

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：74314

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659792

研究課題名(和文) 亜急性脊髄損傷の為に人工マトリックスと成長因子を用いた臨床応用

研究課題名(英文) Treatment of subacute spinal injury by heparin-containing matrix combined with bFGF

研究代表者

平井 達也 (HIRAI, Tatsuya)

公益財団法人田附興風会・医学研究所第5研究部・研究員

研究者番号：50465952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：亜急性期脊髄損傷の問題点の一つとして脊髄組織の空洞化が挙げられる。私達は、この問題を解決するために成長因子を加えた新たな人工基質を利用した。脊髄損傷後の治療方法として様々な神経栄養因子や薬剤が利用されてきたが、私達はヘパリンを含んだ新たな人工基質にヘパリンに親和性を持つ塩基性繊維芽細胞成長因子を加えて利用した。これにより、塩基性繊維芽細胞成長因子は生体内で一月の間、その効果を持続できるようになった。私たちは部分切除術を行ったラットの脊髄にこの材料を移植し、神経再生の評価を行ってきた。その結果この材料は脊髄組織に親和性があることを認め、術後8週では神経細胞軸索突起の伸長を観察できた。

研究成果の概要(英文)：One of the problems concerning subacute spinal injury is the cavity formation in spine nerve. In the present study, we applied heparin containing novel matrix combined with basic fibroblastic growth factor (bFGF) to prevent the cavity formation. The bFGF possesses the affinity to heparin and is expected to stay on the matrix in vivo for a long time. The bFGF-attached heparin-containing matrix demonstrated the effect of bFGF in vivo for one month under physical condition. This novel matrix with bFGF strongly promoted nerve regeneration in partially dissected rat spinal cord. It was also found that this novel matrix had an affinity to the host spinal cord tissues. Elongation of axonal sprouts into the dissected nerve site was observed 8 weeks after surgery. Taken together, our novel matrix combined with bFGF may provide a new strategy to treat spinal cord injury.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 脊髄損傷 人工材料 成長因子

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、交通事故や、運動中の事故などにより、我が国では毎年 3000 人以上の件数が報告されている。殊に、その受傷時期が早いほど、長い年月を車椅子での生活、若しくはベッドから離れられない生活を強いられている。更に、以前までは神経細胞は再生しないものとされていた時期があり、治療の確立には未だ確固たるものがない。然し、近年では世界各地で神経細胞の再生実験が行われ、今後の臨床応用の期待が持たれる。私達は、特許をとっている組織再生の為に特殊生体用ゲルを利用し、そこへ成長因子を加えることで、更なる神経細胞の再生の増強を促し、その有効性と、動物実験による安全性の確認を行い、臨床治療への応用へと誘う。

a) 成長因子として

既に b-FGF は、褥創、熱傷潰瘍、下腿潰瘍、などの治療に利用されており、その安全性も確立されている。又、神経再生としての実験での効果も報告されており (Rabchevsky AG, et al. b-FGF functional recovery following severe spinal cord injury to the rat. *Exp Neur.* 2000 ; 164:280-91.) その効果にも期待できる。現在、私達は人工マトリックスに b-FGF を加えて神経成長のための環境の増強を調べている。更には、HIF-1 を含めた成長因子の検討を行うことで大きな効果を得ることを目標としている。

b) 生体用特殊ゲルとして

現在、人工コラーゲンの開発、臨床応用が行われているが、人工コラーゲンの臨床使用が我が国で承認されていない時から、私達はヘパリン/アルギン酸ゲルを用いてその成果を報告してきた。臨床例では外傷後の指神経欠損、神経バイオプシ - 後の欠損症例、動物実験では、末梢神経回復と神経細胞軸索突起の伸長を確認することができた (K.Kataoka, et al. Alginate enhances elongation of early regeneration axons in spinal cord of young rats. *Tissue Engineering.* 2004;10:493-503) などの報告もある。

2. 研究の目的

脊髄損傷での急性期、及び亜急性期の治療の目的として、神経細胞軸索突起の伸長を試みる。急性期における脊髄損傷の治療目的のひとつとして細胞移植術があるが、移植細胞は一定期間後には脊髄から消失することが報告されている。又、亜急性期においては、移植細胞が宿主脊髄損傷部位に組み込まれ組織の空洞化が起きる。空洞化した部位には、細胞が成長するための足場となる蛋白が無く、その再生は望めない。そこで、私達は足場となる蛋白の代わりとなる人工マトリックスを調整、利用し、更に成長因子として HIF-1 などの因子を誘導させる状態で移植し、細胞が再生するための環境を増強させ、神経細胞軸索突起の伸長を評価し、その安全性を調べる。

