

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462107

研究課題名(和文)トレハロースと微小重力下で培養した幹細胞による脊髄神経の保護と再生

研究課題名(英文)Protection and regeneration of spinal cord by trehalose and mesenchymal stem cells cultured under microgravity

研究代表者

高橋 信也 (Takahashi, Shinya)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：70423382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脊髄虚血を用いて実験覚醒後、下肢運動機能は低下しており、対麻痺の状態となった。1) 標準重力下で培養された10<sup>7</sup>のMSCを使用した。MSC投与群で有意に術直後および24時間後での下肢運動機能の改善を認めた。脊髄の組織学的検索にてMSC投与群での有意なアポトーシスの抑制と、RT-PCRにおいてBax/Bcl-2比の有意な低値を認めた。組織学的検索により術後24時間にてMSCが脊髄組織内に生着していることが確認された。2) 微小重力培養したMSC 1x10<sup>7</sup>による脊髄保護効果を認めた。3) トレハロースを静注した場合の有意性は、今のところ明らかではない。

研究成果の概要(英文)：Rat spinal cord ischemia model was used in this study. 1) MSC cultured under standard gravity of 10<sup>7</sup> was used. Lower limb function at 6 hours and 24 hours after surgery was significantly better in the group with MSC injection compared with the group without MSC (group PBS) and sham group. RT-PCR analysis showed the ratio of Bax to Bcl-2 was significantly lower in the group MSC than the group PBS. Injected MSC was observed in the spinal cord by histological examination at 24 hours after surgery. 2) MSC cultured under microgravity of 10<sup>7</sup> cells had a potential to spinal cord protection. 3) The efficacy of trehalose is not still clear.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：脊髄虚血 大動脈手術 脊髄保護 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科領域において、胸腹部大動脈瘤や大動脈解離に関連した脊髄虚血は現在の治療技術では十分な機能回復が望めないのが現状であり、下半身対麻痺など重篤な合併症を起こす。近年、多分化能を有する幹細胞を利用した再生医療が注目されている。神経領域においても重症疾患の治療を目指して再生医療が試みられているが、未だ技術的に確立されていない。特に間葉系幹細胞に関しては、脊髄虚血に対する使用での効果が散見される状況であり、効果はあるが、これから発展していく状況であると考えられる。我々は臓器移植の際の臓器保護液として用いられる trehalose を経大動脈または静脈投与することにより、脊髄保護効果が得られることを証明しており、また、独自に開発した3次元模擬微小重力細胞培養装置(Gravite;(株)スペース・バイオ・ラボラトリー, Hiroshima, Japan)を用いて骨髄間葉系幹細胞を培養すると、通常重力下(1G)の細胞培養に比べて未分化な骨髄間葉系幹細胞を大量に培養できることを示している。これらの方法を組み合わせることにより、脊髄虚血における神経細胞の保護と修復が得られないかを検討することとした。

### 2. 研究の目的

微小重力環境下では間葉系由来幹細胞を未分化細胞な状態で大量に細胞培養することが可能である。また、トレハロースは脊髄虚血における細胞保護効果があることが示されている。ラットにおける脊髄虚血障害で発症した対麻痺に対して、1)標準重力で培養された間葉系幹細胞の効果、2)微小重力環境下で培養した間葉系由来幹細胞を投与して障害された脊髄神経細胞を再生させ対麻痺を治療すること、3)トレハロースによる細胞保護効果を確認すること、目的として研究を計画した。

### 3. 研究の方法

1)ラット間葉系幹細胞の採取と培養を行う。通常の重力(1G)と、微小重力下での培養(1/1000 G)を行い、その細胞形態と細胞数を評価する。また、その分化について、FACSにて評価を行う。評価するマーカーは、間葉系幹細胞に発現する CD29、CD90 と陽性マーカーとして、造形系細胞に発現する CD45 を陰性マーカーとして使用する。

2)脊髄虚血ラットへの間葉系幹細胞の移植と脊髄の組織学的な解析、客観的下肢運動機能評価を行う。実験には400-500gの雄性SDラットを用いた。モデルは、ラットに全身麻酔を施行後、胸髄レベルで下行大動脈の血流をバルーンで遮断して作成する。ラットは無作為に3群に分けられ、Sham群、PBS群(術直後にPBSを投与)、MSC群(術直後に経動脈的にMSCを投与)とする。術後運動機能解析はBBB(Basso-Beattie-Bresnahan) scoreおよびInclined plane testを用いて評価する。術後24時間後の脊髄組織を採取し、以下の

検討を行う。1)RNAを採取し、real-time PCR法で遺伝子発現を解析する(Bax, Bcl-2, Tnfa, Tnfrsf1a)。2)組織学的解析、アポトーシスの評価と移植細胞の同定を行う。

3)術直前よりトレハロース溶液を静注することによる脊髄保護効果を評価した。

### 4. 研究成果

1)仔ラット大腿より採取した間葉系幹細胞(MSC)をウシ血清培地にて継代培養し、 $1 \times 10^8$ 個として準備した。このためにFACSによるMSCの評価では、CD29+, CD90+, CD45-であることが確認され、投与する細胞はMSC陽性マーカーの発現が高いことが確認された。微重力培養した細胞では、一部CD45+細胞を認めるものの、未分化な状態を保っている細胞を多数認めた。

2)ラットでの脊髄虚血モデルを作成は、当初予定した方法での対麻痺発生率が低かつ術死亡率が高いことから、モデル作成の方法を変更した。循環管理に関しては、系時的に、1)腹部大動脈の遮断では、当初30分の遮断で行い死亡する率は低いものの、下肢対麻痺の発生頻度が極めて低いことが判明し、45分、60分と遮断時間を延長したが対麻痺の発生頻度は改善しなかった。遮断部位を腎動脈下から腎動脈上に変更したが、対麻痺の頻度は変わらず、むしろ創部の出血や操作が煩雑になることからの死亡例が増加した。2)胸部大動脈のバルーン閉塞法は、左大腿動脈より2Fのフォガティカテーテルを挿入して6分、8分、10分、12分での遮断を行った。遮断時間が長い方が明らかに対麻痺の発生頻度は高いが、死亡率も上昇した。また、嘔吐やけいれんを起こして死亡する例も増加した。3)頸動脈からの瀉血と返血を追加した。大動脈遮断前に左頸動脈より瀉血を開始し、血圧が40mmHgで安定したところで大動脈遮断を開始することとした。瀉血は継続して行い、大動脈遮断後の中枢圧の上昇を抑えて中枢圧が40mmHgに保たれるようにした。遮断6-12分後に遮断を解除すると同時に瀉血された血液を中枢圧が150mmHgを超えないように返血していった。この方法により検討して安定した循環動態と適切な対麻痺の状態を得ることに成功した。麻酔法は、1)当初皮下投与としたが、ラットの体温管理を行う上での不安定さから、手技時間が一定しない為、追加投与の必要性が発生することがあり、追加投与を繰り返すことの困難さと、急に動き出した場合の動脈切開部からの出血や追加投与後の突然死などの死亡が発生する為、皮下投与で行うことは困難と判断した。2)腹腔内投与も同様であり、また、遮断にかかるストレスからか、手技中に突然覚醒することも経験し、中止した。3)吸入麻酔と変遷した。吸入麻酔の投与法は、1)気管切開法を用いたが抜管後に気道内に発生する痰がうまく排出できずに死亡する例が多く、2)気管内挿管にて同様に気道内

刺激が強くて痰の発生が強く死亡例が多い為、3)マスク換気を使用することまでに変遷し、気道内合併症は発生しなくなった。これらの方法の組み合わせにより、1週間以上生存するモデルの作成が可能となった。

ラット脊髄虚血モデル(遮断時間8分)を作成し、頸動脈よりMSCを投与した。覚醒後、下肢運動機能は低下しており、対麻痺の状態となった。全モデル数に対する良好な対麻痺症例の成立は70-80%であった。MSC投与群で有意に手術6時間後および24時間後でのBBBスコアは、PBS群に比べて良好であり、また経時的な下肢運動機能の改善を認めた(24時間後BBB:PBS群4.3+/-3.6 vs MSC群10.1+/-5.5, p=0.0080)。Inclined plane testにおいてもMSC群はPBS群に比べて有意に強い傾きに耐えられた(6時間後, 36.5+/-8.3 vs 29.2+/-6.4, p=0.0188; 24時間後, 49.6+/-13.5 vs 35.0+/-10.0, p=0.0044)。脊髄の組織学的検索では、HE染色にて、PBS群で組織の空胞化と炎症細胞浸潤を認めたが、神経細胞数は3群間で有意差を認めなかった(MSC群14.0±0.8個, PBS群14.5±1.8個, sham群13.8±1.0個)。TUNEL染色にてPBS群で有意にTUNEL陽性細胞を認め、陽性率は、PBS群でMSC群およびsham群よりも高かった(sham群5.3+/-6.5%、MSC群13.2+/-18.2%、PBS群47.6+/-15.8%)。MSC群で、PBS群に比べ、有意なアポトーシスの抑制を認めた。RT-PCRにおいてPBS群でのBax/Bcl-2比の有意な上昇を認めた。また、炎症関連遺伝子として、*Tnfa*にはMSC群とPBS群に差を認めなかったが、*Tnfrsf1a*の発現は、PBS群に比べて有意にshamおよびMSC群で抑制されており、組織学的所見を含めて、炎症を抑制する効果がある可能性が示唆された。

SD-Tg (CAG-EGFP)ラット骨髄から採取し、培養したMSCは良好にGFP発色し、これを移植して脊髄組織を観察した。当初は単純に投与して全く生着したMSCを認めなかったが、投与する際に腹部大動脈レベルで大動脈バルーンを拡張させるようにしたところ、術後24時間にてGFP細胞が脊髄組織内に生着していることが確認された。ただし、生着している細胞数は少ない。

2)微重力培養したMSC  $1 \times 10^6$  個による脊髄保護効果を検討し、通常培養の  $1 \times 10^8$  個の場合と下肢運動機能の改善に有意差を認めなかった。このことは、微重力培養した細胞の効果が標準重力で培養した細胞よりも高い可能性を示唆するが、この違いに関しては検討中である。

3)トレハロースの濃度は以前の研究をもとに5%とした。30分前よりトレハロースを静注し、術後まで継続した。神経細胞数およびアポトーシスした細胞数に現段階で有意差を認めていない。また炎症所見に関しても明らかかな優位性を認めていない。問題点として、動脈内投与あるいは前回の検討と同様の分

節遮断した大動脈内投与が検討できておらず、投与のタイミングと投与方法に関する検討を続けている。今のところ明らかではないが、今後の継続した検討が必要である。

## 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 6件)

1. Takahashi S, Sueda T. Prevention of Spinal Cord Ischemia During Thoracic Endovascular Aortic Repair. *Kyobu Geka.*、査読有、2017、70、p251-256.
2. Imura T, Tomiyasu M, Otsuru N, Nakagawa K, Otsuka T, Takahashi S, Takeda M, Shrestha L, Kawahara Y, Fukazawa T, Sueda T, Tanimoto K, Yuge L. Hypoxic Preconditioning Increases the Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Spinal Cord Injury. *J Stem Cell Res Ther*、2017、査読有、7、375.
3. Takahashi S. Invited Commentary. *Ann Thorac Surg*、2017、査読有、Mar;103(3):811. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.07.034
4. Furukawa T, Uchida N, Takahashi S, Yamane Y, Mochizuki S, Yamada K, Mochizuki T, Sueda T. Management of cerebral malperfusion in surgical repair of acute type A aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg.*、査読有、2017 Mar 20、doi: 10.1093/ejcts/ezx056.
5. Takahashi S, Katayama K, Takasaki T, Sueda T. Endovascular repair for retrograde type A aortic dissection with malperfusion. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.*、査読有、2016、24、162-4. doi: 10.1177/0218492314548230.
6. Katayama K, Uchida N, Katayama A, Takahashi S, Takasaki T, Kurosaki T, Imai K, Sueda T. Multiple factors predict the risk of spinal cord injury after the frozen elephant trunk technique for extended thoracic aortic disease. *Eur J Cardiothorac Surg.*、査読有、2015、47、616-20. doi: 10.1093/ejcts/ezu243.

[学会発表](計 1件)

1. 中川 慧, 高橋信也, 猪村剛史, 大塚貴志, 富安真弓, Looniva Shrestha, 末田泰二郎, 河原裕美, 弓削 類、脊髄虚血再灌流モデルラットに対する間葉系幹細胞移植効果の検討. 第16回日本再生医療学会総会. 2017年3月9日. 仙台.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 信也 (TAKAHASHI SHINYA)  
広島大学・病院(医)・病院助教  
研究者番号：70423382

(2)研究分担者

弓削 類 (YUGE LOUIS)  
広島大学・医歯薬保健学研究院(保)・教授  
研究者番号：20263676