

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850212

研究課題名(和文) 犬脊髄損傷症例に対する幹細胞・嗅神経鞘細胞同時自家移植による脊髄再生療法の検討

研究課題名(英文) Establishment of cell transplantation using stem cell and olfactory ensheathing cell into dog with spinal cord injury

研究代表者

伊藤 大介 (ITO, Daisuke)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：40508694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では犬の自然発症した脊髄損傷症例へ鼻粘膜由来幹細胞ならびに嗅神経鞘細胞を同時移植し、その有用性を評価することを最終目的とし、犬の鼻粘膜から幹細胞ならびに嗅神経鞘細胞の抽出を試みた。結果は経鼻腔内視鏡を用いて移植に必要な細胞を採取することは可能であったが、一部の犬で培養細胞中に鼻粘膜由来細菌の感染が認められたため、安全面から移植材料としてはさらなる検討が必要であると考えられた。そこで安全性や利便性が保障されている脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いて脊髄損傷モデルマウスへの移植を実施し、その有用性と安全性を評価した。結果、DFAT移植群ではコントロール群と比較して有意に歩行機能が改善した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the possibility of stem cell and olfactory ensheathing cell transplantation to naturally occurred spinal cord injury in dogs. To establish the methods, it was analyzed whether stem cells and olfactory ensheathing could be harvested from canine nasal mucosa of which were obtained via nasal cavity using endoscopy. Some cells expressed stem cell markers on nasal mucosa section, and other cells expressed olfactory ensheathing cell marker. In addition, those cells could be cultured. However infection were seen in few cases. Therefore further methods would be needed for this study from safety. To find alternative cell source, de-differentiated fat cells (DFAT), which are guaranteed the safety, were transplanted to spinal cord injury model mice to analyze the efficacy and safety. DFAT transplanted mice showed significantly better walking steps than control mice.

研究分野：細胞移植による脊髄再生医療

キーワード：脊髄再生 再生医療 椎間板ヘルニア 脱分化脂肪細胞 DFAT 鼻粘膜

1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で約 250 万の人が脊髄損傷により不自由な生活を余儀なくされている。犬においても人と同様に交通事故や椎間板ヘルニアなどによる脊髄損傷症例は多く、生涯にわたって不自由な生活を余儀なくされるか、諸外国では安楽死が選択される場合がある。脊髄損傷により機能不全が生じる原因は神経細胞体の死滅ではなく、主に脊髄軸索の断裂ならびに脱髄による神経回路の破綻に起因する。近年、脊髄軸索に再生能力自体は備わっているが、グリア瘢痕などの中枢神経の環境が脊髄再生を妨げていることが解明され、細胞移植による脊髄再生医療が注目されている。その中で嗅粘膜から嗅球に存在している嗅神経鞘細胞(Olfactory Ensheathing Cells: OECs)は軸索伸展因子を放出し、髄鞘形成能を有していることから、脊髄再生療法の移植細胞として有力視されている。前述のように、脊髄機能改善には断裂した軸索の再生ならびに再髄鞘化が重要であり、この観点からは OECs に対する期待は大きく、すでにラットやマウス脊髄損傷モデルでは機能的にも十分な脊髄再生効果が得られることが報告されている。人においても OECs 移植による脊髄再生療法への期待は国内外を問わず高く、国内では大阪大学において脊髄損傷患者に対する嗅粘膜移植の phase I, phase II trial が行われている。イギリス、ケンブリッジ大学との共同研究(Prof. Nick D. Jefferyら)により、犬の嗅粘膜 OECs 移植方法を確立し、実際に臨床応用が可能となった。また移植症例の脊髄を病理組織学的に評価したところ移植細胞による軸索ならびに髄鞘再生が確認され、移植細胞の腫瘍化などの併害は認められず安全性も確認された。しかしげっ歯類の脊髄損傷モデルとは異なり、犬の完全麻痺症例においては OECs 移植によって肢の運動機能は改善するものの実際に歩行可能となった症例はわずかであった。この理由として脊髄の太さ、移植細胞の遊走能、支持すべき体重の違い等が考えられるため、OECs 移植の効果を増強させる必要がある。近年の報告では純粋な OECs のみの移植では脊髄再生効果が少なく、幹細胞が混入している方がその効果が高いと報告されている。また人やげっ歯類においては OECs を抽出する嗅粘膜に幹細胞が存在することが判っており、幹細胞と OECs を混和した細胞移植による脊髄再生療法の期待が高まっている。さらに過去の研究から犬の嗅粘膜から抽出した線維芽様細胞がグリア様細胞に分化したことを確認しており、犬においても嗅粘膜内の幹細胞の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では犬の嗅粘膜内における幹細胞を組織学的に同定した後、幹細胞ならびに嗅粘膜 OECs を含む鼻粘膜を経鼻腔内視鏡を用いて採取可能かどうか検討し、初代

