

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791326

研究課題名（和文） 引き抜き損傷及び脊髄疾患の再生治療法の開発

研究課題名（英文） Regenerative therapy for spinal cord avulsion injury and spine-related diseases

研究代表者

齊藤 晋 (SAITO SUSUMU)

財団法人田附興風会・医学研究所 第6研究部・研究員

研究者番号：00450239

研究成果の概要（和文）：

現在においても有効な治療法のない脊髄の神経根引き抜き損傷に対して、再生治療の基礎研究を行った。ラット胎児の海馬より採取した神経幹細胞を脳脊髄液経由でラットの神経根および脊髄損傷部へ導入し、損傷部でのどのように分化するかを免疫組織化学的に調べた。結果、神経幹細胞は引き抜き損傷部位の表面へ接着し、侵入した。また多くの侵入した細胞は GFAP や S-100 蛋白の免疫活性を示し、星状膠細胞への分化が示唆された。しかしながら、神経幹細胞が直接ニューロンへ分化する所見は本研究でのすべての引き抜き損傷モデルにおいて認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

We carried out a basic study for a regenerative therapy for the spinal cord avulsion injury, for which there has been no effective treatment by now. Neural stem cells, which were harvested from hippocampus tissue of rat fetuses, were induced via cerebrospinal fluid to the injured sites of the spinal cord and avulsed spinal roots of adult rats, and how these stem cells differentiate in that site was investigated immunohistochemically. As a result, infused neural stem cells were attached to, and integrated into, the lesions of the avulsion site. Most of these integrated cells displayed the immunoreactivity for S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP). We concluded that the stem cells possibly differentiated to astrocytes in the lesions, however, differentiation to neurons was not observed in any avulsion-injury models of this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：移植、再生医療 神経科学 脊髄引き抜き損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの基礎研究の背景

哺乳類の神経の再生の研究は、中枢神経、末梢神経を問わず国内外で盛んに行われており、多数の報告がなされている。その中で神経系の幹細胞を再生に用いる研究の報告も数多くなされているが、その細胞を移植し、分化や機能などを見た報告は少ない。そこで上司である鈴木氏のグループは神経幹細胞を脊髄損傷部へ脳脊髄液を経由して投与し、脊髄損傷部へと誘導して損傷部の脊髄表面に細胞が侵入するのを確認し、報告した。この手法を現在において有効な治療法のない神経根引き抜き損傷の再生治療に応用できないかと考えたのが、本研究の着想点である。

(2) 臨床的背景

脊髄引き抜き損傷に対しては、神経節の末梢部の損傷ならば神経修復が適応となり、また中枢部の損傷ならば自然回復が期待できないため、神経移行術等の再建手術が行われているのが現状である。一方でわれわれの着想のごとく脳脊髄液経由で神経幹細胞を投与し、それらが引き抜き損傷部において有効な機能を示す所見が得られれば、腰椎麻酔のような極めて簡便な手技で細胞を損傷部へ投与することができるかと期待される。このように最終的には中枢型引き抜き損傷に対して低侵襲な治療法を樹立する目的で研究プランの作成を検討した。

2. 研究の目的

(1) 神経根引き抜き損傷モデルの作成

現在まで本邦、海外で行われている引き抜き損傷モデルでは脊髄の硬膜を切開し、神経根-脊髄移行部で直接鋭利に切断する手法が一般的である。臨床的には、脊髄引き抜き損傷は上肢と頸部の過度の伸展により、神経が牽引されて脊髄からひきちぎれる病態を呈する。そのため上記のような鋭的な切断では

忠実に臨床的病態を再現しているとはいえないため、まず臨床に沿った引き抜き損傷モデルを作成することが最初の目的となった。

(2) 神経幹細胞の分化、機能の評価

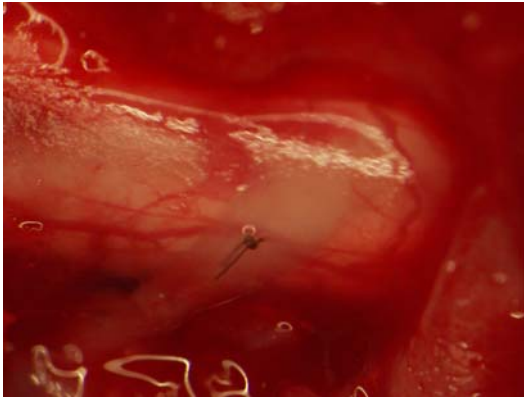
脊髄引き抜き損傷モデルに投与した神経幹細胞がどのように分化し、どのような機能を示すかを調査するのが第2の目的である。分化については免疫組織化学的に観察を行い、機能については電気生理学的評価、行動評価等の手法を用いて調査を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) ラット引き抜き損傷モデルの作成

神経根引き抜き損傷モデルは以下の3パターンで作成を行った。

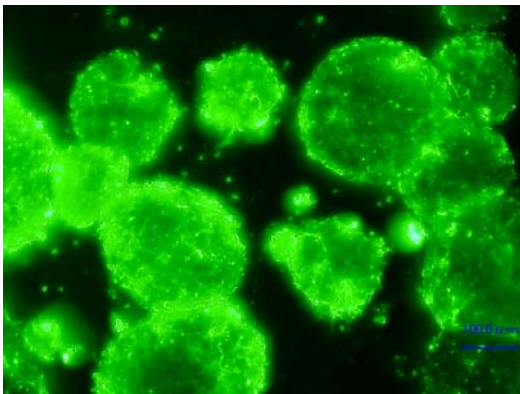
まず第1の方法はSD系ラット（生後4週-6週）の第4-7頸椎を後方よりラミネクトミーを行い、マイクロピンセットを用いて脊髄後根に圧挫損傷を加えた。この際、脊髄硬膜は開放しなかった。第2の方法は同様のラットを用いて片側の肩甲骨内側を切開し、肩甲下筋の筋間を展開し、腕神経叢を露出した。腕神経叢を、フック型把持クランプを用いて外側の角方向に牽引し、抵抗感が消失する時点で牽引を終了した。その後上記の方法と同様に頸椎にラミネクトミーを行い、硬膜を開放して神経根の損傷の有無を実体顕微鏡および固定した凍結標本を用いて確認した。第3の方法は第1の方法と同様にラミネクトミーを行い第4-7神経根および脊髄を露出。硬膜を2椎間分開放し、神経後根-脊髄移行部を展開した後、後根神経根をL字型のフックにて上方に牽引して引き抜きを行った。引き抜きは肉眼的、または実体顕微鏡的に確認し、神経根が脊髄背側に残存していないことを確認した。断裂した神経根は元の付着部へ10-0ナイロン糸にて縫合した（図1）。



(図1：引き抜きされた後根を脊髄後角へ縫着)

(2) 神経幹細胞の作成

GFP (Green Fluorescent Protein) 産生遺伝子を組み込んだ遺伝子組み換え (Transgenic Rat) の SD 系ラットの胎児 (胎生 16~18 日) の海馬を採取し、これを単細胞に分割後、bFGF 添加した無血清培地 (DMEM/F12) 上、37 度 CO₂ 濃度 5% の環境にて 4~6 日浮遊培養し神経幹細胞を得た。これを 3 回培養継代しニューロスフィアを作成した (図 2)。



(図2：培養後のニューロスフィア)

(3) 神経幹細胞の移植およびその免疫組織学的検討

生後 4~6 週の SD 系ラット (雄) をネンブタールを用いて腹腔内投与して麻酔した後、脳固定装置に固定し、頭蓋骨のラムダ縫合より 3.5mm 尾側に 1mm のバーホールを作成、第 4 脳室に 30G 針を刺入して、GFP 標識されたニューロスフィア (1 × 10⁶ 個の神経幹細胞に相当) を含む 25 ml の PBS を脳脊髄液内に注入した (図 3)。3 週、6 週にてペントバルビタール麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い、その脊髄および神経根を採取した。採取した組織から 10

μm 厚の凍結標本を作製し、病理組織学的または、蛍光顕微鏡を用いて免疫組織化学的に評価を行った。免疫染色は 1 次抗体として neurofilament (Sigma), β tubulin (Sigma), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Sigma), S-100β (Sigma), O4 (Sigma) を用いた。また 2 次抗体としては Alexa fluoro 546 抗マウス抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を使用した。

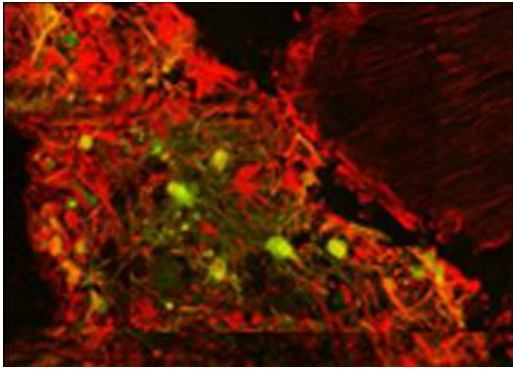


(図3：第4脳室へのニューロスフィアの注入)

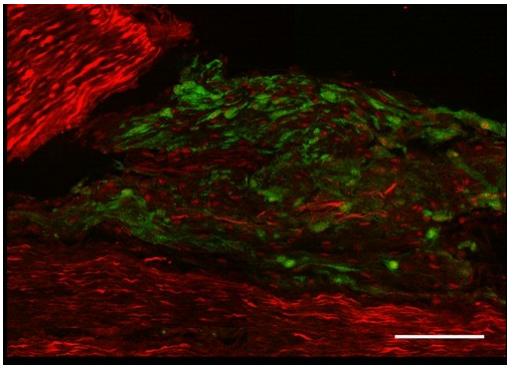
4. 研究成果

(1) 圧挫損傷による神経根引き抜き損傷モデルについて

SD 系ラットに後方よりラミネクトミーを行い、脊髄後根に圧挫損傷を加えたモデルでは、第 4 脳室から移植した GFP 標識付神経幹細胞が損傷部に接着し、一部は後根に侵入する所見が確認された。損傷が軽微であるほど、接着する細胞は少なく、損傷のない脊髄表面への細胞の接着はほとんど認めなかった。進入した細胞は母床へ突起を伸張していた。免疫組織化学的には GFP 標識された細胞は S-100 (図 4), GFAP は免疫活性を示したが、ニューロン特異タンパクである neurofilament (図 5) や β tubulin では不活性であった。オリゴデンドロサイトへの分化を示す O4 も不活性であった。したがって移植された神経幹細胞はアストロサイトへの分化を示したと考えられた。



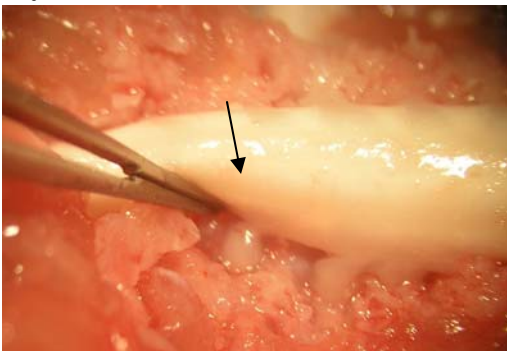
(図4：緑が GFP 標識された神経幹細胞、赤が S-100 抗体活性を示す)



(図5：緑が GFP 標識された神経幹細胞、赤が Neurofilament 抗体活性を示す)

(2) 腕神経叢の牽引による引き抜きモデルについて

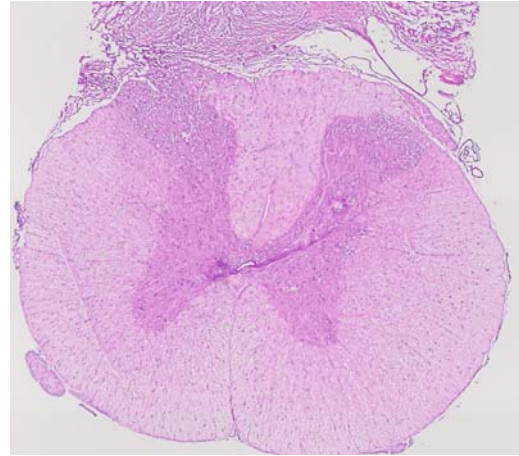
腕神経叢をフック型把持クランプを用いて外側に牽引し、引き抜きを行ったモデルでは、損傷後の硬膜切開による展開の結果、一部の個体で神経根が椎間孔へ侵入する部位において亀裂が認められた(図6)が、多くの個体ではそれより遠位での損傷を認め、中枢型引き抜き損傷を再現することが困難であった。



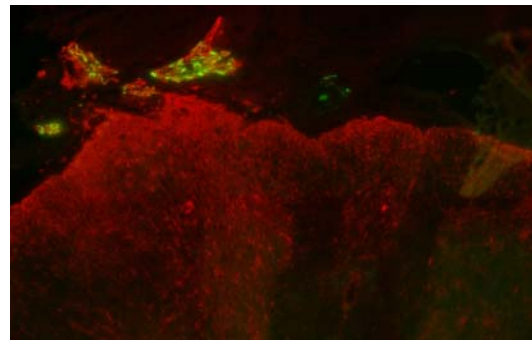
(図6：後根に確認される亀裂損傷(矢印))

(3) 直視下に後根を引き抜き、再縫合を行ったモデル

引き抜きされた後角には癒痕が形成され、その反応は中心管方向に広範囲に及んでいるのが確認された(図7)。GFP 標識された神経幹細胞は引き抜きされた後根側に主に侵入し、突起を伸長させるのが確認された。免疫染色では結果(1)同様に S-100、GFAP には免疫活性を示した(図8)が、ニューロンへの分化は認めなかった。



(図7：引き抜き後の脊髄後角(写真左側))



(図8：緑が GFP 標識された神経幹細胞、赤が GFAP 抗体活性を示す)

(4) まとめ

今回、移植された神経幹細胞が直接ニューロンに分化する事実は認められなかったが、移植された細胞が損傷部位に接着し、侵入し、かつ突起を伸長させるのが確認された。免疫組織化学的にはアストロサイトへ分化していると考えられ、神経の再生に対して何らかの補助的作用を担っている可能性が示唆された。細胞の移植方法は脳脊髄液を介して行うものであり、損傷部に選択的に細胞が定着することが再確認された。これは臨床医学において簡便かつ低侵襲に細胞を注入し、患部へ導入できることを意味する。今回の研究では電気生理学的根拠や、行動生理学的研究はできなかったが、今後そのような側面でのデータを蓄積することで、移植細胞の役割を評価できると考えている。

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)

[学会発表] (計 1 件)

齊藤晋ら. ラット神経根損傷に対する神経幹細胞を用いた再生. 第16回日本形成外科学会基礎学術集会 (神戸, 2007年10月11日(木)~12日(金))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 晋 (SAITO SUSUMU)

財団法人田附興風会・医学研究所 第6 研究部・研究員

研究者番号：00450239