

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460477

研究課題名(和文) マウス脊髄虚血モデルに対するヒト血管内皮前駆細胞移植による脊髄修復効果の検討

研究課題名(英文) Transplantation of human endothelial progenitor cells for the therapeutic approach to spinal cord ischemia reperfusion injury in mice

研究代表者

大北 裕 (Okita, Yutaka)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40322193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胸部下行、胸腹部大動脈瘤手術や血管内治療後の虚血性脊髄障害は重篤な術後合併症の1つである。近年、虚血性疾患や脊髄損傷に対する血管内皮前駆細胞による細胞治療の有効性が前臨床および臨床試験で明らかにされた。また、最近、C57BL/6マウスにおいて遅発型および即時型虚血性対麻痺モデルが確立された為、SCIDマウスで同モデルを検証した。SCIDマウスでは遅発型対麻痺は発生せず、即時型対麻痺モデルのみ誘導可能であった。同モデルに再灌流後8時間にヒトCD34陽性細胞の静脈投与を行い、40時間後の脊髄組織では移植細胞は虚血部位に多数集簇を認めたと脊髄前角細胞は消失。同細胞治療の有効性を見出せなかった。

研究成果の概要(英文)：Spinal cord ischemia injury (SCI) remains one of devastating complications associated with surgery and endovascular repair for descending thoracic and thoracoabdominal aortic diseases. Recently, the efficacy and safety of human endothelial progenitor cell therapy for spinal cord injury as well as ischemic diseases have been revealed in preclinical and clinical studies. Mouse delayed and immediate-onset SCI models were established in C57BL/6 strain. However, only immediate-onset but not delayed-onset SCI was induced in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. We investigated the efficacy of intravenous injection of human CD34+ cells at 8 hours after reperfusion using SCID mouse immediate-onset SCI model. Immuno-histochemically, transplanted cells were abundantly located extra and intra vasculum at ischemic site of spinal cord, however, viable motor neuron was not detected at 40 hours after cell. Therefore, no benefit of CD34+ cell therapy was detected in this severe SCI model.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：マウス脊髄虚血再灌流障害 ヒト血管内皮前駆細胞 CD34陽性細胞 胸腹部大動脈手術合併症 対麻痺

1. 研究開始当初の背景

胸部下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤手術における脊髄虚血による術後対麻痺は未だ解決できていない血管外科医が最も恐れる術後合併症の1つである。種々の程度 (Paraplegia, Paraparesis) を含め、術後対麻痺の発生頻度は5-16%、特に瘤が胸部大動脈から腹部大動脈にかけて最も広範囲に及ぶ Crawford 分類型における術後対麻痺発生頻度は2-27%、平均10%に及ぶ。脊髄虚血が虚血時間・程度、脊髄灌流不全および再灌流障害に関連する根拠に基づき、予防のために、1) 脊髄栄養動脈 (arteria radicularis magna; Adamkiewicz 動脈) の同定・再建、2) 術中、誘発電位を用いた脊髄機能のモニタリング、3) 大動脈解放時の肋間動脈からの steal の防止、4) 分節遮断法、5) 脳脊髄液ドレナージ、6) 低体温、7) 遠位側大動脈灌流、8) 薬理的脊髄保護などの対策により、ある一定の対麻痺予防効果は得られたものの、今なお、熟練した術者に行われた手術においても5-10%の頻度で術後対麻痺は発生する。近年、ステントグラフトの進歩により、術後対麻痺の頻度は2-4%と Open surgery に比べ良好な成績であるものの、現状では、慢性大動脈解離、屈曲・蛇行の強い大動脈、壁在血栓の多い大動脈やデバイスのアクセスが困難な狭小な末梢動脈などには使用が制限される。また、術後対麻痺と術後死亡とは直接関連は認められないものの、患者の QOL を大きく損ない、間接的に術後死亡へと影響する。したがって、胸部下行・胸腹部大動脈手術・ステントグラフト内挿術後対麻痺の予防・治療の新たな Strategy の開発は医学的急務である。

近年、神経発生や神経再生には 'vascular niche' という血管内皮との相互関係が重要であることが明らかとなり、神経再生と血管再生には密接な関係が推測されている。そこで、我々が注目したのが、血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell; EPC) の移植によ

