

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390414

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対する新たな治療法の確立：培養自家骨髄間質細胞の髄液内投与

研究課題名(英文) Establishment of a new strategy for the treatment of spinal cord injury: Intrathecal administration of incubated autologous bone marrow stromal cells.

研究代表者

中谷 壽男 (NAKATANI, Toshio)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70188978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円、(間接経費) 2,910,000円

研究成果の概要(和文)：受傷後早期の脊髄損傷に対する治療として、自己の骨髄由来の単核球細胞を脳脊髄液中に投与することが、安全かつ有用な治療方法となり得るかを検討した。頸髄損傷5例、胸髄損傷5例に対し、自己の腸骨から分離した単核球およそ108個を直ちに腰椎穿刺にて髄液内に投与した。半年以上追跡したが有害反応はなく、かつ早期実施症例では神経機能の改善を認めた。骨髄細胞の髄液内投与による亜急性期脊髄損傷の治療は安全かつ有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To determine whether intrathecal administration of autologous bone marrow cells is safe and feasible for treatment of subacute spinal injury, five patients with tetraplegia due to cervical spinal injury and 5 with paraplegia due to thoracic spinal injury were included. About 1 million mononuclear cells were obtained from their own iliac bone, and administered immediately into cerebrospinal fluid by lumbar puncture. The patients were closely observed for 6 months. No adverse responses were observed. In a few patients treated earlier, definite motor and sensory recovery was remarkable, but limited in patients treated later. Spinal injury treatment with administration of bone marrow cells into cerebrospinal fluid is safe and feasible underwent in the early subacute phase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：脊髄損傷 脊髄再生 骨髄単核球 髄液内投与 骨髄間質細胞 四肢麻痺 対麻痺 運動スコア

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

脊髄損傷、なかでも頸髄損傷による運動・知覚麻痺を来した場合には、機能障害のために生活は著しく障害され、褥瘡や感染症などの深刻な合併症を来す。損傷された脊髄の炎症やさらなる壊死を防止し、失われた脊髄機能を再生させようと、多くの研究者が生物活性のある諸物質や細胞を用いた研究に取り組んできた。ES細胞には倫理的、免疫学的問題などが生じることから、本研究の開始当初にはiPS細胞が大いに期待されていたが、臨床応用は数年から10年先と予測されていた。

(2) これまでの研究成果を踏まえて

我々の研究グループでは、連携研究者が種々の基礎的実験や動物実験の成果を積み重ね、ラットの骨髄間質細胞を胸髄損傷ラットの第四脳室を經由して脳脊髄液中に投与し、神経学的な回復と組織学的にも脊髄壊死の程度が軽いという結果を得た。そこで、霊長類を用いた脳脊髄液中への骨髄間質細胞投与の安全試験を経て、本研究代表者は「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(第 - 相臨床試験)」と題した臨床試験を平成17年から開始した。これは、急性期脊髄損傷患者の脊椎固定手術に際し、脊椎補強の腸骨片を採取する際に骨髄海綿骨を採取し、自己の間質細胞を培養増殖した後に、 10^7 - 10^8 個の細胞を腰椎穿刺にて髄液中に投与し、損傷部に生着・増殖した細胞はいずれ消失するものの、その間に分泌する液性因子の働きにより脊髄機能の再生を図る臨床試験である。実施し得た5症例では、いずれも安全性には問題はなく、機能面でも3症例で良好な結果を得ていることを報告してきた。

2. 研究の目的

研究目的は、上記の臨床試験ではさらに症

例数を重ねる必要があり、安全性の確認、有効性の判断、適用条件の設定などにより、脊髄損傷の新たな治療法を確立することである。

しかし、細胞の培養には培養施設の運用など、多額の経費が掛かり、施設などの条件の制約が大きい。そのために、多施設共同研究を実施することも困難で、有効性の判断に必要な症例数を増やす事が難しい。そこで、本研究の開始に当たっては、これまで実施してきた自己骨髄間質細胞の培養増殖を行わずに、基礎研究に基づいて、患者から採取した骨髄から単核球を分離し、 10^8 - 10^9 個の単核球を直ちに脊髄液中に投与することとして、汎用性を高めることとした。従来は、脊椎固定術に際して腸骨を採取する際に、骨髄を得て居たために、時間的制約が大きく、適用症例をえることが困難であったが、本法により適用の時間的制約が大幅に緩められたために、臨床試験を希望する症例が多く、予定症例数に早く到達した。なお、本臨床試験は平成18年に制定された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に則り、厚生労働大臣の許可を得て実施した。

3. 研究の方法

脊髄損傷患者の中から、別に定めた適用基準と除外基準により患者を選定し、5例の頸髄損傷による四肢麻痺患者と、5例の胸髄損傷による対麻痺患者、いずれもAmerican Spinal Injury Impairment Scale (AIS)がAまたはBの運動完全麻痺の患者、計10例を対象とした。

患者は腸骨から約120mLの骨髄液を吸引採取し、比重遠心法で単核球を分離し、洗浄を繰り返し、 10^8 - 10^9 個の単核球浮遊液をえた。一部をマイコプラズマ、エンドトキシン試験に付し、陰性と判明し次第、腰椎穿刺にて髄注した。また、細胞の品質はCD29、90、11b/c、34、45、117、133の各表面マーカーにて確認した。

患者は投与後 6 ヶ月まで、定期的に通院して International Standard Classification of Spinal Cord Injury motor and sensory function score (ISCSFI) により運動・知覚神経機能を評価するとともに、MRI を含む画像、採血検査にて安全性を追求した。

4. 研究成果

(1) 髄液内投与の安全性

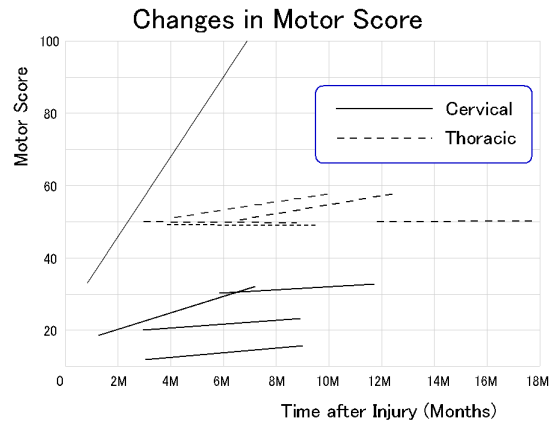
今回の研究は第 Ⅰ相臨床試験として行った。すなわち、安全性の確認が重要課題の一つである。骨髄細胞の髄液内投与の安全性に関しては、今回実施した 10 症例を少なくとも 6 ヶ月以上追跡しているが、細胞移植に伴う有害反応は全く起きていない。先の培養自己骨髄間質細胞を投与する臨床試験も 5 症例に実施し、最長 8 年経過中であるが、有害事象のうち細胞移植に起因すると考えられる有害反応は全く無いと、第三者を含む効果・安全性評価委員会が判定している。このように、自己の骨髄細胞を髄液内投与することについては、安全性が確認されたと考えている。このことは、今後、脳脊髄液内に骨髄細胞を投与する同様の臨床試験を推進して行くに当たって重要な判断材料を提供する事が出来たものと考えている。

(2) 運動・知覚の改善効果について

本研究では各症例の背景が異なるために、少ない症例数でその運動・知覚機能の改善効果を評価することは不可能である。そのためには相当数の症例を積み重ねなければならないために、今回の研究は安全性を確認して、多施設共同研究に道を開くための方法の確立を目指したものである。

図に 10 症例の運動スコアの推移を示した。受傷 3 週後、6 週後に移植した二症例では、著しい改善をみた。とりわけ 3 週後に移植した症例 2 では、運動機能が 33 点から 99 点へと劇的な改善を示した。本症例は 57 歳で C3-6