3. 研究の方法

亜急性期脊髄損傷治療方法の探索を行う。

- 神経細胞への成長因子の有効性を調査する。
- 人工材料であるヘパリン/アルギン酸ゲルの有効性と改良点を調査する。
- 成長因子と人工材料の相乗効果を確認する。
- 更に有効と考えられる成長因子と抑制因子の検索を行う。

神経細胞への成長因子の有効性のちょうさとして、本研究で使用する b-FGF は、血管再生作用と神経軸索突起の伸長を促すことで知られているが、フィブラスプレーとして科研製薬株式会社より販売されており、褥創、熱傷潰瘍、下腿潰瘍、などの治療に広く利用されており、その安全性も確立されている。然し、神経軸索突起を伸長させることができる様々な因子も考えられることから、ラット骨髄間質細胞を培養し、その培養液から有効因子を同定できれば、ヘパリン/アルギン酸ゲルと共に移植術を行い、その効果を確認する。この方法は、自家骨髄間質細胞より分離できるので、臨床応用においても比較的容易に行えるものとする。

人工材料であるヘパリン/アルギン酸ゲルの有効性の確認として、

現在のヘパリン/アルギン酸ゲルの調整方法
アルギン酸ナトリウムにヘパリンを加える
/milliQ water

EDA 2HOSu と EDC HCl を溶解させる

滅菌テフロントレイに流し入れる

25 で 72 時間静置しゲル化させる

ECF で洗浄し吸光度計を用いて純度を測定

milliQ water にて洗浄後、凍結乾燥させる

以上の方法で人工材料を作成し、ガンマ線滅菌を行い、ヘパリン/アルギン酸ゲルに b-FGF を加え (M.Tanihara, et al. Sustained release of basic fibroblast growth factor and angiogenesis in a novel covalently crosslinked gel of heparin and alginate. 2004; 71: 596-601) 脊髄損傷部位に移植する。

亜急性脊髄損傷モデルの樹立と治療方法

- 正常 SD 系ラットを用いる。
- イソフルランを使ったガス麻酔装置により深麻酔科で以下の処置を行う。

3. 脊髄の部分切除は、1x1x1mm の範囲で片側のみを実態顕微鏡下の微小手術で行う。
4. 1x1x1mm のヘパリン/アルギン酸ゲルに b-FGF を加え、切除部位に移植する。
5. 移植、縫合後、翌日より約 3 ヶ月間、行動の観察と病理学的検索を行う。

以上の方法は、京都大学動物実験倫理委員会ガイドライン、及び財団法人田附興風会医学研究所北野病院における動物実験に関する内規及び基本方針、に沿って行う。また、使用するヘパリン/アルギン酸ゲルと b-FGF の量は M. Ohta, et al. Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. J. Biomedical Master Res. 2004; 71:661-668. を参考にして行う。評価方法は、運動機能をみるための観察による方法はポイント式で行い、神経軸索突起の伸長は免疫組織化学染色と化学染色を用いて行う。

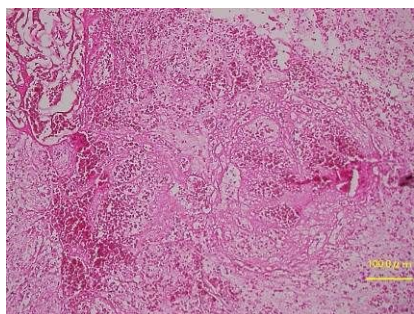
4. 研究成果

平成 24 年度

21 回日本形成外科学会基礎学術集会（福島）

12 回日本再生医療学会総会（神奈川）

上記学会において、脊髄損傷の治療方法の可能性として b-FGF を加えた生体用特殊ゲルの効果を報告した。亜急性期脊髄損傷の問題点の一つとして脊髄組織の空洞化が挙げられる。私達は、この問題を解決するために成長因子を加えた新たな人工材料を利用し検索してきた。脊髄損傷で起きる亜急性以降の組織の空洞化として、ラットの脊髄の片側を部分切除することで脊髄組織の空洞化に相当すると考え、微小手術によりラット脊髄損傷モデルを作成した。同部位に部分切除部位と同じ大きさに調整した塩基性繊維芽細胞成長因子を加えた人工材料を移植し継続的に組織学的観察を行ってきた。術後 1 週では、H&E 染色の顕微鏡観察結果から人工材料は脊髄組織との境界が不明瞭となり、これは今回利用した人工材料が脊髄組織に対して親和性を持っているものと考えられた(写真 1)



