

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592194

研究課題名(和文)末梢神経修復時における、自家骨髄細胞が産生する脳由来神経栄養因子の重要性の解析

研究課題名(英文)Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve

研究代表者

森 幹士(Mori, Kanji)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：30467386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経障害の修復過程の詳細は未解明のままです。神経栄養因子とは、神経細胞の発生・成長・維持・再生を促進させる物質の総称です。そのひとつである脳由来神経栄養因子(BDNF)は、末梢神経系ではシュワン細胞や線維芽細胞で産生され、末梢ニューロンの生存・維持、発達などへの関与が報告されています。しかし、末梢神経障害修復時におけるBDNFの役割や供給源となる細胞についてはよく解っていません。本研究により、末梢神経障害修復時には、自家骨髄細胞が神経障害の局所へと動員され、この自家骨髄由来細胞より分泌されるBDNFが末梢神経再生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulates peripheral nerve regeneration. However, the origin of BDNF and its precise effect on nerve repair have not been clarified. In the present study, we examined the role of BDNF from bone marrow derived cells (BMDCs) in post-injury nerve repair. For the evaluation of BDNF from BMDCs, studies with bone marrow transplantation (BMT) were performed. We found that nerve function of BDNF knockout mice was significantly lower than that of control mice. BDNF expression was very faint before injury, but was dramatically increased after injury in the distal segment from the crush site. BDNF expression was mainly co-localized with CD45 in BMDCs, which was further confirmed by the appearance of GFP-positive cells in the BMT study. These results suggested that BDNF played an important role in peripheral nerve repair. In addition, BMDCs were recruited for the nerve injury site and BDNF derived from these BMDCs has an essential role in nerve repair.

研究分野：医歯薬学

キーワード：BDNF 末梢神経障害 神経修復

#### 1. 研究開始当初の背景

末梢神経障害例では、ある程度の神経線維の再生を期待することが出来ますが、その修復過程の詳細は未解明のままです。神経栄養因子(Neurotrophin)とは、神経細胞の発生・成長・維持・再生を促進させる物質の総称です。そのひとつである脳由来神経栄養因子(BDNF)は、末梢神経系ではシュワン細胞および線維芽細胞で産生され、末梢ニューロンの生存・維持、発達などに関与しているとされています。しかし、末梢神経障害修復時におけるその役割や供給源となる細胞についてはよく解っていません。

#### 2. 研究の目的

BDNFは、中枢および末梢神経系に広く存在する神経栄養因子です。末梢神経障害の回復においても、BDNFが関与することは既に報告されていますが、その供給源や作用経路などの詳細については明らかにされていません。一方、神経細胞のみならず組織障害の修復には骨髄由来幹細胞が重要な働きを担うことが証明されています。そこで我々は、「末梢神経障害修復のために局所へと動員された自家骨髄由来細胞より分泌されるBDNFが末梢神経再生に重要な役割を果たす」との仮説を立て、これを証明することを本研究の目的としました。

#### 3. 研究の方法

BDNFの発現のみ欠いたBDNFノックアウトマウス、および骨髄細胞のみGFPの発光を認めるGFPキメラマウスを作製し、正常マウスと比較検討を行った。坐骨神経圧挫モデルは、マウスの左坐骨神経を露出し脳血管クリップで60秒間圧挫することにより作成した。末梢神経障害修復状況について、経時的に評価を行った。Sciatic Functional Indexスコアやロータロッドトレッドミルテストによる機能的な評価に加え、電気生理学的評価を行った。末梢神経障害部位への骨髄細胞の動員や局所でのBDNF発現は、分子生物学的、組織学的にも検討を行った。

#### 4. 研究成果

BDNFのみ欠いたBDNFノックアウトマウスでは、BDNFを正常に発現するコントロールマウスに比べ、神経障害後の回復が機能的、電気生理学的に有意に遅れることが判明した。また、組織化学的な検討にて、坐骨神経損傷前には局所におけるBDNFとGFPとの発現が確認できないが、坐骨神経損傷後には、神経損傷部の遠位において顕著なBDNFの発現が確認でき、この傾向は、末梢神経障害後4週経過時以降に特に明らかとなった。さらに、骨髄由来の細胞であるGFP陽性細胞の発現もBDNFの発現にオーバーラップすることが確認された。損傷のない坐骨神経においては、GFPおよびGFP陽性細胞の発現はほぼ確認できなかった。

分子生物学的な検討により、現在発現が報告されているBDNFの9つのスプライスバリエーションのうち、スプライスバリエーション5のみが発現していること、このスプライスバリエーション5の発現は神経損傷後1~2週間でピークに達し、これは骨髄由来のGFP陽性細胞の局所への動員時期と一致することが判明した。以上より、末梢神経障害修復時には、自家骨髄細胞が神経障害の局所へと動員され、この自家骨髄由来細胞より分泌されるBDNFが末梢神経再生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

