

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23659723
 研究課題名（和文） 進化分子工学と先端接着技術の応用による脊髄損傷の新たな治療法開発への挑戦
 研究課題名（英文） Neural regeneration in spinal cord injury using combination of photoreactive gelatin and a fusion protein of hepatocyte growth factor
 研究代表者
 田中 雅人（TANAKA MASATO）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：20379754

研究成果の概要（和文）：本研究では、可視光硬化型ゼラチンを用いた脊髄損傷の新たな治療法の効果を検討した。動物実験で脊髄損傷部位に可視光硬化型ゼラチンと成長因子を併用し脊髄損傷による機能損傷の改善を認めた。さらに、コラーゲン結合因子を付加した特殊な成長因子を併用することで成長因子がゼラチン内により効果的に留まることでより優れた治療効果を認めた。これまでに脊髄およびその周囲の特殊な環境に適した生体材料は存在しなかったが、本研究によって可視光硬化型ゼラチンの脊髄損傷治療への可能性が実証された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate the effect of new therapy for spinal cord injury using photoreactive gelatin and a fusion protein of hepatocyte growth factor (CBD-HGF). In vivo experiments, the combination therapy of photoreactive gelatin and CBD-HGF was effective for the functional disorder after spinal cord injury. It was considered CBD-HGF remained into gelatin for a long stretch of time and kept its activation. Up to this day, there are no optimal biomaterials for the unique environment of the spinal cord. This study suggests that the combination therapy of our materials has a potentiality for the therapy of spinal cord injury.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：バイオテクノロジー

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：脊髄再生

1. 研究開始当初の背景

脊髄再生において薬剤、細胞、生体材料は三本柱であり、各々開発が進められてきたが、脊髄およびその周囲の特殊な環境に適した生体材料がいまだ存在せず、これらの薬剤や細胞を損傷局所に適切にデリバリーする手法は確立されていない。著者らは可視光硬化

型ゼラチンを用いて成長因子を材料表面に固定する技術開発に取り組んできた。固定された成長因子はその場に留まり長期間に渡って情報伝達系を活性化するため、質的に異なる刺激をもたらす。これらの成果を応用することで脊髄再生も期待できる。

2. 研究の目的

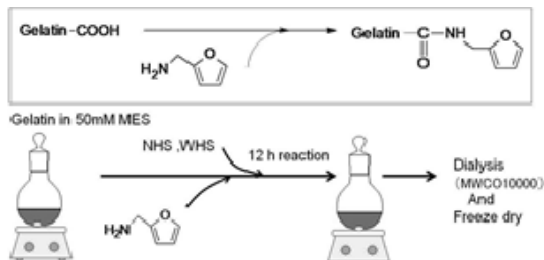
損傷した中枢神経は再生しないと長く信じられてきたが、昨今の神経科学の進歩により脊髄再生は全くの夢物語ではなくなりつつある。しかし、脊髄およびその周囲の特殊な環境に十分適合した材料はまだまだ存在せず、このことが薬剤、細胞を用いた脊髄再生技術の実用化を阻んできた。本研究では、ペプチド進化分子工学や可視光硬化型ゼラチンなど連携研究者である理化学研究所の先端材料・技術を利用した損傷脊髄の再生につながる新たな治療法開発に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) リボソーム・ディスプレイ法を用いたペプチド進化分子工学による結合性改変成長因子（コラーゲン結合性成長因子：CBD）を創製する。

(2) 可視光硬化型ゼラチンの調製

ゼラチンのカルボキシル基を活性エステル化してフルフリルアミンを反応させ、フルフリル化（フラン環導入）ゼラチンを合成する。光増感剤としてローズベンガルを混入し、光架橋によって硬化させる。



