

令和 3 年 6 月 22 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：18K09071

研究課題名(和文) 実験的脊髄損傷後に生じる脳における可塑性の骨髄間葉系幹細胞による亢進作用の解析

研究課題名(英文) Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhance plasticity in the brain of rat model of experimental spinal cord injury

研究代表者

長濱 宏史 (Nagahama, Hiroshi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20725676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷モデルに対するMSC治療によって生じる、損傷局所および損傷上位脊髄および脳における神経可塑性の賦活化は、損傷局所の白質および灰白質の神経損傷、軸索の損傷または変性を保護すること、血液脊髄関門を安定化することが寄与すると考えられた。さらに、MSC治療後に大脳皮質運動野の網羅的遺伝子解析を行った結果、複数の遺伝子の発現量に変化があり、神経再生・神経可塑性の賦活化に關与する可能性があることが判明した。従って、脊髄損傷に対するMSC治療によって、損傷局所および損傷上位脊髄および脳に惹起される神経可塑性の亢進が、運動機能の改善に關与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷後の回復過程において、損傷部位のみならず損傷を受けていない上位に位置する脊髄および脳において、神経の構造および機能の再構築が惹起され、新しい神経回路が構築されることで、神経機能が回復することが知られている。一方、我々は骨髄間葉系幹細胞治療(MSC治療)が神経の再構築を亢進することで良好な機能改善効果を発揮することを明らかにしている。脊髄損傷に対するMSC治療が、損傷脊髄局所ならびに上位脊髄および脳において作用し、神経機能再構築の亢進作用を発揮することで神経機能改善に寄与している可能性があり、そのメカニズムを解明することは次世代の治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：The enhanced neural plasticity at the injured tissue and/or in the higher level of spinal cord and brain following intravenous infusion of MSCs in spinal cord injury (SCI) model was thought to be due to protection from neuronal, axonal loss or degeneration in the injured tissue, and stabilization of the blood-spinal cord barrier. Furthermore, we analyzed the variable genes expressed in the motor cortex at the 3 days post-MSC infusion, when functional improvement was observed, and found that there were changes in the expression levels of several genes, which may enhance neural plasticity. Consequently, we found that intravenous infusion of MSCs in SCI may promote the functional improvement through the enhanced neural plasticity induced at the injured tissue and at the upper spinal cord and brain.

研究分野：神経可塑性

キーワード：神経可塑性 骨髄間葉系幹細胞 脊髄損傷 diffusion tensor

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の自然回復過程において、損傷部位のみならず損傷部位よりも上位に位置する脊髄および脳において、神経可塑性の賦活化が惹起されることにより、新しい神経回路が構築されることが知られている。我々は、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) の経静脈的投与 (MSC 治療) が神経可塑性の亢進を促進し、機能改善に貢献することを明らかにしてきた。また、MSC 治療による遠隔治療効果によって、脊髄損傷後の大脳皮質運動野における皮質脊髄路ニューロン数の減少が抑制されることを報告している。これらのことより、MSC 治療はその遠隔治療効果によって、脊髄損傷における損傷上位に位置する脊髄および脳における神経可塑性に影響を与える可能性を有すると思われる。

さらに、我々の脳虚血に対する functional MRI と Ex vivo Diffusion Tensor Tractography (DTT) を用いた研究から、MSC は梗塞に陥った脳の周囲のみならず、健常側の脳においても神経可塑性の亢進を誘導することが示唆されている。

以上より、脊髄損傷後の損傷局所、ならびに損傷上位脊髄および脳において、MSC 治療の遠隔治療効果による神経可塑性の亢進作用による、神経回路の再構築が惹起され、運動機能の改善に貢献すると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに慢性期脊髄損傷モデルに対する MSC の経静脈的投与による治療効果を報告している。さらに、脊髄損傷後に生じる大脳に対する遠隔効果も明らかにしている。さらに、虚血脳に対する MSC 治療によって、健常脳における神経可塑性の賦活化が起こることも報告している。本研究では、神経可塑性の賦活化に焦点を置く詳細な解析により、脊髄損傷に対する MSC 治療の新たな治療メカニズムを解明することで、新しい治療法の開発に貢献すると思われる。

本研究では、脊髄損傷モデルに対する MSC 治療によって生じる、損傷局所および損傷上位脊髄および脳における神経可塑性の賦活化のメカニズムを多角的に解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) MSC の培養・治療

SD ラットの大腿骨から骨髄を採取・培養を行った。3 継代目の MSC を下記の 2 群に対して、脊髄損傷作製後にランダム化し、非 MSC 治療群、MSC 治療群の 2 群に分け、大腿静脈から投与した。