#### 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16件)

1. Mimura T, Imai S, Kawasaki T, Furuya Y, Mori K, Matsusue Y. Late-emerging Lethal Exacerbation of Cardiomyopathy in a Patient with Mitochondrial Myopathy after Total Hip Arthroplasty. *JBJS Case Connect* 2014;12;4(4):e105. 査読有 <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.CC.N.00043>
2. Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, Karasugi T, Baba H, Uchida K, Kawabata S, Okawa A, Shindo S, Takeuchi K, Taniguchi Y, Maeda S, Kashii M, Seichi A, Nakajima H, Kawaguchi Y, Fujibayashi S, Takahata M, Tanaka T, Watanabe K, Kida K, Kanchiku T, Ito Z, Mori K, Kaito T, Kobayashi S, Yamada K, Takahashi M, Chiba K, Matsumoto M, Furukawa KI, Kubo M, Toyama Y; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Ikegawa S. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet.* 2014;46(9):1012-1016. 査読有 doi: 10.1038/ng.3045.
3. Oda K, Mori K, Imai S, Uenaka K, Matsusue Y. Comparison of repair between cartilage and osteocartilage defects in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like constructs. *J Orthop Sci.* 2014;19(4):637-645. 査読有doi: 10.1007/s00776-014-0574-7.
4. Mori K, Imai S, Kasahara T, Nishizawa K, Mimura T, Matsusue Y. Prevalence,

- Distribution, and Morphology of Thoracic Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament in Japanese: Results of CT-Based Cross-sectional Study. *Spine* (Phila Pa 1976). 2014 1;39(5):394-399. 査読有 doi: 10.1097/BRS.000000000000153.
5. Mimura T, Mori K, Kawasaki T, Imai S, Matsusue Y. Triple pelvic osteotomy: Report of our mid-term results and review of literature. *World J Orthop* 5(1):14-22. Published online 2014 18. 査読有 doi: 10.5312/wjo.v5.i1.14.
  6. Nishizawa K, Mori K, Saruhashi Y, Takahashi S, Matsusue Y. Long-term clinical outcome of sacral chondrosarcoma treated by total en bloc sacrectomy and reconstruction of lumbosacral and pelvic ring using intraoperative extracorporeal irradiated autologous tumor-bearing sacrum: a case report with 10 years follow-up. *Spine J*. 2014 1;14(5):e1-8. 査読有 doi: 10.1016/j.spinee.2013.10.057.
  7. Mori K, Imai S, Taga T, Nishizawa K, Ishida M, Matsusue Y. Undifferentiated sarcoma arising at lower thoracic spine with neuroblastoma-like dumbbell-shaped radiographic appearance in 1-year-old girl. *Spine J* 2014 1;14(4):719-20. 査読有 doi: 10.1016/j.spinee.2013.11.033.
  8. 森 幹士.(依頼原稿)胸部CTからみた胸椎黄色靭帯骨化症の有病率、分布と形態 最新原著レビュー 整形外科 2014; 65巻13号 1382-4.
  9. Mimura T, Kawasaki T, Yagi K, Mori K, Imai S, Matsusue Y. Pigmented villonodular synovitis causing osteonecrosis of the femoral head: A case report. *Case Rep Orthop* Volume 2013 (2013), Article ID 756954, 4 pages. 査読有 doi: 10.1155/2013/756954.
  10. Mori K, Kasahara T, Mimura T, Nishizawa K, Murakami Y, Matsusue Y, Imai S. Prevalence, Distribution, and Morphology of Thoracic Ossification of the Yellow Ligament in Japanese: Results of CT-Based Cross-Sectional Study. *Spine* (Phila Pa 1976). 2013 1;38(19):E1216-1222. 査読有 doi: 10.1097/BRS.0b013e31829e018b.
  11. Karasugi T, Nakajima M, Ikari K; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Tsuji T, Matsumoto M, Chiba K, Uchida K, Kawaguchi Y, Mizuta H, Ogata N, Iwasaki M, Maeda S, Numasawa T, Abumi K, Kato T, Ozawa H, Taguchi T, Kaito T, Neo M, Yamazaki M, Tadokoro N, Yoshida M, Nakahara S, Endo K, Imagama S, Demura S, Sato K, Seichi A, Ichimura S, Watanabe M, Watanabe K, Nakamura Y, Mori K, Baba H, Toyama Y, Ikegawa S. A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Metab*. 2013;31(2):136-143. 査読有 doi: 10.1007/s00774-012-0404-y.
  12. Ando K, Heymann MF, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers* (Basel). 2013 24;5(2):591-616. doi: 10.3390/cancers5020591
  13. 森 幹士, 西澤和也, 西川淳一, 松末吉隆. 軸椎椎間関節近傍の osteoid osteoma に対する, 術中ナビゲーションを用いた pin-point approach による治療経験. *J Spine Res JPSTSS 特集号* 2013; Vol.4 No.7 1210-1212. 査読有
  14. Mori K, Imai S, Shimizu J, Taga T, Ishida M, Matsusue Y. Spinal glioblastoma multiforme of the conus medullaris with holocordal and intracranial spread in a child: a case report and review of the literature. *Spine J*. 2012;12(1):e1-6. 査読有 doi: 10.1016/j.spinee.2011.12.005.
  15. Ando K, Mori K, Verrecchia F, Marc B, Rédini F, Heymann D. Molecular alterations associated with osteosarcoma development. *Sarcoma*. Volume 2012 (2012), Article ID 523432, 12 査読有 doi: 10.1155/2012/523432.
  16. Nishizawa K, Mori K, Saruhashi Y, Matsusue Y. Operative Outcomes for Cervical Degenerative Disease: A Review of the Literature. *ISRN Orthopedics* Volume 2012 (2012), Article ID 165050, 6 pages 査読有 doi:10.5402/2012/165050

〔学会発表〕(計 42 件)

1. 森 幹土. (招待講演) 骨粗鬆症の診断とこれからの骨粗鬆症治療 大津市医師会サタディアフタヌーンセミナー 大津市 2014 5 17
2. 森 幹土. (招待講演) Cortical bone trajectory法を用いた低侵襲な腰椎すべり矯正術. 第11回名古屋脊椎脊髄セミナー2014 名古屋市 2014, 7, 11-12
3. 森 幹土. (招待講演) 骨粗鬆症のお薬はいつ始めるの? 平成26年度 滋賀短期大学・滋賀医科大学共催公開講座 大津市 2014, 8, 9.
4. 森 幹土. (招待講演) 骨粗鬆症の診断とこれからの骨粗鬆症治療 高島市骨粗鬆症治療講演会 2014 高島市 2014, 10, 25
5. 森 幹土. (招待講演) 骨粗鬆症の診断とこれからの骨粗鬆症治療 近江八幡市医師会講演会 2014 近江八幡市 2014, 11, 25
6. 森 幹土、吉川正徳、西 洋一郎、寺本道雄、西澤和也、松末吉隆. 軸椎に発生した単骨性線維性骨異形成症の1例 第122回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 岡山市 2014 4 11-12.
7. 森 幹土、西澤和也、彌山 峰史、松末吉隆. 当院における関節リウマチ頸椎手術の動向 第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会 京都市 2014 4 17-19
8. 森 幹土、笠原俊幸、西澤和也、西川淳一、今井晋二、松末吉隆. 当院胸部 CT 受験者からみた胸椎後縦靭帯骨化症の有病率 第87回日本整形外科学会学術総会 神戸市 2014 5 22-25.
9. 森 幹土、西澤和也、中村 陽、松末吉隆. 軸椎に発生したmonoostotic fibrous dysplasiaの1例 第12回びわこ脊椎セミナー 大津市 2014, 7, 19
10. 森 幹土、西澤和也、中村 陽、松末吉隆. 当院におけるリウマチ性頸椎炎の手術動向. 第23回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 浜松市 2014, 8, 29-30.
11. 森 幹土、西澤和也、中村 陽、松末吉隆. Cortical bone trajectory (CBT)法を用いた腰椎変性すべり矯正のコツ. 第23回日本脊椎インストゥルメンテーション学会 浜松市 2014, 8, 29-30.
12. 森 幹土、西澤和也、中村 陽、松末吉隆. Cortical bone trajectory (CBT)法を用いた腰椎変性すべりの矯正. 第21回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会 宮崎市 2014, 9, 26-27.
13. 森 幹土、西澤和也、中村 陽、松末吉隆. Cortical bone trajectory (CBT)法を用いた腰椎変性すべり矯正術後1年以上の成績. 第123回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 名古屋市 2014, 10, 3-4.
14. 森 幹土. (招待講演) 後縦靭帯骨化症・黄色靭帯骨化症 滋賀県難病相談・支援センター医療講演会 草津市 2013, 2, 14
15. 森 幹土. (招待講演) 胸部CT受験者から見た胸椎黄色靭帯骨化症の疫学 第39回脊椎外科を学ぶ会 話題提供 大阪市 2013, 3, 16
16. 森 幹土. Cortical bone trajectory法. 京滋ヤングスパインフォーラム 京都市 2013, 12, 21.
17. 森 幹土、西澤和也、西川淳一、松末吉隆. 70歳以上のリウマチ性頸椎炎に対するインストゥルメンテーション手術は有用か? 第120回中部整形外科・災害外科学会 和歌山市 2013, 4, 5-6
18. 森 幹土、西澤和也、西川淳一、松末吉隆. 我々の考案した頸椎体幹装具 (MACSFIT)の使用経験. 第120回中部整形外科・災害外科学会 和歌山市 2013, 4, 5-6
19. Mori K, Imai S, Nishizawa K, Nishikawa J, Matsusue Y. Prevalence, distribution and morphology of ossification of the yellow ligament and posterior longitudinal ligament of thoracic spine in Japanese. English Poster Session 第42回日本脊椎脊髄病学会 那覇市 2013, 4, 25-27
20. 森 幹土、笠原俊幸、西澤和也、西川淳一、今井晋二、松末吉隆. 当院胸部 CT 受験者からみた胸椎黄色靭帯骨化症の有病率. 第86回日本整形外科学会総会 広島市 2013, 5, 23-25
21. Mori K, Nishizawa K, Nishikawa J and Matsusue Y. Benefit of surgical treatment for rheumatoid cervical spine in patients over the age of 70. 12<sup>th</sup> AFJO Kyoto 2013, 5, 30-6, 1
22. 森 幹土、西澤和也、西川淳一、松末吉隆. 我々の考案した頸椎体幹装具 (MACSFIT)の使用経験. 第20回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会 名古屋市 2013, 9, 6-7.
23. 森 幹土、西澤和也、西川淳一、松末吉隆. CBT法を用いた腰椎変性すべり矯正術の試み. 第121回中部整形外科・災害外科学会 名古屋 2013, 10, 3-4.
24. 森 幹土、西澤和也、西川淳一、松末吉隆. CBT法を用いた腰椎変性すべり矯正術の試み. 第20回日本インストゥルメンテーション学会 高知市 2013, 10,

- 24-25.
25. 森 幹士、西澤和也、西川淳一、松末吉隆 . 我々の考案した頸椎体幹装具 (MACSFIT) の頸椎・頸胸椎固定術後患者における使用経験 . 第 20 回 日本インストゥルメンテーション学会 高知市 2013, 10, 24-25.
26. 森 幹士、西澤和也、西川淳一、松末吉隆 . Cortical bone trajectory 法を用いた腰椎変性すべり矯正の試み . 第 33 回 滋賀県整形外科医会 大津市 2013, 11, 16.
27. Mori K, Imai S, Matsusue Y. Feasibility of surgical treatment for rheumatoid cervical spine in patients over the age of 70. Spine Across the Sea 2012 Kauai (Hawaii)/USA, July 29 - August 2, 2012
28. 森 幹士 . (招待講演) 注意したい axial pain 第 32 回 滋賀リウマチ・膠原病臨床談話会 ミニレクチャー 大津市 2012, 1, 21
29. 森 幹士 . (招待講演) 腰・背部痛と骨粗鬆症 第 28 回 滋賀医科大学公開講座 草津市 2012, 9, 19
30. 森 幹士、西澤和也、西川淳一、松末吉隆 . 70 歳以上のリウマチ性頸椎炎に対するインストゥルメンテーション手術の有効性について . 第 18 回 日本インストゥルメンテーション学会 神戸市 2012, 11, 1-2.
31. 森 幹士、西澤和也、西川淳一、松末吉隆 . 軸椎椎間関節近傍の osteoid osteoma に対する、術中ナビゲーションを用いた pin-point approach による治療経験 . 第 19 回 日本脊椎・脊髄神経手術手技学会 八戸市 2012, 9, 14-15.
32. 森 幹士、西澤和也、西川淳一、松末吉隆 . ナビゲーションを用いた pin-point approach により切除しえた軸椎 osteoid osteoma の 1 例 . 第 10 回 びわこ脊椎セミナー 大津市 2012, 7, 28
33. 森 幹士、笠原俊幸、西澤和也、今井晋二、松末吉隆 . 当院胸部 CT 受験者からみた胸椎靭帯骨化症の有病率 第 41 回

日本脊椎脊髄病学会 久留米市 2012, 4, 19-21.

34. 森 幹士、猿橋康雄、西澤和也、石田光明、松末吉隆 . ナビゲーションを用いた pin-point approach により切除しえた軸椎 osteoid osteoma の 1 例 . 第 37 回 「脊椎外科を学ぶ会」大阪市 2012, 2, 25

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 幹士 (MORI Kanji)  
滋賀医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 30467386

##### (2) 研究分担者

今井 晋二 (IMAI Shinji)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 90283556

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :