

図3. 神経線維腫形成機構

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

キャリアー細胞を用いた NF1 に対する遺伝子治療

研究協力者 濱田 雄行 愛媛大学医学部産婦人科講師

研究要旨

IAI. 3B 遺伝子は、卵巣癌胸腔転移細胞蛋白高分子量領域に対する monoclonal 抗体を用いて卵巣癌の cDNA ライブラリーよりクローニングされた遺伝子で、その遺伝子発現およびプロモーター活性、さらにこのプロモーターを導入したオンコリティックアデノウイルス AdE3-*IAI. 3B* は卵巣癌の特異性が非常に高い。今回、NF1 細胞株において、このプロモーター活性、AdE3-*IAI. 3B* の NF1 に対する特異性を検討した。さらに、従来人における遺伝子治療で問題とされていた抗アデノウイルス抗体による感染抑制に対し AdE3-*IAI. 3B* 感染キャリアー細胞による NF1 に対する抗腫瘍効果を検討した。細胞株は、NF1 患者より樹立された NF2-1 および NF3 よりクローニングした NF3-1、NF3-2、NF3-3、malignant triton tumor から樹立された MTT 細胞を用いた。*IAI. 3B* プロモーター活性および AdE3-*IAI. 3B* は、NF1 細胞に対して高い特異性を示した。*In vivo* 腫瘍モデルにおいて、ヌードマウス腫瘍に対するキャリアー細胞治療では、完全腫瘍退縮となった。一方、syngeneic mouse model のにおいては、抗アデノウイルス CTL をアデノウイルスによる事前免疫により誘導すると、キャリアー細胞による治療により抗アデノウイルス抗体による感染抑制を断片化されたキャリアー細胞が直接的に標的細胞に取り込まれることにより、感染が成立し、抗アデノウイルス CTL により著明な抗腫瘍効果を示した。さらに、adenovirus-*GM-CSF*あるいは 293 キャリアー細胞併用により抗腫瘍効果がさらに高まることが明らかとなった。以上により、*IAI. 3B* プロモーター導入オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞による遺伝子治療は、NF1 に対して有力な治療法となることが示唆された。

A. 研究目的

NF1 に対する治療法は、手術療法以外特に未だ有用なものはない。多くの部位に腫瘍を発生する NF1 に対してすべて手術療法で対処するのは、患

者の QOL あるいはコンプライアンスにおいて限界があり、新たな治療法の開発が望まれる。NF1 は、NF1 遺伝子異常によって引き起こされる遺伝子疾患であるが、NF1 は非常に長い遺伝子であり、こ

の遺伝子自体がまだクローニングされていないため、NF1 遺伝子導入による遺伝子治療は、現況において不可能である。最近、悪性腫瘍においてのみ増幅し、ウイルスそのものの細胞融解作用を利用して悪性腫瘍の腫瘍退縮を誘導する制限増殖型のウイルス(オンコリティックウイルス)を用いた遺伝子治療が、基礎実験ならびに臨床試験において多く報告されている。

卵巣癌胸腔転移の高分子領域蛋白に対する抗体から卵巣癌の cDNA ライブラリーからクローニングされた *IAI. 3B* 遺伝子に関して、我々は、genomic library よりこの遺伝子のプロモーター領域をクローニングした(Cancer Research, Hamada et al., 2003)。このプロモーターは、卵巣癌特異性が高く、卵巣癌においてそのプロモーター活性は一般的な腫瘍マーカーとして知られている *cox-2* あるいは *midkine* のプロモーター活性のほぼ 10 倍で、最も強力なプロモーターとして知られている CMV プロモーターとほぼ同等であった。一方、NF1 細胞においても *IAI. 3B* プロモーター活性は非常に高く、*cox-2* あるいは *midkine* プロモーターとほぼ同等であった。

このプロモーターをさらにアデノウイルス E1A プロモーターと置換したオンコリティックアデノウイルス AdE3-*IAI. 3B* を作成すると、このオンコリティックアデノウイルスは *in vitro* において卵巣癌特異的に非常に高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。このオンコリティックアデノウイルスは、NF1 に対しても卵巣癌と同様に *in vitro* において非常に高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。一方、*in vivo* においてヌードマウスにおける実験では、卵巣癌腫瘍モデルにおいてオンコリティックアデノウイルスは、一時的に完全腫瘍退縮をきたすもののほとんどの腫瘍

は再発し、根治にいたることはなかった。さらに免疫機能が正常な syngeneic mouse model においてオンコリティックアデノウイルスは、抗アデノウイルス抗体産生により感染が完全に抑制され、抗腫瘍効果は一時的にもまったく認められなかった。これは、アデノウイルスのみならず他のすべてのウイルスによる治療において共通であり、遺伝子治療における最大の障害となっている。今回、NF1 に対する *IAI. 3B* プロモーター活性、オンコリティックアデノウイルス AdE3-*IAI. 3B* の抗腫瘍効果を検討し、キャリアー細胞を用いることにより、ヌードマウスにおける抗腫瘍効果の改善、syngeneic mouse model における抗アデノウイルス抗体による感染抑制すなわち免疫原性の克服について検討を行い、NF1 に対する遺伝子治療の可能性について検討を行った。

B. 研究方法

NF1 腫瘍細胞 NF2、NF3、MTT(malignant triton tumor)は、筑波大学皮膚科において十分なインフォームドコンセントのもとに患者腫瘍より得られたものである。NF2、NF3 に関しては、継代培養を行うことによりさらに NF2-1、NF3-1、NF3-2、NF3-3 の各細胞のクローニングを行った。これらの細胞は、原細胞に比べ細胞増殖能が高く、継代培養が容易となった。

IAI. 3B プロモーター活性は、dual luciferase assay kit (promega)により行った。*In vitro* における増殖抑制実験は、12 well plate に各 well に 5000 個ずつ NF1 細胞を入れ、AdE3-*IAI. 3B* さらに野生型アデノウイルス AdE3 を対照として 14 日後に cell count assay により検討した。抗アデノウイルス抗体は、人グロブリン分画(武田製薬)

より抽出したものより使用した。キャリアー細胞としては、16種類の細胞をAdE3-IAI. 3Bに500MOI、2晩感染しその *in vitro* における抗腫瘍効果およびアデノウイルス産生量をPFU assayにより抗体非存在下において比較検討した。*In vivo* における実験においてヌードマウス、syngeneic mouse modelにおいてB6C3F1マウスを用いた。キャリアー細胞の抗アデノウイルス抗体中におけるアデノウイルス感染機構解明のため電子顕微鏡的検討を行った。

(倫理面への配慮)

NF1 腫瘍細胞 NF2、NF3、MTT(malignant triton tumor)は、筑波大学皮膚科において十分なインフォームドコンセントのもとに患者腫瘍より得られたものであり、動物実験は愛媛大学医学部動物実験管理規定にのっとり許可を得た後、実験動物に対しては動物愛護上の配慮を行い実験を行った。

C. 研究結果

IAI. 3B プロモーター活性は、SV40 を 1 とすると、NF2-1 (46 ± 0.2)、NF3-1 (8 ± 0.1)、NF3-2 (26 ± 1.2)、NF3-3 (16 ± 2.6)、MTT (11 ± 0.7) とコントロールの HUVEC (0.5 ± 0.2) に比較して非常に高い活性を示した。また、これらの値は一般的な悪性腫瘍マーカーとして知られ、プロモーター活性も高いとされている *cox-2* あるいは *midkine* プロモーターとほぼ同様であった。AdE3-IAI. 3Bは、*in vitro* においてその IC50 は NF2-1 0.08MOI、NF3-1 (0.016MOI)、NF3-2 (0.07MOI)、NF3-3 (0.019MOI)、MTT (0.19MOI) と NF1 細胞において特異的に増殖抑制し、一方コントロールの HUVEC においては 14MOI とコントロールの 100~1000 倍

の高い抗腫瘍活性を示した。

キャリアー細胞の *in vitro* の抗腫瘍効果を検討するため、U87 脳腫瘍細胞、K42 ケラチノサイト細胞、F27 線維芽細胞、HT-29 大腸癌細胞、ME180、C33A、HT-3 等の子宮頸癌細胞、PA-1、RMG-1、420、OCC1、OVCAR3、MH 等の卵巣癌細胞、SW626 大腸癌細胞、293 細胞、A549 肺癌細胞に AdE3-IAI. 3B を 500MOI、2晩感染し標的癌細胞に感染し、3晩培養し細胞数を測定し比較検討した。これらの中で A549 が最も良好な抗腫瘍効果を示した。PFU assay においても *in vitro* の抗腫瘍効果と同様に A549 と 293 細胞が最もアデノウイルス産生能において優れていた。6000 倍の高力価の抗体価を有する抗アデノウイルス抗体存在下でのキャリアー細胞の抗腫瘍効果の *in vitro* における比較を行うと、293 細胞より A549 細胞において抗腫瘍効果が高かった。このため、キャリアー細胞としては A549 細胞を使用することとした。

電子顕微鏡的検討により、キャリアー細胞の抗体存在下における感染機構の解明を試みた。A549 細胞に AdE3-IAI. 3B を 1晩感染させ標的癌細胞と共感染し、2% glutaraldehyde で固定後、電子顕微鏡的検討を行った。AdE3-IAI. 3B 感染後、キャリアー細胞は、細胞表面が blebbing を起こし、さらにこの blebbing が microcapsule 状となり、アデノウイルス粒子を含有する細胞断片が標的癌細胞に貪食され感染が成立することが明らかとなった。こうした貪食による感染機構は、正常細胞では認められなく、癌細胞特異的であることが明らかとなった。

In vivo における実験において NF1 では腫瘍形成能を有していないため、ヌードマウスにおいては人卵巣癌細胞である PA-1 および RMG-1 細胞を用いた。Syngeneic mouse model においては、

B6C3F1 マウス由来の OVHM 卵巣癌細胞を用いた。ヌードマウスにおける実験において、AdE3-*IAI. 3B* 単独では一時的に腫瘍退縮が認められるが、すべてのマウス腫瘍において再発したが、キャリアー細胞では完全腫瘍退縮となりすべてのマウス腫瘍において再発は認められなかった。Syngeneic mouse model において、OVHM 腫瘍は、非常に増殖能が高く再発が容易であるため、悪性度が非常に高い。このため、キャリアー細胞単独では、AdE3-*IAI. 3B* 単独と同様に 300 日間の観察における Kaplan-Meier 生存率曲線において抗腫瘍効果はまったく認められなかった。一方、adenovirus- β -*gal* の事前免疫をおこない、抗アデノウイルス CTL を誘導すると 40-70% の完全治癒が認められた。さらに、複数回の事前免疫により抗体価を増加させても 3 回までの事前免疫では抗腫瘍効果に差は認められなかった。これらの抗腫瘍効果は、6 回投与において完全腫瘍退縮が認められた。投与回数を減少させるため、事前免疫後 AdE3-*IAI. 3B* と adenovirus-*GM-CSF* をキャリアー細胞に共感染し併用すると、3 回投与でほぼ 100% 完全腫瘍退縮となった。さらに、投与回数を減少させるため、事前免疫後、AdE3-*IAI. 3B* と adenovirus-*GM-CSF* をキャリアー細胞に共感染し、さらにキャリアー細胞を A549 細胞と 293 細胞を併用すると 1 回投与でほぼ 100% 完全腫瘍退縮となった。

D. 考察

IAI. 3B プロモーターは、卵巣癌のみならず、NF1 においても高い活性を示すことが明らかとなった。*IAI. 3B* プロモーター導入オンコリティックアデノウイルス AdE3-*IAI. 3B* は、卵巣癌のみならず NF1 においても *in vitro* において高い抗腫瘍効果を示

すが、腫瘍内注射では一時的に抗腫瘍効果を示すもののすべての腫瘍において再発することが明らかとなった。AdE3-*IAI. 3B* 感染 A549 キャリアー細胞を 6 回投与でヌードマウスにおいてすべてのマウスにおいて完全腫瘍退縮となった。一方、免疫機能が正常な syngeneic mouse model においては、抗体産生により AdE3-*IAI. 3B* 単独ではまったく抗腫瘍効果は示さず、また、AdE3-*IAI. 3B* 感染キャリアー細胞単独では、マウス癌細胞の悪性度が高いため抗腫瘍効果は示さない。この腫瘍モデルに対してアデノウイルスによる事前免疫を行い抗アデノウイルス CTL を誘導すると 6 回投与でキャリアー細胞により完全腫瘍退縮となり、adenovirus-*GM-CSF* 併用により 3 回投与で完全腫瘍退縮となり、293 キャリアー細胞併用により 1 回投与により完全腫瘍退縮となった。

NF1 腫瘍は、悪性化することもあり、悪性化しない場合でも全身性あるいは中枢性に再発性の良性腫瘍が発生する。こうした場合には、手術、放射線照射による治療のみでは対応できない場合が多く、しばしば死にいたることも多いため、新たな治療法の開発が望まれる。今回、オンコリティックアデノウイルス感染キャリアー細胞による遺伝子治療を開発し、多くの人において既に感染歴があるため抗アデノウイルス抗体が存在し、従来治療効果が望めなかった人における臨床的投与においてもその有用性が期待されることが明らかとなった。さらに、同様に NF1 に対しても治療可能となることが明らかとなった。こうした保存的治療法が確立することは、従来の手術療法あるいは放射線療法に比べ患者の術後の QOL において非常に意義のあることともいえる。

