

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592124

研究課題名(和文) 脊髄再生に必要な血管新生を誘導する多種細胞組み合わせ移植

研究課題名(英文) Transportation for spinal cord regeneration inducing angiogenesis

研究代表者

岩月 幸一 (Iwatsuki, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80346204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験においては、移植された嗅粘膜を集中的に再生神経軸索が通過し、ラット後肢運動機能の回復に貢献することが明らかになった。さらに移植組織中の細胞が再生神経軸索のrelay neuronとして機能することも明らかになった。またラット後肢の運動を強制的に制限することにより、腰膨大部における運動神経の喪失が起こることがわかり、リハビリテーションの重要性が科学的に明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：olfactory mucosa transplantation following spinal cord injury can support at least partial hind limb motor recovery. In this study, we identified numerous axons surrounding the transplanted cells, and penetrating the mucosa at the transplant site without marginal spinal white matter. Olfactory mucosa might therefore be a more suitable scaffold for axonal regeneration than white matter, which contains inhibiting factors for axonal regeneration in the spinal cord.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：脊髄・脊椎疾患学

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷によって脊髄に非可逆的な損傷が及ぶと、四肢の運動および知覚は障害され、これによる四肢麻痺は終生続く。損傷された中枢神経の再生については多くの試みがなされているが、実用的な回復は不可能とされてきた。また脊髄損傷に対する神経再生の基礎研究は盛んに行われているが、動物実験では神経幹細胞をはじめとし各種細胞移植が成果を上げている。しかし、神経幹細胞、胚性幹細胞、骨髄幹細胞、神経鞘細胞などの細胞療法が基礎的研究において検討されているが、3つの条件を満たし、また倫理的問題を解決し、近い将来臨床応用可能と考えられるものは皆無に等しい。神経再生にはその段階に応じた多様な因子の関与が予測され、単一の細胞やfactorのみで有効な再生は期待できないと思われる。近年幹細胞を再生に向け分化誘導させる "niche" が注目されている。幹細胞とともに "niche" を含んだ組織の移植こそが神経再生を可能にする最適な細胞、その足場となる基質、さらに必要とされる因子を持つという移植組織としての条件を満たしていると考えられる。

近年リスボンの国立Egas Moniz病院のCarlos Limaを中心とした研究チームが、世界に先駆けて人自家嗅粘膜移植による損傷脊髄の再生医療を開始しており、目覚ましい成果を挙げつつある。本法においては、人では例外的に終生活発な神経再生が繰り返される嗅粘膜を用いている。ここには神経軸索再生効果が確認されている嗅神経鞘細胞が存在し、また神経幹細胞をはじめとする各種神経再生に必要な因子の存在が確認されている。この嗅粘膜そのものを用いることによって、上記3つの条件は満たされ、また自家移植であるために倫理的問題も小さい。現在までにヨーロッパを中心に250例が施行されているが、完全下肢麻痺から立位可能となった症例の報告もなされている。しかしながら効果は限定的と言わざ

るを得ない。

本法による神経再生の効果は、動物実験でも明らかにされていなかった。まず動物実験でその効果を確認し、その効果発現機序を明らかにし、そして改良に取り組む必要がある。我々はラット脊髄完全離断モデルにおいて、嗅粘膜移植による後肢運動機能の回復を確認し、移植粘膜を超える皮質脊髄運動路の回復が部分的に見られることを報告した (Iwatsuki K. et al. Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats. Neuroreport 19 (13) :1249-1252, Aug 27, 2008)。引き続きこの嗅粘膜移植の効果発現機所を、動物実験で明らかにしていく必要がある。

すでに欧州を中心に250例が行われており有害事象もみられていないことから、我々は2006年に大阪大学医学部倫理委員会の承認を得て、2008年2月より臨床研究も開始した。両下肢完全運動麻痺の患者を歩かせるという、かつてないリハビリテーションの取り組みも含めて、本法の臨床研究も開始した。

2. 研究の目的

主たる動物実験における研究課題は、本法の効果発現機所を明らかにすること。そして本法の効果を高めるために、脊髄に見られる神経再生に対する否定的環境をいかに改善せしめるか、また移植された嗅粘膜の神経軸索再生能をいかに高めるかである。

本研究期間内に、まず動物実験において、嗅粘膜中の各種細胞の移植後の動態、放出されていると思われる各種神経栄養因子の時間的空間的同定を行う。これに基づき本法の改良を模索する。

臨床研究においては神経症状の回復の様態をリハビリとともに解析し、本移植の有効性と安全性を評価し、脊髄再生のための因子を見出す。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意

義

再生医療における移植療法を検討するにあたり、他人のまた幼若な細胞や組織を用いるのは危険である。他人のものであれば免疫反応による拒絶反応は避けられない大きな問題であり、幼若な細胞は腫瘍化の危険がある。実際中国で行われている中絶胎児嗅神経鞘細胞移植においては、多くの日本人患者もこれを受けているとされているが、有効性はなく安全性に大きな問題があると米国の研究チームから近年論文発表があった。また脊髄腫瘍が3例に発生したとの報告も届いている。患者自身からの自己移植が望まれるところであり、未分化な幹細胞等が本来の環境で分化し神経再生を促す組織が望ましい。成人の中枢神経においても幹細胞が存在し、継続的に神経再生がみられる部位があることが明らかになっている。記憶の中枢である海馬歯状回と側脳室の外側壁に存在する脳室下帯、さらに嗅球である。これらの部位には成体神経幹細胞と、その "niche" が存在していると考えられている。これら組織を自家移植すれば脊髄再生は期待するものと思われるが、臨床研究にあたりこれら組織の摘出はあまりに侵襲的であり実際的ではない。嗅球への神経投射を有する嗅粘膜は発生学的に中枢神経とその原基は同じであり、ほぼ生涯を通して神経再生がみられる極めて特異的な組織である。内視鏡的に摘出可能であるため侵襲は小さく、摘出後およそ3ヶ月で粘膜は再生する。粘膜中に神経幹細胞とされる基底細胞や、神経軸索伸長効果が確認されている嗅神経鞘細胞を含み、豊富な神経栄養因子の分泌が確認されている。

本法の臨床応用はヨーロッパを中心に現在まで250例以上が施行済みであり、術後1~3年の成績が報告されつつある。平成17年にはギリシャでも始まり、国際的研究会も平成17年9月に共同研究者がリスボンに集い、平成18年11月に公式に第1回 olfactory mucosa aut

ograft (OMA)学会がイタリアで開催され、平成20年5月にはギリシャで第2回OMA学会が開催された。本研究代表者はこれのコアメンバ - となっている。

本法は倫理面また安全面での要件をほぼ満たし、臨床研究も始まっている実際的な方法である。臨床研究、基礎研究の両輪で進めていくことで、実際的に有益で有効な研究成果と臨床実績を上げることが可能である。

3. 研究の方法

・動物実験

ラット脊髄に損傷を作成する。モデルは実際の人の脊髄損傷と同じ圧挫モデルとし、正確な再現性を持ったものとする。損傷後2週間で嗅粘膜移植を行なう。脊髄損傷部位を露出し、同種別個体のGFPラット嗅粘膜を摘出、洗浄消毒後細切しこれを脊髄圧座部に移植する。移植後8週にわたり、下肢運動機能、膀胱直腸機能などの神経学的所見を観察記録評価する。対照として神経再生の見られない呼吸粘膜を用いる。並行して、病理学的検討を行う。HE、BrdUによる増殖細胞のマーキング、免疫染色として、GFAP、Nestin、さらに特異的転写因子の同定も行う。またtracer (BDF)を用いて皮質脊髄路の構築を検証する。また経時的に各種神経栄養因子の定性、定量を行う。予定しているのは、NGF、BDNF、GDNF、CTNF、NT-3,4等である。動物実験における神経学的所見、病理学的所見について連携研究者が分析、評価する。

（臨床研究） 大阪大学医学部医学倫理委員会にて審査を受け、平成18年6月に承認を得ている。平成20年2月より臨床研究を開始している。プロトコールに沿った詳細な検討を行う。完全下肢運動麻痺患者の歩行リハビリテーションは、これまで行われていなかったものであり、トレッドミルと吊り下げ器等の購入が必要である。

基本的に年齢は40歳以下。脊髄損傷後6ヶ月以降の慢性期の患者で、両下肢完全運動麻痺の患者としている。麻酔は全身麻酔とし、前頭蓋底嗅球近傍の嗅神経を含んだ嗅粘膜いわゆる嗅部を充分消毒後、経鼻内視鏡的におお

よそ3×4cm摘出する。これを2×2mm程度に細切する。次に損傷脊髄部位の椎弓切除を行い、硬膜を切開し損傷部位を露出する。損傷部位に存在する肉芽組織を取り除き、移植床を作成する。この際特に頭尾方向において十分な移植床を形成する。ここに細切された嗅粘膜を充填する。肉芽組織摘出後のcavityが充分充滿されるまで嗅粘膜を移植し、軟膜くも膜硬膜を層々に縫合し閉創する。術後は数日以内にリハビリテーションを開始するが、1日3時間を基本とする。術前術後における、American Spinal Cord Injury Association(ASIA) score、神経学的、放射線学的、電気生理学的検討を行う。研究分担者はこれらデータの解析評価を行い、本移植の有効性と安全性を確立する。

4. 研究成果

動物実験においては、移植された嗅粘膜中を集中的に再生神経軸索が通過し、ラット後肢運動機能の回復に貢献することが明らかになった。さらに移植組織中の細胞が再生神経軸索の relay neuron として機能することも明らかになった。またラット後肢の運動を強制的に制限することにより、腰膨大部における運動神経の喪失が起こることがわかり、リハビリテーションの重要性が科学的に明らかとなった。

臨床研究においては、6例の移植後半年で3例の下肢から随意性の筋電図の導出に成功し、うち1例からは motor evoked potential の導出に成功し、これは慢性期脊髄損傷の患者において、世界で初めて神経軸索の連続性の回復を電気生理学的に証明し得たものである。

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13件)

(1) Ohnishi Y, Iwatsuki K, Shinzawa , Nakai Y, Ishihara M, Yoshimine T; Disuse muscle atrophy exacerbates motor neuronal degeneration caudal to the site of spinal cord injury. Neuroreport 15;23(3): 157-61, 2012

(2) Koichi Iwatsuki et al.
Transplantation of olfactory mucosa as a scaffold for axonal regeneration following

spinal cord contusion in rats.
Neuroscience & Medicine,2013,4, p112-116

(3) Koichi Iwatsuki, Toshiki Yoshimine, Yoshiyuki Sankai, Fumihiro Tajima, Masao Umegaki, Yu-Ichiro Ohnishi, Masahiro Ishihara, Koshi Ninomiya, Takashi Moriwaki
Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia
J. Biomedical Science and Engineering, 2013, 6, p908-916

(4) Yu-ichiro Ohnishi, Koichi Iwatsuki, Koshi Ninomiya, Takashi Moriwaki, Toshiki Yoshimine. Adult Olfactory Sphere Cells are a Source of Oligodendrocyte and Schwann Cell Progenitors Stem Cell Research in Press

(5) Primary olfactory mucosal cells promote axonal outgrowth in a three-dimensional assay" by Ishihara, Masahiro; Mochizuki-Oda, Noriko; Iwatsuki, Koichi; Kishima, Haruhiko; Ohnishi, Yu-ichiro; Moriwaki, Takashi; Umegaki, Masao; Yoshimine, Toshiki Journal of Neuroscience Research in press

(6) 岩月幸一：脊髄損傷に対する再生療法の展望。脳神経外科ジャーナル vol.20, No.8, p580-584, 2012

(7) 岩月幸一、吉峰俊樹、梅垣昌士、大西諭一郎、森脇 崇：慢性期脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植法。Bone Joint Nerve vol.1, No.3, p569-576 2012

(8) 岩月幸一：総説 Clinical

Neuroscience 2012 Vol.30 10 p1111-1114
嗅粘膜による脊髄再生

(9) 岩月幸一：自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療．日整会誌 (J.Jpn. Orthop. Assoc.) 86:897-902, 2012

(11) 吉峰俊樹、岩月幸一、田島文博：ニューロサイエンスの最新情報 脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植法 Clinical Neuroscience 2013 vol. 31,2

(12) 岩月幸一；自家嗅粘膜移植による脊髄再生医療 脳神経外科ジャーナル vol.22 No.6 June 2013 p452-458

(13) 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇；嗅粘膜移植による脊髄神経再生治療 Peripheral Nerve 24(2),2013

(14) 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇；嗅粘膜移植による脊髄再生医療 Anesthesia 21 century, vol 15, No.3-47, 2013

〔学会発表〕(計 16 件)

1) IANR international Association of Neurorestoratology 6 2013, March 4-7 Bucharest Romania

Complete paraplegia patient in chronic spinal cord injury with involuntary muscle spasm expressed motor evoked potential after olfactory mucosa autograft
Osaka University Medical School
Department of Neurosurgery
Koichi Iwatsuki PhD, MD

2) 第 54 回日本神経学会学術大会 東京国際フォーラム 2013 5/29-6/1 シンポジウム 神経再生医療とリハビリテーション

自家嗅粘膜移植による損傷脊髄機能再生法
岩月幸一

3) 第 28 回日本脊髄外科学会 2013 6/6-7 名古屋国際会議場

学術委員会企画シンポジウム 脊髄損傷の再生医療：自家嗅粘膜移植による損傷脊髄機能再生法 大阪大学脳神経外科 岩月幸一

4) 第 28 回日本脊髄外科学会 2013 6/6-7 名古屋国際会議場

学術委員会企画シンポジウム オルファクトリースフィア細胞による中枢・末梢神経損傷治療の検討 大西諭一郎、岩月幸一、新沢康英、二宮貢士、森脇 崇、貴島晴彦、吉峰俊樹

大阪大学脳神経外科、大阪大学医学部遺伝子学

5) 第 28 回日本脊髄外科学会 2013 6/6-7 名古屋国際会議場

学術委員会企画シンポジウム 嗅粘膜移植による脊髄軸索再建の WGA を用いた検討 森脇 崇、岩月幸一、大西諭一郎、二宮貢士、貴島晴彦、梅垣昌士、石原正浩、吉峰俊樹
大阪大学脳神経外科、大阪脳神経外科病院、大阪労災病院

6) 第 24 回日本末梢神経学会学術集会 2013 年 8 月 23 日 新潟

特別企画プログラム

パネル discussion

嗅粘膜移植による脊髄神経再生治療 大阪大学脳神経外科 岩月幸一

7) 15th World congress of neurosurgery, Seoul, Korea

2013 Sep 8-13

Breakfast session Involuntary muscles spasm expressed as motor evoked potential

after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia
Koichi Iwatsuki et al.

8) BIT's 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem cells 2013
Oct 12-14 Dalian, China (oral)
Koichi Iwatsuki Involuntary Muscles Spasm Expressed as Motor Evoked Potential after Olfactory Mucosa Autograft in Patients with Chronic Spinal Cord Injury and Complete Paraplegia

9) 第 72 回日本脳神経外科学会総会 横浜
2013 年 10 月 16 日～19 日
脊髄損傷慢性期に対する自家嗅粘膜移植術
大阪大学脳神経外科 岩月幸一等

10) 第 72 回日本脳神経外科学会総会 横浜
2013 年 10 月 16 日～19 日
脊髄損傷ラットに対する嗅粘膜移植における移植片由来 interneuron の軸索再建への関与
大阪大学脳神経外科 森脇 崇、岩月幸一等

11) 第 48 回日本脊髄障害医学会 2013 年 11 月 14-15 日 アクロス福岡
慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜移植法 (シンポジウム)
大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

12) 第 48 回日本脊髄障害医学会 2013 年 11 月 14-15 日 アクロス福岡
慢性期完全脊髄損傷に対する嗅粘膜移植法 (一般口演)
大阪大学脳神経外科 岩月幸一、吉峰俊樹、大西諭一郎、二宮貢士、森脇 崇

13) TRI 10 周年記念シンポジウム 脊髄損傷に対する革新的治療法開発の現状と展望
2014 年 1 月 19 日 東京 JA 共済ビル 嗅粘膜移植による脊髄神経再生治療 岩月幸一

14) 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3/4-6 京都国際会議場
嗅粘膜ラットを用いた移植組織由来 trans-synaptic neurons の存在の検討
大阪大学脳神経外科 森脇 崇、岩月幸一他

15) 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3/4-6 京都国際会議場
オルファクトリースフィア細胞による中枢末梢神経損傷治療の検討
大阪大学脳神経外科 大西諭一郎、岩月幸一他

16) 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3/4-6 京都国際会議場
慢性期脊髄損傷に対する自家嗅粘膜移植
大阪大学脳神経外科 岩月幸一他

〔図書〕(計 1 件)

梅垣昌士、岩月幸一、吉峰俊樹：先進医療 NAVIGATOR 編集 先進医療フォーラム 第 2 章 先進医療治療の実際 監修 奥村 康、中島正治、大坪 修、発行人 渡部新太郎発行 2013 年 2 月 1 日 発行所 日本医学出版 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩月 幸一 (Koichi, Iwatsuki)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80346204

(2) 研究分担者

吉峰 俊樹 (Toshiki, Yoshimine)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00201046