

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462227

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞移植によるペリサイトの再生が実験的脊髄損傷の機能回復をもたらす

研究課題名(英文) Functional recovery following intravenous infusion of MSCs via repair of pericytes in rat spinal cord injury

研究代表者

佐々木 祐典 (Sasaki, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20538136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに間葉系幹細胞(MSC)をドナー細胞として、動物疾患モデルに対する移植実験を行い、良好な結果を得てきた。脊髄損傷では、損傷部周囲に浮腫を生ずる血液脊髄関門の破綻が機能障害(運動麻痺)などの原因となることが考えられる。本研究においては、脊髄損傷作成後において、骨髄幹細胞移植群では血液脊髄関門の安定化が生じることによって、運動機能の回復に貢献するという仮説を検証し、治療メカニズムを検討することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow may represent a potential source for organ regeneration via multiple mechanisms based on animal experiments. In this study, we induced a contusive SCI at T9 in the rat and studied the effects of intravenous MSC infusion on blood spinal cord barrier (BSCB) permeability, microvascular architecture and locomotor recover. Spatial and temporal changes in BSCB integrity were assessed by intravenous infusions of Evans blue (EvB). SCI resulted in prolonged BSCB leakage that was most severe at the impact site but disseminated extensively rostral and caudal to the lesion. Contused spinal cords also showed an increase in microvasculature. In MSC-treated rats, BSCB leakage was reduced, and locomotor function improved after MSC infusion. These results suggest that intravenously delivered MSCs have important effects on reducing BSCB leakage which could contribute to their therapeutic efficacy.

研究分野：脳神経外科、再生医学

キーワード：脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

血液脊髄(脳)関門は中枢神経系における血液と神経組織の組織液との物質交換を制限する物理的障壁であり、適切な細胞外環境を維持する役割を担っている。脊髄損傷の臨床では、血液脊髄関門が破綻すると血管の透過性が亢進し浮腫を生じるため、抗浮腫効果などを期待したステロイド投与が行われているが、根本的な治療法は存在しない。ところが、最近の細胞生物学の進歩により、血管周囲に存在する周皮細胞(ペリサイト)が、血管の透過性の調整に強く関わり(Daneman et al., 2010)、脊髄損傷時には、毛細血管周囲のペリサイトが脱落することがわかってきた。血管内皮細胞、アストロサイトと共に血管を構成するペリサイトは、最近、多能性の間葉系幹細胞の可能性が有ることまでが示唆されているユニークな細胞であるが(Caplan, 2008)、通常は、血管新生やリモデリング、微小血管系の構造的安定化、血流調節に関わっているために、ペリサイトの脱落が血液脊髄関門の破綻を来す可能性が高い。

私たちは、これまで骨髄幹細胞移植が、脊髄損傷モデルを含む神経疾患モデル動物に対して治療効果を有することを明らかにし(Sasaki et al., 2001, 2004, 2006, 2007, 2009, 2011; Lankford and Sasaki et al., 2008, Osaka et al., 2010)、メカニズムとして、神経栄養・保護作用(神経栄養因子による)、損傷軸索の再生(神経線維の修復)、脱髄軸索の再有髓化(損傷ミエリンの修復)、免疫調節作用、血管新生作用(血流の回復)などを提唱してきた(Sasaki et al., 2007, 2009, 2011)。

2. 研究の目的

複雑な病態生理を呈する脊髄損傷では、組織内の出血、虚血、浮腫などが引き起こす微小循環の機能不全によって、神経組織が壊死

することが機能障害(運動麻痺)などの原因となる。特に、損傷部周囲に浮腫を生ずる血液脊髄関門の破綻の原因は、今までは、血液脊髄関門を構成する血管内皮細胞とアストロサイトの損傷によると考えられてきたが、最近、血液脊髄関門を構成するもう一つの細胞である周皮細胞(ペリサイト)の役割に注目が集まっている。

本研究においては、実験的脊髄損傷において、骨髄幹細胞移植群ではペリサイトの脱落が抑制され、血液脊髄関門の安定化が生じることによって、運動機能の回復に貢献するという仮説を検証し、骨髄幹細胞移植がもたらす治療効果の新たなメカニズムを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験的脊髄損傷は、SD ラットに対して、IH インパクター(IH-0400, Precision Systems and Instrumentation)を用いて作成した。作成後に GFP トランスジェニックラットより採集・培養した MSC を経静脈的に投与し、治療効果の検討を行った。

3-1. 行動学的評価:

経時的に Basso Beattie Bresnahan (BBB) スコア、Rotorod を用いて行った。

3-2. 免疫組織学的解析:

