様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：２０１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０９１８２

研究課題名（和文）脊髄損傷に対する骨髄間葉系幹細胞移植による、脳脊髄での可塑性亢進メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of accelerating plasticity in the brain following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in spinal injury

研究代表者
岡　真一（Oka, Shinichi）

札幌医科大学・その他部局等・准教授

研究者番号：７０７８９４５３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄損傷等の神経損傷に対して自家骨髄間葉系幹細胞(MSC)を経静脈的投与することによって、神経機能が回復することが明らかとなっている。投与した細胞の作用は、損傷部位の局所的修復のみならず、より上位の脊髄、脳を賦活する多岐にわたるメカニズムが存在していることが考えられている。今回我々は、脊髄損傷症例に対するMSC投与後のMRI解析、さらに動物モデルについて組織学的解析およびMRI解析を実施し、神経回路の再編成が生じていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脊髄損傷や脳梗塞等の神経損傷疾患の後遺症に対しては、これまで有効な治療法がなく、多くの人々の社会復帰を妨げる要因となっている。我々は自家骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与による神経機能回復に着目し、急性期～亜急性期の脊髄損傷患者を対象とした医師主導治験を実施し、既に極めて高い有効性を示した。現在、期限・条件付きで薬機承認が得られ実際に治療にあたっている。神経機能回復は多段階にわたる機序が想定されているが、損傷局所のみならず特に損傷局所から離れた脳の賦活化が生じることが、重要な役割を果たしている可能性が示唆され、その解明は本治療のさらなる発展に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neurofunctional recovery in spinal cord injury following intravenous infusion of Mesenchymal stem cells has been reported. It is one of the most important mechanisms of functional improvement that remote responses occur in the brain as well as in the injured spinal cord. In this study, we performed MRI analysis after MSC administration in spinal cord injury cases, as well as histological and MRI analysis in animal models, and demonstrated the reorganization of neural circuits.

研究分野：再生医療

キーワード：mesenchymal stem cells　脊髄損傷　diffusion tensor imaging　brain connectivity

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷後の自然回復過程において、局所のみならず中枢側に位置する脊髄、脳において、plasticity の賦活化が生じ、新しい神経回路が構築されることが重要な役割を果たしていることが知られている(Bareyre et al., 2004; Ghosh et al., 2012; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2016)。そして MSC の移植が plasticity の賦活化を加速させ、機能回復を増幅させると考えられている。我々は最近、運動機能の回復と関連して MSC を移植した脊髄損傷ラット大脳皮質運動野に、神経再生、plasticity の賦活化に関与する可能性がある複数の遺伝子の発現量に変化があることを報告した(Oshigiri et al.,2019)。さらに近年、脳・脊髄の神経回路の plasticity を評価するために、体積などの形態的 MRI(Voxel-Based Morphometry(VBM)、Diffusion Tensor Imaging(DTI))や機能的 MRI(functional MRI(fMRI))などの新しい解析手法が急速に発達してきており、これらの最新の解析手法を用いた脊髄損傷後の神経回路の再構築が報告されている。

## 2. 研究の目的

MSC を経静脈的に移植することによって、多段階に亘る回復メカニズムが相乗的に効果をもたらすと考えられている。特に損傷から離れている遠隔領域においても plasticity を促進するという効果の検証は、本投与法の有用性を検討する上でも非常に貢献するものと考える。本研究では、神経機能画像の解析を中心に、MSC 移植後の plasticity を解析し、その部位や程度などの特定を目指す。すなわち、①脊髄損傷症例の MSC 移植前後の MRI、運動機能評価データを経時的に収集する。②得られた MRI データから既存の大脳白質神経回路の個々の検討および網羅的な大脳 connectome 解析により、plasticity 亢進に寄与する大脳皮質間接続を同定する。③臨床で得られて知見を踏まえて、ラット脊髄損傷モデルに対して、MSC(対照群には Vehicle)を経静脈的に投与して、大脳における plasticity の変化を、MRI ex vivo DTI 法、fMRI 法、軸索トレース法、軸索・樹状突起棘の形態解析等、種々の神経解剖学的解析、免疫組織学的解析、分子生物学的解析を行う。

