

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592153

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する低出力衝撃波治療効果の検討

研究課題名(英文) Low-energy extracorporeal shock wave therapy promotes VEGF expression and neuroprotection and improves locomotor recovery after spinal cord injury

研究代表者

小澤 浩司(OZAWA, Hiroshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10312563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：低出力体外衝撃波治療が脊髄損傷の麻痺の回復に有効か検討した。ラットで脊髄損傷を作製し、Sham群、Sham-衝撃波群(Sham-SW群)、脊髄損傷群(SCI群)と脊髄損傷-衝撃波照射群(SCI-SW群)の4群に分けた。Sham-SW群とSCI-SW群は損傷脊髄部位に低出力衝撃波を照射した。SCI群に比べ損傷後28日以降でSCI-SW群に良好な麻痺の回復を認めた。VEGF、BDNFとそれぞれの受容体のmRNAが7日目までの急性期に増加していた。VEGF、BDNFの早期の回復が下肢運動機能の改善につながっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated whether the low-energy ESWT can increase VEGF expression to provide neuroprotective effect and enhance the locomotor recovery after SCI in rats. Adult female Sprague-Dawley rats were divided into four groups: Sham group (laminectomy only), Sham-SW group (ESWT applied after laminectomy), SCI group and SCI-SW group (ESWT applied after SCI). The low-energy ESWT was applied to the injured spinal cord 3 times a week for 3 weeks after SCI. The low-energy ESWT significantly reduced neuronal loss in damaged neural tissue. Furthermore, locomotor function was significantly improved in animals in SCI-SW group compared to SCI group after SCI. These results demonstrated that the low-energy ESWT enhanced neuroprotective effect of VEGF and improve locomotor recovery following SCI.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷 体外衝撃波 VEGF

1. 研究開始当初の背景

低出力の衝撃波を用いた体外衝撃波治療により、ブタ慢性心筋梗塞モデル、ブタ急性心筋梗塞モデル、ウサギ慢性下肢虚血モデルにおいて、虚血組織における毛細血管数および血流の有意な増加と VEGF など様々なサイトカインの産生により心筋血流の改善、心機能の改善、下肢血流の改善を認めたと報告されている。近年、VEGF は血管増殖因子だけでなく神経増殖因子、神経栄養因子、神経保護因子としての働きが複数報告され注目されている。さらに VEGF 上昇によりアポトーシス抑制に関連する可能性も報告され、損傷脊髄にウイルスを介して VEGF 増殖を促進させると脊髄機能も回復した動物実験の報告がある。

2. 研究の目的

ラット脊髄損傷モデルに対する低出力体外衝撃波照射が、VEGF や BDNF (Brain-derived neurotrophic factor; 脳由来神経栄養因子) の発現を促進し、その神経保護効果により運動機能を改善するか否か検討することである。

3. 研究の方法

76 匹のラットを以下の 4 群に分けた：Sham 群 (椎弓切除のみ、脊髄損傷なし)、Sham-SW 群 (椎弓切除後に低出力衝撃波を照射)、SCI 群 (椎弓切除後に脊髄損傷を作製)、SCI-SW 群 (脊髄損傷後に低出力衝撃波を照射)。重錘落下式脊髄損傷作製装置 New York University Impactor で第 10 胸椎レベルに脊髄損傷モデルを作製した。低出力衝撃波を損傷部の皮膚直上から週 3 回、3 週間照射した。

(1) 運動機能評価として、損傷後 42 日間の運動機能を BBB score (Basso, Beattie and Bresnahan score) を用いて評価した。

(2) 損傷後 7 日目と 42 日目の組織傷害を HE 染色で評価した。損傷後 42 日目の神経細胞数を NeuN 染色で評価した。

(3) 損傷後 7 日目、21 日目の脊髄組織で VEGF とその受容体 Flt-1、BDNF とその受容体 TrkB の mRNA の発現を RT-PCR 法で評価した。

(4) 損傷後 7 日目の VEGF 染色で VEGF の発現を評価した。

4. 研究成果

(1) Sham 群、Sham-SW 群ともに BBB score は低下しなかった。SCI-SW 群では SCI 群に比べ、損傷後 28 日目、35 日目、42 日目の運動機能が有意に高かった。

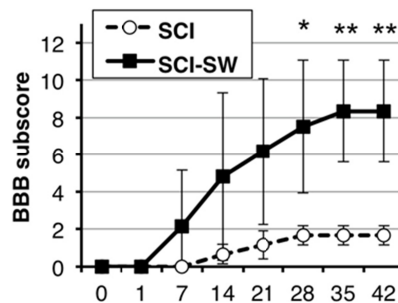
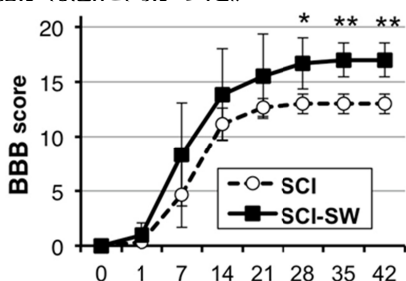


図 1. 脊髄運動機能評価  
BBB score (上) と BBB subscore (下)

(2) HE 染色や NeuN 染色では Sham-SW 群に神経組織損傷はなかった。損傷後 42 日目の神経細胞数は SCI 群に比べ SCI-SW 群では有意に多かった。

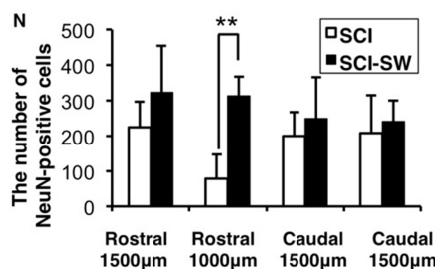


図 2. 42 日目の SCI 群と SCI-SW 群の NeuN 染色による神経細胞の比較

(3) 損傷後 7 日目の VEGF と Flt-1、BDNF と TrkB の mRNA は SCI 群に比べ SCI-SW 群で有意に増加していた。

(4) 損傷後 7 日目の VEGF 染色では SCI 群に比べ SCI-SW 群で VEGF の発現が有意に高かった。

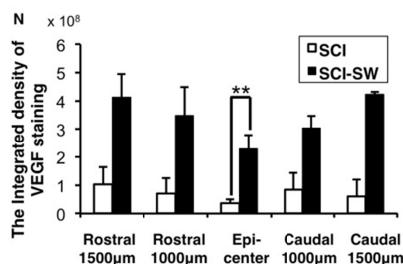


図 3. 7 日目の SCI 群と SCI-SW 群の VEGF 染色による比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

(1) Yamaya S, Ozawa H, Kanno H, Kishimoto KN, Sekiguchi A, Tateda S, Yahata K, Ito K, Shimokawa H, Itoi E.

Low-energy extracorporeal shock wave therapy promotes VEGF expression and neuroprotection and improves locomotor recovery after spinal cord injury. Journal of Neurosurgery. J Neurosurg. in press

査読有

(2) Kanno H, Pressman Y, Moody A, Berg R, Muir EM, Rogers JH, Ozawa H, Itoi E, Pearse DD, Bunge MB. Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *J Neuroscience*. Jan 29;34(5),2014,1838-55. DOI:10.1523 査読有

(3) Takahashi K, Ozawa H, Sakamoto N, Minegishi Y, Sato M, Itoi E. Influence of intramedullary stress on cervical spondylotic myelopathy. *Spinal Cord*. Oct;51(10), 2013, 761-4. DOI: 10.1038 査読有

(4) Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Yamaya S, Tateda S, Yahata K, Itoi E. The role of mTOR signaling pathway in spinal cord injury. *Cell Cycle*. Sep 11, 2012, 3175-9. DOI: 10.4161 査読有

(5) Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, Yamaya S, Itoi E. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice. *J Neurotrauma*. 29, 2012, 946-56. DOI: 10.1089 査読有

(6) Serizawa F, Ito K, Kawamura K, Tsuchida K, Hamada Y, Zukeran T, Shimizu T, Akamatsu D, Hashimoto M, Goto H, M Watanabe T, Sato A, Shimokawa H, Satomi S. Extracorporeal shock wave therapy improves the walking ability of patients with peripheral artery disease and intermittent claudication. *Circ J*, 76, 2012, 1486-93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447002> 査読有

(7) Hayashi D, Kawakami K, Ito K, Ishii K, Tanno H, Imai Y, Kanno E, Maruyama R, Shimokawa H, Tachi M. Low-energy extracorporeal shock wave therapy enhances skin wound healing in diabetic mice: a critical role of endothelial nitric oxide synthase. *Wound Repair Regen*. 20, 2012, 887-95. DOI: 10.1111 査読有

(8) Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Yamaya S, Itoi E. Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice. *Spine*. 36, 2011, E1427-34. DOI: 10.1097 査読有

(9) Ito K, Fukumoto Y, Shimokawa H.

Extracorporeal shock wave therapy for ischemic cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*. 11(5), 2011, 295-302. DOI: 10.2165 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) Tateda S, Ozawa H, Kanno H, Yamaya S, Yahata K, Ito K, Shimokawa H, Itoi E. Therapeutic Potential of Low- Energy Extracorporeal Shock Wave for Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 3/15-18, 2014. New Orleans United States.

(2) Tateda S, Kanno H, Ozawa H, Yahata K, Yamaya S, Itoi E. Rapamycin Suppresses Astrocytic and Microglial Activation and Reduces Development of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury in Mice. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 3/15-18, 2014. New Orleans United States.

(3) Kanno H, Ozawa H, Tateda S, Yahata K, Itoi E. Upregulation of RIP3 Expression in Various Neural Cells after Spinal Cord Injury in Mice. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 3/15-18, 2014. New Orleans United States.

(4) Yahata K, Ozawa H, Kanno H, Yamaya S, Tateda S, Ito K, Shimokawa H, Itoi E. Low-energy Extracorporeal Shock Wave Therapy Promotes VEGF Expression in Various Neural Cells and Enhances Neuroprotective Effect after Spinal Cord Injury. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 3/15-18, 2014. New Orleans United States.

(5) Ozawa H, Sato T, Aizawa T, Itoi E, Kokubun S. Postoperative Spinal Cord Swelling and Intramedullary Gd- DTPA Enhancement in Cervical Spondylotic Myelopathy. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 3/15-18, 2014. New Orleans United States.

(6) 菅野晴夫, Damien Pearse, Mary Bunge, 小澤浩司, 井樋栄二. シュワン細胞移植による脊髄損傷治療-コンドロイチナーゼ遺伝子導入によるグリア瘢痕形成の抑制と神経軸索再生の促進- 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日~18 日. 千葉

(7) 館田聡, 菅野晴夫, 小澤浩司, 山屋誠司, 八幡健一郎, 伊藤健太, 下川宏明, 井樋栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃

波治療 -アロディニアへの効果の検討-  
第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2013年10月17日～18日. 千葉

(8) 八幡健一郎, 菅野晴夫, 小澤浩司, 山屋誠司, 館田聡, 伊藤健太, 下川宏明, 井樋栄二. 急性期脊髄損傷における低出力体外衝撃波治療の VEGF 発現促進・運動機能改善効果.  
第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2013年10月17日～18日. 千葉

(9) Yamaya S, Ozawa H, Kanno H, Sekiguchi A, Itoi E. Low-energy Extracorporeal Shock Wave Therapy Improved Motor Palsy after Spinal Cord Injury. 2013 Annual Meeting, American Academy of Orthopaedic Surgeons. 3/19-23, 2013. Chicago, United States.

(10) Kanno H, Pressman Y, Moody A, Berg R, Muir EM, Rogers JH, Ozawa H, Itoi E, Pearse DD, Bunge MB. Combination of engineered Schwann cell implants to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 1/26-29, 2013. San Antonio, United States.

(11) 山屋誠司, 菅野晴夫, 小澤浩司, 八幡健一郎, 関口玲, 岸本光司, 伊藤健太, 下川宏明, 井樋栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波の効果とメカニズムの検討.  
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2012年10月26日～27日. 名古屋

(12) 菅野晴夫, Damien Pearse, Mary Bunge, 小澤浩司, 井樋栄二. 神経栄養因子発現遺伝子およびコンドロイチナーゼ遺伝子を導入したシュワン細胞移植による脊髄損傷治療の検討.  
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2012年10月26日～27日. 名古屋

(13) Yamaya S, Ozawa H, Kanno H, Sekiguchi A, Kishimoto KN, Itoi E. Effect of low-energy extracorporeal spinal shock wave therapy on spinal cord injury. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2/4-7, 2012. San Francisco, United States.

(14) Sekiguchi A, Kishimoto KN, Hatta T, Okuno H, Oyanagi T, Ozawa H, Itoi E. The relationship between temperature and lubricin expression. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2/4-7, 2012. San Francisco, United States.

(15) 山屋誠司, 小澤浩司, 関口玲, 菅野晴

夫, 岸本光司, 井樋栄二. 脊髄損傷に対する低出力体外衝撃波の効果.  
第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011年10月20日～21日. 前橋

(16) 関口玲, 菅野晴夫, 小澤浩司, 山屋誠司, 井樋栄二. 脊髄損傷におけるラパマイシンの autophagy 促進効果と神経保護作用.  
第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2011年10月20日～21日. 前橋

(17) Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, Yamaya S, Itoi E. Autophagy inducer rapamycin S reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2/13-16, 2011. Long Beach, United States.

〔図書〕(計 1 件)

(1) Uchida K, Nakamura M, Ozawa H, Katoh S. Springer. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014. (19-30, 61-74, 83-96, 311-322)

〔産業財産権〕  
なし

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澤 浩司 (OZAWA HIROSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 10312463

### (2) 研究分担者

伊藤 健太 (ITO KENTA)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 503745086