

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592168

研究課題名(和文) BDNF 遺伝子を過剰発現させた自家マクロファージ硬膜内注入による脊髄損傷の治療

研究課題名(英文) Intrathecal injection of autologous macrophages genetically modified to secrete BDNF by ex vivo electroporation improves hind limbs motor function after thoracic spinal cord injury in rats

研究代表者

尾形 直則(Ogata, Tadanori)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30291503

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)：脊髄損傷に対する遺伝子治療の開発の一つとして、神経栄養因子であるBDNFを過剰発現した自己マクロファージを硬膜内に注射し、損傷組織にmigrationさせ、損傷組織近傍で神経栄養因子を産生させる試みを行った。ラット脊髄損傷モデルを作製し、同一ラット腹腔内から採取した自己マクロファージにBDNF遺伝子を電気的遺伝子導入法で導入し、それを硬膜内に注入した。BDNF遺伝子を過剰発現させたマクロファージを注入したラットでは、脊髄損傷後2週間から8週間にかけて有意な下肢運動機能改善が見られた。損傷組織の中心部周辺の灰白質には、抗BDNF抗体で染色されるマクロファージがmigrateしていた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop an effective substance-delivery system for the treatment of spinal cord injury, we tried to overexpress BDNF protein in injury site by the transplantation of gene-modified autologous macrophages by lumbar puncture. Rat spinal cord injury was performed at the 11th thoracic vertebral level using a MASCIS impactor. Intrathecal injection of autologous macrophages genetically modified to secrete BDNF were injected into the subarachnoid space by lumbar puncture. Injected macrophages migrated and concentrated in the injured portion of the spinal cord and expressed GFP and BDNF proteins. The hind-limb function, evaluated by the BBB scale, in the BDNF-gene transferred animals, was significantly better than that in the vehicle animals from two weeks to eight weeks after the SCI. These results suggest that transplantation of gene-transfected autologous macrophages by lumbar puncture successfully improved hind-limb motor function via BDNF production after spinal cord injury.

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：Spinal cord injury rat macrophage gene therapy BDNF

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷に対する神経再生のための研究は近年めざましい成果を上げており、特に神経幹細胞の移植がトピックになっている。しかし実際の臨床応用を考えたとき、その細胞をどのようにして得るかという問題が残る。これに対し、損傷部にグリア細胞や骨髄細胞を移植する研究も進められ、神経以外の細胞の移植も神経再生に有用であると考えられるようになってきた。1998年に Rapalino らは脊髄損傷ラットの損傷部にマクロファージを移植し、運動機能の回復が得られたと報告した。マクロファージは末梢血からも簡単に単離でき、臨床応用を考える上で移植細胞の候補として有力であると考えられる。損傷された脊髄に神経栄養因子を投与することによって神経再生を図る試みがなされ、BDNF などの栄養因子が神経再生に有効であるという報告がなされている。投与方法としては蛋白を直接注入する方法とアデノウイルスを用いて局部に transfection する方法が報告されている。細胞に遺伝子を導入する方法としてはウイルスを用いる方法の他に、リポフェクション法と電気的遺伝子導入法 (electroporation) が知られているが、従来、ウイルスを用いる方法がその導入効率の高さから主流であった。しかし、近年実験条件の改善により、電気的遺伝子導入法も導入効率が向上し、安全で、量的なコントロールが容易である点が見直されてきている。

2. 研究の目的

神経栄養因子の一つである BDNF を発現させるため遺伝子をベクターに組み込んだものを作成する。このベクターにはトレーサーとして GFP も組み込まれている。ラット腹腔から取り出したマクロファージに Ex Vivo で電気的遺伝子導入法を用いて上記ベクターを取り込ませ、それを実験的脊髄損傷を起こさせたラットの硬膜内に注入する。以前の研究で自己のマクロファージを用いた場合には、

硬膜内に注入された細胞は損傷部位に migrate することが確認されている。この処置を行った後に、組織学的検討として損傷脊髄内に BDNF が過剰発現しているかどうかを確かめるとともに、BDNF を含まないベクターを取り込ませたマクロファージを注入した sham 群に比べ、BDNF を発現させたラットの方が運動能力が勝っているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

ラット脊髄を第 11 胸椎ラベルで椎弓切除し硬膜を露出させ、硬膜上から MASCIS Impactor を用いて重錘を 25mm の高さから落として脊髄損傷を作成した。ラット腹腔内から採取した自己マクロファージを BDNF の cDNA を組み込んだベクターを含む液体中 (ベクター 0.1ug/ul) に浮遊させ、電気的遺伝子導入装置 Gene Pulser (BioRad 社)を用いて電気的遺伝子導入 (エレクトロポレーション) を行った。この遺伝子改変マクロファージを L4/5 椎間より硬膜内に 25G 針を用いて注入した (図 1)。下肢の運動機能は BBB Scale で評価した。

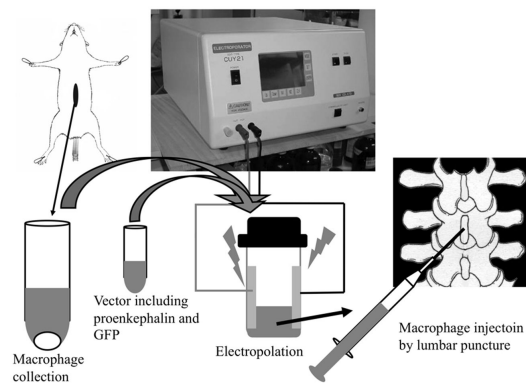


図 1 : 遺伝子導入とマクロファージ硬膜内注入

組織学的検討はヘマトキシリン-エオジン染色に加え、Luxol fast blue を用いた髄鞘染色で白質の状態を観察する。また、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色で、遺伝子導入された細胞が神経組織内に migrate していることを

観察し、また抗 BDNF 抗体を用いた免疫染色で遺伝子導入された細胞に BDNF が過剰発現されていることを観察した。この研究の Control としては BDNF を含まない GFP のみを発現するベクターを用いた (Vehicle)。

4. 研究成果

Vehicle 群に比較し BDNF 遺伝子を過剰発現させたマクロファージを注入したラットでは、脊髄損傷後 2 週間から 8 週間にかけて有意な下肢運動機能改善が見られた (図 2)。

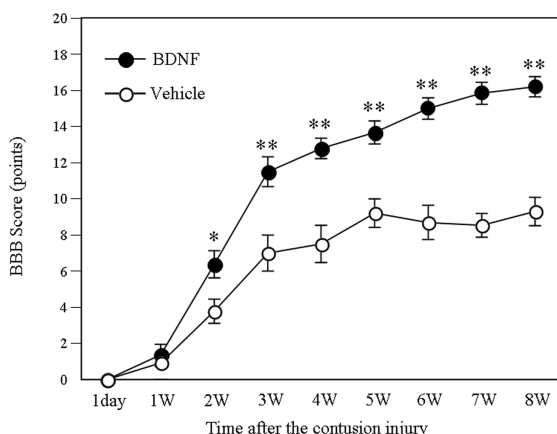


図 2 : 下肢運動機能評価結果

損傷部の組織学的検討では、損傷組織の中心部周辺の灰白質に、抗 CD11b 抗体で染色されるマクロファージが多数見られ、この細胞は抗 GFP 抗体でも染色されることから、遺伝子改変され、注入された腹腔内マクロファージであることが確認された (図 3)。硬膜内に注入されたマクロファージは損傷部中心に migrate し、非損傷部位にはほとんど見られなかったことより、マクロファージは組織損傷のあったところに migrate する性質があることが明らかとなった。損傷神経組織にはサイトカインなどの炎症性物質が増加することが知られており、マクロファージはこの炎症反応に惹かれるように組織に migrate した可能性がある。

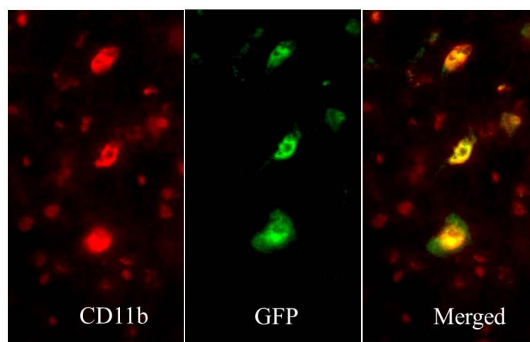


図 3 マクロファージのマーカである CD11b の抗体での染色と抗 GFP 抗体染色の二重染色。遺伝子導入された細胞がマクロファージであることを示している。

この細胞は抗 BDNF 抗体でも染色されることより (図 4)、硬膜内に注入された自己マクロファージが損傷組織内に migrate し、そこで BDNF を産生したことが、下肢運動機能の改善につながったと思われる。

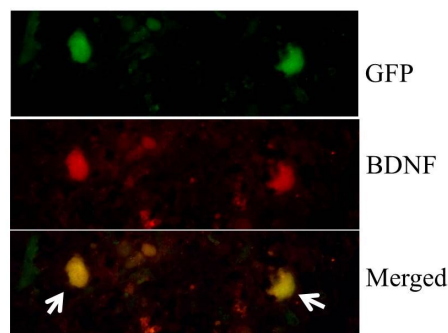
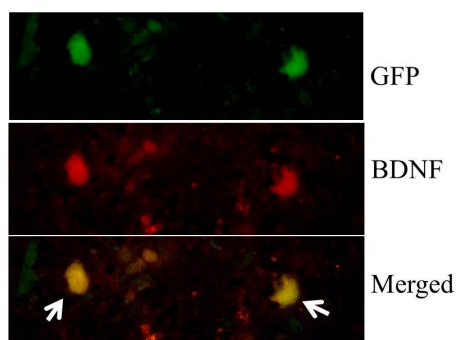


図 4 抗 GFP 抗体染色と抗 BDNF 抗体を用いた二重染色。遺伝子導入された細胞が損傷脊髄内に migrate し、BDNF を過剰発現しているのが示されている。

今回の研究では、将来の臨床応用を考え、遺伝子導入にあたり二つのことを工夫した。一つにはウイルスを使わない電氣的遺伝子導入法である。ウイルスを用いると神経組織では髄膜炎を引き起こす危険性がある。我々は遺伝子導入に際し、この方法をさらに体外 (Ex Vivo) で行うことにより、電圧による

神経損傷のリスクも権限させうると考えた。
二つ目は、細胞移植に際し、神経組織内に直接打ち込むということの危険性を考慮し、マクロファージの組織内へmigrateする能力を細胞移植に応用できないかという可能性を考えた。結果的には硬膜内に注入されたマクロファージは損傷脊髄組織内に migrate し、過剰発現するように遺伝子操作された BDNF を損傷部で産生することに成功した。



5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Autologous macrophages genetically modified by *ex vivo* electroporation and inserted by lumbar puncture migrate and concentrate in damaged spinal cord tissue: A safe and easy gene transfer method for the treatment of spinal cord injury.

Ogata, T., Morino, T., Horiuchi, H., Hino, M., Yamaoka, G, Miura H.

In "Spine Surgery" (K.J. Chung, Ed.), pp.137-148, ISBN:978-953-51-0469-8, InTech, 2012.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

尾形 直則 (Ogata, Tadanori)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30291503

(2)研究分担者

森野 忠夫 (Morino, Tadao)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20380248

堀内 秀樹 (Horiuchi, Hideki)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：60598762

(3)連携研究者

なし