

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462213

研究課題名(和文)慢性期脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞移植による革新的治療法の開発

研究課題名(英文) INTRAVENOUS INFUSION OF MESENCHYMAL STEM CELLS PROMOTES FUNCTIONAL RECOVERY IN A MODEL OF CHRONIC SPINAL CORD INJURY

研究代表者

森田 智慶 (Morita, Tomonori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60723343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脊髄損傷モデルの慢性期に対し骨髄間葉系幹細胞(MSC)の経静脈的移植を行い、治療効果を検討した。T9高位の脊髄を圧挫し、重度脊髄損傷モデルを作製した。損傷10週後にMSCを経静脈的に移植した。後肢の麻痺は移植翌週から改善が見られ始め、対照群よりも有意な回復を得た。移植したMSCの数%が損傷部に集積した。血液脊髄関門の機能は、損傷後11週が経過していても不安定であったが、MSCの移植により速やかに安定し、このことが移植後早期の麻痺の回復に寄与していると考えられた。また、微小血管系の新生、損傷軸索の側枝形成、脱髄軸索の再有髄化などを認め、MSCの作用が多段階に生じていることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow improves behavioral function in rat models of acute spinal cord injury (SCI). In this study, MSCs were infused 10 weeks after the induction of a severe contusive SCI. Locomotor function was assessed until 20 weeks post-SCI. Motor recovery was greater in the MSC group with rapid improvement beginning in earlier post-infusion times than in the vehicle group. Blood spinal cord barrier (BSCB) integrity was assessed by the intravenous infusion of Evans Blue with quantitation of its leakage, and that was reduced in the MSC group. There was extensive remyelination around the lesion center and increased neovascularization/sprouting of the nerve fibers. These results indicate that the MSC therapy results in functional improvements that is associated with structural changes in the chronically injured spinal cord including stabilization of the BSCB, axonal sprouting/regeneration and remyelination.

研究分野：整形外科学

キーワード：mesenchymal stem cell spinal cord injury transplantation

1. 研究開始当初の背景

実験的脊髄損傷 (spinal cord injury: SCI) に対し、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSC) を移植することで機能回復が得られるという報告が散見される^{1,2}。しかし、その多くは急性期モデルを対象としており、慢性期モデルを用いた実験の報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット SCI モデルの慢性期を対象とし、MSC を経静脈的に移植することで、治療効果が得られるのかどうかを検討することである。

3. 研究の方法

雄 SD ラットの第 9-10 胸椎高位を IH インパクトで圧挫し、重度 SCI モデルを作製した。損傷 10 週後、無作為に vehicle (対照) 群、MSC 群に分け、前者には培養液のみを、後者には MSC1.0x10⁶ 個を静脈内投与した。行動評価には、Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) score を用い、損傷 20 週後まで 1 週間ごとに観察を行った。また GFP トランスジェニックラットから採集・培養した MSC (GFP-MSC) を経静脈的に移植し、脊髄損傷部に集積した GFP-MSC を定量解析した。さらに、損傷 11 週後 (移植 1 週後) に Evans Blue (EvB) を静脈内投与し、脊髄組織内の色素漏出の程度を評価することで、血液脊髄関門 (Blood Spinal Cord Barrier: BSCB) の機能について解析した。加えて、免疫組織学的解析なども行い、微小血管系の修復、損傷軸索の側枝形成、脱髄軸索の再有髓化などについての検討も行った。

4. 研究成果

(1) 運動機能の解析：脊髄損傷後、後肢の麻痺の自然回復は 6 週前後でプラトーに達した。移植後、MSC 群では翌週より麻痺の改善が見られ始め、対照群と比較し有意な回復が得られた (図 1)。

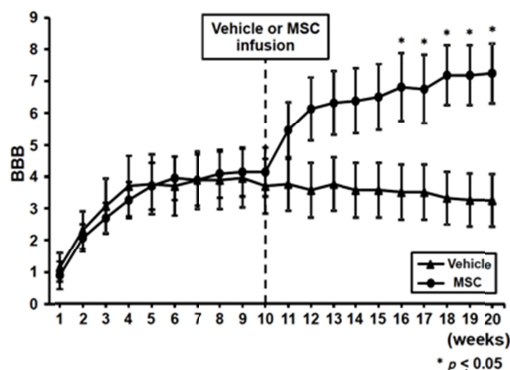


図 1. 慢性期脊髄損傷の実験的動物モデルに対する MSC 移植後の運動機能の改善 (BBB スコア) (Morita et al., Neuroscience, 2016)

(2) GFP-MSC の定量解析：経静脈的に移植した GFP-MSC を定量解析した結果、少なくとも約 5.5% が脊髄の損傷部に集積していた (図 2)

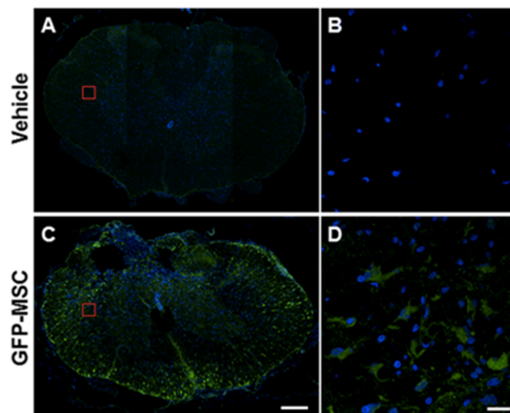


図 2. GFP-MSC の脊髄損傷部への集積 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

(3) EvB 解析：対照群では、静脈内投与した EvB の色素が損傷部を中心とした脊髄組織に漏出しており、血液脊髄関門の機能が低下していた (図 3)。一方 MSC 群では、この漏出が対照群よりも有意に小さく、血液脊髄関門の修復が得られたと考えられた。

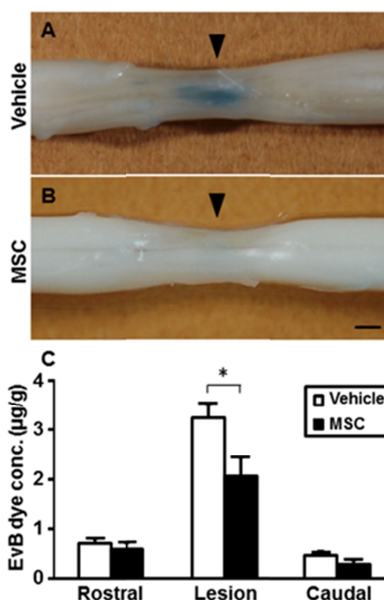


図 3. 慢性期脊髄損傷モデルの血液脊髄関門機能評価 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

(4) 微小血管系の解析：MSC 群は対照群よりも、脊髄損傷部の血管が豊富で、pericyte (周皮細胞) の被覆率も有意に高かった (図 4)。微小血管系の修復が MSC の移植により促進され、このことが血液脊髄関門の機能改善に寄与していると考えられた。

(5) 再有髓化軸索の解析：MSC 群の脊髄損傷部を電子顕微鏡、共焦点顕微鏡で観察したところ、末梢神経型の髄鞘を持った軸索が認められ、損傷軸索の再有髓化が生じていること

を確認した(図 5)。また、この再有髓化軸索数を、MSC 群と対照群で比較したところ、MSC 群で有意に多く認められた(図 6)。

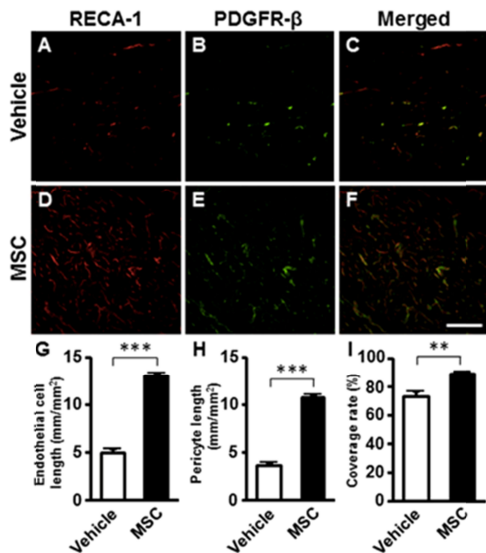


図 4. 脊髄損傷部における微小血管系の免疫化学的解析 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

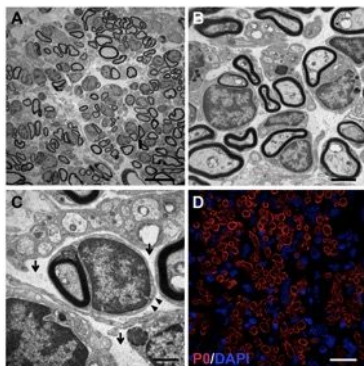


図 5. 電子顕微鏡、免疫染色により観察した再有髓化軸索

(Morita et al., Neuroscience, 2016)

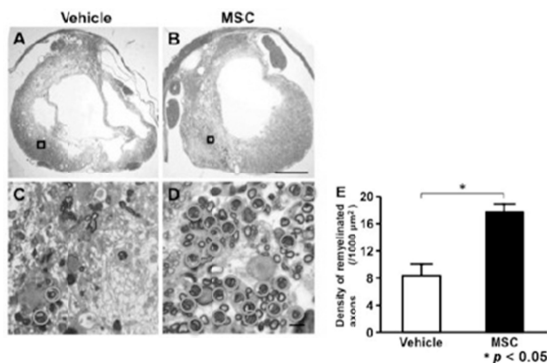


図 6. トルイジンブルー染色による、脊髄損傷部の再有髓化軸索の評価 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

(6) 損傷軸索の免疫組織学的解析: 脊髄損傷部を中心とした部位の皮質脊髄路における損傷軸索の側枝形成、前角におけるセロトニン線維の再生を、免疫組織化学的に解析した(図 7, 8)。それぞれ、損傷部の吻側と尾側を

比較したところ、ともに損傷部尾側において MSC 群で有意に高値となった。このことから、MSC 移植は、損傷された軸索の再生に貢献したものと考えられた。

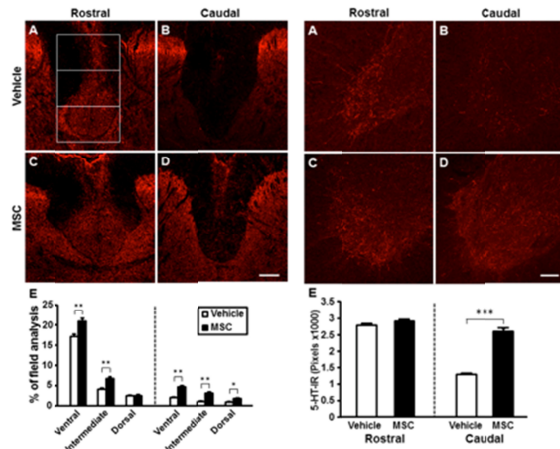


図 7. 皮質脊髄路の免疫化学的解析 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

図 8. セロトニン線維の免疫化学的解析 (Morita et al., Neuroscience, 2016)

(7) 考察および結論

慢性期 SCI モデルに対し、MSC の経静脈的移植により麻痺の改善を認めた。慢性期であっても BSCB の機能は低下していたが、移植後に速やかな安定化が得られ、移植早期における運動機能の回復に寄与していると考えられた。さらに、微小血管系の修復、損傷軸索の再生、および脱髄軸索の再有髓化などの MSC の作用を確認し、これらが協奏的に働くことで麻痺の回復に貢献していると考えられた。

< 図表説明 >

図 1 損傷直後は下肢の運動はほぼ消失した。その後の自然回復がある程度認められたが、6 週前後でプラトーに達した。損傷 10 週後に MSC の経静脈的移植を行ったところ、移植 1 週間後から後肢の麻痺の改善が見られ始め、対照群と比較し有意な回復が認められた。

図 2 蛍光顕微鏡により GFP-MSC を定量解析した。MSC 移植群では、脊髄損傷部を中心とした箇所に細胞が集積していた。A, B: 対照群の脊髄損傷部。それぞれ低倍率、高倍率。C, D: MSC 群の脊髄損傷部。それぞれ低倍率、高倍率。

図 3 脊髄損傷後 11 週 (移植後 1 週) のラットに生体用色素である Evans Blue を静脈内投与した。投与 6 時間後に脊髄を採取し、脊髄組織内に漏出した色素量を解析した。A, B: 対照群では損傷部を中心とした部位に Evans Blue が顕著に漏出していた。

C: 脊髄の損傷部、その吻側、尾側の切片(各1cm)の中に沈着した Evans Blue の色素量を評価した。損傷部において、MSC 群は対照群よりも漏出量が有意に小さかった。

図 4

血管内皮細胞を抗 RECA-1 抗体で、周皮細胞を抗 PDGFR- 抗体で染色した。

A-C: 対照群

D-F: MSC 群

微小血管の血管内皮細胞と周皮細胞の長さを計測し、両群間で比較した。

G: 血管内皮細胞の比較

H: 周皮細胞の比較

I: 血管内皮細胞に対する周皮細胞の被覆率の比較

MSC 群では対照群よりも、血管の被覆率が有意に高かった。

図 5

A-C: 電子顕微鏡を用いて、MSC 移植を行ったラットの脊髄損傷部を観察した。末梢神経型髄鞘を伴った再有髄化した軸索の存在を確認した。

D: MSC 移植を行ったラットの脊髄損傷部に対し、抗 P0 抗体で末梢神経型髄鞘を赤色に標識した。同様に、末梢神経型髄鞘を伴った軸索が認められた。

図 6

損傷 20 週後の脊髄損傷部のプラスチック切片を作製し、トルイジンブルー染色を行った。

A, C: 対照群のラットの脊髄損傷部(低倍率と高倍率)

B, D: MSC 群のラットの脊髄損傷部(低倍率と高倍率)

E: MSC 群では、対照群よりも再有髄化軸索が有意に多かった。

図 7

脊髄後索の皮質脊髄路(損傷部吻側・損傷部尾側)を抗 PKC- 抗体で染色した。

A, B: 対照群の損傷部吻側、尾側。

C, D: MSC 群の損傷部吻側、尾側。

E: 損傷部の吻側と尾側において、染色された皮質脊髄路線維量を対照群と MSC 群で比較した。MSC 群は損傷部尾側で対照群と比し、側枝形成が有意に生じていた。

図 8

脊髄前角のセロトニン線維(損傷部吻側・損傷部尾側)を抗 5-HT 抗体で染色した。

A, B: 対照群の損傷部吻側、尾側。

C, D: MSC 群の損傷部吻側、尾側。

E: 損傷部の吻側と尾側において、染色されたセロトニン線維を対照群と MSC 群で比較した。MSC 群は損傷部尾側で対照群と比し、損傷軸索の再生が有意に生じていた。

< 引用文献 >

Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. J Neurosci 2009 29:14932-14941.

Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. Brain Res 2010 1343:226-235.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Morita T, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Nakazaki M, Nagahama H, Oka S, Oshigiri T, Takebayashi T, Yamashita T, Kocsis JD, Honmou O. INTRAVENOUS INFUSION OF MESENCHYMAL STEM CELLS PROMOTES FUNCTIONAL RECOVERY IN A MODEL OF CHRONIC SPINAL CORD INJURY. Neuroscience 査読有 2016 335:221-231.

DOI:10.1016/j.neuroscience.2016.08.03

7

〔学会発表〕(計 3 件)

Morita T, et al. Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Model of Chronic Spinal Cord Injury. Orthopaedic Research Society 2017 Annual Meeting, San Diego, USA (March 2017)

森田 智慶 他、ラット慢性期脊髄損傷モデルに対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による機能回復の検討、第 35 回日本運動器移植・再生医学研究会、2016 年 9 月 24 日、広島県医師会館(広島県広島市)

森田 智慶 他、ラット慢性期脊髄損傷モデルに対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による機能回復の検討、第131回北海道整形災害外科学会、2016年6月4日・5日、函館アリーナ(北海道函館市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森田 智慶 (MORITA, Tomoori)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 60723343

(2) 研究分担者

佐々木 祐典 (SASAKI, Masanori)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号： 20538136

中崎 公仁 (NAKAZAKI, Masahito)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号： 70722461

押切 勉 (OSHIGIRI, Tsutomu)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号： 70754612

竹林 庸雄 (TAKEBAYASHI, Tsuneo)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 30347166

鰐淵 昌彦 (WANIBUCHI, Masahiko)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 30343388

山下 敏彦 (YAMASHITA, Toshihiko)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号： 70244366

(3) 連携研究者

本望 修 (HONMOU, Osamu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号： 90285007