る血管再生を介した術後脊髄虚血予防・脊髄再生治療である。

2. 研究の目的

胸部下行大動脈瘤および胸腹部大動脈瘤術後対麻痺に対する新たな治療戦略の確立を目的とし、マウス脊髄虚血モデルを用いてヒト血管内皮前駆細胞 (EPC) 移植による脊髄修復効果について検討を行った。

3. 研究の方法

脊髄虚血モデルマウスの作成：全身麻酔を施した C57BL/6 マウス (9-12 週齢雌) および C. B-17/Icr-scid/scidJcl 免疫不全マウス (12-13 週齢雌) を開胸し、左総頸動脈と左鎖骨下動脈間の大動脈および左鎖骨下動脈をマイクロクリップで一定時間遮断することにより (Lang-Lazdunski et al. 2000, Kakinohana et al. 2011) 対麻痺モデルを作製した。脊髄虚血作成中、傍脊柱筋の温度をモニターし、大腿動脈より観血的血圧測定を行った。

EPC の移植：C. B-17/Icr-scid/scidJcl 免疫不全マウスを用いて脊髄虚血作成後、あらかじめ DiI 染色を用いてラベリングを行った ヒト骨髄 CD34 陽性細胞 2×10^5 個/匹 (PBS 200 μ l に懸濁) または 対照群として phosphate-buffered saline (PBS) 200 μ l を経静脈的に投与した。

脊髄虚血モデル作成後および移植後評価：

Basso Mouse Scale (BMS)を用いた定量的運動機能評価

脊髄免疫組織学的解析：hematoxylin-eosin 染色, Nissl 染色および抗 NeuN 抗体を用いた蛍光免疫染色により viable な前角神経細胞数、そして TUNEL 染色による神経細胞における DNA fragmentation を検出し、TUNEL 陽性細胞数の評価を行った。CD34 陽性細胞移植を行ったマウスについては、移植した CD34 陽性細胞の局在を BS-1 lectin との共染色により評価した。

免疫不全マウスと同系統 Immunocompetent マウス間での脊髄虚血障害の差異：SCID マウスおよび CB-17/Icr (IC) マウスに対し、脊髄虚血を作成し、再灌流後 12, 24, 48, 72 時間および 7 日後の BMS および脊髄免疫組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスにおける脊髄虚血モデルの再現性の確認：傍脊柱筋温度 37.5 °C で虚血時間を 5 分、5.5 分、6.0 分および 7 分と設定し、各虚血時間における BMS スコアの推移を再灌流後 7 日まで評価したところ、5 分虚血では 25%、5.5 分では 33.3%、6 分では 41.7% に遅発型対麻痺が認められた。7 分虚血では、全例、即時型対麻痺が認められた。6 分虚血および 7 分虚血の対麻痺を発生したマウスの生存率は、6 分虚血群 (遅発型対麻痺) では再灌流後 7 日まで 100% であるのに対して、7 分虚血群 (即時型対麻痺) は再灌流後 3 日目までに全例死亡した。再灌流後 48 時間における脊髄組織を解析したところ、脊髄前角細胞は 7 分虚血群では 6 分虚血群に比して著明な減少が認められた。その機序として、遅発型対麻痺では、神経細胞に多数の TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が観察されたのに対して、即時型対麻痺では TUNEL 陽性細胞は観察されず、全て壊死細胞であり、組織障害がより高度であると考えられた。以上の結果は Kakinohana らの報告にほぼ一致しており、当研究室においても C57BL/6J マウスを用いた脊髄虚血モデルの再現性を確認できた。

(2) C.B-17/Icr-scid/scidJcl 免疫不全マウスにおける脊髄虚血モデルの条件検討：ヒト細胞の移植実験を予定したため、免疫不全マウスでの脊髄虚血モデルの確立も試みた。C57BL/6 マウスでの脊髄虚血モデルを基に、傍脊柱筋温度 37.5 °C 下に虚血時間 6 分より条件検討を開始した。しかし、C57BL/6 マウスとは異なり、6 分、7 分、9 分および 9.5 分虚

血では、対麻痺は認められなかった。10 分虚血で 42.9% に即時型対麻痺を認められたが、遅発型対麻痺は 1 例も認められなかった。対麻痺を発生したマウスの生存率は、再灌流後 7 日目では 33.3% で、死亡は全て再灌流後 2 日目までに発生した。死亡直後に剖検した個体を詳細に観察したところ、腸管壊死が認められた。そこで、腹部臓器虚血障害を回避するため、Ischemic preconditioning (脊髄虚血前に、左総頸動脈と左鎖骨下動脈間の大動脈を 30 秒間遮断し、30 秒間再灌流) に引き続き、10 分虚血を行ったところ、66.7% に即時型対麻痺が発生した (遅発型対麻痺はなし)。しかし対麻痺発生例の生存率は再灌流後 7 日までで、50% と改善を認めた。また、死亡例において腸管壊死は認められなかった。また、10.5 分虚血でも同様の結果が得られた。以上の結果から、preconditioning を併用することにより、腸管壊死を伴わない対麻痺モデルの作成が可能になった。

(3) C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウス即時型対麻痺モデルに対するヒト CD34 陽性細胞移植の検討：Ischemic preconditioning 30 秒、10.5 分虚血の条件で、即時型対麻痺モデルを用いた。モデルの検討時に対麻痺の発生は、再灌流後 6 時間から 12 時間で BMS スコア ≤ 4 点であるマウスは全例対麻痺を発生したことから、細胞あるいは PBS の投与のタイミングは再灌流後 8 時間と設定した。投与後、40 時間 (再灌流後 48 時間) における脊髄組織を観察したところ、DiI でラベリングされた移植細胞が虚血障害部位に多数集簇を認めた。細胞の局在は、BS-1 lectin で染色された血管にとどまらず、血管外にも多数観察された。しかし、この時点で、細胞移植群、PBS 投与群ともに、Nissl 染色による脊髄前角細胞は既に消滅していた。また、障害は後角にまで波及し、Rexed I および II 相に至るまで神経細胞の著明な減少が認められた。移植後 14 日までで、

細胞移植群と PBS 投与群での BMS スコアの推移および生存率に差異は認められなかった。

C.B-17/Icr-scid/scidJcl マウス即時型対麻痺モデルは脊髄障害程度が著しく高度で、再灌流後早期に、脊髄前角細胞が消失し、再灌流後の生存率が C57BL/6 マウスに比して、著しく不良であった。ヒト CD34 陽性細胞の移植による対麻痺改善効果を検証するには、本モデルの虚血重症度が高すぎるものと考えられた。現在、軽症モデル作成、投与タイミングおよびより適切なヒト移植細胞について更なる検討を行っている。

(4) 脊髄虚血再灌流障害における免疫細胞の役割：SCID マウスでは、C57BL/6 マウスとは異なり、遅発型対麻痺が発生せず、また、即時型対麻痺発生により長い虚血時間を要した。マウス脳虚血モデルにおいて T 細胞が脳虚血病態の悪化への関与が示唆されていることから、SCID マウスおよび SCID マウスと同系統で Immunocompetent の CB-17/Icr (IC) マウスに対し、脊髄虚血を作成し、再灌流後 12, 24, 48, 72 時間および 7 日後の BMS および脊髄免疫組織学的評価を行った。両マウスとも遅発型対麻痺は発生せず、麻痺発生例はすべて即時型であった。脊髄組織の比較では、生存脊髄前角細胞は IC マウスでは、SCID マウスに比較していずれの観察時点においても減少傾向を認め、IC マウスでは脊髄組織への CD3 陽性 T 細胞および CD21 陽性 B 細胞がわずかに浸潤していたが、SCID マウスでは認められなかった。また、Microglia の浸潤は、両群とも再灌流後 12 時間にピークが認められ、IC マウスにおいて浸潤 Microglia 細胞数が多い傾向が認められた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamanaka K, Sasaki N, Fujita Y, Kawamoto A, Hirata K-i, Okita Y. Impact of acquired and innate immunity on spinal cord ischemia and reperfusion injury. General thoracic and cardiovascular surgery. 2016;64:251-259

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大北 裕 (OKITA, Yutaka)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：40322193

(2)研究分担者

川本 篤彦 (Kawamoto, Atsuhiko)
公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター 再生医療研究部 血管再生研究グループ・グループリーダー
研究者番号：00275330

藤田 靖之 (Fujita, Yasuyuki)
公益財団法人先端医療振興財団・先端医療センター 再生医療研究部 血管再生研究グループ・研究員
研究者番号：00590465

浅原 孝之 (Asahara, Takayuki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：20246200