

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6月20日現在

機関番号：82660  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791401  
 研究課題名（和文） q-space イメージングによる脊髄損傷メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of the spinal cord injury by q-space imaging  
 研究代表者  
 藤吉兼浩（FUJIYOSHI KANEHIRO）  
 独立行政法人国立病院機構 村山医療センター（臨床研究センター）・整形外科・医員  
 研究者番号：80365303

研究成果の概要（和文）：代表研究者らは、q-space imagingによる独自の髄鞘の可視化法を開発し、霊長類コモンマーモセット損傷脊髄に対する同種神経幹細胞移植の実験に応用することにより、移植細胞の再髄鞘化が脊髄の再生メカニズムの一つであることを本研究によって示している。

研究成果の概要（英文）：Here we developed the “Myelin map,” an enhanced myelin visualization method based on q-space MR imaging. This method visualizes the highly restricted diffusion of water molecules in myelin sheaths. Myelin maps accurately depicted the poor myelination in myelin-deficient mice, the demyelination/remyelination in marmoset chemical SCI, and the remyelination after allogeneic NS/PC transplantation in marmosets. Myelin maps have an unparalleled ability to visualize demyelination/remyelination and the potential for immediate clinical application as a powerful tool for researchers and clinicians examining diseases of the central nervous system (CNS).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：（1）脊髄損傷（2）MRI（3）コモンマーモセット（4）髄鞘（5）脱髄（6）再髄鞘化（7）神経幹細胞移植（8）q-space イメージング

1. 研究開始当初の背景

われわれは神経幹細胞移植を主軸とした脊髄再生に取り組み、移植細胞が機能回復に寄与することを報告してきたが、そのメカニズムは不明である。一方、マウスES細胞やiPS細胞由来の神経幹細胞の実験において移植細胞の再髄鞘化とglial supportが重要であることを証明し、報告してきた(Kumagai, et al,

2009., Tsuji, et al, 2010)。しかし、これまでに髄鞘を *in vivo* で評価する方法はなく、新たなtoolの開発が期待された。そこで損傷脊髄における組織の微細な変化を捉えるために、拡散MRIの先進技術であるq-spaceイメージングを導入し、髄鞘を特異的に描出する“Myelin map”を開発した

## 2. 研究の目的

H23年度の髄鞘形成不全mutant miceと霊長類common marmoset化学的脊髄損傷モデルを用いた実験によって、Myelin mapが確かに髄鞘の情報を可視化していることが証明された。本年度の研究の目的は、Myelin mapが圧挫損傷においても髄鞘の情報を正確に描出できることを確認すると同時に、世界ではじめての霊長類の脊髄損傷モデルにおける同種神経幹細胞移植を実現し、Myelin mapで評価することによって脊髄再生のメカニズムの一端を解明することである。本研究は脊髄損傷の病態解明に役立つだけでなく、現在有効な治療法のない神経疾患の新規治療開発に結びつくと考えられ、将来的に世界に広く普及する可能性のある重要性の高い研究である。

## 3. 研究の方法

### A. model : 全身麻酔下で成体 common

marmoset (n=5) の第5頸椎高位に脊髄圧挫損傷を加える (modified NYU impactor, 17gの重錘を5cmの高さから落下)。損傷後9日で神経幹細胞を $2 \times 10^5$ 個移植する。Mediumを移植(投与)したものを対照群(n=5)とする。

B. MRI の撮影: 移植前および細胞移植後2, 4, 10週において全身麻酔下にてQSIおよびDTI, DTIを撮像する。

C. 免疫組織学的評価: LFB染色、HE染色のほかに、GFAP、MBPの染色を行う。また電子顕微鏡にて損傷後10週における再髄鞘化の確認をおこなう。組織とQSIを徹底的に比較検討し、移植細胞によりどの程度の髄鞘が残存するのか、それらが移植細胞がoligodendrogliaに分化したことによる再髄鞘化なのか、あるいは損傷を免れた髄鞘であるのかを確認する。

D. 移植細胞の準備: 神経幹細胞の有用性を言うためには、高い活性を維持し、かつhostの脊髄に拒絶されず生着することが大切である。そのためにcommon marmoset E135脊髄由来の神経幹細胞を樹立し、さらに緑の蛍光タンパク質であるVenusをレンチウイルスで〈図4〉common marmoset胎児脊髄由来の神経幹細胞を樹立し、緑で標識した、移植後の細胞を緑の蛍光で追跡することが可能である。これにより、霊長類における同種幹細胞移植が有効であることを確認する。

## 4. 研究成果

H23年度に掲げた研究目的、研究実施計画は本研究資金のおかげで予定のすべての研究を遂行することができた。具体的には、

1) 独自に開発したMyelin mapは、生きているサルの健常および損傷脊髄においてLFB染色で明らかにされた髄鞘領域を明瞭に示しており、強い相関を示していた。

2) Myelin mapは損傷後1週における脱髄と、6週における再髄鞘化を*in vivo*で描出していることがLFB染色と電子顕微鏡像より確認された。

3) *shiverer*と*jimpy*マウスの脊髄を用いた従来のMRIやDTIでは髄鞘形成不全脊髄と正常脊髄の違いを描出できなかったが、Myelin mapでは髄鞘形成不全脊髄ではほとんど信号値はみられなかった。このことよりMyelin mapは髄鞘に基づく画像法であることが証明された。

4) 脊髄損傷後に神経幹細胞を移植したサルの運動機能は対照群と比較して有意な回復を認め、組織学的検討より移植細胞がオリゴデンドロサイトへと分化し脱髄を生じたhostの軸索の再髄鞘化に寄与していることが明らかとなった。

5) Myelin mapは正常のヒトの脳における有髄領域(白質)を明瞭に描出していた。上記の結果よりMyelin mapが真に髄鞘を描出する方法であることが、化学的脱髄モデルと髄鞘形成不全突然変異マウスの脊髄によって証明された。本研究では世界で初めて霊長類の同種神経幹細胞移植に成功した。Myelin mapにより移植細胞による再髄鞘化が脊髄再生メカニズムの1つであることが直接的に証明された。Myelin mapはヒトにおいても安全に短時間に撮像可能であることを確認できたため、今後広く臨床応用が可能である。本法は脊髄損傷だけでなく、多発性

硬化症など原因不明で有効な治療法が確立されていない中枢神経系疾患全般に応用可能であり、それらの病態解明や治療効果判定・創薬の開発に役立つと考えている。

(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 8 件)

Nakamura M, Fujiyoshi K, Tsuji O, Konomi T, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Momoshima S, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M :  
Clinical significance of diffusion tensor tractography as a predictor of functional recovery after laminoplasty in patients with cervical compressive myelopathy. J Neurosurg Spine. 2012 Jun 8. 査読有

Nakamura M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M :  
Long-term surgical outcomes of spinal meningiomas. Spine (Phila Pa 1976). 2012 May 1;37(10):E617-23. 査読有

Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M :  
Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. PLoS One. 2011;6(11):e27706. 査読有

Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Hara CM, Miyawaki A, Okano HJ, Toyama Y, Nakamura M, Okano H :  
Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. Stem Cells. 2011 Dec;29(12):1983-94. 査読有

Tsuji O, Nakamura M, Fujiyoshi K, Ishii K, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Momoshima S, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M :  
Cervical intramedullary ependymoma masquerading as cervical spondylotic myelopathy on MRI analysis. J Orthop Sci. 2011 Oct 6. 査読有

Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H :  
Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 4;108(40):16825-30. 査読有

Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, Momoshima S, Nakamura M, Okano H :  
Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells. Neurotherapeutics. 2011 Oct;8(4):668-76. Review. 査読有

Nakamura M, Fujiyoshi K, Tsuji O, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K :  
Long-term surgical outcomes of idiopathic spinal cord herniation. J Orthop Sci. 2011 Jul;16(4):347-51. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① Kanehiro Fujiyoshi, Tsunehiko Konomi, Osahiko Tsuji, Keigo Hikishima, Akio Iwanami, Morio Matsumoto, Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Kazuhiro Chiba, Masaya Nakamura :  
In vivo Myelin map based on non-Gaussian diffusion distribution elucidated remyelination after cell transplantation in spinal cord injury primates  
3<sup>rd</sup> Annual Meeting of Cervical Spine Research Society, Asia Pacific Section  
Fukuoka (2012. 4. 21-22)

② 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 百島祐貴, 小牧裕司, 山田雅之, 八木一夫, 許斐恒彦, 辻収彦, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也 :  
QSI の脊髓再生医療への応用  
第 39 回日本磁気共鳴医学会大会「Q space imaging / diffusional kurtosis imaging」  
福岡 (2011. 9. 29)

③藤吉兼浩, 許斐恒彦, 辻収彦, 疋島啓吾, 松本守雄, 千葉一裕, 百島祐貴, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 :  
非侵襲的髓鞘可視法 “Myelin map” の精度検証と臨床応用  
第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会  
群馬 (2011. 10. 21)

④藤吉兼浩, 町田正文, 塩田匡宣, 竹光正和, 福田健太郎, 八木満, 飯塚慎吾, 名越慈人, 五十嵐一峰, 臼井宏 :  
拡散テンソルトラクトグラフィを用いた損傷脊髄における投射路の可視化  
第 65 回国立病院総合医学会  
岡山 (2011. 10. 8)

⑤K Fujiyoshi, O Tsuji, T Konomi, K Hikishima, M Yamada, S Momoshima, H Okanno, Y Toyama, M Nakamura :  
q-space MR imaging depict demyelination after spinal cord injury in non-human primate.  
Neuroscience2011  
Washington, DC (2011. 11. 13)

⑥藤吉兼浩, 中村雅也, 辻収彦, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄 :  
脊髄円錐部に発生した軟膜下脂肪腫において手術を施行した 1 例  
第 46 回日本脊椎脊髄障害医学会  
大阪 (2011. 11. 19)

⑦K Fujiyoshi, T Konomi, O Tsuji, K Hikishima, S Momoshima, M Matsumoto, K Chiba, H Okanno, Y Toyama, M Nakamura :  
A novel in vivo myelin MR imaging elucidated the mechanism of spinal cord injury  
Cervical Spine Research Society 39<sup>th</sup> Annual

Meeting Scottsdale  
Arizona (2011. 12. 8)

⑧藤吉兼浩 :  
脊髄損傷における拡散 MRI  
第 6 回日本分子イメージング学会  
神戸 (2011. 5. 27)

⑨藤吉兼浩 :  
脊髄損傷モデルおよび再生過程における軸索および髓鞘の可視化の試み  
神経組織の成長・再生・移植研究会  
第 26 回学術集会  
東京医科大学病院 (2011. 6. 25)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤吉 兼浩 (FUJIYOSHI KANEHIRO)  
独立行政法人国立病院機構  
村山医療センター (臨床研究センター)・  
整形外科・医員  
研究者番号 : 80365303

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :