



Title	ラット脊髄損傷モデルにおける急性期FTY720投与の治療効果および亜急性期BMSC細胞シート硬膜下投与の治療効果の検証
Author(s)	山崎, 和義
Description	配架番号 : 2562
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14096号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14096
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94590
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuyoshi_Yamazaki.pdf



学 位 論 文

ラット脊髄損傷モデルにおける急性期 FTY720 投与
の治療効果および亜急性期 BMSC 細胞シート硬膜下
投与の治療効果の検証

(Verification of therapeutic effects of acute FTY720
administration and subacute BMSC cell sheet subdural
administration in rat spinal cord injury model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

山崎 和義

学 位 論 文

ラット脊髄損傷モデルにおける急性期 FTY720 投与
の治療効果および亜急性期 BMSC 細胞シート硬膜下
投与の治療効果の検証

(Verification of therapeutic effects of acute FTY720
administration and subacute BMSC cell sheet subdural
administration in rat spinal cord injury model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

山崎 和義

目 次

発表論文目録および学会発表目録・	1 頁
要旨・	3 頁
緒言・	6 頁
略語表・	8 頁
第 1 章緒言・	9 頁
実験方法・	9 頁
実験結果・	14 頁
考察・	20 頁
第 2 章緒言・	23 頁
実験方法・	23 頁
実験結果・	27 頁
考察・	34 頁
考察・	38 頁
総括および結論・	39 頁
謝辞・	40 頁
利益相反・	41 頁
引用文献・	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部をまとめた論文は以下の雑誌に発表した。

論文名 FTY720 attenuates neuropathic pain after spinal cord injury by decreasing systemic and local inflammation in rat spinal cord compression model.

雑誌 Journal of Neurotrauma

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kazuyoshi Yamazaki, Toshitaka Seki, Masahito Kawabori, Shuji Hamauchi, Izumi Koyanagai, Kiyohiro Houkin

演題名 ; The development and evaluation of a new simple modified aneurysm clip for small animal SCI models.

学会名 ; NeutoTrauma2018, 15th, Aug, 2018, The Westin Harbour Castle, Toronto, Canada

2. 山崎 和義、関 俊隆、川堀 真人、濱内 祝嗣、小柳 泉、寶金 清博

演題名 ; ラット脊髄損傷実験用新規クリップの開発と検討

学会名 ; 日本脳神経外科学会第 77 回学術総会、2018 年 10 月 10 日、仙台国際センター

3. 山崎 和義、川堀 真人、関 俊隆、濱内 祝嗣、寶金 清博

演題名 ; ラット脊髄損傷モデルにおける FTY720 の治療効果の検証

学会名 ; 第 34 回日本脊髄外科学会、2018 年 6 月 21 日、ロイトン札幌

4. 山崎 和義、川堀 真人、関 俊隆、七戸 秀夫、高宮 宗一郎、
濱内 祝嗣、寶金 清博

演題名 ; ラット亜急性期脊髄損傷モデルにおける骨髄間葉系幹細胞シートによる治療効果

学会名 ; 第 20 回日本分子脳神経外科学会、2019 年 8 月 10 日、秋葉原コンベンションセンター

5. 山崎 和義、川堀 真人、関 俊隆、七戸 秀夫、高宮 宗一郎、
寶金 清博

演題名 ; ラット亜急性期脊髄損傷モデルにおける骨髄間葉系幹細胞シートによる治療効果

学会名 ; 日本脳神経外科第 78 回学術総会、2019 年 10 月 9 日、大阪国際会議場

6. Kazuyoshi Yamazaki, Masahito Kawabori, Toshitaka Seki, Soichiro Takamiya,
Kiyohiro Houkin

演題名 ; Subdural administration of BMSC cell sheet may be less invasive and show a better functional recovery than intramedullary injection of cells in rat sub-acute spinal cord injury model.

学会名 ; The 10th meeting of ACTO, 8th, Nov, 2019, Sapporo Education & Culture Holl, Sapporo

要旨

【背景と目的】

脊髄損傷における治療で現在期待されている治療として、急性期の炎症や浮腫を中心とする進行性の 2 次損傷を抑制する薬物治療と、亜急性期以降に神経再生を妨げるのグリア瘢痕形成を防ぎ、適切なタイミングで幹細胞移植を行う再生医療があげられる。脊髄損傷急性期における薬物治療の研究として、S1P 受容体作動薬として知られる FTY720(フィンゴリモド)の治療効果を動物実験で検証した。(実験①)さらに、脊髄損傷亜急性期における効果的な幹細胞移植方法を検証する目的で、骨髄間葉系幹細胞シートの治療効果と組織学的な検討を行った。(実験②)

【実験①の方法・結果】

Sprague Dawley ラット (BW200-300g) を全身麻酔下に Th6,7 レベルの椎弓切除を行い、Th6/7 レベル脊髄をはさみ圧 30g のクリップでそれぞれ 1 分間 (n=30) はさみ、脊髄損傷モデルを作成した。術翌日に FTY720 を 1.5mg/kg 腹腔内注射した群(n=15)と vehicle(生理食塩水腹腔内投与)群(n=15)にわけた。脊髄損傷翌日と、その後 1 週間毎に 6 週間後まで Basso-Beattie-Bresnahan hind limb locomotor test (BBB scale) を用いて後肢運動機能を評価し、さらに von Frey monofilament test で mechanical allodynia ついても評価した。脊髄損傷後 1 週間後の炎症細胞浸潤については抗 Iba1/CD68 抗体による免疫組織学的染色で行った。脊髄損傷後の 6 週間後の病理組織学的評価として、空洞の頭尾側方向の長さや体積をルクソールファストブルー+ヘマトキシリン&エオジン染色で、損傷部付近に形成されたグリア瘢痕については抗 GFAP 抗体を用いた蛍光免疫染色で評価した。さらに、下降性疼痛抑制系の評価を目的に、 μ opioid receptor (MOR)と hydroxytryptamine transporter (HTT)抗体による蛍光免疫染色を行った。一部の個体(n=3 ずつ)には、脊損 6 週間後に脊損部 1cm 頭側に軸索トレーサー(fluor-ruby:FR)を投与し脊損部尾側の皮質脊髄路の残存または再生された軸索数についても評価した。

FTY720 投与群では、術 2 週間後から BBB score と von Frey test における疼痛閾値が優位に高値となり、運動機能の改善を認める他に感覚障害改善の可能性が示唆された。脊損 6 週後の損傷範囲の長さ・体積は FTY720 投与群で優位に少なく、グリア瘢痕形成も抑制されていた。さらに、FR による運動線維の評価でも、HTT や MOR による感覚関連線維の評価でも、FTY720 群で残存線維が優位に多い結果であり、高い治療効果が想定された。

【実験①の考察】

FTY720(フィンゴリモド)は、冬虫夏草の活性成分であるミリオシンの誘導体であり、生体内でリン酸化を受けて S1P 受容体に対してアゴニストとして働く。特に S1P₁ に作用することで、末梢血液中の T リンパ球の数を低下させるため、強力な免疫抑制作用を発揮することが知られている。急性期の炎症抑制が重要な SCI 治療においても、動物実験レベルでは良好な治療効果の報告がなされており、炎症抑制だけではなく、様々なメカニズムで機能回復をもたらしていると考えられている。今回の実験結果からは、運動機能だけではなく疼痛抑制に対しても効果を発揮していると考えられたが、その機序の一つとして、下降性疼痛抑制系が保たれたことが関連している可能性が示された。

【実験②の方法と結果】

実験①と同じ方法でラット脊髄損傷モデルを n=60 作成し、1 週間後に各ラットを細胞シート移植群、髄内直接移植群、コントロール群に振り分けた(n=20 ずつ)。細胞シート群には、GFP-SD ラットから採取・培養した 7.0×10^4 の細胞数の BMSC 細胞シートを、損傷部脊髄背側硬膜下に移植した。髄内移植群には、脊損 5mm 頭側髄内に同数の細胞を注射した。コントロール群は脊損部の硬膜を切開・縫合する処置のみを行った。

脊損から 7 週間後まで、実験①と同様に BBB score、von Frey test を評価した。組織学的評価脊損後 7 週間後に、ルクソールファストブルー染色や GFAP、Iba1/CD68、HTT や MOR を同様に行い、軸索トレーサーによる FR 投与処置も同様に行って、運動線維についても評価した。移植細胞の生着について確認する目的で、抗 GFP 抗体と抗 NeuN 抗体による 2 重蛍光免疫染色を行った。

運動感覚機能評価の結果としては、髄内移植群も細胞シート群も、治療 6 週間後の BBB score が無治療群に比べて優位に高値であったが、細胞シート群のほうが改善率が高かった。さらに、細胞シート群では von Frey test の疼痛閾値が他 2 群と比べて優位に高かった。組織学的評価では、細胞シート群でも髄内移植群同様に脊損部周囲に GFP 陽性移植細胞の遊走・生着が確認され、一部は NeuN 陽性を示していた。また、細胞シート治療群は損傷範囲も無治療群に比べて小さく、炎症細胞数も少なかった。軸索トレーサーによる運動線維評価では細胞シート群と髄内直接移植群で差は無かったが、MOR, HTT については細胞シート群で優位に保たれていた。

【実験②の考察】

脊髄損傷に対する幹細胞移植による再生医療において、最適な細胞の投与ルート of 検証は合併症を減らして最大限の治療効果をもたらす意味でも重要であ

ると考えられるが、多数の移植細胞の損傷部付近への生着が期待できるという観点からは、損傷部付近髄内への細胞直接注射が最も効果的と考えられる。しかし、細胞直接注射は、脊髄の2次損傷を誘発するリスクがあり、より効率的で安全な細胞投与方法の確立が重要と考えられる。近年の細胞工学発展で確立された幹細胞シート移植療法は、シートそのものが細胞生着に重要な役割を果たす足場の働きを有するために、多くの細胞を効率よく損傷部付近の組織に安全に供給可能となることで、一部は臨床応用が開始されており、良好な治療結果が期待されている。今回の実験で同数の髄内直接注射と比較した治療効果においても、運動機能の優位な改善をもたらしている可能性が高い結果であった。それに加えて、髄内直接移植では認められなかった疼痛抑制効果を有している可能性があり、今後のメカニズムの検証が重要となると考えられた。

【結語】

ラット急性期脊髄損傷モデルに対する FTY720 の治療効果を検証し、疼痛抑制にも強い治療効果をもたらしている可能性が考えられた。

さらに、ラット脊損亜急性期の骨髄間葉系幹細胞の投与方法による治療効果の検討を行った。脊損部への亜急性期細胞シート移植は、同数の幹細胞数の髄内直接移植よりも運動・感覚機能改善効果が高い可能性が示唆された。

緒言

脊髄損傷(spinal cord injury: SCI)は、交通事故やスポーツなどの高エネルギー外傷が原因となり、四肢麻痺等の重篤な後遺症を呈する為、有効な治療法が望まれる疾患領域である。また、近年高齢化が進み、比較的軽い外傷で SCI を合併するケースも増えている。本邦では 15 万人以上の患者が、SCI による後遺症で苦しんでおり、年間 5000 人以上が新たに受傷していると言われている。

若年者も含む脊髄損傷を受傷した患者は、それまでの日常生活や社会生活を継続することが困難となり、高度の介助を要することも多く、本人だけではなく家族にも莫大な負担がかかり、その経済的・社会的資源の損失ははかり知れず、早期の有効な治療法開発が望まれる。

深刻な SCI の後遺症として、重度の四肢麻痺や排尿・排便障害、自律神経障害が挙げられるため、治療の目標としては麻痺を少しでも改善させたり介助の負担を減らせるような環境整備が重要となり、これらの観点からの様々な研究が試みられている。見逃されやすいもう一つの重要な要素として、SCI 患者は損傷部位以下の感覚障害にも苦しんでいることが挙げられる。SCI 患者の 40—60% 以上が何らかの痛みの経験を有し、そのおよそ 3 分の 1 の患者では激しい痛みを自覚した経験があると報告されている。(Finnerup et al., 2014; Siddall et al., 2003)さらに、感覚障害に関しては、様々な要因で進行性に悪化することも稀ではなく、睡眠を妨げそれまでの日常生活の継続を著しく妨げる原因ともなり、意欲の低下や鬱病等の二次的な障害も引き起こす。さらに、強い激しい痛みの持続はリハビリの継続も困難にさせ、運動制限以上の著しい機能障害にも繋がる場合もあるが、劇的に症状を改善させることができる有効な治療が少なく、最も対処が難しい問題の一つとなっている。(Rose et al., 1988; Widerstrom-Noga et al., 2002; Widerstrom-Noga et al., 1999)

SCI 後に痛みや痺れが進行する原因として、亜急性期以降にグリア瘢痕が形成され癒着性クモ膜炎や空洞形成が進行することや異常な神経伝達による中枢性の感作が進行することが原因とも考えられており、こうした観点に着目した治療法の開発も望まれる。

現在、SCI 急性期に対する治療として重要となるのが、脊椎不安定性に対する早期除圧固定術に加え、急性期の炎症や浮腫を中心とする進行性の 2 次損傷を抑制する、薬物治療があげられる。その後、ある程度炎症や浮腫が鎮静化しグリア瘢痕が形成される前の亜急性期に、各種幹細胞の損傷部周囲への移植に代表

される再生医療を適切な形で導入し、慢性期のリハビリテーション継続に移行するのが理想的な治療の流れと考えられる。

本研究では、このような SCI 治療における流れの中で重要となる 2 つの観点、即ち急性期の薬物療法と亜急性期の再生医療に着目し、運動・感覚機能障害の改善に対する有効な治療方針確立に向けて、新たな知見を蓄積することを目的として検証を行った。

一つ目のテーマとした急性期の薬物療法については、抗炎症効果による 2 次損傷の抑制が重要となることから、多発性硬化症に対して臨床応用され、S1P 受容体作動薬として知られる FTY720(フィンゴリモド)(Fujita et al., 1994)の SCI 急性期に対する治療効果の検証・考察を行った。FTY720 の SCI に対する治療効果の検証は動物実験レベルで報告がありその主に抗炎症効果による運動機能改善についての有効性が示されているが(Lee et al., 2009; Norimatsu et al., 2012; Wang et al., 2015)、疼痛抑制に関する評価に関しては十分にはなされていない。そのため、感覚障害に対する効果に対しても焦点をあてて検証した。

また、近年の再生医療・細胞工学の進歩で、細胞シート治療の研究が進み、各種の臓器治療で臨床応用も始まっている。(Jonas et al., 2016; Kokubo et al., 2016; Nishida et al., 2004; Ohki et al., 2012; Sawa, 2017; Yamamoto et al., 2019) 細胞シートは、シートそのものが細胞生着の足場の役割を果たすことが期待され、中枢神経疾患治療の分野でも状況に応じて適用可能な細胞投与形態と考えられ、SCI 治療の分野でも動物実験レベルで行われた研究結果が報告され始めている。(Okuda et al., 2017)従って、二つ目のテーマとして、現在最も有効性が期待されている亜急性期の幹細胞移植による治療効果について、細胞シートを含む細胞の投与方法の違いによる比較・検証を行った。

最後に、本研究で得られた脊髄損傷に対する急性期の薬物治療と亜急性期以降の幹細胞移植に関する知見をもとに、今後の発展と臨床応用が期待される研究方針について、総合的な考察を行う。

略語表

BBB= Basso-Beattie-Bresnahan
BDNF= Brain-derived neurotrophic factor
BMSC = bone marrow stromal cell
CGRP= calcitonin gene-related peptide
dCST=dorsal corticospinal tract
DI=direct injection
DMEM= Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA =ethylenediaminetetraacetic acid
FBS= fetal bovine serum
FR= fluor-ruby
FTY720=Fujita Taitou Yoshitomi 720(Development code)
GFAP=glial fibrillary acidic protein
GFP= green fluorescence protein
HTT= hydroxytryptamine transporter
Iba-1=ionized calcium-binding adapter molecule 1
MEM= Minimum Essential Medium
MOR= μ opioid receptor
MSC=mesenchymal stem cell
PDGF= platelet-derived growth factor
SCI = spinal cord injury
SD= Sprague-Dawley

第1章 ラット急性期脊髄損傷モデルを用いた FTY720 の治療効果の検証について

【緒言】

小動物の SCI モデルの作成は、多くの方法が提唱されているが、クリップ compression による脊髄損傷は他のモデルに比べて大掛かりな設備が不要であり、手技に熟練すれば安定した脊髄損傷を再現することも可能となる。(Poon et al., 2007) また、クリップのはさみ圧を調整することで、比較的容易に目的の重症度の脊髄損傷を量産することができる。

現在、脊髄損傷に対する研究が多方面から進んでおり、様々な知見が蓄積されている。中でも、脊髄損傷急性期に起こる炎症細胞浸潤やサイトカインの放出による損傷部周囲の浮腫・虚血などが進行する 2 次損傷を効果的に防ぐ薬剤治療にも注目が集まっている。こうした中で、多発性硬化症に対する内服薬として承認されている、イムセラ®の成分である FTY720(fingolimod)は、リンパ球の二次リンパ系組織からの移出を阻害する免疫抑制作用以外にも、損傷細胞や血液脳関門の保護効果に加えてエピジェネティックな細胞制御など多彩な機能を有していることが知られてきており、脊髄損傷領域においても動物実験レベルで研究報告がなされ始めている。(Lee et al., 2009; Norimatsu et al., 2012; Wang et al., 2015)

従って、クリップモデルにより作成した中等度のラット脊髄損傷モデル急性期に対し、FTY720 を腹腔内投与し、治療効果を検証・考察した。

【実験方法】

1) 実験計画の概要

脊髄損傷急性期の FTY720 の治療効果を検証する目的で、ラット脊髄損傷モデルを n=30 作成し、24 時間後に FTY720 を腹腔内投与した治療群と同量の生理食塩水を投与した vehicle 群に分けた(n=15 ずつ)。その後、6 週目まで運動・感覚機能評価を 1 週間ごとに継続し、組織学的評価を目的にサクリファイスした。

2) ラット脊髄損傷モデルの作成

以下に用いるクリップは MIZUHO 社製の脳動脈瘤用クリップのブレード内部を滑らかに改変しはさみ圧 30g に調整した特注のクリップ(Figure1 A)を使用した。

以下すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定(reference number 17-0066) に従って実施した。

実験動物は CLEA Japan, Inc から購入した 8-10 週の雌の SD ラットを使用した。麻酔は、4.0% isoflurane, N₂O/O₂(70:30)で導入を行い、2.0%イソフルラン, N₂O/O₂(70:30)で維持し、体温は 36.5-37.5°Cで保持した。他の棘突起に比べて明らかに発達し背部から触診で判別可能な Th2 棘突起をメルクマールにして Th6-7 棘突起を同定し、背部の皮膚を切開した。次に、Th6,7 の棘突起と椎弓に付着する筋群を剥離し、Th6-7 椎弓をニッパーで切離した後、脊髓を軽く背側に牽引した。上述のクリップを鉗子で開いて把持し、下端を脊髓の腹側に滑り込ませ、鉗子を慎重に外してブレードの中央で脊髓をゆっくりはさみ 1 分間待機した。(Figure1 B) クリップをゆっくり外した上で切離した椎弓を脊髓背側に戻し、筋層を 4-0 ナイロン糸で縫合後皮膚を縫合することで型通りに閉創した。

脊髓損傷作成後は、排尿障害のため、朝昼夜の排尿処置を自力排尿が可能になるまで実施した。

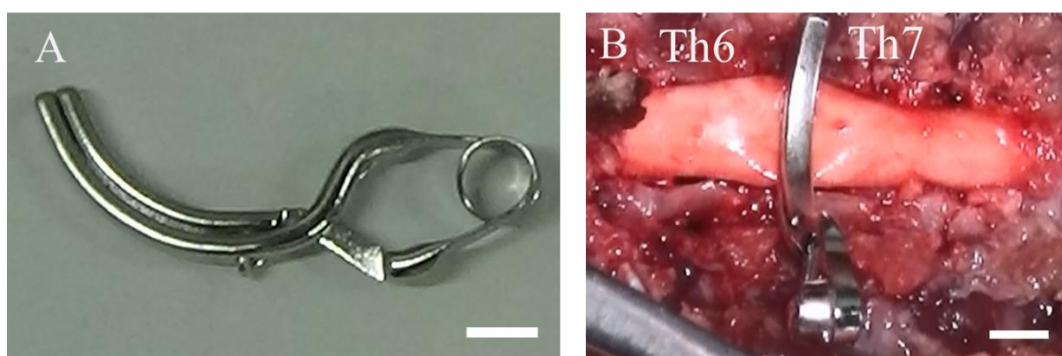


Figure 1 A:MIZUHO 社製脳動脈瘤用クリップを改変し作成した小動物脊損モデル作成用のクリップ

ブレードの表面が滑らかに加工され、硬膜損傷のリスクを軽減させ、ラット中等度脊髄損傷作成用にはさみ圧は 30g に調整されている。(Scale bar= 2mm)

B:クリップを用いて硬膜ごと胸髄を 1 分間はさみ脊髄損傷モデルを作成(Scale bar= 2mm)

FTY720 の投与方法

脊髄損傷 24 時間後に後述する BBB スコアが 1 以下であり十分な下肢麻痺となっていることを確認し、治療群には 1.5mg/kg の FTY720 (Cayman Chemical, Michigan, USA)を、vehicle 群には生理食塩水 100 μ L を腹腔内投与した。

4)運動・感覚機能の評価

細胞移植後の治療効果を検証するために、脊髄損傷後 1 週間ごとに、以下の方法を用いて運動・感覚機能評価を継続した。

後肢運動機能評価として、Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)hind limb locomotor test を用いて評価した。(Basso et al., 1995)ラットをオープンフィールド下で 5 分間観察し左右の後肢の動きを 21 点満点で点数化し、各個体の点数は左右の平均値を記録した。

脊髄損傷後慢性期に移行するに従って、mechanical allodynia が進行することが知られており、小動物では接触圧の異なる細いフィラメントの軽い接触に対する逃避行動で重症度を判定できるため、von Frey monofilament を用いて脊損部以下の mechanical allodynia について評価した。ラットをオープンフィールド下にラバーマット上に置き、接触圧 0.008-300g の 20 段階に調整されたフィラメントの先を、脊損レベル以下の体表(尾の付け根や足背や足底など)に軽く接触させて痛みに対する逃避反応を確認し判定を行った。(Seki and Fehlings, 2008)(Figure2)フィラメントの先の接触で再現性をもって逃避反応を示す最低の接触圧を疼痛閾値として記録した。



Figure 2 von Frey hairs test による疼痛閾値の測定 (接触圧 0.008-300g のフィラメントを脊損レベル以下の皮膚に接触させて、逃避反応の有無を確認している)

5)組織学的検討

SCI 後の脊髄を組織学的に検証する目的で、6 週間後まで生存した全ラットを安楽死させた(後述する軸索トレーサー投与した個体を除く)。

深麻酔下に右心房から脱血しながら 50m の生理食塩水を左心室から灌流した後、4%paraformaldehyde を 50ml 灌流し、Th1-12 レベルの脊髄を椎体・椎弓を含む形で摘出した。さらに、4%paraformaldehyde に 3 日間浸潤させて固定した。

各グループで n=5 ずつ Th4-9 レベルの脊髄を矢状断面中心で切断し、パラフィン包埋を行い、10 μ m 厚の薄切り切片を作成した。また、他の個体より脊髄損

傷中心部より 5mm 頭側と尾側の軸状断の脊髓を n=3 ずつ 1mm 厚で採取し、パラフィン包埋後、10 μ m の厚さで薄切り切片を作成した。

1.脊損部の頭尾側方向の長さ と体積の評価

上述の方法で得た矢状断の薄切り切片を、キシレンに 30 分浸してパラフィンの除去を行った後、ルクソールファストブルー+ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、脱髄部分を顕微鏡(Keyence, Osaka, Japan)で観察し、SCI lesion の頭尾側方向の長さを測定した。

さらに、以下の式で SCI 部の体積 lesion volume として近似した。

Lesion volume= $\pi D^2 (H1+H2)/6$ (H1 は脊損中心部から頭側方向の長さ, H2 は脊損中心部から尾側方向の長さ、D は脊損中心部の前後方向の径)(Dohrmann and Panjabi, 1976; Seki and Fehlings, 2008; Seki et al., 2002)

2.急性期血中リンパ球の評価

フローサイトメリーで SCI3 日後の各群の末梢血中の CD3 陽性リンパ球の割合を測定した(n=3 ずつ)。上述の方法で麻酔導入後、ツベルクリン針と 1cc のシリンジを用いて尾静脈から末梢血を Flow tube を入れた Flow buffer に数滴採取し、1.5 $\times 10^3$ rpm, 4 $^{\circ}$ C の条件で 5 分間遠心分離した後、上清を破棄し RBC lysis buffer(BD pharmingen)1ml を加えて vortex し、2 分間静置した。その後、Flow bufer3ml を加えて溶血を終了させ、同条件で遠心し上清を破棄後、抗 CD3 (PE anti-rat CD3 Antibody, BioLegend, CA)抗体カクテルを加えて染色し、4 $^{\circ}$ C暗所で 30 分静置した。Flow buffer1ml を加えて染色を終了させ、同条件で遠心分離後上清を破棄し、DAPI (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)200 μ l を加えて解析における死細胞を判別・除外した。フィルターに通してフローサイトメーター(FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて末梢血中の CD3 陽性 T 細胞の割合を算出した。

3.炎症反応・血液脊髄関門の評価

各群の脊髄損傷 1 週間後の炎症反応および血液脊髄関門の破綻について評価を行う目的で、運動・感覚機能の評価した群とは別個に各グループ n=10 ずつ作成し 1 週間後に安楽死させた。上述の方法で固定を行い、脊髓矢状断薄切り切片を n=5 ずつ作成し抗 Iba-1,CD68 抗体による免疫組織染色を行った。さらに、脊損 5mm 尾側の axial 切片も n=5 ずつ作成し抗フィブリノーゲン抗体による免疫組織染色を行った。(Kawabori et al., 2013; Kawabori et al., 2015)

パラフィンの除去後、PH6.0 クエン酸緩衝液を蒸留水で 20 倍希釈し、圧力鍋で加熱沸騰させ、切片を投じて 2 分間の加熱処理による抗原賦活を行った。内因性 peroxidase を 10%ヤギ血清でブロッキングした。一次抗体は Iba-1(1:1500,

019-19741, Wako, Japan), CD68(1:1000, MCA341GA, BIO-RAD)、抗フィブリノーゲン抗体 (1:100 at room temperature for 1 hour, proteintech, USA) を使用し、室温で 60 分間反応させた。PBS による洗浄後に DAB 染色を行った。

脊損中心部より頭尾側それぞれ 5mm の部分の顕微鏡下 400 倍の拡大視野をそれぞれランダムに 5 視野選択し、一視野内の活性化マイクログリア・マクロファージの数をカウントし、平均化した。(BZ-X Analyzer, Keyence, Osaka, Japan)

また、脊損尾側の axial 切片における直径 50 μ m 程度の血管をランダムに 5 本選択し、血管周囲のフィブリン漏出面積を測定後(BZ-X Analyzer, Keyence, Osaka, Japan)平均化した。

3. グリア瘢痕領域の評価

慢性期のグリア瘢痕形成について評価する目的で、上述の SCI6 週後の矢状断切片に以下の蛍光免疫染色を行った。PH6.0 クエン酸緩衝液を蒸留水で 20 倍希釈し、圧力鍋で加熱沸騰させ、切片を投じて 2 分間の加熱処理による抗原賦活を行った。さらに、10%正常ヤギ血清にてブロッキング後、一次抗体として GFAP (dilution 1:200; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ)、二次抗体として Alexa Fluor594(Molecular Probes Inc, Eugene, OR)を 1 時間室温で反応させた。顕微鏡下に観察し脊損中心部から尾側に伸びた GFAP 陽性領域として観察されたグリア瘢痕の面積を測定した。(BZ-X Analyzer, Keyence, Osaka, Japan)(Okuda et al., 2017)

4. 皮質脊髓路の評価

軸索トレーサーを用いて、脊損後の残存または再生されたと考えられる下降性線維の評価を行った。具体的には、上述の脊損 6 週後の機能評価を終えたラットを各グループ n=3 ずつランダムに抽出し、維持麻酔下に創部を再開創し、Th4 レベル椎弓を切離後、脊損中心部より約 10mm 頭側の脊髓内に軸索トレーサーである fluor-ruby: FR(10,000 MW, D-1817; molecular Probes, Eugene, OR)を後述する細胞髄内直接注入と同様の方法で定位的に注入し、5 日後にサクリファイスして脊髓を採取した。次に、脊損部尾側の axial 切片を作成し、損傷部 10mm 尾側の後索腹側 1/3 を走行する dorsal corticospinal tract(dCST)の FR で標識された軸索をカウントした。(Chiba et al., 2009)

5. 疼痛抑制関連神経の評価

脊髓後角に関連する介在ニューロンのマーカーとなる μ opioid receptor (MOR) と下降性疼痛抑制系繊維の評価を目的に hydroxytryptamine transporter (HTT)、末梢線維から後角への入力に関連する calcitonin gene-related peptide (CGRP)を評価する目的で、脊損中心部から頭側・尾側それぞれ 5mm 離れた部分の軸状断切片

に対し、上記と同様の方法を用いて以下抗体で蛍光免疫染色を行った。
MOR)(Kudo et al., 2014)、HTT(Somogyi et al., 2004)、CGRP (dilution, 1:8000; Sigma C8198)

6.統計学的手法

全データは、平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には unpaired-*t* test, Mann Whitney U test を用いた。p <0.05 を統計学的に優位とした。
最後に、本章における実験プロトコルのシェーマを Figure3 に示す。

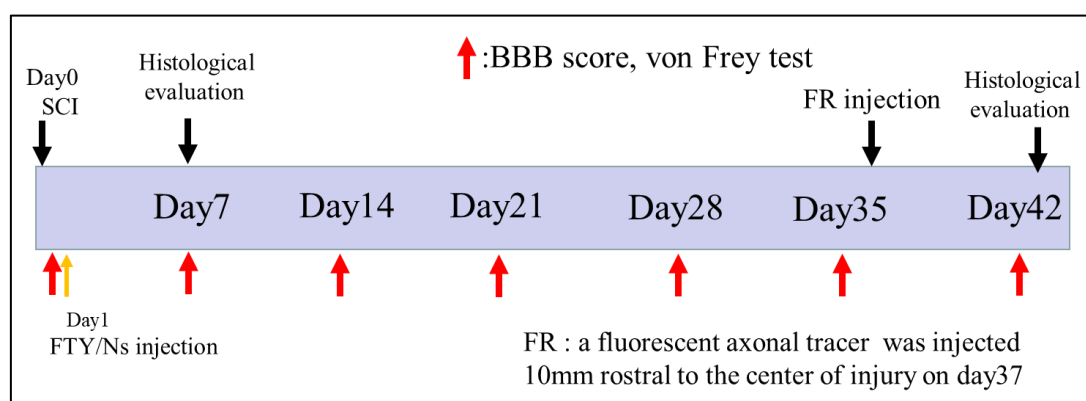


Figure 3 実験スケジュール

【実験結果】

1)運動・感覚機能評価

運動機能評価では、Figure 4 A に示すように、vehicle 群でも最終的に BBB score が7点前後まで回復し、中等度の脊髓損傷を呈していると考えられるが、FTY720 投与群では、2 週目以降から優位に BBB score が上昇し、最終的に 12 前後の点数となり、運動機能の後遺症が明らかに軽減している。さらに注目に値するのは、感覚機能の評価するために行った Von Frey monofilament test における疼痛閾値も、FTY720 治療群において優位に上昇(Figure 4 B)しており、脊損後に進行性に悪化する mechanical allodynia を防いでいる可能性が示唆された。それに加えて、脊損 6 週後の死亡率も FTY 群の方が低く(Figure 4 C)、急性期の高い治療効果を反映していると考えられた。

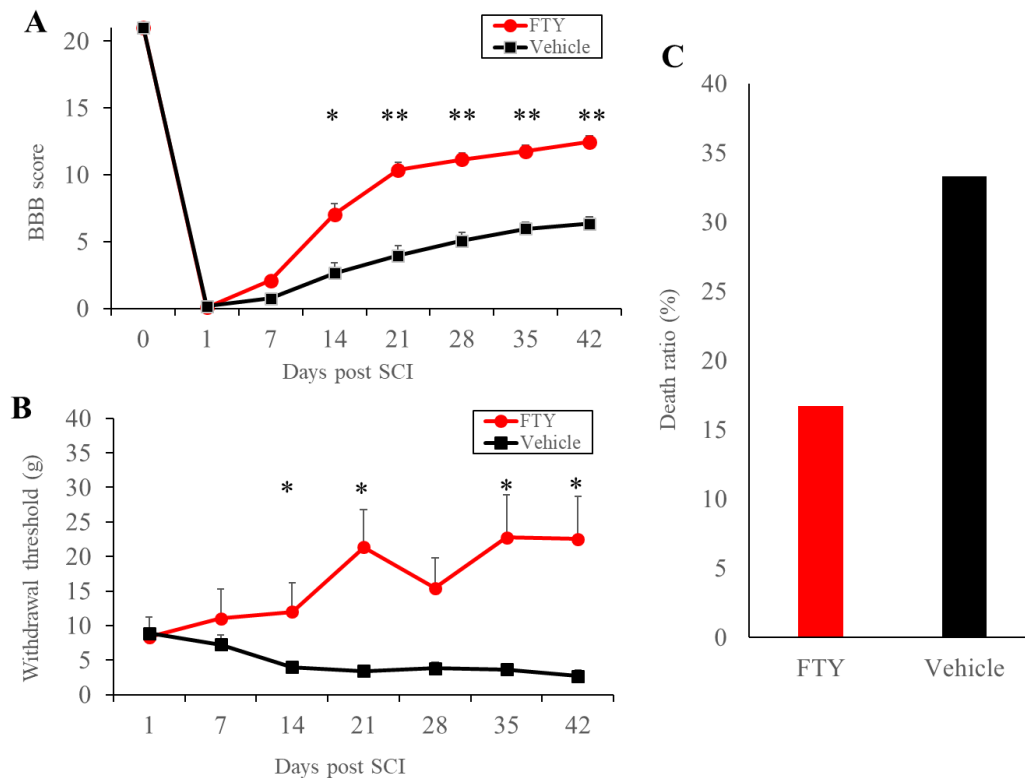


Figure 4. FTY720 の治療効果

FTY720 投与群は vehicle 群に比べて Basso Beattie Bresnahan Score を用いて測定した運動機能が優位に改善し(A)、von Frey monofilament test における疼痛閾値も高値であった。(*P<0.05 values, **P<0.01 values). さらに、FTY720 投与群は、最終的な死亡率も減少を認めた。(C)

2) 脊損部の長さ・体積の評価

Figure 5A,B に示すように、6 週間後の脊損部の長さ・体積は FTY 群で優位に少なく、2 次損傷の軽減作用を示唆する結果であった。

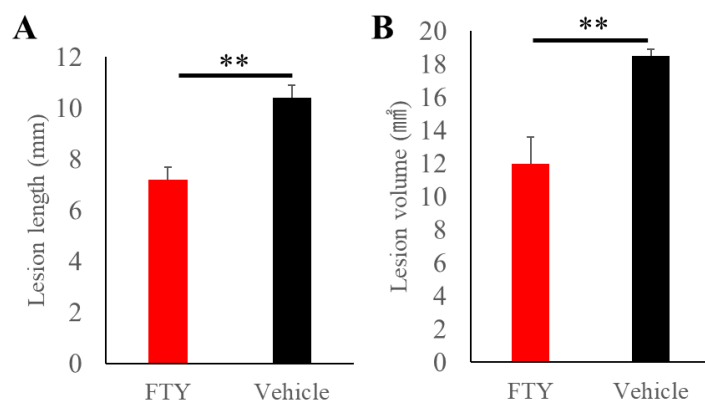


Figure 5. 最終的な脊損部の長さや体積に対する FTY720 の治療効果

A, B FTY720 群における脊損部の長さおよび体積は、vehicle 群に比べて優位に低値であった。(**P<0.01 values).

3)急性期血中リンパ球の評価

脊損 3 日目の末梢血中 CD3 陽性 T セルの割合は、FTY 群で優位に低く、末梢血中のリンパ球遊走阻害作用を反映していると考えられる結果であった。

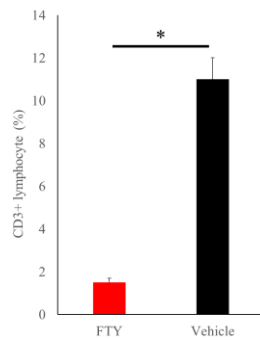


Figure 6. 脊髄損傷 3 日目の末梢血中 CD3 陽性 T cell の割合 (*P<0.05 values)

4)炎症反応・血液脊髄関門の評価

SCI1 週間後の炎症を評価する目的で行った、Iba1/CD68 染色の結果は、脊髄損傷部の頭尾側方向ともに Iba-1/CD68 陽性細胞のカウント数が vehicle 群で優位に多く、FTY720 の投与が活性化マイクログリア/マクロファージの浸潤を抑制している可能性が示唆された。(Figure7)

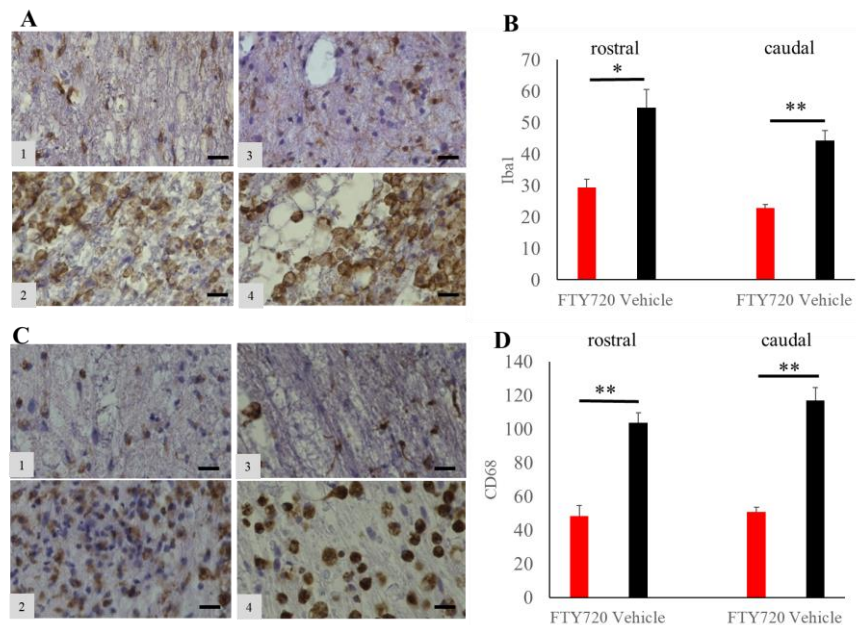


Figure 7. FTY720 の炎症細胞への作用
A:脊髄損傷 1 週間後の Iba-1 染色像

FTY720 投与群で、脊損頭側(1: FTY720, 2: vehicle) (B; left)・尾側(3: FTY720, 4: vehicle)(B: right)共に Activated microglia の浸潤が優位に少なかった。

C: 脊髄損傷 1 週間後の CD68 染色像

FTY720 投与群では、脊損頭側(1: FTY720, 2: vehicle) (D; left)・尾側(3: FTY720, 4: vehicle)(D: right)共に macrophage の浸潤も減少していた。

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Scale Bar = 10 μm)

さらに、FTY 群では、血液脊髄関門の破綻に関する評価として計測した微小血管周囲のフィブリン漏出面積も優位に小さく、血液脊髄関門の破綻を防いでいる可能性が考えられる結果であった。(Figure8)

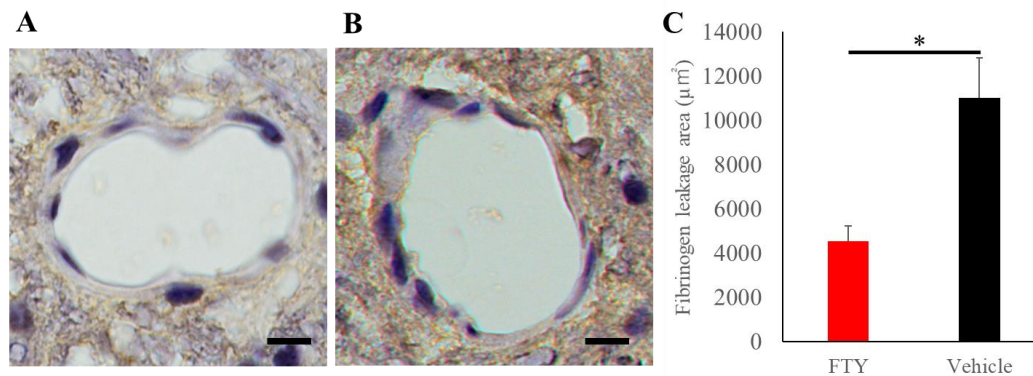


Figure 8. FTY720 の BBB 保護作用

抗フィブリン抗体染色における血管周囲のフィブリン漏出面積の評価では、FTY720 群の (A)で vehicle 群(B)に比べて漏出が少なかった。 (* $P < 0.05$, Scale bar = 10 μm)

5) グリア瘢痕形成に関する評価

脊髄損傷亜急性期以降に形成されるグリア瘢痕の評価を行う目的で、脊損 6 週後の矢状断脊髄切片の脊損中心部から尾側方向の GFAP 陽性領域を計測した結果、FTY 群で陽性領域の面積が優位に小さく、グリア瘢痕形成が明らかに抑制されている結果であった。(Figure9)

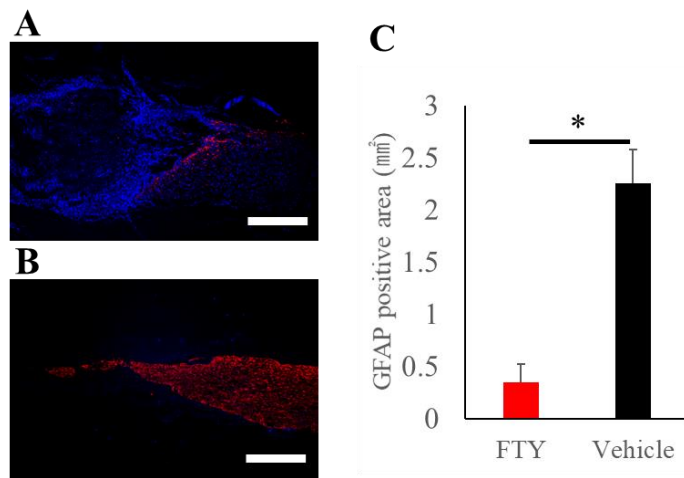


Figure 9. A,B:GFAP(red)/ DAPI(blue) 染色像
 損傷部尾側のグリア瘢痕像(A:FTY720 治療群、B:vehicle 群、 Scale Bar = 1mm)
 の面積も、FTY720 群で優位に小さかった (C). (*P<0.05 values)

5. 皮質脊髓路の軸索評価

軸索トレーサーを用いた脊損尾側部分の dCST における評価では、FTY 群の方が FR 陽性にカウントされる残存(または再生した可能性もある)軸索が多く認められた。Figure(10)

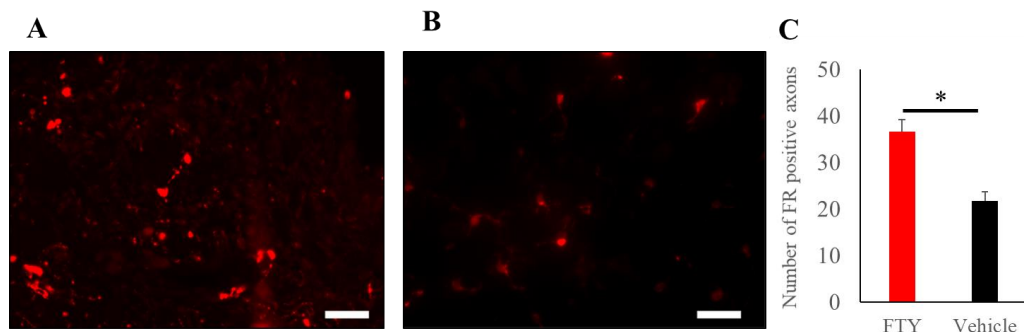


Figure 10. 軸索トレーサーによる残存軸索の評価
 脊損部以下の皮質脊髓路における残存軸索(A:FTY720 群、B:vehicle 群)のカウントにおいても、FTY720 群で優位に多くの残存軸索を認めた (C). (*P<0.05 values, Scale Bar = 50 μ m)

5. 脊髄後角の感覚関連線維の評価

末梢線維から脊髄後角への入力进行评估する目的で行われた脊髄後角付近の CGRP 染色は、FTY 群と vehicle 群で有意差を認めなかった。(Figure11)

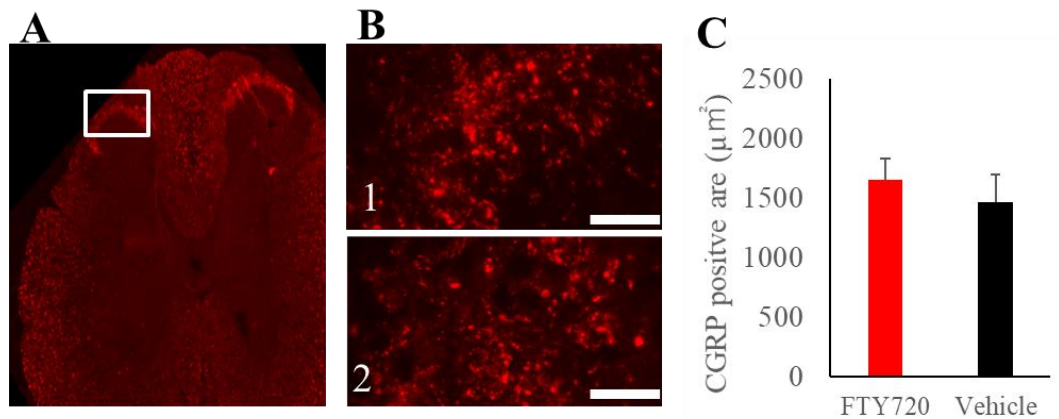


Figure 11. A: 脊損部尾側の axial 断面における CGRP (Calcitonin gene-related peptide) 染色像

B1: FTY720 群の後角拡大像、B2: vehicle 群の後角拡大像

C: CGRP 染色陽性領域の面積は両者で明らかな有意差を認めなかった (* $P < 0.05$ values, Scale Bar = $10 \mu\text{m}$)

一方、Figure 12, 13 で示すように、MOR や HTT による蛍光免疫染色の結果は、脊損部尾側の後角において FTY 群のほうで陽性領域が優位に多く、下降性疼痛抑制系が保たれたために、mechanical allodynia 進行が抑制されたと考えられる結果であった。

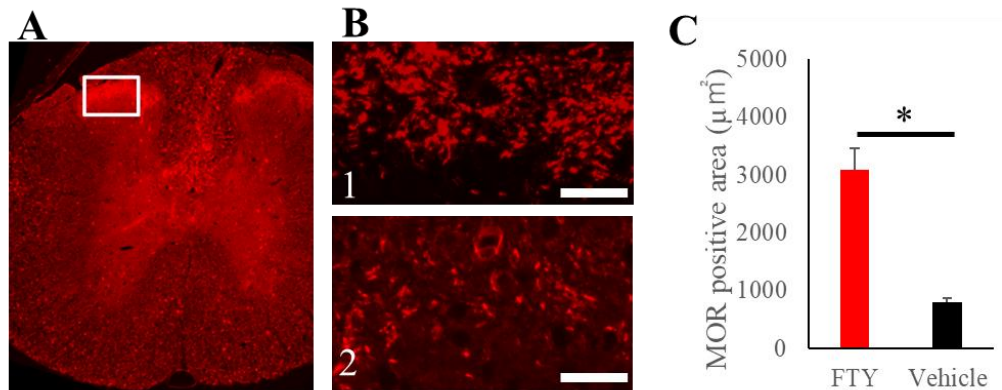


Figure 12. A: 脊損部尾側の axial 断面における MOR (μ opioid receptor) 染色像

B1: FTY720 群の後角拡大像、B2: vehicle 群の後角拡大像

C: MOR 染色陽性領域の面積は FTY720 群で優位に高値だった (* $P < 0.05$ values, Scale Bar = $10 \mu\text{m}$)

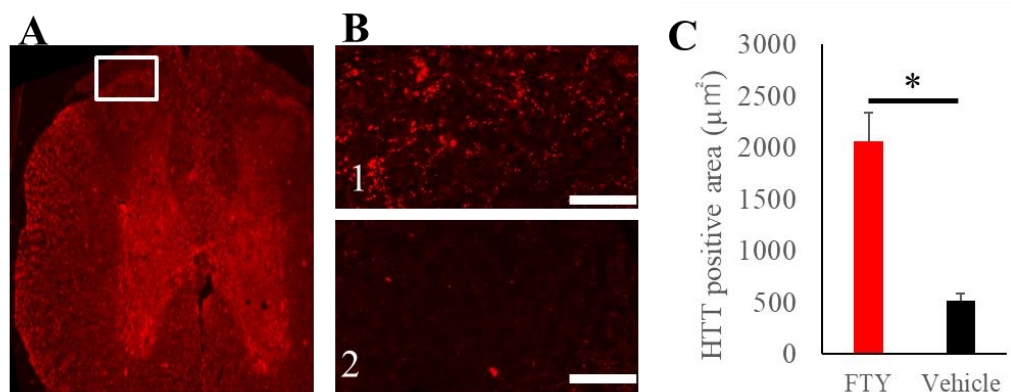


Figure 13. A:HTT(hydroxytryptamine transporter)染色による脊損部尾側での下降性疼痛抑制系繊維の評価

B1:FTY720 群の後角拡大像、B2:vehicle 群の後角拡大像

C:HTT 染色陽性領域の面積も FTY720 群で優位に高値であった

(*P<0.05 values, Scale Bar = 10 μm)

【考察】

1)脊髄損傷急性期に対する薬物治療に期待される効能と FTY720 の特徴

SCI 急性期には、物理的損傷による 1 次損傷で起こる直接的な細胞壊死に引き続き、炎症や浮腫の進行に代表される様々な機序が自己崩壊の連鎖に繋がり 2 次損傷が誘発され、損傷範囲が拡大していくことが知られている。従って、急性期の局所幹細胞移植による治療効果は移植細胞の生着という観点からは限定されると考えられる。そのため、急性期から亜急性期に至るまでは、炎症などの surge をいかに抑制するかが重要と考えられ、多様な機序をターゲットとした薬剤治療の研究や臨床試験が進められ、現在リルゾールやミノサイクリン、G-CSF(granulocyte-colony stimulating factor)や HGF(hepatocyte growth factor)等の各種薬剤治療の実用化が期待されている。(Casha et al., 2012; Grossman et al., 2014; Kamiya et al., 2015; Kitamura et al., 2019)

既に多発性硬化症において内服薬として保険適応が通っている FTY720(fingolimod)は、漢方薬として知られる冬虫夏草の活性成分であるミリオシンの誘導体であり、生体内でリン酸化を受けて S1P₂を除く 4 つの S1P 受容体に対してアゴニストとして働く。特に S1P₁に対しては、この受容体の内在化(エンドサイトーシス)を誘導することで不活性化をまねく機能的アンタゴニストとして働き、末梢血液中の T リンパ球の数を低下させることで、強力な免疫抑制作用を発揮する(Fujita et al., 1994)。SCI 治療においても、その強力な抗炎症作用が 2 次損傷進行を抑制することが期待され、動物実験レベルでは良好な治療効果の報告がなされており、(Lee et al., 2009; Norimatsu et al., 2012; Wang et al., 2015)今後の研究継続による臨床応用が期待されている。また、

FTY720 は末梢神経損傷後の神経障害性疼痛に対しての有効性が動物実験レベルでは報告されているが(Sim-Selley et al., 2018)、脊髄損傷後の感覚障害に対する効果は十分に検討されていない。

2)本実験における FTY720 の治療効果とメカニズムの検証

今回我々が行った実験結果では、従来の実験と同様に運動機能の改善や全身の炎症反応の抑制、2 次損傷の軽減による最終的な損傷範囲の縮小といった治療効果以外にも、mechanical allodynia の進行抑制を示唆する結果がえられている。Bruce らの SCI クリップモデルにおける過去の報告では、脊損部尾側の脊髄後角における下降性疼痛抑制系に関連すると考えられるセロトニン神経の発現が非損傷群に比べて低下することが指摘されており、本研究でも HTT 染色陽性と判定された面積が FTY 群で高値であったため、下降性疼痛抑制系が vehicle 群に比べて保たれている可能性が考えられた。さらに、MOR 染色においても同様の結果を認めており、mechanical allodynia の進行が抑制された一つの要因とも考えられた。脊髄損傷以外の神経障害性疼痛モデルにおいての検証では、FTY720 が脊髄後角付近におけるグリア瘢痕形成や活性化マイクログリア浸潤を抑制することが疼痛抑制に繋がることも想定されており(Doolen et al., 2018)、本研究でも詳細には検討できていないが、FTY 群は脊損部尾側の GFAP 陽性領域の減少とマイクログリア浸潤が少なく、後角付近においても同様の結果が予想される。FTY720 は抗炎症作用による 2 次損傷を抑制するだけでなく、アストロサイトの S1P₁ レセプターの機能を阻害し、亜急性期以降に軸索再生を妨げるアストログリオシス形成も抑制することが知られており(Choi et al., 2011)、軸索残存や再生に有利に働いていると考えられる。

また、FTY720 は S1P の作用を通してタイトジャンクションを保持することで、血液脳関門の破綻を抑制している機序が想定されており(Czech et al., 2009)、本研究における実験結果においても、FTY 群は急性期の血管周囲のフィブリン漏出が減少している傾向が認められている。即ち、血中のリンパ球やマクロファージの組織への移行や炎症性サイトカインなどの組織への浸潤を妨げることで 2 次損傷を抑制するという機序も想定される。

3)本研究の問題点について

本研究の問題点としては、各種組織学的評価における 2 次損傷抑制の結果の機序を直接的に説明できる、分子生物学的メカニズムの検証が不十分であることが第一にあげられる。また、FTY720 の投与量の違いにおける治療効果の比較・検証がなされておらず、最適な投与量や投与方法・回数・タイミングについての考察ができていないことにある。

4) 本研究で新たに得られた知見と今後の発展性について

本研究においては、従来の FTY720 の SCI に対する効果の報告と同様に、炎症による 2 次損傷拡大やグリア瘢痕形成の抑制作用で、運動機能改善を促進するという結果の他にも、多彩な機序を通して SCI 後の疼痛抑制にも有効である可能性が示唆され、更なるメカニズムの解明に向けて研究継続が望まれる結果であった。これらの特徴は、後述する亜急性期の細胞移植による再生医療の進展という観点からも、移植細胞生着に有利な環境を整える働きと考えられ、多方面からの研究継続による更なる知見の蓄積と早期の臨床応用が期待される。

第 2 章 ラット亜急性期脊髄損傷に対する BMSC 細胞シートの治療効果の検証

【緒言】

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は、他の幹細胞に比較し採取・培養が比較的容易であり、癌化等のリスクに代表される副作用が少ない上、多量の栄養因子分泌力を有する特徴がある。さらに、脊髄損傷亜急性期における骨髄間葉系幹細胞の静脈内投与治療が期限・条件付きだが承認されており、一定の成果が期待されている。しかし、静脈投与単独で重篤な脊髄損傷の四肢麻痺や感覚障害・膀胱直腸障害を劇的に改善させる程の効果をもたらすとは考えにくく、適切な細胞投与方法や投与細胞数の検証も必要と考えられる。これまで報告されてきた動物実験レベルでは、脊髄損傷部周囲に各種の幹細胞髄内投与の研究も行われており、より高い治療効果も期待されているが、複数回の細胞移植は難しい上、更なる脊髄損傷誘発のリスクや細胞生着の足場の問題が残されており、最適な投与方法検証の模索が続いている。

また、細胞にアスコルビン酸を加えて培養することで、細胞間が強固に接着し単層の薄いシート状に剥離できる技術が確立され、温度応答性の dish を用いることで容易に組織に移植することが可能となるため、新たな細胞移植方法の選択肢として様々な臓器治療への応用が期待されている。

本章では、ラット大腿骨骨髓から BMSC を採取し培養・継代を行い、幹細胞シートを作成し、SCI 亜急性期における髄内直接幹細胞移植と比較した治療効果の結果について、組織学的評価を中心に検証することを目的とした。

【実験方法】

1)実験計画の概要

まず、細胞シート治療と細胞懸濁液髄液直接注入の治療効果を比較する目的で、以下の3つのグループを作成した。(具体的な作成方法については後述する)

- ①細胞シート移植群(sheet group :S 群)
- ②細胞直接注入群(direct injection group: D 群)
- ③コントロール群(control group: C 群)

実験プランとしては、脊髄損傷 1 週間後に細胞移植治療を行い、治療後 6 週目まで運動・感覚機能評価を 1 週間ごとに継続し、組織学的評価を目的にサクリファイスした。

2)ラット BMSC の分離・培養

ラットにおける骨髄間葉系幹細胞(bone marrow stromal cell: BMSC)の採取・培養方法は広く確立されており、様々なモデルで応用されている(Ito et al., 2012; Ito et al., 2017; Miyamoto et al., 2013; Sugiyama et al., 2011)。

以下すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。実験動物は 10 週齢の green fluorescence protein(GFP)遺伝子組み換え雌 SD ラット (Japan SLC Co., Ltd, Shizuoka, Japan)を使用した。

4.0% isoflurane, N₂O/O₂(70:30)の深麻酔下に頸椎脱臼を行いサクリファイスした後、両側大腿骨を関節の両端を含まず骨髄が露出する形で摘出した。2.5cc シリンジ内に 10%ヘパリン溶液(Mochida Pharmaceutical Co., Japan)を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Nissui, Japan)を吸引・21G 針を装着し、摘出した大腿骨の骨髄内に針を 5mm 前後刺しこみ、メディウムを計 5ml 通過させ、BMSC を含むメディウムを回収した。(左右の大腿骨から合計 10ml の BMSC 含有メディウムを回収)

これを 2×10^3 rpm, 15°C の条件で 5 分間遠心分離した後、上清を破棄し細胞を回収して 150 cm² collagen I coated flask に seeding し DMEM500ml に 10% fetal bovine serum(FBS)と 100U/mL ペニシリン G(SIGMA)を添加した培養液 20cc を加えて P0 とした。37°C, 5%CO₂ 下で 24 時間培養し、非接着細胞を除去するために培養液を交換した。

その後、2〜3 日に 1 回メディウム交換を行い、10 日以上培養継続後、十分にコンフルエンスになっていることを確認した上で、0.05% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)(Gibco)で細胞を浮遊させ 3〜4 回継代培養した。

3) ラット BMSC 細胞シートの作成と移植用の細胞準備

上述の方法で分離培養後継代した BMSC を、温度応答性の 3.5cm² dish である UP Cell®(CellSeed; Japan)に 5.0×10^5 seeding し、Minimum Essential Medium(MEM) α (Invitrogen, 32571-036) 500ml に 10% FBS、100U/mL ペニシリン G(SIGMA)と 82 μ g/mL のアスコルビン酸(Wako chemical industries, Japan)を添加した培養液を 2cc 加えて P4 または P5 とした。

7〜10 日で十分コンフルエンスになったことを確認後(Figure14 A)、dish を 20°C の環境におくと、30 分以内に単層の細胞シートが自然に剥離される(Figure14 B)ため、これを回収した。(Ito et al., 2017)回収した細胞を 0.05% trypsin-EDTA(Gibco)で分解し細胞数を計測した結果、 $1.2 \pm 0.2 \times 10^6$ 細胞数 /sheet であった。そのため、3.5cm dish で作成された約 8.8cm² のシートの細胞数がおおよそ 1.2×10^6 であるため、後述する 7.0×10^4 の髄内細胞直接移植と細胞

数を合わせることを目的に、細胞シートを 7×7 mm 大の正方形型にカットすることが必要であることが判明した

また、後述する直接髄注群(direct injection: DI)群の移植細胞の準備としては、上述の方法で分離培養後継代した BMSC をコラーゲンコート 3.5cm dish に 5.0×10^5 細胞数を seeding し、MEM α (Invitogen, 32571-036) 500ml に 10%FBS、100U/mL ペニシリン G(SIGMA)の培養液を 2cc 加えて P4 または P5 とし、7 ~10 日でトリプシンを加えて細胞を回収し、 $1 \times 10^4 / \mu\text{L}$ の細胞数となるように培養液と細胞の濃度を調整した。

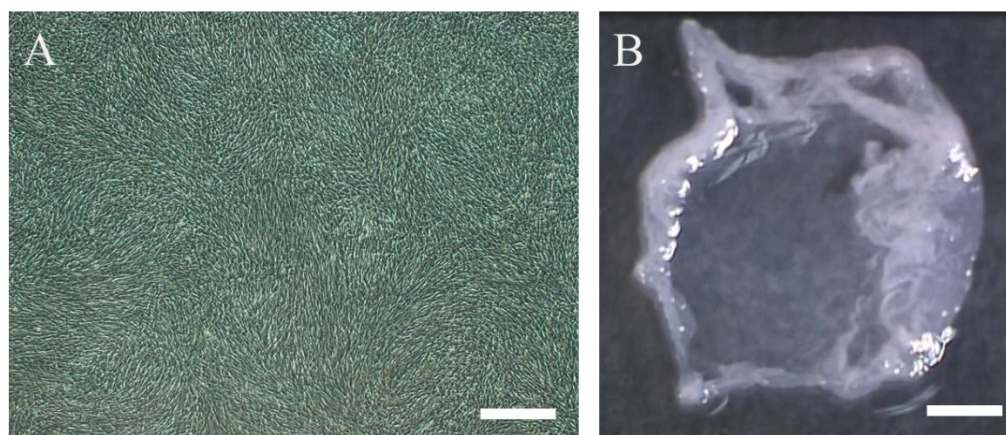


Figure 14. A:シート剥離前の BMSC 顕微鏡画像(Scale bar= $200 \mu\text{m}$)

B:DISH から剥離後の細胞シート (Scale bar= 5mm)

4) 幹細胞移植治療の方法

第一章で述べた方法で、SD ラット SCI クリップモデルを 60 匹作成した。SCI 翌日に後述の BBB スコアが 2 点以上認められる個体は、損傷不十分と判断しその後の実験継続から除外した。

1 .S 群の作成(n=20)

BMSC 細胞シートの移植手術は脊髄損傷 1 週間後に以下の方法で施行した。上述の方法で麻酔を導入・維持した後、背部の創部を再切開し切離した椎弓を慎重に再剥離することで、脊髄損傷部を露出させた。次に、ツベルクリン針で損傷部の背側硬膜をごく薄く切開し、ゼロピンで硬膜切開部分を頭尾側方向に数 mm 大に拡大した。さらに、上述の方法で準備した細胞シート (7×7 mm 大のシートは、移植時は数 mm 四方に縮まっている)を硬膜下に滑り込ませた後、(Figure15A)硬膜切開部分を 10-0 ナイロン糸で縫合(Figure15 B)し、再摘出した椎弓を硬膜上に戻して型通りに閉創した。

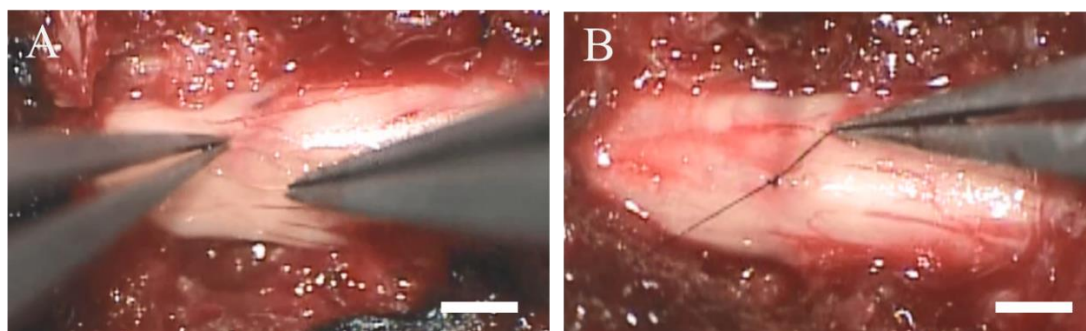


Figure 15. A:セルシートの硬膜下貼付時の画像 (Scale bar=1mm)

B:セルシート貼付後、硬膜縫合時の画像 (Scale bar=1mm)

2. D 群の作成(n=20)

細胞直接移植群に関する方法は以下の方法で施行した。

脊髄損傷 1 週間後に上述の方法で麻酔を導入・維持した後、背部の創部を再切開し切離した椎弓を再度剥離し、脊髄損傷部を露出させた。次に Th5 レベルの椎弓も切離した上で、定位手術装置(Model DKI-900; David Kopf Instruments, Tujunga, CA)に固定した。脊損部中心から 5mm 頭側の脊髄内に Hamilton シリンジの針を 1mm の深さになるように刺入し、上述の方法で調整した $7\mu\text{L}$ の細胞懸濁液を automatic microinjection pump を用いて 7 分間かけて注入した。(Chiba et al., 2009)

3.C 群の作成(n=20)

後述するコントロール群の作成における手術は、1 で述べた硬膜切開を行った後、細胞シートの移植を行わないで硬膜を縫合する手術を施行した。

5)運動・感覚機能の評価

細胞移植後の治療効果を検証するために、第一章と同様に BBB score と von Frey test を施行した。

6)組織学的検討

移植した BMSC やホストの脊髄を組織学的に検証する目的で、細胞移植 6 週間後(脊損後 7 週間後)に、生存した全ラットを上述の方法で安楽死させホルマリン灌流後 Th4-9 レベルの脊髄を椎体ごと摘出し固定した(軸索トレーサーを投与した個体を除く)。硬膜操作部の椎弓と脊髄の癒着による組織の損傷を防ぐため、ホルマリン固定完了後に EDTA・2Na(349-01865,DOJINDO, Japan),50mg/mL と EDTA・4Na (349-01885,DOJINDO, Japan) の濃度で PBS(-)に加えた脱灰液で 14 日間脱灰処置を行った。

その後、各グループで n=5 ずつ矢状断薄切り切片を作成した。また、他の個体より脊髄損傷部より 5mm 付近の頭側と尾側の脊髄横断切片を n=3 ずつ 1mm 厚で採取しパラフィン包埋し、10 μ m の厚さで薄切り切片を作成した。

以下の結果に示す組織学的評価における染色は第一章と同じ方法で行った。

また、移植した BMSC の行方と分化について評価を行う目的に、以下の 2 重蛍光免疫染色を行った。一次抗体として NeuN(1:100; MAB377, Billerica, MA, USA)、GFP antibody(dilution, 1:75; 2956S; Cell Signaling Technology, Japan)を用い室温で一時間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor594(1:200; A11005, Life technologies, USA)、Alexa Fluor488(1:200; A11008, Life technologies, USA)を室温で一時間反応させた。脊損中心部 5mm 頭側と尾側の中心部で顕微鏡下 200 倍の拡大視野でそれぞれランダムに 5 視野選択し、一視野内の GFP 陽性細胞の数をカウントし、そのうちの NeuN 陽性細胞の割合を測定した。(Ito et al., 2017)

7)統計学的手法

全データは、平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較には unpaired-*t* test, Mann Whitney U test を用いた。3 群間の比較には、Turkey's HSD test ,Steel-Dwass test を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に優位とした。

本章における実験プロトコルのシェーマを Figure16 に示す。

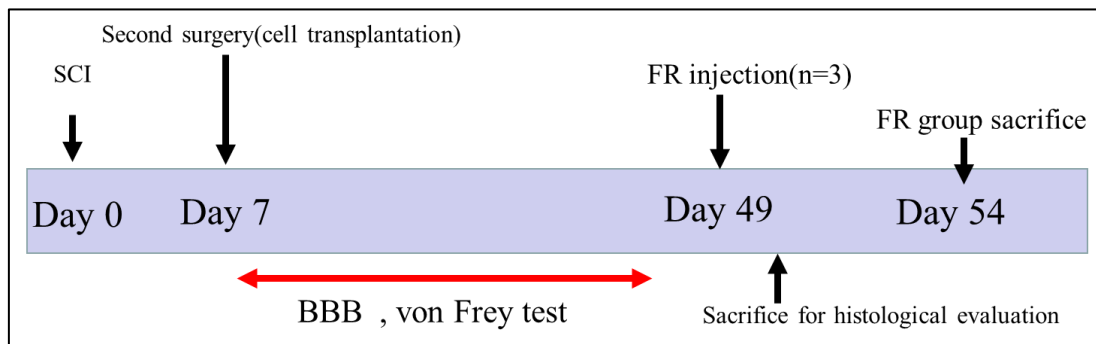


Figure 16 実験プロトコール

【実験結果】

1)運動・感覚機能評価

運動機能評価では、Figure17A に示すように、脊髄損傷翌日の BBB score は 1 点以下で重篤な対麻痺を示しており、コントロール群に示す通り、徐々にスコアは改善し最終的に BBB score が 7 点前後となり、中等度の脊髄損傷を認めている。細胞シート治療群では、シート移植後数週間後からコントロール群よりも優位に BBB score が上昇し、最終的に 12 前後の点数となっている。(p<0.01)

細胞移植群では、シート移植群に遅れて BBB score が改善し始め、最終的にコントロール群よりも優位にスコアが高くなるが、シート群の方が優位にスコアが高かった。(p<0.05)

メカニカルアロディニアを評価するために行った Von Frey monofilament test における疼痛閾値に関しては、Figure17B に示す通り、細胞シート治療群が他 2 群と比べて優位に高値となっており、感覚障害改善効果が高い可能性が示唆された。

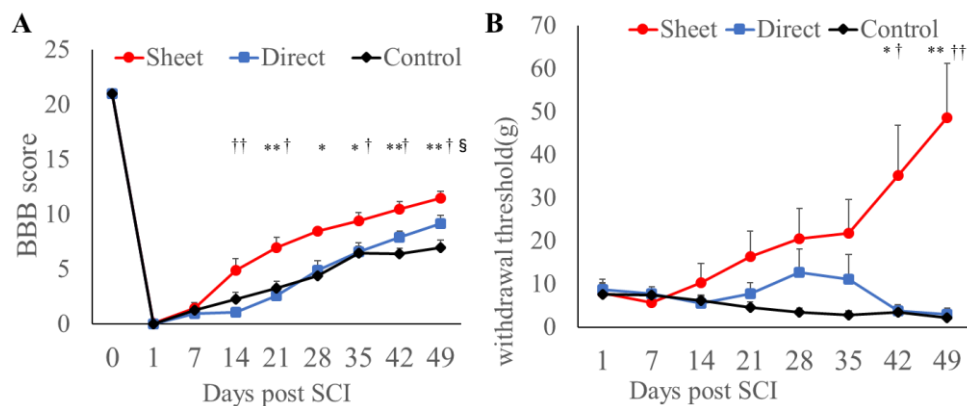


Figure 17. 細胞移植治療の運動・感覚機能の改善効果

A:運動機能評価の為にに行った BBB スコアは最終的にセルシート投与群、細胞直接注射群、コントロール群の順に高値となった。

B:感覚機能評価目的に施行した von Frey hair test における mechanical allodynia の評価では、細胞シート投与群で優位な改善効果をは認められた。(sheet: n=16,direct:n=14,control:n=13)

*: シート群とコントロール群の比較、†: シート群と直接注射群の比較

§: 直接注射群とコントロール群の比較 (*P<0.05 values , **P<0.01 values)

2) 脊損部の長さ・体積の評価

Figure 18D,E に示すように、脊損部長さ・体積は幹細胞移植群で優位に少ない傾向があり、最終的なダメージの拡大を抑制している可能性が示唆された。

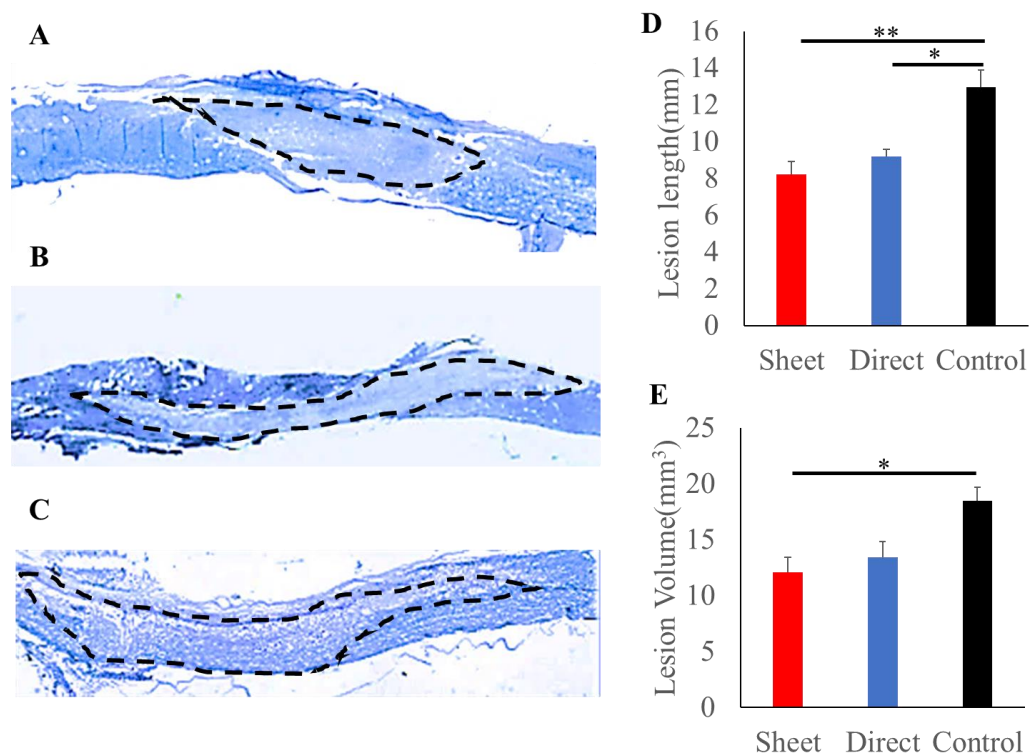


Figure18. 細胞治療の脊損部の長さ及び体積への影響

脊損 7 週後の脊髓矢状断切片における LFB+HE 染色像

A. シート群 B. 直接注射群 C. コントロール群

D. セルシート移植群も細胞直接注射群もコントロール群に比べて優位に脊損部の頭尾側方向の長さが低値であった。 (* $P < 0.05$ values, ** $P < 0.01$ values)

E. 脊損部の体積評価では、セルシート群がコントロール群に比較して優位に厳減少していた。 (* $P < 0.05$ values)

3) グリア瘢痕の評価

GFAP 染色による脊損部中心より末梢側の慢性期のグリア瘢痕範囲の評価でも、細胞シート群が他 2 群に比べて優位に少ない結果を認めており、グリア瘢痕形成抑制作用も高い可能性が示唆された。(Figure19D)

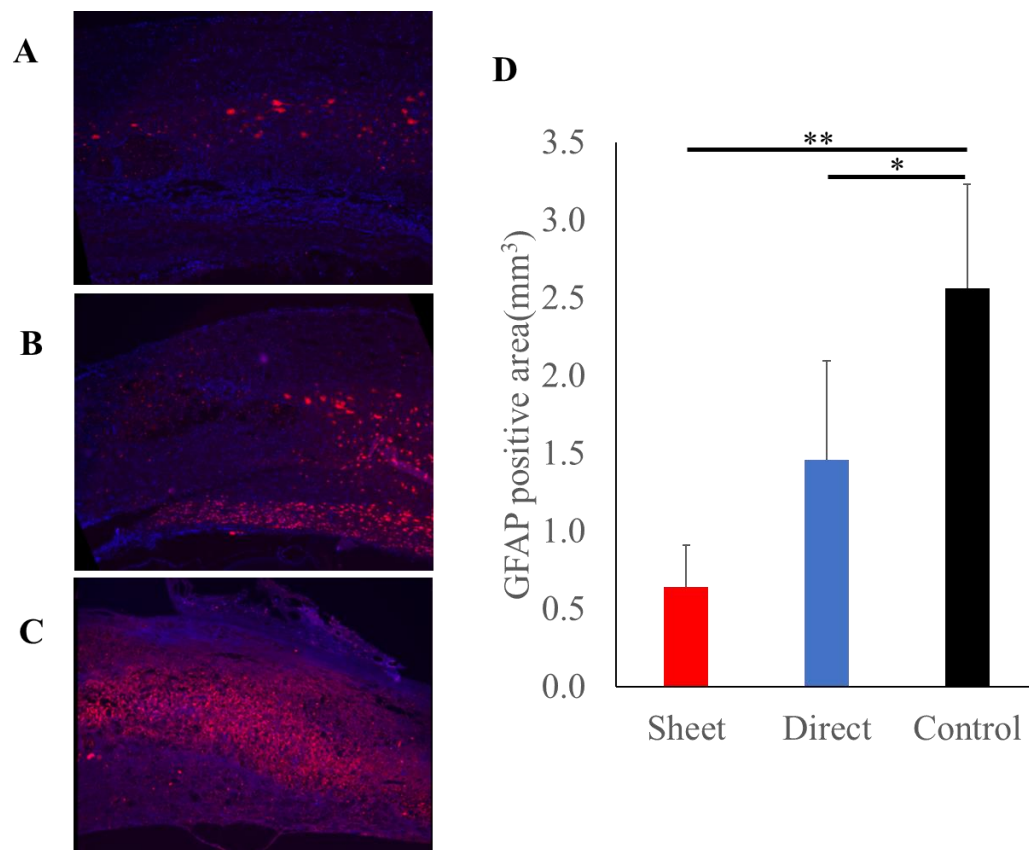


Figure 19. GFAP/DAPI 染色を用いた脊損部尾側におけるグリア瘢痕形成の評価

A セルシート投与群の画像(左端を脊損中心部に設定し尾側方向を観察)

B 直接注射群の画像、**C** コントロール群

D 細胞シート群及び直接注射群両者で脊損部以下のグリア瘢痕形成が優位に抑制されていた。(* $P < 0.05$ values, ** $P < 0.01$ values).

4)慢性期の炎症評価

Iba-1 染色による評価では、脊損頭側方向で細胞シート群がコントロール群に比べて優位にマクログリアが少なく、尾側方向でも有意差は出なかったが少ない傾向が示唆された。(Figure20B,C)

また、CD68 染色による評価では、脊損頭尾側方向ともに細胞シート移植群で活性化マクロファージ浸潤が優位に少なかった。(Figure20E,F)

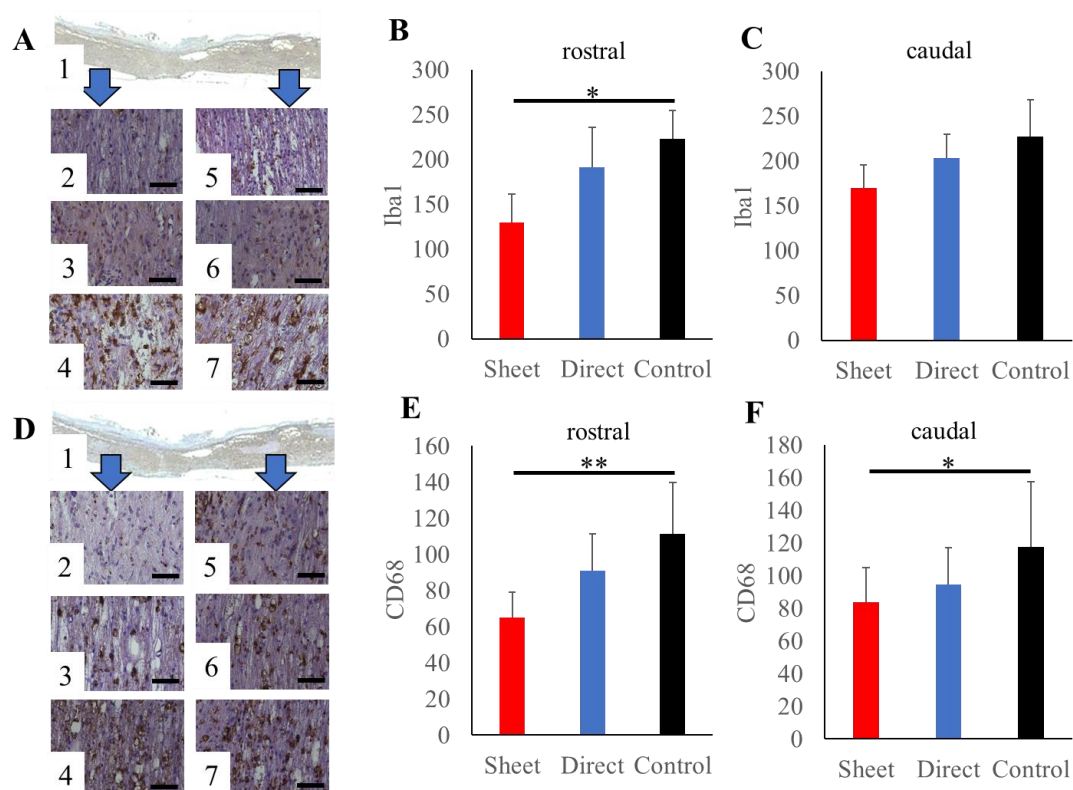


Figure20. 炎症に対する細胞移植治療の効果検証

A Iba-1 染色による Activated microglia 染色像

脊損 7 週後の組織における中心部から頭尾側両方向の拡大画像における細胞数をカウントして評価した

No1.: 脊髄矢状断の弱拡大像

No2.: シート群における脊損部から 3mm 頭側の強拡大像(N03,4 はそれぞれ:細胞直接注射群、コントロール群)

No5.: シート群における脊損部から 3mm 尾側の強拡大像(N06,7 はそれぞれ:細胞直接注射群、コントロール群)

(Scale bar=50 μ m.)

B,C 脊損頭側における Activated microglia は、コントロール群に比べてシート群で優位に減少しており、尾側方向では有意差はなかったが、シート群・細胞直接注射群の順に炎症細胞浸潤が抑制されている可能性が示唆された。

(* $P < 0.05$)

D CD68 染色による macrophage 浸潤の評価

No1.: 脊髄矢状断の弱拡大像

No2.: シート群における脊損部から 3mm 頭側の強拡大像(N03,4 はそれぞれ:細胞直接注射群、コントロール群)

No5.: シート群における脊損部から 3mm 尾側の強拡大像(N06,7 はそれぞれ:細胞直接注射群、コントロール群)

(Scale bar=50 μ m.)

E,F 脊損頭側・尾側で macrophage の浸潤数はコントロール群に比べてシート群で優位に少なかった。(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

5) 移植細胞の生着

脊損頭側の GFP 陽性細胞は、細胞直接注入群のみならず細胞シート移植群でも観察された。脊損尾側部分では、細胞シート移植群で多くの GFP 陽性細胞の生着が認められたが、有意差は無かった。NucN 陽性細胞の割合も、有意差を認めなかった。(Figure21C,D,E)

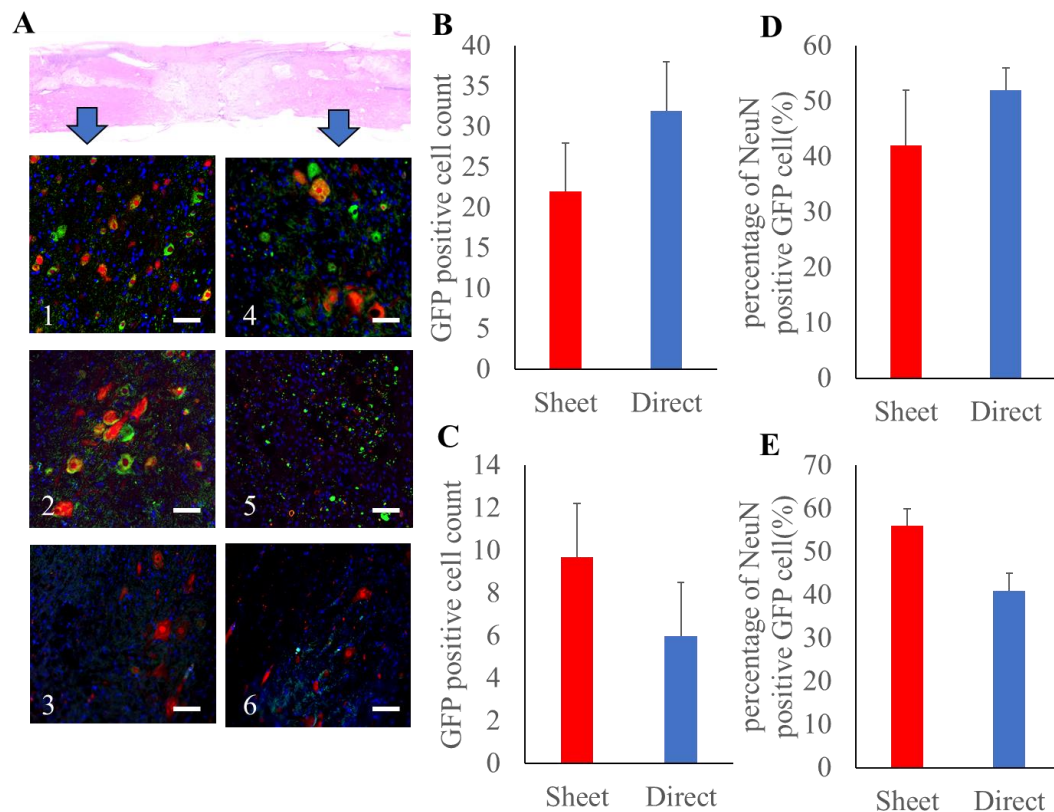


Figure21

A 脊損中心部から頭側・尾側それぞれ 5mm の脊髓内部における移植細胞の生着評価

GFP(緑)と NeuN(赤)の蛍光 2 重免疫染色を施行。

No.1:脊損頭側部のシートグループにおける染色像。GFP 陽性細胞の生着が認められ、一部は NucN 陽性の細胞も確認された。(Scale bar= 50 μ m)

No.2,3:細胞直接移植群、コントロール群の染色像。

No.4,5,6:脊損部尾側のシート群・髄内直接注射群・コントロール群の染色像

B,C 脊損部頭側・尾側における GFP 陽性細胞の 1 視野内の平均カウント数
脊損部頭側では髄内直接注射群で GFP 陽性細胞が多く、尾側ではシート群で多い傾向が示唆されたが、有意差は認めなかった。

D,E 脊損部頭側・尾側における GFP 細胞における NeuN 陽性細胞の割合も各群で差を認めなかった。

5)皮質脊髓路の評価

細胞治療群で優位に残存または再生したと考えられる軸索が多く認められた。
(Figure22D)

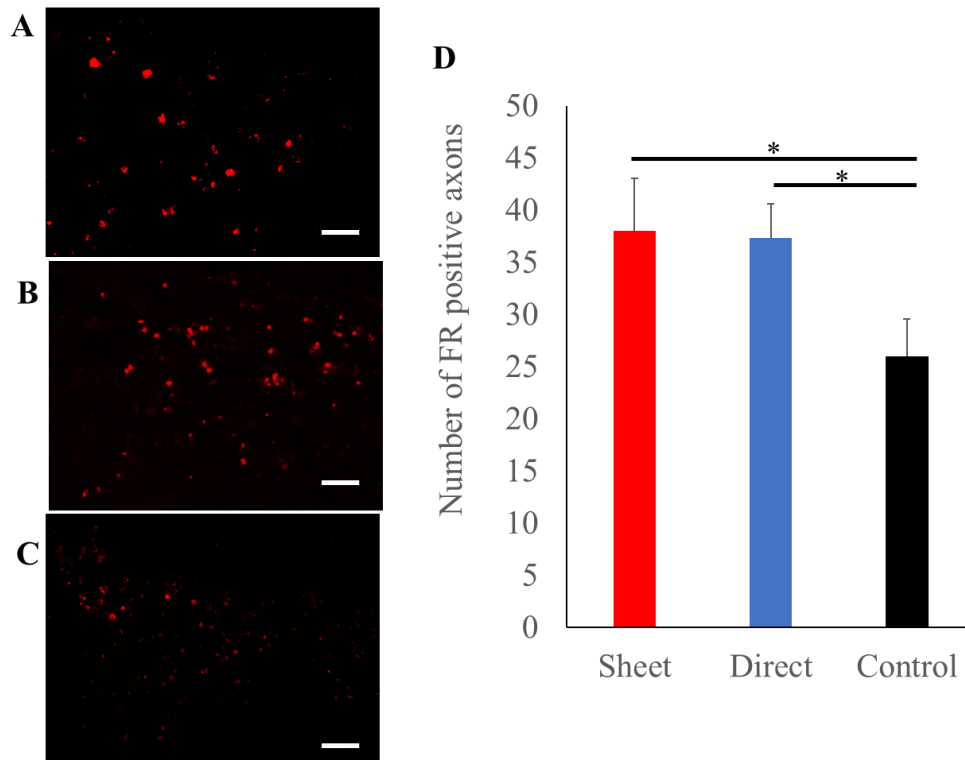


Figure22 軸索トレーサーを用いた脊損部尾側の皮質脊髓路における運動線維の評価

A 脊損7週後のシート群における皮質脊髓路の残存軸索数(Scale bar= 50 μ m).

B,C 直接注射群とコントロール群の残存線維.

D 残存軸索数は細胞治療群両者でコントロール群に比べて優位に多い結果を認めた(* $P < 0.05$)

6)後角における感覚関連線維の評価

脊髄損傷部末梢側の後角における MOR や HTT 染色では、細胞シート治療群で他2群に比べて陽性領域が優位に保たれていた。(Figure23E,J)

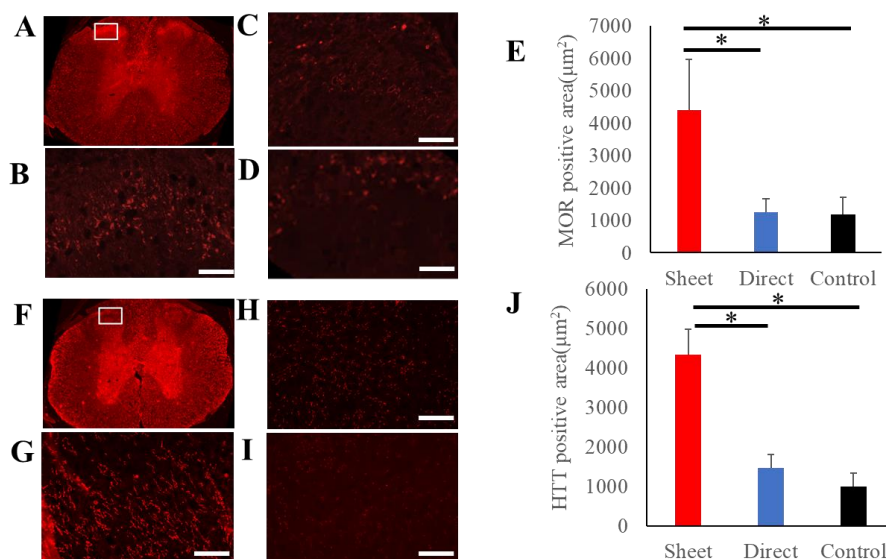


Figure23 感覚関連線維の染色評価

A 脊髄 axial 断面における MOR(μ opioid receptor, inter neuron) 染色像

B シート群における脊損部尾側の後角拡大像(Scale bar= 20 μm)

C,D 直接注射群とコントロール群の脊損部尾側後角拡大画像

E 視野内の MOR 陽性領域はシート群で他 2 群と比較し優位に保たれていたが (*P<0.05 values).

F 脊髄 axial 断面における HTT(hydroxytryptamine transporter, descending pain inhibitory pathway)染色像

G,H,I それぞれシート群、髄内直接移植群、コントロール群の脊損部尾側後角拡大画像

J HTT 陽性領域もシート群で他 2 群と比較し優高値であった。(*P<0.05 values).

【考察】

1)幹細胞移植治療のメカニズムと投与方法について

中枢神経系の幹細胞移植治療では、多くの治療メカニズムが想定されており、主に 2 つの機序にわけられる。1 つ目は、移植した細胞が失われた神経系細胞に分化して機能回復を促進させるメカニズムである。次に、移植細胞からの神経栄養因子、サイトカイン、エキソソームの分泌が損傷領域に対して複数の効果を示す損傷保護効果が重要と言われている。これにより、損傷急性期から続き 2 次損傷を誘発する劇的なサージが抑制され、移植細胞が長く生着し、軸索の再ミエリン化や血管新生を促す環境を提供するとともに、神経再生を妨げるグリア瘢痕も抑制されることで、機能回復が促進されると考えられている。

亜急性期脊髄損傷に対する幹細胞移植による再生医療の研究は、動物実験レベルで多くなされている。(Kawabata et al., 2016; Nagoshi and Okano, 2018; Nakamura and Okano, 2013; Okano and Yamanaka, 2014; Takano et al., 2017)これらの研究結果の蓄積から、脊髄損傷に対する幹細胞投与による再生医療にお

ける細胞移植の時期として、移植細胞の生着という観点からは、急性期の炎症や浮腫が収束に向かい、グリア瘢痕が形成される前の亜急性期が最も適していると考えられる。(Kumamaru et al., 2013)

しかし、適切な細胞投与方法や細胞数の細かな検証はまだ不十分であり、検証の余地があると考えられる。

また、脊髄損傷に対する細胞投与ルートとして、多数の移植細胞の損傷部付近への生着が期待できるという観点からは、損傷部付近髄内への細胞直接注射が最も効果的と考えられる。しかし、細胞直接注射は、脊髄の2次損傷を誘発するリスクがあり、注入細胞の注入トラクトからの流出の問題、繰り返しの投与が難しいといったデメリットも考えられるため、より効率的な細胞生着が期待でき、安全な細胞投与方法の確立が重要と考えられる。

これらの欠点を克服できる可能性がある、細胞シートによる再生医療のメリットとして、シートそのものが細胞生着に重要な役割を果たす足場の働きを有していることが考えられる。多くの細胞を効率よく損傷部付近の組織に安全に供給可能となることで、一部は臨床応用が開始されており、良好な治療結果が期待されている。

実際、ラット脊髄半切モデルに対する急性期細胞シートの治療効果に関する研究が行われており、良好な結果が報告されている。(Okuda et al., 2017)

2)本実験における幹細胞投与方法による治療効果の違いと組織学的評価の考察

本実験では、同数の幹細胞直接髄内投与と比較して効果の検証を行った結果、細胞シート治療群の運動・感覚機能がコントロール群だけでなく髄内直接投与群に比べても優位に改善され、脊髄損傷範囲および損傷部周囲の炎症細胞浸潤、グリア瘢痕の拡大を抑制する効果も認められた。また、軸索トレーサーであるFRによる脊髄損傷部尾側のdCSTにおける残存・再生軸索の評価では、細胞移植群でコントロール群に比べて優位に多く、細胞シート群と直接注射群では有意差は認められなかった。

しかし、損傷部末梢側後角における介在ニューロンの残存を反映していると思われるMOR抗体や下降性疼痛抑制系の評価を目的に行ったHTT抗体によるセロトニン神経軸索の蛍光免疫染色の結果は、細胞シート移植群で他の群に比べて優位に保たれており、von Frey monofilament testで細胞シート群のmechanical allodyniaが抑制された結果と関連している可能性が考えられた。さらに、細胞シート群では、細胞移植治療6週後のBBBスコアが細胞直接移植群に比べて優位に高かったが、これは疼痛閾値の上昇で運動機能の改善にも有利に働いた可能性も考えられる結果であった。

また、細胞シート群は損傷部背側硬膜下に貼付する形で移植したが、移植 6 週後の髄内移植細胞生着の評価では、脊損部頭尾側共に髄内に GFP 陽性細胞の生着を認めており、髄内直接細胞移植と比較しても有意差の無い髄内生着数を認め、細胞の遊走が認められる結果であった。さらに、直接注射群に比べて、脊損尾側で生着細胞数が多くなる可能性(今回の解析では有意差は認めないが)があったが、これは投与部位の違いによる影響を反映している可能性も示唆された。さらに、生着した GFP 細胞の一部は過去の報告と同様に NeuN 染色で陽性を示していた。(Chiba et al., 2009)

3)本研究の問題点について

幹細胞投与群間における上記結果の違いをもたらす原因として考えられるのは、細胞シートが足場としての役割も有しているため、移植細胞がより安定性して長時間働いていた可能性が考えられるが、組織学的評価は 6 週間後のみしかなされていないため、検証が難しい点があげられる。また、移植幹細胞数が同じであっても、そもそも細胞シートの状態で存在する場合と細胞懸濁液の状態で存在する場合では、液性因子の分泌能の違いなどが生じていた可能性も考えられ、BDNF や HGF といった液性因子の評価も重要となると考えられる。

さらに、移植幹細胞の違いによる治療効果の検証もできていないため、最適な移植細胞数を検証するためにも追加評価を行う余地が残されている。

また、細胞シート移植群で優位な疼痛閾値改善効果を認めた結果に関して、十分な直接的な解明がなされていないため、さらに詳しい検証が重要となる。一つの可能性としては、硬膜下脊髄背側に細胞シートを貼付したことにより、最も近くに存在する構造である感覚関連の情報処理に密接に関連する後角や下降性疼痛抑制系に治療効果がより強く働いた可能性も考えられ、直接の関連の証明を行うことが重要となる。

もう一つの問題点としては、他の幹細胞種を用いた実験を行った場合に、細胞直接移植とシート移植で同様の結果が出るのかが不明であり、幹細胞種の違いにおける結果の差異も検証することが望まれる。

また、ラット脊髄損傷モデルに対しては、本実験で使用された 7×7mm 大以上の大きさのシートの移植は手技的に非常に困難となるため、よりたくさんの細胞数からなるシートの移植と詳細な病理組織学的評価を行う場合は、さらに大型の動物での実験が必要になると考えられる。

4)細胞シート移植治療の臨床応用の可能性について

SCI の患者の多くは、損傷レベル以下の感覚の消失だけでなく、しばしば徐々に悪化する痛みや痺れを経験することが知られているが(Siddall et al., 2003;

Widerstrom-Noga et al., 1999)、効果的な治療法が少ないため、日常生活に大きな影響を及ぼすことがある。痛みは身体的、精神的、社会的機能の低下と深く関係(Jensen et al., 2007; Richards et al., 1980; Stormer et al., 1997; Summers et al., 1991)しており、睡眠や日常生活を妨げることにより運動を制限する以上の機能障害も連鎖的に引き起こしていく可能性がある。感覚障害そのものに加えてこうした原因が複雑に絡み合い、機能回復に重要な役割を果たすリハビリそのものが継続困難になり、拘縮や全身状態の悪化が進みさらに症状が重篤化するなどの悪循環に陥ることも稀では無い。

また、脊髄損傷後の進行性の痛みや痺れに苦しむ患者の多くは、主に慢性期となっており、脊髄刺激療法に代表されるニューロモデュレーション治療を中心とした治療も検証されているが、劇的な症状改善効果が認められる例は多くは無い。今回の実験結果から、損傷部の脊髄背側にシート状の幹細胞移植を行うことで、脊髄後角の異常な環境に保護的な作用をもたらし痛みを改善させたという機序も想定され、動物実験の検証で具体的な作用機序の解明が進めば、慢性期の脊髄損傷患者の治療にも応用できる可能性が考えられた。

考察

脊髄損傷における重要な後遺症の一つとして、進行性に悪化する感覚障害があげられる。特に、疼痛に関しては、運動機能の更なる悪化につながるだけでなく、心理面でも著しい悪影響を及ぼし、QOL を大幅に低下させるため、有効な治療方法開発が望まれる。しかし、多くは薬物治療に代表される対症療法が主体となっており、運動機能や自律神経機能と同様に、劇的な改善効果をもたらす確立された治療方法は少なく、様々な観点からの研究継続が重要となる。

第一章・第二章でそれぞれ検証した、ラット SCI 急性期 FTY720 投与や亜急性期硬膜下幹細胞シート移植による治療は、いずれも運動機能の改善だけでは無く、想定される以上の疼痛抑制効果ももたらしめている可能性が示唆された。炎症・グリア瘢痕形成の抑制に加えて、それぞれ異なる機序を通して疼痛抑制効果ももたらしめていることが想定されたため、感覚障害改善の機序解明に焦点をあてた新たな動物実験を行うことで、脊髄損傷患者における感覚障害改善に役立つ新たな研究結果がもたらされる可能性がある。

本実験でも行われたように、FTY720 はラット脊損モデルに対しては腹腔内投与を行うだけで十分な治療効果を認めており、細胞移植治療と組み合わせた実験計画を立てることも容易に可能となる。他家細胞移植において有利に働く免疫抑制作用に加えて、移植された幹細胞の生着に有利な様々な条件を整える働きが、本実験でも明らかにされているため、第二章で行われた BMSC 細胞シート移植の治療効果をさらに高める可能性も期待され、今後の研究進展による併用療法の検証と早期の臨床応用が期待される。

総括および結論

- 1) ラット急性期脊髄損傷モデルにおける FTY720 の治療効果を検証した結果、運動機能改善効果に加えて、強い疼痛抑制効果を有する可能性が示唆された。
- 2) FTY720 の脊髄損傷に対する作用機序として、炎症や血液脊髄関門の破綻を抑制しグリア瘢痕形成を妨げ、神経再生を促す環境を整える働きが考えられた。
- 3) ラット亜急性期脊髄損傷モデルの BMSC 細胞シート移植では、髄内直接細胞投与よりも、治療効果が高い可能性が示唆された。
- 4) 細胞シート移植は、髄内直接投与による 2 次損傷のリスクが少なく、脊髄背側の硬膜下に移植することで、疼痛抑制にも優位に働いていると考えられた。

脊髄損傷急性期における FTY720 投与や亜急性期 BMSC 細胞シートの脊髄背側硬膜下移植治療は、脊損後の疼痛改善効果を有する可能性があり、機序解明に向けた多方面からの研究継続が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださいました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科分野教授 寶金清博先生に謝意を表します。併せて本研究全般にわたり直接ご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野 神経細胞治療部門特任准教授 川堀真人先生・北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野助教/北海道大学病院脳神経外科診療講師 関俊隆先生に深く感謝致します。また、組織学的評価のご教示を頂いた北海道大学大学院医学研究科解剖発生講座教授 渡辺雅彦先生・助教 今野幸太郎先生に深謝致します。

最後に、本研究に多大なご協力を頂きました、実験助手 長島理香様をはじめ研究助手の方々と脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない

引用文献

- Basso, D.M., Beattie, M.S., and Bresnahan, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12, 1-21.
- Casha, S., Zygun, D., McGowan, M.D., Bains, I., Yong, V.W., and Hurlbert, R.J. (2012). Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain* 135, 1224-1236.
- Chiba, Y., Kuroda, S., Maruichi, K., Osanai, T., Hokari, M., Yano, S., Shichinohe, H., Hida, K., and Iwasaki, Y. (2009). Transplanted bone marrow stromal cells promote axonal regeneration and improve motor function in a rat spinal cord injury model. *Neurosurgery* 64, 991-999; discussion 999-1000.
- Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., *et al.* (2011). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 751-756.
- Czech, B., Pfeilschifter, W., Mazaheri-Omrani, N., Strobel, M.A., Kahles, T., Neumann-Haefelin, T., Rami, A., Huwiler, A., and Pfeilschifter, J. (2009). The immunomodulatory sphingosine 1-phosphate analog FTY720 reduces lesion size and improves neurological outcome in a mouse model of cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 251-256.
- Dohrmann, G.J., and Panjabi, M.M. (1976). "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol* 6, 263-267.
- Doolen, S., Iannitti, T., Donahue, R.R., Shaw, B.C., Grachen, C.M., and Taylor, B.K. (2018). Fingolimod reduces neuropathic pain behaviors in a mouse model of multiple sclerosis by a sphingosine-1 phosphate receptor 1-dependent inhibition of central sensitization in the dorsal horn. *Pain* 159, 224-238.
- Finnerup, N.B., Norrbrink, C., Trok, K., Piehl, F., Johannesen, I.L., Sorensen, J.C., Jensen, T.S., and Werhagen, L. (2014). Phenotypes and predictors of pain following traumatic spinal cord injury: a prospective study. *J Pain* 15, 40-48.
- Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y., and Okumoto, T. (1994). Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 208-215.
- Grossman, R.G., Fehlings, M.G., Frankowski, R.F., Burau, K.D., Chow, D.S., Tator, C., Teng, A., Toup, E.G., Harrop, J.S., Aarabi, B., *et al.* (2014). A prospective, multicenter, phase I matched-comparison group trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy of riluzole in patients with traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 31, 239-255.
- Ito, M., Kuroda, S., Sugiyama, T., Maruichi, K., Kawabori, M., Nakayama, N., Houkin, K., and Iwasaki, Y. (2012). Transplanted bone marrow stromal cells protect neurovascular units and ameliorate brain damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Neuropathology* 32, 522-533.
- Ito, M., Shichinohe, H., Houkin, K., and Kuroda, S. (2017). Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat brain infarct. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 375-381.
- Jensen, M.P., Kuehn, C.M., Amtmann, D., and Cardenas, D.D. (2007). Symptom burden in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88, 638-645.
- Jonas, E., Sjoqvist, S., Elbe, P., Kanai, N., Enger, J., Haas, S.L., Mohkles-Barakat, A., Okano, T., Takagi, R., Ohki, T., *et al.* (2016). Transplantation of tissue-engineered cell sheets for stricture prevention after endoscopic submucosal dissection of the oesophagus. *United European Gastroenterol J* 4, 741-753.
- Kamiya, K., Koda, M., Furuya, T., Kato, K., Takahashi, H., Sakuma, T., Inada, T., Ota, M., Maki, S., Okawa, A., *et al.* (2015). Neuroprotective therapy with granulocyte colony-stimulating factor in acute spinal cord injury: a comparison with high-dose methylprednisolone as a historical control. *Eur Spine J* 24, 963-967.

Kawabata, S., Takano, M., Numasawa-Kuroiwa, Y., Itakura, G., Kobayashi, Y., Nishiyama, Y., Sugai, K., Nishimura, S., Iwai, H., Isoda, M., *et al.* (2016). Grafted Human iPS Cell-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells Contribute to Robust Remyelination of Demyelinated Axons after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports* 6, 1-8.

Kawabori, M., Hokari, M., Zheng, Z., Kim, J.Y., Calosing, C., Hsieh, C.L., Nakamura, M.C., and Yenari, M.A. (2013). Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 Correlates to Hypothermic Neuroprotection in Ischemic Stroke. *Ther Hypothermia Temp Manag* 3, 189-198.

Kawabori, M., Kacimi, R., Kauppinen, T., Calosing, C., Kim, J.Y., Hsieh, C.L., Nakamura, M.C., and Yenari, M.A. (2015). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci* 35, 3384-3396.

Kitamura, K., Nagoshi, N., Tsuji, O., Matsumoto, M., Okano, H., and Nakamura, M. (2019). Application of Hepatocyte Growth Factor for Acute Spinal Cord Injury: The Road from Basic Studies to Human Treatment. *Int J Mol Sci* 20.

Kokubo, M., Sato, M., Yamato, M., Mitani, G., Kutsuna, T., Ebihara, G., Okano, T., and Mochida, J. (2016). Characterization of chondrocyte sheets prepared using a co-culture method with temperature-responsive culture inserts. *J Tissue Eng Regen Med* 10, 486-495.

Kudo, T., Konno, K., Uchigashima, M., Yanagawa, Y., Sora, I., Minami, M., and Watanabe, M. (2014). GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. *Eur J Neurosci* 39, 1796-1809.

Kumamaru, H., Saiwai, H., Kubota, K., Kobayakawa, K., Yokota, K., Ohkawa, Y., Shiba, K., Iwamoto, Y., and Okada, S. (2013). Therapeutic activities of engrafted neural stem/precursor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells* 31, 1535-1547.

Lee, K.D., Chow, W.N., Sato-Bigbee, C., Graf, M.R., Graham, R.S., Colello, R.J., Young, H.F., and Mathern, B.E. (2009). FTY720 reduces inflammation and promotes functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 26, 2335-2344.

Miyamoto, M., Kuroda, S., Zhao, S., Magota, K., Shichinohe, H., Houkin, K., Kuge, Y., and Tamaki, N. (2013). Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: a serial 18F-FDG PET study. *J Nucl Med* 54, 145-150.

Nagoshi, N., and Okano, H. (2018). iPSC-derived neural precursor cells: potential for cell transplantation therapy in spinal cord injury. *Cell Mol Life Sci* 75, 989-1000.

Nakamura, M., and Okano, H. (2013). Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 23, 70-80.

Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., *et al.* (2004). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351, 1187-1196.

Norimatsu, Y., Ohmori, T., Kimura, A., Madoiwa, S., Mimuro, J., Seichi, A., Yatomi, Y., Hoshino, Y., and Sakata, Y. (2012). FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol* 180, 1625-1635.

Ohki, T., Yamato, M., Ota, M., Takagi, R., Murakami, D., Kondo, M., Sasaki, R., Namiki, H., Okano, T., and Yamamoto, M. (2012). Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* 143, 582-588 e582.

Okano, H., and Yamanaka, S. (2014). iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain* 7, 22.

Okuda, A., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Shimizu, T., Shigematsu, H., Iwata, E., Morimoto, Y., Masuda, K., Koizumi, M., Akahane, M., *et al.* (2017). Bone marrow stromal cell sheets may promote axonal regeneration and functional recovery with suppression of glial scar formation after spinal cord transection injury in rats. *J Neurosurg Spine* 26, 388-395.

Poon, P.C., Gupta, D., Shoichet, M.S., and Tator, C.H. (2007). Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, 2853-2859.

- Richards, J.S., Meredith, R.L., Nepomuceno, C., Fine, P.R., and Bennett, G. (1980). Psycho-social aspects of chronic pain in spinal cord injury. *Pain* *8*, 355-366.
- Rose, M., Robinson, J.E., Ells, P., and Cole, J.D. (1988). Pain following spinal cord injury: results from a postal survey. *Pain* *34*, 101-102.
- Sawa, Y. (2017). [Surgical Regeneration Therapy Using Myoblast Sheets for Severe Heart Failure]. *Kyobu Geka* *70*, 9-13.
- Seki, T., and Fehlings, M.G. (2008). Mechanistic insights into posttraumatic syringomyelia based on a novel in vivo animal model. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine* *8*, 365-375.
- Seki, T., Hida, K., Tada, M., Koyanagi, I., and Iwasaki, Y. (2002). Graded contusion model of the mouse spinal cord using a pneumatic impact device. *Neurosurgery* *50*, 1075-1081; discussion 1081-1072.
- Siddall, P.J., McClelland, J.M., Rutkowski, S.B., and Cousins, M.J. (2003). A longitudinal study of the prevalence and characteristics of pain in the first 5 years following spinal cord injury. *Pain* *103*, 249-257.
- Sim-Selley, L.J., Wilkerson, J.L., Burston, J.J., Hauser, K.F., McLane, V., Welch, S.P., Lichtman, A.H., and Selley, D.E. (2018). Differential Tolerance to FTY720-Induced Antinociception in Acute Thermal and Nerve Injury Mouse Pain Models: Role of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* *366*, 509-518.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., and Somogyi, P. (2004). GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci* *19*, 552-569.
- Stormer, S., Gerner, H.J., Gruninger, W., Metzmacher, K., Follinger, S., Wienke, C., Aldinger, W., Walker, N., Zimmermann, M., and Paeslack, V. (1997). Chronic pain/dysaesthesiae in spinal cord injury patients: results of a multicentre study. *Spinal Cord* *35*, 446-455.
- Sugiyama, T., Kuroda, S., Osanai, T., Shichinohe, H., Kuge, Y., Ito, M., Kawabori, M., and Iwasaki, Y. (2011). Near-infrared fluorescence labeling allows noninvasive tracking of bone marrow stromal cells transplanted into rat infarct brain. *Neurosurgery* *68*, 1036-1047; discussion 1047.
- Summers, J.D., Rapoff, M.A., Varghese, G., Porter, K., and Palmer, R.E. (1991). Psychosocial factors in chronic spinal cord injury pain. *Pain* *47*, 183-189.
- Takano, M., Kawabata, S., Shibata, S., Yasuda, A., Nori, S., Tsuji, O., Nagoshi, N., Iwanami, A., Ebise, H., Horiuchi, K., *et al.* (2017). Enhanced Functional Recovery from Spinal Cord Injury in Aged Mice after Stem Cell Transplantation through HGF Induction. *Stem Cell Reports* *8*, 509-518.
- Wang, J., Wang, J., Lu, P., Cai, Y., Wang, Y., Hong, L., Ren, H., Heng, B.C., Liu, H., Zhou, J., *et al.* (2015). Local delivery of FTY720 in PCL membrane improves SCI functional recovery by reducing reactive astrogliosis. *Biomaterials* *62*, 76-87.
- Widerstrom-Noga, E.G., Duncan, R., Felipe-Cuervo, E., and Turk, D.C. (2002). Assessment of the impact of pain and impairments associated with spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil* *83*, 395-404.
- Widerstrom-Noga, E.G., Felipe-Cuervo, E., Broton, J.G., Duncan, R.C., and Yeziarski, R.P. (1999). Perceived difficulty in dealing with consequences of spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* *80*, 580-586.
- Yamamoto, R., Miyagawa, S., Toda, K., Kainuma, S., Yoshioka, D., Yoshikawa, Y., Hata, H., Ueno, T., Kuratani, T., and Sawa, Y. (2019). Long-Term Outcome of Ischemic Cardiomyopathy After Autologous Myoblast Cell-Sheet Implantation. *Ann Thorac Surg* *108*, e303-e306.