

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09235

研究課題名(和文) 脊髄虚血障害に対するMuse細胞による再生治療

研究課題名(英文) Novel cell therapy for spinal cord ischemic injury

研究代表者

早津 幸弘 (HAYATSU, Yukihiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50747433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞治療効果を実証するためには、後肢機能低下を維持した状態で長期生存可能な動物モデルが必要である。既存の動物モデルでは長期生存を示した報告はなく、実際に模倣してモデル作成を行ったが、長期生存を得ることはできなかった。そこで、新たな動物モデル構築を目指した。血管収縮薬を用いることで脊髄に選択的な障害を与え、脊髄虚血障害モデルラットを確立した。術後急性期、慢性期において脊髄組織学的評価を行い、脊髄梗塞を実証した。脊髄虚血モデルラットに対し、術翌日にMuse細胞、間葉系幹細胞、PBSをそれぞれ投与し、術後8週間の行動評価を行った。脊髄組織評価、並びに各組織における投与細胞の体内動態も評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈術後脊髄虚血性障害をきたした患者において、現代医療では有効な治療方法は存在しない。本研究により脊髄虚血性障害に対するMuse細胞の有効性を示すことができれば、脊髄虚血性障害に対する積極的治療手段となりうる。Muse細胞は、アクセスの簡便性もメリットの一つであり、術前からストックしておくことが可能である。術後脊髄障害を生じた場合に即座に投与可能である点は今後の臨床応用において大きな利点の一つである。脊髄虚血性障害を診断した段階でMuse細胞を投与することで、脊髄虚血性障害に対する積極的治療を開始することができ、下肢機能改善、膀胱直腸障害回復、ひいては生命予後改善をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To demonstrate stem cell therapy efficacy, a crucial element is establishing an animal model allowing long-term survival while maintaining hindlimb dysfunction. Existing models lack reports of sustained survival, and our attempts to create such a model were unsuccessful. Hence, this study aimed to establish a novel animal model for assessing stem cell therapy effectiveness.

We successfully developed a rat model of spinal cord ischemic injury by selectively damaging the spinal cord using a vasoconstrictor. Histological evaluation confirmed acute and chronic postoperative spinal cord infarction. Subsequently, intravenous injections of Muse cells, mesenchymal stem cells, and PBS were administered to rats with spinal cord ischemia on the day after surgery. Rat behavior was evaluated over an 8-week postoperative period. Spinal cord tissue evaluation and in vivo imaging were conducted to assess the administered cells' distribution and viability.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：虚血性脊髄障害 対麻痺 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腹部大動脈手術はその手術侵襲の大きさから周術期合併症の頻度が高く、特に脊髄虚血性障害は最も重篤な合併症の一つとして挙げられる。下肢機能低下、膀胱直腸障害を生じ、生活の質を低下させ、生命予後にも大きな影響を与える。その発生率は、手術経験豊富な施設においても、胸腹部大動脈人工血管置換術で 8.3%、胸腹部大動脈ステントグラフト治療で 11%と報告されている。術前画像診断技術や術中モニタリング技術の劇的な進歩と相反して、脊髄障害発症率は過去 10 年間で大きな改善は見られていない。

術後脊髄虚血性障害の原因は多岐に渡るが、大動脈遮断に伴う脊髄虚血および遮断解除後の再灌流障害と、動脈硬化に伴う粥腫による塞栓症が大半である。当院では放射線診断科と協力し、脊髄栄養血管 (Adamkiewicz 動脈) を積極的に同定し、確実な術中灌流と再建を行うことで成績向上に努めてきた。脊髄保護戦略の変遷とともに成績は向上してきているが、残念ながら一定数は術後脊髄虚血性障害を発症する。ここで大きな課題となっているのが、脊髄虚血性障害には有効性の高い薬剤や手術治療は存在せず、リハビリによる保存的加療が中心、という点である。我々は、「術後脊髄虚血性障害に対して、幹細胞治療により梗塞に陥った脊髄神経細胞が再生する」という仮説を立て、Muse 細胞 (Multilineage-differentiating stress enduring cells) による幹細胞治療の可能性を想起した。

