

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592165

研究課題名(和文) 磁気ターゲティングを利用した脊椎再建材料による脊髄再生

研究課題名(英文) Therapeutic effects for spinal cord injury with magnetic targeting of cell transplantation.

研究代表者

田中 信弘 (Tanaka, Nobuhiro)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：20363062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は磁気ターゲティングを利用した脊髄損傷に対する新たな治療方法を開発することを目的とした。本研究期間中に実施した研究の成果として、神経幹細胞・磁気ビーズ複合体および骨髄間葉系細胞・磁気ビーズ複合体の樹立、ならびに脊髄損傷モデル作成および骨髄間葉系細胞・磁気ビーズ複合体の投与を行った。脊髄損傷再生を図る研究として、第7胸椎椎弓切除後、ラット脊髄損傷モデルを作成、磁石または無着磁金属を脊髄背側筋肉内に留置し、損傷翌日に骨髄間葉系細胞・磁気ビーズ複合体を脳脊髄液内に投与した。磁石によるターゲティングを行うことで、脊髄背側に細胞が有意に多く集積し、後肢運動機能評価では有意な改善が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the therapeutic effects with magnetic targeting of cell transplantation for spinal cord injury (SCI). Previously, we reported the development of a new cell delivery system using magnetic targeting. In the current study, contusion SCI was induced by placing a 25 g rod onto the spinal cord for 90 seconds in adult SD rats. A neodymium magnet was placed in the paravertebral muscles at the T7 level in the magnet group, whereas a nonmagnet metal was placed at the same spinal cord level in the nonmagnet group. Magnetically labeled bone marrow stromal cells (BMSCs) were injected into the subarachnoid space in both group. Hindlimb motor function of the magnet group demonstrated significant improvement compared with that of the nonmagnet group. This cell delivery system may be a useful method for future clinical application in the treatment of SCI.

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：脊髄損傷 神経幹細胞 脊髄再生 磁気ターゲティング

1. 研究開始当初の背景

再生医療は、本来生体が有する再生力を増強させるだけでなく、積極的に幹細胞などを用いた組織・器官の再生によって、欠損臓器の補てんによる機能的回復を行うことも目標としており、臨床においても軟骨や皮膚で実用化が開始されている。また、今まで臓器移植以外に治療法がなかった心臓・肝臓・腎臓難病に対しても、幹細胞移植による再生医療の研究は急速に進んでいる。

近年、ヒトを含む高等霊長類の成熟脳において神経幹細胞が発見された。従来は「中枢神経組織は再生しないため、いったん損傷を受けたら修復は非常に困難である」と考えられてきたが、神経幹細胞移植による神経再生医療が期待されている。

損傷脊髄に対する細胞移植方法については、報告される実験の多くは注射針などを用いて脊髄損傷部に細胞を直接注入する局所投与が多い。しかし実際の臨床応用を念頭に置くと、すでに易損性のある損傷脊髄に対して更なる障害を与えかねない。全身的経静脈的投与あるいはくも膜下腔投与なども提唱されているが、局所投与と比較すると細胞自体の損傷部位への誘導効果に期待するのみであるため移植効率の低さは否めない。

脊髄損傷の再生には、細胞移植による作用機序の解明とともに安全で効率的な移植方法の開発も重要な課題である。我々の施設では、細胞を磁気で誘導・集積させる磁気ターゲティング法で細胞移植による効果を有効に引き出す研究を、軟骨、腫瘍などに対して行ってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、磁気ターゲティングを利用した脊髄損傷に対する新たな治療方法を開発することである。脊髄損傷モデルに磁気ビーズ複合体により磁性化した神経幹細胞を移植し、損傷部位周囲に組み込まれた磁性体を利用し、損傷部位への効率的な細胞集積を図り脊髄再生を目指した。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞・磁気ビーズ複合体の樹立

胎生14日の green fluorescent protein transgenic Sprague-Dawley rat (GFP ラット) より海馬組織を採取し、機械的に細片化した後、bFGF を含んだ培養液 (DMEM/F12, N2 supplement, bFGF) 中で約2週間浮遊培養する。形成された緑色の自家蛍光を発する細胞集塊 (neurosphere) を神経幹細胞として使用する。続いて磁気ビーズ (フェリスフェア 100[®]) を活性化させ RGDS ペプチドを癒合させ標識し神経幹細胞・磁気ビーズ複合体を作成した (図1)。

(2) 脊髄損傷作成および神経幹細胞・磁気ビーズ複合体の投与

成体ヌードラットに第7胸髄圧挫損傷を加え脊髄損傷ラットを作成した。磁石 (磁石群) または無着磁金属 (無着磁群) を脊髄背側筋肉内に留置し、損傷翌日に移植細胞 1×10^5 個を脳脊髄液内投与により移植した。

4. 研究成果

(1) 神経幹細胞・磁気ビーズ複合体の樹立
胎生14日の GFP ラット海馬組織より採取し、約2週間浮遊培養し細胞集塊 (neurosphere) を作成し神経幹細胞として使用した。磁気ビーズ (フェリスフェア 100[®]) を活性化させ RGDS ペプチドを癒合させ標識し、神経幹細胞・磁気ビーズ複合体を作成した。また同様に磁気ビーズにより標識した骨髄間葉系細胞・磁気ビーズ複合体も作成した。

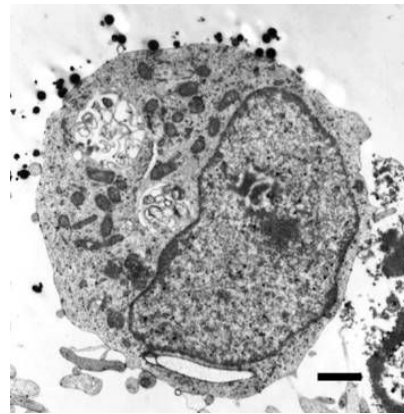


図1：神経幹細胞・磁気ビーズ複合体

(2) 脊髄損傷モデルの脊髄運動機能評価

脊髄損傷再生を図る研究として、ラット脊髄損傷モデルを用いて骨髄間葉系細胞・磁気ビーズ複合体を投与した。

第7胸椎椎弓切除後、Wu らの方法に準じ脊髄損傷を作成、磁石または無着磁金属を脊髄背側筋肉内に留置した (図2、3)。



図2：SD ラット (平均 350g) を用いて、第7胸椎椎弓切除を行った。

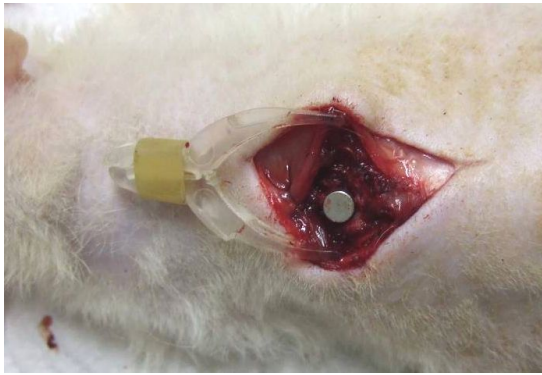


図 3：25g 重錘を用いて脊髄損傷モデルを作成し、磁石，無着磁金属を脊髄背側に留置した。

損傷翌日に磁性化した細胞 1×10^5 個を脳脊髄液内に投与した。磁場を用いることにより脊髄損傷部位に細胞を集積させることを示した。磁石によるターゲティングを行うことで、脊髄背側に移植細胞が有意に多く集積した(図 4、5)。

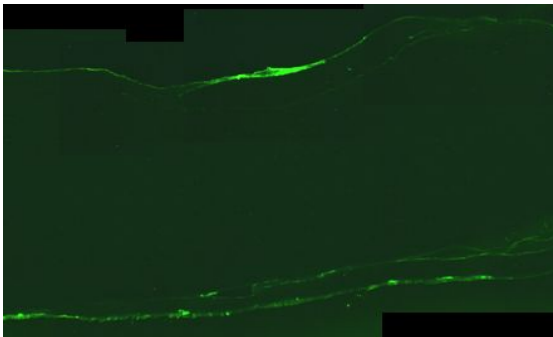


図 4：蛍光顕微鏡所見 (× 40)。

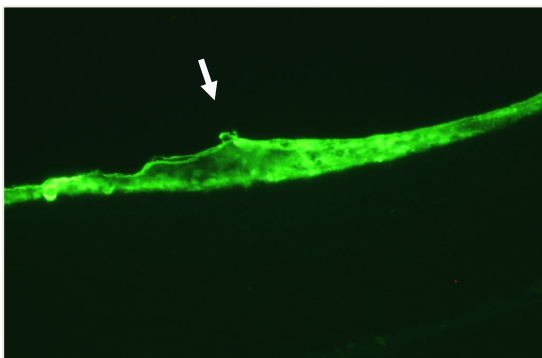


図 5：蛍光顕微鏡所見 (× 100)。
脊髄背側(矢印)に細胞の集積を認めた。

後肢運動機能評価では有意な改善が得られた(図 6)。本研究では、磁場を用いることにより脊髄損傷部位に移植細胞を集積させることが示され、磁気ターゲティングは、移植細胞を任意の場所に、高密度に集積させ、

より高い治療効果が期待できる新しいセルデリバリーシステムとなりうると考えられた。

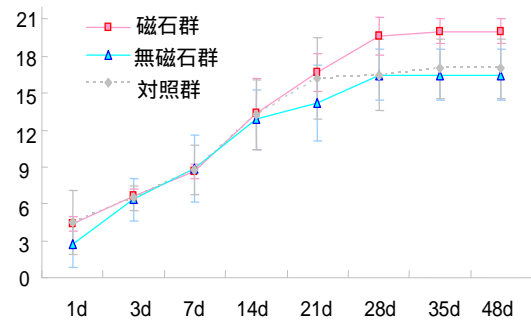


図 6：後肢運動機能評価 (BBB スコア) 磁石群においては、無磁石群、対照群に比べ、28 日、35 日、48 日において後肢運動機能の有意な回復が認められた。

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 2 件)

Fujioka Y, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Nakamae T, Izumi B, Ohta R, Ochi M: Magnetic Field-based Delivery of Human CD133 Positive Cells Promotes Functional Recovery Following Rat Spinal Cord Injury. *Spine*, 査読有, 37(13), 2012, E768-77.

DOI: 10.1097/BRS.0b013e318246d59c.

Sasaki H, Tanaka N, Nakanishi K, Nishida K, Hamasaki T, Yamada K, Ochi M: Therapeutic effects with magnetic targeting of bone marrow stromal cells in a rat spinal cord injury model. *Spine*, 査読有, 36(12), 2011933-8.

DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181eb9fb0.

[学会発表](計 2 件)

藤岡悠樹, 田中信弘, 中西一義, 亀井直輔, 中前稔生, 泉文一郎, 大田亮, 越智光夫: 脊髄損傷に対するヒト末梢血由来 CD133 陽性細胞移植と外磁場デリバリーの効果. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 前橋市 2011 年 10 月 20-21 日

Fujioka Y, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Nakamae T, Izumi B, Ohta R, Ochi M: Magnetic delivery system of human CD133+ cells promote functional recovery in the rat spinal cord injury. Cervical Spine Research Society, Asia Pacific Section, Busan, Korea, April 28- 30, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 信弘 (TANAKA NOBUHIRO)
広島大学・病院・助教
研究者番号：20363062

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号：70177244

中西 一義 (NAKANISHI KAZUYOSHI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：60403557

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：70444685

中前 稔生 (NAKAMAE TOSHIO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
寄附講座助教
研究者番号：40595758