

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591894

研究課題名（和文） 脊髄損傷慢性期での細胞移植を併用した再髄鞘化と運動機能再建

研究課題名（英文） Improvement of functional recovery and promotion of remyelination by cell transplantation and scaffold at the chronic phase after spinal cord injury

研究代表者

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：90451971

研究成果の概要（和文）：成ラット胸髄に圧挫損傷モデルおよび半切モデルを作製し、ハニカムコラーゲン担体（HC）に細胞移植を併用して移植後の機能回復を調査した。圧挫モデルの損傷6週後に培養した FGF2 反応性神経前駆細胞を接着させた HC の移植を損傷空洞内に行った。その結果、HC 単独移植では運動機能が一時的に悪化し機能回復は認められなかった。細胞移植併用群ではわずかに機能回復が得られたが、後肢協調運動を得るまでいたらなかった。一方、胸髄半切モデルに培養骨髄間葉系細胞を接着させた HC を移植すると HC 単独移植と比較して後肢協調運動が可能なまでに回復し、知覚機能も得られた。移植環境を制御すれば HC 担体と細胞移植の併用は損傷後の機能再獲得に有効なことが明らかとなった。しかし、脊髄損傷患者の大部分は慢性期の状態であり、慢性期損傷脊髄の病態と移植環境の改善を動物実験レベルでより解析していく必要がある。今後、損傷周囲の癒痕組織の除去や移植方法の再検討、リハビリテーションなど組み合わせた研究を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, neural progenitor cells (NPCs) or bone marrow stromal cells (BMCs) combined with honeycomb collagen scaffold (HC) were transplanted into the injured spinal cord. HC with NPCs were implanted into contused spinal cord at six weeks after the initial thoracic injury. The

functional recovery was little shown in the both implanted groups. On the other hand, rats implanted with HC containing BMCs displayed better hindlimb function and hypersensitivity than those implanted with HC without BMCs in the hemisectioned model. The implanted area exhibited more nerve fibers than the areas not containing BMCs. These effects result from the presence of BMCs that directly promote nerve regeneration. However, most of spinal cord injury patients have already paralyzed and maintained into chronic phase of recovery. Further treatments such as resection of scar tissue, developments of transplantation technique or rehabilitation would be needed to promote functional recovery at the chronic phase after spinal cord injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1100000	330000	1430000
2010年度	1000000	300000	1300000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

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、神経再生、神経栄養因子、神経幹細胞、移植、担体

1. 研究開始当初の背景

交通事故や転落など大きな外力による脊髄損傷は、骨折を伴う脊柱管の破綻によって脊髄の挫滅をきたし、上行・下行伝導路の障害を起こす。損傷後の機能回復は困難であり脊髄自身に直接作用するような薬剤は開発されていない。現在、残存機能の保持やリハビリテーション、姑息的機能再建や合併症に対する治療が中心となり、脊髄に対する根本的な治療法の開発が望まれている。近年、cell biology の進歩によって神経幹細胞が注目され、中枢神経損傷によって失われた神経細胞とグリア細胞の補充の起源として注目を浴びるようになった。最近では、動物実験だけでなく海外でヒトに対して嗅神経上皮細胞や ES 細胞を利用した細胞移植治療が行われている。日本では、細胞培養が容易で自家細胞として有利な骨髄間葉系細胞や自家嗅粘膜細胞を用いたヒト脊髄損傷患者への移植が行われている。しかし、移植細胞の移植後の動態や細胞移植によるホスト脊髄に対する機能回復の機序は不明な部分も多く動物実験で十分検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、人工担体であるハニカムコーラーゲン (HC) に培養神経前駆細胞 (NPC) あるいは骨髄間葉系細胞 (BMC) を接着させた HC の有効性を確認した後、ラット損傷脊髄に作製された空洞・欠損部分に HC 単独移植群と HC+細胞移植群 (細胞群) を作製して、担体と細胞移植の有効性を証明することである。

3. 研究の方法

1) 脊髄損傷モデルの作製

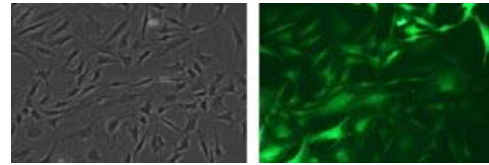
・脊髄圧挫モデルの作製：成ラットを麻酔し第9胸髄レベルの脊髄を露出し血管クリップで30秒間側方向にはさみ脊髄損傷を作製した。本法は、機能回復過程が安定しており慢性期には空洞を形成する。

・脊髄半切モデルの作製：成ラットの Th9 レベルの脊髄に、半側 3mm の欠損を作製した。

2) 神経前駆細胞 (NPC)・骨髄間葉系細胞 (BMC) の培養と保存：NPC は、ラット胎性 16 日の海馬を用いて FGF を添加し分散培養を行った。NPC は、過去に解析されていて FGF 添加時は神経幹細胞マーカーであるネスチン陽性の細胞群で、FGF を除去すると神経、グリア細胞に分化する。NPC は、1 回継代した後、GFP 導入レンチウイルス (LV) を用いてラベルしている。BMC は、成ラット大腿骨から骨髄細胞を回収し、ウシ血清を含む培養液で培養し、1 回継代を行った後 GFP 導入 LV を用いてラベルしている。BMC は、幹細胞の指標である CD11b⁻、CD45⁻、CD90⁺であることを確認している。GFP ラベルした細胞は、凍結保存液を用いて冷凍庫で保管し、移植前に培養を開始

し移植細胞として利用した。

下図) GFP-LV に感染後 5 日の BMC：大部分の細胞が GFP 陽性となっている。



3) HC と移植細胞の準備

HC の準備：HC を空洞あるいは欠損部に適合するように採型する。遠心器で HC の気泡を除去した後、fibronectin コートさせた HC を準備する。移植 5 日前に保存しておいた細胞を使用して HC とともに培養を行う。培養細胞を接着させた HC の一部は固定標本にして蛍光顕微鏡で観察した。

5) 組織学的評価：移植後、8 週間で灌流固定を行い、損傷部分を含んだ脊髄切片を作成した。HE 染色やルクソールファーストブルーを用いたミエリン染色によって損傷脊髄及び空洞の体積、残存ミエリンの定量を行った。また、ホスト脊髄内での GFP 陽性細胞 (移植細胞) 数の定量と分布を観察した。

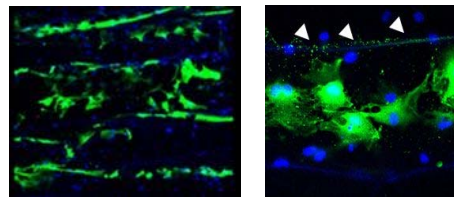
6) 下肢運動検査と痛覚検査

下肢機能はすでに確立している後肢運動機能評価法 (BBB score) を経時的に行った。痛覚検査には、アセトンを利用した冷感検査、von Frey テストを施行して足底刺激の強さと足ひっこめの時間を計測して評価を行った。

4. 研究成果

1) HC と共培養した NPC および BMC

HC と NPC あるいは BMC を用いて培養を行い 5 日後に GFP 抗体による免疫染色を行いマイクロスライサーで HC 切片を作製し蛍光顕微鏡で観察した。NPC は、BMC と比較して細胞径が小さく、ポアサイズ 200~400 μm の HC 内では BMC の生着がよかった。



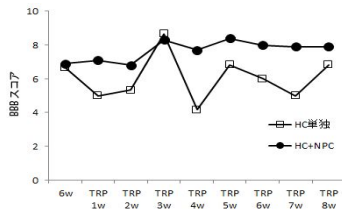
上図) HC 内に生着した BMC の蛍光免疫染色像 (緑：GFP 陽性細胞、青：細胞核) 左：弱拡大、右：強拡大像で矢印部分が HC 孔の壁で GFP 陽性 BMC の HC 壁への接着が観察できた。

2) HC 細胞移植による後肢機能の回復

・圧挫モデルに対する移植

下図は、BBB スコアを用いた後肢機能回復を示したグラフである。損傷 6 週後に移植しているが、移植後 HC 群では 1 時的に悪化していたが、最終観察時では移植前と機能は不変

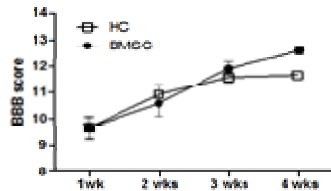
であった。NPC 併用群は、悪化はなかったものの移植後も後肢体重支持が不十分で協調運動も認められなかった。



・半切モデルに対する移植

一方、半切モデルには BMC を併用して HC を移植した。今回、HC の適合性と BMC の効果を早期に確認するために脊髄半切後すぐに準備した HC あるいは HC+BMC を移植し、4 週間後に観察した。

下図は、BBB スコアであるが時間経過とともに後肢機能の改善傾向を示している。



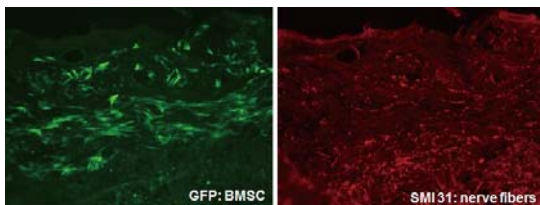
4 週時点では、BMC を併用したグループのほうが有意に運動機能改善を示した。知覚検査でも BMC を併用したほうが経時的に知覚の回復が観察できた。

これら結果から慢性期における担体移植は手術侵襲が大きく繊細な移植技術が必要であることが分かった。HC に NPC を併用しても機能回復はわずかであって注入できるような担体の開発や癒痕組織を薬剤で除去するなど移植環境を改善する工夫が必要であった。

3) 組織学的解析；以降は、半切モデル BMC 移植結果のデータである。

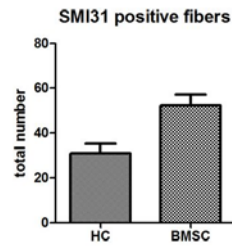
・損傷部の脊髄体積と残存する有髄神経の評価；損傷部を含む 9 mm 長の脊髄切片を作製し、脊髄体積と残存有髄神経線維の面積を計測したが HC 群と BMC 群には有意な差はなかった。

・移植細胞の生着と神経線維の再生；GFP 陽性移植細胞がホスト脊髄内で生着しているのが観察された（下図）。



さらに GFP 陽性部分には、SMI31（神経線維マーカー）陽性線維が HC 群と比較して多く観察された。定量化すると BMC 群が約 2 倍の

神経線維数となり、BMC 群では有意に多かった（下図）。



また、知覚神経線維である CGRP 陽性線維を定量すると BMC 群で多く観察された。このことから BMC を併用することで知覚神経の再生が促進されていることが明らかとなった。

・逆行性神経トレーサー（Fluoro-Gold：FG）を用いた脊髄下行路の再生評価；術後 4 週で Th12 の白質に FG を注射した。注射 1 週後に大脳皮質と赤核を含む脳、および Th6 脊髄の凍結切片を作製して FG 陽性細胞数を計測した。Corticospinal tract・Propriospinal tract の再生を示す FG 陽性細胞数は HC 群と BMC 群には有意な差はなかったが、Rubrospinal tract（赤核脊髄路）では BMC 群で有意に多かった。

このことから BMC 併用 HC 移植によって赤核脊髄路の再生促進が明らかとなった。損傷環境を整備し、HC 単独移植よりも細胞を併用することで機能回復の促進が見込まれる。

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 11 件）

①Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, Shinomiya K, Okawa A. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg.* 2012 in press

②Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakae F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain.* 135(Pt3):833-46. 2012

③Hirai T, Kato T, Kawabata S, Enomoto M, Tomizawa S, Yoshii T, Sakaki K, Shinomiya K, Okawa A. Adhesive arachnoiditis with extensive syringomyelia and giant

arachnoid cyst after spinal and epidural anesthesia: a case report. Spine (Phila Pa 1976). 2012 Feb 1;37(3):E195-8.

④Sakai K, Okawa A, Takahashi M, Arai Y, Kawabata S, Enomoto M, Kato T, Hirai T, Shinomiya K. Five-year follow-up evaluation of surgical treatment for cervical myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament: a prospective comparative study of anterior decompression and fusion with floating method versus laminoplasty. Spine (Phila Pa 1976). 2012 Mar 1;37(5):367-76.

⑤Hirai T, Kawabata S, Enomoto M, Kato T, Tomizawa S, Sakai K, Yoshii T, Sakaki K, Shinomiya K, Okawa A. Presence of anterior compression of the spinal cord after laminoplasty inhibits upper extremity motor recovery in patients with cervical spondylotic myelopathy. Spine (Phila Pa 1976). 2012 Mar 1;37(5):377-84.

