様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月　４ 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：２１Ｋ０９１８３

研究課題名（和文）脊髄障害性疼痛に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた治療法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic efficacy of intravenous infusion of mesenchymal stem cells for myelopathic pain.

研究代表者
栗原　康太（Kurihara, Kota）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：２０８５５８０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：慢性期脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞（MSC）の静脈内複数回投与をし、その治療効果とメカニズムについて検討した。脊髄損傷作製6週間後に、対照群、単回投与群、複数回投与群、高容量単回投与群に分けた。MSCを投与したいずれの群も、対照群と比較して改善を認めたが、複数回投与群が最も改善を示した。単回投与群と高容量単回投与群の改善には差異は認めなかった。また、疼痛抑制効果についても、同様の傾向を示した。慢性期の脊髄損傷患者にMSC治療を適用する場合、複数回の投与がより効果的である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脊髄損傷は神経系に壊滅的な損傷を与え、感覚・運動機能障害や臓器不全を引き起こし、麻痺による機能障害に苦しむ慢性期の累積する患者は多い。さらには脊髄損傷による疼痛は難治性で、有効な治療法が確立されていないのが現状である。先行研究にて、慢性期脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞（MSC)の静脈内単回投与が治療効果をもたらすことを報告している(Morita et al., 2016)。しかし、慢性期脊髄損傷患者の運動機能のさらなる改善を目指すには、MSCの複数回投与が望ましいと考えられる。慢性期脊髄損傷患者に対するMSCの静脈内複数回投与による治療法の開発への本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We investigated the therapeutic effects and mechanisms of repeated intravenous infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) to a rat model with chronic spinal cord injury (SCI). Chronic SCI rats were randomized and infused with vehicle (Vehicle), single MSC injection (MSC-1), single high dose injection (HD-MSC) at week 6, or repeatedly injections of MSCs at 6, 7, and 8 weeks (MSC-3) after SCI induction. Behavioral analysis using BBB score, histological analysis evaluating remyelinated axons and sprouting of CST fibers and raphespinal fiber growth, and ex vivo DTI analysis. In behavioral, histological, and ex vivo DTI analyses, all MSC-treated groups showed improvement compared to the vehicle group, but the MSC-3 showed the most improvement. There was no difference in improvement between the MSC-1 and HD-MSC groups.The same trend was observed for pain suppression.The results indicated that repeated dosing may be more effective when MSC therapy is applied to patients with chronic SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄障害性疼痛　骨髄間葉系幹細胞　静脈内投与

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

脊髄障害性疼痛に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた治療法の開発

Therapeutic efficacy of intravenous infusion of mesenchymal stem cells for myelopathic pain.

１．研究開始当初の背景

脊髄損傷は神経系に壊滅的な損傷を与え、感覚・運動機能障害や臓器不全を引き起こす。現在、世界中で、年間76万人以上の外傷性脊髄損傷の新規症例が発生していると推定されている。従来の脊髄損傷に対する研究は、運動機能の回復に焦点が置かれてきたが、近年は脊髄損傷に伴う二次的影響への関心が高まっており、特に疼痛を含む異常感覚への治療介入によって、ADLやQOLが大幅に改善できることが認識されてきている。しかし、その痛みは難治性で、有効な治療法が確立されていないのが現状であり、痛みに苦しむ多くの脊髄損傷患者のため、新しい治療法の開発に期待が高まっている。

一方で、我々は脊髄損傷に対する基礎・臨床研究において、骨髄間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）の経静脈的投与（MSC治療）を単回投与で行い、運動機能の回復とその治療メカニズムを明らかにしてきた。さらに、自己MSCの静脈的投与を行った医師主導治験において、運動機能の改善だけではなく、脊髄障害性疼痛が改善する症例をしばしば経験した。

今後、患者の累積する慢性期の脊髄損傷患者にMSC治療を行うに際し、さらなる運動機能の改善や、難治性である脊髄障害性疼痛に治療効果を期待するために、新たなアプローチの必要性があると思われる。

２．研究の目的

本研究では、新たなアプローチとして、慢性期脊髄損傷モデルラットにMSCの複数回投与を行い、その治療効果とメカニズムについて検討することを目的とした。

３．研究の方法

雄SDラット(250-300g)にIH impactorを用いて、第9胸髄に圧挫損傷を作製した。脊髄損傷作製6週間後に、単回投与群はMSC（1.0×10^6個/1cc）、対照群は細胞なしの新鮮な培養液(Dulbecco’s Modified Eagle Medium: 1cc）を、それぞれ経静脈的に投与した。複数回投与群には、脊髄損傷8週間後にMSC（1.0×10^6個/1cc)を合計3回、経静脈的に投与した。また、同数の細胞数を単回で投与する高容量単回投与群には、高容量MSC（3.0×10^6個/1cc)を脊髄損傷作製6週間後に投与した。観察期間は投与10週間後まで設定し、行動学的解析、組織学的解析、MRI解析を行った。

４．研究成果

行動学的解析ではBasso-Beattie-Bresnehan scoreを用いて、運動機能を評価した。すべてのラットが脊髄損傷作製直後にほぼ完全な後肢麻痺を示したが、その後徐々に自然回復し、作製後6週間後ではプラトーとなった。対照群は以降の観察期間でスコアの改善は認めなかった。MSCを投与したいずれの群も、投与1週間後（脊髄損傷作製後7週間後）からスコアの改善を示した。投与3～10週間後　(脊髄損傷作製後9～16週間後）には、対照群と比較していずれも有意にスコアが高かった。投与8週間後（脊髄損傷作製後14週間後）以降、複数回投与群が、対照群、単回投与群、高容量単回投与群よりも有意にスコアが高くなった。観察期間中に単回投与群と高容量単回投与群には、スコアには差異は認めなかった。von Frey filament test、Radiant heat testによる疼痛抑制効果についても同様の傾向を示した。

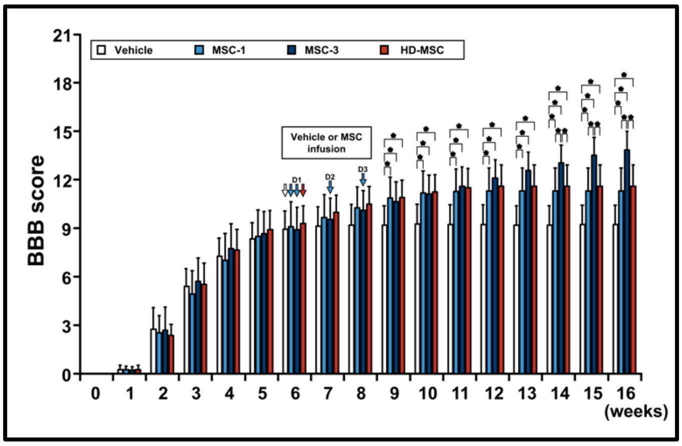
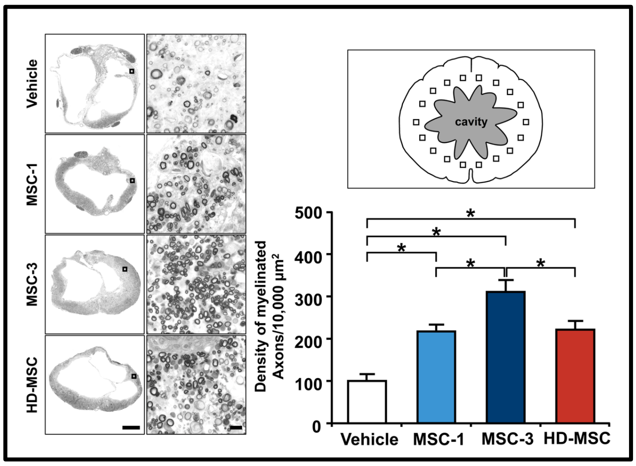


図 1. 行動学的解析
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

組織学的解析では、脱髄軸索の再有髄化、皮質脊髄路（錐体路）・錐体外路の軸索再生を評価した。脱髄軸索の再有髄化は、toluidine blue 染色を用いて脊髄損傷中心部で評価した。全群で、損傷部中心は空洞化を示し、外縁部に有髄軸索が認められた。有髄軸索の密度は、MSC を投与したいずれの群も、対照群に比べて高かったが、複数回投与群が最も高かった。単回投与群と高容量単回群には差異は認めなかった（図 2）。複数回投与群の組織を、光学および電子顕微鏡を用いて観察すると、シュワン細胞による有髄化された末梢神経の髄鞘に類似した特徴を認めた。さらに抗 P0 抗体を用いて評価すると、再有髄化した軸索の多くが、P0 抗体陽性の再有髄化軸索であり、MSC 投与後の再有髄化の特徴が観察された（図 3）。



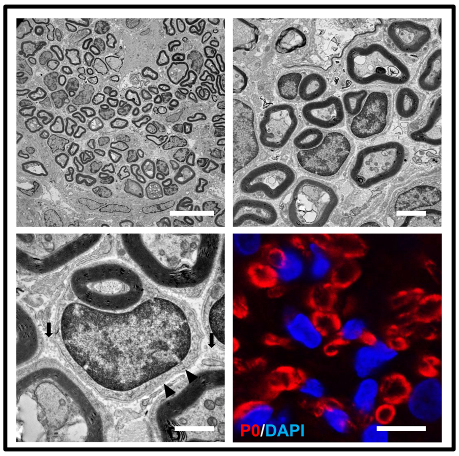
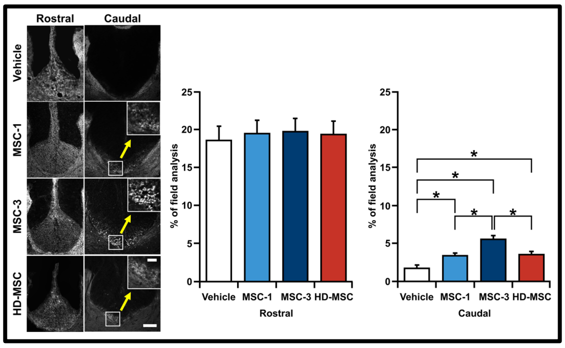


図 2. 脱髄軸索の再有髄化
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

図 3. 光学電子顕微鏡と抗 P0 抗体を
用いて観察した再有髄化軸索
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

軸索再生は、脊髄損傷部から 15〜20mm 吻側と尾側の、それぞれの組織における神経線維を、皮質脊髄路では抗 PKC-γ 抗体を用いて、錐体外路では抗 5-HT 抗体を用いて評価した。皮質脊髄路・錐体外路ともに、吻側では全群間で差異は認めなかったが、尾側においては MSC を投与したいずれの群も、対照群に比べて高く、複数回投与群が最も高かった。単回投与群と高容量単回群には差異は認められなかった。



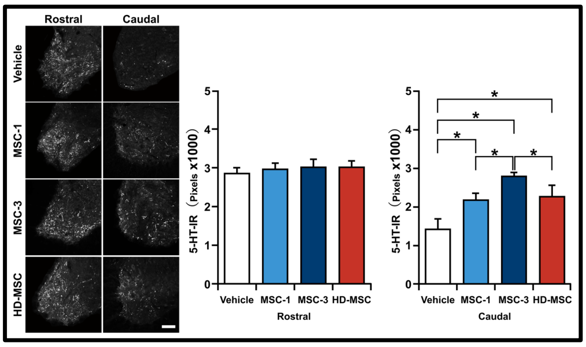


図 4. 抗 PKC-γ 抗体を用いて観察した
皮質脊髄路
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

図 5. 抗 5-HT 抗体を用いて観察した
錐体外路
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

MRI 解析では、Ex vivo Diffusion Tensor Imaging を用いて、脊髄損傷中心部付近の神経線維数を評価した。全群で神経線維数は減少していた。MSC を投与したいずれの群も、対照群に比べて神経線維数が多く、複数回投与群が最多だった。単回投与群と高容量単回群には差異は認められなかった。

