

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861305

研究課題名(和文) 脊髄損傷治療の新しいscaffoldの検証

研究課題名(英文) Self-assembling Peptide Reduces Glial Scarring, Attenuates Posttraumatic Inflammation, and Promotes Neurite Outgrowth of Spinal Motor Neurons

研究代表者

安藤 圭(Ando, Kei)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40566973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro: PanaceaGelを培地とした場合、神経細胞に対する毒性はないどころか神経軸索突起が有意に伸長していた。RNAレベルではGDNF, BDNF, NGFといった神経栄養因子、そして炎症系サイトカインの発現に有意な変化が認められた。

In vivo: 脊髄損傷モデルラットにおいてPanaceaGel投与により、神経成長因子の発現量が増加し、神経再生の促進が投与後速やかに開始されたと考えられた。組織染色では損傷部周囲に明らかな細胞の侵入、そして神経軸索の侵入が確認された。一度損傷が生じても、細胞が発育するに快適な環境が存在すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The central nervous system extracellular matrix may play a role in maintenance of the neuronal network by inhibiting axonal growth and suppressing formation of additional inadequate synapses. In this study, we show increased expression of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-4 (NT-4), and tropomyosin receptor kinase (TrkA and TrkB) in SPG-178-promoted neurite outgrowth of motor neurons in vitro, and decreased inflammation and glial scar with use of SPG-178 in vivo.

This study provides new evidence for the role of SPG-178 as a scaffold in the spinal cord and suggests that this peptide is a neuroprotective factor that may serve as an alternative treatment for neuronal injuries.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 足場

## 1. 研究開始当初の背景

現在の日本では約 50 万人の以上の患者が麻痺を抱えたまま生活を余儀なくされており、毎年 5000 人以上の患者が脊髄損傷を来し、個人と社会に与える肉体的、精神的、経済的負担は極めて大きい。これまで我々は脊髄再生抑制効果をもつケラタン硫酸 (KS) プロテオグリカン (PG) 阻害剤であるケラタナーゼ投与、そして神経堤由来の細胞集団である歯髄幹細胞を損傷部位に移植することで有意な機能回復が得られることを報告してきた。しかし移植の際、足場となる媒体の使用については未だ一定の見解が得られていない。本研究の目的は、いまだ未確立の脊髄損傷治療に対する細胞移植の足場となる新規自己集合体ペプチドゲルの効果、役割を調べることである。

2. 研究の目的 近年の研究では損傷神経を再生する試みが幾つかなされている。ES、IPS を含む神経幹細胞、骨髄幹細胞、シュワン細胞、歯髄幹細胞治療に神経栄養因子、神経再生抑制因子阻害剤の併用が有効であることが明らかとなり、脊髄損傷後の再生医療を中心とした期待が高まっている。しかし移植の損傷部位への有効性を高めるためには、移植細胞の分化の方向性を誘導する神経栄養因子および移植細胞の足場 (scaffold) の併用が必須とされる。本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけとして、神経幹細胞移植に type I collagen (Fujimoto et al. Stem Cells 30: 1163-73, 2012)、骨髄幹細胞移植に通常の細胞培養液 (Hodgetts S et al. Cell Transplant 21: 2012)、シュワン細胞移植に PuraMatrix peptide (Moradi F et al. Journal of Neuroscience Reserch: 1-14, 2012)、そして我々のグループより歯髄幹細胞移植に fibrin glue (Sakai K et al. J Clin invest 122: 80-90, 2012) など、使用される

scaffold は多岐にわたっており、適切な使用法に関して一定の見解がない。さらに、これらの scaffold そのものに関する細胞毒性などのデータはないのが現状である。しかし、近年、栄養因子の運搬機能をもつペプチドが注目されており、骨再生 (Semino CE et al. J Dent Res 87: 606-16, 2008)、視神経再生 (Ellis-Behnke RG et al. Natl Acad Sci 103: 5054059, 2006)、心筋梗塞後の再生などに使用されている。我々の着目した自己集合体ペプチド (PanaceaGel) は、上述の中では力学的強度を保持するために pH を酸性とせざるを得ない PuraMatrix に似たものであるが、pH は髄液と同様の中性でありながら、十分な強度、細胞接着性をもつ (Nagai Y et al. Biomaterials 33: 1044-51, 2012)。そこで我々は移植細胞の足場 (scaffold) と予測される自己集合体ペプチドゲル (PanaceaGel) に着目した。

3. 研究の方法 In vivo では脊髄損傷ラットにゲル単体を投与し、至適投与量、時期、方法の検討、下肢運動機能の回復への効果、組織学的検討、順行性トレーサーによる神経再生の検討を加える。In vitro では、PanaceaGel を培地とした場合のラット脊髄前角細胞から採取した神経細胞、アストログリア、ミクログリアを用い、神経軸索伸長効果、細胞保護効果、サイトカイン分泌能への影響をみる。

既に有効性の明らかとなったケラタナーゼ、歯髄幹細胞との併用することによる相乗効果を、上述した内容と同様に見極めていく。

## 4. 研究成果

In vitro: 神経細胞に対する毒性はないどころか神経軸索突起が有意に伸長していた (図 1)。

RNA レベルでは GDNF, BDNF, NGF といった神経栄養因子、そして炎症系サイトカインの発現に有意な変化が認められた(図 2)。

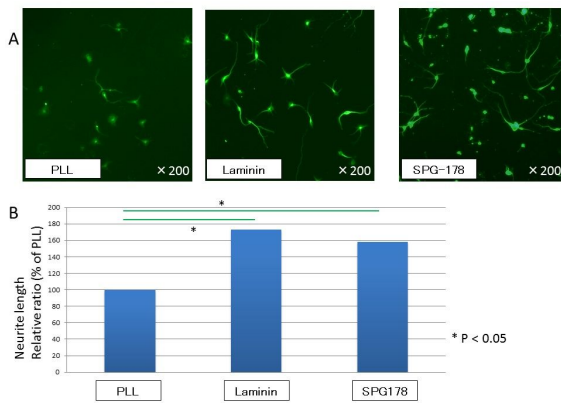
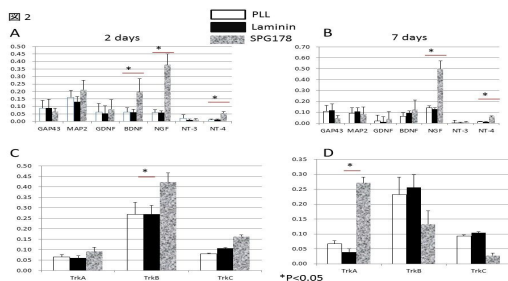


図 1

In vivo: 脊髄損傷モデルラットにおいて PanaceaGel 投与により、神経成長因子の発



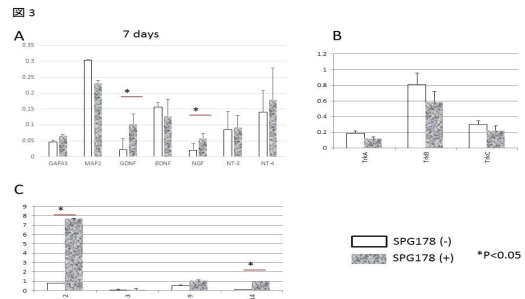
現量が増加し、神経再生の促進が投与後速やかに開始されたと考えられた。また、MMP-9、3の発現量が投与7日後に最も高い値を示し、経時的に低い値となった(図 3)。

組織染色では損傷部周囲に明らかな細胞の侵入、そして神経軸索の侵入が確認された。また物理的バリアーとなり軸索伸長を阻害し得る繊維性瘢痕(Collagen type4 染色)では、染色範囲が減少していることが確認さ

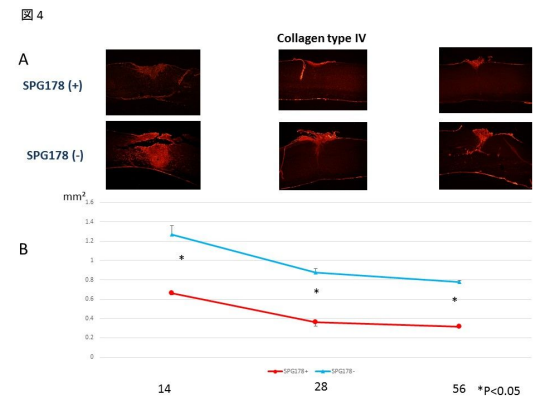
れた(図 4)。

一度損傷が生じて、細胞が発育するに最適な環境が存在すると考えられた。

PanaceaGel の神経再生足場材料用組成物は、中性領域、すなわち生体内に近い pH



条件(例えば、pH 7.0 付近)において、神経再生足場材料用組成物に含まれる自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸残基の電荷の総和が 0 を超えて +5 以下である。これにより、PanaceaGel の神経再生足場用組成物を用いた神経再生足場は、生体内環



境で十分な強度および細胞接着性を発揮することができる。そのため、高い生体安全性の確保と、効果的な神経再生とを両立することができる。

中枢神経系では様々な軸索伸長の阻害要因が働くため、効果的な神経再生が困難である。しかしながら、PanaceaGel の神経再生足場材料用組成物によれば、阻害要因を抑制するための添加剤を含まない場合であっても、中枢神経系における軸索伸長の阻害要因の働きを抑制し、効果的な軸索伸長を行うことができる。さらに、in vivo ではグリア瘢痕の形成自体を抑制することも、

神経再生促進に寄与していると考えられた。

<引用文献>

- (1). Nagai Y, Yokoi H, Kaihara K, et al. The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self-assembling peptide hydrogel. *Biomaterials* 2012;33:1044-51.
- (2). Jiang XY, Fu SL, Nie BM, et al. Methods for isolating highly-enriched embryonic spinal cord neurons: a comparison between enzymatic and mechanical dissociations. *Journal of neuroscience methods* 2006;158:13-8.
- (3). Ruff RL, McKerracher L, Selzer ME. Repair and neurorehabilitation strategies for spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1142:1-20.
- (4). Liesi P, Kauppila T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Experimental neurology* 2002;173:31-45.
- (5). He YY, Zhang XY, Yung WH, et al. Role of BDNF in central motor structures and motor diseases. *Molecular neurobiology* 2013;48:783-93.
- (6). Altar CA, Cai N, Bliven T, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 1997;389:856-60.
- (7). Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal  
2015年10月22日富山国際会議場(富山県富山市)  
安藤圭、今釜史郎、伊藤全哉、小林和克

transduction. *Annual review of biochemistry* 2003;72:609-42.

- (8). Menet V, Prieto M, Privat A, et al. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:8999-9004.
- (9). Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999;23:297-308.
- (10). Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004;24:2143-55.

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0件)

[学会発表](計1件)

- (1). 第30回日本整形外科学会基礎学術集会  
脊髄再生の足場となる新規自己集合体ペプチドの効果

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安藤 圭 (Kei, Ando)

名古屋大学・医学部付属病院・病院助教

研究者番号：40566973

(2)研究分担者

なし