培養を行った。

(2) 経鼻腔内視鏡により採取した嗅粘膜初代培養による培養細胞の安全性に関する検討

(3) 脊髄損傷モデルマウスへの細胞移植による有用性

(4) 犬の自然発症した脊髄損傷症例への細胞移植の有用性と安全性に関する検討

3. 研究の方法

(1) 犬の嗅粘膜内における幹細胞の同定

・供試犬：学生実習に使用された後、安楽死処置を施された犬(10頭)

・方法：鼻腔内を、ゲンタマイシン加生理食塩水を用いて繰り返し洗浄した後、経鼻腔内視鏡により、嗅粘膜を摘出する。

・細胞培養：採取した嗅粘膜をゲンタマイシン加生理食塩水にてさらに洗浄した後、メスを用いて破碎した。その後、コラゲナーゼならびにトリプシンを加え、細胞を単離し DMEM を用いて洗浄した。単離した細胞を 10% 子牛血清加 DMEM に成長因子を添加した培養液を用いて再浮遊させ初代培養を実施した。

・免疫組織学的検討：採取した組織ならびに培養細胞を固定し、免疫染色学的検索に供した。採取した嗅粘膜は 4% PFA に 48 時間浸漬し、その後、30% グルコース溶液へ 24 時間浸漬した後、OCT コンパウンドにて凍結切片を作製した。嗅神経鞘細胞同定のために p75、S100 ならびに GFAP を標識し、幹細胞同定のために nestin ならびにダブルコルチンを標識した。

(2) 犬鼻粘膜由来初代培養細胞の安全性に関する検討

上記した犬の嗅粘膜内における幹細胞同定に関する実験で実施した初代培養内に細菌等の感染がないか検討した。

・方法：犬の旧粘膜組織から作製した初代培養中に肉眼的に細菌感染を認めた場合、あるいは認められなかった場合においても培養 4 週間後に細菌同定検査を実施した。

(3) 脊髄損傷モデルマウスへの細胞移植による有用性

実験計画当初は犬嗅粘膜から採取した幹細胞ならびに嗅神経鞘細胞移植による脊髄損傷モデルマウスの後肢機能改善に関する有用性と安全性を評価する予定であった。しかし安全性に関する課題を解決できなかったため本実験では上記細胞に代わり安全性が保障されている脱分化脂肪細胞を脊髄損傷モデルマウスへと移植し、その有用性と安全性に関して検討を行った。

・移植細胞

移植細胞は過去に示されている方法により作製した Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニックマウス由来の DFAT (DFAT-GFP) 細胞を用いた (図 1)。

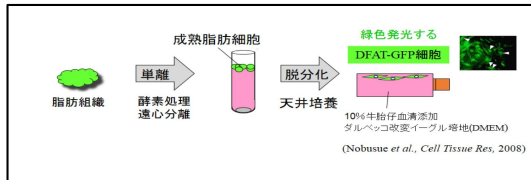


図 1 . DFAT の調整法

簡潔に記すと、GFP トランスジェニックマウス (10 週齢、雌、三菱化学株式会社) の鼠径部から脂肪組織を採取し、細分化した後に、0.1% コラゲナーゼ (Collagenase Type ; Sigma) 溶液と混合させ、37 で 1 時間振動した。フィルタリング、遠心 (135 × g、3 分間) 後に浮遊した脂肪細胞層を採取した。採取した脂肪細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、10% 牛胎仔血清 (Moregate BioTech) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium ; DMEM, Nissui Pharmaceutical) を満たした培養フラスコ (BD Falcon 3107, Bedford) に採取した脂肪細胞を播種し、5% 二酸化炭素存在下でインキュベートした。播種した細胞は、培養フラスコ内に浮遊し、およそ 1 週間後に上面 (天井) に固着し線維芽細胞様細胞へと変化した。培養フラスコから培養液を除去し、フラスコ内の天井に付着した細胞が底面にくるように上下回転させた。培養液は、脊髄損傷モデルへの移植日まで 4 日毎に交換した。

