

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591630

研究課題名（和文）

遺伝子移入骨髄幹細胞とコンドロイチナーゼABCを利用した哺乳動物脊髄再生

研究課題名（英文） Spinal cord regeneration with infusion of Ch-ABC and transplantation of bone marrow stem cells in the mammal.

研究代表者

平野 健一 (HIRANO KENICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50566974

研究成果の概要（和文）：

哺乳動物における脊髄損傷後の運動、知覚機能不全の改善作用につき明らかにすることを目的として研究を行った。齧歯類と同様、脊髄損傷後のビーグル犬においても GDNF 発現骨髄幹細胞とコンドロイチナーゼ ABC の効果が確認された。脊髄損傷後における、脊髄再生において、コンドロイチナーゼ ABC 0.05U/200 μ L が運動機能回復において至適投与量であった。我々は、コンドロイチン硫酸以外にもケラタン硫酸の脊髄再生阻害作用についても証明した (J Neurosci. 2010 28;30(17):5937-47)。コンドロイチン硫酸分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC の有効性に加え、ケラタン硫酸分解酵素であるケラタナーゼ II の有効性についても証明した (至適濃度：0.05U/200 μ l) (J Neurosci. 2011 Nov 23;31(47):17091-102.)

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the recovery of motor and sensory function after spinal cord injury in the mammal. The efficacy of GDNF-expressing bone marrow stem cells and Ch-ABC for spinal cord injury in the beagle dogs was demonstrated as in the rodents. The optimal density of Ch-ABC was 0.05U/200 μ l for the recovery of motor function. We also demonstrated the inhibitory function of keratan sulfate for spinal cord regeneration. The efficacy of keratanase II; catabolic enzyme of keratan sulfate, for spinal cord regeneration was also demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脊椎外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄再生、コンドロイチナーゼ ABC、脊髄損傷、骨髄幹細胞、GDNF、遺伝子導入、ケラタナーゼ

1. 研究開始当初の背景

急性脊髄損傷は人体が被る外傷のうち最も悲惨なものの一つである。急性脊髄損傷の発生率は若い世代で高いが、最近では高齢化社会に伴って高齢者においても転倒によって脊髄損傷を受傷する率が上昇している。この脊髄損傷が、個人と社会に与える肉体的、精神的、経済的な負担は極めて大きく社会問題にもなっている。分子生物学的研究の進歩と同時に、脊髄損傷における病態解明は進んできたが、まだ未知な部分も多く、治療に関しては確立されていない。脊髄損傷が起こると、急性期（損傷後10日まで）には炎症反応が主体であり、亜急性期から慢性期（損傷後10日以後）には脊髄保護を主体とした修復反応が起こるとされており、我々は急性期に神経障害性に働くこととされる iNOS の動態、また亜急性期に神経保護的に働く栄養因子 NGF、GDNF の動態を平成7年から継続的に行ってきた研究で明らかにしてきた。その結果、急性期の iNOS 産生を抑制することで、脊髄炎症による脊髄空洞化を減少させ、また脊髄栄養因子である NGF、GDNF を亜急性期に投与あるいは増幅させることによって脊髄再生を促すことが可能であると結論した。

2. 研究の目的

我々は目的とする遺伝子を倫理的に問題となっていないウイルスベクターは使用せずに、有効かつ安全に遺伝子の導入ができるヌクレオフェクション法で可能とし、また多分化能を有する自己由来の骨髄由来幹細胞を遺伝子導入細胞として採用し、神経細胞への分化も可能とした。また損傷脊髄局所において、骨髄間質細胞に GDNF を強制発現させることに成功し、軸索伸長と神経回路の再構築を図り、臨床応用への可能性を模索する段階まで到達した。GDNF 産生遺伝子をヌクレオフェクション法で自己骨髄由来幹細胞に強制発現させ、この細胞移植を行うのと同時に、コンドロイチン硫酸の分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を投与することによって、脊髄再生が促進される事が明らかとなった。今回の研究目的は以下の2点を明らかにすることである。

