

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03123

研究課題名(和文) 病期分類に基づいた犬の脊髄再生医療に対する包括的治療戦略の開発と応用

研究課題名(英文) Staging-based regenerative therapy for spinal cord injury in dogs

研究代表者

西村 亮平 (Ryohei, Nishimura)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80172708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：犬の脊髄損傷(SCI)に対し骨髄脂肪細胞周囲細胞(BM-PAC)を用いた再生医療の開発・応用を行った。急性期SCIに対しては、他家BM-PACの静脈投与の開発を行った。他家細胞はホストの免疫を受け、十分な治療効果が得られなかったが、重篤な合併症はなく安全性が示された。亜急性期SCIに対しては、自己BM-PAC静脈投与の臨床試験を実施した。脊髄梗塞の犬1例に対し実施した結果、重篤な合併症はなく、投与後3ヶ月で歩行機能の回復が得られ、安全性と有効性が示された。また、BM-PACからニューロスフェアの誘導が可能であることを明らかにし、今後、慢性期SCIに対する細胞補充療法の開発・応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小動物臨床において、犬の脊髄損傷疾患は再生医療の主要なターゲットであり、現在、自己あるいは他家間葉系幹細胞(MSC)の静脈投与が行われるようになってきたが、治療の有効性・安全性を示す科学的データが不足しており、問題となっている。本研究は、静脈投与されたMSCの体内分布や運動機能回復がどのようなメカニズムで得られる可能性があるかを示すものであり、それらの治療の有効性を支持する科学的データを供する。一方、他家MSC投与の有効性については否定的な結果であり、現在普及しつつある治療法に警鐘を鳴らすと同時に、どのような改善方法が考えられるかの道筋を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed and applied regenerative medicine using bone marrow peri-adipocyte (BM-PAC) for spinal cord injury (SCI) in dogs. For acute SCI, we developed an intravenous administration of allogeneic BM-PAC. Allogeneic cells were immunized by the host, and sufficient therapeutic effects were not obtained, but safety was demonstrated with no serious complications. A clinical trial of self-administered intravenous BM-PAC was performed for subacute SCI. As a result of administering to one dog with spinal cord infarction, there were no serious complications, and recovery of walking function was obtained 3 months after administration. Thus, the safety and efficacy of intravenous administration of autologous BM-PACs were demonstrated. In addition, we clarified that neurospheres can be induced from BM-PAC. This result could contribute to the development and application of cell replacement therapy for chronic SCI.

研究分野：再生医療

キーワード：犬 脊髄損傷 再生医療 間葉系幹細胞 骨髄脂肪細胞周囲細胞 急性期 亜急性期 慢性期

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、科学的根拠に基づいた犬 SCI に対する再生医療の開発を目的とし、犬 MSC の性状解析を行ってきたが (Chung CS, *J Vet Med Sci.* 2013)、その結果、従来の犬骨髄由来 MSC(BMMSC)より幹細胞能の高い MSC が骨髄脂肪細胞周囲に存在することを見出し、骨髄脂肪細胞周囲細胞(BM-PAC)と名付けて報告した(Lin HY, *Stem Cells Dev.* 2017)。また、BM-PAC は血管新生に寄与する肝細胞成長因子(HGF)や血管内皮成長因子(VEGF)の分泌能に優れ、ヌードマウス SCI モデルへ静脈投与したところ、損傷部へ集簇する Homing 機能を示し、運動機能が有意に回復した。移植部位では新生血管が有意に増加しており、BM-PAC から損傷部に血管新生関連因子が供給され、組織学的・機能的修復に至る治癒メカニズムの一端が解明され、今後の臨床応用が期待された。

一方、投与に用いる BM-PAC を準備するためには少なくとも約 1 週間を要するため、急性期 SCI に対する治療には、他家 BM-PAC の移植を検討する必要がある。また、慢性期 SCI ではグリア瘢痕が形成され、内在性の組織再生能力が消失した状態であるため、神経細胞や髄鞘細胞などを外来性に補充する必要があると考えられている。ヒトでは、iPS 細胞が樹立され、iPS 由来神経幹・前駆細胞を用いた治療法の開発が進んでいるが、犬では臨床利用可能な iPS 細胞の樹立には至っていない。従来、MSC は間葉系細胞以外にも肝細胞や神経細胞などへの多分化能を示すことが報告されているが、幹細胞能に優れた BM-PAC を用いることで、より効率的に神経細胞を誘導し、慢性期 SCI に対する移植細胞として有用性が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、病期分類に基づいた犬 SCI に対する BM-PAC を用いた再生医療の開発・応用を行うことを目的とし、まず、犬の亜急性期 SCI に対する BM-PAC 経静脈移植の臨床試験を行い、有効性および安全性の評価を行うことを目的とした。一方、犬の急性期・慢性期 SCI に対する再生医療の開発を継続し、急性期に対しては、他家 BM-PAC あるいは新鮮 BM-PAC による移植の安全性・有用性を検討し、安全性・有用性が確認できた場合は臨床応用を目指すこととした。慢性期 SCI に対しては BM-PAC からの機能的神経細胞の分化・誘導法を確立し、慢性期 SCI モデルへの移植を行い安全性と有効性を明らかにし、最も克服が困難と予想される、犬の慢性期 SCI に対する再生医療の開発を目指すこととした。

3. 研究の方法

3-1. 犬の亜急性期 SCI に対する自己 BM-PAC 経静脈移植の臨床試験

重度脊髄損傷と診断された犬で発症後亜急性期においても歩行機能の改善が得られない症例を対象とし、自己 BM-PAC 静脈投与を行い、投与後継時的に、有害事象の有無、運動機能回復、損傷脊髄の MRI 画像を評価し、安全性および有用性を評価した。

3-2. 犬の急性期 SCI に対する他家 BM-PAC の治療効果の検討

3-2-1. 犬 BM-PAC の MHC 抗原発現の解析

BM-PAC の MHC 発現を FACS を用いて解析し、他家細胞の免疫原性を評価した。

3-2-2. B6 マウス SCI モデルに対する犬 BM-PAC 静脈投与の有効性の検討

通常免疫をもつ B6 マウスの SCI モデルを作成し、BM-PAC の静脈投与を行い、損傷部への遊走能と運動機能回復の促進効果について評価をおこなった。また、損傷部に遊走した BM-PAC に対するリンパ球の浸潤程度を免疫染色で評価した。

3-2-3. 他家 BM-PAC の静脈投与の安全性評価および損傷部への遊走能と宿主免疫反応の評価

犬の背部皮膚欠損モデルを作製し、自己あるいは他家 BM-PAC を静脈投与した (それぞれ Auto 群、Allo 群)。また、他家 BM-PACs 投与後に免疫抑制剤 (シクロスポリン) を投与した群を作製し CsA 群とした。BM-PAC は蛍光標識試薬 (VivoTrack680) で標識したのち投与した。Allo 群については、一般身体検査、血液検査 (CBC と血清生化学検査) を実施し、副作用について評価した。各群、投与 1 週間後に損傷部皮膚を回収し、IVIS 及び病理組織学的に BM-PAC の損傷部への遊走と免疫細胞 (CD8+T 細胞、マクロファージ) の浸潤を免疫染色により評価した。

3-3. BM-PAC の神経細胞分化能の検討

3-3-1. 慢性期 SCI モデルに対する BM-PAC 静脈投与の有用性の評価

ヌードマウス SCI モデルを作製し、受傷後 20 および 40 日後に蛍光標識した BM-PACs を静脈投与し、細胞分布を IVIS を用いて評価した。また、投与後 6 週間、運動機能回復を評価した。

3-3-2. BM-PAC の神経細胞分化能評価

BM-PAC と BMMSC を神経細胞分化培地で培養し、得られた細胞の形態学的評価、神経細胞マーカー発現解析を行って、BMMSC との比較から BM-PAC の神経細胞分化能を評価した。

3-3-3. BM-PAC 由来ニューロスフェアの作製

BM-PAC のスフェロイドを神経分化誘導培地で培養し、ニューロスフェアの作製を試みた。

3-3-4. BM-PAC 由来神経オルガノイドの作製と大脳皮質欠損モデルへの移植

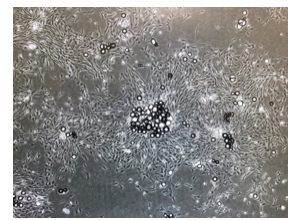
BM-PAC 由来ニューロスフェアをバイオ 3D プリンタを用いて積層・融合させ神経オルガノイドの作製を試みた。また、得られた組織をヌードマウス大脳皮質欠損モデルの欠損部に移植し、欠

損部への定着を病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

4-1. 犬の亜急性期 SCI に対する自己 BM-PAC 経静脈移植の臨床試験

脊髄梗塞により発症から 2 ヶ月の時点で自力起立・歩行不能であったチワワに対し実施した。BM-PAC は培養から 7 日目で投与予定細胞数 (1×10^6 /kg) を回収可能であった (図 1)。BM-PAC の静脈投与による重篤な合併症はみられず、投与から 3 ヶ月後には自力起立・歩行の回復がみられた。



【図 1】 症例骨髄から分離・培養した BM-PAC (培養 3 日目)

4-2. 犬の急性期 SCI に対する他家 BM-PAC の治療効果の検討

4-2-1. 犬 BM-PAC の MHC 抗原発現の解析

MHC class I 発現が低く、MHC class II を発現はみられず、免疫原性は低いことが予想された。

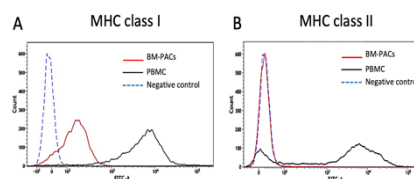


【図 2】 症例の歩様 (投与前、投与後 3 ヶ月)

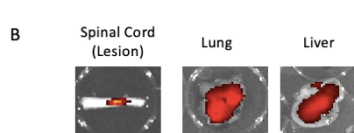
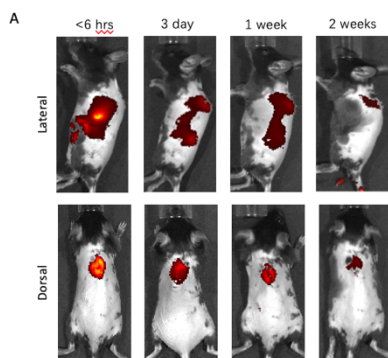
4-2-2. B6 マウス SCI モデルに対する犬 BM-PAC 静脈投与の有効性の検討

犬 BM-PAC は脊髄損傷部への遊走能を示したが (図

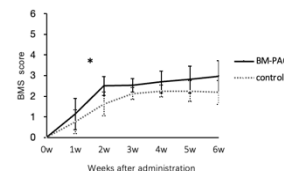
4)、歩行機能の回復は得られなかった (図 5)。病理組織学的評価では軸索に対する保護作用が示唆されたが、癒痕抑制は十分でなく、軸索の伸長が十分得られなかった可能性が考えられた (図 6)。損傷部脊髄組織の CD3 に対する免疫染色をおこなったところ、T 細胞の顕著な浸潤がみられ、他家 BM-PAC の MHC I 発現は低いものの、ホストの免疫反応を惹起する可能性が示唆された。



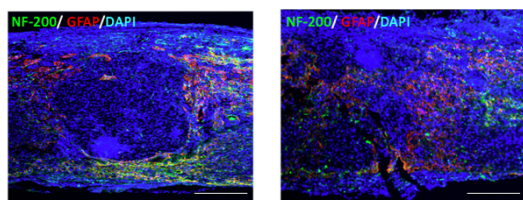
【図 3】 BM-PAC の MHC 発現解析 (PBMC: 末梢血単核細胞)



【図 4】 BM-PAC の体内分布評価 (A) B6 マウスの急性期 SCI モデルに対し Vivotrac680 で標識した BM-PAC を静脈投与した。投与直後は肺に分布するが、3-7 日後には損傷部周囲に分布が確認された。2 週後にはシグナルが減弱した。(B) 投与 1 週後に摘出した組織 (脊髄・肺・肝臓) にもシグナルが認められる。

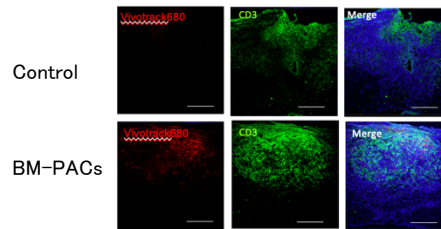


【図 5】 B6 マウス急性期 SCI モデルに対し BM-PAC の静脈投与を行い、BMS スコアにて機能回復を評価した。溶媒のみ投与した対照群と比較し、投与 2 週後に有意な回復がみられたものの、6 週後では差が見られなかった。



【図 6】 BM-PAC 投与後 6 週後の損傷部の病理組織学的評価

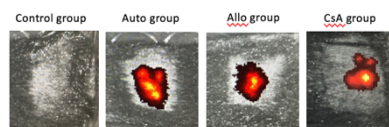
(左) BM-PAC 投与群 (右) コントロール群。BM-PAC 投与群では NF-200 陽性の神経線維の残存が有意にみられたが、GFAP 陽性のグリア癒痕の形成は両群で差がみられなかった。



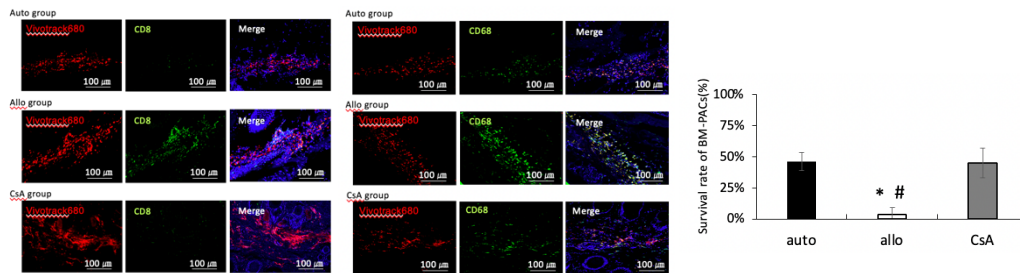
【図 7】 脊髄損傷部における T 細胞浸潤 BM-PAC 投与群で Vivotrack680 陽性細胞がみられ、BM-PAC の損傷部への遊走が示唆される。CD3 陽性細胞は BM-PAC 投与群で有意に増加し、BM-PAC に対するホスト免疫反応が示唆される。

4-2-3. 他家 BM-PAC の静脈投与の安全性評価および損傷部への遊走能とホスト免疫反応の評価

Auto 群、Allo 群いずれにおいても損傷部への遊走が認められた。Auto 群ではほとんど CD8 陽性 T 細胞の浸潤がみられなかったのに対し、Allo 群では顕著な浸潤がみられ (図 9A)、マクロファージによる貪食が確認された (図 9B)。CsA 群では CD8 陽性 T 細胞の浸潤が有意に抑制され、マクロファージによる貪食も Auto 群と同程度に抑制された (図 9C)。BM-PAC の MHC I 発現は低レベルであるものの、ホスト免疫反応を惹起し、治療効果を十分発揮できないと考えられた。一方、安全性の面では、他家 BM-PAC 投与後、一般状態には重篤な有害事象はみられなかったが、血液検査結果ではリンパ球や血小板の一過性の低下が観察され、投与後数日は観察期間が必要であると考えられた。



【図 8】 皮膚損傷部への BM-PAC の遊走能

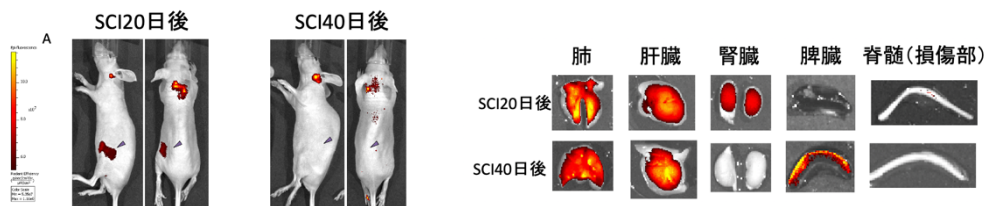


【図9】皮膚損傷部におけるCD8陽性T細胞およびマクロファージ（CD68陽性細胞）の浸潤
 (A) CD8陽性T細胞の浸潤はAllo群でみられ、Auto群、CsA群ではほとんどみられなかった。(B) CD68陽性を示すマクロファージはいずれの群でもみられたが、Allo群で顕著であった。(C) マクロファージ（CD68陽性）に貪食されたBM-PAC（Vivotrack680陽性）の割合を算出した結果、Allo群ではほぼ全ての細胞が貪食されていたが、免疫抑制剤を投与することで、Auto群と同程度に貪食が抑制されている。

4-3. BM-PACの神経細胞および運動ニューロンへの分化能の検討と移植効果の検討

4-3-1. 慢性期SCIモデルに対するBM-PAC静脈投与の有用性の評価

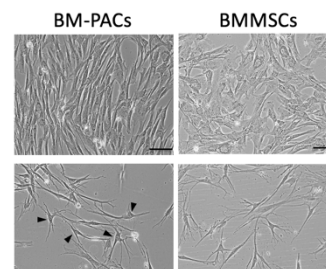
受傷後20日でわずかに損傷部への遊走がみられたが、受傷後40日後では損傷部への遊走が確認されず（図10）、慢性期では静脈投与による細胞の遊走が困難と考えられた。



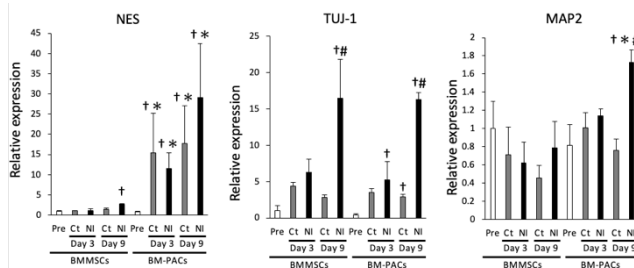
【図10】ヌードマウスSCIモデルに対し受傷後20日および40日でBM-PACを静脈投与した。投与後1週間にIVISを用い細胞の局在を観察した結果、損傷部への遊走はほとんど観察されなかった。

4-3-2. BM-PACの神経細胞分化能評価

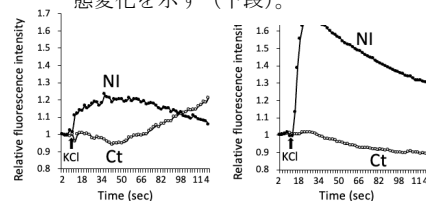
BM-PAC、BMMSCいずれも神経分化誘導培地により神経細胞様の形態変化を認めた（図12）。MAP2の発現はいずれも同等に上昇したが、BM-PACは神経幹細胞マーカーであるNestinの発現が高く、神経細胞分化に適した細胞であると考えられた（図13）。また、KCl添加時におけるカルシウム取り込みを比較したところ、BM-PACから誘導した神経細胞様細胞でより良好な反応が得られ、電気生理学的機能を有する神経細胞への分化能を有することが示唆された（図14）。



【図12】神経細胞分化誘導時の細胞形態評価 BM-PAC、BMMSCsいずれも非誘導時は線維芽細胞様の形態を示すが（上段）、分化誘導により神経細胞様の突起を形成する細胞に形態変化を示す（下段）。



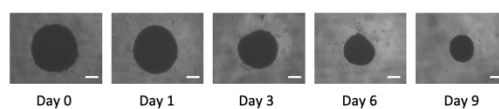
【図13】神経細胞分化誘導による神経細胞マーカー発現の変化 各細胞において神経分化誘導3日後、9日後のNES（神経幹細胞マーカー）、TUJ-1（幼若神経細胞マーカー）、MAP2（成熟神経細胞マーカー）の発現変化を示す。いずれの細胞も誘導によりTUJ-1の発現が上昇したが、MAP2発現はBM-PACsのみで有意に上昇し、NES発現はBM-PACsで高い発現がみられ、誘導後も発現が維持された。（Pre：誘導前、Ct：非誘導、NI：神経分化誘導）



【図14】誘導後の細胞にKClを添加し、カルシウム取り込み能を評価した。神経細胞誘導によりBM-PACsでは鋭いピークを示すCa流入が観察され、電気生理学的機能を有する神経細胞への分化が示唆された。

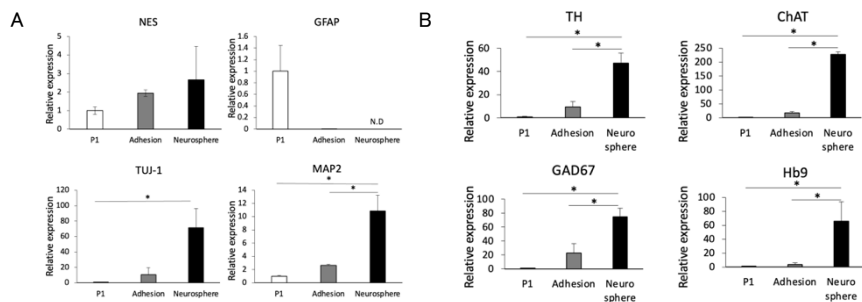
4-3-3. BM-PAC由来ニューロスフェアの作製

BM-PACを 3×10^4 cells/wellで96穴浮遊細胞プレートに播種し、神経分化誘導培地でスフェロイドを作成したところ、BM-PACは24時間以内にスフェロイドを形成した（図15）。9日間神経分化誘導を行い、神経細胞マーカー発現をRT-PCRを用いて評価したところ、4-3-2の単層培養で誘導した細胞と比較し、TUJ-1及びMAP2の有意な上昇がみられた。さらに、ドパミン神経や運動ニューロンなどに発現するTyrosine Hydroxylase (TH)、Choline Acetyltransferase (ChAT)などの発

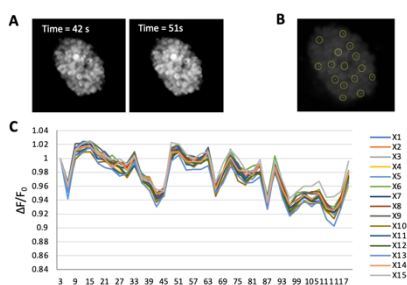


【図15】BM-PACは神経分化培地にて浮遊培養を行うことで、スフェロイドを形成した。スフェロイド径の継時的な縮小がみられた。Bar = 200 μm

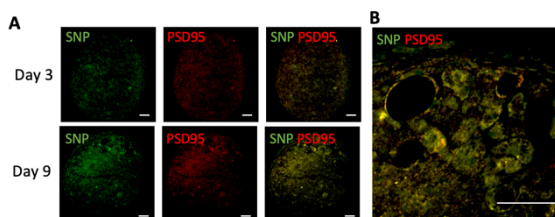
現上昇もみられ、BM-PAC からニューロスフェアを誘導することで、他のサブタイプ特異的な神経細胞へ分化する可能性が示された (図 16)。さらに、KC1 刺激によるカルシウム取り込み能を評価したところ、スフェロイドを構成する細胞全体で同期的にカルシウム取り込みがみられた (図 17)。Synapsin と PSD95 による免疫蛍光染色を行った結果、スフェロイド全体に二重陽性を示す領域がみられ、スフェロイド内のシナプス形成が示唆された (図 18)。



【図 16】 BM-PAC から誘導したニューロスフェアの神経細胞マーカー発現 (A) ニューロスフェア誘導により単層培養 (Adhesion) と比較して、TUJ-1 (幼若ニューロンマーカー)、MAP2 (成熟ニューロンマーカー) の発現上昇がみられた。(B) ニューロスフェア誘導により Tyrosin Hydroxylase (TH、ドパミン作動性ニューロン)、Choline Acetyltransferase (ChAT、コリン作動性ニューロン)、GAD67 (GABA 作動性ニューロン)、Hb9 (運動ニューロン) の発現上昇がみられ、サブタイプ特異的な神経細胞への分化能が示された。



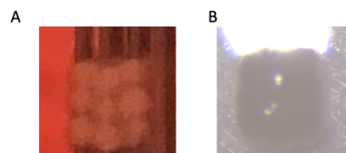
【図 17】 BM-PAC から誘導したニューロスフェアの Ca イメージング (A) Fluo-4 添加後、律動的な Ca 流入がみられた。(B,C) 無作為に抽出した 15 点での Ca 流入を測定した結果、全地点での発光強度変化の波形で同期がみられた



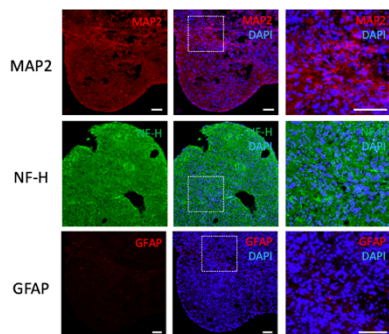
【図 18】 ニューロスフェア誘導後 3 および 9 日目にスフェロイドを回収し、Synapsin (SNP) および PSD95 に対する二重免疫染色を行った。誘導 9 日目に SNP と PSD95 の発現上昇がみられ、スフェロイド全体で二重陽性を示す領域が観察された。

4-3-4. BM-PAC 由来神経オルガノイドの作製と大脳皮質欠損モデルへの移植

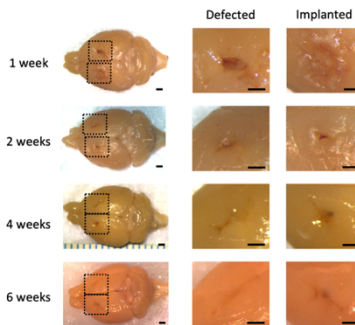
4-3-3 にて作製した BM-PAC 由来ニューロスフェアをバイオ 3D プリンタを用いて 3×3×3 個に配列して積層・融合させ神経誘導培地にて培養した結果、約 1mm 立方の大きさを持つ組織の作製が可能であった (図 19)。病理組織学的評価の結果、この組織全体で MAP2 (成熟神経細胞マーカー)、NF-H (軸索マーカー) を強く発現しており、GFAP (アストロサイトマーカー) の発現はみられず、ニューロスフェアの集合体であると考えられた。ヌードマウス大脳皮質欠損モデルへの移植を試みたが、欠損部への定着はみられず、宿主脳との結合や連絡などの解析はできなかった。3D プリンタで大型化したことにより、組織内部の細胞が壊死したことが原因と考えられた。



【図 19】 BM-PAC 由来神経オルガノイドの作製 (A) バイオ 3D プリンタを用い、BM-PAC 由来ニューロスフェアを積層培養した。(B) 積層後 6 日後の組織外観。ニューロスフェアは完全に融合し、1mm 立方の一塊の組織を形成した。



【図 20】 融合後の組織の MAP2、NF-H、GFAP に対する免疫蛍光染色。MAP2 および NF-H の強い発現がみられたが、GFAP の発現は認められなかった。



【図 21】 BM-PAC 由来神経オルガノイドの大脳皮質欠損モデルへの移植。移植後の肉眼所見を継続的に示す。ヌードマウス大脳皮質に 1mm 立方の欠損を作製し、BM-PAC 由来脳オルガノイドの移植を行ったが、移植した組織は 2 週後以降確認が困難で、病理組織学的にも定着が確認できなかった。Defected (欠損床)、Implanted (移植床)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Junyan, Fujita Naoki, Takeda Tae, Hanyu Wataru, Takatani Hirohide, Nakagawa Takayuki, Nishimura Ryohei	4. 巻 72
2. 論文標題 Canine bone marrow peri-adipocyte cells could therapeutically benefit acute spinal cord injury through migration and secretion of hepatocyte growth factor to inflammatory milieu	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 19 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hanyu W, Fujita N, Chen J, Takeda T, Nishimura R
2. 発表標題 Development of regenerative therapy for spinal cord injury in dogs.
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen J, Fujita N, Takeda T, Hanyu Y, Nakagawa T, Nishimura R
2. 発表標題 The therapeutic effects and homing ability of intravenous administration of allogeneic canine mesenchymal stem cells
3. 学会等名 2019Congress of Asian Society of Veterinary Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 急性期脊髄損傷に対する犬間葉系幹細胞の静脈投与による肝細胞成長因子デリバリー
2. 発表標題 陳君妍、藤田直己、武田妙、羽生航、中川貴之、西村亮平
3. 学会等名 第162階日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 直己 (Fujita Naoki) (10554488)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教 (12601)	
研究分担者	西田 英高 (Nishida Hidetaka) (00622804)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	
研究分担者	伊藤 大介 (Ito Daisuke) (40508694)	日本大学・生物資源科学部・准教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------