

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592188

研究課題名(和文)慢性期損傷脊髄への細胞移植治療の確立とリハビリテーションの併用効果

研究課題名(英文) Establishment of a combination therapy with cell transplantation and rehabilitation at chronic phase after spinal cord injury

研究代表者

榎本 光裕 (Enomoto, Mitsuhiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90451971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラットを用いた脊髄損傷モデルの作製行い、細胞移植治療の確立とリハビリテーションの併用効果を解析した。脊髄損傷慢性期からトレッドミルあるいは水泳を行わせると4週後には後肢機能の改善が得られ、神経栄養因子とシナプス形成の増強が得られた。また、慢性期に培養骨髄間葉系細胞と人工担体を組み合わせて移植した場合、手術侵襲に伴う一過性の運動機能低下があったものの細胞治療の併用が機能回復に有効であった。細胞移植によって上位からのシグナル増加が期待できる研究成果であった。

研究成果の概要(英文)：We believe that a combination therapy with cell transplantation and rehabilitation is best because the cells can work directly to repair the injured environment and the rehabilitation can activate neural plasticity. The rehabilitative effects of treadmill running (TM) and swimming (SW) during the chronic phase in rats with a SCI were evaluated. Six weeks after the contusion injury at the thoracic level, the TM group showed improved hind limb coordination, and gait length in the TM group was longer than that of the control group. In both TM and SW group, the mRNA levels of NT-3 and PSD95 were increased compared to the control group. Even long after a SCI, the spinal cord has a high capacity for neural plasticity. However, behavioral recovery was not sufficient after BMSC transplantation with scaffold at six weeks after SCI. The further tissue damage occurred by the direct implantation. Further analysis is needed to obtain successful recovery at the chronic phase after SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 細胞移植 人工担体 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

脊髄は、脳と比較して白質が外側に位置し非常に軽微な外傷によって伝導路の障害を引き起こす。交通事故や転落などによる外傷性脊髄損傷は、脊髄の挫滅をきたし上行・下行伝導路の障害を起こすようになる。最近では、高齢化社会となって頸髄症患者が増加し、軽微な外傷で四肢麻痺を呈するような患者も増えており、脊髄損傷に対する積極的な治療が望まれている。最近では、脊髄損傷に対する基礎研究が発展し、様々な細胞種を利用した細胞移植の有効性が報告されている (A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. J Neurotrauma. 2011)。

海外では、臨床応用も行われ脊髄損傷に対する細胞移植療法の開発が進んでいる。我々もラット脊髄に胎児海馬あるいは脊髄由来神経幹細胞を移植してホスト脊髄内に生着し髄鞘形成に必要なオリゴデンドロサイトに分化したことを報告している (M. Enomoto et al., Eur J Neurosci 2003)。しかし、我が国では、胎児由来神経幹細胞や ES 細胞の利用に倫理的な制限があって移植に利用できる細胞種が少ない。臨床現場への応用には、倫理上問題の少ない自家細胞が必要になる。その中で骨髄から単離した骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) は、比較的容易な手技で培養可能で多分化能を有している。BMSC は、ヒトにも応用可能で脊髄損傷治療に有効とされている (Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Application Stem Cells. 2010)。

わが国でも関節軟骨の再建や椎間板再生、さらに一部の施設で脳梗塞治療 (札幌医大) や脊髄損傷治療 (京都大学、関西医科大学) に応用されている。よって現状で脊髄損傷に対する細胞移植療法に使用できる細胞は BMSC であって積極的に基礎研究データを重ねていく必要がある。

一方で脊髄損傷後の機能回復あるいは維持のためにはリハビリテーション (リハビリ) が重要である。近年、促進効果を用いて脳機能を回復させる方法 (Effects of intensive repetition of a new facilitation technique on motor functional recovery of the hemiplegic upper limb and hand. Brain Inj. 2010) や対麻痺患者に対して強制的に歩かせるトレッドミル歩行訓練などの積極的なリハビリ手法 (Effects of intense exercise in chronic spinal cord injury. Spinal Cord. 2008) が注目されている。ここ数年、基礎研究領域でも動物用のトレッドミル等を用いて脊髄機能回復について報告されているが、脊髄機能を回復させるためには損傷脊髄への治療とリハビリを組み合わせた複合的な治療方法の確立が重要と考えている。

2. 研究の目的

近年、神経幹細胞の発見によって神経再生

研究が進み、脊髄損傷に対する幹細胞移植治療が開発されている。しかし、治療の主体は、急性期から亜急性期までであり、脊髄損傷慢性期 (麻痺の完成後) では治療方法がないのが実際である。本研究目的は、動物実験モデルを用いて臨床応用可能な骨髄間葉系幹細胞を用いた移植治療の確立とさまざまなリハビリテーション方法を組み合わせることによって慢性期に移行した損傷脊髄の機能回復を目指すものである

3. 研究の方法

1) 脊髄損傷モデルの作製

成ラットを用いて麻酔下に胸椎椎弓切除を行い小さなクリップで脊髄を一定時間挟んで胸髄損傷を作製する。確立された損傷モデルで約 6 週間後に運動機能の回復が一定となる。

2) 運動・知覚検査

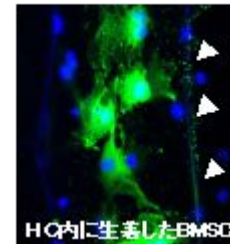
後肢運動機能評価法 (BBB スコア) を損傷後から 1 週間ごとに測定する。知覚検査は、2 週ごとに機械刺激とアセトン刺激をして足底刺激の強さと足ひっこめの時間を計測して評価を行う。リハビリ開始前と最終観察時に後肢 Foot Print を記録した。

3) 培養骨髄間葉系細胞 (BMSC) の培養と人工担体 (ハニカムコラーゲン: HC) の移植およびコンドロイチナーゼ注射

BMSC: ラット大腿骨から単離した骨髄液を培養し、1 代継代した後に GFP を導入したレンチウイルスに感染させて BMSC のラベルを行う。

HC: 脊髄損傷後 6 週で損傷脊髄に大きな空洞が形成される。空洞よりやや小さい HC を作成し配向を頭尾側に向けて成形する。

移植方法: 成形した HC 内に低下圧細胞導入法を用いて孔内に細胞を接着させる (右写真: 緑は BMSC で矢頭はポアの壁)。内壁に細胞が接着している。



HC+BMSC の移植: 顕微鏡

鏡下で空洞部分を同定して白質部分を損傷しないように切開を加えて HC+BMSC を空洞内に挿入する。

コンドロイチナーゼ (ChABC) 注射: ChABC (生化学工業: 100U/ml) を準備し損傷頭・尾側に 2 か所 (計 4 か所) ガラス管を用いて 1ul ずつ脊髄に注射する。

4) 運動療法の設定: 脊髄損傷、6 週間後から以下の運動を開始する。

・トレッドミル: ベルト式強制走行装置であり一定の運動負荷を行うことができる (Foud et al., Behav. Brain Res 2000)。

・ランニングホイールを用いた運動: 一定時間ホイール内にいれて自発運動を促す (Ying et al., Exp. Neurology 2005)。

・水泳・水中歩行訓練: 一定時間水泳および水中での歩行訓練を行う (Kuerzi et al., Exp.

Neurology 2010)。

5) 腰髄部分での神経栄養因子の発現とシナプス形成：後肢機能の獲得には、損傷部分や腰髄部分で神経栄養因子 (BDNF、NT3、GDNF) の発現変化が推測される。また、PSD95、SNAP25 といったシナプス関連タンパクの変化も運動機能再獲得に必要である。腰膨大 mRNA の発現を real-time PCR を用いて解析した。

6) 組織学的評価：最終観察時、損傷部分を含んだ脊髄切片を作製して HE 染色やミエリン染色で定量化をする。運動機能の差を見るためにシナプスマーカーを用いた免疫染色を行い定量化する。

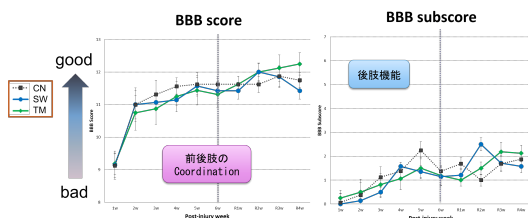
7) 腰髄部分の PSD-95 と synaptophysin の蛋白定量を Western blotting 法によって行った。