## 3. 研究の方法

**方法 1：脊髄損傷症例の MRI、運動機能評価データの収集、解析**

MSC による治療を目的に札幌医科大学附属病院に入院した全ての脊髄損傷症例について、入院時、移植直前、移植 1 ヶ月後、移植 3 ヶ月後、移植 6 ヶ月後の時点での脊髄および脳の T1 強調画像、T2 強調画像、DTI、resting-state fMRI の撮影を行い、さらに同一の時点での神経機能評価(ASIA 機能障害尺度、ISCSCI、SCIM-Ⅲ)を併せて行う。MRI データは、これまでも多数報告されている標準的な方法により解析する。すなわち、T1 強調画像など解剖学的 MRI データは、標準的な脳画像解析ソフトである SPM(Statistical Parametric Mapping, UCL)、Freesurfer(Harvard)にて、標準化・segmentation 等の処理を行う。脳 DTI データは、FSL(FMRIB Software Library, Oxford)、MRtrix3(King's College London)による、画像変換、tractography、標準画像空間への registration 等を実行し、グラフ理論を元に各種パラメーターを算出する。resting-state fMRI データについても同様に CONN toolbox(McGovern Institute for Brain Research, MIT)を用いてデータ解析を行う。

**方法 2：脊髄損傷動物モデルにおける、MSC 投与による損傷上位の脊髄・脳の plasticity 解**

**析**

ラット用脊髄損傷作成装置(IH-0400 Impactor; PSI 社製)を用いて、SD ラットの Th9 に実験的脊髄損傷を作成する(Morita et al., 2016)。脊髄損傷作製後 1 週目にラットから採集・培養した MSC を経静脈的に移植し、行動学的評価をしながら、観察期間終了後(4 週)まで飼育する。行動学的評価は、Basso Beattie Bresnahan(BBB) スコアと Rotarod test を用いる。なお、対照群には Vehicle を投与し、比較検討する。

**2-1. In vivo MRI データの解析**

動物実験用高磁場 MRI(7T)を用いて撮像を行う。左前脚電気刺激を Task とし task-fMRI (Suzuki et al., 2013)を撮像する。データは臨床例と同様に解析を行う。

**2-2. Ex vivo MRI データの解析**

動物実験用高磁場MRI(7T) を用いて撮像を行う。撮像項目は、①T1およびT2強調画像、②脳DTI(図: 予備データ)、③脊髄DTIである。こちらのデータも臨床例と同様に解剖学的、機能的な解析を行う。

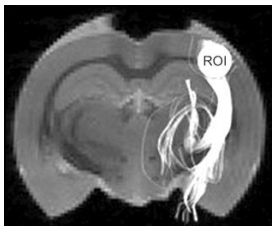


図: ラット慢性期脊髄損傷に MSC を経静脈的に移植後、10 週後に施行した脳の Ex vivo DTI。大脳皮質運動感覚野に ROI を設定している。大脳皮質からの神経線維が、描出されており、脳の plasticity が検出可能である。(予備データ)。

**2-3. 軸索トレース法による神経解剖学的比較解析**

MSC を移植後、右大脳皮質運動感覚野に順行性トレーサである biotinylated dextran amines(BDA)やウイルストレーサーを局所注入し、皮質脊髄路ニューロンのトレースを行なう。

**2-4. 軸索・樹状突起棘(dendritic spine)の形態解析**

MSC を移植後の大脳皮質切片において、neuron のゴルジ染色を行い、その形態変化を解析する。

## 4. 研究の成果

**成果 1: 脊髄損傷症例の MRI、運動機能評価データを収集、解析**

MSC による治療を目的に札幌医科大学病院に入院した全ての頚髄損傷症例について、頭部および脊髄の MRI データを収集した。当院入院時（投与前)、投与 1 ヶ月後、投与 4 ヶ月後または受傷 6 ヶ月後の時点での頚髄および脳の T1 強調画像、T2 強調画像、DTI、resting-state fMRI の撮影を行い、さらに同一の時点での神経機能評価(ASIA 機能障害尺度、ISCSCI、SCIM-III)を併せて行った。MRI データを元に実施した大脳 connectome 解析によるステミラック注投与前と受傷 6 ヶ月後の比較では、脊髄損傷重症度分類(AIS)が 2 段階以上改善した症例群において、Global Efficiency(全体効率)および Clustering Coefficient(クラスタ係数)の増加傾向を示した。これら大脳各種ネットワーク指標に変化が生じており、大脳神経回路の構成に変化が生じていることが示唆された(図 1,2. Oka, 未発表)。

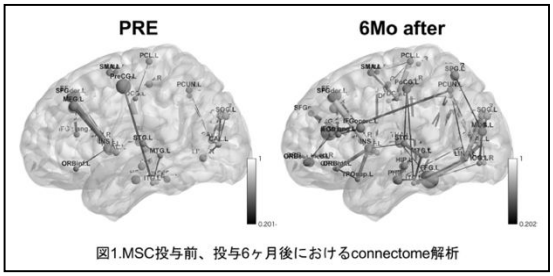

図1.MSC投与前、投与6ヶ月後におけるconnectome解析

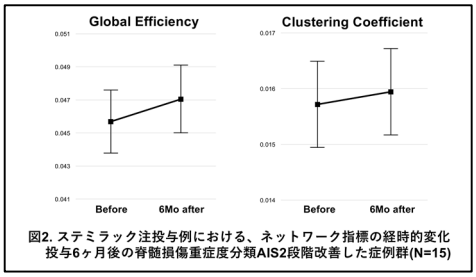

図2. ステミラック注投与例における、ネットワーク指標の経時的変化
投与6ヶ月後の脊髄損傷重症度分類AIS2段階改善した症例群(N=15)

**成果 2: 重症頭部外傷症例における MSC 投与後の脳 plasticity の賦活化亢進の解析**

脊髄損傷症例と同様の脳 MRI 解析を他疾患の MSC 治験症例についても実施している。そのうち、自己培養 MSC を実施した重症頭部外傷の一症例の解析結果において、投与前により、いずれも右大脳の吻側中前頭回を中心に前頭葉と頭頂葉を連絡する 4 つの回路の賦活化が確認された(Yamaki, Oka et al.,2024)。

**成果 3：脊髄損傷モデルラットにおける MSC 投与後の脳脊髄 plasticity の賦活化亢進の解析**

急性期脊髄損傷モデルラットに対して、MSC 投与群、vehicle 投与群、コントロール群における、大脳皮質運動野において遺伝子発現レベルを比較検討した結果、神経再生、plasticity の賦活化に関与する可能性がある複数の遺伝子において、MSC 投与により有意に発現量に変化が生じていた(Oshigiri et al.,2019)。さらに、順行性ウイルストレーサーを用いた皮質脊髄路の解析において、MSC 投与群では脊髄損傷部を迂回する架橋連結が出現し、尾側へ繋がっていくことが認められた(Hirota et al.,2022)。MSC 投与によって引き起こされる運動機能の回復において、局所やさらに離れた大脳皮質においても組織再構築が回復の一つの要因となっていることが示唆される結果であった。

**成果 4:脳梗塞モデルラットにおける MSC 投与後の脳 plasticity の賦活化亢進の解析**

脊髄損傷と関連して、同様に神経損傷疾患である脳梗塞モデルラットに対して、MCS 投与群、 vehicle 投与群における ex vivo 脳 DTI 解析を実施した。結果、脳梁を介して両側大脳皮質を連絡する Tract の描出数が MCA 投与群において有意に増加し(Nagahama et al., 2018)、さらにリハビリテーションを併用することで増加が促進されることが明らかとなった(図 3. Yamashita et al., 2023)。この研究は、ラットにおける脳 DTI 解析において、撮像条件の設定や、解析方法、今後 connectome 解析方法を確立していく上で非常重要な位置づけと考えられた

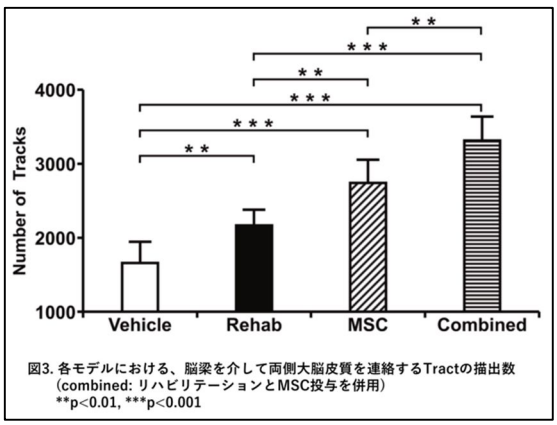

図3. 各モデルにおける、脳梁を介して両側大脳皮質を連絡するTractの描出数
(combined: リハビリテーションとMSC投与を併用)
**p<0.01, ***p<0.001

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　0件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Yamaki Tomohiro、Oka Shinichi et al. | ４．巻<br>36 |
| ２．論文標題<br>Intravenous infusion of auto-serum-expanded autologous mesenchymal stem cells into chronic severe brain injury patients | ５．発行年<br>2024年 |
| ３．雑誌名<br>Interdisciplinary Neurosurgery | ６．最初と最後の頁<br>101927～101927 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.inat.2023.101927 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Hirota Ryosuke、Sasaki Masanori、Kataoka-Sasaki Yuko、Oshigiri Tsutomu、Kurihara Kota、Fukushi Ryunosuke、Oka Shinichi、Ukai Ryo、Yoshimoto Mitsunori、Kocsis Jeffery D.、Yamashita Toshihiko、Honmou Osamu | ４．巻<br>39 |
| ２．論文標題<br>Enhanced Network in Corticospinal Tracts after Infused Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury | ５．発行年<br>2022年 |
| ３．雑誌名<br>Journal of Neurotrauma | ６．最初と最後の頁<br>1665～1677 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1089/neu.2022.0106 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Yamashita Tatsuro、Sasaki Masanori、Sasaki Yuichi、Nagahama Hiroshi、Oka Shinichi、Kataoka-Sasaki Yuko、Ukai Ryo、Yokoyama Takahiro、Kobayashi Masato、Kakizawa Masafumi、Kocsis Jeffery D.、Honmou Osamu | ４．巻<br>1825 |
| ２．論文標題<br>Rehabilitation facilitates functional improvement following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in the chronic phase of cerebral ischemia in rats | ５．発行年<br>2024年 |
| ３．雑誌名<br>Brain Research | ６．最初と最後の頁<br>148709～148709 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.brainres.2023.148709 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 佐々木　祐典<br>(Sasaki Masanori)<br>(20538136) | 札幌医科大学・医学部・准教授<br>(20101) | |
| 研究分担者 | 横山　貴裕<br>(Yokoyama Takahiro)<br>(60896116) | 札幌医科大学・医学部・研究員<br>(20101) | |
| 研究分担者 | 本望　修<br>(Honmou Osamu)<br>(90285007) | 札幌医科大学・医学部・教授<br>(20101) | |
| 研究分担者 | 鵜飼　亮<br>(Ukai Ryo)<br>(30896113) | 札幌医科大学・医学部・助教<br>(20101) | |

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 |
|---|---|