

骨髄間質細胞を用いた犬の脊髄損傷治療への臨床応用

西田 英高^{1), 2)} 中山 正成^{1)†}

1) 奈良県 開業 (中山獣医科病院: 〒630-8342 奈良市南袋町6-1)

2) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

Clinical Application of Transplantation of Autologous Bone Marrow Stromal Cells for Treatment of Spinal Cord Injury in Dogs

Hidetaka NISHIDA* and Masanari NAKAYAMA†

* Nakayama Veterinary Hospital, 6-1 Minamifukuro, Nara, 630-8342, Japan

(2012年2月29日受付・2012年8月6日受理)

脊髄損傷とは、脊髄に強い力が加わることによって損傷を受ける病態をいう。交通事故による脊椎骨折・脱臼、椎間板ヘルニア及び脊椎・脊髄腫瘍などが原因で脊髄損傷を受ける。脊髄の損傷部位によって症状は異なるが、重度の場合は対麻痺または四肢麻痺、排尿・排便障害、呼吸困難など永続的にその機能が障害され、場合によっては死に至ることもある。現在、確立されている治療法は、脊髄の減圧及び脊椎の固定術、そして術後のリハビリテーションである [1]。前者は損傷された脊髄の二次的な損傷を最小限にし、後者は残存した脊髄機能を維持する。機能の回復が困難な場合は、寝たきりの生活を余儀なくされる。

1928年にCajalら [2] は、損傷を受けた哺乳類の中枢神経は自己再生・修復する能力がないことを報告し、この概念が長く信じられてきた。しかし、近年、脊髄や脳の再生を試みた研究が進められ、新たな治療法として期待されている。成体に存在する組織幹細胞は、損傷を受けた組織を修復・再生する際の細胞供給源になっていると考えられており、再生医療へ利用し得る細胞として注目されている [3]。組織幹細胞は体のあらゆる組織に存在していると考えられており、骨髄 [3]、脂肪 [4] 及び胎盤 [5] などから分離されている。また、あらゆる細胞に分化することが可能な胚性幹細胞 (ES細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が今後の細胞源として期待されている。組織幹細胞は、ES細胞のように受精卵を用いないので倫理的問題が生じないこと、ES細胞

やiPS細胞と比べて腫瘍化する可能性が低いこと、さらに自己の細胞を用いることで免疫拒絶を受けないことから、臨床応用に適しているといわれている。

1976年、Friendsteinら [6] は、マウス骨髄中に含まれる線維芽細胞様のコロニー (CFU-F) を形成する細胞集団の存在を報告し、これらの細胞は造血幹細胞の増殖及び分化を支持する細胞であることがわかった。その後Pittengerら [3] によって、人の骨髄中にも同様な細胞集団があり、これらの細胞のなかに単一のコロニーから、骨、軟骨及び脂肪の間葉系細胞へ分化する幹細胞の存在が明らかにされた。これ以降、骨髄から採取され、CFU-Fを形成する細胞は、幹細胞とそれに由来する異なる分化段階にある多様な細胞集団として、骨髄間質細胞 (bone marrow stromal cell: BMSC) と呼ばれるようになった [7]。

現在までに、マウスや人のBMSCは骨、軟骨及び脂肪への分化能を持つだけでなく、他の種類の細胞、たとえば肝細胞 [8, 9]、神経細胞 [10, 11] など胚葉を超えた細胞へ分化し得ることが報告されている。さらにさまざまな液性因子を分泌することにより、損傷された組織の修復に関与すると考えられている [12, 13]。一方、犬のBMSCについても骨、軟骨及び脂肪に分化し得ることが報告されており [14, 15]、獣医学領域における犬BMSCを用いた再生医療が期待されている。本稿では、おもにBMSCを用いた脊髄再生について取り上げ、人及び犬の脊髄損傷治療への臨床応用の現状と今後の課題

† 連絡責任者: 中山正成 (中山獣医科病院)

〒630-8342 奈良市南袋町6-1 ☎0742-25-0007 FAX 0742-25-0005 E-mail: nova@nara-nakayamavet.com

† Correspondence to: Masanari NAKAYAMA (Nakayama Veterinary Hospital)

6-1 Minamifukuro, Nara, 630-8342, Japan TEL 0742-25-0007 FAX 0742-25-0005
E-mail: nova@nara-nakayamavet.com

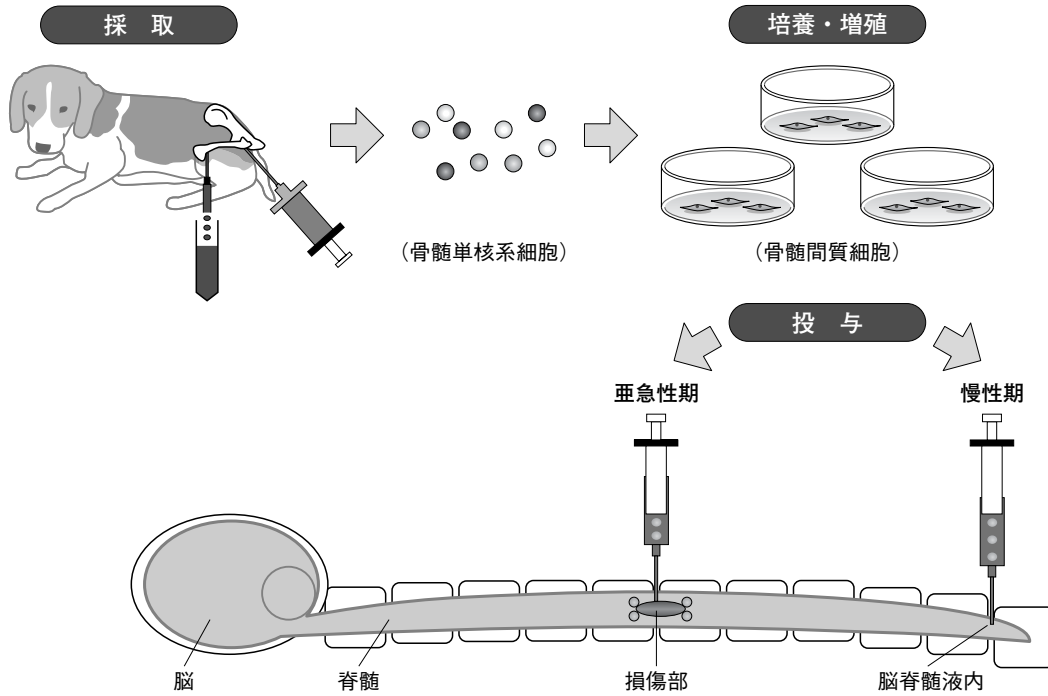


図 骨髄間質細胞を用いた脊髄損傷に対する治療の略図

について詳述する。

実験動物を用いた骨髄間質細胞投与の効果

近年、脊髄損傷の治療として、さまざまな細胞を用いた治療が試みられている。現在のところ、その細胞源として、シュワン細胞 [16]、神経幹細胞 [17]、マクロファージ [18]、嗅神経鞘細胞 [19]、骨髄単核系細胞 [20] 及び BMSC [21] などが用いられている。細胞治療の臨床応用を考えた際に、最も臨床応用に適した細胞の条件は採取が容易であり、安全性が高いこと、さらに自家組織を使用できることがあげられる。これらの条件を満たす BMSC は有力な細胞源と考えられる。脊髄損傷ラットの急性期（損傷直後）、亜急性期（損傷後 1～2 週間）及び慢性期（損傷後 3 カ月）に BMSC を投与した結果、脊髄の再生とともに運動機能の改善が認められた [21-25]。一方、投与時期の違いによって、効果に差が認められなかったという報告も存在する [22, 26]。投与方法の比較では、損傷部への直接投与や脳脊髄液内への投与が静脈内投与と比較して、効果的であったとする報告がある [27-29]。この理由として、静脈内へ投与された細胞の多くが肺にトラップされるためと考えられている [30]。