4. 研究成果

4-1. 脊髄損傷慢性期におけるリハビリテーションの効果

ラット後肢運動機能評価法 (BBB スコア・サブスコア) を胸髄損傷後から 1 週間ごとに測定すると損傷 6 週後には機能回復は一定となる。また、知覚検査も同様に回復が見られなくなる。同時期を慢性期と定義した。損傷慢性期からトレッドミル (TM) 群と水泳訓練 (SW) 群、訓練しない対照 (CN) 群の 3 群を作製して運動・知覚機能の回復を比較した。最終観察時 (4 週間) には後肢フットプリントを行い、歩幅を計測した。

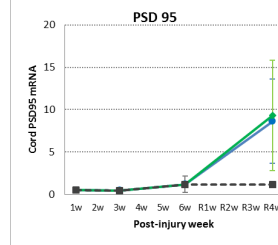
BBB スコアは、CN 群と比較し SW 群ではリハビリ開始後 2 週で改善したものの、その後低下した。一方、TM 群ではリハビリ後改善し、そのまま改善傾向を維持した (下グラフ)。



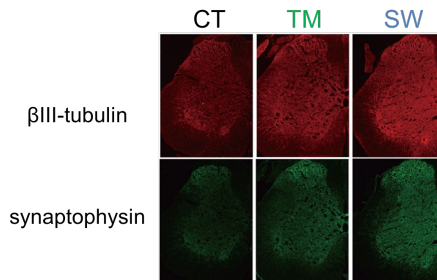
リハビリ前と 4 週後の最終観察時点での点数の改善率を計算したところ、BBB score は、CN 群 1.25%、SW 群 -0.45%、TM 群 9.53% となり、トレッドミル運動が機能回復に寄与していた。歩行時 Foot print では、非損傷群と比較して損傷群は足の外旋を呈した。CN 群、TM 群と比較し SW 群でのみ外旋角度が改善していた。

4-2 神経栄養因子とシナプス関連蛋白の発現 神経栄養因子の発現を非損傷ラット腰髄との mRNA 発現量と比較した。BDNF は TM 群では変化がなく SW 群で減少した。一方、NT3 は SW 群と TM 群において発現の増加が認められた。

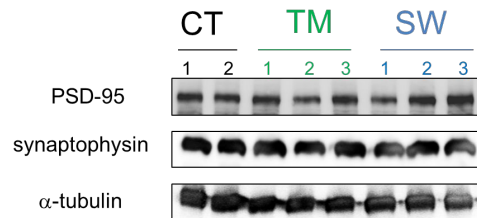
シナプス関連蛋白の発現は、非損傷ラットと比較して、SNAP25 と SIP30 はリハビリによる変化は認められなかったが、PSD95 は SW 群と TM 群において増加が見られた (グラフ)。



組織学的解析では、シナプス前蛋白である Synaptophysin は CN 群と比較して TM・SW 群での変化は見られなかった (下写真)。



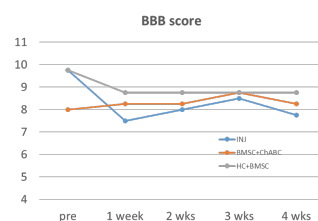
PSD-95 と synaptophysin の蛋白定量を Western blotting 法によって行った。腰膨大での PSD-95 は、SW 群と TM 群で増加傾向であった (下写真)。



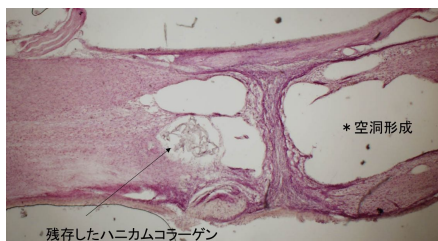
これら結果から脊髄損傷により低下した上位からのシグナル伝達は、後肢運動によって変化はおこらないが、筋の強制刺激により末梢からのシグナル伝達を増加させることで、脊髄シナプスの成熟や可塑性変化がおきた可能性が示唆された。よって脊髄損傷慢性期であってもリハビリテーションが機能改善に寄与しているものと考えられる。

4-3 培養骨髄間葉系細胞 (BMSC) と人工担体 (HC) を組み合わせた移植治療

ラット脊髄圧挫損傷モデルの作製を行い、損傷 6 週間後に培養骨髄間葉系細胞 (BMSC) と人工担体 (ハニカムコラーゲン: HC) を組み合わせて移植した HC+BMSC 群、BMSC と脊髄癒痕を除去するコンドロイチナーゼ (ChABC) を併用して移植した BMSC+ChABC 群を作製し、培養液のみを注射する対照 (INJ) 群を作製して運動機能の変化を比較した。移植 1 週目では、どの群も運動機能がわずかに低下し、対照群では低下したままであった。一方、BMSC を移植した 2 群では徐々に回復したものの協調運動が得られるまでの回復は見られなかった (グラフ)。



組織学的に観察すると移植周囲での空洞形成が大きかった(写真)。顕微鏡下に損傷脊髄



内に HC 移植を行っているが宿主脊髄への侵襲が強かったためと推測された。

BMSC+ChABC 群でも空洞形成が残存していたことから慢性期ではChABCを併用してもBMSCの生着率が低く機能回復の役割が少ないと推測された。しかし、細胞移植によって上位からのシグナル増加が期待できる研究成果であって、慢性期損傷脊髄に対する細胞移植およびリハビリテーションの有効性に重要な知見と考えている。

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14件)

Enomoto M. The future of bone marrow stromal cell transplantation for the treatment of spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015 Mar;10(3):383-4. 査読有

Ukegawa M, Bhatt K, Hirai T, Kaburagi H, Sotome S, Wakabayashi Y, Ichinose S, Shinomiya K, Okawa A, Enomoto M. Bone marrow stromal cells combined with a honeycomb collagen sponge facilitate neurite elongation in vitro and neural restoration in the hemisectioned rat spinal cord. *Cell Transplant.* 2014 査読有

Hirai T, Enomoto M, Kaburagi H, Sotome S, Yoshida-Tanaka K, Ukegawa M, Kuwahara H, Yamamoto M, Tajiri M, Miyata H, Hirai Y, Tominaga M, Shinomiya K, Mizusawa H, Okawa A, Yokota T. Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury. *Mol Ther.* 2014 Feb;22(2):409-19. 査読有

Arai Y, Hirai T, Yoshii T, Sakai K, Kato T, Enomoto M, Matsumoto R, Yamada T, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. A prospective comparative study of 2 minimally invasive decompression procedures for lumbar spinal canal stenosis: unilateral laminotomy for bilateral decompression (ULBD) versus muscle-preserving interlaminar

decompression (MILD). *Spine (Phila Pa 1976).* 2014 査読有

Yoshii T, Yamada T, Hirai T, Taniyama T, Kato T, Enomoto M, Inose H, Sumiya S, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. Dynamic changes in spinal cord compression by cervical ossification of the posterior longitudinal ligament evaluated by kinematic computed tomography myelography. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014 査読有

Ukegawa D, Kawabata S, Sakaki K, Ishii S, Tomizawa S, Inose H, Yoshii T, Kato T, Enomoto M, Okawa A. Efficacy of biphasic transcranial electric stimulation in intraoperative motor evoked potential monitoring for cervical compression myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014 査読有

Enomoto M, Bunge MB, Tsoulfas P. A multifunctional neurotrophin with reduced affinity to p75NTR enhances transplanted Schwann cell survival and axon growth after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2013 査読有

Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature.* 2013 査読有

Yoshii T, Yuasa M, Sotome S, Yamada T, Sakaki K, Hirai T, Taniyama T, Inose H, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A. Porous/dense composite hydroxyapatite for anterior cervical discectomy and fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013 査読有

Taniyama T, Hirai T, Yamada T, Yuasa M, Enomoto M, Yoshii T, Kato T, Kawabata S, Inose H, Okawa A. Modified K-line in magnetic resonance imaging predicts insufficient decompression of cervical laminoplasty. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013 査読有

Enomoto M, Ukegawa D, Sakaki K, Tomizawa S, Arai Y, Kawabata S, Kato T, Yoshii T, Shinomiya K, Okawa A. Increase in paravertebral muscle activity in lumbar kyphosis patients by surface electromyography compared with lumbar spinal canal stenosis patients and healthy volunteers. *J Spinal Disord Tech.* 2012 Aug;25(6):E167-73.] 査読有

Hirai T, Enomoto M, Machida A, Yamamoto M, Kuwahara H, Tajiri M,

Hirai Y, Sotome S, Mizusawa H, Shinomiya K, Okawa A, Yokota T. Intrathecal shRNA-AAV9 inhibits target protein expression in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult mice. Hum Gene Ther Methods. 2012 Apr;23(2):119-27. 査読有
榎本 光裕 整形トピックス ハニカム コラーゲンスポンジと細胞移植を併用した損傷脊髄の再建 整形外科 (0030-5901)64 巻 13 号 Page1382(2013.12) 査読無
請川 大, 榎本 光裕, 富澤 将司, 猪瀬 弘之, 吉井 俊貴, 加藤 剛, 川端 茂徳, 大川 淳【腰椎疾患 up-to-date】腰椎疾患に対する診断・評価の進歩 画像および機能診断 胸腰椎椎体骨折後偽関節に対する椎体形成術後の腰背筋活動 評価 表面筋電図を用いた検討 別冊 整形外科 (0287-1645)63 号 Page32-38(2013.04) 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

榎本光裕, 請川円, 鍋木秀俊, 平井高志, 柳下和慶, 大川淳, 若林良明
An EGFR inhibitor induces Schwann cell proliferation and promotes functional recovery with remyelination in injured proneal nerve after end-to-side neuroorrhaphy. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience 2014 年 10 月 19 日 Washington DC, USA
榎本光裕, 山下理子, 請川円, 鍋木秀俊, 平井高志, 柳下和慶, 大川淳
Expression patterns of glial cell-derived neurotrophic factor, vascular endothelial growth factor and their receptors after rat spinal cord injury The 43th annual meeting of the Society for Neuroscience 2013 年 11 月 12 日 サンディエゴ, USA
平井高志, 榎本光裕, 若林良明, 横田隆徳, 大川淳 Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury The 43th annual meeting of the Society for Neuroscience 2013 年 11 月 10 日 サンディエゴ, USA
請川 円, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 若林良明, 大川 淳 EGF 受容体阻害薬を用いた末梢神経再生の促進 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17-18 日 千葉市千葉
山下 理子, 榎本 光裕, 請川 円, 鍋木 秀俊, 早乙女 進一, 大川 淳 脊髄損傷慢性期における移植骨髄間葉系細胞の役割 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17-18 日 千葉

市千葉
島田皓子, 請川円, 平井高志, 堀江正樹, 柳下和慶, 大川淳, 榎本光裕 ラット脊髄損傷慢性期に対する運動療法の効果 第 27 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26~27 日 名古屋市愛知
榎本光裕, 島田皓子, 請川円 平井高志 若林良明 堀江正樹 大川淳 柳下和慶 Both treadmill exercise and swimming induce increase of neurotrophic factors and synaptic proteins at the chronic phase after spinal cord injury. The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 13 日~17 日 ニューオリンズ, USA
平井高志, 榎本光裕, 若林良明, 横田隆徳, 大川淳 Intrathecal shRNA-AAV9 inhibits target protein expression in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult mice The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 13 日~17 日 ニューオリンズ, USA
吉田寛, 平井高志, 請川円, A. Hama, 大川淳, 榎本光裕 Suppression of transient receptor potential vanilloid 1 in dorsal root ganglion mediated by small interfering RNA attenuates thermal allodynia in a mouse model of neuropathic pain The 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 13 日~17 日 ニューオリンズ, USA
請川円 平井高志 鍋木秀俊 大川淳 榎本光裕 ラット脊髄損傷慢性期におけるトレッドミル運動効果が脊髄での神経栄養因子とシナプス関連タンパクに与える影響 第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18~21 日名古屋市愛知

〔図書〕(計 2 件)

M Enomoto, M Ukegawa1, K Fukushima, K Bhatt, Y Wakabayashi, A Okawa Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord: Chapter 22. Axonal regeneration across an artificial scaffold combined with cell transplantation applied to the transected spinal cord. Springer 2014 Page269-282
M Enomoto and AT. Hama Spinal Cord Injuries: Causes, Risk Factors and Management PAIN MANAGEMENT FOLLOWING SPINAL CORD INJURY: CLINICAL AND BASIC SCIENCE PERSPECTIVES page 49-88 Nova Science Publishers, Inc 2012 Nov

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究者番号：30251507

東京医科歯科大学整形外科

<http://www.tmd.ac.jp/med/orth/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎本 光裕 (ENOMOTO MITSUHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90451971

(2)研究分担者

若林 良明 (WAKABAYASHI YOSHIAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・

講師

研究者番号：00431916

早乙女進一 (SOTOME SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・

寄付講座・准教授

研究者番号：20401391

大川 淳 (OKAWA ATSUSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・

教授

研究者番号：30251507