(3) 徐放量の測定

可視光硬化型ゼラチンからの薬物、神経栄養因子の徐放能を検討する。本研究では、コラーゲン結合性肝細胞増殖因子（CBDHGF）の徐放能を検討した。

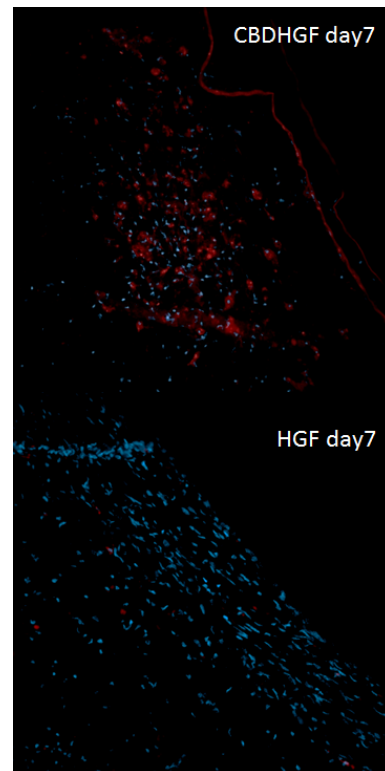
(4) マウス脊髄損傷モデルを用いた検討

マウス脊髄切断モデルを用いて本材の局所療法の有効性を検討する。マウス胸髄レベルで脊髄を完全切断し、同部位に成長因子を含んだ光硬化型ゼラチンを硬化させた。切断のみを対照群（cut）とし、ゼラチン充填群（gel）、ゼラチンと肝細胞増殖因子充填群（gel+HGF）、ゼラチンとコラーゲン結合性肝細胞増殖因子充填群（gel+CBDHGF）の4群において比較を行った。

4. 研究成果

(1) コラーゲン結合性成長因子の創製

本研究では、脊髄損傷治療に有効性を示す肝細胞増殖因子（HGF）にコラーゲン結合因子を付加した結合性改変成長因子を創製した。これにより光硬化型ゼラチンを含めたコラーゲンへの結合力を高めることができる。下図はマウス脊髄内に CBDHGF、HGF をそれぞれ局所注射し、7 日後に切り出した切片像である。CBDHGF は注射後 7 日経過しても局所に留まっていた（赤色部分）が、HGF は残存していなかった。



(2) 可視光硬化型ゼラチンの調製

可視光硬化型ゼラチンは in situ で硬化することができ、光照射時間を調製することで接着強度を調製することができた（図 1）。本研究では 2 分間の光照射を行った。

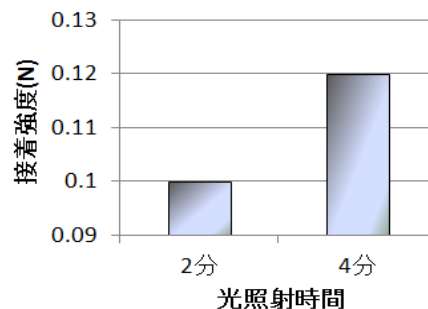


図 1

(3) 徐放量の測定

可視光硬化型ゼラチンは神経成長因子をゼラチン内に留めることができる。今回新たに創製したコラーゲン結合性肝細胞増殖因子（図 2 実線）は肝細胞増殖因子（図 2 点線）より長期間、ゼラチン内に留まることが確認された。すなわち、より長時間効果的に成長因子が流されることなく局所に留めておくことが可能であった。

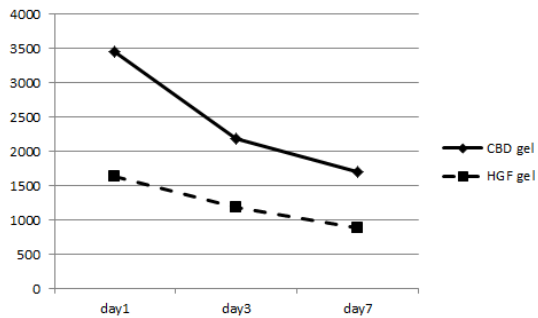


図 2 ゼラチン内の成長因子量

(4) マウス脊髄損傷モデルを用いた検討

① 下肢運動機能の改善

ゼラチンにコラーゲン結合性肝細胞増殖因子を加えた群 (gel+CBDHGF) は、切断のみの群 (cut)、ゼラチンのみの群 (gel)、ゼラチンに肝細胞増殖因子を加えた群 (gel+HGF) と比べ、術後 1 週～8 週にかけて有意に下肢運動機能の改善を認めた (図 3)。

