

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592663

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞移植治療の新たな疾患への応用及び神経損傷治療への併用療法の開発

研究課題名(英文) Transplantation of autologous bone marrow cells for treatment of subacute and chronic spinal cord injury and another disease.

研究代表者

太田 正佳 (Masayoshi, Ota)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究員

研究者番号：20462278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷に対する有効な治療方法はまだないが、我々は骨髄間質細胞や単核球細胞を直接や髄液経由に投与することで急性期の脊髄損傷に効果があることを示してきた。今回は、亜急性期や慢性期にも上記の細胞を投与することで、行動学的、組織学的にも効果があることを証明した。組織学的には軸索の伸長所見を認めた。また、より厳しい条件の切断症例に対して、コラーゲンとヘパリン含有したアルギン酸で細胞移植した場合、どちらが神経再生に有効な環境を提供するか研究した結果、後者のほうが優れている材料と判明した。また、同一材料を用いて、脂肪移植、難治性潰瘍の治療の研究に利用したところ、ヘパリン含有アルギン酸の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells have studied as effective transplants for the spinal cord acute crush injury. In this study, we showed that BMCs and BM-MNCs have showed as effective transplants for the spinal cord crush injury in sub-acute and chronic stages. The groups of transplantation have beneficial effects on tissue repair and axonal outgrowth, leading to improve locomotion of rats. Furthermore, we directly transplanted the BM-MNCs with artificial matrix (Collagen gel or Alginate gel of heparin binding protein) in acute spinal cord cut injury. The covalently crosslinked heparin and alginate gel sustains release of bFGF in vitro. We indicated that alginate gel is better than collagen in the view point of affinity and cell toxicity. In another study, we applied the fat transplantation and skin ulcer. This novel material accelerates wound closure and leads effective fat graft with angiogenesis in histologically.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経再生

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は治療が不可能な疾患として扱われてきた。交通事故や、運動中の事故により、我が国では毎年 5000 人以上の報告がされている。これらの事故による脊髄損傷の割合を年齢別にみると 20 歳前後から 60 歳前後に多く、殊に 20 歳前後の若者の場合は悲惨である。たった 1 度の事故による受傷で、その後、一生涯、麻痺は回復しない。これは、その受傷時期が早ければ早いほど、長い年月を車椅子での生活、若しくはベッドから離れられない生活を強いられることを意味する。いまだ、急性のステロイド治療以外に臨床応用できるものもないのが現状であった。

我々のグループは 1998 年ごろから末梢神経の再生と中枢神経である脊髄神経の再生を研究してきた。研究当初は人工物による再生を主に試みてきた。2000 年代にはいり、ES 細胞を利用した神経再生が報告され、細胞移植による神経再生の研究が加速した。研究当初は時代の流れに沿い神経幹細胞を利用した脊髄神経の再生に関して、いくつかの論文発表も行っていた(2003 年までの報告)。

しかし、当時より、我々のグループでは、研究の最終目標をできるかぎり早い時期に臨床応用するというものであった。したがって、ES 細胞を利用した細胞移植の臨床応用に関しては、倫理的側面が常に存在するため、懐疑的であった。一方、細胞移植の方法も、損傷部に、直接細胞移植するという研究手法が主流であったが、脳脊髄液由来に移植することを考案した。この手法は、臨床応用する時に大掛かりに手術をせずとも脊髄穿刺の要領で細胞移植できる点である。

あくまでも臨床応用にこだわって研究していたため、移植細胞は、倫理的障壁の少ない骨髄間質細胞に着目した。2004 年頃から骨髄間質細胞による脊髄神経の再生に関して論文を発表した。3. 概要は、間質細胞は移植しても神経細胞に分化することなく、損傷急性期における神経の損傷を最小限に抑制するものではないかという結論にいたった。その段階で、サルに移植しての安全性をたしかめた。また、培養方法に関しても工夫をした。その結果、関西医大での臨床応用を行った。当時、獣医師たちのイヌでの効果なども報告され、大型動物でも効果をしめすことは間違いないと考えられた。

しかし、臨床応用となると、患者さんの外傷を受けてから、移植細胞を採取し、培養する時間の問題があった。培養方法も工夫をするものの時間的な問題が避けて通ることができなかった。そこで、2 つのことを考え研究をすすめた。一つ目は、外傷後にすぐに採取できる細胞により、同等の効果を得られないかということ。二つ目は損傷後の亜急性期や慢性期といわれる時期、に細胞移植により治療効果を示さないかということこの 2 点に関して、さらに、研究を進めた。

