

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2010  
 課題番号：19592074  
 研究課題名（和文） 自家細胞、液性因子、人工細胞外マトリクスを用いた慢性期脊髄損傷治療の研究  
 研究課題名（英文） The research for repair of chronic spinal cord injury using autologous cells, growth factor and artificial extracellular matrix.  
 研究代表者  
 片岡 和哉（KATAOKA KAZUYA）  
 京都大学・医学研究科・非常勤講師  
 研究者番号：10314189

研究成果の概要（和文）：まず、ラットの脊髄に一定の損傷を作る装置を作成し、この装置を用い、ラットの脊髄に比較的安定した損傷を作成することが可能となった。損傷作成後 2 週間で脊髄を免疫組織化学染色にて観察すると、脊髄内に安定した大きさの空洞が形成されていることを確認した。この空洞に、アルギン酸ゲル、成長因子を結合したアルギン酸ゲルを注入した。移植後、脊髄を観察したが、空洞の拡大の抑制や、一部神経組織の再生が見られたが、有意な結果は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：We made the device for making injury to spinal cords of rats. Using this device we could make fixed damage to spinal cords. After 2 weeks, we observe fixed size cavities in the spinal cords using immunohistochemical staining. We injected the alginate gel and the bFGF applied alginate gel. After injection, we investigate the spinal cord. We confirmed inhibition of enlargement of the cavities and partial regeneration of nerve fibers, but we could not find statistically significance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：慢性期脊髄損傷、細胞外マトリクス、アルギン酸ゲル、bFGF、徐放、ヘパリン様ペプチド

1. 研究開始当初の背景  
 再生不可能といわれた中枢神経も、条件を整

えれば末梢神経と同様に再生可能であることは、もはや広く認知されている。われわれの

施設でも、これまで、われわれが開発した人工細胞外マトリクスであるアルギン酸ゲルを用いて、末梢神経損傷、急性期脊髄損傷再生の研究を行ってきた。また、自家骨髄間質細胞を使用して、急性期脊髄損傷再生の研究も行ってきた。

さまざまな施設で、栄養因子や種々の抗体、細胞成分などを用いた研究により、急性期の脊髄損傷に関しては、治療法開発のめどが立ちつつある。また、臨床応用も一部始まっている。しかしながら、慢性期脊髄損傷に関しては未だ確固たる方向性は確立されていないのが現状である。慢性期脊髄損傷には、グリオシスの処理や神経成長阻害因子の阻害、神経栄養因子の選択・投与時期、細胞成分の補充など非常に困難な問題が多い。

## 2. 研究の目的

本研究で、治療法確立まで到達するのは非常に困難であると予想されるが、以後の研究の方向性を示すような研究を計画している。慢性期脊髄損傷の再生を困難にしている最大の原因は、脊髄内軸索のおかれている環境にあるといわれている。すなわち、アストロサイトをはじめとする神経膠細胞が神経成長阻害因子等の液性因子を産生していることが確認されている。またグリオシスと呼ばれる瘢痕組織を形成し、物理的にも、軸索再生を許さない環境を作り出しているといわれている。液性因子に関しては、その阻害因子等を用いた研究もなされてはいるが、グリオシスに関してはその研究報告は見られない。

今回の研究では、脊髄内のグリオシスを分解するような働きを持った、液性因子や、自家細胞（マクロファージなど）を移植しグリオシスがどう変化するかを見たい。また、うまくグリオシスを部分的にでも分解できれば、これまで研究してきた人工細胞外マトリクスを同時移植して脊髄内軸索の再生を見たい。本研究の期間内に、慢性期脊髄損傷の軸索再生が可能となるような環境を整える方法を模索したい。

## 3. 研究の方法

ラット（4-8週齢）のTh8-10のレベルで、椎弓切除を行い脊髄を露出させる。硬膜上より圧挫損傷を加える。この状態で創を閉鎖し飼育して、脊髄慢性期損傷を作成する。圧挫損傷は完全麻痺とならない程度とする。まず、

この状態で脊髄を取り出し、免疫組織化学染色法を用いて、慢性期脊髄損傷の脊髄空洞の完成時期・程度、グリオシスの評価を行う。この結果をもとに、次の移植時期を決定する。次に、われわれが研究してきた人工細胞外マトリクスであるアルギン酸ゲルを、硬膜外より注入することにより、この空洞に移植する。注入後2, 4, 8週後、脊髄組織採取し、免疫組織化学染色法を用いて評価する。これをコントロールとし、われわれが開発した、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を結合し徐放化したアルギン酸ゲルを移植したものと比較する。

これらの結果をふまえ、他の液性因子（神経成長因子、肝細胞成長因子等）、コラーゲン分解酵素などをアルギン酸ゲルに添加、または持続注入するモデルを検討する。また急性期脊髄損傷の再生でこれまで良好な結果をもたらしている自家骨髄間質細胞およびこの細胞を分化誘導したものを使用する。さらに有用性の期待できる細胞系と、神経系細胞に分化することが期待される自家骨髄間質細胞をアルギン酸を基本とする人工細胞外マトリクスとともに移植する。免疫組織化学染色、電子顕微鏡等を用いて、グリオシスの状態、脊髄内軸索の伸長の様子、移植した細胞と既存の脊髄細胞との相互作用などを観察する。さらに、この系に神経成長因子や、成長阻害因子の阻害因子などを加えて変化を観察する。結果を総合し慢性期脊髄損傷の治療に至適な組み合わせ、投与（移植）時期を検討する。

## 4. 研究成果

(1) まず、安定した慢性脊髄損傷を作成する実験を行った。New York University Weight Drop Device にならって、10gのおもりを脊髄に垂直に落下させる装置を作成した。この装置は硬膜上に接触させた金属棒の反対端に、おもりをガイドに沿って垂直に落下し、間接的に圧挫損傷を加えるものであり、種々の高さより落とせるように工夫してある。生後4週齢、8週齢のWistarラットの背部を切開し、胸髄 Th8-10 のレベルで椎弓を切除し、硬膜を損傷しないよう注意して、脊髄を露出。先に作成した Weight Drop Device を用いて硬膜上から脊髄に圧挫損傷をくわえる。椎弓を元に戻し、皮膚縫合し飼育する。おもりを落とす高さを変え至適な損傷を作成する実験を行った。

6.25 cm, 12.5 cm, 25cm から落とし 2-4 週間後に脊髄を採取し、凍結切片を作成。NF200 抗体や GFAP 抗体等を用いて免疫組織化学染色し、脊髄内の空洞の形成を観察した。脊髄内空洞は受傷後 2 週間でほぼ完成することが確認された。生後 8 週齢の場合 6.25 cm の場合空洞は比較的小さく、下肢の麻痺も 2 週間程で回復した。12.5 cm の場合比較的大きな空洞を形成し、下肢の麻痺は長期残存した。25cm では巨大な空洞を形成し、ほぼ完全麻痺となり、ほとんどのラットが死亡した。生後 4 週齢の場合は 6.25 cm の高さでも比較的大きな空洞が形成され、下肢の麻痺も残存した。12.5 cm では巨大な空洞が形成され、膀胱直腸障害が原因と思われるが、一週間程度で死亡する個体が多かった。25cm では、脊髄は完全麻痺し、ほとんどのラットが死亡した。実験を繰り返しているうちにほぼ安定した大きさの空洞が形成できるようになった。この装置を用いて、一定の慢性脊髄損傷が作成できることがわかった。また♀の方が膀胱直腸障害によると思われる死亡が少なかった。

この成果より、以後の実験では、生後 4 週齢の Wistar 系♀ラットを用い、6.25cm よりのおもりの落下で脊髄損傷を作成し、受傷後 2 週間で移植等を行うこととした。

(2) 前述のように作成した脊髄内空洞に、安全に細胞外マトリクスなどを移植（注入）する方法を検討した。注入するアルギン酸ゲルは、われわれの施設で研究してきた人工細胞外マトリクスで、末梢神経損傷では、損傷軸索の再生・伸長に非常に有用であることが証明されている。また以前の研究ではラットの急性期の脊髄損傷に移植した場合、グリオーシスの抑制、脊髄空洞の縮小、軸索の伸長等の結果が得られている。

脊髄損傷作成後 2 週間で再度椎弓切除し、損傷作成時に硬膜につけた目印を参考に、硬膜外より空洞内に注入する方法をとった。形成された脊髄内空洞の容積はおよそ 0.3-0.5ml でほぼ安定していた。この空洞内の脳脊髄液を硬膜外よりシリンジで吸引し、同量のアルギン酸ゲルを注入した。吸引・注入には Micro manipulator を使用し、硬膜にあけた小孔より、30G の注射針を研磨し先端を鈍にしたものを用い、さらなる脊髄損傷を起さないように注意して行った。注入する際に少し難しい面があったが、安全に、安定して注入でき

るようになった。注入後、ラットの後肢の運動を観察したが、さらなる脊髄損傷の徴候は見られなかった。

その後、以前にわれわれが開発した、アルギン酸にヘパリン様ペプチドを結合させたゲルを使用した。このアルギン酸ゲルはヘパリン様ペプチドの部分で塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と結合し、アルギン酸の分解と共に bFGF が徐放されることが、以前の研究で確認されている。このゲルに bFGF を添加し脊髄空洞内に同様に注入した。

(3) 無注入群、アルギン酸ゲル単独注入群をコントロールとし、bFGF 徐放アルギン酸ゲル群を検討した。Wistar 系ラット、生後 4 週齢♀を用い、各群 5 匹作成した。無注入群は損傷後 4, 6, 10 週後、ゲル注入群は注入後 2, 4, 8 週後（損傷後 4, 6, 10 週）ホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄損傷部を取り出し標本を作製した。凍結切片を作成した。神経軸索を染色するための抗 NF200K 抗体、神経膠細胞を染色するための抗 GFAP 抗体等を用い、免疫組織化学染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用い、染色結果を、各群比較検討した。

いずれの群も脊髄に空洞が作成されていた。脊髄の空洞は、bFGF 添加アルギン酸ゲル注入群が小さい傾向は見られたが、ばらつきが大きく統計的有意差は見られなかった。またアルギン酸ゲル単独注入群では無注入群との差は見られなかった。神経線維の免疫組織化学染色では、脊髄空洞壁近辺に染色される軸索の数は bFGF 添加群が多い傾向が見られたが、統計的に有意差は得られなかった。また空洞を埋めるような神経・神経膠組織の再生、損傷部を横切るような軸索の再生は見られなかった。神経膠細胞の染色では、グリオーシスが抑制・縮小しているような明かな所見を得ることが出来なかった。

(4) 今回の研究では、今後の治療法の研究の発展・展開につながるような結果は残念ながら得られなかった。浸透圧ポンプを使用して液性因子を持続投与すること、自家細胞の移植まで検討、準備していたが、本研究では想定していた様な結果が得られず、そこまで至らなかった。

今回の研究では、negative な結果しか得られなかった。反省点としては、脊髄損傷の作成法、脊髄空洞内への移植・注入法等の開発・取得に時間をとられてしまい多くの液性因

子やコラーゲン分解酵素などを投与できなかったことがあげられる。ただ今回得られた研究手技、手法は、検討したが大きな問題が無いと考えられ、今後も応用可能と考えられた。今後、アルギン酸ゲルを基本として、さらなる細胞外マトリクスの改良を検討する必要があると考える。また、液性因子、細胞成分を移植する研究を続けたいと考える。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

片岡 和哉 (KATAOKA KAZUYA)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：10314189

##### (2) 研究分担者

野瀬 謙介 (NOSE KENSUKE)  
京都大学・医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：80379057

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：