

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09509

研究課題名(和文) 脊髄損傷ラットに対する微小重力環境培養を行った頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植

研究課題名(英文) Transplantation of cranial bone derived mesenchymal stem cells cultured under microgravity into spinal cord injury rat

研究代表者

武田 正明 (Masaaki, Takeda)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：10403552

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)：脊髄損傷モデルラットに対するラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞(rcMSCs)およびラット四肢骨由来間葉系幹細胞(rbMSCs)移植効果を判定した。

本研究では経頭蓋刺激運動誘発電位(transcranial Motor evoked potential: tcMEP)を用いて定性的評価に加え、定量的評価を行った。

まず経時的tcMEP測定可能なモデルラット作成方法を確立させ(Sci Rep. 2021 Jun 14;11(1))、脊髄損傷モデルラットにrcMSCs移植を行い、rbMSCsより運動機能改善効果が高いことを定量的に示すことができた(Sci Rep. 2021 Nov 9;11(1))。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では電気生理評価を用いて動物モデルにおける経時的な定量的運動機能評価方法を確立した。長期間にわたり、安定的に中枢神経損傷モデルラットにおいて運動機能を評価することができ、細胞移植などにおける神経再生の過程を確実に追跡することができるようになった。

今回脊髄損傷での評価を行ったが、現在、同様の手法を用いて脳挫傷、脳梗塞モデルに対する研究を進めており、良好な結果が確認できている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of transplanting rcMSCs (rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells) and rbMSCs (rat bone marrow mesenchymal stem cells) on a SCI model rat. In addition to the conventional qualitative evaluation, in this research, we performed quantitative evaluation using tcMEP (transcranial motor evoked potentials).

First, we produced the model rat which can measure extended tcMEP using bone-thinning technique (Sci Rep. 2021 Jun 14;11(1)). Next, we performed the rcMSCs transplantations to the SCI model rat, and using tcMEP quantitative higher improvement of motor function was shown than rbMSCs transplantations (Sci Rep. 2021 Nov 9;11(1)).

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：脊髄損傷 頭蓋骨由来間葉系幹細胞移植 経頭蓋刺激運動誘発電位

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで独自に神経堤由来である頭蓋骨から間葉系幹細胞を樹立し、その細胞特性や神経保護効果について報告してきた。脳梗塞モデルに対する頭蓋骨由来間葉系幹細胞の移植効果について報告しており、今後は他の疾患モデルへの応用が期待される。微小重力環境下で培養した間葉系幹細胞を脊髄損傷ラットに移植すると、通常重力下培養の間葉系幹細胞に比較して、運動機能の改善効果が高いことを既に発表している。今回脊髄損傷モデルラットに対する、頭蓋骨由来間葉系幹細胞の移植効果並びに微小重力環境下培養でさらに移植効果が高まるかどうかについて検討する方針とした。

### 2. 研究の目的

これまで脊髄損傷後の運動機能評価には BBB score を用い、定性的な評価を行っていたが、今回の研究では経頭蓋刺激運動誘発電位 (transcranial Motor evoked potential: tcMEP) を用いて定量的評価を追加する方針とした。また、約 4 週間にわたる経時的な評価も行い、神経再生の過程を詳細に評価することを目的とした。

細胞移植にはラット長管骨由来間葉系幹細胞 (rbMSCs: rat bone marrow mesenchymal stem cells) に加え、当グループで用いているラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞 (rcMSCs: rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells) を用いた。

### 3. 研究の方法

#### tcMEP を用いた運動機能評価

ラットにおいて経時的に tcMEP を用いて運動機能評価を行ったモデルがなく、我々が行ったマウスでの tcMEP 測定経験をもとに、同様の方法を用いて測定を行ったが記録困難であった。

このため、まず経時的 tcMEP 測定可能なモデルラット作成方法を確立させた。マウスと比較してラットの頭蓋骨が厚いことから電気抵抗が高いことが有効な電気刺激を行えていないのではないかと仮説を立て、脊髄外科領域で用いる bone-thinning technique を応用してラット頭蓋骨を削り、電気抵抗を下げたモデルラットを作成した (Fig.1)。

28 日間の tcMEP 測定後、HE 染色を用いてモデルラット脳の組織学的評価を行った。

#### 脊髄損傷モデルラットに対する MSC 移植効果の判定

脊髄損傷モデルラット (圧挫傷モデル) を作成し、rcMSCs ならびに rbMSC 移植を行い、従来の定性的評価に加え tcMEP を用いた定量的評価を用いて運動機能評価を行った。

脊髄損傷作成前に基準波形となる tcMEP 測定をまず行う。

脊髄損傷作成翌日に細胞移植を行い、28 日目まで各種運動機能評価を行う。

28 日目に損傷部位の脊髄組織を回収し、各種遺伝子の発現、脊髄損傷に伴い形成された空洞の面積を測定した。

### 4. 研究成果

#### tcMEP を用いた運動機能評価

上記モデルラットを用いることで、28 日間にわたり、安定した tcMEP 測定が可能となった (Fig.2)。

#### ◆ ラットの骨薄削りモデルの作成

対象:メスSDラット(Charles River, Kanagawa, Japan) 6匹



ドリルを使用して、頭蓋骨の内板のみを残し、Lambda、Bregma直上に直径5mmの円形の骨削除を行った

Fig.1

#### ◆ tcMEP測定

全例、全期間(28日間)、tcMEP記録が可能

#### 代表波形

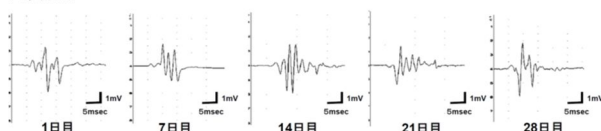
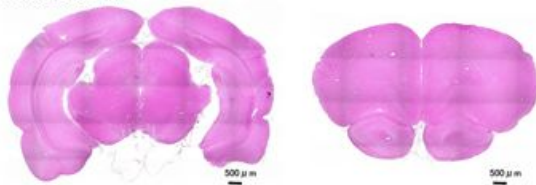


Fig.2

28 日間の tcMEP 測定後、モデルラット脳の組織学的評価を行った。骨削除部直下を含め、モデルラット脳に脳挫傷、くも膜下出血、脳出血といった電気刺激に由来する損傷は認められなかった (Fig.3) (Sci Rep. 2021 Jun 14;11(1))。

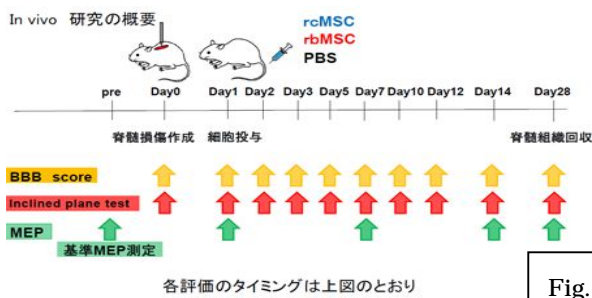
◆ 組織学的評価



くも膜下出血、脳挫傷、脳出血なし

Fig.3

脊髄損傷モデルラットに対する MSC 移植効果の判定

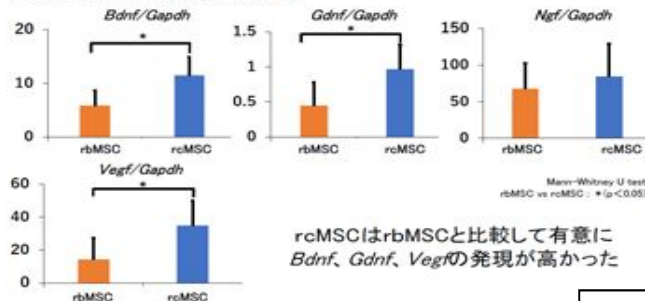


各評価のタイミングは上図のとおり

Fig.4

tcMEP 測定、運動機能評価、細胞移植は上記のシェーマに沿って行った (Fig.4)

結果① MSCの遺伝子発現の評価

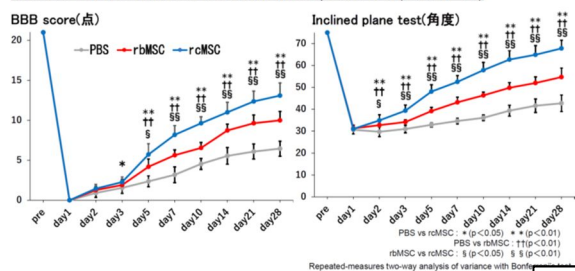


rcMSCはrbMSCと比較して有意に *Bdnf*, *Gdnf*, *Vegf* の発現が高かった

Fig.5

BDNF (脳由来神経栄養因子)、GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子)、NGF (神経成長因子)、VEGF (血管内皮増殖因子) の PCR を行ったところ、BDNF、GDNF、VEGF の発現が rcMSC では有意に高かった (Fig.5)。

結果② 運動機能評価: BBB score/Inclined plane test (各群 n=11)

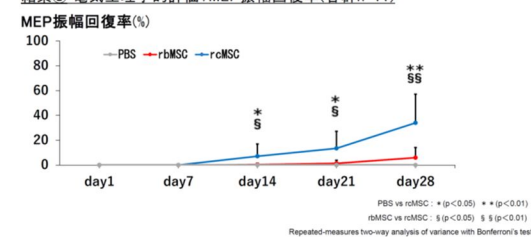


rcMSC投与群はrbMSC投与群と比較して有意に運動機能が回復した

Fig.6

従来法(定性的評価)での運動機能評価では、rcMSC 移植群は rbMSC 投与群と比較して有意に運動機能改善が認められた (Fig.6)。

結果③ 電気生理学的評価: MEP 振幅回復率 (各群 n=11)

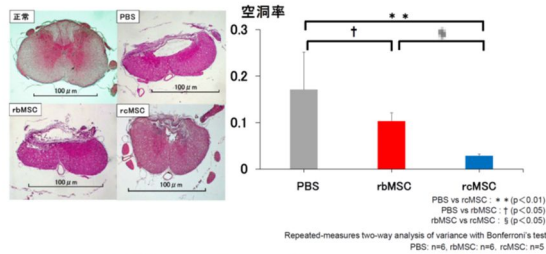


rcMSC投与群はrbMSC投与群と比較して有意に振幅の回復率が高かった

Fig.7

tcMEP での運動機能評価では、rcMSC 移植群は rbMSC 投与群と比較して有意に運動機能改善が認められた。また、rcMSC 移植群は早期から振幅が再出現し、最終的に記録された振幅も大きかった (Fig.7)。

研究④ 組織学的評価:空洞率



rcMSC投与群はrbMSC投与群と比較して有意に空洞率が低かった

Fig.8

脊髄内の空洞面積は、rbMSC 移植群もコントロールと比較すると空洞面積は小さかったが rcMSC 移植群は rbMSC 投与群と比較して有意に面積が小さかった ( Fig.8 )。

脊髄損傷の病態は、物理的刺激による一次損傷に加え、アポトーシスやフリーラジカルなどによる、組織の二次損傷が大きく関与している。脊髄損傷モデルに対する MSC 投与効果の作用機序として、脳/グリア由来神経栄養因子 (BDNF、GDNF) の分泌や誘導、神経成長因子 (NFG) や血管内皮増殖因子 (VEGF) の分泌が挙げられる。これら paracrine effect により、神経保護、神経新生、抗炎症や抗細胞死などの、作用を介して二次的損傷を減少させることが知られている。本研究では rcMSC は rbMSC と比較して BDNF、GDNF、VEGF 遺伝子の発現が高く、脊髄損傷モデルに対してより優れた細胞投与効果が期待できる。

rcMSC は rbMSC と比較して、分子生物学的に脊髄損傷に対する抗二次損傷効果に優れ、脊髄損傷に投与することで空洞化はより抑制され、運動機能評価や電気生理学的評価ではよりよい改善が得られた。

本研究により、頭蓋骨由来間葉系幹細胞は脊髄損傷後の機能回復の有用な幹細胞ソースとなる可能性が示された ( Sci Rep. 2021 Nov 9;11(1) )。

上記結果を踏まえ、rcMSC 移植効果のさらなる向上を証明するため、微小重力環境下で培養した rcMSC 移植を開始している。また、本研究で用いた tcMEP 測定を脳挫傷、脳梗塞に応用した実験系も既に開始となっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Takeda Masaaki, Okazaki Takahito, Shimizu Kiyoharu, Kuwabara Masashi, Hosogai Masahiro, Yuge Louis, Mitsuahara Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of rat cranial bone-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery in rats with spinal cord injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01490-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Yuyo, Otsuka Takashi, Mitsuahara Takafumi, Okazaki Takahito, Yuge Louis, Takeda Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel bone-thinning technique for transcranial stimulation motor-evoked potentials in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91780-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田 雄洋 , 光原 崇文 , 大塚 貴 , 岡崎 貴仁, 武田 正明, 清水 陽元, 桑原 政志, 細貝 昌弘, 河原 裕美, 辻 紘一朗, 飯田 幸治 , 弓削 類
2. 発表標題 ラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の脊髄損傷への移植効果
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuyo Maeda , Takafumi Mitsuahara , Takashi Otsuka , Masaaki Takeda , Takahito Okazaki , Kiyoharu Shimizu, Masashi Kuwabara, Yumi Kawahara, Koichiro Tsuji, Louis Yuge
2. 発表標題 RAT CRANIAL BONE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION PROMOTES FUNCTIONAL RECOVERY IN SPINAL CORD INJURY MODEL RATS
3. 学会等名 International Society of Stem Cell Research 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田雄洋、武田正明、大塚貴志、桑原正志、細貝昌弘、光原崇文、清水陽元、岡崎貴仁、弓削類
2. 発表標題 ラットおける、経時的で安定したMEP測定の新たな手技の確立
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

〔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

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