1：Ch-ABC の投与時期、量、期間について検討を加え、至適時期、量を決定する

2：早期臨床に応用するために、哺乳類であるビーグル犬を対象に安全性の確認と脊髄再生効果の有無を検討する。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬脊髄損傷モデルの作成

ビーグル犬を静脈麻酔後、第9胸椎を椎弓切除し、重錘落下法（IHインパクト使用）により急性脊髄不全損傷モデルを作成。

(2) 細胞採取

ビーグル犬の骨盤骨髄から採取した骨髄細胞を培養する。

(3) 神経栄養因子の過剰発現とコンドロイチナーゼABCの投与

①グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）遺伝子をヌクレオフェクション法を用いて培養骨髄細胞に遺伝子導入し、GDNFを強制発現させる。このGDNF強制発現骨髄細胞を脊髄損傷後の脊髄の空洞部に移植する。

②神経栄養因子を強制発現させるもう一つの方法として、イミュノフィリンリガンドとして作用する、疎水性ジペプチド（ロイシン、イソロイシン）を培養骨髄細胞に作用させ、各種神経栄養因子（NGF、BDNF、GDNFなど）を強制発現させる方法を試みる。

③コンドロイチナーゼABCは椎弓切除した部分にオスモチックポンプを使用して脊髄損傷後から14日間持続投与する。コンドロイチナーゼABCの投与量は1.0 U/mlで行う。

④神経栄養因子の定量

各種神経栄養因子（NGF、BDNF、GDNFなど）をウエスタンブロット法で評価。

⑤組織学的評価

軸索の評価（Fluorogold）、神経細胞（beta-tubulin、MAP2）、アストロサイト（GFAP）、マイクログリア（Iba1、ED2、OX-42）、オリゴデンドロサイト（Olig2）の各種免疫染色を行い、軸索の再生、構成細胞の識別を組織学的に評価する。組織学的な定量を行う。

⑥運動機能評価

Inclined plate test

BBBスコア

グリッドテスト

3種類の運動機能評価を行って微細な変化をとらえることが可能となる

⑦知覚機能評価

Hot plate test

このホットプレートテストは感覚過敏がおればすぐさま足をプレートから離すが、感覚障害、感覚鈍麻が強いとプレートから足を離す時間が長くなる。

⑧電気生理学的評価

Motor evoked potentials (MEPs)

Somato sensory evoked potential (SSEP)
筋電図を針電極を使用して計測し、運動機能回復を評価。AmplitudeとLatencyで評価

4. 研究成果

結果

〈ウエスタンプロット法による神経栄養因子の定量〉

Ch-ABC投与群(以下ABC群)の損傷脊髄において、非投与群と比較してNGF, BDNF, GDNFの有意な発現上昇を認めた(投与2週後)。

〈免疫染色による組織学的評価〉

投与2週後

ABC群において、astrocyte microgliaの増殖が抑制されており、oligodendrocyteに関しては非投与群と有意な差を認めなかった。損傷部周囲の軸索再生に関してはABC群において有意に再生線維の増殖を認めた。

〈後肢運動神経機能評価〉3分間歩行させ、グリッドを下肢でグリップできた割合を%グリップ値とした。ABC群において、生理食塩水投与群と比較して%グリップ値が高値を示し、ABC群における後肢運動神経機能回復が確認された。

〈後肢知覚神経機能評価〉ビーグル犬後肢を55℃に温めたホットプレートの上に乗せ、後肢を放すまでの時間を計測した。生理食塩水投与群では、損傷前に比して、損傷後、経時的に反応時間が短縮していき、熱刺激に対して過敏反応を示した。一方、ABC群では、損傷早期には生理食塩水投与群と同様の傾向を示したが、損傷3週間後から5週間後には徐々に過敏反応は軽減し、損傷8週後には、損傷前とほぼ同程度の反応時間となり、知覚神経機能回復の回復が認められた。

