

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861149

研究課題名(和文) 嗅粘膜移植法と骨髄間葉系細胞髄注療法との共移植法の有効性評価

研究課題名(英文) Evaluation of co-transplantation method between olfactory mucosa transplantation method and bone marrow mesenchymal cell medulla injection therapy

研究代表者

森脇 崇 (Moriwaki, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：20591019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脊髄損傷モデルに対して嗅粘膜移植を実施し、さらにcombined therapyとして、骨髄間葉系幹細胞(BMSC)を髄腔内投与し、軸索中継細胞(Relay-neurons)数を主要評価項目とした。Relay-neuronsは、移植後の神経再生の概念neuron relay formationでは重要な役割を果たすが、その寄与度は不明のままである。Relay-neuronsの関与を明らかにするために、人での嗅粘膜移植症例で脊髄DTIを評価し、さらに、人での嗅粘膜移植症例において、fMRIを用いて解析し、下肢運動機能回復と関連することを示した。

研究成果の概要(英文)：Bone mesenchymal stem cell (BMSC) was intrathecally administered as a combined therapy for the olfactory mucosal membrane transplantation to the rat spinal cord injury model, and the number of axon relay cells (Relay-neurons) was the main evaluation item did. Relay-neurons play an important role in the concept of neural regeneration after transplantation. However, there is a problem peculiar to the crush model about the contribution degree, and it remains unclear. To clarify the involvement of Relay-neurons, spinal cord DTI in the case showing the recovery of motor function of the lower limb after OM transplantation cases in humans was evaluated, and furthermore in the OM transplantation cases in human, Brain function change accompanying restoration of motor function of the lower extremity was analyzed using fMRI in a patient after OM transplantation and fMRI changes are related to the restoration of the lower limb motor function involved by Relay neurons.

研究分野：脊椎脊髄外科学

キーワード：relay neuron 脊髄損傷 嗅粘膜移植 spinal DTI fMRI

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷によって途絶えた神経軸索が再生され、再び脳から腰髄前角細胞まで繋がることで下肢運動機能回復を得たと解剖学的に考えており、その再生過程を補助し、促進することが可能となる神経栄養因子を持続的に付加する骨髄間葉系細胞に注目していた。そこで、神経栄養因子が一定期間持続的に脊髄腔内へ分泌されたことによって回復を示した培養自家骨髄間葉系細胞移植による脊髄再生治療に着目し、この神経栄養因子効果を嗅粘膜移植法に効果的に付加する新規移植法の開発を目指した。ラット脊髄損傷モデルに対して嗅粘膜移植を実施し、さらに combined therapy として、骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) を髄腔内投与し、その機能回復効果、効果発現の短縮効果、軸索伸長効果、及び軸索中継細胞 (Relay-neurons) 数を主要評価項目として実験し、有効性を示す計画であった。主要評価項目である Relay-neurons は、移植後の神経再生の概念である neuron relay formation の中で、重要な役割を果たすが、その移植片由来の Relay-neurons が、移植嗅粘膜から供給され脊髄固有の介在神経による神経再生と共同で下肢運動機能の回復に寄与することについてはラット脊髄損傷圧挫モデルを用いて証明し、報告した (1)。

主要評価項目のひとつとして予定していた嗅粘膜移植片由来の Relay neurons が下肢運動機能改善に対する寄与の度合いについての疑問は残った。これにはラット精髄損傷圧挫モデル特有の問題があり、不明のままであった。この Relay neurons の回復過程での有効性、寄与度を間接的ではあるが、人での嗅粘膜移植症例で下肢運動機能回復を示しているケースにおける脊髄 DTI を評価した (2)。また、人での嗅粘膜移植症例において、下肢運動機能回復に伴う脳機能の変化を、嗅粘膜移植術後の患者における fMRI を用い

て解析し、それにより、脊髄損傷部への嗅粘膜移植により、同部位に移植嗅粘膜由来の Relay neurons の関与を示唆することを DTI を用いて立証し、つづいて、その関与と下肢運動機能回復については、脳機能を fMRI によって評価し、運動領野の脳賦活部位での変化が Relay neurons の関与する下肢運動機能回復と関連することを立証した (3)。

## 2. 研究の目的

主要評価項目である Relay-neurons は、移植後の神経再生の概念である neuron relay formation の中で、重要な役割を果たすが、それを主要評価項目として新たな研究を行う上で、その寄与度等について明らかにする必要性があり、その解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 当初の研究計画の主要評価項目の嗅粘膜移植片由来 Relay neurons の存在証明；

【方法】8週齢雄SDラットに脊髄圧挫モデルを作成し、2週間後にEGFPラットの嗅粘膜組織を同部位へ移植した。移植後8週間後に脳運動領野へBDA神経軸索トレーサーを、続いて腰髄へ逆行性trans-synaptic WGA神経軸索トレーサーを注入し固定した。嗅粘膜群(OM; n=8)、呼吸粘膜群(RM; 神経前駆細胞を含まない粘膜; n=4)、損傷単独PBS群(n=4)を設定した。

(2) 脊髄 DTI 評価を用いた嗅粘膜移植片由来 Relay neurons の関与；

【方法】嗅粘膜移植手術を施行した4症例中、装具下での安定歩行が可能となった症例である。脊髄移植部をGE社製3T-MRIを用いてDTI(MPG25軸)を施行しtractographyを作成した。移植後4,12,24,48週後の損傷中心部のtractographyとfractional anisotropy(FA)を計測し評価した。

(3) Relay neurons の関与する下肢運動機能回復症例での脳機能を fMRI による評価；

【対象と方法】嗅粘膜移植手術を施行した胸髄以下完全脊髄損傷患者 (ASIA grade A または B) 4 人 (男性 3 人、女性 1 人、平均年齢 32.8 才) を対象とした。全例、術前にも 2 か月のリハビリを施行しており、術前リハビリ

前、術直前、術後6か月、術後1年における、右下肢運動（膝屈曲伸展を試みる）タスク、右下肢運動イメージタスク、右手運動（離握手）タスクによる脳fMRIを施行し、SPM12による解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 【成績】脊損・移植部位で形態学的にGFP/BDA/WGA/DAPI陽性の細胞は嗅粘膜由来の"relay-neuron"であり、その数はOM;  $2.33 \pm 0.509$ , RM;  $0.133 \pm 0.09$  ( $P < 0.01$ ) (ア; 図1、図2)であった。脊損・移植部上位・下位では、移植部を超えて下位へ到達したBDA陽性軸索数はOM;  $10.58 \pm 3.11$ , RM;  $5.22 \pm 1.07$ , PBS;  $1.5 \pm 0.379$  ( $P < 0.05$ ) (イ; 図3)、同様に移植部を超えて上位へ到達したWGA陽性軸索OM;  $17.77 \pm 1.7$ , RM;  $4.88 \pm 1.37$ , PBS;  $1.77 \pm 0.641$  ( $P < 0.01$ ) (ウ; 図4)といずれもOM群で多かった。OM群で移植嗅粘膜組織由来"relay-neuron"の存在が示され(ア)、移植部を通過するBDA陽性軸索は、脊髓圧挫部位周囲の脊髓残存・再生軸索(脊髓固有介在神経を介するもの除く)そして圧挫移植部位を貫通する再生軸索(嗅粘膜由来"relay-neuron"を介するものを除く)を示しOM群で多かった(イ)。移植部を超えたWGA陽性軸索は、脊髓圧挫部位周囲及び圧挫移植部位を通過、貫通する脊髓残存・再生軸索(脊髓固有介在神経及び嗅粘膜由来"relay-neuron"を介するものを含む)を表しOM群で多かった(ウ)。

#### 【総括】

ラット脊髓圧挫モデルを用いて嗅粘膜移植を実施し、"relay-formation"を形成する移植嗅粘膜組織由来"relay-neuron"の存在が確認された。

図1 脊損・移植部位でのGFP/BDA/WGA/DAPI陽性の細胞は嗅粘膜由来Relay-neurons

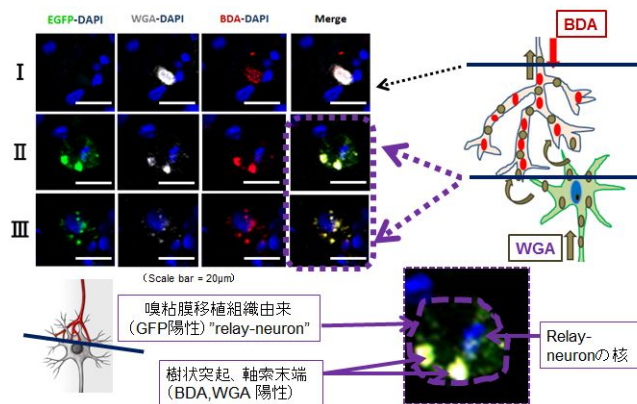


図2 “GFP/BDA/WGA/DAPI陽性細胞”の各群でのカウント数

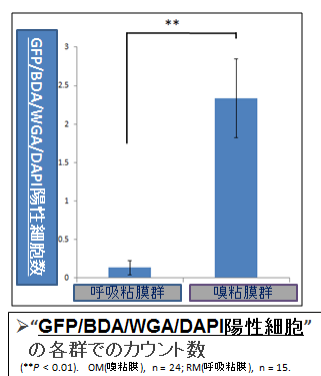


図3 (損傷部を超えた)BDA陽性軸索数のカウント数

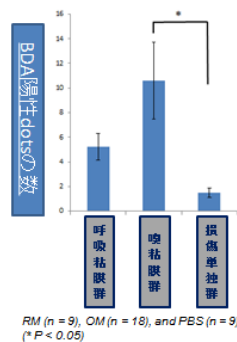
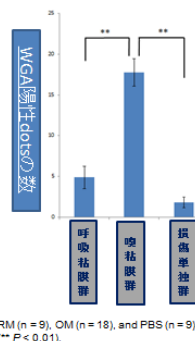


図4 (損傷部を超えた)WGA陽性軸索のカウント数



(2) 移植後 4 週から 48 週後にかけて嗅粘膜移植部内の tract が増加した。また、mean FA は、4 週/8 週で、0.23/0.22 と著変はなかったが、FA の幅は、4 週/8 週で、0.12/0.076 と低下した。

【考察】嗅粘膜組織が軸索伸長する足場 (scaffold) として機能していることを tractography は示している。また、48 週でわずかな間隙を残していることは、Relay-neurons が出現している可能性を示す (図 5)。臨床でのバイオフィードバックリハは、本来とは異なる軸索を繋いでいることを示唆する。FA 幅の集約化は、リハビリ加療が synaptic refinement を促進していると解釈もできる。

【結論】基礎研究結果と臨床経過を考慮し、移植脊髄内での変化を検討した。今後、先進医療となった自家嗅粘膜移植術前後の患者データを蓄積し検証を重ねたい。

図 5 嗅粘膜移植後 48 週後の脊髄 DTI ; Relay-neurons の関与示唆

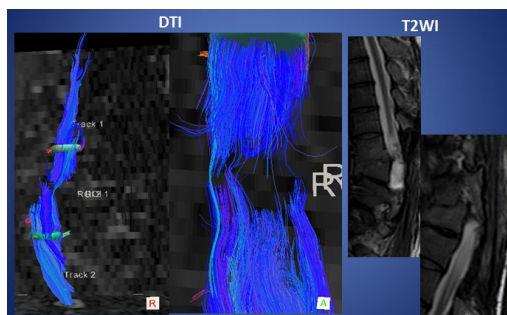
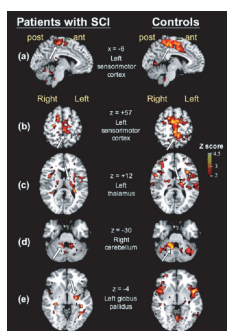


図 6 縮小を認めた慢性期完全脊髄損傷患者における右下肢運動タスク時の脳賦活領域



(3) 【結果】3 名の下肢 ASIA motor score は 0 点で経過、1 名は半年以降 7 点と改善を示

した。fMRI 集団解析の結果、運動イメージタスク、運動タスク共に継時的に全脳賦活部位の拡大を示した。しかし、前者では、対側運動感覚野、補足運動野、帯状回、基底核、同側小脳を中心に cluster の広がりをもとめ、右手運動のパターンにはほぼ一致するような変化を示したのに対し、後者では、両側補足運動野、前運動野、同側運動野や両側基底核を中心に cluster の拡大を示した。

【考察】1: 運動イメージでの脳賦活部位は、受傷後長期経過した重症麻痺患者が対象であったため、介入前は健常肢でのそれよりもかなり縮小していたと思われる (図 6)。2: 治療介入により運動イメージでの脳賦活部位は健常肢の運動での賦活パターンに近づくことが示唆された。3: 運動タスクにおいてみられた健常肢の運動と異なる脳賦活パターンは、重症例の場合、脊髄機能興奮を高めるための代償性変化であると思われる、介入により継時的拡大を示した。4: 症例を重ね、変化を正しく読み解くことで、今後、予後や治療介入効果の判断としての脳機能画像の使用を期待したい。

## 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 )

Spine 2014 Jul 15; 39(16): 1267-73

Presence of trans-synaptic neurons derived from olfactory mucosa transplanted after spinal cord injury.

Takashi Moriwaki, Koichi Iwatsuki, Yu-ichiro Ohnishi, Koshi Ninomiya, Toshiki Yoshimine.

〔 学会発表 〕 ( 計 2 件 )

2015年6月25日

第30回日本脊髄外科学会

演題名 ; 脊髄損傷後の移植嗅粘膜組織由来神経軸索間 " Relay-neuron " の存在

口演 学術委員会企画シンポジウム

森脇 崇、岩月幸一、大西諭一郎、二宮貢士、  
大川都史香、吉峰俊樹

2015年10月16日

一般社団法人日本脳神経外科学会第74回学  
術総会

演題名；脊髄損傷後嗅粘膜移植手術施行患者  
の下肢運動タスクに対する継時的脳賦活領  
域の解析 fMRI study 口演

二宮貢士、岩月幸一、大西諭一郎、大川都史  
香、鷹羽良平、吉峰俊樹

ホームページ等

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

森脇 崇(Moriwaki Takashi)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号:20591019

### (2) 研究分担者

岩月 幸一(Iwatsuki Koichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号:80346204

### (3) 連携研究者

大西 諭一郎(Ohnishi Yu-ichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号:533811

(4) 研究協力者

( )