

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K13054
研究課題名(和文) 脊髄損傷への幹細胞治療とロボットを用いたリハビリテーションによる新規治療の開発

研究課題名(英文) Combination of cell therapy and robotic rehabilitation for spinal cord injury

研究代表者
猪村 剛史 (Takeshi, Imura)

広島大学・医系科学研究科(保)・助教

研究者番号：80760016
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット脊髄損傷モデルに対して、由来の異なるMSCsの静脈内投与効果を検討すること、さらには免荷式歩行支援装置を使用したリハビリテーションを行い、その治療効果を検討することを目的とした。その結果、神経関連遺伝子や神経栄養因子として知られるBdnfおよびGdnfの発現は頭蓋骨MSCsで有意に高かった。Vegfの発現は、脂肪MSCsにおいて有意に高かった。骨髄MSCsおよび頭蓋骨MSCsをラット脊髄損傷モデルに投与し運動機能改善に与える影響を検討したところ、頭蓋骨由来MSCs投与群で運動機能が有意に改善した。in vitroにおける神経保護効果についても頭蓋骨MSCsが優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷は、運動障害および感覚障害を始めとする重篤な機能障害を残存することの多い疾患として知られているが、有効な治療法は未だに確立されていない。本研究において、脊髄損傷モデルに対し頭蓋骨由来MSCsの静脈内投与によって、優れた機能改善が得られることが明らかになった。治療効果の高いMSCsの供給組織が明らかになったことは脊髄損傷の新たな治療を検討する中で意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine optimal MSCs and investigate the effect of combination of MSCs transplantation and robotic rehabilitation in spinal cord injury. In the results, the gene expressions of Snail, Slug, Bdnf, and Gdnf were significantly higher in the MSCs derived from cranial bone. The expression of Vegf was significantly higher in the MSCs derived from adipose tissue. MSCs derived from cranial bone showed significant therapeutic effects in vivo experiment using spinal cord injury model and in vitro experiment using NG108-15 cells.

研究分野：再生医療、リハビリテーション

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 脊髄損傷 リハビリテーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、運動障害および感覚障害を始めとする重篤な機能障害を残存することの多い疾患として知られている。その中で、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) を用いた再生医療に関する多くの臨床試験が行われ、一定の効果を示す報告が散見される。

MSCs は、様々な組織より樹立が可能であることが知られ、近年では由来とする組織によって MSCs の特性が異なることがわかってきた。しかしながら、脊髄損傷に対し最も治療効果を発揮する MSCs については一定の見解が得られていない。さらに、MSCs の静脈内投与のみで得られる治療効果には限界があり、細胞投与の効果を最大限発揮する治療手段のひとつとしてリハビリテーションが挙げられる。脊髄損傷のような重度運動障害を呈する場合、免荷装置の活用によってより質の高いリハビリテーションを行える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、重度運動障害を呈したラット脊髄損傷モデルに対して、由来の異なる MSCs の静脈内投与効果を検討すること、さらには免荷式歩行支援ロボットを使用したリハビリテーションを行い、その治療効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各組織からの MSCs の樹立

Sprague-Dawley (SD) ラットの皮下脂肪、長管骨 (大腿骨および脛骨) 骨髄、頭蓋骨を採取し、90mm の培養皿に播種した。樹立後の細胞の表面マーカーの発現を Fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて解析し、MSCs としての特性を評価した。

(2) 遺伝子発現解析

real-time PCR により各組織から樹立された MSCs の遺伝子発現を解析した。解析には、神経堤関連遺伝子として知られる Snail および Slug, 神経栄養因子として知られる Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf), Grial cell line-derived neurotrophic factor (Gdnf), basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (Vegf) を使用した。内部標準遺伝子として、Actin, beta (Actb) を用いた。

(3) 脊髄損傷モデルラットの作製

脊髄損傷モデルの作製には SD ラットを用いた。脊髄損傷は、Weight dropping method を用いて作製した。まず、ラットの胸腰部の皮膚を正中切開し、第 9~11 胸椎レベルの椎弓切除を行い、脊髄を露出した。その後、第 10 胸椎レベル上に直径 2 mm の impactor rod を設置し、50 mm の高さから、10 g の錘を自由落下させ該当レベルの脊髄に対し損傷を加えた。脊髄損傷モデル作製後は、1 日 2 回の排尿管理と後肢の拘縮予防のための関節可動域運動を行った。また、損傷後のリハビリテーションとして、免荷装置の使用を試みた。

(4) 静脈内細胞投与

各組織由来 MSCs を培養後、細胞懸濁液を回収した後、 1×10^6 cells/300 μ L となるように各組織由来 MSCs を PBS に懸濁した。MSCs 投与は脊髄損傷 24 時間後に尾静脈経由で行った。細胞投与には、骨髄由来 MSCs および頭蓋骨由来 MSCs を使用した。

(5) 運動機能評価

運動機能評価には、自発運動を評価する BBB scale およびラットを角度可変式の板上に乗せ、姿勢保持が可能な最大角度を測定する Inclined plane test を用いた。運動機能評価は、損傷前、損傷 1 日・2 日・3 日・5 日・7 日・10 日・14 日・21 日・28 日後に行った。

(6) 電気生理学的評価

皮質脊髄路の機能を評価するために、電気生理学的評価として運動誘発電位 (Motor evoked potential: MEP) を測定した。MEP 測定は、損傷前、損傷 1 日・7 日・14 日・21 日・28 日後に行った。

(7) NG108-15 の培養と酸化および炎症ストレス曝露

脊髄損傷後に、二次損傷として損傷組織周囲で生じる炎症や酸化ストレスを模擬的に再現するため、in vitro における神経モデルとして神経芽細胞腫 (NG108-15) を培養した。NG108-15 の培養に、Lipopolysaccharide (LPS) もしくは H₂O₂ を添加することで、炎症ストレスや酸化ストレスを加えた。さらに、各組織由来 MSCs の培養上清を添加することで、MSCs による神経保護効果を検討した。細胞生存率を、神経保護効果の指標とした。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の樹立

ラットの皮下脂肪、長管骨骨髄、頭蓋骨いずれの組織からも MSCs 様の紡錘形の形態を有する細胞が樹立された (図 1 A-C). これらの細胞の表面マーカーを、FACS を用いて解析した結果、樹立された細胞は MSCs としての特性を有することが確認された.

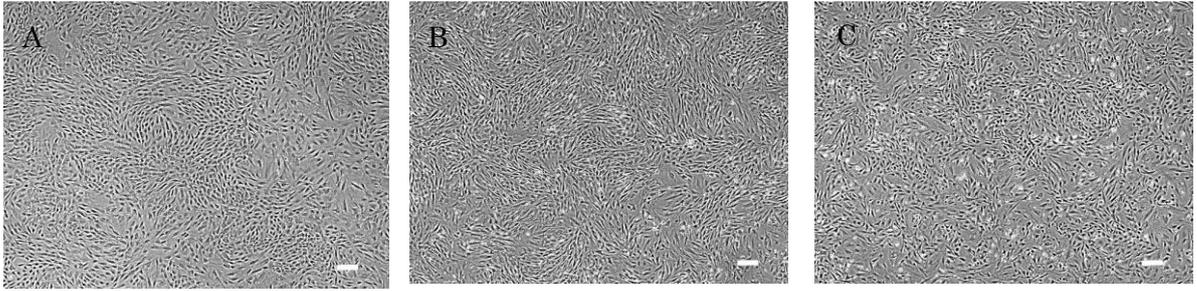


図 1 各組織から樹立されたラット MSCs

(A: 皮下脂肪由来 MSCs, B: 骨髄由来 MSCs, C: 頭蓋骨由来 MSCs) (Scale bars: 200um)

(2) MSCs の遺伝子発現

神経関連遺伝子である *Snail* および *Slug* の発現は、他の MSCs と比較して、頭蓋骨 MSCs で有意に高かった (図 2 A, B). *Bdnf* および *Gdnf* の発現においても、頭蓋骨 MSCs で有意に高かった (図 2 C, D). *bFGF* の発現は MSCs の由来によって特徴的な差異を認めなかった (図 2 E). *Vegf* の発現は、脂肪 MSCs において有意に高かった (図 2 F).

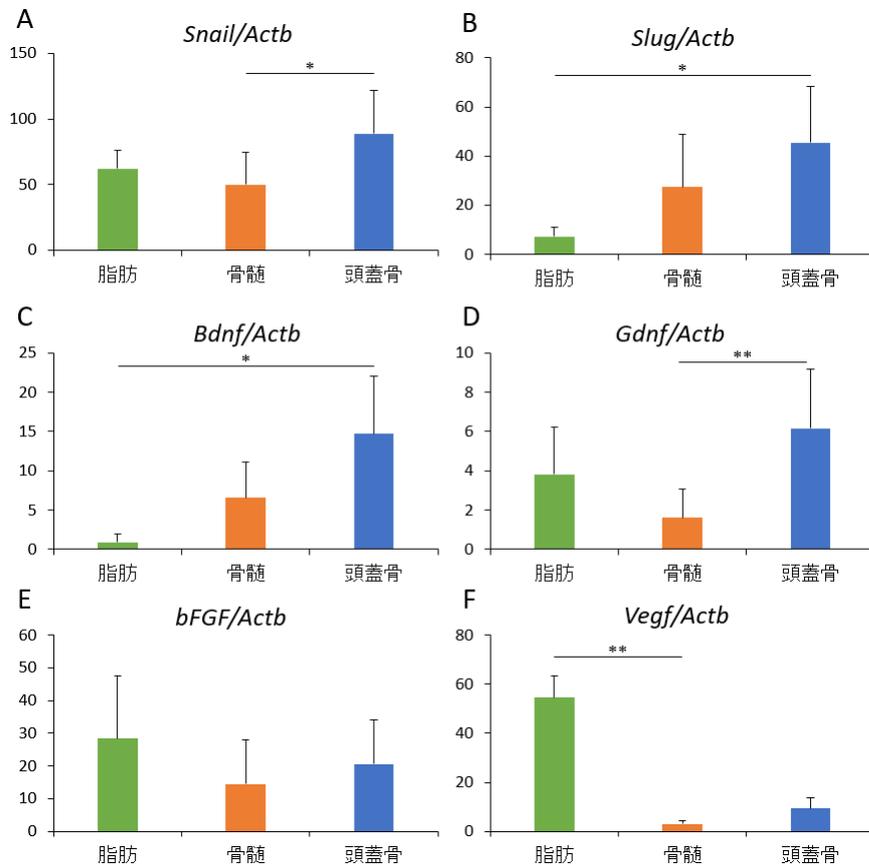


図 2 MSCs の遺伝子発現

(3) 運動機能評価

BBB scale, Inclined plane test の両方において、損傷前と比較して脊髄損傷後に機能が著しく低下した (図 3 A, B). 細胞投与を行わない対照群と比較して、細胞投与を行った群で運動機能が有意に改善した. さらに、BBB scale, Inclined plane test とともに、頭蓋骨 MSCs を移植した群において、他の 2 群と比較して有意に運動機能が改善した.

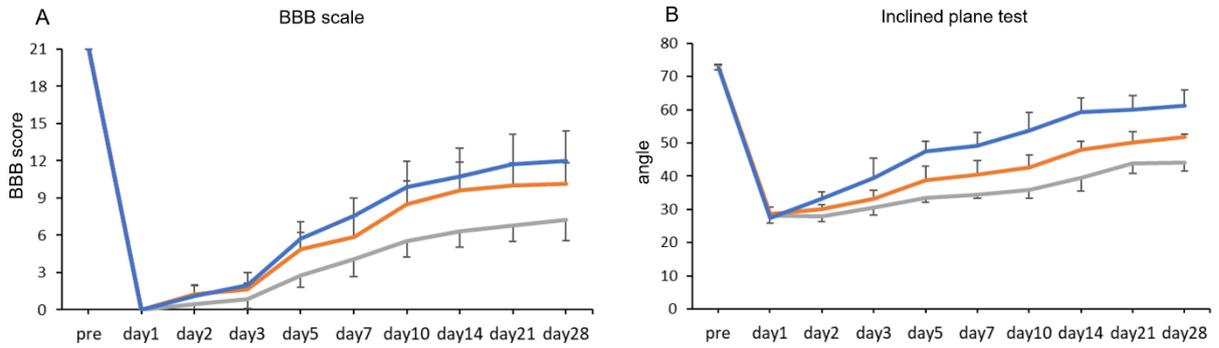


図3 運動機能の推移

(A: BBB score, B: Inclined plane test, 灰線: 対照群 n = 9, 赤線: 骨髄 MSCs 移植群 n = 8, 青線: 頭蓋骨 MSCs 移植群 n = 7)

(4) 電気生理学的評価

損傷前と比較して、損傷後には MEP の振幅が減衰することが確認された。さらに、損傷 28 日後における減衰した振幅の回復率は頭蓋骨由来 MSCs 移植群で有意に高かった (図 4)。

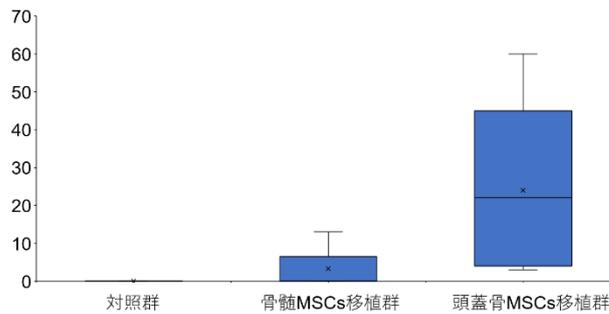


図4 MEP の振幅回復率

(5) MSCs 培養上清による神経保護効果

炎症もしくは酸化ストレスに曝露された NG108-15 の細胞生存率は、control 群と比較して、MSCs の培養上清を加えることで有意に改善した (図 5A, B)。特に、頭蓋骨 MSCs の培養上清では、他の MSCs の培養上清と比較して神経保護効果が顕著であった。

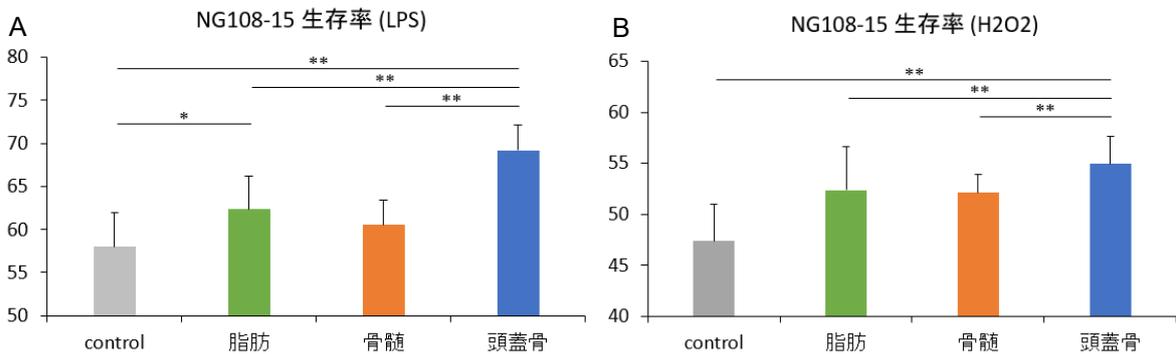


図5 NG108-15 の生存率

(6) MSCs 投与後のリハビリテーション

脊髄損傷後、リハビリテーションとして後肢の拘縮予防のための他動的な関節可動域運動をラット後肢の各関節 (股関節, 膝関節, 足関節) に対し行った。また、損傷後のリハビリテーションとして、免荷装置を用いた運動を試みたが、機器の調整に難渋したことから、免荷装置の効果検証は十分に行えなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oshita J., Okazaki T., Mitsuhashi T., Imura T., Nakagawa K., Otsuka T., Kurose T., Tamura T., Abiko M., Takeda M., Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Early transplantation of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells enhances functional recovery in ischemic stroke model rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 83-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0186.	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 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 101601
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Imura T., Otsuka T., Kawahara Y., Yuge L.	4. 巻 22
2. 論文標題 "Microgravity" as a unique and useful stem cell culture environment for cell-based therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regene Ther	6. 最初と最後の頁 2-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.03.001	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 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 enhances the neuroprotective effect of human cranial bone derived mesenchymal stem cells in brain injury model	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 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 Abiko M., Mitsuhashi T., Okazaki T., Imura T., Nakagawa K., Otsuka T., Oshita J., Takeda M., Kawahara Y., Yuge L., Kurisu K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery in ischemic stroke model through neuroprotective effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 1053-1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2018.0022	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 Imura T., Nakagawa K., Kawahara Y., Yuge L.	4. 巻 27
2. 論文標題 Stem cell culture in microgravity and its application in cell-based therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 1298-1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0298.	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 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 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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takeshi Imura
2. 発表標題 Interactive effects of cell therapy and rehabilitation in brain injury model
3. 学会等名 World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Imura
2. 発表標題 Epigenetic mechanisms of myoblast differentiation in hypergravity culture
3. 学会等名 American Society for Gravitational and Space Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城戸皓輝、猪村剛史
2. 発表標題 脊髄損傷モデルラットに対するヒト頭蓋骨由来間葉系幹細胞の移植効果
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Otsuka, Takeshi Imura
2. 発表標題 Cranial bone derived mesenchymal stem cells cultured in simulated microgravity have highly neuroprotective effect against stress induced NG108-15 cell death in vitro.
3. 学会等名 15th International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Imura
2. 発表標題 Myogenic differentiation is accelerated by hypergravity culture through epigenetic regulations.
3. 学会等名 33rd American Society for Gravitational and Space Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Louis Yuge, Takashi Otsuka, Takeshi Imura
2. 発表標題 Simulated microgravity culture increases the neuroprotective potential of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 33rd American Society for Gravitational and Space Research (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----