・脊髄損傷モデルマウスの作製

イソフルランによる全身麻酔下において、成体雌マウス (n=22, C57BL/6N, Charles River Laboratories Japan, 10 週齢) の第 10 胸髄を椎弓切除により露出した。露出した脊髄における損傷部位は、脊髄中心管が深部に存在することが予測された正中線上とした。正中線は、第 9 胸椎と第 11 胸椎の棘突起を繋いだ線に一致させた前脊髄静脈を目印とした。マウスへの圧迫挫滅損傷は、脊髄損傷モデル作製装置 (Infinite Horizon ; IH インパクト、Precision Systems and Instrumentation, 60-kilodyne) を用いて行った。脊髄損傷後は、露出した第 10 胸髄にゴアテックス EPTFE パッチ (日本ゴア株式会社) をのせ、定法に従い縫合した。

・細胞移植法

脊髄損傷 8 日後に、DFAT-GFP 細胞 (1 × 10⁵ cells/2 μl) をマウスの第 10 胸髄 (損傷中心部) に垂直に移植し、移植したマウスを DFAT 細胞区とした。なお、DMEM (2 μl) のみを注入したマウスを対照区とした。移植にはハミルトンシリンジ (SIGMA) とステレオタ

キシックインジェクター (Muromachikikai) (0.5 μl/分) を使用した。

・運動機能評価 (BMS)

損傷 8 (移植前)、9、11、14、17、22、29 および 36 日後に BMS スコアを用いてマウスの後肢の運動機能を 2 名で評価した。BMS スコアに左右差が認められた場合には、左右の BMS スコアの平均値を用いた。マウスの後肢が持続性内転を示した場合は、評価は行わなかった。

・組織学的評価

脊髄損傷 36 日後、イソフルランによる深麻酔下において、マウスに 4% パラホルムアルデヒドを経心的に灌流し、脊髄を採取した。採取した脊髄は、同液を用いて一晚浸漬固定した後に脊髄硬膜を剥離した。その後、定法にしたがってパラフィン包埋し、7 μm で薄切した。乾燥、脱パラフィン処理後にルクソール・ファスト青 (Luxol fast blue ; LFB) 染色、免疫組織化学そしてヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin Eosin ; HE) 染色を行った。免疫組織化学において、組織標本は抗原の賦活化とブロッキング処理の後に一次抗体とともに 4 で一晚インキュベートされた。使用した一次抗体を次に示した: Myelin Basic Protein ; MBP (Covance, 1:500), Glial fibrillary acidic protein ; GFAP (DAKO, 1:400), Chondroitin sulfate proteoglycans ; CSPG (SIGMA, 1:200), CD11b (eBioscience, 1:400), 二次蛍光抗体 (Molecular Probes®, 1:2000) は室温で 1 時間インキュベートされた。全ての免疫組織学的染色において一次抗体を除いた陰性対照を作製した。染色した標本は、Dapi-Fluoromount-G™ (Southern Biotechnology Associates Inc.) で封入し、BZ-9000 顕微鏡 (Keyence) で撮影した。脊髄面積、LFB 陽性面積、MBP 陽性面積およびグリア瘢痕面積の測定には、キーエンス解析ソフトウェア (ダイナミックセルカウントならびに計測モジュール) を用いた (各面積 n=11)。また、全てのマウスにおいて損傷中心部で計測をおこなうため、中心管が描出された矢状断面を正中線上である損傷中心部として各面積の測定を行った。各面積の測定範囲は損傷部を中心として頭側および尾側方向に長さ 1.2mm (total 2.4mm) とした。損傷した脊髄におけるグリア瘢痕面積は、各群の損傷中心部において空胞変性が顕著な細胞 (おそらく壊死細胞) の集団を包むように線維芽細胞が配列して形成された境界をグリア瘢痕の辺縁とし、面積を測定した (図 2)。

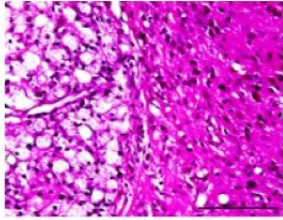


図2. グリア瘢痕面積の測定法
線維芽細胞によって裏打ちされた領域をグリア瘢痕の辺縁として面積を測定した

(4) 犬の自然発症した脊髄損傷症例への細胞移植の有用性と安全性に関する検討

・適応症例

交通事故や外傷により胸腰部脊髄損傷を生じ、神経学的に後肢完全麻痺と診断された症例。あるいは胸腰部椎間板疾患により完全麻痺と診断され、かつ従来の治療法によって改善を認めなかった症例（治療後少なくとも6ヵ月以上改善を認めない）に対し、飼主に臨床治験であること、リスクや合併症を説明し、同意が得られた場合に実施。

・移植細胞の準備

自家移植を原則に適応症例から採取した脂肪を上記方法によって DFAT を作製する。移植細胞数は 500×10^6 個を目標とする。

・細胞移植法

DFAT 培養の準備ができ次第、損傷した脊髄内にハミルトンシリンジ（SIGMA）を用いて移植する。

・運動機能評価

小動物で用いられている神経学的検査に加え、継時的な MRI 検査によって脊髄内の評価を行う。また電気生理学検査によって体性感覚誘発電位（SSEP）ならびに運動誘発電位（MEP）の評価を実施する。

4. 研究成果

(1) 犬の嗅粘膜内における幹細胞の同定
嗅嗅神経鞘細胞と考えられる p75 陽性細胞は採取された粘膜からおおよそ 75% の割合で増殖が認められ、p75 陽性細胞は s100 ならびに GFAP が共陽性であるものも存在した。しかし幹細胞のマーカーである nestin を発現した細胞の割合は 10% 未満であり、今回の培養法では幹細胞抽出が困難であることがわかった（図3参照）。

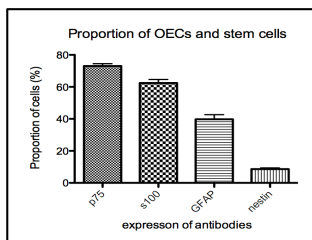


図3. 培養で得られた細胞の蛋白発現の割合

(2) 犬鼻粘膜由来初代培養細胞の安全性に関する検討

犬の嗅粘膜組織から得られた初代培養細胞を維持したところ、10 症例から得られた細胞培養中 4 症例で細菌感染を疑う所見を認めた。全ての症例で細菌同定検査を実施したところ、感染を疑った 4 例で Staphylococcus 属や Escherichia 属の感染を認めた。培養中に細菌感染を疑わなかった 6 症例では細菌同定検査で陰性の結果であった。したがって経鼻腔内視鏡によって得られた犬の嗅粘膜は移植細胞源となりうるが、感染を生じる可能性があるため安全性を考慮した場合、さらなる検討が必要であることが判明した。

(3) 脊髄損傷モデルマウスへの DFAT 移植による有用性の評価

脊髄損傷モデルマウスへ DFAT 移植を実施し、継時的な機能評価（BMS）を実施したところ、DFAT 細胞を移植したマウス（DFAT 細胞区）の BMS スコアは、損傷 14 日後に細胞移植前（損傷 8 日後）よりも有意に高い値を示した。その後は、全てのタイムポイントにおいて有意差が認められた。一方、対照区のマウスの BMS スコアは 36 日後においても有意差は認められなかった（図4参照）。

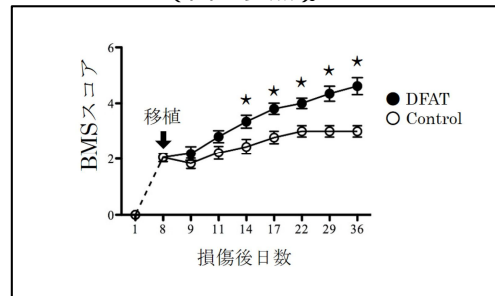


図4. DFAT 移植群と対照群の BMS の変化

また歩様の観察においても DFAT 移植群では足裏で体重を支えることができたのに対し、対照群では肢を引きずって歩行していた（図5）



図5. 対照群（左）と DFAT 移植群（右）の歩様の様子

病理組織学的検索にて、DFAT 移植群では損傷部位（移植部位）における髄鞘を標識する LFB 陽性面積が、対照群と比較して有意に増加していることが判明した（図6）。

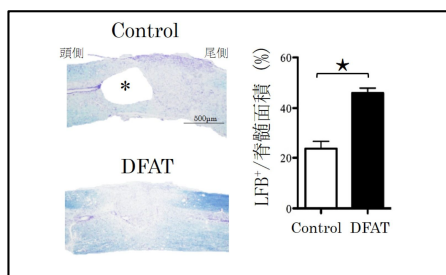


図6. 損傷部位におけるLFBの発現面積

以上のことより DFAT 移植により脊髄損傷モデルマウスの肢の機能が有意に改善することが判明し、その機序として再髄鞘化による改善であることが示唆された。したがって安全性に保障がある DFAT を犬の自然発症脊髄損傷症例に移植する価値があることがわかった。

(4) 犬の自然発症した脊髄損傷症例への細胞移植の有用性と安全性に関する検討
本研究期間に適応症例基準に合致する症例が2頭存在した。その詳細は以下の通りであるが、飼主が臨床治験を希望されなかったため、実際に犬の自然発症脊髄損傷症例に DFAT 移植を実施し、その有用性を評価することはできなかった。

・症例1. ミニチュア・ダックスフンド、去勢雄、9歳齢。椎間板ヘルニアグレード5。手術により脊髄を圧迫している椎間板物質を除去し、継時的に肢の機能回復を評価したが、随意運動が回復しなかった。

・症例2. ミニチュア・ダックスフンド、去勢雄、7歳齢。椎間板ヘルニアグレード5。症例1同様に従来の手術によって脊髄を圧迫している椎間板物質を除去したが、肢の機能改善を認めなかった。

どちらの症例も手術前のMRI検査にて椎間板ヘルニアに加え、圧迫された脊髄内に異常信号強度を示し、予後不良である可能性が示唆されていた。また両症例で手術下の肉眼所見で脊髄自体が腫脹し、赤味がかっている様子が認められた。こうした所見は予後不良であると考えられ、適応症例になると考えられた。

<引用文献>

Schwab JM, Brichtel K, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, Tuli SK, Schluesener HJ. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol.* 2006 Feb;78(2):91-116.
Olby N, Levine J, Harris T, Muñana K, Skeen T, Sharp N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of

thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003;6:762-769.

Li Y, Decherchi P, Raisman G. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci.* 2003 Feb 1;23(3):727-31.

Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2000-2.

Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol.* 2004 May 17;473(1):1-15.

Féron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain.* 2005 Dec;128(Pt 12):2951-60.

Ito D, Matsunaga S, Jeffery ND, Sasaki N, Nishimura R, Mochizuki M, Kasahara M, Fujiwara R, Ogawa H. Prognostic value of magnetic resonance imaging in dogs with paraplegia caused by thoracolumbar intervertebral disk extrusion: 77 cases (2000-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Nov 1;227(9):1454-60.

Ito D, Ibanez C, Ogawa H, Franklin RJ, Jeffery ND. Comparison of cell populations derived from canine olfactory bulb and olfactory mucosal

cultures. Am J Vet Res. 2006 Jun;67(6):1050-6.

Ito D, Fujita N, Ibanez C, Sasaki N, Franklin RJ, Jeffery ND. Serum-free medium provides a clinically relevant method to increase olfactory ensheathing cell numbers in olfactory mucosa cell culture. Cell Transplant. 2008;16(10):1021-7.

Jeffery ND, Smith PM, Lakatos A, Ibanez C, Ito D, Franklin RJ. Clinical canine spinal cord injury provides an opportunity to examine the issues in translating laboratory techniques into practical therapy. Spinal Cord. 2006 Oct;44(10):584-93. Epub 2006 Mar 7. Review.

Skinner AP, Pachnicke S, Lakatos A, Franklin RJ, Jeffery ND. Nasal and frontal sinus mucosa of the adult dog contain numerous olfactory sensory neurons and ensheathing glia. Res Vet Sci. 2005 Feb;78(1):9-15.

Yu F, Zhao X, Li C, Li Y, Yan Y, Shi L, Gordon BR, Wang DY. Airway stem cells: review of potential impact on understanding of upper airway diseases. Laryngoscope. 2012 Jul;122(7):1463-9.

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 1件)
Yamada H, Ito D, Oki Y, Kitagawa M, Matsumoto T, Watari T, Kano K
Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2014;454(2):341-346 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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:
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
伊藤 大介 (ITO, Daisuke)
日本大学生物資源科学部・講師
研究者番号: 40508694

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: