

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08766

研究課題名(和文)術後虚血性脊髄障害に対する間葉系幹細胞を用いた治療法の開発

研究課題名(英文)Intravenous infusion of mesenchymal stem cells for spinal cord ischemia

研究代表者

安田 尚美 (Yasuda, Naomi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40722385

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)：虚血性脊髄障害モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSCs)の経静脈的投与が治療効果を検討した。モデルラットに運動障害発症1日後にMSCを投与し28日間観察して非投与群と運動機能を比較した。結果、MSC投与群では非投与群と比較し有意な運動機能の改善が認められた。また、MRIを用いた経時的観察においても脊髄体積の保持を認めた。組織学的検討においては、MSC投与群において、脊髄の断面積の保持、神経細胞数の保持、神経線維数の保持、微小血管系の保持を認めた。これらにより、治療メカニズムとして神経保護と血液脊髄関門の安定化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸部下行および胸腹部大動脈瘤は破裂すると死に至る疾患である、そのため外科治療が必要となるが、手術における合併症である虚血性脊髄障害の発症頻度は10-15%程度ある。様々な予防法が行われ発生頻度は下がってきているが、有効な治療法はない。虚血性脊髄障害は発症してしまうとリハビリテーションを行うしかなく、麻痺によって杖歩行や車いす生活を余儀なくされる。大動脈瘤の発生頻度は50代ころより上昇し、脊髄障害が発生すると社会的損失が大きい。今回、骨髄間葉系幹細胞の静脈投与により運動機能の回復効果を認めため、治療法として確立すれば社会的に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ischemic spinal cord injury (iSCI) is a devastating complication of aortic surgery, with few strategies for prevention. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) for traumatic SCI has been shown. The purpose of this study was to investigate mechanisms which may exert therapeutic efficacy in iSCI.

Severe iSCI was created to occlude the descending aorta. One day after iSCI induction, iSCI rats were randomized into two groups: one received intravenous infusion of MSCs, the other received vehicle.

MSC treated animals exhibited gradual improvement of locomotor function during the 4-week study period; however the vehicle group displayed persistent motor deficits. In the MSC-treated group we observed the protection of white and gray matter volume reduction and preservation of microvasculature including BSCB function. Intravenous infusion of MSCs may provide therapeutic efficacy to improve functional outcomes in a rat model of severe iSCI via protection of white and gray matter.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血性脊髄障害 神経再生 神経保護 胸腹部大動脈瘤

1. 研究開始当初の背景

近年、大動脈瘤に対する外科治療全体の成績向上が得られているが、胸部・胸腹部大動脈瘤の外科治療は手術侵襲も大きく、その成績は決して良好とは言えない。大動脈瘤は破裂すると命を落とすことになるため外科治療が避けられないが、その合併症として生じる虚血性脊髄障害による症状は非常に重篤である。開胸手術における発症頻度も10~20%と高い。そのため、これまでも様々な予防対策が試みられたが、エビデンスを持った治療法に乏しく、未だ標準化された脊髄障害予防対策の確立に至っていない。大動脈瘤は、患者年齢のピークが50代からと比較的若く、脊髄障害が発生すれば精神的・肉体的な苦痛が大きいのに加え、生活の質が大きく低下し、その予後が有意に悪くなる。虚血性脊髄障害に対する根本的治療はないため、結果、社会復帰は難しく医療・介護費用が増加し、社会的損失は大きく、新しい治療法の開発は急いで対応すべき課題となっている。しかしながら、これまでは予防法の観点からの研究のみで、虚血性脊髄損傷そのものの治療法に関する研究は未だにない。

現在、札幌医科大学ではこれまでの良好な基礎研究に基づき、脊髄損傷などの患者に対する骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)の経静脈的投与の研究を行っており、神経症状の回復という良好な治療効果を認めている (Honmou et al., 2021)。これまでの研究より、MSCは損傷部位に集積する homing 作用を持っており、静脈投与によって病巣への到達が可能なことがわかっている。また神経栄養因子による神経栄養・保護作用、損傷軸索の再生、損傷ミエリンの修復、血管新生作用を認めることがわかっており、それらが協奏的に作用することがあることもわかっている。さらに、実験的外傷性脊髄損傷においては神経栄養因子による神経保護作用や、ペリサイトを含む血液脊髄関門 (blood spinal cord barrier: BSCB) の安定化と修復が強く運動機能の改善に關与することが判明している (Morita et al., 2016)。

本研究では外科的に作成した脊髄虚血ラットモデルを用いて、MSCの静脈内投与が、治療効果をもたらすかどうかを検証する。本研究において、治療効果を認めれば、より早く臨床応用が期待され、社会的に多に貢献する波及効果を有すると考えられる。

2. 研究の目的

従来の虚血性脊髄障害に対するアプローチはその予防の観点のみで、今までは脊髄障害を発生しないように術前、術中に様々な工夫が用いられてきたが、根本的治療方法はない。

本研究では、MSCによる虚血性脊髄障害に対する治療効果とその発症のメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

SDラットを対象とし虚血性脊髄障害モデルを外科的に作製し、重度後肢麻痺となったラットに対して、1日後にMSC(1.0×10^6 cells/1ml)を大腿静脈から経静脈的に投与し (Vehicle群にはDMEM 1ml)、運動機能および組織学的に解析を行った。

行動学的評価はBasso Beattie Bresnahan(BBB)スコアを用いて行った。観察期間は28日間とし比較的長期の観察を行った。経過観察中にin vivo MRIにて経時的に脊髄のvolumeを計測した。28日の観察期間終了後に脊髄を採取し、組織学的検査を行った。HE染色、Nissl染色、各種免疫染色を行った。さらに、MRI-DTIを用いて画像的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 脊髄虚血ラットモデルの確立

SDラットを用いて長期生存が可能な虚血性脊髄障害モデルを、下行大動脈を一定時間直接遮断する外科的方法にて確立した。

(2) 運動機能評価

虚血性脊髄障害モデル作製後1日後にBBB1以下のモデルをランダム化し、MSC投与群と非投与群に振り分けた後に、MSC (1.0×10^6 cells/1ml) および培養液 (DMEM 1ml) を経静脈的に投与し、28日間の運動機能観察を行った結果、MSC投与群で有意な運動機能の回復を認めた。

(図1: Yasuda et al., Brain Res, 2020)

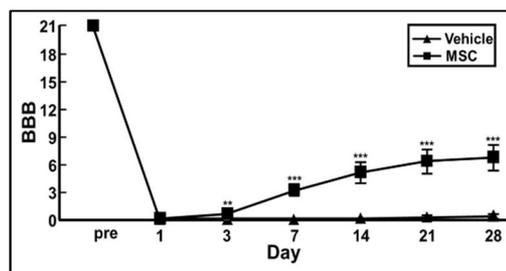


図 1

(3) 脊髄断面面積評価

HE染色を用いて脊髄断面面積の評価を行った結果、MSC投与群においては脊髄全体、灰白質、白質のいずれにおいてもMSC投与群で有意に脊髄断面面積の保持を認めた。(図2: Yasuda et al., Brain Res, 2020)

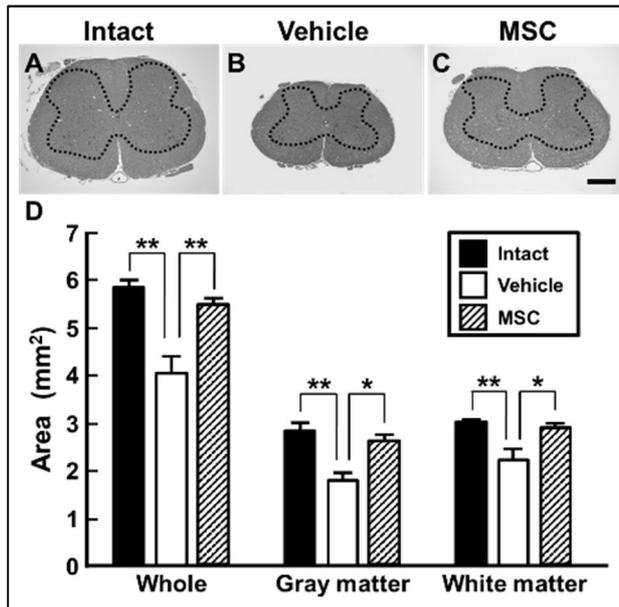


図 2

(4) 脊髄体積評価

In vivo MRIを用いた脊髄の経時的な体積評価では、両群の体積の減少を認めたが、MSC投与群においては、Vehicle群と比較して有意な体積の保持を認めた。(図3: Yasuda et al., Brain Res, 2020)

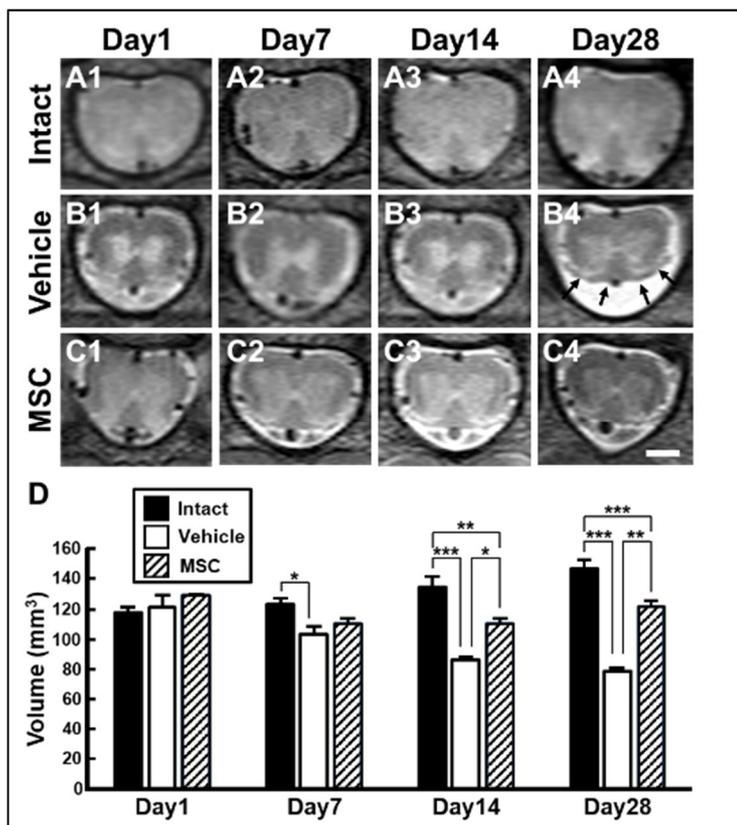


図 3

(5)組織学的評価（脊髄灰白質）

脊髄灰白質における神経細胞数の評価を Nissl 染色および免疫染色（ニューロン: NeuN、グリア細胞: GFAP）にて行った結果、ニューロンおよびグリア細胞どちらにおいても MSC 投与群で有意に細胞数が保たれていた（図 4：Yasuda et al., Brain Res, 2020）。

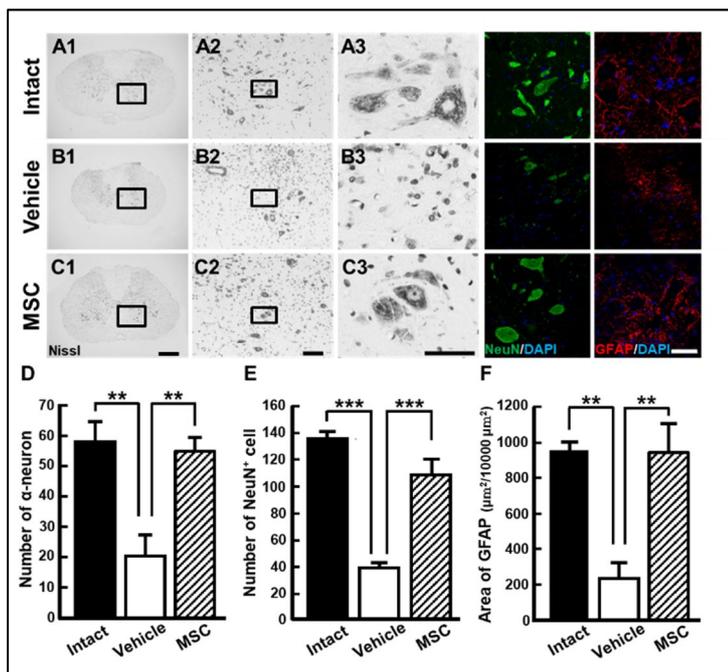


図 4

(6)組織学的評価（脊髄白質）

脊髄白質において軸索数およびその性状を評価した結果、MSC 投与群では軸索数が有意に保たれており、変性軸索も少なかった（図 5、図 6：Yasuda et al., Brain Res, 2020）。

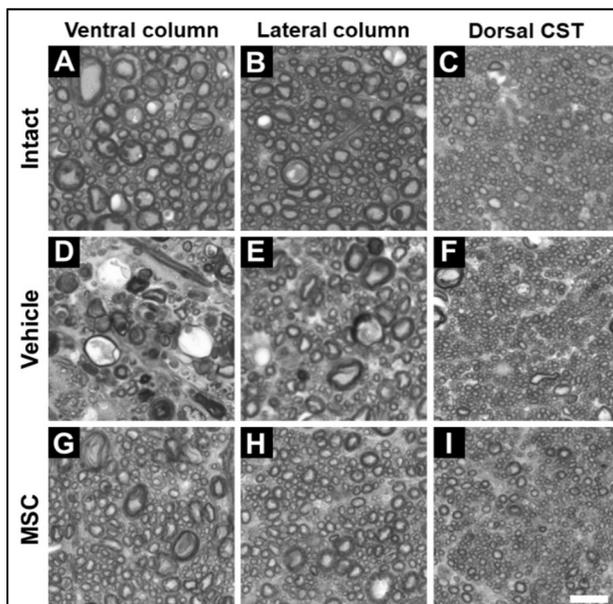


図 5

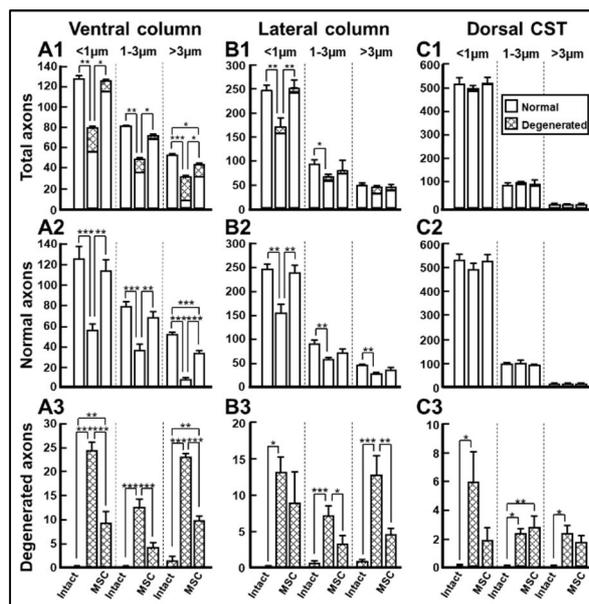


図 6

(7)神経線維数評価

MRI DTI(Diffusion Tensor Image)による神経線維数の評価をした結果、MSC 群では正常群より少ないが、Vehicle 群よりは有意に多かった（図 7：Yasuda et al., Brain Res, 2020）。

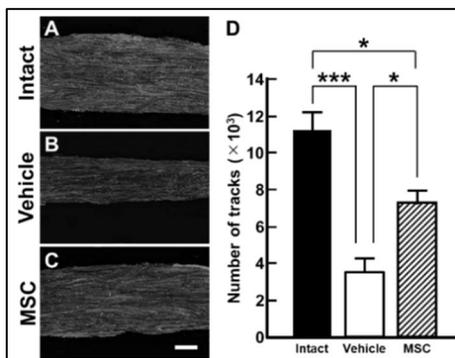


図 7

(8)血液脊髄関門と微小血管系評価血液脊髄関門の評価

血液脊髄関門の評価はエバンスブルーの漏出量により計測した (A, E, I, M)。MSC の投与にて血管外漏出量は少なく、血液脊髄関門の機能の安定化が認められた。微小血管は免疫染色にて計測した (B-D、F-H、J-L)。血管内皮細胞は MSC 投与群では保持が認められた (N)。周細胞は減少していたが MSC 群では vehicle 群と比較して有意に多かった (O)。周細胞の血管内皮細胞との被覆率も MSC 群で保たれていた (P) (図 8 : Yasuda et al., Brain Res, 2020)。

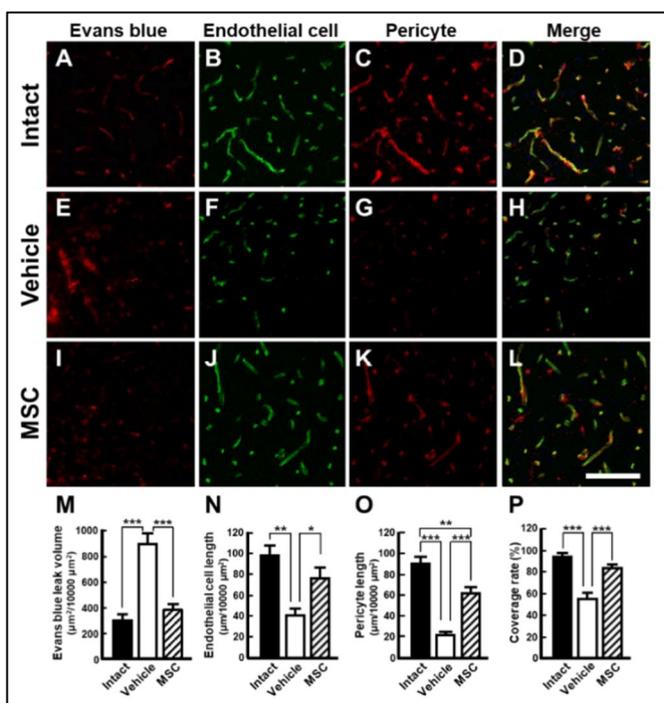


図 8

(9)考察

本研究において確立したラットの虚血性脊髄障害モデルは 28 日間の比較的長期の観察期間において、Vehicle 群では後肢運動機能の回復を認めなかったが、MSC 群では観察期間を通して後肢運動機能の回復を認めた。

MSC 群では脊髄灰白質における神経細胞の保護に加え、白質における軸索の保護を認めた。さらに、微小血管系の保護と血液脊髄関門の安定化を認め、これら複数の治療メカニズムが運動機能の回復に貢献していると思われる。

(10)結語

虚血性脊髄障害モデルラットに対する MSC の経静脈的投与によって運動機能の回復が得られた。治療メカニズムとして、脊髄白質・灰白質の神経保護および血液脊髄関門の安定化が関与していると考えられた。

引用文献 : Yasuda et al. Intravenous delivery of mesenchymal stem cells protects both white and gray matter in spinal cord ischemia. Brain Res 2020

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuda Naomi, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Nagahama Hiroshi, Kocsis Jeffery D., Kawaharada Nobuyoshi, Honmou Osamu	4. 巻 1747
2. 論文標題 Intravenous delivery of mesenchymal stem cells protects both white and gray matter in spinal cord ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147040 ~ 147040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.147040	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naomi Yasuda
2. 発表標題 Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Ischemic Spinal Cord Injury
3. 学会等名 The Society of Thoracic Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田尚美
2. 発表標題 術後虚血性脊髄障害モデルに対する骨髄間葉系幹細胞静脈投与の治療効果の検討
3. 学会等名 日本心臓血管外科学会
4. 発表年 2020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	佐々木 祐典 (Masanori SASAKI) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川原田 修義 (Nobuyoshi KAWAHARADA) (30325865)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	本望 修 (Osamu HONMOU) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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