Muse 細胞は自発分化能・抗炎症作用・ストレス耐性能を有する幹細胞で、これらの特性は本研究において、その治療機序に大きく寄与することが期待される。また、腫瘍性を持たない細胞であり、静脈注射のみで障害組織へ遊走・生着する。安全性と簡便性、低侵襲性の点からも Muse 細胞は他の幹細胞より優れており、実臨床に即した細胞治療として期待される。臨床治験が行われた疾患もあり、有効な治療効果を示してきた。これらの理由から本研究では本学を特徴づける研究成果を活かすことができる Muse 細胞を選択した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、大動脈術後脊髄虚血性障害患者に対する幹細胞治療の確立である。臨床治験の前段階として、動物実験による基礎的データの構築が必須である。

当科では、教室の歴史の中で胸腹部大動脈治療を積極的に行なっており、脊髄虚血性障害予防に取り組んできた。動物実験による知見の集積も重ねてきた。過去に構築してきた脊髄障害予防戦略と組み合わせることで、より包括的な脊髄虚血性障害対策を構築したいと考えている。

3. 研究の方法

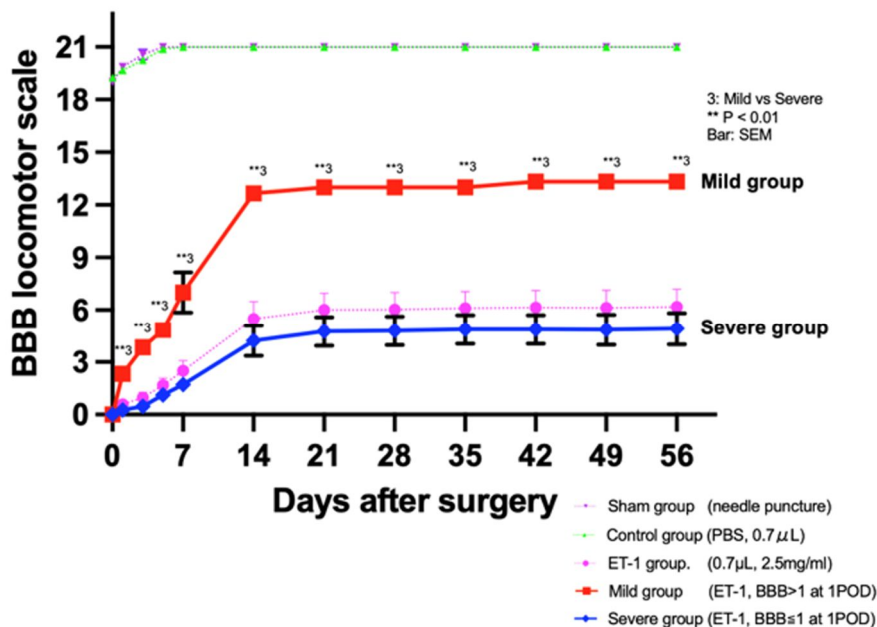
本研究では、大動脈術後脊髄虚血性障害への幹細胞治療に関する臨床治験に繋げることを目指し、非臨床試験としての動物実験による基礎的データの蓄積を行う。

- (1) 脊髄虚血モデル動物の作成 (ラット): 幹細胞治療効果を実証するためには、後肢機能低下を維持した状態で長期生存可能な動物モデルが必要である。これまで、既存の動物モデル (腹部大動脈バルーン閉鎖モデル、大動脈遮断モデル) では長期生存を示した報告はなく、実際に模倣してモデル作成を行なったが、長期生存を得ることはできなかった。そこで、新たな動物モデル構築を目指した。当院脳神経外科から報告されている脳梗塞モデルに倣い、血管収縮薬を用いることで脊髄に選択的な障害を与え、脊髄虚血障害モデルラットを確立した。
- (2) モデル動物評価: 術後から週 1 回、BBB locomotor scale で行動評価を行なった。術後 8 週間観察し、後肢機能低下を維持したモデルを確立した。また、術後急性期、慢性期において脊髄組織学的評価を行い、脊髄梗塞を実証した
- (3) Muse 細胞の収集: ヒト骨髄間葉系細胞を継代し、Fluorescence-activated cell sorting (FACS), Magnetic cell sorting (MACS) を用いて Muse 細胞を収集する。
- (4) 細胞投与と行動評価: 作成した脊髄虚血モデルラットは、術後 24 時間後に行動評価を行い、BBB locomotor scale が 0-1 点の範囲内にある動物を使用する。実験(2)で検証し、その条件がモデル動物として安定化を図れることを示した。それらのモデル動物に対し、最適化した投与時期に Muse 細胞、間葉系幹細胞、PBS をそれぞれ投与し、BBB locomotor scale により術後 8 週目まで行動評価を行う。
- (5) 組織学的評価: 術後 2 週目、及び 8 週目に sacrifice し、脊髄組織学的評価 (免疫組織学的評価) を行う。
- (6) In vivo imaging: 蛍光色素 (Akaluc) で標識した間葉系幹細胞、Muse 細胞を FACS により収

集する。これらをモデル動物に投与し、術後3日目、7日目に In vivo imaging system により撮影、生体内動態を追跡する。その後、動物を sacrifice し、脊髄、その他の臓器を摘出し、各組織における細胞集積を解析する。

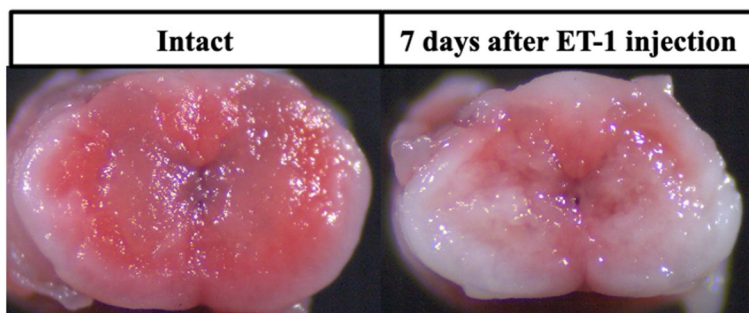
4. 研究成果

(1) モデル動物の確立、評価：薬剤量、投与経路、投与量を最適化し、脊髄梗塞モデルラットを確立した。



さらに、術後24時間後の行動評価において BBB locomotor scale が 0-1 点の範囲内にある動物は、慢性期の BBB locomotor scale のばらつきを抑えられることを示した。

下位胸髄断面の TTC 染色マクロ像を下記に示す。術後7日目で脊髄前角を中心に梗塞巣を認めた。

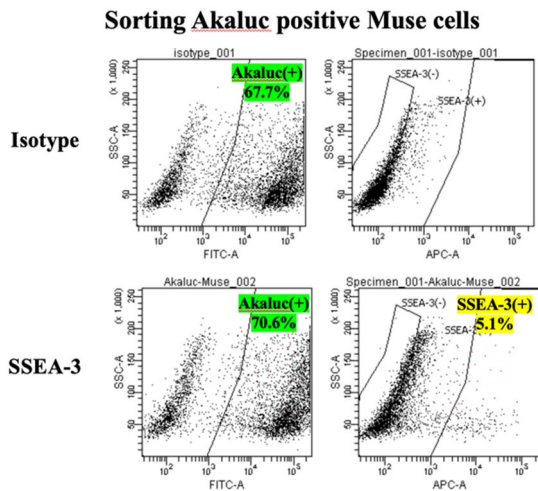


(2) 投与細胞の収集

MACS により SSEA-3 陽性細胞を収集した。SSEA-3 陽性率が 70%以上の細胞を投与細胞として使用

した。

さらにレンチウイルスを用いてヒト骨髄間葉系細胞に蛍光色素 (Akaluc) を導入し、FACS により Akaluc 陽性 Muse 細胞を収集した。(下図)



(3) 細胞投与実験

Muse 細胞、間葉系幹細胞、PBS をそれぞれ投与し、BBB locomotor scale により術後 8 週目まで行動評価を行った。Muse 細胞投与群は、間葉系幹細胞、PBS 投与群に対し、有意に後肢機能が改善した。

(4) In Vivo imaging

Akaluc 陽性 Muse 細胞を投与された脊髄虚血モデルラットの脊髄組織において、Akaluc 陽性 Muse 細胞の集積を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	高橋 悟朗 (Takahashi Goro) (50526449)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	細山 勝寛 (Hosoyama Katsuhiko) (70837046)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	熊谷 紀一郎 (Kumagai Kiiichiro) (80396564)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	神田 桂輔 (Kanda Keisuke) (90839507)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	

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