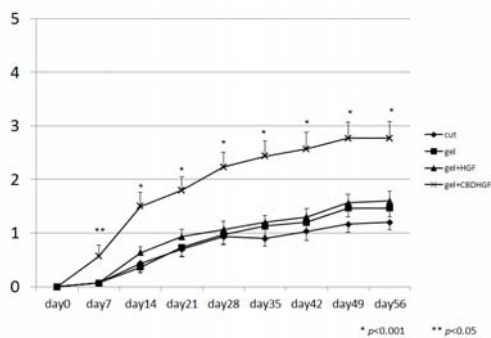


図 3 BMS による下肢運動機能評価

② 運動誘発電位の検討

術後 8 週の時点での各群の下肢運動誘発電位を比較した。ゼラチンにコラーゲン結合性肝細胞増殖因子を加えた群 (gel+CBDHGF) は

その他 3 群と比べ有意に大きい振幅を認め、下肢運動機能の改善と関連した結果となった (図 4)。

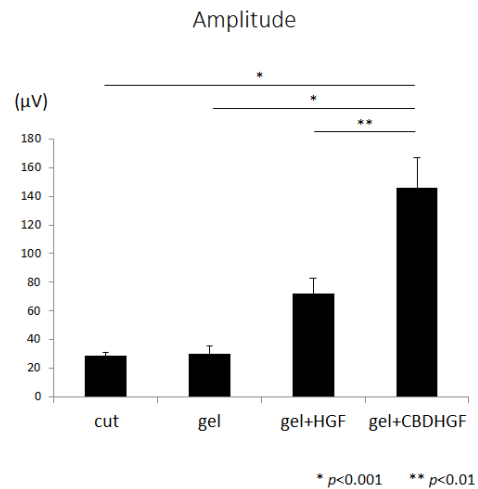


図 4

③ 神経細胞トレーサーを用いた評価

術後 8 週の時点で損傷部遠位にフルオロゴールドを注射し、赤核での標識神経細胞の数を各群で比較を行った。肝細胞増殖因子を加えた群 (gel+CBDHGF) はその他 3 群と比べ多くの標識神経細胞を認めた (図 5)。

Number of GF-labeled neurons in the bilateral red nuclei

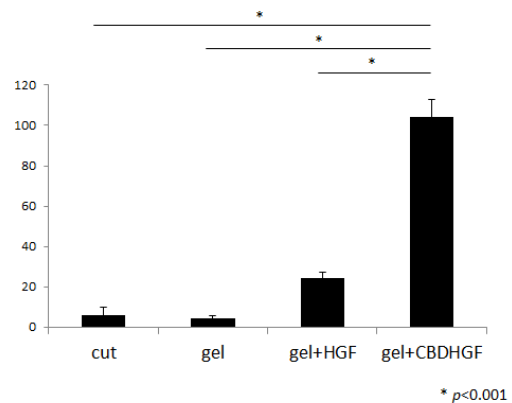


図 5

本研究は、脊髄損傷治療に有効な生体材料として可視光硬化型ゼラチンを用いた。同ゼラチンにコラーゲン結合性肝細胞増殖因子 (CBDHGF) を加えることでより長期間、有効に同成長因子の活性を損傷部位に与えることができた。また、同ゼラチンは有機溶媒を使用しないため、その他の様々な成長因子や

細胞を封入することができる。組織再生の3因子である担体、成長因子、細胞を組み合わせた治療を実現させるための有効な方法となりうることが示された。

今後は、現在の研究解析を継続し、さらに別の成長因子や細胞移植を併用した治療を試みる予定である。

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10件)

- ① 田中雅人、SAPHO症候群、MB Orthopaedics 25、2012、1-8、査読有
- ② 田中雅人、化膿性脊椎炎の病態と治療、整形看護、2012、722-728、査読有
- ③ 田中雅人、麻酔科医のための3D解剖学講座：8時限目：整形外科・脊椎脊髄外科頸椎前方アプローチ、Lisa 18、2011、51-53、査読有

〔学会発表〕(計55件)

- ① Masato Tanaka、Strategy for spinal sagittal deformity、AO Spine Advance Deformity Course、2012.6.14、Nanjing (China)
- ② 田中雅人、DVRとSegmental pedicle screwを用いた思春期特発性側弯症における椎体回旋変形の矯正、第85回日本整形外科学会、2012.5.17、京都
- ③ Masato Tanaka、Minimal Access and Navigational Surgery、AO Spine Master Course、2012.2.18、Sydney (Australia)

〔図書〕(計4件)

- ① 田中雅人、他、中外医学社、アトラス骨・関節画像診断 5 脊椎・脊髄、2012、86-89
- ② 田中雅人、他、中外医学社、アトラス骨・関節画像診断 5 脊椎・脊髄、2012、90-93
- ③ 田中雅人、他、中山書店、「整形外科臨床パッセージ」10巻 第3章、2012、131-139

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 雅人 (TANAKA MASATO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20379754

(2) 研究分担者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

高畑 智宏 (TAKAHATA TOMOHIRO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80571223

(3) 連携研究者

伊藤 嘉浩 (YOSHIHIRO ITO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工研究室

研究者番号：40192497