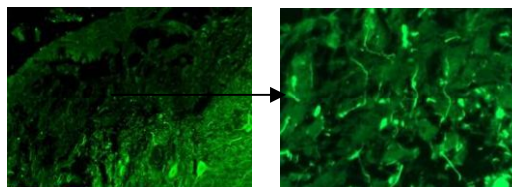
(写真 1)

平成 25 年度

22 回日本形成外科学会基礎学術総会（新潟）

上記学会において、b-FGF を加えた生体用特殊ゲル移植後 8 週では神経細胞軸索突起伸

長とミエリンシースの確認を報告した。また、この人工材料は脊髄組織に対して十分な親和性を持ち、塩基性繊維芽細胞成長因子を徐放することで脊髄組織に起きる空洞化を補いながら神経細胞軸索突起の伸長の為の環境を整えたと考えた(写真 2.3)。



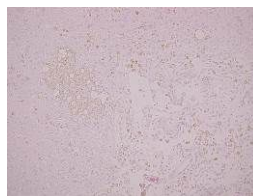
(写真 2)

(写真 3.)

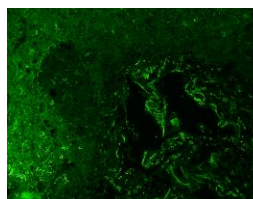
(写真 2. 損傷脊髄人工材料移植部。矢印写真 3. 移植中心部での神経軸索突起の伸長)

平成 26 年度

23 回日本形成外科学会基礎学術総会（長野）
上記学会において、生体用特殊ゲルのみの移植と b-FGF を加えた生体用特殊ゲルの比較検討を行い、b-FGF を加えた生体用特殊ゲルでは血管新生が多く観察され(写真 4)、今後の神経細胞軸索突起伸長のための環境を整えていることを報告した(写真 5)。



(写真 4. 血管新生)



(写真 5. 神経軸索突起)

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)

Yoshihisa Suzuki, Namiko Ishikawa, Kaoru Omae, Tatsuya Hirai, Katsunori Ohnishi, Norihiko Nakano, Hidetaka Nishida, Toshio Nakatani, Masanori Fukushima, and Chizuka Ide Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. Restor Neurol Neurosci. 査読有、2014; 32(4): 473-82.

〔学会発表〕(計 4 件)

bFGF 徐放アルギン酸ゲルを用いた脊

髄損傷後の神経再生の評価、平井達也、
他、23 回日本形成外科学会基礎学術総
会 2014 年 10 月 9 日(長野県松本市キ
ッセイ文化ホ - ル)

bFGF徐放ヘパリン/アルギン酸を用い
た急性期脊髄損傷治療の評価、平井達
也、他、22 回日本形成外科学会基礎学
術総会 2013 年 11 月 8 日、朱鷺メッセ
(新潟県新潟市)

bFGF徐放効果のあるヘパリン/アルギ
ン酸を用いたラット急性期脊髄損傷治
療の効果、平井達也、他、12 回日本再
生医療学会総会、2013 年 3 月 21 日、
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

bFGF徐放効果を持ったヘパリン/アル
ギン酸を用いたラット急性期脊髄損傷
での神経再生の評価、平井達也、他、
21 回日本形成外科学会基礎学術集会、
2012 年 10 月 5 日、ホテルリステル猪
苗代(福島県耶麻郡)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平井 達也 (HIRAI, Tatsuya)
公益財団法人田附興風会・医学研究所第 5
研究部・研究員
研究者番号：50465952

(2)研究分担者

鈴木 義久 (SUZUKI, Yoshihisa)
公益財団法人田附興風会・医学研究所第 5
研究部・研究主幹
研究者番号：30243025