⑥Hirai T, Okawa A, Arai Y, Takahashi M, Kawabata S, Kato T, Enomoto M, Tomizawa S, Sakai K, Torigoe I, Shinomiya K. Middle-term results of a prospective comparative study of anterior decompression with fusion and posterior decompression with laminoplasty for the treatment of cervical spondylotic myelopathy. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Nov 1;36(23):1940-7.

⑦ Kusano K, Enomoto M, Hirai T, Wakabayashi Y, Itoh S, Ichinose S, Okabe S, Shinomiya K, Okawa A. Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1. Neurosci Lett. 2011 Mar 29;492(1):64-9.

⑧Tomori M, Kawabata S, Tomizawa S, Ishii S, Enomoto M, Adachi Y, Sato T, Shinomiya K, Okawa A. Diagnosis of incomplete conduction block of spinal cord from skin surface using spinal cord evoked magnetic fields. J Orthop Sci. 2010 May;15(3):371-80.

⑨Okawa A, Sakai K, Hirai T, Kato T, Tomizawa S, Enomoto M, Kawabata S, Takahashi M, Shinomiya K. Risk factors for early reconstruction failure of multilevel cervical corpectomy with dynamic plate fixation. Spine (Phila Pa 1976). 2011 Apr 20;36(9):E582-7.

⑩Kusano K, Enomoto M, Hirai T, Tsoulfas P, Sotome S, Shinomiya K, Okawa A. Transplanted neural progenitor cells expressing mutant NT3 promote myelination

and partial hindlimb recovery in the chronic phase after spinal cord injury. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Mar 19;393(4):812-7.

⑪Numano F, Inoue A, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A, Okabe S. Critical involvement of Rho GTPase activity in the efficient transplantation of neural stem cells into the injured spinal cord. Mol Brain. 2009 Nov 28;2:37.

①～⑪すべて査読有

[学会発表] (計7件)

①榎本光裕, 請川円, 平井高志, 早乙女進一, 四宮謙一, 大川淳 ハニカムコラーゲンスポンジと骨髄間葉系細胞移植を併用した損傷脊髄の再建 第26回日本整形外科学会基礎学術集会 2011年10月前橋

②平井高志, 榎本光裕, 早乙女進一, 四宮謙一, 大川淳 神経因性疼痛モデルマウスの腰部後根神経節での TRP family の経時的発現パターン 第25回日本整形外科学会基礎学術集会 2010/10/15 京都

③草野和生, 榎本光裕, 若林良明, 伊藤聰一郎, 岡部繁男, 四宮謙一 Rho family G protein 制御によるラット坐骨神経再生の促進 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009/11/04

④草野和生, 榎本光裕, 早乙女進一, 大川淳, 四宮謙一 Mutant NT3を導入した神経前駆細胞移植による慢性期脊髄損傷治療の試み 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009/11/04

⑤M. Enomoto, M. Ukegawa, K. Bhatt, T. Hirai, S. Sotome, K. Shinomiya, A. Okawa. Axonal regeneration into a honeycomb collagen sponge combined with bone marrow stromal cells in the injured spinal cord. The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience 2011/11/13 ワシントンDC

⑥M. Enomoto, K. Kusano, T. Hirai, Y. Wakabayashi, S. Itoh, A. Okawa, K. Shinomiya. Enhancement of sciatic nerve regeneration by adenovirus-mediated expression of dominant negative RhoA and Rac1. The 40th annual meeting of the Society for Neuroscience 2010/11/16 サンディエゴ

⑦K. Kusano, M. Enomoto, P. Tsoulfas, K. Shinomiya, A. Okawa. Neurotrophic activities of transplanted neural progenitor cells expressing mutant NT3 in injured spinal cord. The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience 2009/10/20 シカゴ

[図書] (計1件)

Mitsuhiro Enomoto and Aldrich Hama

PAIN MANAGEMENT FOLLOWING SPINAL CORD
INJURY: CLINICAL AND BASIC SCIENCE
PERSPECTIVES Nova Science Publishers 2012
in press

〔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

東京医科歯科大学整形外科 HP

<http://www.tmd.ac.jp/med/orth/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座講師

研究者番号 : 9 0 4 5 1 9 7 1

(2) 研究分担者

若林良明 (YOSHIAKI WAKABAYASHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号 : 00431916

早乙女進一 (SOTOME SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座准教授

研究者番号 : 20401391

(3) 連携研究者

四宮謙一 (SHINOMIYA KENICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・名誉教授

研究者番号 : 20111594