

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10896

研究課題名(和文)自己嗅粘膜とiPS由来神経細胞併用療法による脊髄損傷治療法の開発

研究課題名(英文) Combined cell therapy using iPS derived neuron and olfactory mucosa for spinal cord injury

研究代表者

石原 正浩 (Ishihara, Masahiro)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00533803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘膜による軸索誘因作用について検討するため嗅粘膜基底層(LP)と後根神経節(DRG)とを共培養した。抗NT-3抗体および抗NGF抗体を添加した培地では軸索誘因効果は減弱した。LPのみを培養した培地からはNGFとVEGFが検出された。抗PSA-NCAM抗体を添加すると有意に軸索誘因作用が減弱し、PSAの分解酵素であるEndo-Eを処理をしたLPと共培養すると有意に軸索誘因作用が減弱した。嗅粘膜組織は軸索伸長誘因効果を有し、その効果はNGFをはじめとする神経栄養因子および細胞外マトリックスであるPSA-NCAMを介していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により嗅粘膜組織による神経軸索伸長に関する液性因子および細胞外マトリックスを同定することができた。これにより、現在完全脊髄損傷における自己嗅粘膜移植術における再生メカニズムの詳細な解析につながる。また、自己嗅粘膜移植術における適応症例制限を克服するための神経嗅粘膜組織グラフト作成に道筋をつけるものとなる。本研究により広範囲脊髄損傷症例や高齢者の症例に対して機能再生医療の適応が拡大することが期待される。そのことにより、長期の介護に携わる家族の負担を軽減、そしてリハビリテーション従事者や施設の効率的な運用につながり、社会的費用の軽減をもたらすことも期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of interaction between regenerating axons and olfactory mucosa, we the lamina propria, with dorsal root ganglion and analyzed what factors affect neurite regrowth. Nerve growth factor (NGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were released from lamina propria during the culture days. Neurites extended along the lamina propria in contact with the olfactory ensheathing cell array, which provided an efficient guide for elongation. Neurite density proceeding up to the LP significantly decreased when the lamina propria was treated with antibodies for polysialic acid-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) or by removal of PSA moiety. In our co-culture experiment, treatment with neurotrophin antibodies revealed that NGF might play a role in the enhancement of neurite outgrowth. And Our results suggest that PSA bound to NCAMs might play a key role in the direct interaction between neurites and OECs.

研究分野：神経再生

キーワード：神経再生 嗅粘膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷などによる脊髄損傷での運動障害は終生続き、QOL は大きく損なわれる。現在わが国には約 10 万人の脊髄損傷患者があり、毎年 5000 人以上の新規受傷者がいるといわれている。損傷時の急性期・亜急性期治療法が有効でない現状から、そのほとんどは慢性期患者であり、長期にわたる医療・介護面の本人・家族および社会的負担は大きい。

2. 研究の目的

自家嗅粘膜移植術は完全脊髄損傷に対して一定の効果を持つことを示したが、その一方、臨床適応に限界があることが分かった。

- 1) 移植嗅粘膜の容積の制限から 3cm 以上の脊髄損傷に対して適応外であること
- 2) 加齢に伴い嗅粘膜に含有されている神経前駆細胞の減少が報告されており、そのため 40 歳以上の症例において適応外であること。

慢性期完全脊髄損傷患者に 3cm 以上の損傷部位の症例が多く、また近年、高齢者の転倒に伴う脊髄損傷が増加しており、自家嗅粘膜移植術単独だけでは対応しきれない症例が増加することが推測される。そのため、自家嗅粘膜移植術の改良が必要であると思われた。

十分な神経組織が足りないことが想定されることから、嗅粘膜 神経組織グラフトを検討することとした。それに先立ち、まず、嗅粘膜による軸索伸長促進効果についての詳細を検討した。