経時的に組織採集を行い、作成した凍結切片に免疫染色を行い、超解像共焦点顕微鏡(ZeissLSM780, ELYRAS.1)を用いて定量解析を行った。使用した一次抗体:ペリサイト(PDGFR- β ; #3169, Cell Signaling, NG2;AB5320A4, Merck Millipore、血管内皮細胞(RECA-1; NB100-64647, Novus Biologicals)、アストロサイト(GFAP; ab4674)。

3-3. 生体内色素の組織内漏出:

生体内色素である Evans Blue (961Da)を

大腿静脈より投与した。24 時間後に、脊髄組織(吻側<C2>、損傷部<T9-10>、尾側<L1-2>)を採集し、IVIS imaging system での定量、組織内への漏出を吸光度計にて定量的に測定し、BSCB の機能的再生度の変化を評価した。一部のラットは 4%PFA で灌流固定し、凍結切片を作成し、共焦点顕微鏡を用いて血管外漏出を観察した。

3-4. 組織学的解析：

エポン封埋によりプラスチック切片を作製し、トルイジンブルー染色による光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による超微細構造の解析を行った。

3-5. Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)：

動物用 MRI(7T)を用いた Ex vivo MRI Diffusion Tensor 法により、軸索の進展・損傷を検出した。

4 . 研究成果

4-1. 行動学的評価：

BBB 試験によって、脊髄損傷作製後数日は、後肢に強い麻痺を呈していたが、次第に骨髄幹細胞移植群では後肢機能が回復し、非移植群と統計学的に有意な差を認めた。

4-2. 免疫組織学的解析：

観察期間終了後に、4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄の凍結切片を作成した。ペリサイト (PDGFR- α)、アストロサイト (GFAP) 血管内皮細胞 (RECA-1) を免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察し、血液脊髄関門の損傷過程を定量化した結果、骨髄幹細胞移植群において、非移植群と比べて、微小血管の新生、pericyte の血管被覆率の増加を認めた。

4-3. 生体内色素の組織内漏出：

脊髄組織への Evans Blue の漏出は損傷部位において見られたが、骨髄幹細胞移植群では非移植群よりも有意に低量であり、骨髄幹細胞の移植によって血液脊髄関門の安定化・修復がなされたと思われた。

4-4. 組織学的解析：

観察期間終了後に、エポン封埋によりプラスチック切片を作製し、トルイジンブルー染色による光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による超微細構造の解析を行った結果、骨髄幹細胞移植群では非移植群よりも有意に再有髄化した軸索を認め、骨髄幹細胞の移植によって脱髄軸索の再有髄化がなされたと思われた。

4-5. Ex vivo MRI Diffusion Tensor Imaging (DTI)：

観察期間終了後に、ラットを 4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄組織を dissect した。組織は、4 %パラホルムアルデヒドで後固定を行なって、動物用 MRI (7T)を用いて Ex vivo MRI による Diffusion Tensor Imaging を行なった。Ex vivo 法は撮像時間の制限・体動がないために、極限まで空間分解能を向上させており、作成した高精度の DTI 画像は損傷軸索の有効な評価法となると思われた。

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4件)

Diffuse and persistent blood-spinal cord barrier disruption after contusive spinal cord injury rapidly recovers following intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells. Matsushita T, Lankford KL, Arroyo EJ, Sasaki M, Neyazi M, Radtke

C, Kocsis JD, Exp Neurol, 査読有.

267:152-64, 2015.

脊髄損傷患者に対する自家培養骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与による細胞療法の検討.

山下敏彦, 佐々木祐典, 臨床評価, 査読無,

42: 108-110, 2014.

自家骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与による

脊髄再生. 本望修, 佐々木祐典, 岡真一, 森

田智慶, 竹林庸雄, 山下敏彦, 整形・災害外科,

査読無, 56:1177-1181, 2013.

脊髄損傷患者に対する自家培養骨髄間葉系

幹細胞の静脈内投与による細胞療法の検討.

山下敏彦, 佐々木祐典, 臨床評価, 査読無,

41: 108-115, 2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 祐典 (Sasaki, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 20538136

(2)研究分担者

鰐淵 昌彦 (Wanibuchi, Masahiko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30343388

三上 毅 (Mikami, Takeshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30372816

小林 正樹 (Kobayashi, Masaki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70592715

中崎 公仁 (Nakazaki, Masahito)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 70722461

坂井 拓郎 (Sakai, Takuro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 80639229

佐々木雄一 (Sasaki, Yuichi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 00570136

鈴木 淳平 (Suzuki, Junpei)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 00572596

森田 智慶 (Morita, Tomonori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 60723343

浪岡 愛 (Namioka, Ai)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 60748995

浪岡 隆洋 (Namioka, Takahiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70748996

(3)連携研究者
なし