- 非 MSC 治療群：新鮮な培養液 (1ml) 静脈内投与
- MSC 治療群：MSCs ( $1.0 \times 10^6$  個) を新鮮な培養液 1ml に懸濁させ静脈内投与

### (2) 脊髄損傷モデル

① 脊髄圧挫モデル：深麻酔下にて SD ラット (雄、250g-300g) のラット用脊髄損傷作成装置 (IH-0400 Impactor; PSI 社製) を用いて、Th9 に実験的脊髄損傷を作製した。

② 脊髄虚血モデル：深麻酔下にて SD ラット (雄、250g-300g) の下行大動脈 (鎖骨下動脈から 5mm 遠位部) を 16 分間クランプし、実験的脊髄虚血を作製した。

### (3) 行動学的評価

モデルラットの運動機能を経時的にオープンフィールドテストによる BBB スコアを用いて評価した。

### (4) 解析項目

#### ① 画像診断学的解析

動物用 7T-MRI (70/16PharmaScan, Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) を用いて、経時的に脊髄の T2 強調像を撮像し、脊髄の体積を定量した。評価日はモデル作製後、1, 7, 14, 28 日とした。また、観察期間終了後に、ラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄組織を高解像度 Ex vivo DTT で撮像し、Tractography 解析 [Diffusion Toolkit, and Trackvis software (<http://trackvis.org>)] によって脊髄の神経線維を描出することで、MSC 投与後の神経回路の再構築の程度などを解析した。

#### ② 組織学的解析

観察期間終了後に脊髄を採集し、H&E 染色し、白質および灰白質の面積を定量した。また、Nissl 染色を行うことで、脊髄前角の  $\alpha$ -motor neuron の数を定量した。また、光学顕微鏡 (BZ-X700) を用いて、脊髄白質 (前索、側索、後索) の神経軸索径を計測した。さらに、モデル作製後 8 日後に EvansBlue を尾静脈より投与し、EvansBlue の血管漏出を定量することで、血液脊髄関門の integrity を評価した。

#### ③ 免疫組織学的解析

観察期間終了後に脊髄組織を採集し、神経細胞マーカーである NeuN、グリア細胞マーカー

である GFAP、血管内皮細胞のマーカーとして RECA-1、ペリサイトのマーカーである PDGFR- $\beta$  を用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡 (LSM 780 ELYRA S.1 system; Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した (laser line/excitation/emission: 405/358/463 nm for DAPI; 488/493/520 nm for RECA-1, NeuN; 561/590/617 nm for PDGFR- $\beta$  and GFAP)。

#### ④ マイクロアレイ解析

脊髄損傷モデルラットの大脳皮質 (運動野) を採集、RNA を抽出し、Clarion™ D/Gene Chip Rat Transcriptome Array (RTA 1.0., Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて、発現遺伝子を解析、発現変動遺伝子群を特定した。

#### ⑤ 遺伝子定量解析

④でスクリーニングされた遺伝子を RT-PCR 法によって定量した。逆転写には Super Script VILOTM cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)、PCR には PRISM7500 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 行動学的解析

脊髄損傷ラットすべてに対麻痺を認めたが、3、7 日目において、MSC 治療群では非 MSC 治療群より有意に BBB スコアが高く、MSC 投与直後より治療効果を発揮することを示した (図 1)。

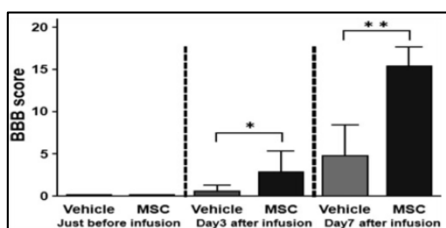


図 1. 行動学的解析結果

BBB スコアは MSC 投与 3 日目以降で、MSC 投与群が有意に高かった。(Oshigiri et al., J Neurotrauma, 2019)

#### (2) 画像診断学的解析

脊髄の T2 強調像を経時的に撮像し、脊髄の体積を計測したところ、正常ラットでは躯幹の成長に合致して徐々に脊髄体積が増加した。脊髄損傷群では、経時的に脊髄体積が減少したが、MSC 治療群では、非 MSC 治療群と比較して減少の程度は緩やかであり、14 日目以降で有意に体積が大きかった (図 2)。また、Diffusion Tensor Tractography 解析を用いて脊髄神経線維数を定量すると、MSC 治療群は非治療群に比べて、有意に神経線維数が多かった (図 3)。

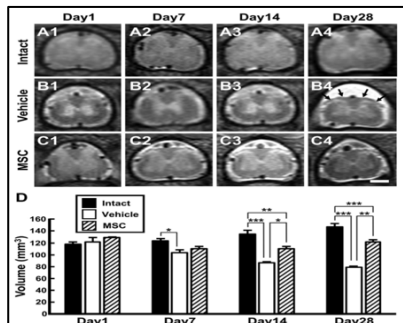


図 2. T2 強調像による体積計測

正常ラットの脊髄体積は経時的に躯幹の脊髄体積は成長に合致して徐々に脊髄体積が増加した。脊髄損傷群では、経時的に脊髄体積が減少したが、MSC 投与群では、非投与群と比較して減少の程度は緩やかであり、14 日目以降で有意に体積が多かった。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

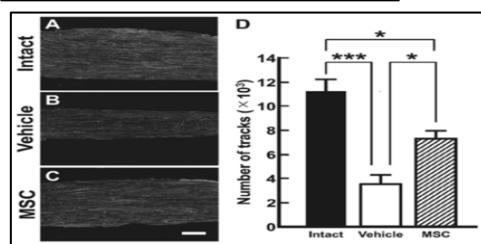


図 3. Tractography による神経線維描出

Diffusion tensor tractography を用いて神経線維数を測定したところ、MSC 投与群では非 MSC 投与群に比べて、有意に神経線維数が多かった。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

#### (3) 組織学的解析

H&E 染色を行い、脊髄組織断面より、白質および灰白質の面積を測定したところ、脊髄全体の面積は MSC 治療群が非治療群と比べて有意に大きく、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった。灰白質面積は MSC 治療群が非治療群よりも有意に大きく、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった。白質面積は MSC 治療群が非治療群よりも有意に大きく、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった (図 4)。また、Nissl 染色を行った脊髄断面よりカウントした脊髄前角の  $\alpha$ -motor neuron の数は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多く、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった (図 6)。正常ラットと比べて、MSC 非治療群は後索、側索における軸索数が有意に減少したのに対し、MSC 治療群では軸索の減少が抑制されていた (図 5)。EvansBlue の漏出量は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に少なく、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった (図 7)。

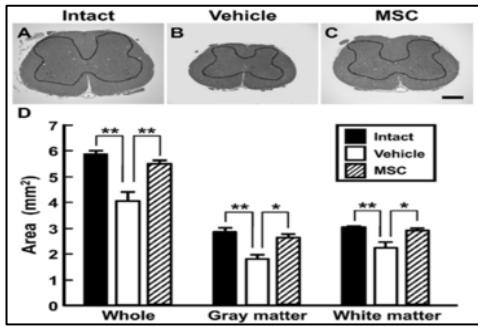


図 4. 脊髓断面積計測  
H&E 染色を行った脊髓断面の白質および灰白質面積を計測したところ、MSC 治療群では、非 MSC 治療群に比べて、白質および灰白質、両者の合計面積が有意に大きかった。正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

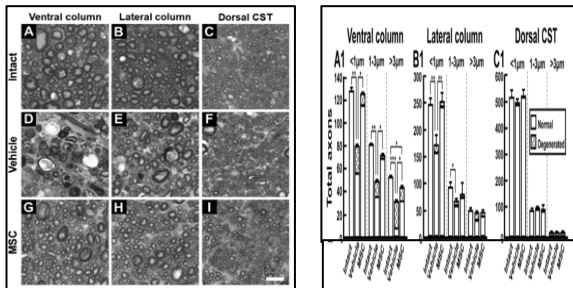


図 5. 軸索の光学顕微鏡像  
光学顕微鏡を用いて、白質線維の軸索を観察した。正常群と比べて、非 MSC 群では軸索が損傷しているが、MSC 治療群では、損傷が軽減されている。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

(4) 免疫組織学的解析

NeuN 陽性細胞数は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多く、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった(図 6)。GFAP 陽性細胞数は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多く、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった(図 6)。RECA-1 陽性細胞数は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多く、正常ラットと MSC 治療群の間に有意差はなかった。PDGFR-β 陽性細胞数は MSC 治療群が非治療群に比べて有意に多かった(図 7)。

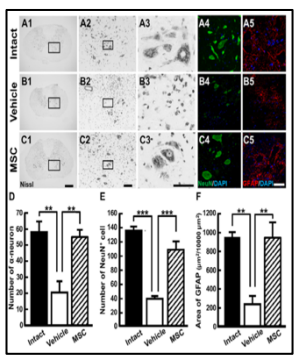


図 6. 免疫組織学的解析  
α-motor neuron、神経細胞、グリア細胞を免疫組織学的に評価した。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

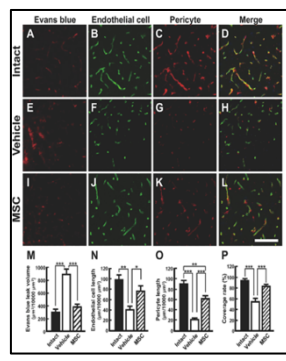


図 7. 毛細血管の評価  
血液脊髄関門の評価を行い、血管内皮細胞、ペリサイトを免疫組織学的に評価した。(Yasuda et al., Brain Res, 2020)

(5) 遺伝子解析

大脳皮質の網羅的遺伝子解析で発現量に変化のあった 38 個の発現変動遺伝子(Differentially expressing genes: DEGs)のうち、15 個が coding 遺伝子であった(図 8)。非治療群と比べて MSC 治療群で発現が高かった 7 個の coding 遺伝子の発現量は、BBB スコアとのピアソンの相関解析の結果、正の相関があることが判明した(図 9)。

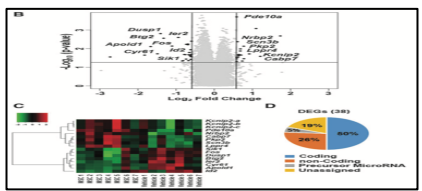


図 8. 発現変動遺伝子解析  
脊髄損傷モデルラットに対する MSC 治療によって大脳皮質(運動野)に発現する遺伝子を解析した。(Oshigiri et al., J Neurotrauma, 2019)

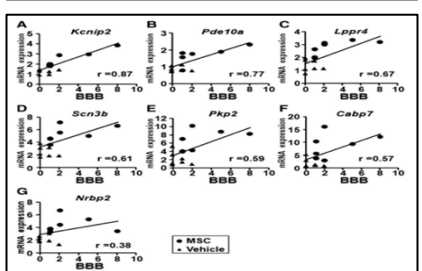


図 9. 運動関連遺伝子の解析  
非治療群と比べて MSC 治療群で発現量の高かった 7 個の coding 遺伝子(Kcnp2, Pde10a, Lppr4, Scn3b, Pkp2, Cabp7, Nrbp2) は、ピアソンの相関解析の結果、運動機能(BBB スコア)との相関があることが判明した。(Oshigiri et al., J Neurotrauma, 2019)

(6) まとめ

脊髄損傷モデルに対する MSC 治療によって生じる、損傷局所および損傷上位脊髄および脳における神経可塑性の賦活化は、脊髄損傷局所の白質および灰白質の神経損傷、軸索の損傷または変性を保護すること、血液脊髄関門を安定化することが寄与していたと考えられた。さらに、運動機能の回復が現れた MSC 治療 3 日目に大脳皮質運動野の網羅的遺伝子解析を行った結果、複数の遺伝子の発現量に変化があり、これらの遺伝子の多くは神経再生、神経可塑性の賦活化に関与する可能性がある遺伝子であることが判明した。従って、脊髄損傷に対する MSC 治療によって、損傷局所および損傷上位脊髄および脳に惹起される神経可塑性の亢進が、運動機能の改善に関与している可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Kiyose Ryo, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Nakazaki Masahito, Nagahama Hiroshi, Magota Hiroto, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Takemura Mitsuhiro, Yokoyama Takahiro, Kocsis Jeffery D., Honmou Osamu	4. 巻 149
2. 論文標題 Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Enhances Therapeutic Efficacy of Reperfusion Therapy in Cerebral Ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e160 ~ e169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2021.02.056	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 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 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 Oshigiri Tsutomu, Sasaki Toru, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Nakazaki Masahito, Oka Shinichi, Morita Tomonori, Hirota Ryosuke, Yoshimoto Mitsunori, Yamashita Toshihiko, Hashimoto-Torii Kazue, Honmou Osamu	4. 巻 36
2. 論文標題 Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells Alters Motor Cortex Gene Expression in a Rat Model of Acute Spinal Cord Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 411 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2018.5793	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0件

〔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  (SASAKI Masanori)  (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授   (20101)	
研究分担者	本望 修  (HONMOU Osamu)  (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授   (20101)	
研究分担者	鈴木 淳平  (SUZUKI Junpei)  (00572596)	札幌医科大学・医学部・研究員   (20101)	
研究分担者	中崎 公仁  (NAKAZAKI Masahito)  (70722461)	札幌医科大学・医学部・研究員   (20101)	削除：2019年5月15日

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
---------	---------