

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890060

研究課題名（和文） 血管柄付き脊髄移植の脊髄再生医療における可能性の検討

研究課題名（英文） Vascularized Nerve Flap for Spinal Cord Repair

研究代表者

菊池 和希 (KIKUCHI KAZUKI)

東京大学 医学部附属病院 特任臨床医

研究者番号：40508090

研究成果の概要（和文）：

血管柄付き神経移植は、シュワン細胞が高率に生着するため従来の神経移植に比べて優れた神経再生が得られることが判明している。これまで当科では様々な症例に対して血管柄付き神経移植を行い、良好な結果を得ている。脊髄損傷治療への新たなアプローチをしていくため、今回我々はこの技術、概念の中枢神経への応用を検討した。本実験で、血流をもった末梢神経の移植を脊髄切断部位に行い、組織学的に評価を行ったところ、短期間のフォロー（10日間）で既に神経膠細胞の生着、線維性瘢痕の抑制に関して有意な効果をもつことが証明された。血管柄付きの移植をした場合はシュワン細胞の非常に良好な生着が得られ、4型コラーゲンの免疫染色から線維性瘢痕が優位に抑えられていることが分かった。線維性瘢痕の制御は、中枢神経再生の問題点を克服する重要なポイントであることが再生医療の分野でも指摘され続けており、マイクロサージャリーによる血行を有した神経の移植はこの問題のブレイクスルーになり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Object: By making the “vascularized nerve flap for complete spinal cord gap” model, we assessed the histological effect of this method. **Method:** Eight female Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups: group A and group B. Group A included “nonvascularized nerve flap” models, whereas group B consisted of “vascularized nerve flap” models. In each group, we transferred peripheral nerves to fill the void made by complete surgical transection of the spinal cord. Postoperatively, we administered intravenous antibiotics and performed urethral catheterization and disimpaction everyday. Tissue sampling was done on postoperative day 10. **Results:** No necrosis occurred in group B, vascularized models. In group A, nonvascularized models, necrosis of the grafted nerves was observed in 2 of the 4 rats. As for the specimens of Kluver-Barrera’s method for selective myelin sheath staining, in group B, all specimens were stained with Kluver-Barrera’s method for selective myelin sheath staining, whereas in group A, 2 specimens with successful engraftment were not stained. With type IV collagen immunostaining, the increase of type IV collagen around the grafted area was not so severe, compared with that of normal region in vascularized cases. In nonvascularized cases, the appearance of type IV collagen was prominent. Therefore, in the vascularized cases, it was made clear that Schwann cells survived in vascularized models and that fibrotic scar formation was inhibited. **Conclusion:** Histological comparison between vascularized and nonvascularized peripheral nerve transfer for complete spinal cord gap showed significant differences in 10 days. A longer follow-up period is necessary for observation of functional differences.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,050,000 | 315,000 | 1,365,000 |
| 2010年度 | 950,000 | 285,000 | 1,235,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：脊髄損傷、マイクロサージャリー、血管柄付き神経移植、脊髄再生

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は現在日本での患者数がおよそ10万人、毎年約5千人が新たに受傷していると言われている。破壊された脊髄を再生し、再び機能を取り戻すことは全世界の脊髄損傷患者共通の願いであるが、未だ根本的な治療法は確立されていない。近年動物実験モデルにおいて、種々の組織・細胞移植により脊髄の再生、機能回復が得られたとする報告が相次ぎ脚光を浴びてきた。最近では脊髄損傷に対するiPS細胞移植療法の可能性についても検討されている[Nakamura M et al. Exp Neurol 2001;169:407-15], [Nakamura M et al. Exp Neurol 2003;184:313-25]。しかし、脊髄内での移植細胞の動態解析が不十分な点も多く、細胞の生着・分化には多くの困難が存在している。iPS細胞を神経幹細胞にあらかじめ分化させた上で移植しても、脊髄としての組織が再生されるには神経細胞やグリア細胞が立体的に正しく配置される必要があり、現在のところその技術が開発されていないという問題点が存在している。この問題点解決のためのブレイクスルーとして、我々は神経幹細胞を単に移植するものではなく、「超微小血管吻合技術」を用いて血行を持った生きた脊髄の同種移植として血管柄付き脊髄移植あるいは血管柄付き末梢神経移植を行い、更に神経幹細胞移植も併用して行うことで、安定した血流を持った移植組織が立体的に正しい神経幹細胞の分化・生着に寄与してくれる可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究は、形成外科医として我々が開発してきた「超微小血管吻合技術」を用いて、脊髄損傷動物モデルに対し、血流をもった脊髄の同種移植および末梢神経の自家移植を行うというまったく新しい方法をラットおよび

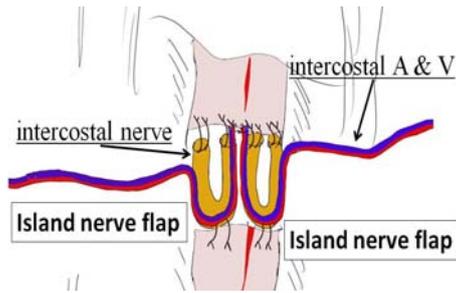
ブタで行い、マイクロサージャリー技術の脊髄損傷治療に対する可能性を追求する。さらに、神経幹細胞移植との併用療法も行うことによって再生医療が抱えていた脊髄損傷治療における問題の解決にいかに関与できるか、運動機能評価及び組織学的評価を通じて調べることを目的とする。

