

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592109

研究課題名（和文） 中枢神経再生療法の新戦略としての体性幹細胞の可塑性

研究課題名（英文） Pluripotency of somatic stem cells as new strategy for therapy of CNS regeneration.

研究代表者

井上 肇（INOUE HAJIME）

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60193603

研究成果の概要（和文）：

脊髄損傷によって喪失した運動機能は、ヒト 表皮幹細胞の移植一週間後より、対照群に比べ有意に改善し、観察期間の6週間後に於いても、すべての観察期間で有意に運動機能回復が認められた。BBB判定を終了後、自然飼育して、本研究に与えられた術後の2年間経過観察を行った結果、表皮幹細胞移植ラットは、運動機能改善の維持と直腸膀胱障害の改善が認められた。これらの成果をもとに、獣医師との連携で外傷性の脊髄損傷中動物への自家培養上皮幹細胞移植を行うべく、準備に入った。

研究成果の概要（英文）：

The hind limb paralysis with spinal cord injury improved significantly as compared to control group 1 to 6 week after human keratinocytes grafting. After scoring of bbb on motor function at 6week, the experimental rats, which were breed ad libitum, were observed for about 2 years. The keratinocytes grafted rats were shown the improvement of motor function and bladder and rectal disturbance symptom. From these results, to apply for clinical use, we prepare for the experiment of autologous keratinocytes grafted dog with a veterinarian.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

従来中枢神経は一度損傷すると、改善（再生）しないとされてきた。しかしながら、胚性幹細胞（ES細胞）の樹立と、その後の分化誘導方法の発見により、中枢神経再生の可能性が示されたばかりか、その後の幹細胞研究の発展により、その各々の構成組織・臓器等にも幹細胞の存在が示され、しかも多分化能を有する事が判明してきている。古くから実用化されている骨髄幹細胞採取技術と骨髄幹細胞移植は、初期には血液疾患の治療への応用に限定されていたが、現在では骨髄幹細胞移植による心不全治療、心筋梗塞治療への応用、四肢末梢部位の血管再生療法に応用され始めている。これは、骨髄幹細胞中に存在する間葉系幹細胞が大きな役割を果たしている」と推定される。その間葉系幹細胞の多分化能への注目と研究の発展が、先に示した構成組織・臓器内幹細胞の発見と応用に繋がり、中枢神経再生への可能性も現実味を帯びてきており、精力的な研究と応用方法がES細胞と同様に模索されつつある。

現在日本において脊髄損傷疾患患者数は10万人超、そしてスポーツ外傷や交通外傷などを原因として毎年5,000人以上が脊髄損傷を罹患しているとの統計がある。これら全ての患者が、車椅子、寝たきりの生活を余儀なくされる訳ではないが、大半は後遺症を伴い、日常生活に何らかの障害をもたらしている。注目すべきは、これら脊髄損傷患者のその罹患時の年齢分布を見ると現在の日本を支えている働き盛りの世代、今後の日本を支えるはずであった若者が半分以上を占めており、少子高齢化が進行している現在の日本社会において、来るべき高齢化の社会保障に関わる、すなわち日本を支える

べき世代を毎年5,000人も喪失している事になり大きな社会問題である。しかも脊髄損傷における後遺障害は不可逆的であり、仮に車いす、寝たきり患者の増加を毎年5,000人と仮定すると、日本のマンパワーが毎年5,000人減るだけでなく、被社会保障者（医療費、生活保障など）が5,000人増える事も意味し、都合1万人の労働力の減少と国民支出の増大を意味する。何故ならこれら中枢神経系に傷害をもたらした場合、現況の治療は極めて受動的であり、損傷神経支配組織の廃用性萎縮を抑制する為のリハビリテーションに終始し、損傷神経系の治療を試み麻痺からの解放を期待する能動的治療が存在しないからである。厚生労働省においても、これらリハビリテーションに関わる医療費の増大に歯止めをかけるべく、医療保険制度の見直しを計り、世論の反発を買っているのは記憶に新しい。従って、これら年齢層の患者が十分な社会復帰を出来るような治療法が確立される事は、患者個々の福音になるだけでなく、日本社会に医療費削減、医療制度に対する大きな貢献となる事は想像に難く無い。

我々は、この中枢神経再生を具現化するため、体性幹細胞を中心とした神経再生方法に関する研究に取り組み、その結果骨髄幹細胞、ES細胞によらない新たな第3の神経再生法、即ち脂肪組織ならびに皮膚組織からの幹細胞、脱分化細胞を用いた細胞治療の有用性を発見し、その可能性についてかねてより研究し、一定の成果を納めている。

2. 研究の目的

本研究は、既に有効性が示され特許申請中の上皮幹細胞利用による脊髄神経再生技術を確立し、特に

移植後の長期経過観察を行う事でその運動機能改善作用の継続性、表皮幹細胞適用の安全性（すなわち副作用の危険性）について3年程度をめどに証明する事である。並行して、交通外傷等を原因とし脊髄損傷を来した愛玩動物に対し（主にイヌ）、獣医師の協力の下に、表皮幹細胞移植治療を試み基礎データを積み上げ、最終ステップとなるヒト臨床応用へとつなげる。

3. 研究の方法

ヒト由来表皮幹細胞の培養を行い3年間の経過観察を目的として、なるたけ早期に脊髄損傷ラットへ移植を行う。その為に、初年度出来るだけ早いうちに脊髄損傷モデルを作製し移植研究を行う。同時に、効率の良い移植法の確立を目指し、表皮幹細胞 DDS を可能とする scaffold（以下鑄型）の探索を平行して行う。

具体的には以下のようなプロセスを経る。

(1) ヒト表皮幹細胞の採取と培養：臨床試験部会第 1295 号の承認研究方法に基づき、IC と文書における同意を得た患者より、手術時に余剰となった正常皮膚を幹細胞培養に用いる。すなわち、採取皮膚を細切し、定法に従って除菌後、酵素消化、細胞分散を行い、遊離細胞を回収する。得られた遊離細胞の細胞密度を調整後、当教室で確立している表皮幹細胞培養法（特許出願中）を用いて培養する。培養開始 7 日以内に認められるクローン増殖した表皮幹細胞のみを、切り出し法で回収し継代培養する。このようにして得られた表皮幹細胞を研究に用いる。

(2) 脊髄損傷ラットの作製：動物実験倫理委員会承認第 000013 号の承認研究方法に基づき全身麻酔下、実験動物への苦痛を最低限に抑えた状況下で愛護的に脊髄損傷モデルを作製する。すなわち、麻酔下の SD 系雌性ラット（250g 程度）の脊椎 T9-10 を開放し、脊髄を露出した後 10g の分銅を 2.5cm の高さから落錐させ脊髄損傷を誘発する。

覚醒後、確実に損傷を引き起こせたラットについて実験に用いる。

(3) 細胞移植法：一群 30 匹を研究に用いる。脊髄損傷誘発後の急性期炎症が消退した 8 日目、あるいは症状が固定した 6 週間後に、細胞移植を定法に従って行う。対照群としては、細胞を懸濁した溶媒、あるいは同一患者から用手法によって培養した線維芽細胞を用いる。長期経過観察においては一群 10 匹を、病理組織学的検討については一群 3 匹程度を別途作製した後研究に用いる。

(4) 評価法：長期経過観察においては行動観察を基本とする。BBB 判定法を用いて、移植後 3 週間迄はほぼ毎日、以降 6 週間迄は一週間に一回、以降通常飼育に切り替え、2~3 年程度経過を観察する。また、必要に応じてトレッドミルによる運動機能解析を併用する。

4. 研究成果

脊髄損傷によって喪失した運動機能は、ヒト表皮幹細胞の移植一週間後より、対照群に比べ有意に改善し、観察期間の 6 週間後に於いても、すべての観察期間で有意に運動機能回復が認められた。BBB 判定を終了後、自然飼育して、本研究に与えられた術後の 2 年間経過観察を行った結果、表皮幹細胞移植ラットは、運動機能改善の維持と直腸膀胱障害の改善が認められた。その結果。その結果対照群は、すべて全身症状が悪化し、安楽死もしくは自然死をしたにもかかわらず、表皮幹細胞移植群は生存した。

これらの成果をもとに、獣医師との連携で外傷性の脊髄損傷中動物への自家培養上皮幹細胞移植を行うべく、準備に入った。

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 2 件)

1. 井上 肇、菅谷 文人、
千代倉 友博、渡部 雄一、
相原 正記、熊谷 憲夫
末梢組織細胞を用いた現実的再生
医療とその治療戦略 -幹細胞様
細胞から多血小板血漿まで-
聖マリアンナ医科大学雑誌；査読
有 2010、38:第2・3

2. Tsukada H, Inoue H, Osada H
Re-epithelialization after
laser therapy of a stenotic
artificial tracheal graft.
Surgical Today；査読有 2008、
28:672-674

[学会発表] (計 2 件)

1. 井上 肇
再生医療の実用化に向けた新規ア
プローチ -気管再生を中心に-
六医科大学合同 新技術説明会
2010年12月9日 東京

2. 安藤幸二 他
各種材質による人工気管移植成績
第26回日本呼吸器外科学会
2009年4月14日 小倉

[図書] (計1件)

1. 熊谷憲夫、井上 肇
培養表皮による創傷治療 創
傷外科に置ける新しいアプローチ
(形成外科増刊号)S255-S261 2008
年10月 克誠堂出版(株)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 肇 (INOUE HAJIME)
聖マリアンナ医科大学・医学部・
准教授
研究者番号：60193603

(2)研究分担者

武永 美津子 (TAKENAGA
MITUKO)
聖マリアンナ医科大学・医学
(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：10236490

富岡 みゆき (TOMIOKA
MIYUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学
部・研究技術員
研究者番号：90398967

(3)連携研究者

なし