E. 結論

IAI. 3B プロモーターを導入したオンコリテックアデノウイルス感染 A549 キャリアー細胞による遺伝子治療は、NF1 に対して有効な治療法となりうることが明らかとなった。

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性脛骨偽関節症の偽関節部骨癒合判定装置の開発

分担研究者 中村耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科教授

研究要旨

先天性脛骨偽関節症において、偽関節部の骨癒合判定を可能とする診断装置の開発を行う。

A. 研究目的

神経線維腫症に合併する先天性脛骨偽関節症は偽関節部に対し多数回の手術を要する骨癒合が得にくい極めて難治性の疾患である。近年、手術法の進歩により骨癒合率は上昇しているが、骨癒合が得られても偽関節部の骨幅の狭小は残存する場合が多い。骨癒合が得られた部位が荷重負荷に耐え得るかの判断は現在、主にレントゲンにより行われているが定性的であり十分ではない。我々は偽関節部の骨癒合判定を非侵襲に定量評価可能な診断装置の開発を目的とし研究を行った。

B. 研究方法

偽関節部の微小な荷重に対する骨の変位を高精度に測定することで骨の癒合程度を判断する。そのために、 $2.6\mu\text{m}$ の精度を有する超音波エコー-tracking法（ET法）を用いた。昨年度までの開発において脛骨骨幹部骨折における臨床測定にて、ギプスによる保存療法とプレートや髓内釘といった内固定材料を用いた手術療法の骨折症例いずれにおいても、骨折部の骨癒合部位の剛性経時変化を定

量評価可能であった。このことから、この手法による先天性脛骨偽関節症例における測定の可能性が示されたが、偽関節症例では脛骨の遠位端に偽関節部が存在し、且つ骨幅が狭小しているため既存のリンア電子プローブと下肢保持具による測定が不可能であった。そこで平成18年度の開発においては測定部位の形状に適したプローブの開発と下肢の保持具の開発を行った。

プローブ開発において、脛骨の遠位端に設置可能な極めて小さいものが必要であることから、既存のもので生体に用いられている経直腸用シングルプローブ（周波数7.5MHz、形状 $\phi 8\text{mm}$ 円形、重量0.6g）に着目し開発を開始した。電子プローブではなくシングルプローブによりエコー-trackingが可能であるか、そしてこれらを平面配置することで面変化も検出可能であるかの検討を行った。3個の経直腸用シングルプローブを平板上に正三角形の頂点にあたる位置にそれぞれ配置し、これを金属平板に対し向け金属平板を微小変化させることにより面変化の検出を行った。また、これに続く基礎実験として新たに開発した骨計測用シングルプローブ（ $15\text{mm}\times 12.2\text{mm}$ 内に9つの振動子を有す

る)の音響特性を測定し、これを用いた臨床測定を健常脛骨において実施した。

下肢保持具として遠位支持部の明確化、測定精度の向上、測定の安全性・効率性向上を目標とし新たな保持装置を開発した。既存の陰圧による下肢全体を包み込む方法ではなく、シリコンゴムスポンジを支持部材料として用いたU字状の治具で、近位部は4cm、遠位部は2cm程度の幅で下肢を保持する。さらに近位部と遠位部は高さ調整機能と共にそれぞれの荷重が測定可能なものとし設置再現性の向上を図った。この下肢治具の固定性の評価として健常脛骨にて25N荷重を加え下肢の回旋の程度を評価した。

さらに、これらの新規プローブと下肢保持機能に対応可能な解析ソフトも新たに開発した。これらを用い臨床測定を実施し、既存の測定と比較することにより精度、安全性、効率化の評価を行った。

最後に先天性脛骨偽関節症の骨偽関節部は平面状の構造ではなく、狭小で脆弱な骨であるため、臨床応用に先立ち、動物実験を行なった。

対象は日本白色兎、雄、週齢21-23週の健常骨を使用した。兎脛骨は長さ110-120mm(平均11.3mm)、幅10-11mm(平均10.3mm)である。試験は力学試験(4点曲げ試験)とエコトラッキング法を同時に行い結果を比較し評価した。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いられる超音波はすでに臨床で用いられているものと周波数・音圧ともにかかわらず安全性は確立されている。また、検査の際に負荷される荷重は被検者が日常生活において常に受けている荷重より充分小さいものでありこの検査による骨への損傷は無く安全である。

検査に際しては対象者および対象者家族に口頭

および文書を用いて説明を行い、十分に理解し同意を得られたもののみを対象とする。また、全研究を通して患者の個人情報公開されない。

動物実験に関しては動物試験受託者より AAALAC International の許可を得た。

C. 研究結果

基礎実験では、経直腸用シングルプローブにおいても金属表面のエコトラッキングが可能でありミクロンの精度で面変化も検出可能であった。このことから新たに骨計測用プローブの開発を行い、小型プローブの音響特性を評価した結果、中心周波数7.47MHz、比帯域74.7%、素子感度-30.7dB、静電容量700pFと骨表面波形を取得するために十分な特性、感度があることが実証された。また、実際の脛骨測定においても既存の電子プローブと遜色のないエコトラッキング測定が可能であった。

新規下肢保持具では近位部と遠位部を既存のものと比較し局所的に保持することに成功し、25N荷重による回旋角度は脛骨骨幹部上に設置したアングルメーターにて0.1度以下の回旋で、十分な保持力を有していることが実証された。また、これらの臨床健常骨測定において測定中・測定後の痛みや不快感を残すことはなく、安全性に問題は全く見られなかった。

これらのプローブ、治具を用いた健常脛骨における測定の結果、5回計測において標準偏差0.007度と既存測定の0.015度に対して2倍程度の測定再現性が実現された。

また、兎脛骨の4点曲げ試験におけるエコトラッキング法の精度結果は、健常人脛骨における屈曲検出精度0.01度に対し兎脛骨は0.033度であり、小型プローブは臨床応用可能である測定結果を得

ることができ、その有用性が確認された。

D. 考察

先天性脛骨偽関節症の測定において、骨幹端部の狭小した部位での計測を可能にする小型プローブとより高精度な計測を可能とする固定治具が必要であった。新たに開発した骨計測用プローブでは既存のプローブと遜色のない精度で狭小部位での計測を可能と可能であり、下肢固定治具においては支持部位の局所化によっても荷重に対し安定した固定性を有していた。

E. 結論

先天性脛骨偽関節測定用に新たなプローブと下肢固定治具の開発を行い、これらが偽関節部の剛性測定における要求を満たしていることを明らかにした。

今後臨床応用していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi I, Sato W, Matsuyama J: Treatment of Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia-A Multi-Center Study in Japan- Journal of Pediatric Orthopaedics. 25 (2): 219-24, 2005 Mar-Apr.
2. Ohnishi I, Kurokawa T: Measurement of the tensile forces during bone lengthening. Clinical Biomechanics, 20 (4), 421-427, 2005
3. S. Ohashi, I. Ohnishi, T. Kageyama: The Effect of Vascularity on the Canine Distracted Tibial Callus Consolidation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 438, 253-259, 2005
4. Matsuyama J, Ohnishi I, Kageyama T, Oshida H, Suwabe T, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005
5. Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K: Osteogenesis and Angiogenesis in the Regenerating Bone during Transverse Distraction-Quantitative Evaluation Using a Canine Model. Clinical Orthopaedics and Related Research, 433, 243-50, 2005
6. Harada A, Sakai R, Miyasaka K, Ohtsuka T, Yoshikawa Y, Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K: A New Method for Measuring Bone Strength using Echo-Tracking, Proceedings of the IEEE, Vancouver, Canada, October, 2006, 13-16.
7. Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Suzuki H, Harada A, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. A new method for measurement of bone deformation by echo tracking. Med Eng Phys 2006;28(6):588-95.
8. Ohashi S, Ohnishi I, Kageyama T, Imai K, Nakamura K, 2007. Distraction osteogenesis promotes angiogenesis in the surrounding muscles. Clin Orthop Relat Res 454, 223-229.
9. Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Bessho M, Matsumoto T, Miyasaka K, Harada A, Ohashi A, Nakamura K. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking.

Ultrasound in Medicine and Biology (in press)

2. 学会発表

1. A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking. - Matsuyama J, Ohnishi I, Sakai R, Miyasaka K, Harada A, Bessho M, Ohashi S, Matsumoto T, Nakamura K. The 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Poster session 2007. San Diego
2. 超音波エコートラッキングを用いた骨癒合判定法- 松山順太郎、大西五三男、大橋暁、別所雅彦、松本卓也、中村耕三. 第79回日本整形外科学会学術集会 シンポジウム2006 横浜
3. A new method for evaluation of fracture healing by echo tracking. - Matsuyama J, Ohnishi I, Ohashi S, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. 第32回日本骨折治療学会 シンポジウム 2006 仙台
4. A New Method for Evaluation of Fracture Healing by Echo Tracking - Matsuyama J, Ohnishi I, Ohashi S, Bessho M, Matsumoto T, Nakamura K. 8th EFFORT CONGRESS, FLORENCE, ITALY 2007
5. A Minute Bone Bending Angle Measuring Method

using Echo-Tracking for Assessment Bone Strength, Transactions of the IEEE. Sakai R, Miyasaka K, Suzuki H, Ohtsuka T, Harada A, Y, Matsuyama J, Ohnishi I, Nakamura K, - International Ultrasonics Symposium, New York, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1. 「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」

出願国：米国

発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大西五三男

出願人：アロカ(株)：国立大学法人東京大学

出願番号：11/390,788

出願日：2006年3月28日

2. 「ULTRASONIC DIAGNOSTIC APPARATUS」

出願国：E P (英、仏、独、伊、スイス)

発明者：原田烈光：酒井亮一：中村耕三：大西五三男

出願人：アロカ(株)：国立大学法人東京大学

出願番号：'06006394.8

出願日：2006年3月28日

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書**

神経線維腫症に合併した脊椎及び脊髄病変に関する研究

研究協力者 内藤正俊 福岡大学医学部整形外科教授

研究要旨

当科における神経線維腫症に脊椎及び脊髄病変を合併した症例に対する手術的治療の検討

有水 淳 福岡大学医学部整形外科助教

A. 研究目的

神経線維腫症は比較的希な疾患であるが脊髄、脊椎病変を合併することはよく知られている。今回我々は当科における神経線維腫症に脊椎、脊髄病変を合併した症例に対し手術的な治療を行ったのでその成績につき文献的考察を加え報告する。

B. 研究方法

神経線維腫症に対し手術的治療を行った症例は3例で男2例、女1例であった。平均年齢は48歳で臨床型は全例タイプ1であった。

C. 研究

実験1

全例に脊髄腫瘍の合併がみられた。うち2例は頸椎及び胸椎の腫瘍による脊髄症を合併した症例で

残りの1例は多発性馬尾神経腫瘍、仙骨腫瘍を認めた。手術方法は、頸椎の症例に対しハローヴェストを併用した後方固定術を胸椎の症例にはインストゥルメントを併用した後方除圧固定術を腰椎の症例には横倒し式の椎弓形成術を施行した。頸椎及び腰椎の症例に関しては術後麻痺の改善を認めたが胸椎の症例に関しては術後麻痺の改善なく術後約2ヶ月で胃癌にて死亡した。

[症例供覧]

症例1. 67才男性。主訴：腰痛、右下肢痛
現病歴は平成9年頃より特に誘因なく腰痛右下肢痛が出現し保存的な加療を行われるも症状軽快せず平成13年4月より症状が増悪し腫瘍を指摘され同年5月17日に当科を紹介初診。既往歴として54歳時に脳髄膜腫摘出術、62歳時に腋下の神経鞘腫切除術、64歳時に右上肢の神経鞘腫切除術を受けている。入院時所見として視診で体幹を中心に多数

のカフェオレ斑を認め、神経学的な異常所見として両側アキレス腱反射の低下と会陰部の知覚鈍麻を認めた。画像所見は単純骨盤正面像で右 S1 神経根の走行に沿って仙骨内に Scalloping が見られた。MRI では仙骨部に T1 強調画像で低信号、ガドリニウムにて enhance される巨大な腫瘍が見られた。ガドリニウムで enhance される腫瘍が L3, 4 脊柱管内にも観察され、T2 強調画像では L1, 2 レベルの硬膜内に多数の腫瘍を認めた。腰椎ミエログラフィーでは L3/4 レベルでブロック像及び多数の腫瘍、右 S1 根嚢像の消失を認めた。ミエロ後 CT では仙骨部での右 S2 以下の神経根の圧迫は軽度であったが L2/3 レベルでは馬尾の圧排は高度であった。以上により右下肢痛の原因として L3/4 が主病変と考え、仙骨の病的骨折の危惧もあったが L3-4 titanium mini plate による椎弓形成術及び腫瘍摘出を行った。硬膜管内の多数の腫瘍も可及的に摘出した。病理診断は神経鞘腫であった。術後 3 ヶ月で骨癒合を確認。現職の警備員に復帰した。

症例 2. 36 才 女性。主訴：四肢の脱力、歩行障害。現病歴は H5 年頃より左下肢痛、歩行障害出現。H6 年夏頃より四肢の脱力出現し転倒しやすくなった。同年 9 月 26 日、皮膚科より当科紹介となる。既往歴として 33 才時、神経線維腫症の診断にて皮膚科で右側胸部腫瘍切除術施行。入院時、視診にて体幹を中心に多数のカフェオレ斑を認めた。神経学的異常所見は四肢腱反射は著明に亢進、病的反射陽性、下肢 MMT では腸腰筋、大腿四頭筋の筋力低下を認めた。画像所見は単純レントゲンでははっきりした異常所見は認めなかったが MRI の axial 像の T2 強調画像で C2/3 右椎間孔の内外に dumbbell 型の腫瘍を認めた。sagittal 像では C1-3 spinal cord の前方に T1 low, T2 high の巨大な腫瘍を認め、spinal cord は著明に圧排されていた。ミエログラフィー

では C3/4 レベルで、Cap like defect いわゆる騎袴状陰影を認めた。ミエロ後 CT では cervical cord の著明な扁平化が観察された。以上より病因は頸髄の圧迫による脊髄症と考え C1-4 椎弓形成術、腫瘍摘出術及び 0-C2 後方固定術を施行し、ハローヴェストを装着した。術後四肢脊髄症状の悪化が見られ長期のリハビリテーションを要した。現在杖にて歩行可能である。

症例 3. 41 歳 男性。主訴：歩行困難。

現病歴は 21 歳時に頸椎腫瘍に対し腫瘍摘出術及び頸椎椎弓形成術を施行される。35 歳頃より背部痛を自覚。40 歳時に胸部単純レントゲンにて異常陰影を指摘され生検術を受け胸腔内神経鞘腫を指摘。41 歳になり両下肢の脱力が増強し歩行が困難となり他医にて MRI の結果脊髄腫瘍の診断にて当科紹介初診。既往歴として 21 歳時に皮膚腫瘍を摘出し神経線維腫症の診断をされています。また家族歴として母親、弟妹が von Recklinghausen 病の診断を受けていた。入院時視診にて体幹を中心に多数のカフェオレ斑を認めた。神経学的所見として下肢の深部腱反射は著明に亢進し病的反射は陽性であった。また膝、足間代が陽性であった。下肢 MMT では腸腰筋以下の筋力低下を認め知覚は Th3 以下の知覚鈍麻を認めた。画像所見では単純レントゲンにて Th3 の病的骨折を認める。MRI では T1 強調像にて第 3 胸椎を中心に脊椎の後方要素まで浸潤している腫瘍陰影を認め、またガドリニウムで enhance では腫瘍周辺が造影されていた。T2 強調像ではくも膜下腔は消失していた。axial 像では腫瘍は胸腔内まで拡大し砂時計腫の像を呈していた。またミエログラフィーでは T4 レベルで造影剤は途絶しておりミエロ後 CT では第 3 胸椎の椎体は骨破壊が認められた。さらに胸腔内の腫瘍は T4/5 レベルにて気管を

圧迫しその径は約半分ほどになっていた。以上より病因は胸髄の圧迫による脊髄症と考え胸腔内腫瘍も同時に摘出する事を考え手術は呼吸器外科と合同で行った。まず脊髄の腫瘍を後方より神経根を含めて摘出し、インストゥルメントを用いた後方固定術を施行。その後体位を仰臥位にした後前方より胸腔内の腫瘍を摘出しました。術前、気管を圧迫していた腫瘍はほぼ全摘されています。術後の病理組織診断は悪性神経鞘腫であった。この症例は手術約1ヶ月後に貧血が進行し上部消化管内視鏡にて末期胃ガンが発見され2ヶ月後に死亡した。

D. 結論

脊髄腫瘍の合併率は Brasfield は 3.6%、新村は 4%、と報告している。しかし Mautner らはタイプ 2 の 89%に、吉岡は頭蓋内病変を伴う症例の 58%に合併していたと述べ脊髄腫瘍の合併は稀ではないと考えられる。合併する脊髄腫瘍の病理組織型は神経鞘腫、神経線維腫が大半を占めるとされ伸展形式は硬膜内髄外腫瘍が最も多く、5-29%が悪性化し予後不良とされている。しかし近年のMRIの進歩により術前の組織診断もある程度可能となっておりもし悪性化が強く疑われる時は早期に手術を含めた治療が必要になってくると考えられる。NF に合併した脊髄腫瘍の治療の基本は NF conference statement にあるように NF 患者の QOL を優先し適切な時期に施行された必要最小限の手術のみが正当化される。しかしその手術方法に関しては一般的には後方からの腫瘍摘出術が多く行われているが症例 3 のように前方への発育が大きいときは前方からのアプローチも必要となりその症例毎に応じた方法を考えなければならない。また症例 2 は術後脊髄症状の悪化が見られたが、川合、馬場らが示す

ように Microsurgical technique の駆使、脊髄誘発電位による術中脊髄モニタリングなどを行いより安全な操作を行う必要があったと考えられる。また藤本らは有症候性腫瘍のみの切除をすべきであると述べているが症例 2 では術前の詳細な神経学的評価、MRI、脊髄造影により責任病巣が限定され、より低侵襲手術で高い患者の満足度が得られた。NF に合併した脊髄腫瘍に対しては詳細な術前評価による責任病巣の決定が重要と考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

神経線維腫症 II 型に対する聴性脳幹インプラントによる聴覚再建

分担研究者 吉田 純 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科教授

研究要旨

神経線維腫症 II 型患者の日常生活に最も影響しているのは聴力障害である。これに対して、聴性脳幹インプラントは欧米で 800 例以上に使用されているが、本邦では薬事未承認のため普及していなかった。我々は昨年、この治療を経験したので報告する。患者は 35 歳女性。1998 年 10 月に右聴神経鞘腫を全摘出、2006 年 10 月に左聴神経鞘腫も全摘出し、聴性脳幹インプラント手術は 2007 年 9 月に実施した。音入れを実施して聴覚再建が確認され、言語聴覚士による訓練を続けている。

齋藤 清

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科

曾根三千彦

名古屋大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科

1992 年に初めて人に用いられた聴性脳幹インプラントは、すでに欧米で 800 例以上に使用されているが、本邦では薬事未承認のため個人輸入で高額が必要であり、一昨年までは東京で 7 例行われた以外に普及していなかった。我々は昨年、この治療を経験したので報告する。

なお、この治療は名古屋大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、患者からは倫理委員会の承認を得た書式によるインフォームド・コンセントを得て実施した。

A. 研究目的

神経線維腫症 II 型は治療困難な疾患で、患者の日常生活に最も影響しているのは聴力障害である。聴神経腫瘍の治療についても、聴力が残っている間は腫瘍摘出には慎重になり、摘出時期を逸して腫瘍が巨大になることもしばしばである。これに対して、聴性脳幹インプラントにより聴覚の再建が可能となれば、患者の予後を改善できるのみでなく、聴神経鞘腫の摘出も積極的に行うことができる。

B. 研究方法

患者は 35 歳女性。1998 年 10 月に歩行障害と右聴力損失のため右聴神経鞘腫を全摘出。左は聴力が残っており経過観察していたが、2006 年 10 月

に左聴力消失し歩行障害が著明となったため、左聴神経鞘腫も全摘出した（図1）。

聴性脳幹インプラント手術は2007年9月に実施した。皮下にレシーバー部分を埋入し、電極はルシュカ孔から挿入して、脳幹の蝸牛神経核上に設置した（図2, 3, 4）。術中には電気信号をつたえ、聴性脳幹反応で刺激が伝達されていることを確認し、最適の位置を決定した。

C. 研究結果

術後6週間待って、音入れを実施した。幸い21電極のうち18電極を活性化することができ、聴覚再建が確認された。その後、言語聴覚士による訓練を続けている。

D. 考察

聴性脳幹インプラントでは、電極を蝸牛神経核に設置する。人工内耳では電極を蝸牛に挿入すると音階に沿った刺激が可能であるが、蝸牛神経核には蝸牛のような音階の分布はない。聴性脳幹インプラントにより、環境音の認知、会話の認知、会話リズムと音量の認識、読唇術の改善が期待できるが、これ単独で会話ができる可能性は低い。しかし、聴覚が戻ることは、患者にとって大きな福音である。

問題点として、薬事未承認であり、300万円の負担が必要である。この治療の適応患者は多く、さらなる機器の改良と発展が見込まれている。日本でもこの治療が保険診療となり普及することを強く期待している。