〈電気生理学的評価〉

MEPs SSEPともに、非投与群において潜時遅延・振幅低下・伝導速度低下あり、ABC群における神経機能回復が示唆された。

以上の結果より、ビーグル犬のABC投与群において、非投与群と比較して有意な運動・知覚神経機能の回復を認めた。齧歯類だけでなく、哺乳動物でもGDNF産生遺伝子をヌクレオフェクション法で自己骨髄由来幹細胞に強制発現させ、この細胞移植を行うのと同時に、コンドロイチン硫酸の分解酵素であるコンドロイチナーゼABCを投与することによって、脊髄再生が促進される事が明らかとなった

我々は、コンドロイチン硫酸以外にもケラタン硫酸に軸索再生阻害機能があることを明らかにした。さらに、ラットにおいてケラタン硫酸分解酵素であるケラターゼIIにもCh-ABCと同様の軸索再生機能があることを示した。

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13件)

1. Hirano K., Imagama S., Hasegawa Y. Ito Z. Muramoto A. Ishiguro N. The influence of locomotive syndrome on health-related quality of life in a community-living population Mod. Rheumatol in pres. 2013(査読有)
2. Hirano K., Imagama S., et al Surgically treated cases of lumbar spondylolysis and isthmic spondylolisthesis-- A multicenter study J Spinal Disord Tech. in press. 2013(査読有)
3. Muramoto A, Imagama S, Ito Z, Wakao N, Ando K, Tauchi R, Hirano K, Matsui H, Matsumoto T, Matsuyama, Y, Ishiguro N. The cutoff amplitude of transcranial motor-evoked potentials for predicting postoperative motor deficits in thoracic spine surgery. Spine. 38(1):E21-7. 2013(査読有)
4. Hirano K, Imagama S, Oishi Y, Kanayama Y, Ito Z, Wakao N, Matsuyama Y, Ishiguro N. Progression of cervical instabilities in rheumatoid arthritis patients having lower extremity arthroplasty after 5.7 years after first arthroplasty Mod Rheumatol. Sep;22(5):743-9. 2012(査読有)
5. Hirano K., Imagama S., et al Primary spinal cord tumors: review of 678 surgically treated patients in Japan- A multicenter study Eur Spine J. 21:2019-2026. 2012 (査読有)
6. Hirano K., Imagama S., Hasegawa Y. Wakao N. Muramoto A. Ishiguro N. Effect of back muscle strength and sagittal spinal imbalance on locomotive syndrome in community living Japanese men Orthopedics. 35(7):e1073-8. 2012(査読有)
7. Hirano K., Imagama S., Hasegawa Y.

- Wakao N, Muramoto A, Ishiguro N. Impact of spinal imbalance and back muscle strength on locomotive syndrome in community living elderly people. J Orthop Sci 17:532-537. 2012 (査読有)
8. Tauchi R, et al The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. JNeuroinflammation 9:53, 2012 (査読有)
 9. Tauchi R, et al ADAMTS-13 is produced by glial cells and upregulated after spinal cord injury Neuroscience Letters 517(1) 1-6, 2012 (査読有)
 10. 村本明生, 松山幸弘, 今釜史郎, 伊藤全哉, 若尾典充, 安藤圭, 平野健一, 田内亮吏, 石黒直樹 胸椎手術における術後麻痺と CMAP 波形の振幅の絶対値. 脊髄機能診断学 34:139-143, 2012, (査読有)
 11. 平野健一 関節リウマチ患者の破壊性頸椎病変に対する後頭骨胸椎固定術の手術合併症と対策 整形外科 62 (10) 1135-38 2011 (査読有)
 12. Imagama S et al. Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. J Neurosci. 2011 23:31(47):17091-102. (査読有)
 13. 村本明生, 松山幸弘, 今釜史郎, 伊藤全哉, 若尾典充, 安藤圭, 平野健一, 田内亮吏, 石黒直樹 胸椎 OPLL 手術における CMAP 波形変化のタイミング. 脊髄機能診断学 33:131-136, 2011, (査読有)
- [学会発表] (計 15 件)
1. 田内亮吏 ADAMTS-13 のグリア細胞による産生と脊髄損傷におけるその発現 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012/10/27 名古屋
 2. 今釜史郎, 伊藤全哉, 安藤圭, 田内亮吏, 村本明生, 松井寛樹, 松本智宏, 村山宣人, 森田泰博, 門松健治, 石黒直樹 bFGF 様新規化合物による脊髄損傷治療_日本整形外科学会基礎学術集会 2012. 10. 26-27 名古屋
 3. 今釜史郎, 伊藤全哉, 田内亮吏, 新城龍一, 門松健治, 石黒直樹 脊髄損傷におけるプロテオグリカンの脊髄可塑性抑制のメカニズム 中部日本整形外科学会災害外科学会 2012. 10. 5-6 福井
 4. 平野健一 脊髄変性疾患とケラタン硫酸 日本整形外科学会基礎学術集会 2012. 10 名古屋
 5. Hirano K, Imagama S, et al. Epidemiology of primary spinal cord tumors in Japan- A multicentre study spine across the sea 2012.7 Kauai (USA)
 6. 平野健一 今釜史郎他 ロコモティブ シンドロームは腰椎疾患との関連が強い-住民検診における足腰指数 25 と JOABPEQ を用いた検討第 85 回日本整形外科学会学術集会 2012.5 京都
 7. 平野健一 今釜史郎 他 腰椎分離症・分離すべり症の手術症例検討 第 40 回 日本脊椎脊髄病学会 2012.4 東京
 8. Hirano K, Imagama S, et al. Progression of cervical instabilities in patients with rheumatoid arthritis 5.7 years after their first lower limb arthroplasty 3rd CSRS-AP 2012.4 福岡
 9. 平野健一 今釜史郎 他神経線維腫症 Type1 の多発脊髄腫瘍による頸髄症症例の手術経験第 13 回圧迫性脊髄症研究会 2012.1 東京
 10. 平野健一 今釜史郎 若尾典充 村本明生 石黒直樹 長谷川幸治 一般住民における腰部脊柱管狭窄症と脊椎アライメント・可動性との関係 第 84 回日本整形外科学会学術集会 2011.5 横浜
 11. 平野健一 今釜史郎 若尾典充 村本明生 石黒直樹 長谷川幸治 ロコモティブシンドロームと脊椎アライメント・可動性との関係 第 84 回日本整形外科学会学術集会 2011.5 横浜
 12. 平野健一 今釜史郎 石黒直樹 腰部脊柱管狭窄症として治療されていたが、PAD に対する治療で間欠性跛行が改善した 1 例第 35 回 PG 研究会 2011.5 名古屋
 13. 平野健一 今釜史郎 若尾典充 村本明生 石黒直樹 長谷川幸治腰部脊柱管狭窄症と脊椎アライメント・可動性との関係-地域住民検診による検討 第 40 回 日本脊椎脊髄病学会 2011.4 東京
 14. 平野健一 今釜史郎 若尾典充 村本明生 石黒直樹 長谷川幸治ロコモティブシンドロームと脊椎アライメント・可動性との関係-地域住民検診における検討 第 40 回 日本脊椎脊髄病学会 2011.4 東京
 15. 平野健一 今釜史郎他 脊椎手術におけるインストゥルメント折損例の検討

第20回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 2011.1 久留米

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 健一 (HIRANO KENICHI)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50566974

(2) 研究分担者

今釜 史郎 (IMAGAMA SHIRO)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40467288

安藤 圭 (ANDO KEI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：40566973

田内 亮吏 (TAUCHI RYOJI)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50584744

村本 明生 (MURAMOTO AKIO)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90597858

松井 寛樹 (MATSUI HIROKI)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70612802

(3) 連携研究者

なし