BMSC を生体に移植すると、組織修復と機能回復が認められるという現象は数多く報告されているが、その理由として① BMSC の産生する液性因子が傷害を受けた組織の修復に関与している [21, 23]、② 投与された一部が組織に生着し、さらにその組織の細胞に分化し、修復に関わっている [24, 31]、という 2 つのメカニズム

がおもに考えられている。しかしながら、これら脊髄再生の修復機序はまだまだ明らかにされておらず、結論にはいたっていない。

人での臨床研究の現状と結果

前述した研究を受け、医学領域では、2005 年以降から自家 BMSC を用いた脊髄損傷患者に対する臨床治験の研究報告がなされるようになった [32-34]。また、わが国においても Saito ら [35] によって、脊髄損傷患者に対する臨床治験が 2006 年より開始され、現在まで 5 例に実施されている。いずれの報告においても細胞移植による合併症や副作用は認められず、安全性に関しては問題ないという結果である。しかしながら、症例数が少ないなどの理由によって、細胞移植についてははっきりとした効果を示した報告はない。また、2010 年から Geron 社によって ES 細胞を用いた脊髄損傷患者に対する臨床治験が開始され、2011 年に経済的な理由によって中止されているが、今後の研究が期待される。

犬での臨床研究の現状と結果

犬においても、脊椎骨折・脱臼や椎間板ヘルニアによって脊髄損傷を生じる。特に椎間板ヘルニアの症例数は、ミニチュアダックスフントなどの軟骨異常栄養性犬種の人気に伴い、増加傾向にある [36, 37]。犬の場合、脊髄損傷の重症度は、後肢の痛覚の有無によって判定する。脊椎骨折・脱臼によって後肢の痛覚が認められない場合、その予後はきわめて悪いとの報告がある [38]。また、椎間板ヘルニアで後肢の痛覚が認められない場

合、手術による改善率は41～62%である [39-43]. さらに、後肢の痛覚が認められない犬で、術後2週間以内に痛覚の改善が認められなかった場合、改善率はきわめて低い [43]. 現在のところ、手術によって機能に改善が認められなかった犬に対する治療法は確立されておらず、これらの犬は寝たきりの生活や飼い主の希望によって、安楽死となる。

これらの重度脊髄損傷の犬に対して、細胞を用いた脊髄再生が試みられている。韓国では、脊髄損傷モデル犬を用いて、他家の臍帯血由来 [44] 及び脂肪由来 [45] の間質細胞を投与し、これらの有効性を示している。BMSCを用いた臨床研究 (図) では、後肢の痛覚消失を伴った脊椎骨折・脱臼で、手術を行った亜急性期 (損傷後2週間以内) において損傷部に細胞投与を行った結果、7例中2例で運動機能の改善が認められ、歩行可能となった。しかし、後肢の痛覚に改善が認められる症例は存在しなかった [46]。また、後肢の痛覚消失を伴った椎間板ヘルニアで、術後1カ月の時点で機能の改善が認められなかった慢性期 (損傷後1～3カ月) において脳脊髄液内に細胞投与を行った結果、10例中6例で運動機能に改善が認められ、歩行可能となったが、感覚機能に改善が認められたのは1例のみであった [47]。これら亜急性期及び慢性期のすべての症例で、細胞投与後に疼痛や臨床症状の悪化など副作用は認められなかった [46, 47]。

以上より、犬の脊髄損傷に対するBMSCの投与は安全性が高い治療であるといえる。しかし、これらの治療による効果を明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

