

平成 21年 6月12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780240

研究課題名（和文） 脊髄損傷における骨髄間質細胞を用いた再生医療の確立

研究課題名（英文） Establishment of Regenerative therapy using bone marrow stromal cells for dog and cat with spinal injury

研究代表者 枝村 一弥 (EDAMURA KAZUYA)
 日本大学・生物資源科学部・講師
 研究者番号：80366624

研究成果の概要：

本研究は、自然発症の脊髄損傷の動物に自己の骨髄間質細胞（BMSCs）を移植して、脊髄を修復および再生させ、自立歩行を可能とすることを最終目標とした極めて臨床的で実際的な研究である。3 ヶ年にわたり 1) 犬の BMSCs の培養方法の確立、2) 犬の BMSCs の多分化能の検討、3) 犬の BMSCs のニューロンへの分化、4) 犬の BMSCs のシュワン細胞への分化、5) 犬の BMSCs の自己血清を用いた培養法の検討、6) 犬の BMSCs の凍結保存法の検討 7) 本治療法の実症例への臨床応用と治療効果の検討の順で実施した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 臨床獣医学

キーワード：獣医学、再生医学、移植・再生医療、外科、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

外傷や椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷は、小動物臨床で最も多く遭遇する神経疾患である。重症例では当時の医療技術を駆使してもその機能回復は困難であり、車椅子での生活を余儀なくされていた。最悪のケースでは安楽死も選択され、脊髄損傷の画期的な治療法は確立していない状況であった。

成体哺乳類の脊髄神経は再生不可能であると信じられてきたが、種々の実験系で神経の再生が確認され始めてきた。1990年代から、それらを解決する目的で異種細胞、ES細胞、

神経幹細胞、嗅球上皮細胞および骨髄間質細胞を利用した脊髄再生の研究が行われてきた。申請者は、研究開始前に異種細胞移植の研究を行っていたが、超急性拒絶反応の克服や種を超えた感染の問題など克服すべき問題が多く、小動物臨床領域での臨床応用の可能性は極めて低いと考えていた。また、犬ではES細胞の樹立が困難で、移植後の奇形腫の制御、培養の費用が高価などといった問題が解決されていない状況であった。さらに、神経幹細胞は脳底部に多く存在するという理由から採取は困難なことが多く、臨床応用

する時は他家から採取するために拒絶反応が生じる恐れがあった。従って、採取および分離が容易な骨髄間質細胞が最も現実的な移植細胞源であると考えた。

申請者は、日本大学付属動物病院で脊髄疾患の診療に携わり、多くの自然発症脊髄損傷の動物の症例を診療、手術する機会があった。これらの診療業務は、科学研究費補助金基盤 B (課題番号：16380213、研究代表者：徳力幹彦) の分担研究者として行っていた。この環境を利用し、自然発症脊髄損傷の動物における自己の骨髄間質細胞の効果を確かめられるという点で、現在までに不明であった問題点の解決や、臨床適応基準の設定などが明らかになる可能性が高いと考えられた。このような背景から、自然発症の脊髄損傷の動物に自己の骨髄間質細胞を移植して、脊髄を修復および再生させ、自立歩行を可能とすることを旨とする研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、自然発症の脊髄損傷の動物に自己の骨髄間質細胞を移植して、脊髄を修復および再生させる究極の根治療法を最終目標とした極めて臨床的で実証的な研究である。本研究では、世界に先駆けて犬の骨髄間質細胞の培養法を確立し、ニューロンへの分化を試みる。また、臨床応用を目指し犬の骨髄間質細胞のシュワン細胞への分化も試みる。現在問題となっている牛胎子血清 (FBS) を含有していない培養液を用いた検討もを行い、自己血清を用いた犬骨髄間質細胞の培養法の確立を目指す。また、犬骨髄間質細胞の長期保存法として凍結保存法の検討も行う。最終的に、自然発症脊髄損傷の動物に骨髄間質細胞を移植し、治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 犬の BMSCs の培養方法の確立

全身麻酔下で犬の上腕骨から骨髄を採取した。リン酸緩衝液に混じ細胞を洗浄した後に、Histopaque-1077 を用い、比重遠心して単核系細胞を分離、回収した。次いで、10%牛胎子血清 (FBS) を含む α -MEM 液体培地を用いて 5%CO₂、37°C の条件下で静置培養した。附着細胞が confluent となるまでの期間や形態を位相差顕微鏡にて経時的に観察した。

(2) 犬の BMSCs の多分化能の検討

犬の BMSCs の多分化能を検討する目的で、骨、軟骨、脂肪への分化を試みた。骨分化培地として 10%FBS、dexamethazone (0.1 μ M)、L-ascorbic acid (50 μ g/ml)、 β -glycerophosphate (10mM) を含む L-DMEM を用い、21 日間培養した。培養液中のアルカリフォスファターゼ (ALP) 濃度を、IDEXX 社製 Vet test を用い、比色定量法にて測定した。培養 21 日

目に、分化した細胞をホルマリンで固定して、骨芽細胞の同定を行う目的で ALP 染色、カルシウム沈着の有無を検討する目的で Von kossa 染色を行った。軟骨分化培地として 10%FBS、デキサメタゾン、Recombinant TGF- β 3、アスコルビン酸、L-Proline、Pyruvate、ITS+Premy を含む DMEM を用い、21 日間培養した。培養後に、軟骨への分化を確認する目的で、トルイジンブルー染色を行った。脂肪分化培地として、デキサメタゾン、h-Insulin、L-glutamine、インドメタシン、IBMX を含む DMEM を用い BMSC の培養を行った。脂肪への分化を確認する目的で、ズダン III 染色を行った。

(3) 犬の BMSCs のニューロンへの分化

犬の BMSCs を 3 回継代後に、pre-incubation media で 24 時間培養した。次いで、neuron-induction media で 6 時間培養しニューロンへの分化を試みた (分化群)。これらの期間に、L-DMEM のみで培養したものを対照群とした。実験中は、位相差顕微鏡にて形態を経時的に観察した。分化終了後に細胞を固定し、ニューロンのマーカーとして神経特異的エノラーゼ (NSE) と Neurofilament に対する免疫染色を行い、ニューロンへの分化を確認した。

(4) 犬の BMSCs のシュワン細胞への分化

BMSCs を 2 回継代後にシュワン細胞への分化を試みた。まず、BMSCs を 20%FBS と 1mM β -mercaptoethanol を含む α -MEM を用いて 24 時間培養した。次いで、10%FBS を含む α -MEM に all-trans-retinoic acid を添加し 3 日間培養した。最後に、PDGF-AA、bFGF、forskolin、neuregulin を含む 10%FBS 入りの α -MEM で 1 週間培養を行い、シュワン細胞への分化を試みた (分化群)。これらの期間に、 α -MEM のみで培養したものを対照群とした。実験中は、位相差顕微鏡にて形態の変化を経時的に観察した。分化終了後に、シュワン細胞のマーカーとして GFAP に対する免疫染色を行った。

(5) 犬の BMSCs における自己血清を用いた培養法の検討

犬から分離・培養した BMSCs を用い、5 つの群を設定し検討を行った。 α -MEM に 10% FBS を添加した培養液を用いた群を陽性コントロール (FBS 群) とした。 α -MEM のみを使用した群を陰性コントロール (無血清群) とした。供試犬より採血し分離した自己血清をそれぞれ 5%、10%、20% となるように α -MEM に添加し、それぞれ 5%AS 群、10% AS 群、20%AS 群とした。これらの細胞は 5% CO₂、37°C で静置培養した。各群ともに 10 日間培養し、3 日目と 7 日目に培養液を交換し

た。培養 3、7、10 日目に位相差顕微鏡で形態を観察し各群を比較した。培養 10 日後に各群ともに EDTA トリプシンにて細胞を剥がし、M&S テクノシステム社製 NucleoCounter を用いて細胞数を計測した。さらに各群ともに神経分化試験も行い、神経への分化率や神経のマーカーである NSE の染色性を比較した。

(6) 犬の BMSCs の凍結保存法の検討

犬 BMSCs を分離・培養し confluent となった後に、EDTA/Trypsin を用いて細胞を回収した。BMSCs を PBS で洗浄後に 1.0×10^6 個の細胞を 1ml の Cellvation® に混じ、 -80°C で凍結保存した。凍結保存した後は、 38°C のウォーターバスで解凍し、10% FBS 含有 α -MEM で再び静置培養し、その形態や増殖能を観察した。さらに、ニューロン分化培地を用いてニューロンへの分化誘導を行い分化率を計測した。分化終了後にニューロンのマーカーである NSE に対する免疫染色を行い陽性率を算出した。

