

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24286

研究課題名(和文) 中枢神経損傷後の感覚障害に対する幹細胞治療と運動介入を併用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of a new treatment method that combines stem cell therapy and motor intervention for sensory impairment after central nervous system injury

研究代表者

大塚 貴志(Otsuka, Takashi)

広島大学・医系科学研究科(保)・助教

研究者番号：60845965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、脳損傷モデルに対して急性期における間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)の移植とトレッドミル運動によるリハビリテーション介入を併用し、運動機能ならびに感覚機能の改善効果とそのメカニズムの検証を試みた。その結果、MSCs移植単独群、リハビリテーション単独群は無処置群に比べて有意に運動機能を改善させるが、MSCs移植とリハビリテーション併用群においてより運動機能が顕著に改善したことが遺伝子発現解析より明らかとなった。このことから、損傷後早期のMSCs移植と積極的なリハビリテーション介入の併用は運動機能の改善をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経疾患に対する幹細胞を用いた再生医療研究において、必ずしも十分な機能の回復が得られないこともある。そのため、さらなる改善を引き出すための再生医療後の治療戦略の構築が求められており、その手段としてリハビリテーション介入が注目されている。

再生医療後のリハビリテーションとの併用効果を検討した本研究では、再生医療またはリハビリテーション単独での介入に比べ、再生医療とリハビリテーションの併用により、より顕著な運動機能の改善がみられることを見出した。本研究の結果は、再生医療後のリハビリテーションのアプローチ方法の最適化と臨床応用に向けた一助となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a combination of mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation in the acute phase and rehabilitation intervention by treadmill exercise for a brain injury model to improve motor function and sensory function and its mechanism. As a result, it was clear from the gene expression analysis that the MSCs transplantation alone group and the rehabilitation alone group significantly improved the motor function compared to the untreated group, but the MSCs transplantation and rehabilitation combination group more improved the motor function. This results suggests that the combined use of MSCs transplantation early after injury and active rehabilitation intervention improves motor function.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 脳損傷 リハビリテーション 細胞移植 神経再生 再生医療 中枢神経疾患

1. 研究開始当初の背景

中枢神経疾患に起因する機能障害に対するリハビリテーション単独の効果には限界があり、新規治療法の開発が社会的に求められている。近年、中枢神経疾患に対する再生医療研究の発展により、我が国でも間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) を中心に幹細胞を用いた臨床試験が開始されている。臨床研究において、幹細胞治療は一定の効果を示しているものの、必ずしも十分な機能の回復が得られないこともある。そのため、さらなる改善を引き出すための再生医療後の治療戦略の構築が求められており、その手段としてリハビリテーション介入が注目されている。申請者の所属する研究室では、再生医療またはリハビリテーション単独での介入に比べ、再生医療とリハビリテーションの併用により、より顕著な運動機能の改善がみられることを報告している (Imura T, *et al. Neurosci Lett*, 555: 73-78, 2013)。再生医療後のリハビリテーションとの併用効果を検討した先行研究では、運動機能の改善というアウトカムで評価を行っているが、この機能改善の背景たり得る組織内の変化を詳細に検討した報告は少ない。中枢神経疾患において運動機能の改善を担保するメカニズムの解明がなされれば、より具体的な介入方法の立案に繋がると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では細胞治療としての MSCs の移植、リハビリテーション介入、ならびにそれぞれの併用を行い、細胞移植後の併用方法として、リハビリテーション介入の頻度や強度について検討を行う。介入と併用によって運動機能の改善が得られた場合、その詳細なメカニズムを分子生物学的観点から解明を試みる。また、本研究の結果を踏まえて再生医療後のリハビリテーションのアプローチ方法の最適化を図り、臨床応用に向けた提案を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 至適なりハビリテーション介入の方法論の検討

リハビリテーション介入の方法として、本研究ではトレッドミル運動を用いた。極低温処置により大脳の運動野領域に損傷を生じさせた C57BL/6 マウスをトレッドミルで暗期の活動時間に 20 分間にわたって運動を遂行させ、速度条件ごとにトレッドミルからの脱落の有無について評価を行った。脱落しない速度条件を、急性期の機能低下を起こしたモデルマウスでも実施可能な設定として以降の実験において採用した。

(2) MSCs 移植とリハビリテーション介入の併用と運動機能評価

脳損傷作成翌日に MSCs を移植し ,同日よりリハビリテーション介入を行った .リハビリテーション介入の頻度は ,毎日行う高頻度 ,2 日に 1 回の低頻度 ,一切の介入を行わない無処置の 3 系統に分け ,損傷 5 週間まで継続的に行った .運動機能評価には ,Rotarod test ならびに Beam walking test の 2 つを用いて行った (図 1).

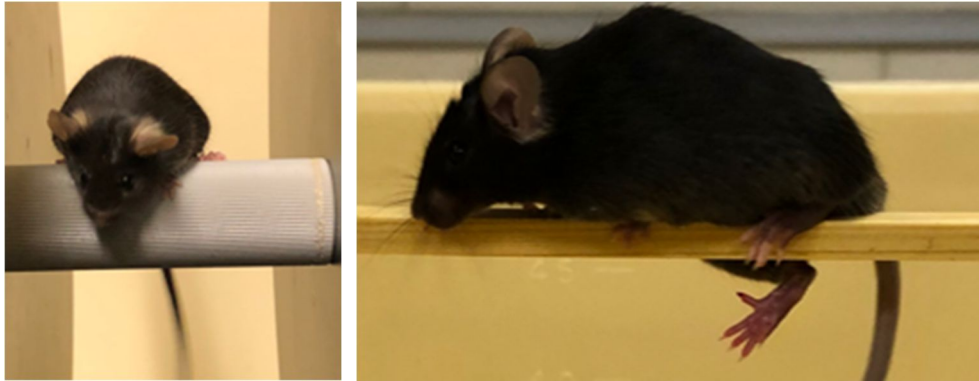


図 1 . 運動機能評価

左 : Rotarod test 右 : Beam walking test

(3) 脳損傷領域の解析

損傷 1 週間後ならびに 5 週間後の脳損傷領域を採取し ,real-time PCR 法による遺伝子発現解析を行った .解析した項目は ,神経栄養因子である肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor :HGF) ,神経成長因子(nerve growth factor :NGF) ,神経可塑性因子である成長関連因子-43 (growth associated protein-43 :GAP-43)とし ,内部標準因子として GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を用いた .

4 . 研究成果

(1) 至適なりハビリテーション介入の方法論の検討

脳損傷マウスに対して ,様々な速度でのトレッドミル運動介入を行い ,急性期からでも遂行可能な速度条件を設定し ,再現性をもってマウスの運動介入に成功した .

(2) MSCs 移植とリハビリテーション介入の併用と運動機能評価

脳損傷後翌日から 5 週間後にかけて運動機能評価を行った結果 , Rotarod test , Beam walking test のいずれにおいても MSCs 移植またはリハビリテーション介入単独での効果が認められた .さらに ,移植とリハビリテーション介入の併用群ではより顕著な改善がみられ ,併用による相乗効果が示された (図 2 , 3).

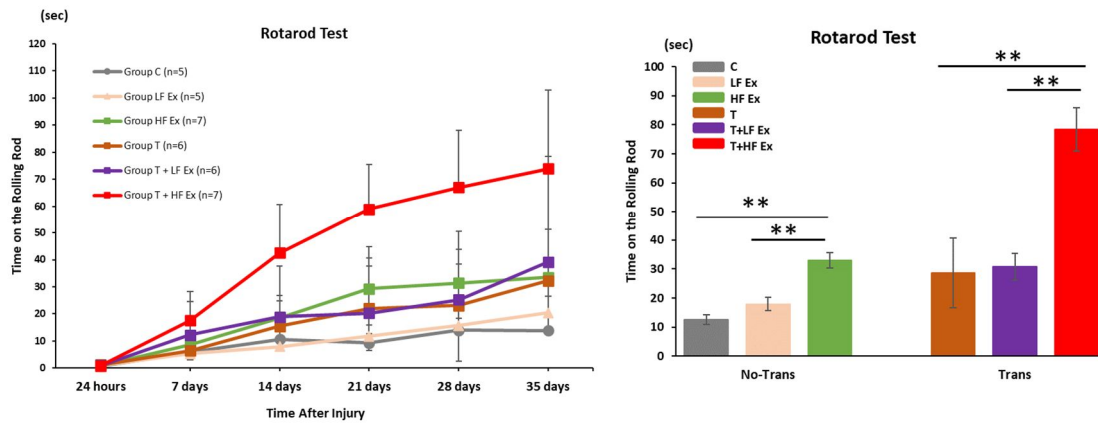


図 2 . 各群における運動機能 (Rotarod test) の推移

Group C : 移植・運動無し

Group LF Ex : 移植無し・低頻度運動

Group HF Ex : 移植無し・高頻度運動

Group T : 移植あり・運動無し

Group T+LF Ex : 移植あり・低頻度運動

Group T+HF Ex : 移植あり・高頻度運動

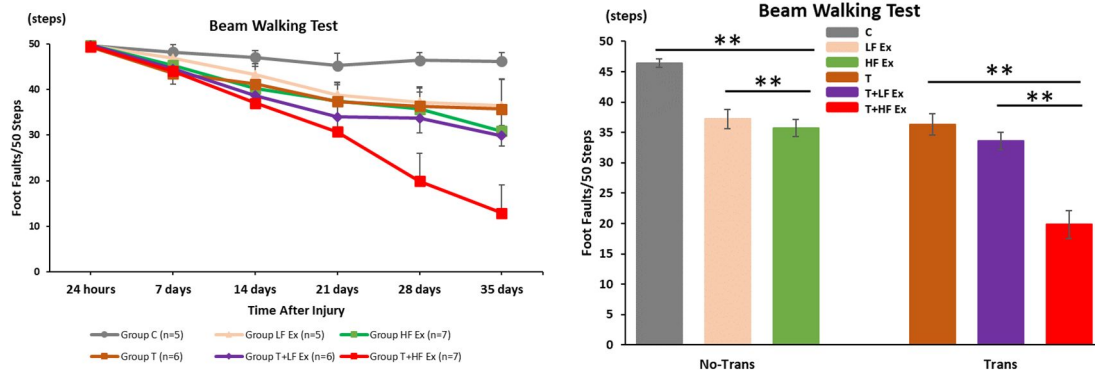


図 3 . 各群における運動機能 (Beam walking test) の推移

Group C : 移植・運動無し

Group LF Ex : 移植無し・低頻度運動

Group HF Ex : 移植無し・高頻度運動

Group T : 移植あり・運動無し

Group T+LF Ex : 移植あり・低頻度運動

Group T+HF Ex : 移植あり・高頻度運動

(3) 脳損傷領域の解析

移植 1 週間後ならびに 5 週間後の脳損傷領域の遺伝子発現解析を行った結果, HGF, NGF, GAP-43 それぞれで運動機能と同様に MSCs 移植またはリハビリテーション介入単独での有意な発現増加が認められた. また, HGF においては, 損傷 5 週間後の解析で移植とリハビリテーション介入の併用による相乗効果がみられ, 損傷領域周囲での内因性神経栄養因子の発現増加を介して機能改善がもたらされたことが示唆された (図 4). 感覚機能の評価として SEP を用いた解析を試みたが, 経頭蓋での活動の取得が困難であり, 本研究では具体的な成果を得るに至らなかった. 中枢からの順行性の電気活動を計測する MEP も含めて齧歯類での経頭蓋刺激ならびに活動電位取得について今後より詳細な検討と至適な方法論の確立を目指す.

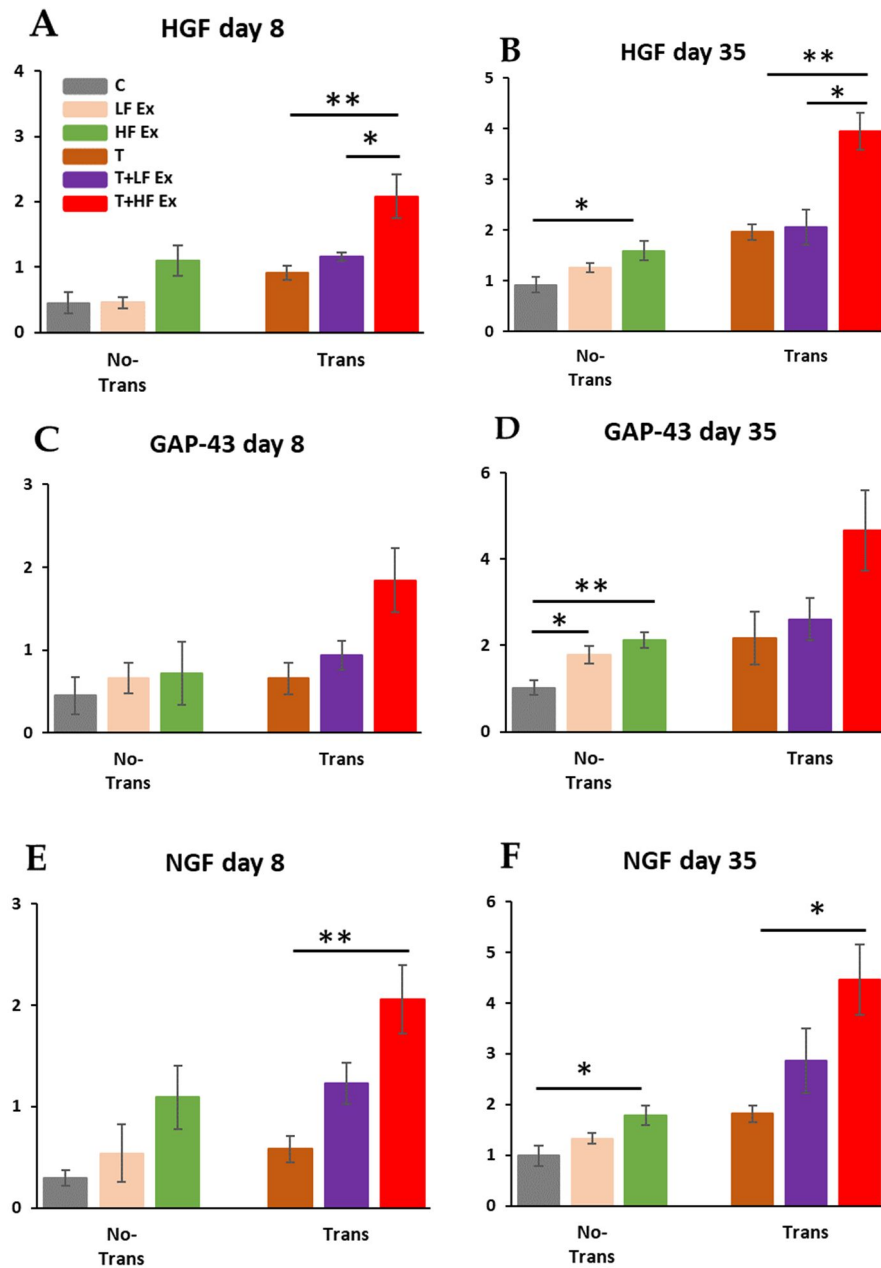


図4. 各群における神経栄養因子, 神経可塑性因子の遺伝子発現解析

Group C : 移植・運動無し

Group LF Ex : 移植無し・低頻度運動

Group HF Ex : 移植無し・高頻度運動

Group T : 移植あり・運動無し

Group T+LF Ex : 移植あり・低頻度運動

Group T+HF Ex : 移植あり・高頻度運動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kurose Tomoyuki, Takahashi Shinya, Otsuka Takashi, Nakagawa Kei, Imura Takeshi, Sueda Taijiro, Yuge Louis	4. 巻 41
2. 論文標題 Simulated microgravity-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101601 ~ 101601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101601	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 Imura Takeshi, Otsuka Takashi, Kawahara Yumi, Yuge Louis	4. 巻 12
2. 論文標題 “Microgravity” as a unique and useful stem cell culture environment for cell-based therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 2 ~ 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.03.001	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 OSHITA Jumpei, OKAZAKI Takahito, MITSUHARA Takafumi, IMURA Takeshi, NAKAGAWA Kei, OTSUKA Takashi, KUROSE Tomoyuki, TAMURA Takayuki, ABIKO Masaru, TAKEDA Masaaki, KAWAHARA Yumi, YUGE Louis, KURISU Kaoru	4. 巻 60
2. 論文標題 Early Transplantation of Human Cranial Bone-derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Functional Recovery in Ischemic Stroke Model Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 83 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2019-0186	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩本佳央梨, 猪村剛史, 小西宏武, 大塚貴志, 松本昌也, 光原崇文, 河原裕美, 辻紘一郎, 弓削 類, 栗栖 薫
2. 発表標題 頭蓋骨由来間葉系幹細胞を用いた特定細胞加工物の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, 黒瀬智之, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 模擬微小重力環境下での連続的な継代が間葉系幹細胞の特性に与える影響
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒瀬智之, 高橋信也, 中川 慧, 猪村剛史, 大塚貴志, 河原裕美, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境を利用した虚血 再灌流による脊髄損傷に対する培養間葉系幹細胞の移植効果
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Otsuka T, Imura T, Nakagawa K, Kurose T, Teranishi M, Karim Md. S, Kawahara Y, Kurisu K, Yuge L
2. 発表標題 Simulated microgravity culture potentiates neuroprotective effect of mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 35th Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research (ASGSR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺西正貴, 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, 大下純平, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力培養がラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護メカニズムに及ぼす影響
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本佳央梨, 猪村剛史, 小西宏武, 大塚貴志, 松本昌也, 光原崇文, 河原裕美, 辻紘一郎, 弓削 類, 栗栖 薫
2. 発表標題 臨床研究を目指した頭蓋骨由来間葉系幹細胞の投与細胞としての評価
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒瀬智之, 高橋信也, 中川 慧, 猪村剛史, 大塚貴志, 河原裕美, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境で培養した間葉系幹細胞による脊髄損傷後の運動機能改善
3. 学会等名 第2回日本再生医療とリハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒瀬智之, 高橋信也, 中川 慧, 猪村剛史, 大塚貴志, 河原裕美, 末田泰二郎, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境培養間葉系幹細胞が損傷脊髄の運動機能におよぼす影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, 阿美古 将, 大下純平, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 ラット頭蓋骨, 骨髄, 脂肪組織由来間葉系幹細胞の特性比較と神経保護効果
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺西正貴, 大塚貴志, 猪村剛史, 中川 慧, 阿美古 将, 大下純平, 河原裕美, 栗栖 薫, 弓削 類
2. 発表標題 微小重力環境で培養したラット頭蓋骨由来間葉系幹細胞の神経保護メカニズムの検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019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