E. 研究発表

学会発表

齋藤 清、曾根三千彦：聴性脳幹インプラントによるNF2患者の聴覚再建。第24回白馬脳神経外科セミナー、2008.2.8-10

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 35歳女性

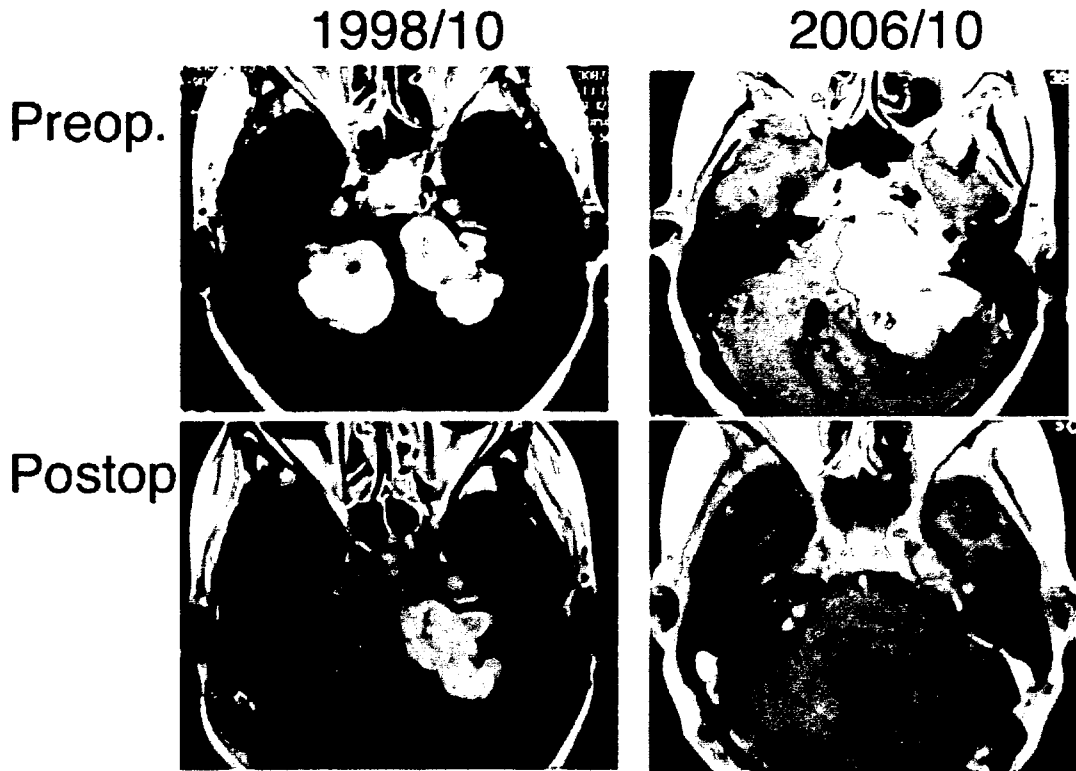


図2 聴性脳幹インプラント

Nucleus 24 ABI

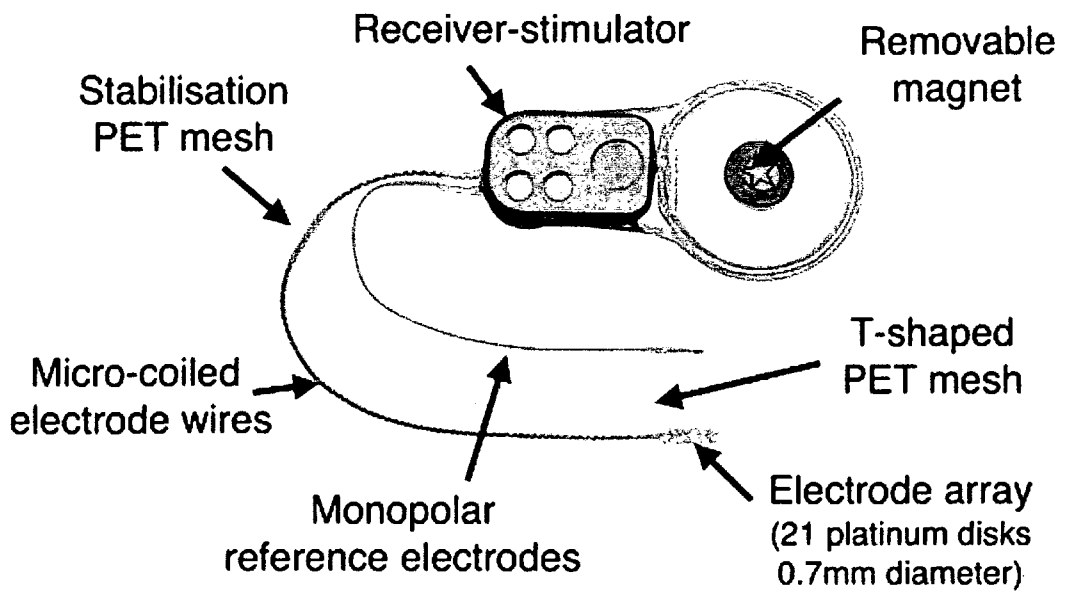


図3 電極部分

Nucleus 24 ABI

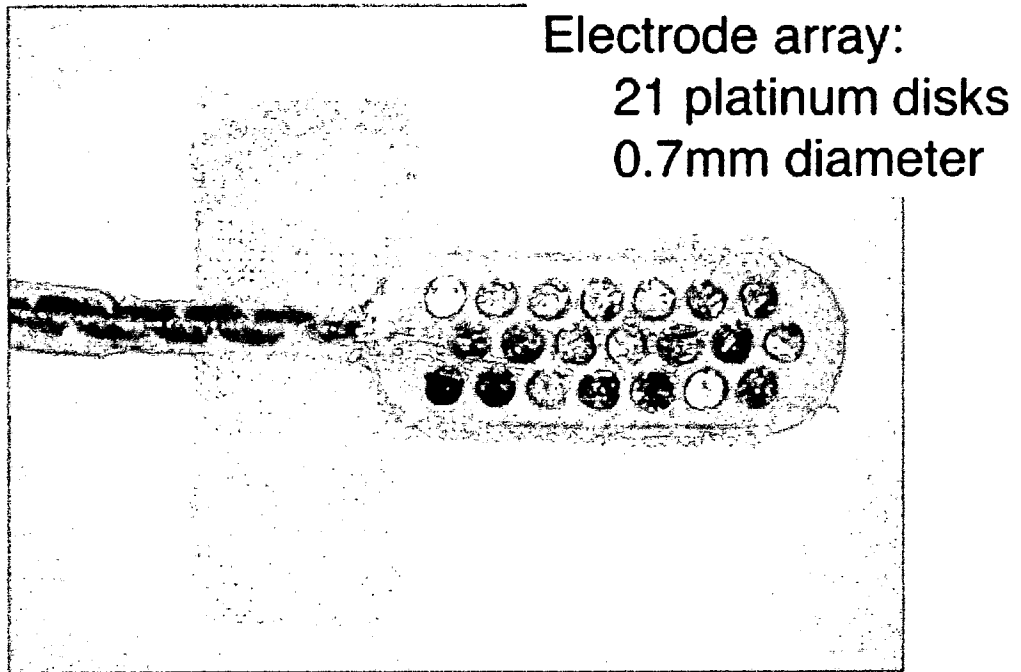
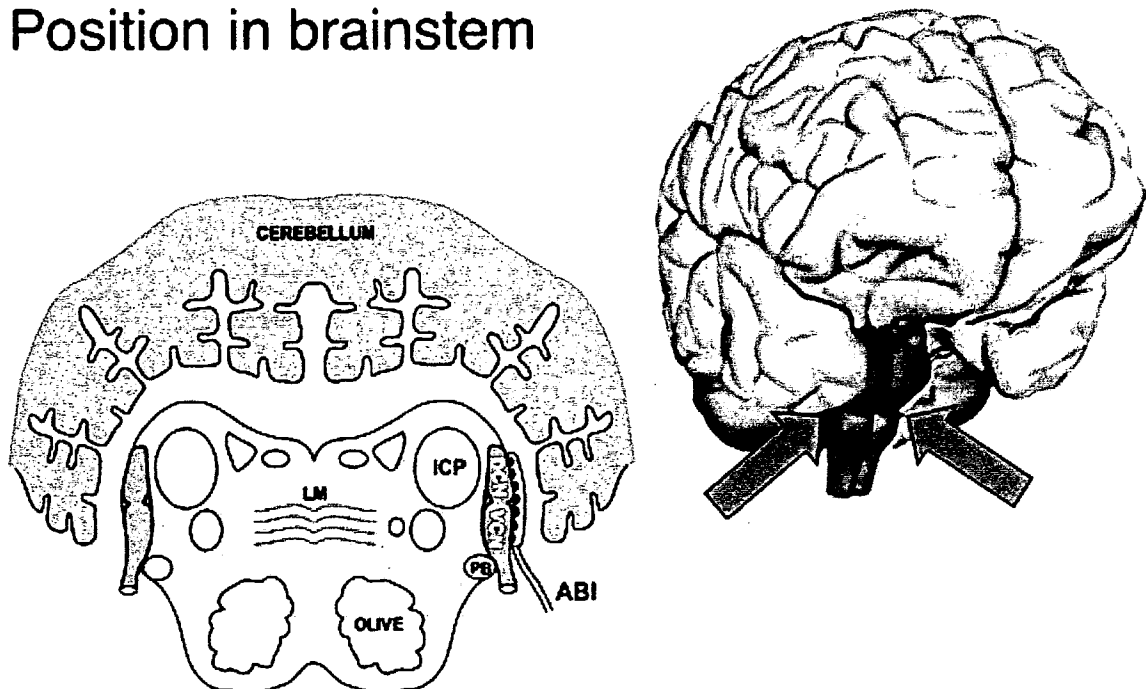


図4 電極設置部位

Position in brainstem



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中枢神経損傷に対する神経幹細胞移植による神経再生への可能性

分担研究者 吉田 純 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科教授

研究要旨

Neurofibromatosis type I や type II に発生する神経線維腫や、特に type II に発生する前庭神経鞘腫の摘出時の神経機能温存および損傷後の機能再生は大きな課題である。これまでの報告では神経再生のためには、(1) 神経や神経幹細胞などの移植、(2) GDNF などの神経栄養因子の投与や遺伝子導入などのアプローチなどが基礎研究レベルで試みられている。昨年の本会議では、損傷後に形成されるグリア瘢痕による物理・化学的バリアを抑制し、神経再生を促す試みを報告した。本年は、脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞の経静脈的に投与による神経再生の研究を報告し、その可能性について考察したい。

神経系疾患（損傷）モデルに対して、神経幹細胞の移植研究が盛んに行われているが、そのほとんどは局所的移植されたものである。今回、我々は、経静脈的に移植した神経幹細胞が脊髄損傷に遊走するかどうかを経時的に評価し、さらに遊走能に關与する種々のサイトカイン、ケモカインを検討した。その結果、損傷後7日目に最も多く神経幹細胞の損傷部位への集積が確認された。この結果と一致するように損傷後7日目の脊髄損傷部位において hepatocyte growth factor (HGF) と stromal derived factor (SDF)-1 の発現量がピークを示した。今回の結果より、経静脈的に移植した神経幹細胞は、損傷7日目をピークに選択的に脊髄損傷部位に集積し、SDF-1、HGF は神経幹細胞に対する重要な誘引物質であることが示唆された。

夏目敦至、齋藤 清

名古屋大学大学院医学研究科系脳神経外科学

A. 研究目的

我が国には10万人以上（米国は約45万人）の脊髄損傷患者が存在し、毎年5000人（同10000

人）以上が新たに受傷している。しかもその大半は若者であり、機能回復のための治療確立は急務であるといえる。近年再生医療の中で注目されているのが自己複製と多能性を併せ持つ幹細胞である。ニューロンやグリア細胞に分化する能力を有する神経幹細胞は脊髄損傷治療の有効な手段として期待されている。

我々は cell line 化したヒト神経幹細胞を脊髄損傷モデルヌードマウスへ経静脈的に投与し損傷部位への移行を調べた。また臨床応用するにあたっては投与のタイミングが問題になるため、損傷後の至適投与時期も評価した。そして損傷部位に選択的な取り込みや時間による集積量の違いを左右する因子として何らかの誘引物質があると考え、脊髄損傷部位から放出されるケモカインやサイトカインの経時的な mRNA 発現量を調べた。さらに損傷部位に移入した神経幹細胞のニューロンやグリアへの分化能を検証し、神経幹細胞投与による運動機能改善を評価した。

B. 研究方法

細胞：ヒト胎児脳由来神経幹細胞に retrovirus を用い *v-myc* を導入して神経幹細胞を cell line 化した F3 細胞に、レポーター遺伝子である *lacZ* を遺伝子導入した安定細胞株を用いた。この cell line を大量培養し、DiI (CellTracker) で標識した。

脊髄損傷動物モデルと臓器摘出：生後 8 週、メスのヌードマウスにハロタン吸入麻酔下、第 8 胸椎の椎弓切除をおこない、 $1 \times 2 \text{ mm}$ のプラスチックプレートで 5 g/mm^2 の圧迫を脊髄上に 5 分間加えた。損傷 3、7、10 日後に、標識した神経幹細胞 1.0×10^7 個を尾静脈より注入した。注入後さらに 1 週間してマウスを屠殺し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、損傷脊髄の他正常脊髄、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓等の臓器を取り出した。

脊髄損傷部位への神経幹細胞の遊走評価：損傷部位を Hematoxylin-Eosin 染色、X gal 染色をした。また、凍結切片を蛍光顕微鏡で観察し、脊髄

損傷部位においては 0.25 mm^2 あたりの DiI 標識細胞（投与した神経幹細胞）数を計数した。

ケモカインの経時評価：損傷 3、7、10 日後の脊髄損傷部位を顕微鏡下で取り出して RNA を抽出し、誘引物質の候補とされる hepatocyte growth factor (HGF)、stromal-derived factor (SDF)-1、C3a、leukemia inhibitory factor (LIF) を RT-PCR、定量 real-time RT-PCR で経時的に mRNA 発現量を計測した。

血液脊髄関門の破壊の評価：損傷 3、7、10 日後の血液脊髄関門の破壊程度を評価するために、エバンスブルー色素（マウス体重 1 g あたり $50 \mu \text{ g}$ ）を腹腔内投与した。翌日マウスを屠殺し、PBS で灌流固定後、損傷脊髄を破碎し、抽出液を 620 nm の吸光度で計測した。

運動機能評価と神経幹細胞の分化：損傷 7 日後に神経幹細胞を投与したマウス ($n=8$) については、投与 21 日後に The Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) テストを施行し運動機能評価を行った。また、抗 neuron-specific class III beta-tubulin 抗体や抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体で免疫染色をし蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

神経幹細胞の脊髄損傷部位への遊走：

神経幹細胞は投与後 7 日目に多数遊走していることが認められた (図 1)。脊髄損傷部位に移行した神経幹細胞数は損傷 3 日後に投与した群 ($n=8$) では $46 \pm 6 \text{ 個/mm}^2$ であったが、損傷 7 日後投与群 ($n=8$) では $140 \pm 10 \text{ 個/mm}^2$ と有意に上昇していた。しかし損傷 10 日後投与群 ($n=8$) では $6 \pm 2 \text{ 個/mm}^2$ と減少していた。他臓器では全ての投与

群において肺、肝臓、脾臓に神経幹細胞の移行は認められたものの観察されたのは投与後3日目までで7日目には全て排泄されていた。脳、非損傷脊髄においては全ての投与群において神経幹細胞の移行はみられなかった(図2)。

損傷部位からのケモカインの放出と血液脊髄関門の破壊の経時的評価:

脊髄損傷部位の mRNA 発現量は、損傷7日後の SDF-1 が正常脊髄の 101 ± 12 倍、HGF は 78 ± 3 倍と高値を示した。しかし損傷3、10日後の SDF-1、HGF の mRNA 発現量は通常の脊髄と変わらず、C3a、LIF については損傷後どの時期においても mRNA 発現量が正常脊髄に比べ高まっているという結果は得られなかった。エバンスブルー色素を投与した損傷脊髄は、圧迫を加えた箇所的一致して脊髄背側に肉眼的にも色素の漏出が確認できた。漏出色素量は損傷3、7、10日後のどの時期も脊髄あたり約 $3 \mu\text{g}$ とほぼ一定であった(図3)。

運動機能評価と神経幹細胞の分化:

損傷を加えた直後、どのマウスも BBB テストにおいてほぼ同等の5点を示すが、神経幹細胞非移植群 ($n=7$) は移植3週間後には約17点と自然回復した。しかし損傷7日後神経幹細胞移植群 ($n=7$) は移植3週間後に約19点と非移植群に比べ運動機能の改善を示す傾向がみられた。この移植群のマウスの脊髄損傷部位に移行した神経幹細胞の一部は抗 neuron-specific class III beta-tubulin 抗体や抗 GFAP 抗体に陽性に染まるものも観察された(図4)。

D. 考察

脊髄損傷患者に対する神経幹細胞移植を臨床応用するためにはいくつかの検討課題がある。まずは移植方法であるが、今までの報告では直達手術によるものが大半であった。神経幹細胞を直接脊髄損傷部位に移植する方法は確実ではあるが病変部位をさらに損傷せしめることになり、実際の臨床の間では現実的ではない。腰椎穿刺による報告もあるが直達手術よりは低侵襲であるとしても、損傷部位の深部まで移植細胞が到達することはできない。そこで我々が着目したのは神経幹細胞の経静脈的移植である。この方法は非常に低侵襲であると共に移植量、時間、速度が自由に変えられる利点もある。しかし経静脈的移植の場合、神経幹細胞が脊髄損傷部位に移行するのかという疑問が生じる。今回の我々の研究で神経幹細胞が経静脈的に脊髄損傷部位に移行し、しかも部位選択的に移植されることが証明された。次に最適な投与時期が問題になるが、損傷部位の微小環境も刻一刻と変化している。本実験で、経静脈的に移植した神経幹細胞は、損傷7日後をピークに選択的に脊髄損傷部位に集積することが証明された。今までも投与時期については直達力による損傷部位の変化、出血、脳脊髄関門の破綻、炎症性細胞浸潤、サイトカイン、グリア瘢痕形成の面から論じられることがあった。至適投与時期が明らかになったことで、その時期の損傷部位に神経幹細胞を誘引する要因を探ったところ SDF-1 と HGF が候補にあげられた。これらは神経幹細胞が損傷部位に最も移行する時期に一致して損傷部位での発現量が高まっていたことから、SDF-1 と HGF が神経幹細胞を損傷部位に誘引する何らかの役割を担っていると考えられた。実際 SDF-1 は造血幹細胞を心筋などの虚血病変部位へ誘引させる重要な因子と考え