

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K18023

研究課題名(和文)重症脊髄損傷に対するナノテクノロジーと細胞シート工学のハイブリッド治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Hybrid Therapy Using Nanotechnology and Cell Sheet Engineering for Severe Spinal Cord Injury

研究代表者

奥田 哲教 (Okuda, Akinori)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80646167

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)：脊髄損傷の大きな機能改善を得るには、再生軸索に配向性を持たせることが必要と考え、配向性細胞シートを格子状にして作成を試みたが、強度不足となりシート構造を維持できなかったため、通常の細胞シート形状を用いた。また、移植神経幹細胞に配向性を持たせるために、cell fiber技術を用いたが、移植時に細胞シートを折りたたむため、その際に配向性が失われてしまい、配向性維持が出来なかったため、BMSCシートに存在する軸索再生阻害因子を分解処理した細胞シートと神経幹細胞を共培養した共培養シートを開発した。通常の細胞シートより軸索再生や再髄鞘化を促進したが、運動機能改善に有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

打撲型脊髄損傷は臨床現場でよく見かける損傷形態であり、数多くの研究が行われており、治療薬の創薬も行われている。一方、最重症である離断型脊髄損傷は臨床ではあまり遭遇しないが、症例は存在している。脊髄が離断しているため、軸索再生の余地がなく、重症であるため研究もすくなく、再生治療の手立てが現在ない。我々の研究から開発した骨髄間葉系細胞と神経幹細胞の共培養シートは欠損脊髄を補充し、軸索再生と再髄鞘化を促進できるscaffoldであることが分かった。今後更に改良し、離断型脊髄損傷治療の一助としたい。

研究成果の概要(英文)：To obtain significant functional improvement of spinal cord injury, we thought it was necessary to give regenerated axons orientation, and attempted to create oriented cell sheets in a grid shape, but the sheet structure could not be maintained due to insufficient strength, so we used a regular cell sheet shape. In addition, cell fiber technology was used to give the transplanted neural stem cells orientation, but since the cell sheets were folded during transplantation, the orientation was lost during the folding process and could not be maintained. Therefore, we developed a co-culture sheet in which neural stem cells were co-cultured on the cell sheet with the axon regeneration inhibitory factor present in the BMSC sheet. Although it promoted axonal regeneration and remyelination better than regular cell sheets, no significant difference in improvement of motor function was observed.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 軸索再生 細胞シート 神経幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症脊髄損傷の一形態である脊髄離断では脊髄の欠損部が生じてしまい、それを補填する scaffold(足場)が必要となるため、脊髄欠損部を超えた反対側への軸索再生 (re-entry) を獲得するのは非常に困難である (Sugai K et al. 2015)。様々な人工材料の scaffold に種々の細胞を搭載して離断脊髄への移植が行われているが、その有用性は scaffold への軸索伸長であり、re-entry や後肢運動機能改善は殆ど報告されていない。骨髄間葉系細胞を用いた脊髄損傷の治療は、臨床治験段階まで進展しており、その効果と安全性が確立された移植ソースである。我々は、骨髄から骨髄間葉系間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) を採取培養し、BMSC シートの作製に成功しており、2mm の欠損を有する脊髄離断ラットへの移植によって、BMSC シート移植部を横切った軸索の re-entry、後肢運動機能改善を報告した (Okuda A et al. J Neurosurg Spine 2017)。しかし、運動機能の改善は軽度であり、後肢を用いた歩行を獲得することが出来ず、細胞シートの更なる改善が必要と考えた。BMSC は in vivo では神経系細胞に分化しないと報告されており、BMSC が神経系細胞に分化しない為、より大きな脊髄再生を実現するには、神経系細胞に分化する神経幹細胞の移植も必要である。我々は、BMSC と神経幹・前駆細胞 (NS/PC) との共培養シートを開発し報告した (Okuda A. et al. J Spine Research 2017)。脊髄離断ラットへの BMSC と NS/PC 共培養シート移植実験では、BMSC シート移植群と比較して、移植後 8 週での再生軸索数に有意差を認めず、その伸長方向に統一性はなく斜走や横走するものが多かった。共培養シート群で 8 週後の移植部での再髄鞘化が有意に多い結果であったが、後肢運動機能は両群間で 8 週まで有意差はつかず、後肢を用いた歩行は獲得できなかった。これらの結果から、より大きい後肢運動改善を得るには、より早くより多い再生軸索が必要と考える。より早い軸索再生には、再生軸索が真直ぐ最短で反対側脊髄断端部に到達することが必要である。より多く軸索が再生するには、細胞シート内へ伸長するよう促進する薬物をシートに搭載することが必要である。そこで我々は、軸索誘導性の神経栄養因子を含有した生体吸収性徐放性ナノカプセルを搭載した、細胞配向性を有する BMSC と NS/PC の共培養シートを脊髄離断ラットへ移植することでより大きな運動機能改善が得られる、との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞配向性を有した BMSC シート (配向性 BMSC シート) と NS/PC を共培養して作製した配向性共培養シートに、神経栄養因子含有徐放性ナノカプセル (カプセル) を搭載させた、ハイブリッド型共培養シートの新規開発、ハイブリッド型共培養シートの脊髄離断ラットへの移植、シート内細胞の移植後動態の解明、を目的とする。

3. 研究の方法

配向性 BMSC シートの作製 :

7 週齢 F344 ラット大腿骨から BMSC を採取し初期培養を行う。2 週間後に 1×10^4 cell/cm² の細胞密度で播種して継代する。その際使用する培養皿にはガラスボトム培養皿を用い、表面に細胞接着阻害領域をパターン状に形成し、細胞の伸展・増殖方向を制御するものである。長方形格子状に細胞が培養するように作製したガラスボトム培養皿を用いて、アスコルビン酸 (82µg/ml) 添加標準培地で二次培養を行い、2 週後にスクレパーを用いて長方形格子状配向性 BMSC シートを作製する。この方法で配向性 BMSC シートが作製困難な場合、通常の BMSC シートに近づけるよう、長方形格子の大きさをシート採取可能となるまで減少させていく。

神経栄養因子含有徐放性ナノカプセルの作製 :

「2 重エマルジョン重合法によるポリエステルを基盤として生分解性ナノ粒子の合成」に準じて行う。外科縫合糸などに使用される生分解性の PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) を用いる。PLGA を溶かした有機溶媒に NT-3 水溶液を混入し、超音波分散法にて均一な水中油滴型乳化液を得る。これを、5% のポリビニルアルコール水溶液に添加し、ホモジナイザーを用いて均一化する。これにより NT-3 を含有するカプセル状の水中油中水型乳化液が得られ、溶媒を除去して、ナノカプセルを採取する。この方法は一般的な化学的乳化法であり、安定してカプセルの採取が可能と考える。

ハイブリッド型共培養シートの作製 :

胎生 18 日 F344 ラット胎仔の脳を採取・分解し、懸濁物を得る。これを規格既製の培養液 DMEM/Ham' sF12 に入れ、細胞濃度 2.5×10^5 /mL で培養する。培養液には、無血清培養用サプリメント N2、抗生剤及び組み換え体ヒト型塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を補充する。培養 3 日後に、神経幹細胞を含む神経系細胞 (NS/PC) が浮遊性の塊 (神経細胞塊) を形成する。継代して得られる 2 次神経細胞塊を、完成した配向性 BMSC シートに播種し、前述の神経細胞培養液を用

いて 1 日間共培養を行い、配向性共培養シートを作製する。完成した配向性共培養シートの上に、神経栄養因子カプセルを播種して、ハイブリッド型共培養シートを作製する。20 mmの脊髄欠損モデルラットを作製し、欠損部に共培養シート移植群、配向性共培養シート移植群、カプセル搭載配向性 BMSC シート移植群、ハイブリッド型共培養シート移植群の 4 群間で免疫組織顕微鏡に軸索再生、グリア瘢痕形成抑制、再髄鞘化を検討し、BBB スコアを用いた後肢運動機能の回復評価を行う。

4. 研究成果

配向性細胞シートの作製で、格子状細胞シートの作製を試みたが、格子状にすることでシート強度が得られず、培養皿からはがす際にシート構造が破綻した。以上から、配向性細胞シート作成を断念し、BMSC シートに含有する軸索再生阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) を分解させた BMSC シートの作製を試みた。培養皿に付着した状態の BMSC シートの conditioned medium に 0.1U/ml のコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) を添加し、6 時間インキュベーター内で CSPG 分解を行った。抗 delta-4S 抗体を用いて、BMSC シート内の CSPG が分解されたことを確認した (図 1)。また、CSPG 分解 BMSC シート (cB シート) に 2×10^5 NS/PC を播種し、1 日間共培養を行い、CSPG 分解 BMSC・NS/PC 共培養シート (cBN シート) を作製した。作製した B シートを脊髄欠損部に移植した B シート群と、cBN シートを移植した cBN シート群を移植後 2 週と 8 週で再生軸索数と再髄鞘化軸索数、運動機能を比較検討を行った。

2 週・8 週ともに、cBN シート移植群で再生軸索数が有意に多い結果であった (図 2 N=5, 5)。また、8 週での再髄鞘化軸索数は cBN シート群で有意に多かった (図 3 N=5, 5)。後肢運動機能改善については、8 週までの各週での 2 群間に有意差は認めなかったが、軽度の講師運動機能改善を認めた (図 4 N=5, 5)。

以上の結果から、BMSC シートに含有される CSPG を分解することと、神経幹細胞を共培養して移植することで、より大きな脊髄再生が促進される可能性が示唆された。

図 1

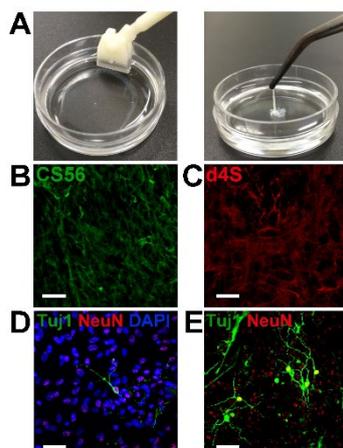


図 2

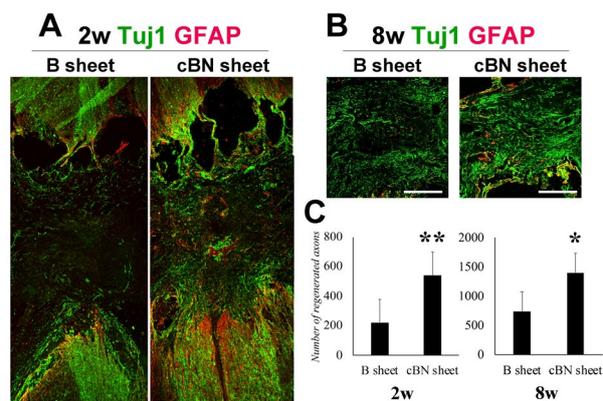


図 3

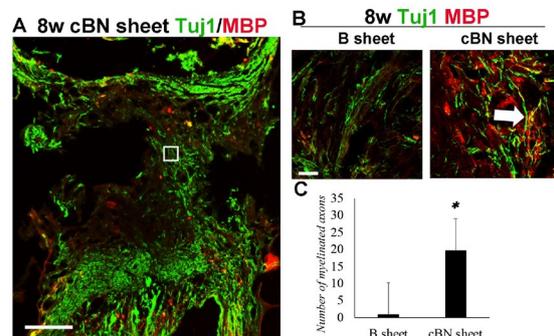
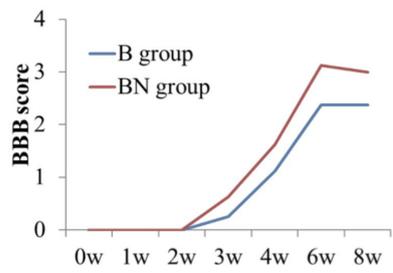


図 4



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 奥田哲教	4. 巻 Vol.271 No.7
2. 論文標題 scaffold-freeな骨髄間葉系細胞シートの有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 655, 660
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 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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akinori Okuda
2. 発表標題 Chondroitin Sulfate Proteoglycans Digestion of Bone Marrow Stromal Cell Sheet with ChABC Promote Neurite Elongation in vitro and Axonal Regeneration in vivo
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田哲教
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞シートを用いた脊髄損傷治療
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Okuda
2. 発表標題 Chondroitin Sulfate Proteoglycans Digestion of Bone Marrow Stromal Cell Sheet with ChABC Promote Neurite Elongation in vitro and Axonal Regeneration in vivo.
3. 学会等名 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田哲教
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞シートのコンドロイチナーゼによるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン分解が神経突起伸長と軸索再生を促進する
3. 学会等名 第37回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田哲教
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田哲教
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞と神経幹・前駆細胞の共培養シート移植による完全離断脊髄損傷ラットの軸索再生と再髄鞘化
3. 学会等名 第46回日本脊椎脊髄病学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------