

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10758

研究課題名(和文) 抗炎症作用に優れた微重力培養した間葉系幹細胞による胸部大動脈瘤術後対麻痺予防

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell with anti-inflammatory effect cultured under microgravity prevents paraplegia after thoracic aortic repair

研究代表者

高橋 信也 (Takahashi, Shinya)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：70423382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胸部大動脈瘤手術後の脊髄障害による対麻痺は、QOLを低下させ生命を脅かす重篤な合併症である。脊髄障害を予防することと障害された組織を再生することは、非常に重要な治療法である。優れた抗炎症作用を有する間葉系幹細胞(MSC)を微重力培養して投与したが、その結果は、通常培養したMSCと同等かそれよりも劣るとする予備実験結果となった。一方で、微重力培養したMSCでは、アポトーシス抑制効果の増強を認めた。これらは脊髄保護における炎症の意義と、微重力培養したMSCによるアポトーシス抑制による脊髄保護効果を示していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸部大動脈瘤手術後の対麻痺は、QOLを低下させ生命を脅かす重篤な合併症である。急性期および遅発性に発生する脊髄障害および脊髄の細胞死を予防することおよび障害された組織を再生することは、非常に重要な治療法である。さまざまな脊髄保護法が考案される中、1)本研究では十分に進められなかったものの、炎症の必要性を問う結果を残した。2)微重力環境により培養された間葉系幹細胞の脊髄虚血保護効果を示し、今後の治療法の改良が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：Spinal cord injury (SCI) and paraplegia after thoracic aortic surgery is devastating complication reducing quality of life. Preventing SCI and regenerating injured tissue is very important treatment. In this series we examined efficacy of mesenchymal stem cell with excellent anti-inflammatory effect cultured in microgravity, however, they had the same or inferior effects compared with MSC cultured in normal condition. On the other hand, MSC cultured in bovine serum under microgravity suppressed apoptosis more than MSC culture under normal gravity. These results implied the significance of inflammation on spinal cord protection and efficacy of microgravity in spinal cord protection.

研究分野：大動脈外科

キーワード：脊髄虚血 間葉系幹細胞 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓血管外科領域において、胸腹部大動脈瘤や大動脈解離に関連した脊髄虚血は現在の治療技術では十分な機能回復が望めないのが現状であり、下半身対麻痺など重篤な合併症を起こす。近年、多分化能を有する幹細胞を利用した再生医療が注目されている。神経領域においても重症疾患の治療を目指して再生医療が試みられているが、未だ確立されていない。移植された間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cells (MSC) が障害を受けた組織に分化して組織の修復を行うことを支持する報告は少ないが、移植された MSC は障害部位に遊走し、障害部位に浸潤する炎症細胞を抑制することによって組織の修復に働くことが報告されている (Am J Physiol Renal Physiol 289: 31-42, 2005)。さらに、MSC は T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞に対して抑制的な作用を有することが報告されている (Blood 107: 367-72, 2006; Blood 105: 1815-22, 2005)。これら免疫細胞が関与する炎症性サイトカインが炎症だけでなく、アポトーシスと関与することが指摘されている (Embo J., 19: 3325-3336., 2000)。高橋らは対麻痺予防法の研究を一貫して行ってきた。術中の脊髄虚血障害を軽減させるためのケミカルシャペロンであるトレハロース (Takahashi; J Vasc Surg, 2011) や sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA) の保護効果を報告した。小胞体ストレスの軽減する 4-PBA の大動脈内注入では、脊髄虚血再灌流における、小胞体ストレスに誘導されるアポトーシスの抑制を示した。(Mizukami, Takahashi; J Vasc Surg, 2010)。しかし、未だ対麻痺予防として臨床的に有効なのは 1) 脊髄液ドレナージ, 2) 動脈圧を高く保つ 2 つの方法だけで、対麻痺には有効な治療法がない。中島らは、ラット腹膜硬化症モデルへ MSC の投与を行ったところ、投与した MSC は障害を受けた腹膜中皮細胞へのマクロファージをはじめとする炎症細胞の浸潤を減少させることによって、線維化を抑制することを明らかにした (Ueno T, et al. Kidney Int. 84: 297-307, 2013)。さらに、幹細胞用の無血清培地：STK2 (DS Pharma Biomedical) を用いて MSC の増殖を 100 ~ 1000 倍にすることが可能であり、STK2 を用いることで患者血清を使用せずに多量の細胞数の MSC をより短時間で準備することができる。また MSC を STK2 で培養すると、ウシ血清含有培地で培養した MSC よりも活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制できることから、MSC の有する抗炎症効果が増強していることを示した。弓削らは、独自に開発した 3 次元模擬微小重力細胞培養装置を用いて骨髄間葉系幹細胞を培養すると、通常重力下の細胞培養に比べて未分化な骨髄間葉系幹細胞を大量に培養できることを示した。

2. 研究の目的

胸部大動脈手術における術後対麻痺は、依然として 3~15% 程度の頻度で発生する、生命の質の低下、寝たきり、そして生命を脅かす重篤な合併症である。急性期および遅発性に発生する脊髄障害および細胞死を予防することは、今後も成果の期待される重要な問題である。種々の薬剤に脊髄保護効果があると言われているが、実際に単独の効果で臨床応用されているものはない。我々は、間葉系由来幹細胞 (MSC) の微小重力培養による大量増殖を報告した。また MSC の抗炎症効果とその増強法を確認している。今回、虚血再灌流において、優れた抗炎症作用の MSC が、脊髄神経細胞のネクローシスおよびアポトーシスの予防に関与することと、大量増殖した抗炎症作用 MSC の投与による脊髄神経保護を、薬剤併用も絡めて研究することを目的とする。

3. 研究の方法

脊髄虚血モデルの作成： 雄性 SD ラット (450-510 g) をイソフルランで麻酔し、左頸動脈よりルートを確認し、大動脈遮断後に瀉血および遮断解除後に返血を行うことにより、中枢側大動脈圧が 40mmHg にコントロールできるように準備した。露出させた左大腿動脈からバルーンカテーテルを挿入した。鎖骨下動脈付近まで挿入後、バルーンを膨らませ、左頸動脈より瀉血を行い中枢圧を低下させて、11 分間経過観察の後、バルーンを虚脱させ、再灌流を行うと同時に返血を行い血圧を再上昇させた。これにより脊髄虚血モデルとした。

- (1) STK2 を用いて微重力培養した MSC を再灌流後の脊髄虚血モデルに投与し、その脊髄障害抑制効果を判定した。
- (2) 再灌流後、PBS (PBS 群)か骨髄由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) を血管内に注入した。移植に使用した細胞は、通常重力下で培養した細胞 (MSC-1G 群) か、微小重力環境下 (10⁻³ G) で培養した細胞 (MSC-MG 群) のいずれかを使用した。後肢の運動機能を観察し、Basso-Beattie-Bresnahan scale (BBB スケール)か傾斜板試験で評価した。虚血-再灌流術から 1, 3 日後に脊髄を採取し、HE 染色や免疫組織科学的染色による組織学的解析、ウェスタンブロットによる生化学的解析を行った。

4. 研究成果

- (1) STK2 を用いて微重力培養した MSC では、虚血 再灌流後の講師の運動機能は低下した。コントロール群と比較しても同等の効果しか得られない印象であった。この群は、1 匹作成するのに数十万円の費用がかかるため、その原因を追究することは、今後の課題とすることとした。
- (2) 虚血-再灌流後、後肢の運動機能が著しく低下した。両後肢は弛緩性の麻痺を呈し、運動はみられなくなったが、MSC-1G 群や MSC-MG 群では徐々に後肢の関節運動がみられた。

虚血-再灌流 1 日後では、前角に小さい空洞化領域や浸潤細胞がわずかにみられた。3 日後には空洞化領域は拡大し、浸潤細胞は増加した。脊髄の損傷は限局的で、腰髄から仙髄で Tuj1 陰性部位が観察された。PBS 群に比べて、MSC-1G 群や MSC-MG 群の損傷領域は小さかった。

灰白質と白質の境界部付近でアストロサイトが多く観察された。MSC-1G 群や MSC-MG 群のアストロサイトに比べ、PBS 群のアストロサイトの突起は長かった。BDNF 陽性のアストロサイトが MSC-MG 群で多く観察され、ウェスタンブロットによる解析では、MSC-1G 群や MSC-MG 群で proBDNF や mBDNF が増加していた。Caspase3 陽性細胞は、PBS 群に比べて MSC-1G 群や MSC-MG 群で少なかった。

結果として、虚血性脊髄障害において、抗炎症性を高める必要性は今後も検討が必要であること、微重力培養することによりアポトーシス抑制効果が増強することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi S, Nakagawa K, Tomiyasu M, Nakashima A, Katayama K, Imura T, Herlambang B, Okubo F, Arihiro K, Kawahara Y, Yuge L, Sueda T	4. 巻 105
2. 論文標題 Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy Improves Lower Limb Movement After Spinal Cord Ischemia in Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Thorac Surg.	6. 最初と最後の頁 1523, 1530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2017.12.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sueda T, Takahashi S	4. 巻 48
2. 論文標題 Spinal cord injury as a complication of thoracic endovascular aneurysm repair.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sugery Today	6. 最初と最後の頁 473, 477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-017-1588-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi S, Sueda T.	4. 巻 70
2. 論文標題 [Prevention of Spinal Cord Ischemia During Thoracic Endovascular Aortic Repair].	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kyobu Geka	6. 最初と最後の頁 251,256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto S, Takahashi S, Okahara S, Takahashi H, Katayama K, Watanabe M, Taguchi T, Kurosaki T, Herlambang B, Sueda T.	4. 巻 59
2. 論文標題 minal organ protection: distal perfusion during replacement of the ascending aorta and aortic arch.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cardiovasc Surg (Torino).	6. 最初と最後の頁 485, 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23736/S0021-9509.17.10119-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsuka T, Imura T, Nakagawa K, Shrestha L, Takahashi S, Kawahara Y, Sueda T, Kurisu K, Yuge L	4. 巻 27
2. 論文標題 Simulated Microgravity Culture Enhances the Neuroprotective Effects of Human Cranial Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells in Traumatic Brain Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev.	6. 最初と最後の頁 1287,1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0299.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurose T, Takahashi S, Otsuka T, Nakagawa K, Imura T, Sueda T, Yuge L	4. 巻 41
2. 論文標題 Simulated microgravity-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 1,6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2019.101601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋信也
2. 発表標題 ラット脊髄虚血モデルに対する間葉系幹細胞の効果
3. 学会等名 日本血管外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野間 玄督 (Noma Kensue) (00379893)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・専門研究員 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末田 泰二郎 (Sueda Taijiro) (10162835)	広島大学・医系科学研究科(医)・名誉教授 (15401)	
研究分担者	弓削 類 (Yuge Rui) (20263676)	広島大学・医系科学研究科(保)・教授 (15401)	
研究分担者	中島 歩 (Nakashima Ayumu) (40448262)	広島大学・医系科学研究科(医)・共同研究講座教授 (15401)	