1 つ目について、急性期に細胞移植できる細胞の候補としては骨髄単核球に注目した。2007 年にこれに関しては急性期に神経の保護作用により脊髄神経の損傷が軽度に抑えられることを示した。

2 つ目に関して、イヌの脊髄損傷の慢性期に移植細胞を血液由来に移植しても行動の回復があることを報告した。

一方、2008 年には、関西医大での骨髄間質細胞の臨床応用症例に関して治療経過を報告した。

研究の目的

現在臨床応用を行うにいたった、骨髄間質細胞移植、骨髄単核球移植を進展させることとそのメカニズムを検討することで、次の安全性の高い治療方法を確立、保険適応されるような手法の改良を目的としている。脊髄損傷後の早期に骨髄単核球を移植すること、また、同時に骨髄より間質細胞を採取し培養し、亜急性期に細胞移植すること。移植方法は脳脊髄液由来に移植すること。亜急性期、慢性期において骨髄間質細胞を脳脊髄液由来で移植しても効果をしめすかどうか。詳細な神経保護因子に関して更なる検討を加えて、物質を抽出することで細胞移植を回避することはできないかということ。骨髄間質細胞や単核球が細胞保護作用をもつため、末梢神経や神経根損傷、筋肉損傷、皮膚潰瘍の治療や脂肪移植に応用できるのではないかということ

次の目標として、神経損傷に完全離断が生じた場合や完全な慢性期にはいり空洞形成した場合は、いまの手法では、真の神経再生にはいたっておらず、移植細胞も失われる。そこで、離断もしくは形成された空洞の空間に直接人工物を足場として細胞移植を行うことで神経再生ができないかという事。そのうち、いくつかを本研究で明らかにすることを目標にしていた。

研究の方法

をのぞき共通部分が多くおのおのの手法について記す。脊髄損傷モデルラットの樹立の方法。脊髄損傷モデルは、Slc: Splaque-Dawley (SD) 系ラットを利用する。(研究によっては WISTAR 系を用いることもある。)生後 4 週齢のメスで体重は約 70-90 g の個体を用いる。脊髄損傷の方法は、脊髄損傷装置を用いて行う。NYU インパクトナイフ、それに準ずる器具を使用する。脊髄損傷装置の調整として、直径:2.0 mm で、重量:10 g の金属製ロッドを、50 mm の高さから、落下させる方法を用いた。麻酔は動物実験用ガス麻酔器を用いて、2-3%のイソフルランを継続的に気道より吸入させることで深麻酔下での施術とする。術式はマイクロ顕微鏡を用いた微小手術で、Th6-8 レベルでの脊髄を露出し、脊髄損傷装置を利用して脊髄の損傷を行う。その後、目視による脊髄損傷の確認を行う。の実験に関しては、同様の手法で麻酔、脊髄の露出を行うが、損傷は片側のみ完全切断とする。細胞移植の方法として、単核球移植の方法として、単核球は、SD-Tg(CAG-EGFP)ラットで生後 4 週齢のオスから採取する。単核球の採取と分離、採取方法は、単核球を採取するまでの施術は、ガス麻酔を利用した深麻酔下で行う。深麻酔下で

SD-Tg (CAG-EGFP) ラットから大腿骨を採取後、採取した大腿骨の両端部の骨頭部を切除し、片側の露出した骨髓に予め滅菌しておいた pH7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) 4 ml を注入することで、反対側から洗い出される骨髓液を滅菌試験管に回収する。これを数回繰り返すことで骨髓液/PBS とする。分離方法は、Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (Ficoll-Paque) を利用する方法を用いる。滅菌された試験管に 3 ml の Ficoll-Paque を入れておき、骨髓液/PBS を重層する。合計 7 ml の溶液を 400 g、40 min、18[°] にて遠心分離を行う。遠心分離によって得られた中間層を単核球層とし、全量を回収する。回収した中間層の溶液に PBS を加え、全量を 6 ml になるようにし、400 g、15 min、18[°] の遠心にて洗浄を行う。上清をアスピレーターにて吸引し、残りの沈殿槽に 6 ml の PBS を加え、数回ピペティングを行ってから 400 g、15 min、18[°] の遠心により洗浄する。更に、同じ操作をもう一度行い、残りの沈殿槽へ単核球の全量が約 1×10^4 から 1×10^5 / 1 micro L になるように PBS を加える。

細胞の移植方法は脊髄損傷装置により脊髄損傷を起こした Slc:SD 系ラットの損傷部位に単核球が 1×10^4 から 1×10^5 / 1 micro L に調整した PBS 溶液を約 10 micro L の容量で 30G の注射針と 1 ml 容量のシリンジを用いて、尾側から損傷部位に向かって、背側より約 45 度の角度でゆっくりと注入する。単核球の入っている PBS 溶液約 10 micro L を全量注入後、約 3 秒程度の間は注射針は直ぐに抜かず、元の位置で静止しておき、ゆっくりと注射針を抜き取ることで単核球が損傷脊髄組織部位から漏れ出ることを防ぐ。

の移植方法は脳固定装置にラットを固定し第 4 脳室経路に注入するため、頭蓋骨に穴をあけ、ゆっくり細胞移植したのち 5 分ほど注射を固定したのちぬく。その後、移植部分は閉創する。

に関して移植組織の担体として人工コラーゲンとアルギン酸を用意した。また、アルギン酸はヘパリン結合タンパク質を架橋した進化した材料も用いている。この担体は移植細胞を保持する担体としても、また、神経伸長因子の一つと知られ、ヘパリン結合の性質をもつ bFGF の担体としても使用することを考えている。このヘパリン結合タンパク質をもつアルギン酸は の実験にも使用している。 に関しての使用ラット、麻酔方法は上記同様、細胞の調整方法は上記同様である。損傷方法は実験の目的でかわるので以下にしめす。脂肪移植実験に関しては、麻酔は上記同様。術式はマイクロ顕微鏡を用いた微少手術である。ラット鼠蹊部の脂肪を採取する。移植細胞は計量し、移植細胞はおのおの同等とする。50 mm 四方のアルギン酸担体と移植細胞を混合して、ラット、頭蓋骨上 (皮下脂肪が全くない部分) に移植する。移植以後、1, 2, 3 週目の移植細胞の状態を肉眼的、組織学的に評価する。皮膚潰瘍治療実験に関して麻酔は上記同様。術式はマイクロ顕微鏡を用いた微少手術である。ラットの背中に直径 10 mm の難治性皮膚欠損を作成する。直径 10 mm の円形にアルギン酸を用意し、移植用に調整した骨髓単核球を含浸させて、皮

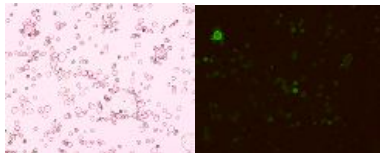
膚欠損部に移植する。皮膚潰瘍を 1 週間目に採取し潰瘍径を測定するとともに組織学的評価を行う。実験動物を用いる本研究は、全て京都大学動物実験倫理委員会ガイドライン及び公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院における動物実験に関する内規及び基本方針に沿って進め、ラット脊髄損傷モデルを利用した移植術は財団法人田附興風会医学研究所北野病院の倫理委員会の承認後行っている。

4. 研究成果

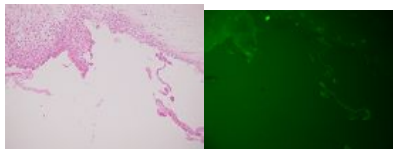
に関して 亜急性期、慢性期脊髄損傷ラットに直接骨髓間質細胞移植を行った。損傷後 2 週間後、培養した骨髓間質細胞を損傷部位に直接注入した。その後の行動評価は BBB スコアで行い、対照群が 4 ポイント程度に対して、移植群は 10 ポイントであった。行動回復がよい群は組織学的に再生軸索が損傷部位に確認できた。再生軸索もシュワン細胞につつまれ、周りはコラーゲンに線維を含むマトリックスの形成があった。一方、移植細胞も損傷部位にとどまらず、2 週間以内には消失する。これは、以前の研究と同様であった。同様の損傷時期に、我々の開発した髄液経路に細胞移植する方法でも行動評価を行った。その結果は移植群では 11-13 ポイントの回復を得た。直接細胞移植するよりも回復がよかった。その理由は、直接注入という二次損傷をおさえられるというや、髄液経路の方が移植細胞による炎症作用を抑制する効果が広範であると推測された。移植細胞は 1 週間前後で焼失すること、損傷部で分化するような細胞は認めなかった。損傷部の空洞形成は抑制され、再生軸索も損傷部を伸長していた。再生軸索は細胞外マトリックス内をのびていた。その再生様式は、末梢神経の再生形式に類似していた。その結果を得て、損傷時期は同様で、移植細胞を複数回投与することを試みた。その結果、BBB スコアも同様に回復することが確認された。さらに、組織学的な再生様式も同様な結果を支持していた。考察すると、脊髄損傷をうけたのち、損傷部位には細胞外マトリックスが形成される。従来、そのマトリックスが再生を害するという意見が多数で、再生神経はむしろ、宿主のアストロサイトやオリゴが再生軸索を支持するという考えが多かった。しかし、この結果から、移植細胞は一定時期に消え、移植群は空洞形成が少なく、回復行動が良いという結果は組織学的に細胞外マトリックス内にある再生神経が寄与していると考えてよいと思う。移植細胞が消失して、機能評価が高いというのは、移植細胞と損傷早期に分泌されるようななんらかの神経保護因子や神経伸長因子が関与していると考えられた。このことも、同様に、我々のグループ内で、その有効因子の探索を行っている ()。

次に に関してだが、挫滅損傷でなく、切断症例での回復を視野に入れた研究である。まず、切断空間に埋めるべき材料のコラーゲンとアルギン酸の優位性を評価した。今回は脊髄切断部分での材料の評価を、骨髓単核球細胞移植を併用することで行った。移植した細胞は SD-Tg (CAG-EGFP) ラットの大腿骨から採取した単

核球を利用した。移植前の移植細胞の蛍光は確認できた。しかし、損傷部位に移植したのち1週間後の損傷部位には蛍光のある細胞の確認ができなかった。ただし、HE染色では移植細胞らしい細胞は確認できた。以下に示す。



分離直後の単核球のヘマトキシリン/エオジン染色(左) 蛍光顕微鏡による GFP タンパク発現単核球の確認(右)



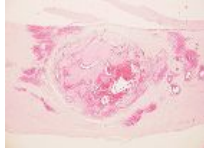
脊髄損傷部と単核球のヘマトキシリン/エオジン染色(左) 蛍光顕微鏡による GFP タンパク発現単核球の確認(右)

足場のタンパク質としてアルギン酸とコラーゲンの評価を行った。術後1から4週の1週間単位の組織学的評価としてヘマトキシリン/エオジン染色標本の観察も含めて検討すると、コラーゲン物質であるテルプラグは宿主側の脊髄組織と明瞭な境界が確認でき、テルプラグが脊髄組織中に吸収されていく過程では脊髄組織とテルプラグの間に明らかな空洞化を観察できた。



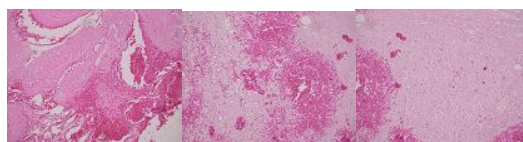
術後4週での移植部位の HE 染色(左) 抗 GFAP 抗体陽性のアストロサイトのプロセスは移植部位周辺に広がり突起による隔壁を形成していた。(中央) 抗 neurofilament 抗体陽性の神経細胞軸索突起においては十分な萌芽を確認することができなかった(右)。

以上の結果から、コラーゲン物質であるテルプラグは脊髄組織との親和性に問題があると考え、テルプラグに替わる足場タンパクとしてヘパリン/アルギン酸ゲルの使用を検討した。その結果、術後1週でも既に宿主側の脊髄組織に十分に親和性があることをヘマトキシリン/エオジン染色の観察により確認することができた。



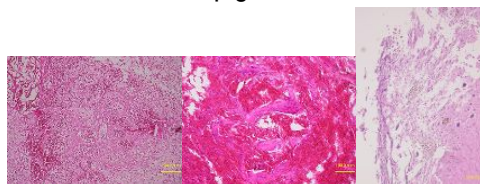
ヘパリン/アルギン酸を移植した脊髄組織像

移植部位中心部でヘパリン/アルギン酸ゲルは存在しているが、その周辺の脊髄組織とヘパリン/アルギン酸ゲルの間の組織は境界が不明瞭になっており、これはヘパリン/アルギン酸ゲルが脊髄組織に対して十分に親和性を持っていることを示唆している。



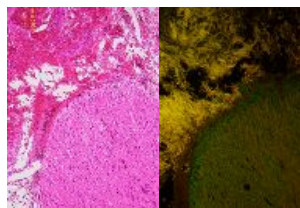
移植中心部(左)境界部(中央)境界部よ脊髄組織(右)

次にこのヘパリンアルギン酸ゲルに細胞移植せずに bFGF を添加させることで、同様の研究を行うこととした。このゲルは bFGF を1ヶ月以上徐放することができる。末梢神経でも効果を示した。bFGF は 0.005 μ g を含浸させた。



移植1週間目 移植中心部(左)移植ゲルは材料の形状を保持している。移植3週間目 移植中心部(中央)ゲルは吸収されつつある。移植8週間目(右) 移植ゲルは辺縁から吸収されている。

次に、移植3週間目の移植部の境界部の再生神経の状態を評価する。

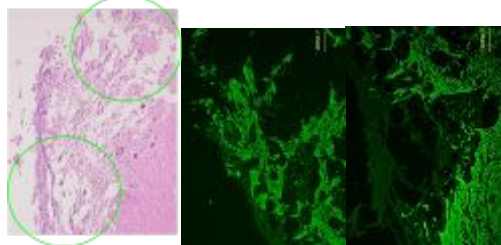


HE と GFAP(アストロサイト)を染色。境界部にアストロサイトの突起が伸長している。

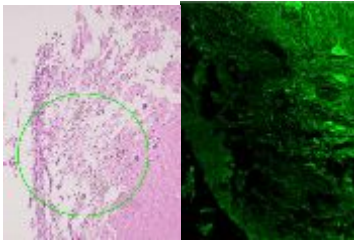


HE と NF(神経軸索突起)を染色。右にいくほど拡大像。境界部には神経軸索突起が伸びている。

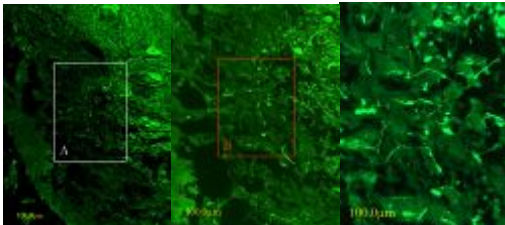
移植8週間目の移植部の境界部の再生神経の状態を評価する。



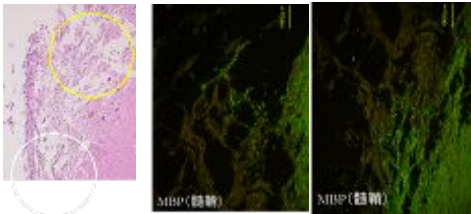
移植部の組織像。HE と GFAP 上部マルが左、下部マルが中央。辺縁部のゲルは吸収され、アストロサイトの突起が伸長している。



移植部の組織像。HE と NF
同一部分の神経線維突起が伸長している。



NF を拡大すると多数の神経線維突起をみる。



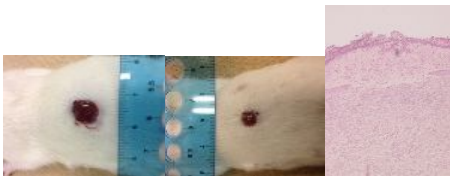
MBP を評価 が中央。黄色は右。わずかなが
ら、再生神経線維には髄鞘形成がある。神経軸
索突起の先端に認める。

今のところ、再生神経はわずかであり、機能的
評価につながるものではない。しかし、組織学的
には、再生神経を促す環境をヘパリン結合性アル
ギン酸ゲルが提供する可能性があることがわか
っている。ミエリネーシスの評価や意義など検討
の余地が多い。

次に皮膚潰瘍の治療実験に関して
背部に1cmの潰瘍を作成する。



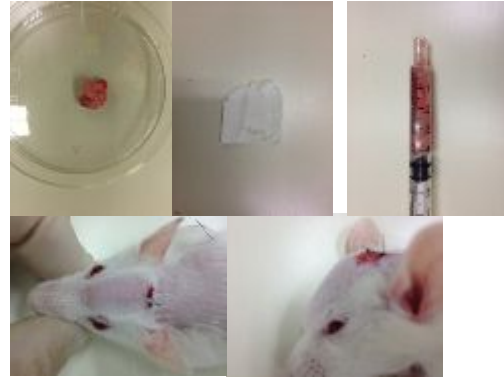
右はコントロール、左は bFGF 含浸したアルギ
ン酸ゲルに骨髄単核球を保持させた。



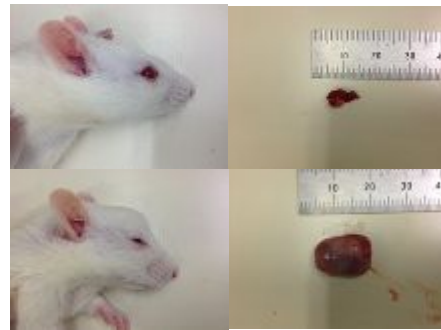
治癒直径はコントロールと治療群では差があ
った。組織学的、肉眼的にも治療群は表皮形成、肉芽
形成が促進されていた。また、新生組織には、血
管新生に富んでいた。より、詳細な評価が必要
である。

脂肪移植実験についてまとめる。
ラット鼠蹊部から脂肪細胞を採取し、中央のヘパ
リン結合アルギン酸ゲルを使用し、bFGF0.005 μ

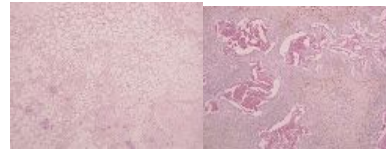
g、0.01 μ g を含浸させる。移植は脂肪のない頭
蓋骨直上に移植。



3 週間後、ラットの移植脂肪組織を採取。重さな
どを評価する。



上記はコントロールとbFGF 0.005 μ g との比較で
ある。0.01 μ g も同等の評価となった。
移植組織はおおむね、治療群は脂肪細胞の生
着がよく、組織学的にも血管新生がよいため、脂
肪細胞の生着がよいものと考察された。
しかし、一部の治療群では、血腫形成があるも
のもあり、治療群の結果に不安定さをのこすケ
ースもあり、より適正な bFGF の投与濃度の設
定が不可欠である。今後の検討の余地をのこす
結果となった。



しかし、一部の治療群では、血腫形成があるも
のもあり、治療群の結果に不安定さをのこすケ
ースもあり、より適正な bFGF の投与濃度の設
定が不可欠である。今後の検討の余地をのこす
結果となった。

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6件)

1. Suzuki Y, Ishikawa N, Omae K., Hirai T,
Ohnishi K, Nakano N, Nishida H, Nakatani
T, Fukushima M, and Ide C. Bone
marrow-derived mononuclear cell
transplantation in spinal cord injury

- patients by lumbar puncture. Restor Neurol Neurosci, 2014 (in press)
2. Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kamishina H, Izawa T, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T. Evaluation of serum phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a prognostic biomarker in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. Vet Surg. 43 (3):289-293, 2014
 3. Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C: Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats PLoS ONE 8 (9): e73494.doi:10.1371/journal.pone. 0073494, 2013
 4. F, Nakatani T, Iwase M, Maeda Y, Murao Y, Suzuki Y, Fukushima M, Ide C : Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. Restor Neurol Neurosci 30(2):127-136, 2012
 5. Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T : Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury. Vet Surg. 41(4):437-442.,2012
 6. Nishida H, Shoji Y, Nakamura M, Hatoya S, Sugiura K, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Nakayama M, Suzuki Y, Ide C, Inaba T: Evaluation of methods for cell harvesting and the biological properties at successive passages of canine bone marrow stromal cells. Am J Vet Res. 3(11):1832-1840. 2012

[学会発表] (計 2件)

1. bFGF 徐放効果を持ったヘパリンアルギン酸を用いたラット急性期脊髄損傷

での神経再生の評価の追加報告 平井達也、石川奈美子、太田正佳、鈴木義久 22 回日本形成外科基礎学術集会 2013 年 11 月 7 日 新潟県新潟市 朱鷺メッセ

2. bFGF 徐放ヘパリン/アルギン酸ゲルを用いたラット急性期脊髄損傷治療の評価平井達也 石川奈美子 月野暁彦 西林涼子 鈴木義久 21 回形成外科学術集会 福島県 福島市 2012 年 10 月 5 日

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 正佳 (OHTA, Masayoshi)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5 研究部・研究員

研究者番号: 20462278

(2) 研究分担者

鈴木 義久 (SUZUKI, Yoshihisa)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5 研究部・研究主幹

研究者番号: 30243025

井出 千束 (IDE, Chizuka)

藍野大学・医療保健学部 藍野再生医療研究所・教授

研究者番号: 70010080