にかけての頸髄損傷を認め、受傷 24 日目に細
図：運動スコアの経時的変化



横軸は時間経過を月単位で、縦軸は ISCSFI の運動スコアを示す。実線は頸髄損傷症例の、破線は胸髄損傷症例の 6 ヶ月間にわたる経時的変化を示す。すなわち線の左端が移植時の運動スコアを、右端が 6 ヶ月後の運動スコアを示す。

表：症例の AIS と ISCSFI score の変化

症例	AIS		Motor score		Light touch score		Pin Prick score	
	移植時	6M後	移植時	6M後	移植時	6M後	移植時	6M後
1	A	B	50	50	62	78	58	63
2	B	D	33	99	70	106	44	68
3	A	A	51	57	77	79	78	82
4	B	C	50	57	61	98	40	44
5	A	A	50	50	59	67	64	67
6	A	A	20	22	26	28	20	21
7	B	B	30	32	55	78	46	52
8	B	C	19	31	40	76	24	54
9	B	B	50	50	76	77	60	68
10	A	A	12	16	20	36	12	16

表には今回の対象 10 症例の移植時と半年後の AIS grade の変化や、運動スコア、知覚スコアを示した。

胞移植をした。4 週間後には上下肢ともに筋

力の明確な改善が見られ、6ヶ月後には起立し、装具を着けての歩行が可能となり、箸で食事が出来るようになった。本症例では、知覚スコアにおいても60点の劇的改善をみている。受傷42日後に移植した21歳の症例8でも、運動スコアで12点、知覚スコアでは66点の改善をみた。

一方、頸髄損傷でも受傷後3-6ヶ月に移植した症例6,7,10では僅かな改善を認めるに留まった。これらより、受傷後数週間以内の早期の移植が望ましいのではないかと示唆がえられた。

破線で示した胸髄損傷では、いずれも上肢の運動機能は障害されていないために、移植時の運動スコアは50点は確保されていたが、移植後の改善は全く認められないか、ごく僅かの改善に留まった。なお、胸髄損傷の5症例はいずれも移植時期が受傷3ヶ月以降で有り、数週間以内の早期に移植のために受診された症例は無かった。とくに3症例においては運動スコアは全く改善しなかった。

しかしながら、運動スコアに改善の見られなかった胸髄損傷症例においても、知覚スコアでは20点、40点の改善をみた症例が有り、また、運動スコアに反映されないものの、坐位を保持できる時間が延びるなどの、肋間筋の筋力が改善されたと思われる症例が見られた。現時点のISCSIの運動スコアでは、四肢の筋力が反映されるものの、肋間筋の筋力は評価の対象とされていない。そのために、胸髄損傷では脊髄機能が大幅に改善されて腰髄が支配する下肢の筋力が改善されるまでは、運動スコアに反映されない評価方法となっていることが影響していると考えられる。

なお、AIS grade に関しては、Aの5症例では一例がBに改善したに留まったが、grade Bの5症例では一例がDへ、2例がCへ改善し、Bに留まったのは2症例であった。

なお、先に報告した培養骨髄細胞を移植した研究(後述の発表論文)では、受傷2,3週後の移植に限定していたこともあってか、

5症例のうち歩行可能症例、起立訓練中症例を含む症状の改善著明な改善を3例に認めている。

(3)まとめと今後の展望

以上より、今後は更に症例を重ねて、安全性の確認と、有効性の評価が可能な症例数を積み上げる必要がある。

今回の研究で、骨髄細胞を培養増殖せずに、骨髄液採取後、単核細胞を分離して直ちに髄液内投与した場合にも、安全性には問題が無く、かつ効果も期待出来る可能性が示された。

また、移植は受傷後早期の数週間以内程度の症例を対象とすることが、効果の期待度が高いことが示唆された。

胸髄損傷については、有効性が望めないのでは無く、評価方法を検討することによって有効性の判断に資するべきと考えられる。

AIS grade Aの症例に関しては、改善の効果を期待することが、困難であることが示唆され、対象をgrade BまたはCの症例に限定することが、効率が良いと考えられた。

今後は、これらの結果を考慮した上で、多施設共同研究や先進医療への申請を目指して行きたい。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Yoshihisa Suzuki, Namiko Ishikawa, Kaoru Omae, Tatsuya Hirai, Katsunori Ohnishi, Norihiko Nakano, Hidetaka Nishida, Toshio Nakatani, Masanori Fukushima, Chizuka Ide, Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. Restorative Neurology and Neuroscience, 査読有、2014, in press
Norihiko Nakano, Yoshiyasu Nakai, Tae-Beom Seo, Tamami Homma, Yoshihiro Yamada, Masayoshi Ohta, Yoshihisa Suzuki, Toshio Nakatani, Masanori Fukushima, Miki Hayashibe, Chizuka Ide,

Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation through CSF on the Subacute and Chronic Spinal Cord Injury in Rats, PLOS one、査読有、8巻、2013、e73494、

DOI:10.1371/journal.pone.0073494

Fukuki Saito, Toshio Nakatani, Masaaki Iwase, Yuji Maeda, Yoshinori Murao, Yoshimasa Suzuki, Masanori Fukushima, Chizuka Ide, Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: A pilot study.

Restorative Neurology and Neuroscience 査読有 30巻、2012、127-136、

DOI:10.3233/RNN-2011-0629

中谷壽男、骨髄間質細胞、Bone Joint Nerve、査読無、1巻、2011、577-582

中谷壽男、岩瀬正顕、齊藤福樹、前田裕仁、鈴木義久、福島雅典、井出千束、骨髄間質細胞の髄液内投与、整形外科、査読無、62巻、2011、755-760

[学会発表](計6件)

Toshio Nakatani, Yoshimasa Suzuki, Fukuki Saito, Masaaki Iwase, Yuji Maeda, Masanobu Tsuda, Yasuyuki Kuwagata, Masanori Fukushima, Chizuka Ide, Clinical trials for spinal injury treatment with autologous bone marrow cells administration into cerebrospinal fluid, 7th Asian Conference on Emergency Medicine (ACEM2013)、2013年10月25日、Tokyo International Forum, Tokyo
齊藤福樹、津田雅庸、中谷壽男、鎌方安行、岩瀬正顕、鈴木義久、井出千束、福島雅典、脊髄損傷に対する新しい治療法--骨髄由来単核球を用いて--、第28回日本救命医療学会、2013年9月21日、久留米大学筑水会館、久留米、
Toshio Nakatani, Fukuki Saito,

Yoshimasa Suzuki, Masanori Fukushima, Chizuka Ide, Intrathecal administration of bone marrow mononuclear cells for the treatment of spinal injury; a clinical trial, International Surgical Week 2013、2013年8月25日、Helsinki (Finland)

齊藤福樹、岩瀬正顕、中谷壽男、津田雅庸、前田裕仁、宮崎秀行、北元健、金沢武哲、鈴木義久、井出千束、福島雅典、当院における脊髄損傷に対する再生医療への取り組み、第40回日本救急医学会総会、2012年11月15日、京都・国立京都国際会館

岩瀬正顕、中谷壽男、浅井昭雄、頸髄外傷の現状と問題点、第26回日本外傷学会、2012年5月25日、リーガロイヤルホテル東京、東京

齊藤福樹、岩瀬正顕、中谷壽男、鈴木義久、井出千束、福島雅典、ヒト急性期脊髄損傷に対する自家骨髄間質細胞移植～臨床試験までのみちのり～、第39回日本救急医学会、2011.10.19、京王プラザホテル、東京

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

[その他]
ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 義久 (SUZUKI, Yoshihisa)
田附興風会・第6研究部・研究主幹
研究者番号: 30243025

井出 千束 (IDE, Chizuka)
藍野大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70010080

福島 雅典 (FUKUSHIMA, Masanori)
先端医療振興財団・臨床研究情報センタ
ー・センター長
研究者番号：80107820

岩瀬 正顕 (IWASE, Masaaki)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30247902

齊藤 福樹 (SAITO, Fukuki)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：1046227