

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 4月27日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791758

研究課題名（和文） 中枢神経再生療法における脂肪組織の有用性

研究課題名（英文） Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury.

研究代表者

太田 有紀 (OHTA YUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60387066

研究成果の概要（和文）：外傷性脊髄損傷モデルラットに対して脂肪組織由来幹細胞 adipose-derived stem/stromal cells (ASCs) を経静脈的に移植すると、障害を受けた後肢運動機能の回復が顕著に促進し、脊髄損傷部の空洞が小さい、すなわち、脊髄損傷に対する治療効果が得られた。その作用機序の一つとして、従来では炎症の指標とされる cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 の多様な作用を介する可能性が示唆された。また、移植した ASCs の長期生存は認められなかったことから腫瘍発生等の危険性は少なく、移植細胞として ASCs は安全であることが示唆され、中枢神経再生療法における脂肪組織の有用性が高まった。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue is a potential source for cell therapy to treat spinal cord injury (SCI) because it contains multipotent cells known as adipose-derived stem/stromal cells (ASCs). Here, we performed intravenous infusion of ASCs in rats with SCI. ASCs significantly promoted functional recovery of SCI rats compared with control animals, and the area of spinal cord cavitation was smaller in the ASC group. ASCs gradually accumulated at the site of injury, but long-term survival of these cells was not demonstrated. Spinal cord tissue levels of trophic factors were not increased after ASC infusion. Interestingly, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) showed a transient increase in both the spinal cord tissue and blood of the ASC group. CINC-1 was secreted by ASCs in vitro, and the sponge implantation assay showed that ASCs induced angiogenesis as did CINC-1. These findings suggest that CINC-1 may play an important role in recovery from SCI after ASC transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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・形成外科学

キーワード：再生医学, 脂肪組織, 脊髄損傷, 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷者は、わが国において10万人以上存在し、年間約5,000人が新たに罹患しているにもかかわらず、その根本治療法はいまだ確立されていない。現在、脊髄損傷に対して承認されている薬物治療は、ステロイド大量療法のみである。一方、薬物治療に加えて細胞移植により損傷した脊髄を再生させようという試みが盛んに研究され、新たな治療法として注目されている。

そこで、ドナー細胞供給源として脂肪組織に着目し、外傷脊髄損傷モデルへの細胞移植療法の研究に着手してきた。脂肪組織は成人において体重の約20%と推定され、全身に広く分布しているため採取が容易であり、採取時に伴う苦痛が少なく、乳幼児から高齢者に至るまで安全に採取が可能な組織である。

これまでの検討から、脂肪組織由来細胞 (adipose-derived stem/stromal cells; ASCs) をモデルラットの損傷脊髄に移植すると、細胞移植のないコントロール群に比較して、障害を受けた後肢の運動機能が顕著に改善することを明らかにした。しかしながら、移植細胞の損傷脊髄への直接注入は、脊髄に追加的な損傷を加える危険性がある。そこで、負担がより少なく、比較的多くの細胞数の移植が可能となる静脈投与による移植を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、後肢に運動機能障害を呈する外傷性脊髄損傷モデルラットに対して経静脈的にASCsを移植し、その治療効果を検討すること、また、動物実験を通してASCsを用いた再生療法の有効性及び安全性の確認を行い、ドナー細胞供給源として脂肪組織の有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット脂肪組織の採取とASCsの培養

7週齢Sprague-Dawley (SD)ラットを麻酔下、鼠径部より採取した皮下脂肪組織を0.1%コラゲナーゼ溶液中で37°C、1時間の処理を行った。フィルトレーション後、遠心操作により成熟脂肪細胞層とstromal-vascular fraction (SVF)とに分離した。分取したSVFを20% fetal bovine serumを含むDulbecco's modified Eagle's medium中で、37°C、飽湿、5% CO₂条件下、接着培養によりASCsを得た(図1)。

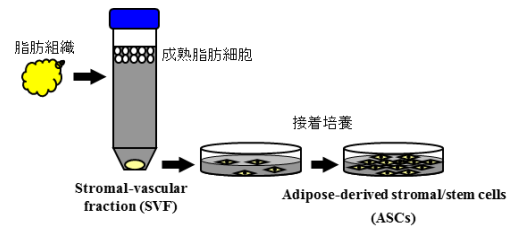


図1. ASCsの培養

(2) 外傷性脊髄損傷モデルラットの作製

麻酔下、雌性10週齢SDラット胸部部(T10)位の脊髄に直接一定重量の負荷(25mmの高さから10gの錘を落下)を与え、後肢に運動機能障害を惹起した損傷モデルを作製した。

(3) 細胞移植

急性期炎症が消退した損傷8日目に、麻酔下、生理食塩水に懸濁した2継代目のASCs、あるいは対照群として生理食塩水を損傷ラット尾静脈からstereotaxic microinjectorを用いて投与した。

(4) 静脈投与後の細胞動態

[³H]-thymidineを取り込ませ、ラジオアイソトープ標識したASCsを損傷ラットに移植し、血液および各臓器の放射活性から各組織に到達した移植細胞の割合を算出した。

(5) 運動機能評価

Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) open-field locomotor rating scaleを用いて、後肢運動機能を0(完全麻痺)から21(正常歩行)にスコアリングし、経時的に歩行機能を評価した。

(6) 移植細胞の生着、組織学的および生化学的評価

Green fluorescent protein (GFP)発現ラット由来ASCsを移植細胞として用い、損傷脊髄での生着を評価した。ASC移植後一定期間経過した脊髄組織切片を作製し、組織学的に評価した。また、脊髄および血液で変動する因子について、抗体アレイを用いてスクリーニングし、enzyme-linked immunosorbent assay法により解析した。

(7) 血管新生作用の評価

ラット背部皮下組織に、ASCs, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)あるいはsalineを含むスポンジを移植した。4日後にスポンジを含む肉芽組織を摘出し、ヘモグロビン含量を測定した。

4. 研究成果

外傷性脊髄損傷モデルラットに対する静脈投与による ASCs の移植は、これまで実施してきた損傷脊髄への直接注入による移植 (2.5×10^5 cells/5 μ L) に比較して、10 倍量の細胞数 (2.5×10^6 cells/500 μ L, 投与速度: 25 μ L/分) の移植が可能であった。

$[^3\text{H}]$ -thymidine 標識 ASCs を用いて静脈投与後の体内動態を解析したところ、ASCs は徐々に損傷脊髄に集積する傾向を示し、同じ中枢神経系である脳と比較して、その移行性は顕著に高いことが明らかになった (図 2)。

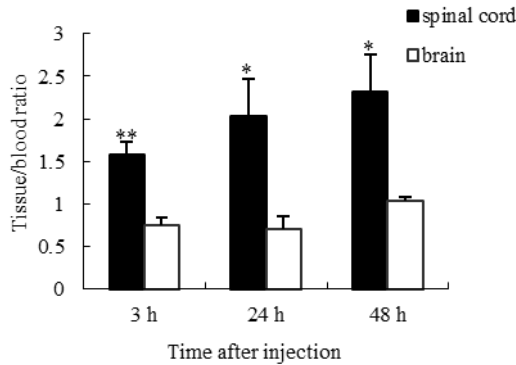


図 2. 血液に対する各組織の相対放射能濃度比

BBB スコアによる歩行機能評価において、ASC 移植群は移植後早期から顕著なスコアの増加を示し、対照群に比較して有意に後肢運動機能の改善を認めた (図 3)。

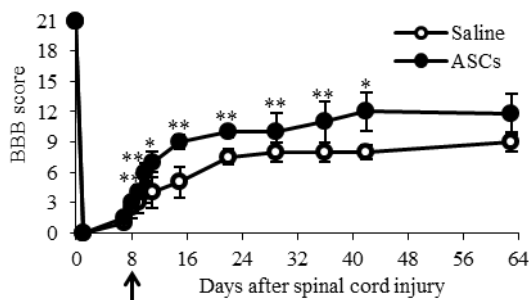


図 3. 後肢運動機能障害に対する ASCs の移植効果

後肢運動機能評価終了後、脊髄組織を組織学的に検討したところ、ASC 移植群の脊髄では損傷による空洞部が小さく (図 4A)、軸索再生のマーカーである growth-associated protein 43 を発現している細胞が多く認められた (図 4B)。その一方、GFP を指標に ASCs の生着について検討したところ、損傷脊髄内に GFP 陽性細胞は検出されなかった。

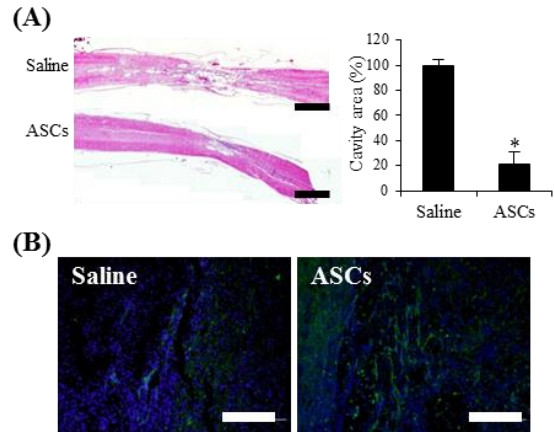


図 4. 組織学的評価

脊髄損傷ラットに対する ASCs の移植効果として、ASCs が産生・分泌する液性因子に着目した。しかしながら、ASCs の移植は損傷脊髄および血液中におけるそれらの濃度に大きな影響を与えなかった。そこで、抗体アレイを用いて ASCs の移植により変動する因子を網羅的にスクリーニングしたところ、CINC-1 に強いスポットが得られた。その発現の経時変化について検討した結果、脊髄、血液ともに ASC 移植数時間後、一過性に上昇することが明らかになった (図 5A, 5B)。また、ASCs 自信による CINC-1 の産生・分泌も認められた。

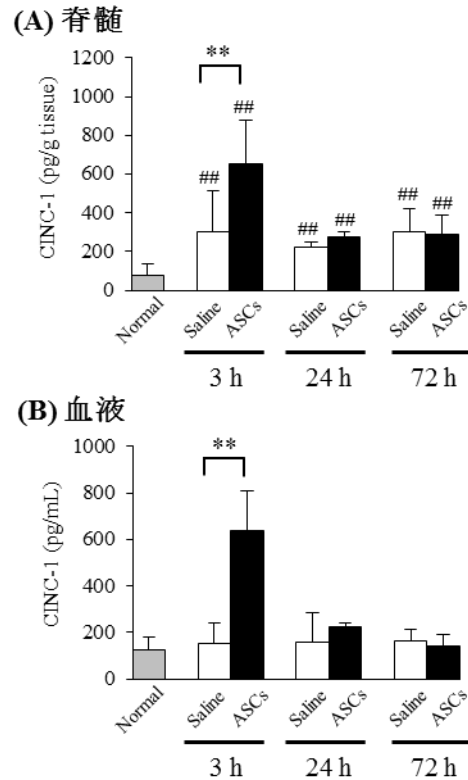
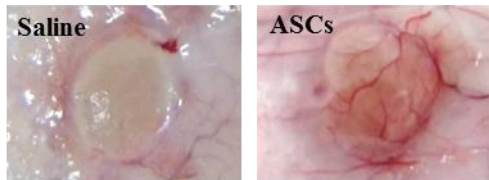


図 5. 脊髄および血液中 CINC-1 の変動

CINC-1は脊髄損傷後一過性に上昇し、二次損傷の拡大に関与することが知られており、本研究でも健常ラットに比較して損傷5時間後の脊髄では150倍以上に増加することが確認された。一方、ASC移植3時間後の脊髄CINC-1の増加は10倍以下であり、その上昇の程度は損傷直後の増加に比較して小さいものであった。Sponge implantation法を用いてASCsの血管新生作用を検討したところ、対照群(saline)に比較して、ASCsを含浸させたスポンジを移植した群の肉芽組織中には多数の血管が観察され、ヘモグロビン含量も有意に増加した(図7)。CINC-1含浸スポンジを移植した群の肉芽組織においても、新生血管の観察およびヘモグロビン含量の増加を認めた。しかしながら、それらはCINC-1含浸0.1 μ gをピークとして認められ、1 μ gのCINC-1含浸スポンジ移植群ではもはや観察されなかった。

(A)



(B)

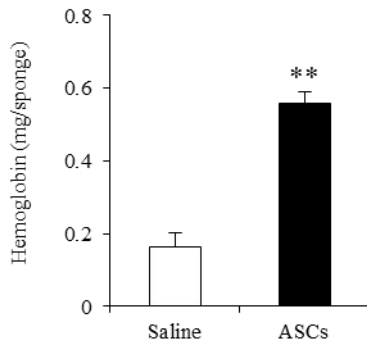


図7. ASCsの血管新生作用

本研究から、外傷脊髄損傷モデルラットへのASCsの経静脈的な移植は、問題なく実施が可能であり、治療効果が得られることが明らかになった。その作用機序の一つとして、CINC-1の関与が示唆された。急激な上昇あるいは大過剰のCINC-1は損傷の拡大につながるが、中程度の上昇はむしろ機能回復につながる可能性が考えられ、ASC移植の作用機序の一つとして興味深い知見が得られた。

また、移植8週間後の脊髄においてASCsの生着は認められず、移植後長期生存は困難であること、それ故に腫瘍発生等の有害事象も認められないことからASCsは移植細胞として安全であることが示唆され、中枢神経再

生療法における脂肪組織の有用性が高まった。

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)

[学会発表](計4件)

①発表者：太田 有紀

発表課題：外傷性脊髄損傷に対する脂肪組織由来幹細胞移植の効果

学会名：第10回日本再生医療学会

発表年月日：2011年3月1日

発表場所：京王プラザホテル

②発表者：太田 有紀

発表課題：脂肪組織を利用した外傷性脊髄損傷治療の試み

学会名：第9回日本再生医療学会

発表年月日：2010年3月19日

発表場所：広島国際会議場

③発表者：太田 有紀

発表課題：脂肪組織を利用した再生医療試み

学会名：第18回日本形成外科学会基礎学術集会

発表年月日：2009年10月1日

発表場所：都市センターホテル

④発表者：太田 有紀

発表課題：脂肪組織を利用した外傷性脊髄損傷治療

学会名：第14回アディポサイエンス研究会シンポジウム

発表年月日：2009年8月22日

発表場所：千里阪急ホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 有紀 (OHTA YUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60387066

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし