡法、MRI解析いずれにおいても、MSC投与群において神経回路の再構築を認めた。現在、その詳細な定量解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのところ、SLモデルという特異的なモデルを用いてMSCによる神経回路の再構築について検討された研究はない。本研究により、今まで注目されていない再構築された神経回路に対する新しいアプローチが可能となる。したがって、本研究の学術的価値は高く、本研究によりこのメカニズムが解明されたなら、波及効果は極めて高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the reconstruction of neural circuits following spinal cord injury, we conducted behavioral and neuroanatomical analyses using SL models, with administration of MSCs. In the behavioral analysis, the MSC-treated group showed significantly higher BBB scores. In the neuroanatomical analysis, both axonal tracing and MRI revealed evidence of neural circuit reconstruction in the MSC-treated group. Currently, detailed quantitative analysis is underway.

研究分野：神経科学

キーワード：Staggered lesion MSC 脊髄半切断 アデノ随伴ウイルス 組織透明化 Diffusion Tensor Imaging

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の運動機能の自然回復は、新たな神経回路の再構築が関与することが報告されている。臨床的な脊髄損傷の多くは、これまで報告されてきた脊髄圧挫モデルに近い。損傷部位の周囲は解剖学的に正常な部分も残存し、その残存した正常な神経組織が、自然回復に関与しているという可能性が報告されているが、回復の程度は限定的であることが多い (Chen et al., 2016)。

我々は、これまで脊髄損傷モデルに対して骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: 以下 MSC) を経静脈的に投与した結果、運動機能の回復が得られることを明らかにしてきた (Akiyama et al., 2002; Morita et al., 2016; Osaka et al., 2010; Sasaki et al., 2001; Sasaki et al., 2009)。主な治療メカニズムとして、MSC による血液脊髄関門の安定化、損傷局所における損傷軸索の sprouting や、損傷軸索自身の再生、脱髄軸索の再有髓化などが、協奏的に作用することにより、運動機能の回復に貢献すると明らかにしてきた (Morita et al., 2016; Sasaki et al., 2009)。さらに、最近の我々の研究から、損傷した神経組織に対する MSC の静脈内投与 (MSC 治療) によって神経の可塑性を亢進させ、シナプス新生を起こすことが、機能回復に貢献し、治療メカニズムとなりうることを見出している (Sasaki et al., 2016)。

また、我々は、医師主導治験の臨床において、MSC 治療による喪失した運動機能に与える治療効果は投与早期のみならず、段階的に発現することを経験してきた。つまり、移植後しばらくの時間経過の後、症状が段階的に回復することを繰り返し、顕著な機能回復を獲得し続けていることを観察してきた (Honmou et al., 2021)。

近年、異なる脊髄高位で脊髄半切断を作製するモデル (Staggered lesion: 以下 SL モデル) が報告されている (Courtine et al., 2008)。この損傷モデルは、我々がこれまで検討してきた脊髄圧挫モデルと異なり、脊髄の 2 か所に半切断を行う、特異的かつ人工的なものである。先行研究の報告によると、右第 7 胸椎高位と左第 12 胸椎高位で脊髄半切断を同時に行うと、両側完全麻痺が生じ、その後の自然回復はわずかである一方、左第 12 胸椎高位で脊髄を切断させ、10 週後に右第 7 胸椎高位で脊髄を切断すると、その 4 週後には麻痺が部分的に改善を認めたとされている。また、左第 12 胸椎高位で脊髄を半切断後 10 週経過してから (この時点で歩行は可能)、右第 7 胸椎高位で脊髄を半切断すると、両側完全麻痺となり、その麻痺は永続的に改善しないと報告されている。これらのことから、神経回路の再構築には時間を要するということが、また脊髄損傷後の自然回復には損傷を免れた正常な脊髄組織が必要であり、それが新たな神経回路の再構築が関与していること推察されている (Courtine et al., 2008)。SL モデルは、損傷部分と損傷を免れた部分で明確に分かれており、脊髄損傷後の神経回路の再構築を、より明確に検討することができるものであると考えられている。

これまでに SL モデルに対して MSC 治療を行われたという報告はない。本研究

では、このモデルに対し MSC 治療を行い、運動機能の改善が得られた損傷脊髄の、再構築された神経回路を解析する。本研究により MSC の治療メカニズムがより明確に説明できるようになると考えた。

2 . 研究の目的

本研究の目的は MSC 治療により、神経回路がどのように再構築されるかを検討することである。これまでのところ、SL モデルという特異的なモデルを用いて MSC による神経回路の再構築について検討された研究はない。本研究により、今まで注目されていない再構築された神経回路に対する新しいアプローチが可能となり、MSC 治療メカニズムの解明に貢献すると考えられる。

3 . 研究の方法

MSC 投与群、細胞なしの Dulbecco ' s Modified Eagle Medium (以下 : DMEM) 投与群、コントロール群に振り分けた。

オスの成体ラット (Sprague-Dawley ラット、体重 250 ~ 300g) に、ケタミン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) の混合剤を腹腔投与して麻酔をかけた。皮膚切開後、左第 11/12 胸椎椎間関節を露出させ、左第 11 胸椎下関節突起を切除した。その後、左第 12 胸椎上関節突起を一部切除し、脊髄を正中から左外側縁まで展開した。同様に右第 6/7 胸椎椎間関節を露出させ、右第 6 胸椎下関節突起を切除した。その後、右第 7 胸椎上関節突起を一部切除し、脊髄を正中から右外側縁まで展開した。第 7 胸椎高位脊髄右半側と、第 12 胸椎高位脊髄左半側に眼科用メス (p-715、フェザー社) を用いて半切断した。

SL モデル作製後 1 日目 (BBB が 0 点である個体が対象) に MSC (コントロール群には MSC なしの培養液のみ) を経静脈的に投与した。静脈投与は大腿静脈から行った。温度 24 ± 2 、湿度 50% の環境で飼育した。術後は 1 日 2 回の膀胱圧迫による排尿ケアを行った。また、本研究は同種移植のため、拒絶反応を防ぐため MSC または DMEM を投与する前日からシクロスポリン A (10mg/kg) の皮下投与を連日行った。

MSC の調整・培養はこれまでの研究に従って作製した。成体 Sprague-Dawley ラットの大腿骨から骨髓を採取し、15ml の培養液で希釈した。この培養液は DMEM に 10% 加熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS)、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンが添加されていた。培養液で希釈された MSC は 37°C 、5% CO_2 の湿潤環境下で 3 日間インキュベートされた。その後、シャーレに付着した細胞をトリプシン-EDTA 溶液で剥がし、 1×10^4 個/mL の密度で継代培養した。3 回の継代培養後、得られた MSC を本研究で使用した。

モデル作製後 0 日、3 日、7 日、14 日、21 日、28 日に、オープンフィールド

を用いて後肢の運動機能を評価する Basso Beattie Bresnahan (以下 BBB) スコアで行動学的解析を行った。

再構築された神経回路の神経解剖学的解析は、軸索追跡法 (AAV8-CAG-GFP) と MRI における DTI (Diffusion Tensor Imaging) で行った。

軸索追跡法: モデル作製後 14 日目にケタミン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) の混合剤を腹腔内投与した。定位固定装置で固定して、大脳皮質運動野の直上を開頭した。Green Fluorescent Protein (GFP) でコード化された AAV (AAV-8-CAG-GFP) を右大脳半球運動野に、tdTomato でコード化された AAV (AAV-8-CAG-tdTomato) を左大脳半球運動野に局所注射した。局所注射はガラスピペットを装着したナノリッターインジェクター (World Precision Instrument Inc) を使用した。Bregma から 1mm 外側、前後方向は bregma から -1mm、0mm、1mm で局所注射した。それぞれに深さ 1.5mm および 1.0mm の高さで、計 6 か所に局所注射した。各部位に 0.5 μ L、計 3 μ L 投与した。トレーシングから 6 週間後、ケタミン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) へ腹腔投与後、PBS および 4% PFA で灌流固定し、脊髄を採取した。10% 20% 30% スクロース溶液で 1 日ずつ浸透し、OCT 包埋後、-80 で保存した。脊髄はクライオスタットを使用して厚さ 20 μ m に切片化して、共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM780 ELYRA S.1) を用いて観察した。また、別個体では組織透明化を行った。組織透明化は CUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis) 法を用いた。トレーシングから 6 週間後、同様に灌流固定を行い、脊髄を採取した。半希釈した CUBIC-L に 6 時間、37 で処理した。その後 100% CUBIC-L で 7 日間、37 で浸漬した。CUBIC-L は 2 日毎に交換した。その後、CUBIC-L を PBS で 2 時間漬けて洗浄し、半希釈した CUBIC-R に 24 時間、37 の環境で浸漬した。翌日、100% CUBIC-R に交換し 37 の環境で浸漬して、透明化の工程は終了した。光シート顕微鏡 (Miltenyi Biotec, Ultramicroscope) による観察により、神経回路の高精度比較解析を行った。

MRI: MRI 装置は 7T (Pharma Scan) を使用した。DTI を用いたトラクトグラフィにより、SL モデルの神経線維を視覚化して、それらについて定量解析を行った。モデル作製から 8 週間後、ケタミン (50mg/kg) およびキシラジン (10mg/kg) で深麻酔後、PBS および 4% PFA で灌流固定し、脊髄を採取した。4% PFA、4 で 2 週間保存後、T7 病変および T12 病変を中心とした 2~3cm 大のブロックに切断し、フッ素溶液で充填させて撮像した。取得したデータは DSI-Studio で解析した。

4. 研究成果

BBB スコアは、モデル作製後 7 日、14 日、21 日、28 日において MSC 投与群が有意に高値であった。軸索追跡法、MRI 解析いずれにおいても、MSC 投与群において神経回路の再構築を認めた。特に ex vivo MRI による diffusion tensor tractography を用いた、脊髄内の神経回路の詳細な解析も試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 小原 尚
2. 発表標題 脊髄損傷モデル (Staggered lesion) に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与
3. 学会等名 第38回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小原 尚
2. 発表標題 脊髄損傷モデル (Staggered lesion) に対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与
3. 学会等名 日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 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	廣田 亮介 (Hirota Ryosuke) (10815434)	札幌医科大学・医学部・訪問研究員 (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	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 (Toshihiko Yamashita) (70244366)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	佐々木 優子 (Kataoka-Sasaki Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (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