

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791053

研究課題名（和文） 霊長類脊髄損傷に対する HGF の有効性および治療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of a novel therapy using hepatocyte growth factor for spinal cord injury in primate

研究代表者

北村 和也（KITAMURA KAZUYA）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00383860

研究成果の概要（和文）：コモンマームセット頸髄損傷モデルに対しヒト組み換え肝細胞増殖因子蛋白（recombinant human hepatocyte growth factor; rhHGF）をくも膜下腔持続投与することにより著明な運動機能回復促進効果が得られることを明らかとした。組織学的にも有意な損傷範囲縮小効果を確認することが出来た。またアロディニアや腫瘍形成を認めず安全性についても確認できたことから、本研究結果は rhHGF を用いた脊髄損傷治療が臨床応用へ結びつく可能性を示すものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Intrathecal administration of recombinant human HGF significantly reduced damaged area in spinal cord and promoted motofunction recovery after spinal cord injury in common marmoset, non-human primate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷 再生医学 肝細胞増殖因子（HGF） 治療 臨床応用

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の新たな治療法として、神経幹細胞などを用いた細胞移植療法は臨床応用へ大きな期待がよせられている。しかし、細胞移植のみでは機能回復は得られるものの、結果はいまだ不十分と言わざるを得ず、移植部微小環境をコントロールすることの重要性がわかってきた。また、移植療法を臨床へ応用する上では、移植細胞の確保や倫理的問題が大きな課題として挙げられる。そこ

で申請者らは、神経栄養因子、血管誘導因子である Hepatocyte Growth Factor (HGF) に注目し、損傷部の修復と下肢の機能回復を促すと共に、移植細胞がより生着しやすい環境にするという効果を期待した。

HGF はこれまでに、脳虚血（Miyazawa et al, 1998）や筋萎縮性側索硬化症モデルマウス（Sun et al, 2002）においてその有効性が報告されている。さらには劇症肝炎や閉塞性動脈硬化症

においてはすでに HGF 臨床治験が始まっていることから、脊髄損傷に対してもその有効性が確立されれば臨床応用の可能性が非常に高いという利点があった。

我々はラット胸髄圧挫損傷モデルに対してウイルスベクターを用いて HGF を髄内に供給することにより、神経保護・血管新生・軸索伸長作用を介して有意な損傷範囲縮小効果・運動機能回復効果が得られることを報告した (Kitamura et al, J. Neurosci. Res. 2007)。しかしながら、この研究から HGF の損傷脊髄に対する有効性は確認されたものの、ウイルスベクターを用い、かつ損傷前に脊髄に注入していたことからそのまま臨床へ応用することは不可能であった。そこでヒト組み換え肝細胞増殖因子蛋白 (recombinant human hepatocyte growth factor; rhHGF) を損傷後よりも膜下腔へ投与することで有効性を確認し、臨床応用へ向けたより practical な検討を行う研究を計画、開始した。ラット脊髄損傷モデルに対して rhHGF を損傷直後より 2 週間持続投与したところ、損傷範囲の著明な縮小および有意な下肢運動機能回復を認めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前臨床試験として霊長類コモンマームセット頸髄損傷モデルに対する rhHGF の有効性と安全性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 成体コモンマームセットの第 5 頸椎高位に圧挫損傷を作製し、直後よりも膜下腔にカテーテルを挿入し、rhHGF400 μ g を 4 週間持続投与した (n=6)。対照群には PBS を投与した (n=5)。

(2) 術後 12 週まで Bar grip test にて上肢筋力を、独自に開発した open field scoring にて上肢の神経学的機能を評価した。open field scoring においては上肢の神経学的な運動機能に注目した。歩行時や、眼前に差し出されたペンを掴もうとする際の上肢運動を客観的に観察した。具体的には、手関節の伸展動作や回内動作、肩関節挙上の有無またその程度について点数化した。

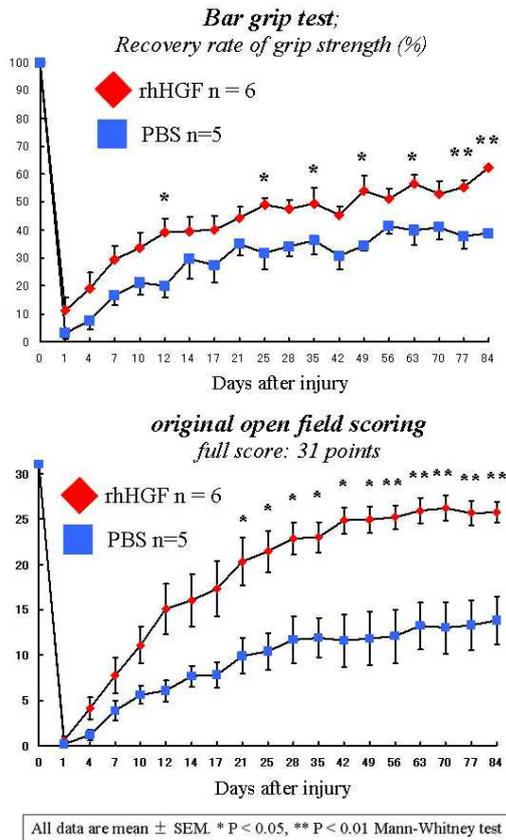
(3) 損傷後 1・3・12 週に頸髄 MRI を撮像し (Bruker 社製 7.4 tesla)、損傷範囲を同一個体で経時的に評価した。

(4) 損傷後 12 週目に脊髄の組織学的検討を行った。LFB 染色にて髄鞘化された脊髄白質面積を定量した。抗 CaMK2- α 抗体を用いた免疫染色にて、脊髄側索の皮質脊髄路を構成する CaMK2- α 陽性線維面積を定量した。抗 CGRP 抗体を用いた免疫染色にて、脊髄後角

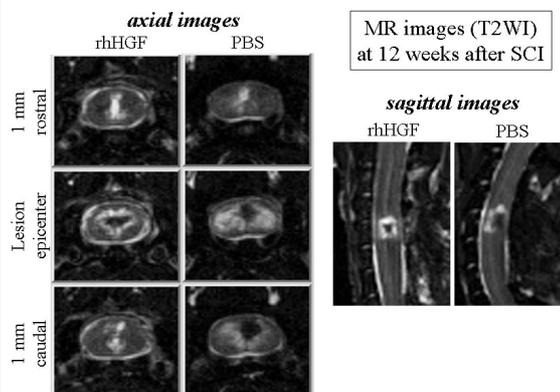
における CGRP 陽性 C 線維分布を定量した。

4. 研究成果

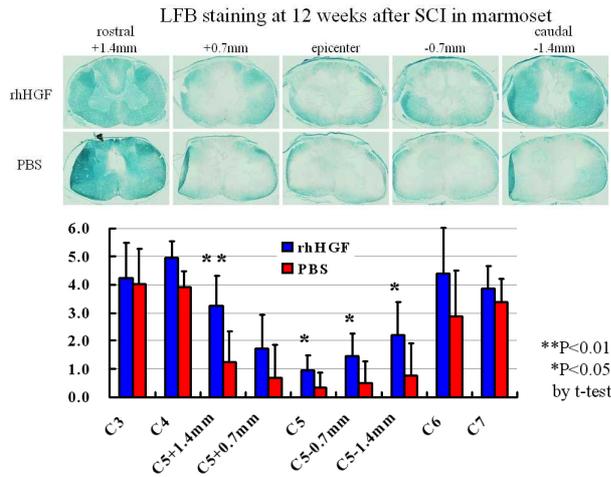
(1) rhHGF 群で対照群に比べ有意に良好な運動機能回復が認められた。異常行動は認めなかった。(下図)



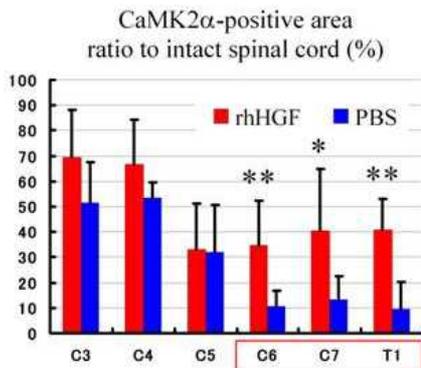
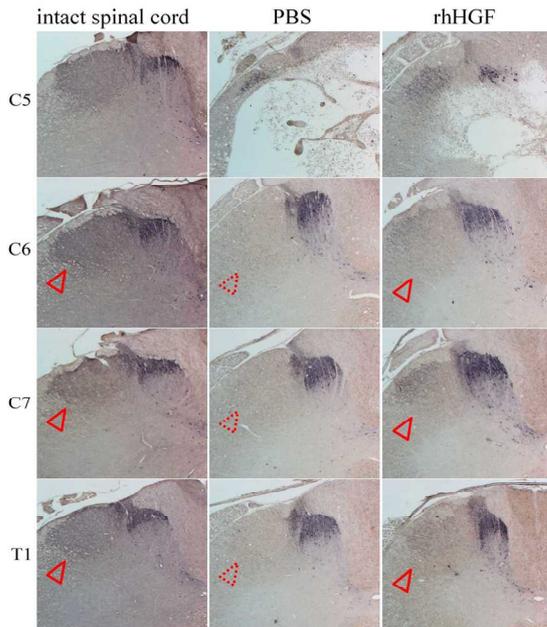
(2) 損傷後 12 週目の MRI 像では、脊髄背側から圧挫した損傷モデルであるにもかかわらず、rhHGF 群では脊髄背側白質が正常信号を呈しており、T2 high を呈する異常信号領域および空洞面積が著明に縮小していた。実際の組織像を反映し、有意な損傷範囲縮小を示しているものと考えられた。(下図)



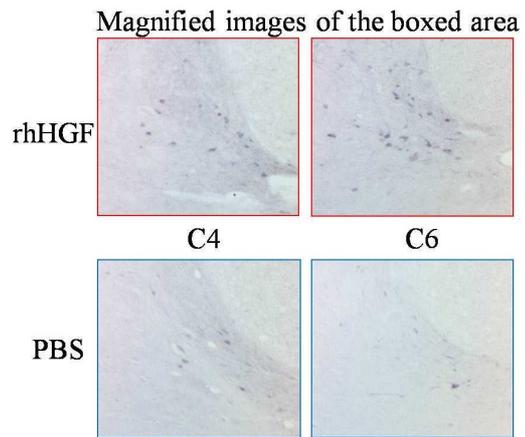
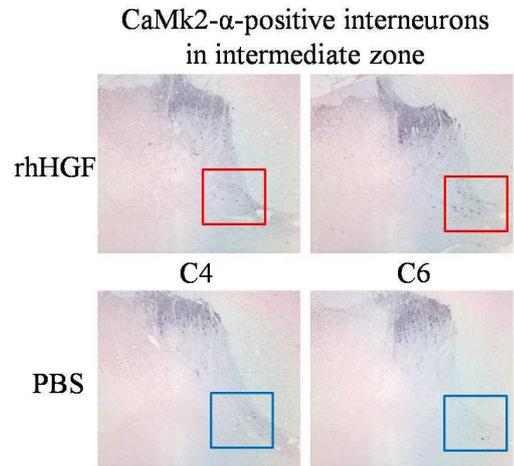
(3) rhHGF 投与群で LFB 陽性となる髄鞘化面積が損傷部周囲で有意に保たれていた(下図: 単位 mm²).



皮質脊髓路を示す CaMK2- α 陽性線維が損傷尾側においても有意に保たれており, 良好な上肢運動機能回復を示唆する結果と考えられた。(下図)

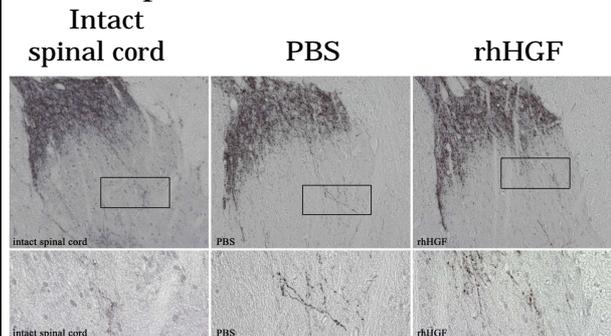


また, 脊髓灰白質の intermediate zone に存在する CaMK2- α 陽性 interneuron の分布を検討したところ, 損傷部頭尾側の高位において rhHGF 群で多い傾向にあり(下図), interneuron を介した新たな neural circuit (propriospinal tract)の構築が促進された可能性が示唆された.



さらには脊髄後角における CGRP 陽性 C 線維分布に両群間で有意な差を認めなかったことから(下図), rhHGF 投与により異痛症 (allodynia) が励起されないことが確認された. 腫瘍形成は 1 例も認めなかった.

CGRP-positive fibers in dorsal horn



(4) これらの結果から, rhHGF のくも膜下腔持続投与により霊長類脊髄損傷に対して著明な治療効果が得られることを明らかとした。またアロディニアや腫瘍形成を認めず安全性についても確認できたことから, 本研究結果は rhHGF を用いた脊髄損傷治療が臨床応用へ結びつく可能性を示すものと考えている。臨床応用へ向けには, therapeutic time window の検討(受傷後どれほど時間が経過してから投与しても有効な治療効果が得られるか)が不可欠であり, ラット脊髄損傷モデルを用いて損傷後4日目から rhHGF をくも膜下腔投与しても有効な治療効果が得られることを確認した。また, カニクイザルを用いた rhHGF くも膜下腔持続投与の毒性試験, 脳脊髄液中の薬物動態試験をすでに開始している。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

(1) 北村和也ら, recombinant human Hepatocyte Growth Factor は霊長類脊髄損傷後の上肢運動機能回復を促進する -コモンマーマセットを用いた前臨床試験 -, 日本脊椎脊髄病学会, 2009.4.23, 神戸

(2) Kazuya Kitamura et al, Intrathecal administration of recombinant human hepatocyte growth factor promotes recovery of hand dexterity after cervical spinal cord injury in primate: Preclinical trial using common marmoset. Cervical Spine Research Society European Section, 2009.06.10 -13, Uppsala, Sweden

(3) 北村和也ら, ヒト組換え HGF 蛋白を用いた脊髄損傷治療戦略, 日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.05, 横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 和也 (KITAMURA KAZUYA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 00383860

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし