

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591718
研究課題名（和文） 遺伝子移入骨髄幹細胞とコンドロイチナーゼABCを利用した脊髄再生
研究課題名（英文） Spinal cord regeneration with infusion of ch-ABC and transplantation of bone marrow stem cells.
研究代表者 松山 幸弘 (MATSUYAMA YUKIHIRO) 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号：20312316

研究成果の概要：

コンドロイチナーゼABCの脊髄損傷後の運動、知覚機能不全の改善作用につき明らかにすることを目的として研究を行った。脊髄損傷後における、脊髄再生において、コンドロイチナーゼABC0.05U/200Lが運動機能回復に置いて至適投与量であった。またこの酵素は脊髄損傷後に発症する痛みにも効果を認める事ができた。現在椎間板ヘルニアにたいしての臨床応用が可能となっており、脊髄損傷患者にいち早く臨床応用可能と考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：脊髄再生、SSEP、MEP、コンドロイチナーゼABC

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の進歩、ゲノム解読の進行により、様々な遺伝子操作が非常に簡便になってきている。昨年までの研究で、我々は目的とする遺伝子を倫理的に問題となっているウイルスベクタ

ーは使用せずに、有効かつ安全に遺伝子の導入ができるヌクレオフェクション法で可能とし、また多分化能を有する自己由来の骨髄由来幹細胞を遺伝子導入細胞として採用し、神経細胞への分化も可能とした。

2. 研究の目的

コンドロイチナーゼ ABC の脊髄損傷後の運動、知覚機能不全の改善作用につき明らかにすること。コンドロイチン硫酸の分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を投与することによって、脊髄再生はどの程度促進されるかどうかを明らかにすることを目的とする。またその投与時期、量、期間についても詳細に検討を加え、至適時期、量を決定することも目的とする。

3. 研究の方法

S.Dラットの脊髄損傷モデルを作製。クモ膜下にコンドロイチナーゼABC (0.05 U/200 μ L) を充填した浸透圧ポンプ (Alzet osmotic pump) を使用し損傷直後から、14日間髄腔内に持続投与した。

神経栄養因子の定量

各種神経栄養因子 (NGF、BDNF、GDNFなど) をウェスタンブロット法で評価。

組織学的評価

軸索の評価 (Fluorogold)、神経細胞 (β -tubulin(金)、アストロサイト (GFAP)、マイクログリア (ED2、OX-42)、オリゴデンドロサイト (Olig2) の各種免疫染色を行い、軸索の再生、構成細胞の識別を組織学的に評価する。組織学的な定量を行う。

運動機能評価

Inclined plate test, BBBスコア, フットプリントテスト, 3種類の運動機能評価を行って微細な変化をとらえる

知覚機能評価 : Hot plate test,

電気生理学的評価

Motor evoked potentials (MEPs), Somatosensory evoked potential (SSEP)

筋電図を針電極を使用して計測し、運動機能回復を評価。AMPLITUDEとLATENCYで評価

4. 研究成果

<後肢運動神経機能評価 (BBBテスト) >

コンドロイチナーゼABC投与群 (以下ABC群) において、生理食塩液投与群に比して有意な後肢運動神経機能の回復を認めた。0.05

U/200 μ Lより少量あるいは増量し投与したが、0.05 U/200 μ Lが運動機能回復に置いて至適投与量であった。

<後肢運動神経機能評価 (グリッドテスト) >

3分間歩行させ、グリッドを下肢でグリップできた割合を%グリップ値とした。ABC群の%グリップ値は、生理食塩液投与群の%グリップ値に比して高値を示し、これらの投与群において後肢運動神経機能の回復が認められた。これらは上記BBBテストの結果を支持する結果であった。

<後肢運動神経機能評価 (フットプリントテスト) >

ABC群の歩幅は、生理食塩液投与群の歩幅に比して広く、これらの投与群において後肢運動神経機能の回復が認められた。

<知覚神経機能評価 (熱刺激に対する作用 : テイルフリックテスト) >

ラットの尻尾を55 $^{\circ}$ Cの湯浴に浸し、尻尾を揺らすまでの時間 (反応時間) を計測した。生理食塩液投与群では、損傷前に比して、損傷後、経日的に反応時間が短縮していき、熱刺激に対して過敏反応を示した。一方、ABC群では、損傷早期には生理食塩液投与群と同様の傾向を示したが、損傷3週後から5週後以降からは徐々に、熱刺激に対する過敏反応は改善し、損傷8週後には、損傷前とほぼ同程度の反応時間となり、知覚神経機能の回復が認められた。

<知覚神経機能評価 (圧刺激に対する作用 : タッチテスト) >

ABC群では、損傷4週後までは生理食塩液投与群と同様、知覚過敏症状を示したが、損傷5週後以降は徐々に知覚過敏反応は改善した。損傷10週後には、損傷前と同程度のfilamentの圧刺激となり、ABC群において知覚神経機能の回復が認められた。

<電気生理学的検討>

MEP, spSECP を用いた電気生理学検査でも、ABC 群で有意に改善を示した

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Morio Matsumoto, Kazuhiro Chiba, Yukihiro Matsuyama, (他 32 名, 16 番目) Surgical Results and Related Factors for Ossification of Posterior Longitudinal Ligament of the Thoracic Spine. Multi Institutional Retrospective Study. Spine 33:1034-1041, 2008 (査読有)

2. Yoshihito Sakai, Yukihiro Matsuyama, Hiroshi Nakamura, Yoshito Katayama, Shiro Imagama, Zenya Ito, Akira Okamoto. The effect of Muscle Relaxant on the Paraspinal Muscle Blood Flow. Spine 33, 581-587, 2008 (査読有)

3. Yoshito Sakai, Yukihiro Matsuyama, Hiroshi Nakamura, Yoshito Katayama, Shiro Imagama, Zenya Ito, Naoki Ishiguro, Segmental pedicle screwing for idiopathic scoliosis using computer-assisted surgery, J Spinal Disord Tech, 21:181-186, 2008 (査読有)

4. Yoshito Katayama, Yukihiro Matsuyama, Hisatake Yoshihara, Yoshihito Sakai, Hiroshi Nakamura, Shiro Imagama, Zenya Ito, Norimitsu Wakao, Mitsuhiro Kamiya, Yasutsugu Yukawa, Tokumi Kanemura, Koji Sato, Hisashi Iwata, Naoki Ishiguro, Clinical and Radiographic Outcomes of Posterolateral Lumbar Spine Fusion in Humans using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 An Average Five-Year Follow-up Study, International Orthopaedics. In press 2008 (査読有)

5. Shunji Matsunaga, Kozo Nakamura, Atsushi Seich, Yukihiro Matsuyama (他 23 名, 17 番目) Radiographic predictors for the development of myelopathy in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament- A multicenter cohort study. Spine 33, 2648-50, 2008 (査読有)

6. Tatsuya Hattori, Yukihiro Matsuyama, Yoshihito Sakai, Naoki Ishiguro, Hitoshi Hirata, Ryogo Nakamura, Chondroitinase ABC enhances axonal regeneration across nerve gaps, J Clin Neurosci, 15:185-191, 2008 (査読有)

7. Yasutsugu Yukawa, Fumihiko Kato, Keigo Ito, Yumiko Horie, Tetsuro Hida, Masaaki Machino, Zenya Ito, Yukihiro Matsuyama

Postoperative changes in spinal cord signal intensity in patients with cervical compression myelopathy: comparison between preoperative and postoperative magnetic resonance images. J Neurosurg Spine 8:524-528, 2008 (査読有)

8. Keigo Ito, Yukihiro Matsuyama, Fumihiko Kato, Naoki Ishiguro, Analysis of interleukin-8, interleukin-10, and tumor necrosis factor-alpha in the cerebrospinal fluid of patients with cervical spondylotic myelopathy. J Spinal Disord Tech. 21:145-7, 2008 (査読有)

9. Yasutsugu Yukawa, Fumihiko Kato, Keigo Ito, Yumiko Horie, Zenya Ito, Yukihiro Matsuyama, Laminoplasty and skip laminectomy for cervical compressive myelopathy: range of motion, postoperative neck pain, and surgical outcomes in a randomized prospective study, Spine, 32:1980-1985, 2007 (査読有)

10. Takahiro Naruse, Yukihiro Matsuyama, Naoki Ishiguro, Cyclooxygenase-2 expression in ependymoma of the spinal cord, Journal of Neurosurgery : Spine, 6:240-246, 2007 (査読有)

11. Yoshihito Sakai, Yukihiro Matsuyama, Yukiharu Hasegawa, Hisatake Yoshihara, Hiroshi Nakamura, Yoshito Katayama, Shiro Imagama, Zenya Ito, Naoki Ishiguro, Nobuyuki Hamajima, Association of Gene polymorphisms with Intervertebral Disc Degeneration and Vertebral Osteoporosis Formation, Spine, 21:1279-86, 2007 (査読有)

12. Yoshihito Sakai, Yukihiro Matsuyama, Katsuya Takahashi, Tomoya Sato, Tatsuya Hattori, Shojiro Nakashima, Naoki Ishiguro, New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration, Bio-Medical Materials and Engineering, 17:191-7, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 松山幸弘, 側彎症手術の術中脊髄モニタリングの実態: 脊椎脊髄病学会モニタリング委員会による多施設調査、日本側彎症学会、2008. 10. 10-10. 11、奈良 (査読有)

2. 伊藤全哉, 脊髄モニタリング中にいつ術者にアラームすべきか? 日本側彎症学会、2008. 10. 10-10. 11、奈良 (査読有)

3. 酒井義人, 脊椎ナビゲーション手術において surface matching は必要か?、日本脊椎インストゥルメンテーション学会、

2008.10.2-10.3、名古屋（査読有）

4. 伊藤全哉、自家腸骨移植と局所骨移植で後方経路腰椎椎体間固定術(PLIF)の椎体間骨癒合に差はあるか? : 同一施設による自家腸骨と局所骨の比較検討、日本脊椎インストゥルメンテーション学会、2008.10.2-10.3、名古屋（査読有）
5. Zenya Ito, Kenji Kadomatsu, Yukihiro Matsuyama, Naoki Ishiguro, Keratan sulfate is associated with functional disturbance after spinal cord injury. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2008.3.2-3.5, San Francisco（査読有）
6. Yoshihito Sakai, Yukihiro Matsuyama, Hiroshi Nakamura, Yoshito Katayama, Shiro Imagama, Zenya Ito, Naoki Ishiguro, Back exercise for the management of flexion and extension-provoked low back pain, International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2007.6.11-6.14, Hong Kong（査読有）
7. Zenya Ito, Yukihiro Matsuyama, Yoshihito Sakai, Hiroshi Nakamura, Shiro Imagama, Naoki Ishiguro, Hasegawa Yukiharu, What is the risk factor worsening low back pain? : A longitudinal study in a year, International Society for the Study of the Lumbar Spine Annual Meeting, 2007.6.11-6.14, Hong Kong（査読有）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 幸弘 (MATSUYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20312316

(2) 研究分担者

酒井義人(SAKAI YOSHIHITO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：70378107

伊藤全哉 (ITO ZENYA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50447819

今釜史郎 (IMAGAMA SHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40467288

片山 良二 (KATAYAMA RYOUJI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40378104