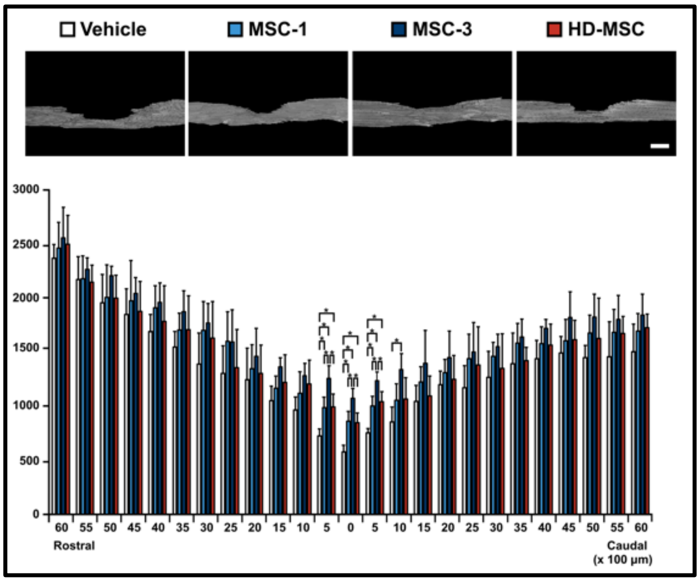


図 6. Diffusion Tensor Imaging
(Kurihara, et al., Brain Research, 2023)

これらの解析結果により、慢性期脊髄損傷モデルにおいて、MSC の複数回投与が、脱髄軸索の再有髄化、損傷軸索の再生や神経回路の再構築を促進し、疼痛抑制を含む行動学的な改善に寄与する可能性が示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　0件）

1．著者名 Kurihara Kota、Sasaki Masanori、Nagahama Hiroshi、Obara Hisashi、Fukushi Ryunosuke、Hirota Ryosuke、Yoshimoto Mitsunori、Teramoto Atsushi、Kocsis Jeffery D.、Yamashita Toshihiko、Honmou Osamu	4．巻 1817
2．論文標題 Repeated intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances recovery of motor function in a rat model with chronic spinal cord injury	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Brain Research	6．最初と最後の頁 148484～148484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2023.148484	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 栗原康太、小原尚、福士龍之介、廣田亮介、森田智慶、佐々木祐典、寺本篤史、本望修、山下敏彦
2．発表標題 慢性期脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞の複数回投与による治療効果の検討
3．学会等名 第53回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4．発表年 2024年

1．発表者名 栗原康太、小原尚、福士龍之介、廣田亮介、森田智慶、佐々木祐典、寺本篤史、本望修、山下敏彦
2．発表標題 慢性期脊髄損傷モデルラットに対する骨髄間葉系幹細胞の複数回投与による治療効果の検討
3．学会等名 第97回日本整形外科学会学術集会
4．発表年 2024年

1．発表者名 福士龍之介
2．発表標題 脊髄障害性疼痛に対する骨髄間葉系幹細胞の治療効果の検討
3．学会等名 第37回　日本整形外科学会基礎学術集会
4．発表年 2022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
研究分担者	福士　龍之介 (Fukushi Ryunosuke) (00894065)	札幌医科大学・医学部・特任助教 (20101)	
研究分担者	廣田　亮介 (Hirota Ryosuke) (10815434)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	佐々木　祐典 (Sasaki Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	山下　敏彦 (Yamashita Toshihiko) (70244366)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	押切　勉 (Oshigiri Tsutomu) (70754612)	札幌医科大学・医学部・訪問研究員 (20101)	
研究分担者	岡　真一 (Oka Shinichi) (70789453)	札幌医科大学・その他部局等・准教授 (20101)	
研究分担者	佐々木　優子 (Sasaki Yuko) (80631142)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	本望　修 (Honmou Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	小原　尚 (Obara Hisashi) (20919732)	札幌医科大学・医学部・研究員 (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