

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580469

研究課題名(和文) 骨髄単核細胞を用いた脊髄再生治療法の開発および獣医臨床応用

研究課題名(英文) Development of a regenerative therapy for spinal cord injury by autologous transplantation of bone marrow derived mononuclear cell.

研究代表者

原田 恭治 (Harada, Yasuji)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70398882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄の再生医療として、幹細胞を含む様々な細胞を用いた移植治療法が考案されているが、自己骨髄由来単核細胞は細胞培養を必要としないため、受傷後早期に移植することが可能である。我々は、動物の脊髄損傷症例に対して自己骨髄由来単核細胞を用いた臨床試験を実施したところ、治療効果が認められた。骨髄単核細胞がどのようなメカニズムで脊髄を再生するのかはほとんど解明されていないので、ラットを用いた動物実験を行った。その結果、移植した骨髄単核細胞は約一週間局所に存在し、HGF、MPC-1、VEGFなどのサイトカインを放出することにより、細胞のアポトーシス発現を抑制し、神経を保護していることが認められた。

研究成果の概要(英文)：As a regenerative therapy of a spinal cord, the various types of cell therapy were developed. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cell is useful for early transplantation after injury without a cell culture. Our clinical trials, using an autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells, showed therapeutic effect for the spinal-cord-injury case of dogs. Since most mechanisms in which the transplanted bone marrow-derived mononuclear cell regenerate a spinal cord were not explored, we examined by using a rat model. As a result, the transplanted bone marrow-derived mononuclear cells existed in the injected area for over one week. Cytokines, such as HGF, MPC-1, and VEGF were secreted from transplanted bone marrow-derived mononuclear cells. These cytokines believed to reduce the apoptosis of nerve cells, and having a protective effect for injured spinal cord.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：再生医療 脊髄 骨髄 単核細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脊髄神経は再生能が乏しく、事故や疾病などで脊髄を損傷すると下半身麻痺や四肢麻痺の状態が生涯続く。そのため、何らかの脊髄を再生させるような治療法の開発が求められている。我々は、動物の脊髄損傷症例に対して骨髄単核細胞を用いた臨床試験を世界に先駆けて実施したところ、明らかな治療効果が認められた。

2. 研究の目的

骨髄単核細胞が脊髄を再生する機序はまだ十分に解明されていないため、動物実験と獣医臨床試験の双方向からのアプローチでそのメカニズムを解明していくとともに、得られた情報のフィードバックから最適な脊髄再生治療法を確立していくことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷ラットモデルを使用した動物実験

ドロップタワーを用いた重錘落下法により、脊髄損傷ラットモデルを作成する。あらかじめラットの骨髄から分離回収しておいた骨髄単核細胞を損傷部周囲に移植する。移植後定期的に BBB スコアを用いた運動機能検査を行い、組織学的検査所見と比較しながら考察する。

(2) 動物症例に対する骨髄単核細胞自家移植の臨床試験

神経学的検査や MRI 検査などにより診断された、犬の椎間板ヘルニア症例 (グレード 5 : 痛覚消失をとともなう完全麻痺の最重症例) に対して、自家骨髄単核細胞移植術を行う。逸脱した椎間板物質の摘出手術に先立ち、症例の上腕骨近位から骨髄穿刺により骨髄液を採取する。採取した骨髄液を遠心分離して骨髄単核細胞を回収する。その後、椎間板ヘルニアの摘出手術を行い、手術終了時に準備しておいた骨髄単核細胞を脊髄内に注入する。このような方法で骨髄単核細胞移植術を実施し、その後の回復過程を MRI 検査や電気生理学的検査を用いて評価し、術後成績を検討する。

4. 研究成果

(1) 脊髄ラットモデルを使用した動物実験

(a) 脊髄損傷部に注入移植した骨髄単核細胞は、損傷部周囲の組織に接着し、一定期間影響を与えることが組織学的に認められた。時間の経過とともに移植細胞には減少していく傾向が認められたが、移植後 7 日間以上は脊髄損傷部周辺に接着していることが認められた (図 1a)。

(b) 脊髄損傷部に移植された骨髄単核細胞からは、HGF、MPC-1、VEGF など、神経の再生および保護作用の認められているサイトカインの放出が確認された (図 1b)。

移植した骨髄単核細胞の脊髄内分布

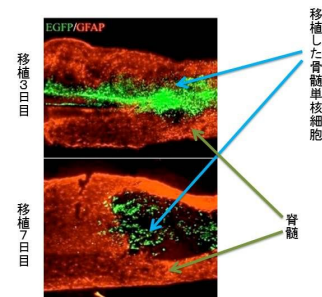


図 1a

移植した骨髄単核細胞から放出されるサイトカイン

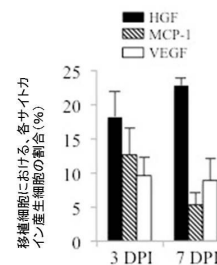


図 1b

(c) 脊髄損傷部の脱髄領域 (面積) は、骨髄単核細胞を移植した群のほうが、コントロールに比較して、有意に小さい値を示した (図 1c)。

脊髄損傷後の脱髄領域

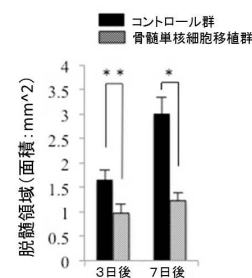


図 1c

(d) 脊髄損傷部周辺細胞中のアポトーシス発現率は、骨髄単核細胞を移植した群のほうが、コントロールに比較して、有意に低い値を示した (図 1d)。

アポトーシス発現率

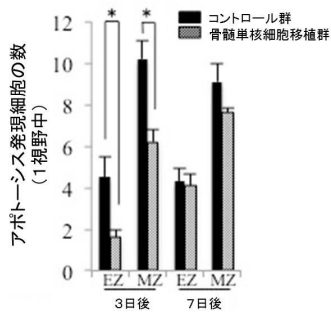


図 1d

(e) 骨髄単核細胞を移植した脊髄損傷モデルラットの歩行回復における BBB スコアは、コントロール群に比較して有意に高い値を示した (図 1e)。

歩行機能の回復

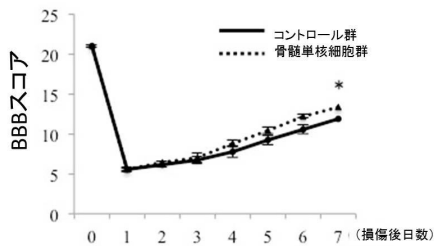


図 1e

以上の結果から、損傷した脊髄に移植した骨髄単核細胞は一定期間、移植部周辺に定着していること、移植された骨髄単核細胞は、HGF、MPC-1、VEGF など、神経細胞の保護に効果の認められているサイトカインを放出することにより、細胞のアポトーシス発現を抑制し、脊髄組織が崩壊していくこと (脱髄) を抑制していることが認められた。

(2) 犬の椎間板ヘルニア症例に対する臨床試験

(a) 胸腰部椎間板ヘルニア・グレード 5 (両後肢の完全麻痺、深部痛覚消失) を呈するダックスフンド 36 頭に対して、片側椎弓切除術および自家骨髄単核細胞の移植術を行ったところ、術後の歩行回復率は 88.9% を示し、片側椎弓切除術のみを実施した症例の回復率 56.5% (46 頭) に比較して、有意に高い回復率を示した (図 2a)。

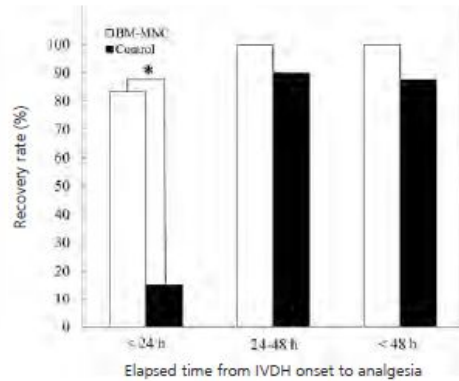


図 2a

(b) 骨髄単核細胞の移植術後、運動機能の回復が認められた症例では、脊髄誘発電位の波形に関しても回復が認められた (図 2b)。

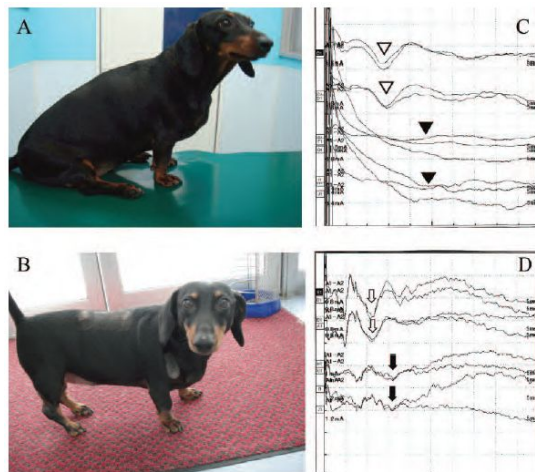


図 2b

(c) 移植した骨髄単核細胞中には、HGF の mRNA が数多く発現していることが認められた (図 2c)。

mRNA expression	11	9	2
Number of samples	940.75	1107.08	192.28
HGF**	1	1	0
IL-6**	1	1	1

図 2c

(d) 受傷後長期間が経過している症例に關しても、骨髄単核細胞の移植術後に運動機能の回復する症例が認められた (図 2d)。

Timing	Gait		Proprioception		Nociceptive Response		Texas Spinal Cord Injury Scale (Total Score)
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	
Before transplant	0	0	0	0	0	0	0
After transplant	2	2	1	1	0	0	6†

Possible ranges of scores: gait (per limb), 0 to 6; proprioception (per limb), 0 to 2; nociceptive response (per limb), 0 to 2; Texas Spinal Cord Injury Scale (total score), 0 to 20.
† Total score at day 37 and day 1245 after transplant.

図 2d

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) Tamura K, Harada Y, Nagashima N, 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. Exp Clin Transplant. 2012 Jun;10(3):263-72. PubMed PMID: 22631064. DOI: 10.6002/ect.2011.0151

2) Tamura K, Harada Y, Kunimi M, Takenitsu H, Hara Y, Nakamura T, Tagawa M. Autologous bone marrow mononuclear cell transplant and surgical decompression in a dog with chronic spinal cord injury. Exp Clin Transplant. 2015 Feb;13(1):100-5. DOI: 10.6002/ect.2013.0237.

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 田村勝利、原田恭治、長島奈歩、他 9 名、犬の慢性期脊髄損傷に対する自家骨髄由来単核細胞移植術の効果、獣医麻酔外科学会、2012 年 6 月。

2) 田村勝利、原田恭治、長島奈歩、他 10 名、犬の対麻痺を伴う胸腰部椎間板ヘルニア症例における 3DCT 検査と化学的メディエーターの検討、日本獣医学会、2012 年 9 月。

3) 新井清隆、原田恭治、神野信夫、他 2 名、ラット急性期脊髄損傷モデルを用いた骨髄由来単核細胞移植療法の治療機序および効果に関する検討、獣医麻酔外科学会、2014 年 12 月。

〔図書〕(計 1 件)

1) 原田恭治、椎間板ヘルニアの未来形 後編 再生医療と幹細胞移植、MVM 2015(152)、40-44。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 恭治 (HARADA, Yasuji)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：70398882

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：