

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390333

研究課題名（和文） 脊髄損傷、末梢神経損傷に対する臨床試験の推進

研究課題名（英文） Development of treatment for injury of central and peripheral nervous system

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：従来、損傷された脊髄組織は再生せず、その機能回復は不可能とされてきた。従って、脊髄損傷患者の予後は悲惨であり、生涯を対麻痺のために車椅子で、あるいは四肢麻痺のためにベッド上での生活を強いられる。よって、脊髄損傷の治療法の開発は急務である。われわれは骨髄単核球を用いてラット脊髄損傷の治療を行い有効性を証明した。同様の方法で脊髄損傷イヌの治療を行った。対照群では12頭中2頭が歩行可能となりその2頭では深部知覚は認められなかった。細胞移植群では11頭中6頭が歩行可能となりその6頭中1頭で深部知覚が認められた。有効性を確認した。骨髄単核球を用いたヒト臨床試験を行って安全性を評価した。10例実施し、本試験に関連する有害事象はなかった。今後、有効性評価を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：Intrathecal transplantation of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of the patients with spinal cord injury was conducted to assess the safety and feasibility. Ten patients were included. No adverse associated with the treatment responses were observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：細胞培養・移植学

### 1. 研究開始当初の背景

従来、損傷された脊髄組織は再生せず、その機能回復は不可能とされてきた。従って、脊髄損傷患者の予後は悲惨であり、生涯を対麻痺のために車椅子で、あるいは四肢麻痺のためにベッド上で、時には呼吸筋麻痺のために人工呼吸器すら外せない生活を強いられる。中枢神経は再生しないといわれていたため、治療は浮腫などに伴う二次損傷をできる

だけ小範囲にとどめることに主眼がおかれてきた<sup>1)</sup>。しかし近年動物実験で、神経幹細胞、ES細胞、活性化マクロファージ、嗅球由来細胞、骨髄由来細胞等を損傷部位へ移植し機能回復を得たとする報告がある<sup>1)2)3)4)5)6)7)8)9)</sup>。さらに、これらの細胞を用いた臨床研究もいくつか実施されている<sup>10)11)12)</sup>。2010年には米国でES細胞を用いた臨床試験が開始された。

本研究の研究者等が所属していた京都大学大学院形成外科と生体構造医学（解剖学講座）では<sup>13)</sup>、ラットの脊髄に控滅損傷を与え損傷部に直接あるいは脳脊髄液を介して海馬由来の神経幹細胞を移植し、細胞が損傷部に良く生着することを確かめてきた<sup>8)</sup>。しかし、幹細胞は増殖力が強く、腫瘍化しないようにコントロールすることが困難であるため臨床応用はできないことがわかった<sup>14)</sup>。そこで、ラットを用いて骨髄間質細胞を用いる実験を行った。まず損傷脊髄への直接移植について検討したところ、移植群では歩行運動に著明な改善を認め、組織学的にも空洞化を含む脊髄損傷程度の軽減を認めた<sup>14)15)</sup>。より簡便で侵襲の少ない方法として、ラット骨髄間質細胞の脳脊髄液中（第四脳室内）投与について検討したところ、損傷部への直接移植と同様の神経学的な回復と、組織学的な脊髄損傷程度の軽減を認めた<sup>16)17)</sup>。また、霊長類において間質細胞移植により腫瘍が発生しないことを確認した。この結果をもとに臨床試験を開始した。まず、獣医科病院で脊髄損傷イヌに対する培養骨髄間質細胞移植による脊髄再生治療を実施した。両後肢麻痺で深部知覚を欠く受傷後 1~3 ヶ月の慢性期脊髄損傷イヌ（ダックスフント）に対する複数回（1 週間隔 3 回投与）骨髄間質細胞移植治療ランダム化比較試験を行った。対照群では 12 頭中 2 頭が歩行可能となり（16.7%）その 2 頭では深部知覚は認められなかった。細胞移植群では 11 頭中 6 頭が歩行可能となり（54.5%）その 6 頭中 1 頭で深部知覚が認められた<sup>18)</sup>。さらにヒトに対しても、本研究の研究者等のグループによる急性期脊髄損傷に対する培養自家骨髄間質細胞移植による脊髄再生治療の検討が 2005 年より実施されている。2010 年 6 月までに 5 例に実施され、いずれにおいても細胞移植に伴う有害事象は観察されていない。しかし、5 例の結果からだけでは骨髄間質細胞投与の有効性については到底判断できない。有効性を確認するためには症例数を増やした臨床試験が必要である。多くの患者様に臨床試験に参加して頂き有効性を評価するためには培養操作がボトルネックになっていることがこの試験を通じて確認された。

## 2. 研究の目的

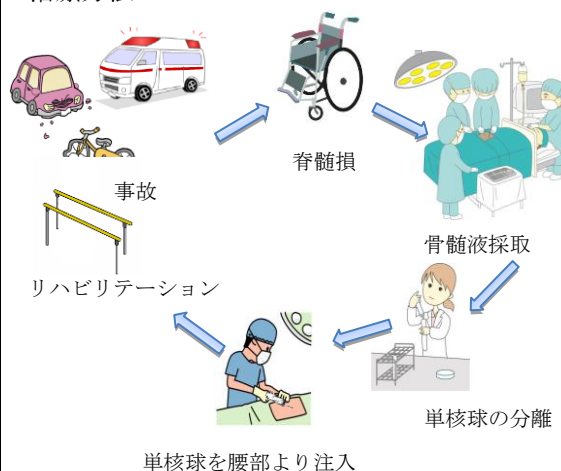
培養操作が不要である骨髄単核球を用いた方法の有用性を検討すること

## 3. 研究の方法

脊髄損傷モデルラットの脳脊髄液中への骨髄由来単核球投与により歩行運動の改善、脊髄損傷程度の軽減を評価する  
 獣医科病院でダックスフントの脊髄損傷に対し骨髄単核球を移植するイヌでの臨床研

究を行い安全性有効性を評価する  
 ヒト脊髄損傷患者に対する骨髄単核球を用いた臨床試験を実施し安全性を評価する

## 治療方法



## 適格基準

以下の選択規準をすべて満たし、かつ、以下の除外規準のいずれにも該当しない症例を適格症例とする。

### (1) 選択基準

- ① ASIA 機能障害尺度 A~C の脊髄損傷患者
- ② 受傷後 3 週から 1 年の患者
- ③ 画像診断により脊髄の部分的損傷が認められた患者
- ④ 同意取得時の年齢が 20 歳以上 60 歳以下の患者
- ⑤ 本人から文書による同意が得られた患者

### (2) 除外基準

- ① 脊髄の完全離断が認められた患者
- ② 中心性脊髄損傷の患者
- ③ SOFA スコアで 3 点以上の臓器障害を有する患者
- ④ B 型肝炎, C 型肝炎, ヒト免疫不全ウイルス感染症, 成人 T 細胞白血病, パルボウイルス B19 感染症が否定できない患者
- ⑤ 悪性腫瘍を合併する又は 5 年以内の既往を有する患者
- ⑥ 以下の疾患・障害を合併する患者
  - ・ 骨髄増殖性疾患又は骨髄異形成症候群
  - ・ コントロール不良な虚血性心疾患
  - ・ 自己免疫疾患
  - ・ 脊柱管狭窄症
  - ・ 脊髄損傷に起因しない中枢神経障害による四肢運動麻痺
  - ・ 肝機能障害
  - ・ 腎機能障害
  - ・ コントロール不良な精神障害

- ⑦ 他の臨床研究に参加中、又は参加終了から6ヵ月以上経過していない患者
- ⑧ 妊婦又は妊娠している可能性のある患者
- ⑨ その他、研究者等が不相当と判断した患者

#### 4. 研究成果

脊髄損傷モデルラットの脳脊髄液中への骨髄由来単核球投与により歩行運動の改善、脊髄損傷程度の軽減を確認した<sup>19)</sup>。ラットの実験では、移植された単核細胞は損傷部で長い間生存することはなくやがて消失したが、髄液中の HGF と VEGF が増加していた。この実験から、骨髄由来単核細胞は、細胞自体が分化したり足場となって神経再生を促進するのではなく、細胞から分泌される液性因子が脊髄の再生に関与していることが示唆された。また、損傷部へ遊走した細胞が宿主の細胞と直接コンタクトして何らかのシグナルを伝達する事による作用も再生に関与していると予想された。

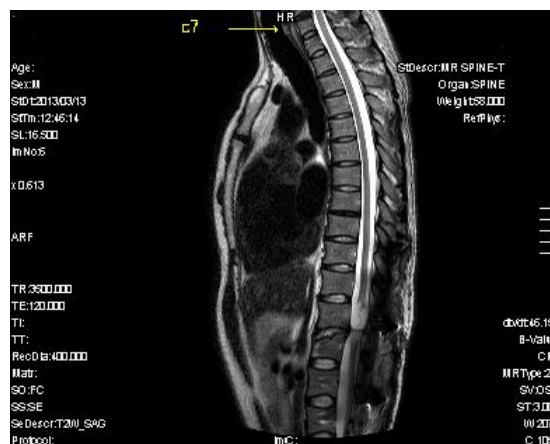
獣医科病院でダックスフントの脊髄損傷に対し骨髄単核球を移植するイヌでの臨床研究が実施され細胞移植による有害事象はなく、麻痺の回復が認められたと報告した<sup>20)21)</sup>。ヒト脊髄損傷患者に対する骨髄単核球を用いた臨床試験では安全性を確認中である。10例に移植が行われたが、全例で麻酔は必要なく、マイコプラズマ試験・無菌試験・エンドトキシン試験は陰性で、6ヶ月間腫瘍発生はMRIで観察されなかった。

同様のヒト臨床試験は外国で実施され、少なくとも移植による有害事象はないと報告されている<sup>22)</sup>。もし骨髄単核球の移植で治療効果が得られれば培養操作が不要なため培養骨髄間質細胞移植による治療よりも簡便で広く行える治療法となりうる。

一方、問題点も見つかった。神経が再生してもすでに筋肉の萎縮が強いためスコア2以上の改善まで結びつかなかった症例もあった。現在行われているリハビリテーションは中枢神経が再生することは想定されておらず、残存する運動機能で失った運動機能を代償する能力を高めることが目的である。しかし、今後中枢神経再生治療が現実のものとなれば、神経再生が得られるまでの期間筋肉が萎縮しないように維持する目的のリハビリテーションが必要になると思われる。



登録時の MRI 画像



6ヶ月後の MRI 画像

#### 参考文献

- (1) Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al: A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second Acute Spinal Cord Injury Study. N Engl J Med 1990 ; 322: 1405-1411,
- (2) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. Science 2000 ; 290: 1779-82.
- (3) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From Marrow to Brain: expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. Science 2000 ; 290: 1775-9.
- (4) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts: Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; 95: 3908-13.

- (5) Kopen GC, et al. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebrum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 ; 96 : 10711-6.
- (6) Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. Neuroreport 2000 ; 11: 3001-5.26)
- (7) Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El-Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99: 2199-204
- (8) Rapalino, O, Lazarov-Spiegler, O, Agranov, E, Velan, GJ, Yole, E, Fraidakis, M, Solomon, A, Gepstein, R, Katz, A, Belkin, M, Hadani, M, Schwartz M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. Nat Med 4, 1998, 814-821.
- (9) Li, Y., Field, PM, Raisman, G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. Science 277, 2000, 1997.
- (10) Huang Hongyun, et al. Influence of patients' age on function recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. Chin Med J 2003; 116(10):1488-1491
- (11) Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Hirakawa, A., Murao, Y., Suzuki, Y., Onodera, R., Fukushima, M., Ide, C. : Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: The first clinical trial case report. The Journal of TRAUMA. 2008; 64, 53-59
- (12) Samdani, A., Paul, C., Betz, R., Fischer, I., Neuhuber, B. : Transplantation of Human Marrow Stromal Cells and Mono-Nuclear Bone Marrow Cells Into the Injured Spinal Cord. 2009; SPINE 34: 2605-2612
- (13) Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, Kataoka K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C. Electrophysiological and HRP-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. Neurosci Lett. 2002 ; 318 : 121-124.
- (14) Bai H, Suzuki Y, Noda T, Wu S, Kataoka K, Kitada M, Ohta M, Chou H, Ide C. Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat: A method for cell transplantation J Neurosci Methods. 2003 ; 124 : 181-7.
- (15) Wu S, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Kitaura M, Chou H, Nishimura Y, Ide C. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. Neurosci Lett. 2002 ; 318 : 81-4
- (16) Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. Exp Neurol. 2004; 187: 266-278.
- (17) Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Ohta M, Chou H, Ide, C. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. J Neurosci Res 2003 ; 72 : 343-351.
- (18) Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, and Inaba T. Locomotor improvement after autologous bone marrow stromal cell intrathecal delivery in dogs with chronic spinal cord injury: American Journal of Veterinary Research (in press)
- (19) Yoshihara, T., Ohta, M., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., Suzuki, Y., Taguchi, A., Watanabe, Y., Adachi, Y., Ikehara, S., Sugimoto, Y., Ide, C. : Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury. Journal of Neurotrauma. 2007; 24, 1026-1036.
- (20) 田村勝利. M. ダックスフントの胸腰部椎間板ヘルニア症例に対する自家骨髄細胞移植の効果 : 第 80 回獣医麻酔外科学会 2010
- (21) 田村勝利. M. ダックスフントの胸腰部椎間板ヘルニア症例に対する自家骨髄細胞移植の臨床効果の検討 : 第 150 回日本獣医学会 2010
- (22) Kumar A. A., Kumar S. R., Narayanan R, Arul K, Baskaran M., Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cell Therapy for Spinal Cord Injury : A Phase I / II Clinical Safety and Primary Efficacy Date. Experimental and Clinical Transplantation. (2009)4:241-248.

## 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8件)

① Tamura, K., Harada, Y., Nagashima, N., Kunimi, M., Itoi, T., Ishino, H., Yogo, T., Nezu, Y., Hara, Y., Suzuki, Y., Ide, C., Tagawa, M., : Autotransplanting of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells for Complete Cases of Canine Paraplegia and Loss of Pain Perception, Secondary to Intervertebral Disc Herniation. Experimental and Clinical Transplantation 2012; 3: 263-272.

② Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Muraio, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M., Ide, C., : Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patient: a pilot study. Restorative Neurology and Neuroscience 2012; 30: 127-136.

③ Ide, C., Nakai, Y., Nakano, N., Seo, TB., Yamada, Y., Endo, K., Noda, T., Saito, F., Suzuki, Y., Fukushima, M., Nakatani, T., : Bone Marrow Stromal Cell Transplantation for Treatment of Sub-acute Spinal Cord Injury in the Rat. Brain Res 2010; 1332: 32-47.

〔学会発表〕(計9件)

① 平井達也、鈴木義久、石川奈美子、太田正佳、西田英高、田村勝利、井出千束、谷原正夫、鈴木康夫、bFGF徐放化のあるへパリン/アルギン酸ゲルを用いたラット急性期脊髄損傷に対する神経再生の評価、第12回日本再生医療学会総会、2013年3月21日-23日、パシフィコ横浜

② 鈴木義久、石川奈美子、平井達也、月野暁彦、西林涼子、太田正佳、脊髄損傷の治療法の開発、第21回日本形成外科学会基礎学術集会、2012年10月4日-5日、ホテルリステル猪苗代

③ AMERICAN ASSOCIATION FOR THE SURGERY OF TRAUMA 2010/9/22-25 ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS INCUBATED BONE MARROW STROMAL CELLS INTO CEREBROSPINAL FLUID IN SPINAL INJURY PATIENTS: A PILOT STUDY . T, Nakatani, . M, Iwase, . F, Saito, . Y, Maeda, . H, Tsuchiya, . T, Ikeda, . T, Omura, . O, Iiji, . K, Matumoto, . A, Hirakawa, . Y, Urao, . Y, Suzuki, . M, Fukushima, . C, Ide, . BOSTON MARRIOTT COPLEY PLACE BOSTON, MA, U. S. A.

〔その他〕

ホームページ等

<http://svso01.kitano-hp.or.jp/bportal/portal?PSML=PPage&Action=SBLogin>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (3) 連携研究者

中谷 壽男 (NAKATANI TOSHIO)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70188978

谷原 正夫 (TANIHARA MASAO)  
奈良先端科学技術大学院大学・  
物質創成科学研究科・教授  
研究者番号：50294286