

## 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 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791757

研究課題名（和文）細胞死抑制ペプチド添加人工コラーゲンによる脊髄再生への試み

研究課題名（英文）The research for repair of spinal cord injury using artificial collagen cell with death inhibitory peptide

研究代表者

齊藤 福樹 (SAITO FUKUKI)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10462277

研究成果の概要（和文）：ラット脊髄損傷モデルに対し、組織欠損部へ再生の足場（スキャホールド）として人工コラーゲンを移植し観察した。組織学的には移植片と脊髄との親和性が良好であること、一部に組織への軸索の伸展が観察された。後肢運動機能評価においては優位な変化は認めなかった。

研究成果の概要（英文）： We were transplanted an artificial collagen as scaffold of regeneration to the rat spinal cord injury model. After transplantation, we observed the spinal cord using HE and immunohistochemical staining. We confirmed partial regeneration of nerve fibers and high degree of histocompatibility. Locomotion evaluated by BBB score was not recovered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：再生医学 脊髄損傷 神経再生 移植・再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

旺盛な再生能を発揮することが少ないヒトの組織再生を図る基本的な考え方として、再生を担う細胞、細胞を増殖・分化させる成長因子、細胞に再生の場を提供する足場（scaffold）の三者が一体となって初めて有効な組織再生が期待できると考えられる。我々の研究グループでは臨床応用を

目標にし、倫理的にも医学的にも問題が少ないと考えられる手法を用いて脊髄再生の治療を模索してきた。これまで、損傷部を架橋する人工材料としてアルギン酸を利用した研究、細胞移植治療として神経幹細胞・骨髄間質細胞を利用した研究等を行ってきた。以前に我々は分離・培養した幹細胞を髄液内に移植すると、脊髄損傷部に生

着・増殖することを明らかにした。ラットの脊髄損傷（離断）モデルで、ギャップにアルギン酸を移植すると軸索伸長を促進すること、また神経幹細胞を保持させて移植することにより、脊髄内に侵入・遊走した細胞は多くはアストロサイトに分化し、突起を伸長することをも確かめてきた（一部は神経細胞に分化する）。今回、我々の研究グループが創成した人工コラーゲンを用いた検討を計画した。

## 2. 研究の目的

急性損傷後の脊髄障害は、直接的外力（一次的損傷）によって生じる脊髄組織の挫傷による出血壊死と、それに引き続いて生じる二次的損傷によってもたらされる遅発性脊髄細胞死により、重症化されることが知られている。二次的障害の機序については、未だ十分に解明されていないが、マクロファージなどが放出するサイトカインによる反応は、その障害を助長する大きな因子の1つと考えられている。近年、脊髄損傷における神経細胞の変性が、抗 Fas リガンド抗体により抑制できることが報告され、谷原らはアポトーシス誘導サイトカインを特異的に抑制する低分子ペプチドを創成した。また、人工材料としてのコラーゲンに着目し、アミノ酸原料から世界で初めて3重らせん構造を有する人工コラーゲンを開発した。今回の実験では、脊髄損傷ラットに対し、細胞死（アポトーシス）抑制ペプチドを付加した人工コラーゲンを移植し、宿主細胞との相互作用などを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ラットの胸髄レベル (Th7-9) で椎弓切除を行い、約2mmの脊髄欠損モデルを作成する。それらに、蛍光タンパクで標識したラットの胎児より分離培養した神経幹細胞を細胞死抑制ペプチド添加人工コラーゲンと共に移植し観察する。移植した神経幹細胞が宿主の組織・細胞とどのような相互作用をするのか、また、幹細胞がどのような分化を示すのかを明らかにしたい。

移植した幹細胞が、損傷部位で必要とされる細胞（希突起膠細胞、星状膠細胞、ニューロンなど）に分化するかどうか。また、分化した細胞がその部位で機能するかどうかを明らかにしたい。できれば神経電気生理学的にも解析を行う。軸索輸送は horseradish

peroxidase (HRP) を用いて標識する。軸索が移植した幹細胞より分化した希突起膠細胞により髄鞘形成されるかどうか。また、分化した星状膠細胞が、中枢神経構造の回復に役立つのかわるか。分化したニューロンが宿主ニューロンとシナプスを形成するのかわかを明らかにしたい。さらに、将来的に臨床応用を考え、最適なペプチドの濃度も検討したい。

(2) 合成コラーゲンは、谷原らにより世界で初めて合成に成功したポリペプチドで、天然コラーゲンのアミノ酸配列を基にアミノ酸を化学的に重合したものであり、天然コラーゲンと同様の3重らせん構造を有している。原料となるアミノ酸は非動物由来のため、BSEやアレルギーなどの危険性がなく、天然コラーゲンに比べて無臭で熱安定性に優れ、加工性も良好といった特長を持っているので、特に安全性が重要視される医療用材料としての展開が期待されている。そのほか、様々な用途で必要とされるアミノ酸組成を選択するなど、任意の合成コラーゲンを設計することも可能である。今回は、細胞死を特異的に抑制するペプチド【腫瘍壊死因子 (TNF : Tumor Necrosis Factor) を特異的に抑制するペプチド (K. kajiwara, et al. BAA, 1699, 131-137 2004)】と組み合わせ、足場としての可能性と、できれば幹細胞とともに移植することによる効果と脊髄再生への可能性について継時的に検討することとした。

## 4. 研究成果

〈in vitro において〉

GFP (Green Fluorescent Protein) 産生遺伝子を組み込んだ Transgenic Rat (SD strain) の胎児 (胎生 16~18 日) の海馬を採取し、これを単細胞に分割する。この細胞を 4~6 日浮遊培養し、Neurosphere (神経幹細胞) を得る。得られた Neurosphere と、人工コラーゲンを共培養し顕微鏡にて観察し、形態上の変化がないことを確認した。

〈in vivo 脊髄損傷モデルの作製〉

顕微鏡下に、生後 4 週齢のラットの脊椎を椎弓切除し胸髄レベル (Th7-9) で約 2 mm の脊髄切除を行い、ギャップを作製し人工コラーゲンを移植した。しかし膀胱直腸障害に起因すると考えられる、術後 1 週間ほどで死亡する個体を認めたため、別モデルの作製を検討した。

また、過去のデータより、雌の方が、膀胱直腸障害に起因するトラブルが少ないため、雌のモデルを用いた。以上、観察上のモデルとしては完全切断モデルが宿主-移植片との境界が明瞭ではあったが作成を断念した。そのため、他の文献にて確立されていた脊髄左半切モデルにて検討を行った。

無添加人工コラーゲンを移植したラットを対照群として、細胞死抑制ペプチド添加人工コラーゲン群と移植後12週まで比較検討した。

ホルムアルデヒドにて灌流固定し、脊髄を取出し標本を作製し、凍結切片を作製した。

HE染色においては、両群とも移植片と宿主との親和性は良好であり、コラーゲン線維の間隙は宿主組織で充填されていた。また時間経過とともに移植した人工コラーゲンは消失していくことが確認された。

免疫組織学的検討においては、細胞死抑制ペプチド添加群で神経軸索の伸長を認めるものが散見されたが、有意ではなかった。移植部を横断するほどの軸索伸長は認めなかった。また、移植部周囲にはあきらかなグリオーマの形成は認めなかった。HE染色で確認された線維間を充填する組織が何であるかは同定できなかった。

両群を、BBBスコアリングシステム(Basso-Beattie-Bresnahan Locomotor 法)に基づいて運動機能の評価を定期的に行い、1~12週まで観察した。しかし結果は両群で明らかな差異は認めなかった。

今回の研究では、移植部の検証が明瞭である脊髄完全切断モデルを作製し、実験に臨んだがモデルが安定せず、時間を要してしまった。また、移植部の硬膜再建は手技的に困難であった。細胞死抑制ペプチド添加人工コラーゲンで架橋した結果、軸索伸展を認め、中枢神経再生への第1段階としての結果を得た。しかし、軸索伸展の絶対数は少なく、ペプチド濃度の調整等により更なる改善がはかれるのかもしれない。近年、influximabに代表されるTNF阻害剤の脊髄損傷に対する有効性の報告が散見されており、本研究もそれに追随する可能性が示唆される。

12週までの観察においても、運動機能の改善までには至らず、今後、今回検討できなかった幹細胞等と共に移

植を行い、さらなる機能改善を目指し検討を継続していく予定である。

## 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4件)

① Saito F, Nakatani T, Iwase M, Maeda Y, Murao Y, Suzuki Y, Fukushima M, Ide C.

Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. Restor Neurol Neurosci. 2012;30(2):127-36. 査読有

② 中谷 壽男, 岩瀬 正顕, 齊藤 福樹, 前田 裕仁, 鈴木 義久, 福島 雅典, 井出 千束

【運動器傷害における治療法の新しい試み】 脊椎 脊髄損傷の臨床研究 骨髄間質細胞の髄液内投与 整形外科(0030-5901)62巻8号 Page755-760 2011 査読無

③ Ide C, Nakai Y, Nakano N, Seo TB, Yamada Y, Endo K, Noda T, Saito F, Suzuki Y, Fukushima M, Nakatani T. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. Brain Res. 2010 May 21;1332:32-47. 査読有

④ 齊藤 福樹, 岩瀬 正顕, 中谷 壽男, 前田 裕仁, 鈴木 義久, 井出 千束 【脊髄再生基礎科学の現状と近未来の展望】 急性期脊髄損傷に対する培養自家骨髄間質細胞移植 臨床試験の経過 脊椎脊髄ジャーナル(0914-4412)23巻9号 Page829-834 2010 査読無

[学会発表] (計4件)

① 齊藤 福樹, 岩瀬 正顕, 中谷 壽男, 津田 雅庸, 前田 裕仁, 宮崎 秀行, 北元 健, 金沢 武哲, 鈴木 義久, 井出 千束, 福島 雅典 救急領域における再生医療の現況 当院における脊髄損傷に対する再生医療への取り組み 第40回日本救急医学会 2012年11月15日、京都

② 齊藤 福樹, 岩瀬 正顕, 中谷 壽男, 鈴木 義久, 井出 千束, 福島 雅典 ヒト急性期脊髄損傷に対する自家骨髄間質細胞移植 臨床試験までのみちのり 第39回日本救急医学

会 2011年10月18日、東京

③ Nakatani Toshio, Iwase Masaaki,  
Saito Fukuki, Ikedo Taichi, Omura  
Tomohisa, Tsuchiya Hiroyuki, Maeda  
Yuji, Hirakawa Akihiko, Murao  
Yoshinori, Matsumoto Kenji,  
Sakamoto Tomosaburo, Iiji Satoshi,  
Suzuki Yoshihisa, Fukushima  
Masanori, Ide Chizuka A Clinical  
trial of the administration of  
autologous incubated bone marrow  
stromal cells into cerebrospinal  
fluid in five spinal cord injury  
patients 4<sup>th</sup> Japanese-Korean  
Joint Session Program 2010年10月  
10日、東京

④ 齊藤 福樹, 岩瀬 正顕, 前田 裕  
仁, 泉野 浩生, 平川 昭彦, 村尾  
佳則, 中谷 壽男 急性期脊髄損傷  
における自家骨髄間質細胞移植 5症  
例の検討 第24回日本外傷学会  
2010年5月27日、千葉幕張

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 福樹 (SAITO FUKUKI)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10462277