

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23791647
研究課題名（和文）	コラーゲンフィラメント補填を用いた脊髄機能再建
研究課題名（英文）	Reconstruction of spinal cord function using collagen filaments
研究代表者	
鈴木 秀典（SUZUKI HIDENORI）	
山口大学・大学院医学系研究科・助教	
研究者番号：	30393432

研究成果の概要（和文）：

Monkeyを用いた脊髄損傷モデル作成のための、全身麻酔や術後管理手法、モデル作成方法など多くの基礎的な知見を得た。また Allodynia について、Rat&Mouse を用いて、適切な評価スケールを作成し、客観的なスケールを用いて神経障害性疼痛を示すことに成功した。CFを用いた移植治療では、急性期においてはげっ歯類同様に良好な軸索の再生が確認された。短期評価のため、下肢運動機能の回復については未確認なデータであり、今後の検討課題である。

研究成果の概要（英文）：

We obtained a lot of basic knowledge of the methods of anesthesia and management after surgery, and how to make the monkey's SCI model. And on allodynia we made good scale using rat and mouse SCI models. In addition we succeeded to show the degree of allodynia using our new scale objectively. On CF transplantation to monkey SCI model, the results of tissue analysis were excellent and we confirmed that regenerated axons went through into the Collagen Filaments same as rat models in acute phase. But this is only analysis in a short term, so we have little data about motor functional recovery. This is the next theme and task for us.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：脊椎脊髄病、神経再生医学

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、scaffold、allodynia

1. 研究開始当初の背景

重度脊髄損傷患者の機能予後は極めて不良である。患者の精神的な苦しみはもとより、社会的・経済的損失も甚大である。しかし臨床現場において、十分な機能回復を可能にする治療法は未だにない。しかし近年、幹細胞移植や神経栄養因子の補充により、脊髄再生が可能であるとの報告があいつぎ、げっ歯類での再生治療効果はほぼ確立された段階にある。急性期から亜急性期の脊髄損傷に対す

る治療効果が新規再生医療の応用で得られることはすでに周知の事実である。

(Exp. Clin. Transplant 7(4):241-48. 2009, Yoon SH. Stem Cell 25(8):2066-73. 2007, Lima C. J spinal cord Med 29(3):191-203. 2006)。

これらの結果を踏まえて、すでに各国で脊髄再生治療に関する臨床治験が急速に進んでいる。我々もこれまで、細胞移植や scaffold 移植による脊髄再生治療の可能性を模索し、

ある一定の成果を報告してきた。(Suzuki et al., Med Mol Morphol in press. 2010, Med Mol Morphol. 42;322(3):150-4. 2009, 整形外科 60(5):450. 2009, 医学と薬学 59(1):45-51. 2008, BBRC 24;322(3):918-22. 2004. Cytometry Research 15(2):27-35. 2005.)。

損傷脊髄組織では、挫滅部位への新生軸索の進入は非常に困難である。軸索をガイドする足場となる細胞外器質の構造破綻によることが大きい。その一方で、単純な鋭利切断面を作成してやり、scaffold 移植などを行ってやると新生軸索は切断部を良く超えて伸びることが知られている。(Neuroscience 126:365-74. 2004)。

我々はこれらの現象を踏まえて、これまでコラーゲンフィラメント (CF) 補填による脊髄再生研究をすすめてきた。少なくともこれまでの研究成果より、ラットでは以下の脊髄再生が確実に生じることがわかった。

(J Tissue Eng Regen Med 3:19-25. 2009, J Neurosci Methods 178:308-15. 2009, Med Mol Morphol 42:322(3):150-154. 2009, J Biomed Mater Res A 70(4):569-75. 2004, Neurol Res 26(2):145-50. 2004, Spine:28(20):2346-51. 2003)。

すでにマウス、ラットからウサギでの治療効果の確認が終了し、動物実験段階としての最終型である、霊長類:サル(マーモセット)脊髄損傷に対するCF補填療法の治療を計画した。

2. 研究の目的

ヒト脊髄損傷治療に関して、我が国の基礎研究レベルは非常に高い水準にあるにもかかわらず、その臨床治験の進歩は世界に大きく遅れをとっているのが現状である。

本研究の目的は、ヒト脊髄損傷患者への臨床治験を開始する前段階として、コラーゲンフィラメント(以下、CF)移植療法により、十分な脊髄機能の回復と安全性が期待できるのかどうかについて、動物実験レベルでの最終段階にあるサル(マーモセット)を用いて検証することである。

具体的には以下の項目である。

- (1)サル(マーモセット等)において、損傷脊髄-CF置換モデルを確立させる。
- (2)損傷脊髄部のCF部分置換を行うことで、ほ乳動物においても軸索再生やCF内の神経組織が生じるのかについて明らかにする。
- (3)CF部分置換にて脳と四肢をつなぐ索路(錐体路、錐体外路)の再建が霊長類脊髄でも可能かどうかについて明らかにする。
- (4)行動学的に四肢運動機能、感覚機能の回復がどの程度生じるのかについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1)脊髄損傷モデルの作成と移植

(2)評価

①. 運動・感覚機能評価

従来の運動機能評価スケールには哺乳類を評価可能な適切なスケールが存在しないため、ASIA scale, BBB scaleなどを組み合わせた評価スケールを作成する。また、感覚機能評価についても同様に評価方法そのものが確立していないため、評価する項目とともに新たな評価スケールを作成した上で、経時的な評価を行う。

②. 電気生理学的評価

運動機能、感覚機能評価の結果を踏まえ、MEPs, SEPsによる運動・感覚機能に関する電気生理学的な客観的な評価を行う。

ただし、これまで哺乳類での電気生理学的な評価法に関する基礎的なデータや条件を示した報告はなく、これについても基礎的なデータ収集から開始する。

③. 神経再生の組織学的評価

HE染色やLFB染色と併せて、各種免疫組織学的評価を行う。NeuN、 β -TubulinIII、MAP2ab、GFAP、O4、Gal-C、TrkA(宿主細胞の動態、グリア痕)、synaptophysin(シナプス形成)、GAP43、NF-M(軸索伸展)、ED1、OX42(免疫系細胞浸潤)、CD34、CD45、VEGF(血管新生)を用いる。

また、移植後のCFの吸収とその周囲での異物反応や炎症所見についても組織学的に評価を行う。

評価を行うタンパクについてはこれまでのラットやマウスでのものと同様なものを考えているが、霊長類では市販されていない抗体が多数存在するため、各抗体に個体については、個々に作成する必要がある。

④. トレーシング評価

Rhodamin B Dextran や Fluoro-Gold を腰膨大部片側灰白質内に $0.5\mu\text{l}$ 注入を行い、逆行性トレーシングを行う。赤核レベルでの評価とし、定量的な再生軸索数の評価を行う。また scaffold での再生軸索の進入時期や数の経時変化を評価する。併せて、順行性トレーサーとして、BDA を赤核に注入し、中枢側脊髄-CF-末梢側脊髄各部位での再生軸索のカウントを行い、定量的に再生量を把握する。

手法そのものは従来通りのものであるが、これまで報告のほとんどない霊長類での研

究であるため、評価法から実験器具にいたるまで、すべてを新たに検討しなおしながらの研究遂行となる。

最終的に、安全性の確認、行動学的・神経生理学的な回復、組織学的な再生が生じていることを確認する。

4. 研究成果

霊長類での適切な胸髄損傷モデルは存在しないため、まずはコモンマーモセット、アカゲザルを用いた脊髄損傷モデル作成のために、最適な麻酔条件、IH impactor を用いた中等度胸髄損傷モデル、術後管理の条件についての詳細な条件設定を確認した。また従来の IH impactor を用いての脊髄損傷モデルの作成は、実験の動物の大型化がすすむと使用が困難であり、バルーンを用いた脊髄損傷モデルの作成やクリップモデルの確立を同時にすすめた。また、BBB score と ASIA scale を改良した下肢運動スケールを作成し、ほ乳類における脊髄損傷後の運動機能評価法について検討した。脊髄損傷後のアロデニアについての適切な評価法が確立していないため、ラット・マウスを用いて、von Frey test, Thermal test の正常、損傷群での基礎データの収集を行った。マウスにおいては、anti IL6 receptor 抗体を用いた胸髄損傷治療後のアロデニアに対する治療効果を、上記データをもとに解析し、発表した。私たちの評価法にて、異常疼痛が治療により軽減され、いわゆる脊髄損傷後のアロデニアが改善していることを、客観的なスケールを用いて表すことに成功した。コラーゲンフィラメントを用いた胸髄損傷アカゲザルに対する移植治療に関しては、現時点では術後の長期生存が困難なため、移植後の短期間での組織評価にとどまったが、急性期においてはげっ歯類同様に良好な軸索の再生が確認された。短期評価のため、下肢運動機能の回復については未確認なデータである。大型動物における電気生理学的な評価においても、正常・損傷群での preliminary data と手技を確立した。

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3件)

- ① 鈴木秀典、田口敏彦
整形外科領域の疼痛治療
Brain Medical 24 巻 37-44, 2012 査読無
- ② 鈴木秀典、田口敏彦
疼痛治療の実際 腰痛・坐骨神経痛
臨床と研究 89 巻 174-180 2012 査読無
- ③ Hidenori Suzuki (1 番目), Toshihiko

Taguchi, Yoshihiko Kato, et al. (他6名)

Transplantation of neurospheres derived from bone marrow stromal cells promotes neurological recovery in rats with spinal cord injury.

Medical molecular morphology 44(3): 131-138, 2011 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 鈴木秀典
脊髄損傷ラットに対する_感覚機能評価スケールの検討
第135回山口県整形外科医会
2012年12月01日
千秋楽(山口)
- ② 村上智俊、鈴木秀典
マウス脊髄圧挫損傷モデルにおける炎症性サイトカイン発現変化の検討
第124回西日本整形・災害外科学会
2012年11月17日
別府コンベンションセンター(大分)
- ③ 村上智俊、鈴木秀典
マウス脊髄圧挫損傷モデルに対する抗IL-6受容体抗体の治療効果
第27回日本整形外科学会基礎学術集会
2012年10月26日
名古屋国際会議場(名古屋)
- ④ 鈴木秀典
脊髄損傷ラットに対する感覚機能評価スケールの検討
第27回日本整形外科学会基礎学術集会
2012年10月26日
名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑤ Hidenori Suzuki
Central Pain Syndrome after the operation of the Cervical Spondylotic Myelopathy
Society for Neuroscience 2012
2012年10月13日~2012年10月17日
New Orleans, USA
- ⑥ Murakami Tomotoshi, Hidenori Suzuki
A neuroprotective role of anti-interleukin-6(IL-6) receptor antibody following spinal cord injury (SCI) in mice
Society for Neuroscience 2012
2012年10月13日~2012年10月17日
New Orleans, USA
- ⑦ Hidenori Suzuki
Combination therapy for rats with

spinal cord injury -Collagen filaments
as a scaffold and NT-3-
International Spinal Cord Society 2012
2012年09月03日～2012年09月05日
London, UK

- ⑧ Hidenori Suzuki
Central Pain Syndrome after the
operation of the Cervical Spondylotic
Spine Across the Sea 2012
2012年07月29日～2012年08月02日
Kauai, USA
- ⑨ 鈴木秀典
コラーゲンフィラメントの脊髄再生への
応用
第85回日本整形外科学会総会
2012年05月18日
京都国際会議場（京都）
- ⑩ 鈴木秀典
頸髄症術後患者における神経障害性疼痛
第41回日本脊椎脊髄病学会
2012年04月20日
石橋文化センター（久留米）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI HIDENORI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30393432