この研究ではこれまで我々が臨床で用いてきた超微小血管吻合技術を、脊髄損傷に応用することをコンセプトとしている。

これまでの研究と異なる独創的な点は、超微小血管吻合技術を用いて血流を有した脊髄移植または末梢神経移植を行うこと、さらに神経幹細胞移植と血管柄付き脊髄移植を併用して行うことで、安定した血流を持った移植脊髄組織が立体的に正しい神経幹細胞の分化・生着に寄与してくれる可能性に着目していることである。これは、今まで脊髄再生研究が突き当たっていた大きな問題のブレイクスルーとなり、現在日本だけで約10万人、全世界では数百万人単位の患者さんの新たな希望になれると信じている。

3. 研究の方法

過去にラットで肋間神経を束ねた形で切断部に移植し、軸索伸長と機能回復が認められたという報告が世界中で注目を浴びたが[Cheng, H., et al. Science, 273: 510-513, 1996]、手技が複雑なため十分な数の追試が試みられていない。今回まず、我々は予備実験的に350gのメスのSD系ラット8匹に対し、マイクロサージャリーにより血管柄付き末梢神経移植の実験モデルを作成した。脊髄を切断し、そこへ肋間神経移植を行い、血管柄付きの場合と血管柄付きでない場合とで組織学的評価を行った。

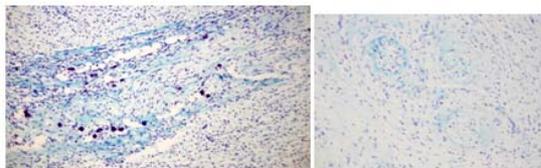


(上図) 脊髄切断部への血管柄付き島状肋間神経弁移植

4. 研究成果

血管柄付きではない移植をしたものはほとんどの場合組織が壊死・崩壊しており、生着しても瘢痕組織の増生が確認され、シュワン細胞を染色してみるとほとんど染まらなかった。血管付きのものは移植組織の形態は維持されており、瘢痕の形成も経度に抑えられている傾向がみられ、シュワン細胞は良好に染色されていた。

すなわち、血管柄付きの移植をした場合はシュワン細胞の非常に良好な生着が得られた。また、線維性瘢痕を抑えることが中枢神経再生の問題点を克服するポイントであることが再生医療の分野でも指摘され続けており、マイクロサージャリーによる血行を有した神経の移植はこの問題のブレイクスルーになり得ると考えられた。



Vascularized nerve

Free nerve

(上図) KB染色によるシュワン細胞の比較

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 **Vascularized Nerve Flap for Spinal Cord Repair -a preliminary study-**
ePlasty, volume11, march 16, 2010. (査読あり)

Kikuchi Kazuki, Mihara Makoto, Narushima Mitsunaga, Iida Takuya, Koshima Isao

②

Potential of vascularized spinal cord transplantation for pediatric central nervous system tumors

Academic Collaborations for Sick Children, Vol.2 No.1, 2010. (査読あり)

Kikuchi Kazuki, Mihara Makoto, Narushima Mitsunaga, Iida Takuya, Uchida Gentaro, Koshima Isao

[学会発表] (計9件)

①2009年6月21日 第24回神経組織の成長再生移植研究会 (GRT研究会)

於 伊香保温泉ホテル天坊

②2009年11月12日 第44回日本脊髄障害医学会

於 東京国際フォーラム

③2010年3月5日 1st European Meeting on Supra microsurgery

Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain

④2010年4月7日 第53回日本形成外科学会総会

於 ANAクラウンプラザホテル金沢

⑤2010年5月22日 第24回神経組織の成長再生移植研究会 (GRT研究会)

於 大阪府立大学医学部

⑥2010年9月2日 6th International Muscle Symposium

The University of Vienna, Wien, Austria

⑦2010年9月16日 第19回日本形成外科学会基礎学術集会

於 パシフィコ横浜

⑧2010年10月22日 第45回日本脊髄障害医学会

於 長野県松本文化会館

⑨2010年11月18日 第37回日本マイクロサージャリー学会学術集会

於 愛知県産業労働センター

[図書] (計0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

①

掲載誌

『**脊髄損傷ラットに対する血管柄付き末梢神経移植に成功**』

菊池和希

医学専門紙 Medical Tribune .2010 年 5 月
20 日 (VOL. 43 NO. 20) p. 38.

[概要]本研究STEP1 において、脊髄切断部に対する血管柄付き島状肋間神経弁が移植後良好に生着し、脊髄内の中枢神経線維がある程度肋間神経移植組織内に入り込んできていることを組織学的に示した。これは血管柄付き末梢神経移植が脊髄という中枢神経に対しても成功した初めての報告である。この報告は 2010 年 4 月の日本形成外科学会総会で最初に行い、後に医学専門紙 Medical Tribuneに掲載された。

②

研究関連ホームページ

東京大学学術連携研究会

URL:

http://gakujutu.umin.jp/ACSC/ACSC2010_2_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 和希 (KIKUCHI KAZUKI)

東京大学 医学部附属病院 特任臨床医

研究者番号：40508090

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：