(7) 実症例への臨床応用と治療効果の検討

交通事故や落下などによる外傷、または椎間板ヘルニアによる脊髄損傷で後肢が完全麻痺であり、手術による回復の見込みのない犬と猫を治療対象とした。本治療に関する同意を得た患者から MRI 診断時または手術時に骨髄を採取した。採取後に本研究室で確立した方法で、BMSCs を培養した。約 2 週間後に全身麻酔下を行い、透視下にて BMSCs を注射器を用いて移植した。術後は、リハビリテーションも行い、機能の回復の程度を検討した。

4. 研究成果

(1) 犬の BMSCs の培養方法の確立

骨髄液を培養した翌日には紡錘形の附着細胞が認められ、平均 10.0 ± 2.5 日で confluent となった。骨髄 2mL から、 $3.8 \pm 2.1 \times 10^6$ 個の細胞を得ることができた。これらの形態は、他品種で報告されている BMSCs の形態と極めて類似していた。これらの結果から、我々の培養した細胞が、犬の BMSCs であることが示唆された。本分離法は高価な機器を必要とせず簡易であり、臨床現場でも応用できる可能性を示した。

BMSCs (培養 7 日)



BMSCs (培養 14 日)



(2) 犬の BMSCs の多分化能の検討

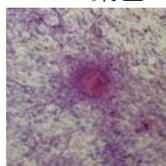
骨分化培地で培養後、平均 9.2 ± 2.4 日目で細

胞塊が形成され始めた。これらの細胞塊は培養期間とともに増加し、培養 18 日目にはフラスコ全体に一定の間隔を保った無数の細胞塊を形成するまでとなった。大きな細胞塊は骨様に白色を呈しており、肉眼的でも確認可能なものもあった。培養液中の ALP 濃度は、培養 21 日目まで有意な変動は認められなかった。ALP 染色を行ったところ、細胞塊は ALP 陽性であった。さらに、これらの細胞塊は Von kossa 染色にて黒染し、カルシウム沈着が認められた。これらの結果は、犬の BMSCs が骨芽細胞へ分化したことを示唆しており、犬の BMSCs も骨へと分化する能力を有していることが示唆された。

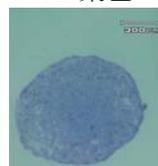
軟骨分化培地でペレット培養を行ったところ、早いものでは培養 3 日目から小さな白い球系の細胞塊を確認することができた。軟骨培養を行った全ての個体で、培養 3 週目までに白い球系の細胞塊を形成した。培養 3 週目に細胞塊をホルマリン固定し、パラフィン包埋後に薄切し、トルイジンブルーに対する染色性を確認したところ、全個体で異染性を示した。これらの結果は、犬 BMSCs は軟骨へも分化する可能性を示唆した。

脂肪分化培地で培養後、細胞は膨化し始め、空胞形成も認められた。これらの細胞のズダン III 染色を行ったところ、オレンジ色に染色され、犬 BMSCs が脂肪へと分化したことが示唆された。これらの結果を総合すると、培養を確立した犬 BMSCs は、少なくとも骨、軟骨、脂肪への多分化能を有している可能性が示唆された。

ALP 染色



TB 染色



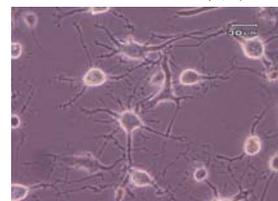
ズダン III 染色



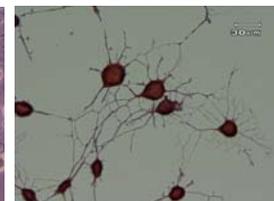
(3) 犬の BMSCs のニューロンへの分化

BMSCs は、neuron-induction media で培養後、約 65% でニューロン様の形態へと変化した。一方、対照群においてはニューロン様の形態に変化した細胞の割合は 0.9% であった。ニューロン様の形態に変化した細胞は、全ての細胞が NSE 陽性細胞であった。NSE 陽性細胞は分化群で 88.5%、対照群で 0.8% であり、両群間に有意差を認めた。BMSCs をニューロンへと分化誘導したところ、ニューロン様の形態へと変換し、NSE および neurofilament 陽性であった。すなわち、犬の BMSCs はニューロンへと分化する能力を有していることが示唆された。

ニューロンへの分化



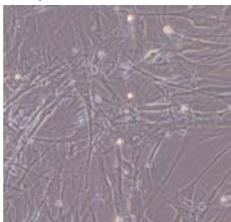
NSE 染色



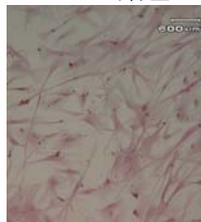
(4) 犬の BMSCs のシュワン細胞への分化

シュワン細胞への分化誘導培地での培養後、BMSCs の形態は変化し、培養 1~3 日後より鋭い突起を持った紡錘形細胞が認められた。本実験で、BMSCs から誘導された細胞の形態は、Kamada らが報告しているシュワン細胞 (BMSC-SC) と類似していた。これらの細胞の増殖力は旺盛で、平均 4.5 ± 1.5 日で confluent となった。ほぼ全ての細胞がシュワン細胞様の形態へと変化し、その分化率は $77.4 \pm 0.4\%$ であった。シュワン細胞様に変化した細胞を GFAP に対する免疫染色を行ったところ、GFAP 陽性率は $95.0 \pm 4.0\%$ であった。しかし、GFAP に対して染色されたほとんどの細胞が弱陽性であった。一方、対照群では GFAP 陽性細胞は認められなかった。今回、犬の BMSCs をシュワン細胞へと分化誘導したところ、シュワン細胞様の形態へと変化し、GFAP も陽性であった。これらの結果は、他の品種で認められている結果とほとんど同様であった。すなわち、犬の BMSCs もシュワン細胞へと分化する能力を有している可能性が示唆された。

犬 BMSC-SC



GFAP 染色

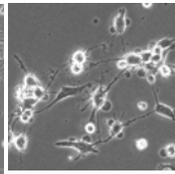
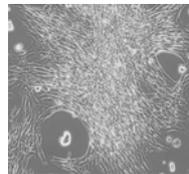


(5) 犬の BMSCs における自己血清を用いた培養法の検討

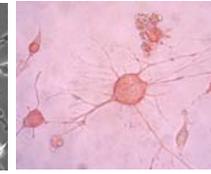
FBS 群の BMSCs は典型的な紡錘形を示し比較的均一に増殖した。一方、無血清群では BMSCs の増殖・形態の変化は認められなかった。FBS 群と違い AS 群では増殖の過程でコロニー様の細胞塊の形成が認められた。FBS 群が全ての群の中でもっとも細胞数が多く、無血清群では測定できない検体もあり、少ない傾向が認められた。また、AS 群の間では有意な細胞数の差は認められなかったが、濃度依存的に細胞数が増加し、10%以上はプラトーになる傾向が認められた。無血清群では神経に分化している細胞は認められなかった。自己血清で培養した全ての群で神経様の形態への分化が認められた。また陽性コントロールである FBS 群とも形態的な差は認められなかった。無血清群では全ての細胞が NSE 陰性であった。一方、FBS 群および AS

群では、神経様形態へと変化した細胞全てが NSE 陽性であった。これらの実験結果から、AS 添加培地を用いて犬 BMSCs を培養することが可能であり、その至適濃度は 10%であると結論付けられた。

20%AS 群:形態 神経分化



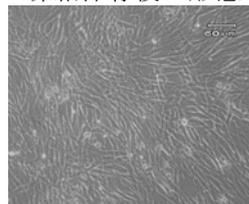
NSE 染色



(6) 犬の BMSCs の凍結保存法の検討

犬 BMSCs を Cellvation[®] で凍結保存した後に 10%FBS 含有 α -MEM で培養したところ、全例で紡錘形で線維芽細胞様の細胞の増殖が観察された。その形態は凍結前と極めて類似していたが、細胞膜に空胞状の変性が認められた。凍結保存後の増殖能は凍結前とほとんど差は無く、ニューロン分化培地で分化誘導したところ、全例でニューロン様細胞への形態の変化が観察された。その時のニューロン分化率は $75 \pm 7.0\%$ であった。分化した細胞の多くは NSE 染色が陽性となり、その陽性率は $88 \pm 5.6\%$ であった。今回、解凍した犬 BMSCs は、凍結前の形態と極めて類似し、増殖能もほとんど同様であった。さらに、ニューロン分化培地を用いて分化誘導したところ、ニューロン様の形態へと分化し、NSE 陽性であったことから、凍結保存した犬 BMSCs もニューロンへの分化能を有している可能性が高いことが示唆された。本研究で行った Cellvation[®] を用いた犬 BMSCs の凍結保存法は、従来の培養法よりも簡便で、かつ長期間保存することが可能であることが示唆された。

凍結保存後の形態



NSE 染色



(7) 実症例への臨床応用と治療効果の検討

Grade Vb の最も重度の麻痺で、外傷性脊髄損傷で飼い主の同意の得られた症例は、現在までに 8 例である。治療を行ったのは、犬 6 例、猫 2 例であった。すべてが、胸腰椎部の外傷性脊髄損傷 (T7-L4) であった。損傷から骨髄液採取までの期間は、6~21 日であった。損傷から BMSCs を移植するまでの期間は、20~41 日であった。移植細胞数は、 $1.4 \sim 12.1 \times 10^6$ cells であった。移植した細胞は、全てが神経様形態へと分化した。移植した 8 例中 6

例で随意運動と思われる肢の運動が認められた。驚くべきことに、8例中3例で歩行可能となった。歩行が認められた症例は、全例で損傷部位へのBMSCsの移植を行った症例であった。治療成績と移植までの期間には、関連は認められなかった。実際の症例では、損傷部位にできる限り多くのBMSCsを移植出来た症例で治療成績が良い傾向が認められた。一方で、全ての症例で深部痛覚が回復していないという問題もあった。今後は、症例数を増やし、さらに検討を続けていく必要がある。

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 2件)

- ① 枝村一弥. MRI世代から見た犬や猫における神経疾患の診断と治療の現状と最新知見. 日本獣医師会雑誌. 査読無 61(4): 260-267. 2008.
- ② 枝村一弥. 犬の骨髄間質細胞の神経系細胞への分化と脊髄損傷症例への臨床応用の可能性. 日本獣医学会学術集会講演要旨集. 査読無 p.124. 2007.

[学会発表] (計 7件)

- ① 枝村一弥. 骨髄間質細胞を用いた脊髄損傷の治療戦略と将来展望. 静岡県角笛会総会 (2009年3月8日、静岡グランドホテル、静岡)
- ② 枝村一弥. 脊髄疾患の診断と治療に関する最新の話—画像診断・ステロイド療法・神経再生医療・リハビリに関する徹底討論—. 第5回日本獣医内科学アカデミー (2009年2月13-15日、京王プラザホテル、東京)
- ③ 枝村一弥, 黒澤隆, 管野信之, 関真美子, 手島健次, 浅野和之, 田中茂男. 犬骨髄間質細胞の培養および神経分化における自己血清添加培地の影響. 第146回日本獣医学会 (2008年9月24-26日、宮崎シーガイア)
- ④ 黒澤隆, 枝村一弥, 管野信之, 関真美子, 手島健次, 浅野和之, 田中茂男. 犬骨髄間質細胞の培養および神経分化における自己血清添加培地の影響. 第46回日本大学獣医学会 (2008年6月7日、日本大学生物資源科学部)

⑤ 枝村一弥, 清水麻衣子, 久楽賢治, 管野信之, 関真美子, 手島健次, 浅野和之, 田中茂男. 犬の骨髄間質細胞におけるシュワン細胞への分化に関する検討. 第45回日本大学獣医学会 (2007年6月2日、日本大学生物資源科学部)

⑥ 枝村一弥, 樋口飛鳥, 久楽賢治, 管野信之, 関真美子, 手島健次, 浅野和之, 田中茂男. 犬の骨髄間質細胞における骨細胞への分化に関する検討. 第45回日本大学獣医学会 (2007年6月2日、日本大学生物資源科学部)

⑦ 枝村一弥. 犬の骨髄間質細胞の神経系細胞への分化と脊髄損傷症例への臨床応用の可能性. 第143回日本獣医学会学術集会 (2007年4月5日、筑波国際会議場)

[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]

本研究に関する内容を、学会発表の他に獣医師会の卒後教育講演等で20件行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝村一弥 (EDAMURA KAZUYA)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80366624

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者