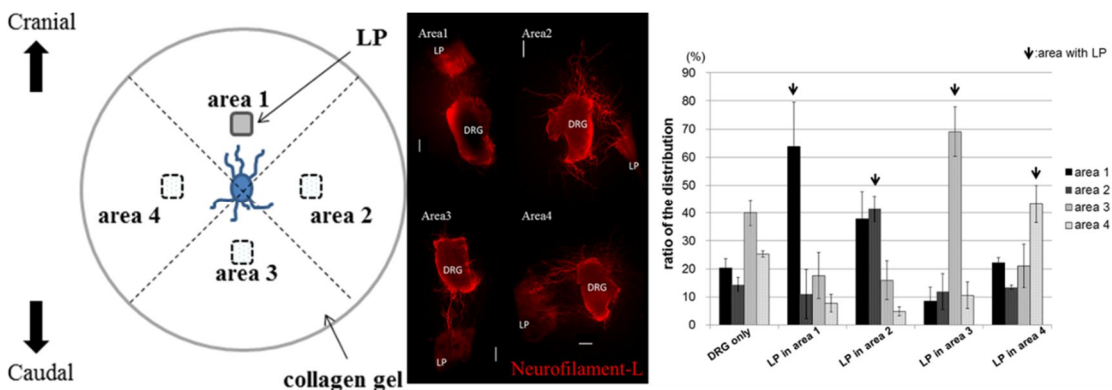
3. 研究の方法

SD ラットより採取した嗅粘膜(OM)を酵素処理し、嗅上皮(OE)と基底層(LP)に分離した。後根神経節(DRG)とカルチュプレート上でLPと各々共培養した。軸索誘因作用があることを確認した。神経栄養因子による影響を検討するため、抗神経栄養因子抗体を培養液中に添加し共培養した。また、培地中の神経栄養因子をELISA法を用いて測定した。次に、細胞外マトリックスによる影響を検討するため、培地に種々の抗細胞外マトリックス抗体を添加、もしくは、細胞外マトリックスを分解する酵素処理をした組織を作成し、共培養をした。

4. 研究成果

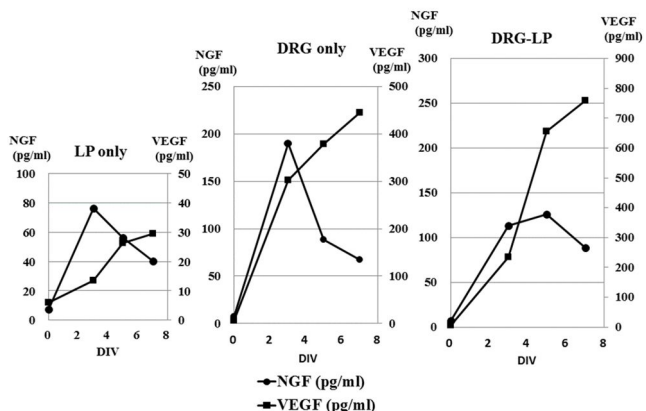
(1)DRG-LP共培養による軸索伸長促進効果の確認

下図のようにDRGとLPの培養位置を変えながら1週間培養し1週間後に固定神経軸索のマーカーであるNeurofilament-Lを用いて免疫染色をした。それぞれのAreaのNeurofilament-L陽性部位を定量化したところ、LPの置く位置を変えるとその位置の方向にDRGの神経軸索が誘引されることが確認できた。

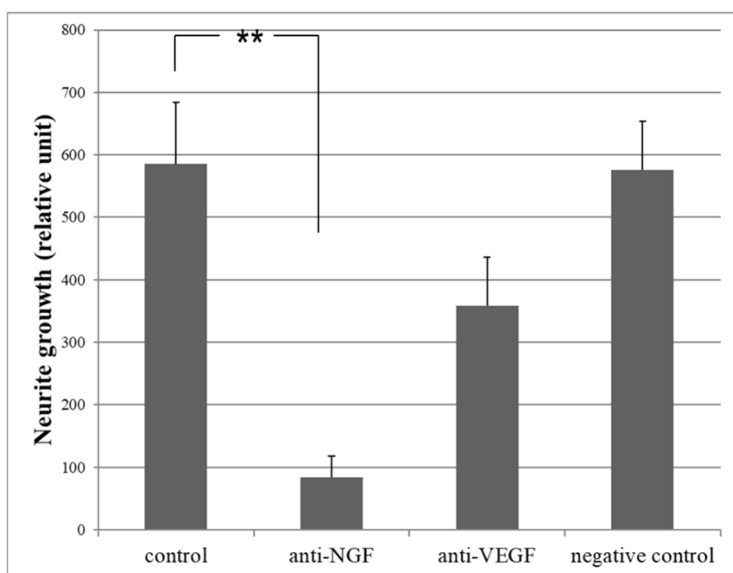


(2)神経栄養因子による影響の検討

神経栄養因子による影響を確認するため、LP単独,DRG単独,LP-DRG共培養における培地中の神経栄養因子について、NGF,BDNF,NT-3,VEGFの4種類をELISA法を用いて測定した。NT-3,VEGFについては検出限度以下であり、NGF,VEGFの2種類のみ検出された。共培養することによりNGFは産生量が増大することが明らかになった。

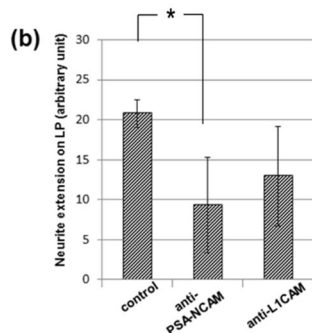
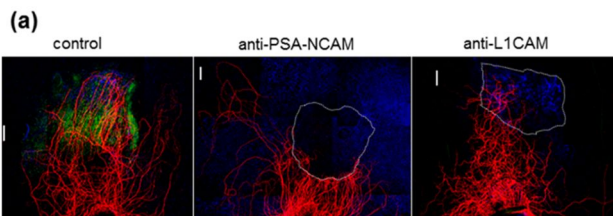


次に DRG-LP 共培養の培地中に、抗 NGF 抗体もしくは抗 VEGF 抗体を添加したところ、抗 NGF 抗体を添加すると軸索伸長量が有意に減弱する一方、抗 VEGF 抗体の添加では減弱しなかった。以上のことより、NGF が LP による軸索伸長促進効果に関与することが分かった。

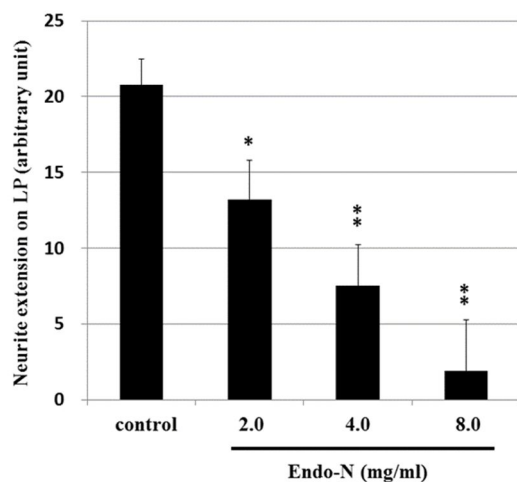


(3)細胞外マトリックスによる影響の検討

細胞外マトリックスの影響を検討するため DRG-LP 共培養の培地に代表的な細胞外マトリックスである PSA-NCAM と L1-CAM の中和抗体を添加すると、抗 PSA - NCAM 抗体添加により LP 上の軸索伸長が優位に抑制された。



次に PSA-NCAM の分解酵素である Endo-E を培地中に添加すると Endo-E 濃度依存的に LP 内での軸索伸長阻害効果を認めた。



上記結果から LP による神経軸索伸長促進作用は神経栄養因子の NGF および細胞外マトリックスである PSA-NCAM が大きく関与することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshiyuki Ozono, Suetaka Nishiike, Masahiro Ishihara, Toshiyuki Fujinaka	4. 巻 66(1.2)
2. 論文標題 Rupture of Internal carotid artery pseudoaneurysm in the sphenoid sinus as a complication of deep neck space infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 188-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.66.188.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sho Fujiwar, Yu-ichiro Ohnishi, Hirofumi Sugano, Nobuhiko Nakajima, Asaya Nishi, Takashi Moriwaki, Masahiro Ishihara, Haruhiko Kishima,	4. 巻 19(9)
2. 論文標題 Analysis of cage stability and interbody pressure distribution in compression of cortical bone trajectory fixation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Spine Journal	6. 最初と最後の頁 S169-S170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.spinee.2019.05.449	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 1件）

1. 発表者名 Masahiro Ishihara, Noriko Mochizuki-Oda, Yu-ichiro Ohnishi, Koichi Iwatsuki, and Haruhiko Kishima
2. 発表標題 Olfactory mucosa provides an optimal supporting tissue for neurite outgrowth via diffusible factors and cell-cell interaction
3. 学会等名 ASIA SPINE 2018 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----