今後の課題

多くの研究によって、損傷された脊髄は再生・修復できる可能性が示唆された。しかし、これらの臨床研究は同時に細胞を移植しただけでは効果に限界があることを示し、いくつかの興味深い課題を与えてくれた。1つ目は何をもちいて治療の効果とするかである。実験動物ではその効果を組織学的に評価することが可能であるが、臨床研究では投与された細胞がどのように作用しているかを直接確認することはできない。MRI、電気生理学的検査、バイオマーカーなどを用いて、より多角的に評価する必要がある。2つ目は、適応症例の選別である。再生医療によって完治は望めなくても、運動機能や感覚機能が少しでも回復するならば、飼い主にとっての精神的な負担の軽減は計り知れない。どのような症例に適応することができ、どの程度の効果が期待できるかについて、大規模に臨床治験を行い、明らかにしなければならない。3つ目は脊髄損傷に対する新たな治療法の開発である。既存の方法ではおそらく完全な脊髄の再建は難しい

と思われる。新たな細胞、栄養因子、人工材料、または既存の方法を組み合わせることによって、劇的な変化をもたらす治療法を開発しなければならない。

これまでの脊髄損傷を対象とした人及び犬の臨床研究における治療効果は限定的であり、現時点では安全性及び有効性の確認を行っている段階である。脊髄損傷に対する細胞移植は、まだまだ課題が山積している状況である。臨床現場で用いる獣医師が確信をもって再生医療を脊髄損傷の治療に応用するためには、さらなる基礎及び臨床研究の継続が必要である。

引用文献

- [1] Sharp NJH, Wheeler SJ : Thoracolumbar disc disease, *Small Animal Spinal Disorders*, Sharp NJH, Wheeler SJ, 2nd ed, 121-135, Elsevier Mosby, Philadelphia (2005)
- [2] Cajal SR : Degeneration and regeneration of the nervous system, May RM, transl, Oxford University Press, Oxford (1928)
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 143-147 (1999)
- [4] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH : Multilineage cells from human adipose tissue : implications for cell-based therapies, *Tissue Eng*, 7, 211-228 (2001)
- [5] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K : Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential, *Stem Cells*, 22, 649-658 (2004)
- [6] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN : Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Exp Hematol*, 4, 267-274 (1976)
- [7] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG : Bone marrow stromal stem cells : nature, biology, and potential applications, *Stem Cells*, 19, 180-192 (2001)
- [8] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK : In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Hepatology*, 40, 1275-1284 (2004)
- [9] Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX : In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes, *J Cell Biochem*, 102, 52-63 (2007)
- [10] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG : Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 10711-10716 (1999)
- [11] Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML,

- Laywell ED : Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation, *Stem Cells*, 24, 1054-1064 (2006)
- [12] Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y : Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms, *J Neurosci Res*, 86, 1024-1035 (2008)
- [13] Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Yamada Y, Ohno T, Yamanaka A, Nagai Y, Fukushima M, Suzuki Y, Nakatani T, Ide C : Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells, *Neurosci Lett*, 483, 57-61 (2010)
- [14] Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M : Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells : a biochemical, morphological and ultrastructural study, *Histochem Cell Biol*, 128, 507-520 (2007)
- [15] Kamishina H, Farese JP, Storm JA, Cheeseman JA, Clemmons RM : The frequency, growth kinetics, and osteogenic/adipogenic differentiation properties of canine bone marrow stromal cells, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44, 472-479 (2008)
- [16] Martin D, Robe P, Franzen R, Delrée P, Schoenen J, Stevenaert A, Moonen G : Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury, *J Neurosci Res*, 45, 588-597 (1996)
- [17] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H : Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats, *J Neurosci Res*, 69, 925-933 (2002)
- [18] Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder JB, Yoles E, Belkin M, Schwartz M, Hadani M : Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury : phase 1 study results, *J Neurosurg Spine*, 3, 173-181 (2005)
- [19] Collazos-Castro JE, Muneton-Gomez VC, Nieto-Sampedro M : Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries, *J Neurosurg Spine*, 3, 308-317 (2005)
- [20] Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C : Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury, *J Neurotrauma*, 24, 1026-1036 (2007)
- [21] 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*, 72, 343-351 (2003)
- [22] 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*, 99, 2199-2204 (2002)
- [23] 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*, 187, 266-278 (2004)
- [24] Zurita M, Vaquero J : Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation, *Neuroreport*, 15, 1105-1108 (2004)
- [25] 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*, 1332, 32-47 (2010)
- [26] Nandoe Tewarie RD, Hurtado A, Ritfeld GJ, Rahiem ST, Wendell DF, Barroso MM, Grotenhuis JA, Oudega M : Bone marrow stromal cells elicit tissue sparing after acute but not delayed transplantation into the contused adult rat thoracic spinal cord, *J Neurotrauma*, 26, 2313-2322 (2009)
- [27] Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M : Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats : systemic or local administration?, *Neurosci Lett*, 398, 129-134 (2006)
- [28] Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B : Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury : a comparison of delivery methods, *Spine*, 34, 328-334 (2009)
- [29] Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N : Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct : an optical imaging study, *Neuropathology*, 32, 217-226 (2012)
- [30] Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP : Stem cell transplantation : the lung barrier, *Transplant Proc*, 39, 573-576 (2007)
- [31] 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*, 11, 3001-3005 (2000)
- [32] Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, Park HS : Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, *Tissue Eng*, 11, 913-922 (2005)
- [33] Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y : Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor : Phase I/II

- clinical trial, *Stem Cells*, 25, 2066-2073 (2007)
- [34] Pal R, Venkataramana NK, Bansal A, Balaraju S, Jan M, Chandra R, Dixit A, Rauthan A, Murgod U, Totey S : Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia : a pilot clinical study, *Cytotherapy*, 11, 897-911 (2009)
- [35] Saito F, Nakatani T, Iwase M, Maeda Y, Murao Y, Suzuki Y, Fukushima M, Ide C : Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients : a pilot study, *Restor Neurol Neurosci*, 30, 127-136 (2012)
- [36] Tanaka H, Nakayama M, Takase K : Usefulness of myelography with multiple views in diagnosis of circumferential location of disc material in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation, *J Vet Med Sci*, 66, 827-833 (2004)
- [37] Itoh H, Hara Y, Yoshimi N, Harada Y, Nezu Y, Yogo T, Ochi H, Hasegawa D, Orima H, Tagawa M : A retrospective study of intervertebral disc herniation in dogs in Japan : 297 Cases, *J Vet Med Sci*, 70, 701-706 (2008)
- [38] Bagley RS : Spinal fracture or luxation, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 30, 133-153 (2000)
- [39] Duval J, Dewey C, Roberts R, Aron D : Spinal cord swelling as a myelographic indicator of prognosis : a retrospective study in dogs with intervertebral disc disease and loss of deep pain perception, *Vet Surg*, 25, 6-12 (1996)
- [40] Scott HW, McKee WM : Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception, *J Small Anim Pract*, 40, 417-422 (1999)
- [41] Olby N, Levine J, Harris T, Muñana K, Skeen T, Sharp N : Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord : 87 cases (1996-2001), *J Am Vet Med Assoc*, 222, 762-769 (2003)
- [42] 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*, 227, 1454-1460 (2005)
- [43] Laitinen OM, Puerto DA : Surgical decompression in dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception : a retrospective study of 46 cases, *Acta Vet Scand*, 46, 79-85 (2005)
- [44] Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK : Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs, *J Vet Sci*, 8, 275-282 (2007)
- [45] Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK : Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury, *J Vet Sci*, 10, 273-284 (2009)
- [46] Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Suzuki Y, Ide C, Inaba T : Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs, *Am J Vet Res*, 72, 1118-1123 (2011)
- [47] Nishida H, Nakayama M, Tanaka H, Kitamura M, Hatoya S, Sugiura K, Harada Y, Suzuki Y, Ide C, Inaba T : Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal cord injury, *Vet Surg*, 41, 437-442 (2012)