

Mini Review

Regenerative medicine for spinal cord injury: Current status and open issues

Masaya Nakamura^{1, *}, Narihito Nagoshi^{1,2)}, Kanehiro Fujiyoshi^{1,2)},
Shinjiro Kaneko¹⁾, Yoshiaki Toyama¹⁾, and Hideyuki Okano²⁾

¹⁾ Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Spinal cord injuries result in devastating loss of function, because spinal cord of human beings never regenerates after injury. People believed in this dogma for a long time. There is an emerging hope for regeneration-based therapy of the damaged spinal cord due to the progress of neuroscience and regenerative medicine including stem cell biology. In this review, we have summarized recent studies aimed at the development of regeneration-based therapeutic approaches for spinal cord injuries, including therapy with transplantation of neural crest stem cells and induction of axonal regeneration, and the establishment of new method for evaluating injured and regenerated axonal fibers by MRI.

Rec.12/24/2008, 1/16/2009, pp198-203

* Correspondence should be addressed to:

Nakamura M, Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan. Phone: +81-3-5363-3812. Fax: +81-3-3353-6597. e-mail: masa@sc.itc.keio.ac.jp

Key words spinal cord injury, neural crest stem cell, chondroitin sulfate proteoglycan, semaphorin 3A, diffusion tensor tractography

Introduction

Neural stem cell transplantation is a promising regenerative medicine strategy for the treatment of spinal cord injury (SCI). We previously investigated the optimum timing of neural stem cell transplantation from the perspective of microenvironments within the injured spinal cord¹⁻³⁾, and successfully transplanted rat neural stem cells into the injured spinal cord of adult rats⁴⁾ and human neural stem cells into the injured spinal cord of common marmosets⁵⁾, thereby promoting functional recovery. We believe these findings represent a significant step toward the clinical application of neural stem cell transplantation. However, because of various problems, it has not yet been possible to use neural stem cells clinically. Herein, we present basic studies

that have been conducted to address various barriers against the realization of regenerative medicine for SCI. These problems include: (1) ethical issues related to the use of aborted fetal tissues, (2) axonal growth inhibitors within the injured spinal cord, and (3) insufficient methods for evaluating damaged and regenerated axons within the spinal cord.

Ethical issues related to the use of aborted fetal tissues

Aborted fetus-derived cells were used in our above-mentioned studies on neural stem cell transplantation for treating SCI. Ethical issues related to the clinical use of such cells have long been discussed at the relevant councils of the Ministry of Health,

Labour and Welfare. However, even the guidelines on the use of human stem cells for clinical research, published in 2006, do not include a definite stance on the validity of using aborted fetus-derived cells (Fig. 1). Because of these problems and uncertainties, we have recently focused on neural crest cells derived from the patient's own tissue as a source of somatic stem cells, rather than on stem cells from aborted fetal tissue.

1) What is a neural crest cell?

Neural crest cells, which are induced at the border of the epidermal ectoderm and neural plate during development, move to the surrounding tissue immediately after closure of the neural tube. The migratory neural crest cells have diverse differentiation potentials, and are able to differentiate into neurons and glia of the sensory and autonomic systems, adrenal medulla, pigment cells, cranial skeleton (bone and cartilage), teeth (odontoblasts), arterial smooth muscle, and other cell types. Neural crest cells play an important role in many aspects of organ development and therefore are called the "fourth germ layer"⁶⁾. Migratory neural crest cells differentiate into diverse tissues, depending on their environment. However, a portion of these cells remains undifferentiated and latent within various tissues while retaining their multipotential nature, even in adult organs. These neural crest stem cells have recently been attracting close attention as a potential cell source for autologous transplantation, because of their capacities of self-renewal and multipotential⁷⁾.

2) Isolation and identification of neural crest stem cells

Neural crest stem cells exist in many tissues, including the skin, intestine, heart, and corneas of adult mice⁸⁻¹¹⁾. Using transgenic PO-Cre and Wnt1-Cre/Flxed-EGFP mice¹²⁻¹⁴⁾, we demonstrated that neural crest stem cells are also present in the dorsal root ganglia and bone marrow of adult mice¹⁵⁾. Although the presence of stem cells (serving as a source of neural cells) in bone marrow has been shown in many reports, their embryological origin and differentiation potentials have been regarded as questionable. There are no reports that explain how the bone marrow-derived cells, of mesodermal origin, can differentiate into neural cells, which are of ectodermic origin. In addressing these questions, we found that neural crest stem cells move via the blood into the bone marrow during early embryonic development and remain latent in the bone marrow until adulthood, when they can produce neurons and glia. Furthermore, when we compared the properties of neural crest cells derived from different tissues (i.e. dorsal root ganglion, skin, and bone marrow) of adult mice, we found striking differences in their differentia-

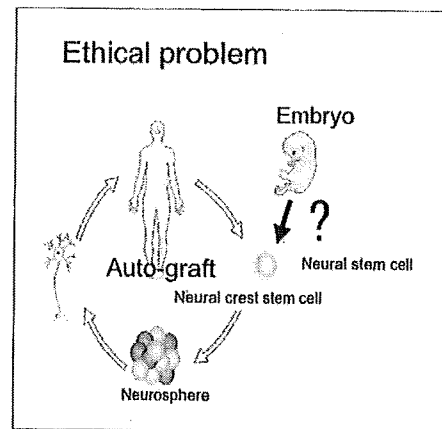


Fig.1 Avoidance of ethical problems associated with aborted tissue-derived neural stem cells by using neural crest cells

tion potential and gene expression profile. This result indicated that the neural crest stem cells latent in each adult tissue are not uniform, but rather retain properties that depend on their tissue of origin.

3) Transplantation of neural crest stem cells

Several recent transplantation studies have used skin-derived neural crest stem cells as a cell source. Miller et al. reported that skin-derived neural crest stem cells transplanted into demyelinated regions of central and peripheral axons differentiate into Schwann cells, which subsequently engage in remyelination¹⁶⁾. Furthermore, these authors reported that skin-derived neural crest stem cells transplanted into injured spinal cords also differentiate into Schwann cells, and their differentiation is followed by axonal growth and the accumulation of endogenous Schwann cells, leading to a recovery in locomotor function¹⁷⁾. However, in all these reports, the neural crest stem cells were obtained from neonatal mice. There are significant differences in the properties of neonatal and adult neural crest stem cells¹⁸⁾.

To achieve the goal of clinical application, it is important to evaluate the potential usefulness of neural crest stem cells derived from various adult tissues. In another study, neural crest stem cells derived from adult mouse skin were transplanted into injured mouse spinal cord. Some of the transplanted cells survived, but no improvement in locomotor function was described¹⁹⁾. Further studies are needed to determine the effectiveness of this approach. Since neural crest stem cells are found in a variety of adult tissues, and since their characteristics depend on their tissue of origin, it will be essential to select the type of neural crest

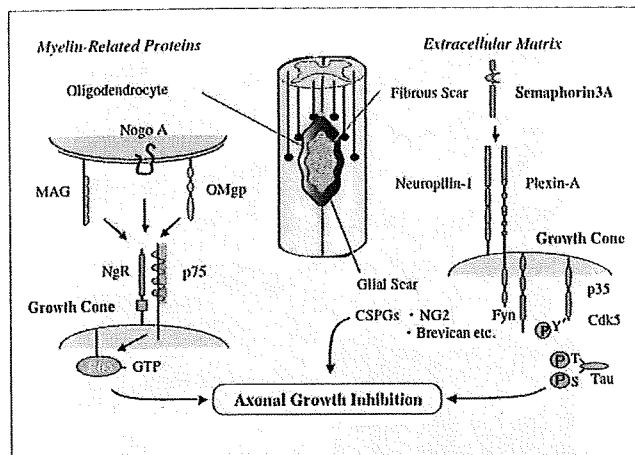


Fig.2 Axonal growth inhibitors in the injured spinal cord

stem cell for transplantation that will yield optimal results. In any event, neural crest stem cells are somatic stem cells that can be used for autologous transplantation. Given these features, in terms of both ethics and safety, neural crest stem cells are a promising source for transplantation in clinical cases.

Overcoming axonal growth inhibitors

Axonal growth does not occur in the injured central nervous system, although it can take place in the injured peripheral nervous system. One explanation for this is the presence of factors that inhibit axonal regeneration in the central nervous system. Even if effective stem cell transplantation for acute or sub-acute SCI can be achieved, it will still be difficult to establish valid regenerative treatments for chronic SCI unless the effects of the axonal growth inhibitors in the central nervous system can be overcome.

The axonal growth inhibitors found to date in the central nervous system can be roughly divided into myelin-associated proteins present in the myelin sheath (Nogo, MAG, and OMgp), and extracellular matrix components present in glial scar tissue, such as chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) and semaphorin 3A (Sema 3A) (Fig.2). In recent studies, animal models of SCI were treated with Nogo receptor antagonists (NEP1-40)²⁰, chondroitinase ABC (an enzyme involved in the degradation of CSPG)²¹, and Rho signal-suppressing drugs (C3 and Y-27632)^{22,23}. These methods are anticipated to be of value in treating spinal cord injuries.

We developed a Sema 3A inhibitor and applied it to the subarachnoid cavity of rats for 4 weeks after complete transection of the thoracic spinal cord. This agent stimulated axonal regen-

eration, induced vascularization, and promoted the migration of Schwann cells into the injured area, thus facilitating the recovery of leg locomotor function in the rats²⁴. We also induced a thoracic contusive SCI in rats and administered chondroitinase ABC into the subarachnoid cavity of each rat for one week, beginning one week after injury. The CSPG level in the injured spinal cord decreased to a normal level after this treatment. In the same study, neural stem cell transplantation, applied in combination with chondroitinase ABC, exerted synergistic effects, and induced more marked axonal regeneration than either treatment given alone²⁵. These results indicated that the regeneration of injured axons can be induced by combining the use of axonal extension inhibitors with neural stem cell transplantation. This important finding opens the door for effective treatments for chronic SCI.

Establishment of a method for evaluating spinal cord regeneration

The realization of regenerative medicine for the spinal cord requires the establishment of an evaluation method. Needless to say, axonal regeneration in the spinal projection tract is important for achieving spinal cord regeneration. However, the absence of an established method for evaluating axonal regeneration has made it clinically difficult to evaluate the responses of the injured spinal cord to cell transplantation.

To address this need, we have focused on a particular imaging technique, diffusion weighted imaging (DWI), which yields images based on the diffusion of water molecules. Two DWI methods, diffusion tensor imaging (DTI) and diffusion tensor tractography (DTT), have especially attracted our attention. We have applied these methods to the visualization of long tracts within injured spinal cords.

1) Anisotropy and the FA map

How water molecules diffuse in the living body varies depends on the nature of the local environment, and this variation is called, "anisotropic diffusion." For example, the white matter fibers constituting the spinal cord are highly anisotropic, and visualization of their anisotropy should delineate axonal arrangements. FA (fractional anisotropy) provides an indicator of the magnitude of anisotropy. FA ranges from 0 to 1, where it is 0 in cases with isotropic diffusion, and approaches 1 as the diffusion becomes more anisotropic. An image representing anisotropy two-dimensionally is called an "anisotropy map" or an "FA map." In a color FA map, different colors are assigned to different axes; thus, fibers can be distinguished from each other by using dif-

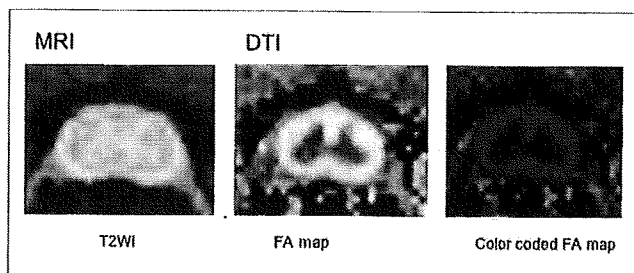


Fig.3 MRI and DTI of the normal spinal cord of a common marmoset

T2-weighted image (T2WI) and DTI (anisotropy map and colored anisotropy map) of the common marmoset spinal cord (cross-section). On the anisotropy map, white matter fibers, which have high anisotropy, are depicted as high signal areas. On the colored anisotropy map, different colors are assigned to different axes. White matter fibers are blue. The image shows the white matter to be composed of longitudinally arranged axonal fibers. (Reproduced from Reference 26)

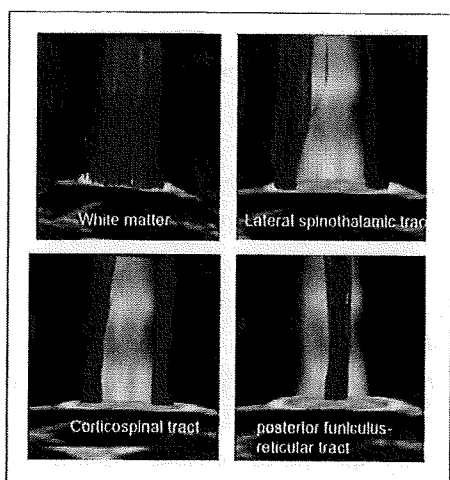


Fig.5 DTT of the normal spinal cord of a common marmoset (live model)

DTT clearly depicting fibers of the entire white matter were obtained by setting the regions of interest within the white matter of the cervical segment of the common marmoset spinal cord. By changing the regions of interest, it is possible to selectively depict by DTT, not only the corticospinal tract, but also the afferent fibers (lateral spinothalamic tract, posterior funiculus-reticular tract, etc.). (Reproduced from Reference 26)

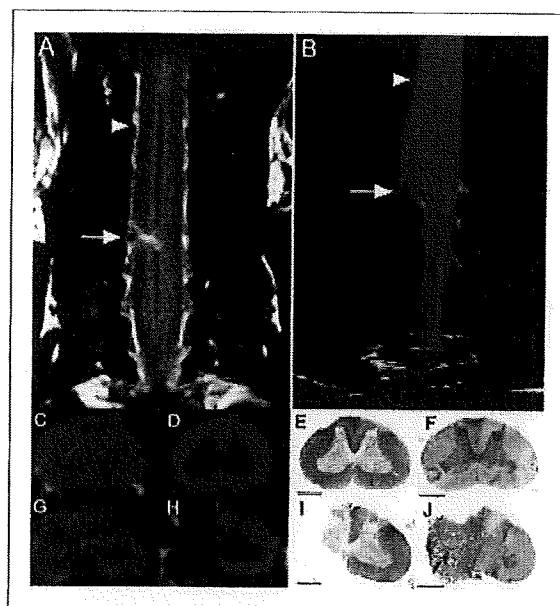


Fig.4 T2WI, DTT, and histological features of a common marmoset with half-cut spinal cord
Cervical segment of the common marmoset spinal cord 2 weeks after it was cut halfway through at the C5/6 level (a post-mortem model). A) MRI T2WI. B) Interrupted nerve fibers of the half-cut spinal cord are visible by DTT. C-F) Spinal cord 2-cm cranial to the half-cut level. G-J) Spinal cord at the half-cut level. Histological features of the HE- (F,J) and LFB- (E,I) stained specimens are well reflected by DTT (C,G) and the colored anisotropy map (D,H). (Reproduced from Reference 26)



Fig.6 DTT of the corticospinal tract and pyramidal decussation of a common marmoset

The medulla oblongata-pyramidal decussation (an anatomical feature of the corticospinal tract) is clearly depicted in the DTT. In this area, it is known that 90% of corticospinal tract fibers pass through the pyramidal decussation, and a small percentage descend the ipsilateral lateral funiculus (red fibers) or the contralateral anterior funiculus (blue fibers). DTT clearly depicted even these fibers. (Reproduced from Reference 26)

ferent colors according to the direction of their arrangement. Usually, blue is assigned to fibers running longitudinally in the spinal cord, red to fibers running laterally, and green to fibers running dorsoventrally. Fig.3 shows a color FA map of the cross-section of a common marmoset spinal cord. In this figure, the blue represents white matter fibers running vertically²⁶.

2) Diffusion tensor tractography of the spinal cord

DTT (diffusion tensor tractography) is an imaging technique in which the direction of maximum anisotropy for each voxel is traced. Before spinal DTT can be applied clinically, it is indispensable to conduct detailed analyses to determine the extent to which DTT reflects each tissue type, and the reliability with which DTT depicts axonal information.

With this purpose in mind, we performed DTT for a common marmoset after SCI. Our results yielded the first, worldwide, clear DTT of the spinal cord of an experimental primate. In this experiment, the cervical segment of the spinal cord of a common marmoset was cut halfway through at the C5/6 level, and DTT was performed two weeks later (immediately following the sacrifice of the animal). Unlike MRI, which depicts the injured spinal cord only as changes in signal intensity on T1 and T2 weighted images, DTT allows visualization of the injury in the form of interrupted white matter fibers (Fig.4). The examination of histological specimens stained with HE and LFB confirmed that DTI and DTT precisely reflected the histological features of the injured tissue. By performing detailed post-mortem DTT analyses of this animal model, we devised various ways to minimize artifacts (e.g., movement caused by respiration, the beating of cerebrospinal fluid, etc.), which enabled us to perform spinal cord DTT in live common marmosets. Furthermore, by changing the regions of interest for DTT on the basis of our neuroanatomical findings, we obtained clear projection tract-selective DTT images in live animals (Fig.5). We have also obtained images of the pyramidal decussation, which was previously considered to be impossible (Fig.6)²⁶. We have thus demonstrated that DTT is a very useful method of fiber tracking that may replace conventional tracers for monitoring SCI and repair.

Future perspectives

Basic research has been steadily advancing and overcoming the obstacles to the realization of regenerative medicine for SCI. Recently, induced pluripotent stem cells, developed by Yamanaka et al²⁷, have been attracting considerable attention as a cell source and are expected to provide significant advancements in regenerative medicine. To promote regenerative medicine in Japan

and advance its techniques worldwide, further basic research aimed at ascertaining its safety and efficacy, followed by clinical trials, are essential.

References

- 1) Nakamura M, Bregman BS: Difference in neurotrophic factor gene expression profiles between neonate and adult rat spinal cord after injury. *Exp Neurol*, 169: 407-415, 2001.
- 2) Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, et al: Differences in cytokine expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 184: 313-325, 2003.
- 3) Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, et al: In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J*, 19: 1839-1841, 2005.
- 4) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al: 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.
- 5) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury in Primates. *J Neurosci Res*, 80: 182-190, 2005.
- 6) Le Douarin NM, Kalcheim C: *The neural crest* UK: Cambridge University Press, 1999.
- 7) Crane JF, Trainor PA: Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 267-286, 2006.
- 8) Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al: A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol*, 6: 1082-1093, 2004.
- 9) Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, et al: Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, 35: 657-669, 2002.
- 10) Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, et al: Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol*, 170: 1135-1146, 2005.
- 11) Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, et al: Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem cells*, 24: 2714-2722, 2006.
- 12) Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, et al: A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice. *Dev Biol*, 212: 191-203, 1999.
- 13) Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, et al: Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-

- inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol*, 8: 1323-1326, 1998.
- 14) Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, et al: A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett*, 470: 263-268, 2000.
 - 15) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al: Multipotent Neural Crest-Derived Stem Cells in Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Facial Skin. *Cell Stem cell*, 2: 392-403, 2008.
 - 16) McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, et al: Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci*, 26: 6651-6660, 2006.
 - 17) Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, et al: Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci*, 27: 9545-9559, 2007.
 - 18) Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, et al: Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron*, 35: 643-656, 2002.
 - 19) Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, et al: Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci*, 32: 67-81, 2006.
 - 20) GrandPre T, Li S, Strittmatter SM: Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 417: 547-551, 2002.
 - 21) Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ et al: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416: 636-640, 2002.
 - 22) Ellezam B, Dubreuil C, Winton M et al: Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res*, 137: 371-380, 2002.
 - 23) Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 23: 1416-1423, 2003.
 - 24) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, et al: Axonal Regeneration and Functional Recovery by Administration of Strong and Selective Semaphorin3A Inhibitor into the Injured Spinal Cord. *Nat Med*, 12: 1380-1389, 2006.
 - 25) Ikegami T, Nakamura M, Yamane J, et al: Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of GAP-43-positive fibers after rat spinal cord injury. *Euro J Neurosci*, 2: 3036-3046, 2005.
 - 26) Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, et al: In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci*, 27: 11991-11998, 2007.
 - 27) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. 2006.

受賞記念講座 (三四会奨励賞)

脊髄損傷後の軸索再生制御機構の解明と軸索再生促進へのストラテジー
Strategy for elucidating the mechanism controlling
axonal regeneration and achieving enhanced axonal regeneration
after spinal cord injury

¹ 慶應義塾大学医学部整形外科, ² 慶應義塾大学医学部生理学,

³ ハーバード大学医学部ボストン小児病院神経科学部門,

⁴ 独立行政法人国立病院機構村山医療センター整形外科/臨床研究センター

かね こ しん じろう¹⁻⁴・なか むら まさ や¹・と やま よし あき¹・おか の ひで ゆき²
金子 慎二郎¹⁻⁴・中村 雅也¹・戸山 芳昭¹・岡野 栄之²

¹ Keio University School of Medicine, Department of Orthopaedic Surgery

² Keio University School of Medicine, Department of Physiology

³ Division of Neuroscience, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, USA

⁴ National Hospital Organization, Murayama Medical Center,
Department of Orthopaedic Surgery and Clinical Research Center

Shinjiro Kaneko¹⁻⁴, Masaya Nakamura¹, Yoshiaki Toyama¹, Hideyuki Okano²

概 要

哺乳類成体中枢神経系のニューロンの軸索は末梢神経系のニューロンの軸索に比して再生能に乏しいが、その理由の1つとして中枢神経系の損傷部においては軸索の再生を阻害する様々な因子が存在するという事が挙げられる。一方、中枢神経系においては末梢神経系に比して損傷を受けたニューロンの軸索の intrinsic な再生能自体が乏しいという側面もあり、これらの軸索再生制御機構を分子生物学的に解明する事は、脊髄損傷等の中枢神経系の損傷後に、より良い軸索の再生を得るためには極めて重要な課題の1つであり、本稿ではこれらの事項に焦点を当てて概説する。

Key Words : conditioning lesion, intrinsic growth ability, 軸索再生阻害因子, ミエリン関連蛋白質, Semaphorin 3A

背 景

哺乳類の成体中枢神経系のニューロンの軸索は末梢神経系のニューロンの軸索に比して再生能に乏しい。その理由の1つとして、中枢神経系の損傷部の環境による、いわゆる extrinsic factor (外的要因) が挙げられ、大別すると、(1)ミエリン debris 中に存在する種々のいわゆるミエリン関連蛋白質と、(2)瘢痕組織中に存在する種々の細胞外基質の2つが主な軸索再生阻害因子である

と考えられて来た (図1)。一方で、これらの extrinsic factor の作用は、損傷を受けたニューロンの軸索側の intrinsic な伸長能を適切な手段により促進させる事により、少なくとも部分的には相殺可能なものである事も示されて来た。したがって、中枢神経系軸索の損傷後の再生能力は、損傷を受けたニューロンの軸索側の intrinsic な再生能と損傷部環境側の extrinsic な軸索再生阻害因子の力のバランスによって決まって来るものと考えられる。

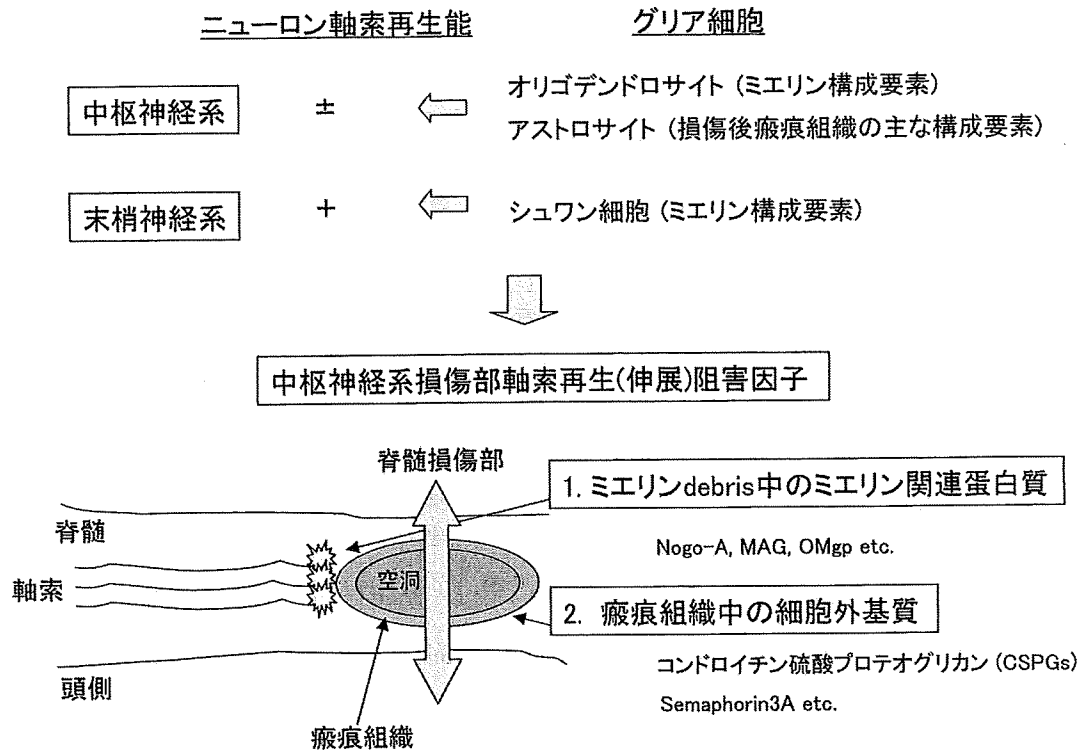


図1 末梢神経系と中枢神経系のニューロン軸索再生能の相違と構成要素の相違の関係／中枢神経系における様々な軸索再生(伸展)阻害因子
末梢神経系と中枢神経系のニューロン軸索再生能の相違は、その構成要素の相違などとも密接な関係がある。中枢神経系に存在する様々な軸索再生阻害因子は、主に、(1)損傷部ミエリン debris 中等に存在する種々のミエリン関連蛋白質と、(2)損傷部瘢痕組織中に存在する種々の細胞外基質の2つに大別される。

1. 軸索再生制御機構の解明の手掛かり

これらの相互関係を解明する上で、ひいては軸索再生制御機構そのもののメカニズムに関する研究を進めていく上で非常に有用なモデルとして知られているのが、後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) のニューロンを用いた conditioning lesion model である。DRG ニューロンの特徴として、末梢組織に innervate していく末梢側の枝と脳幹部まで脊髄内の dorsal column の中を走行していく中枢側の枝と、2本の軸索を DRG 内にある細胞体から伸ばしているという点が挙げられる(図2)。興味深い事に、末梢側の軸索(枝)は損傷後の再生能が高いのに比して、中枢側の軸索(枝)は損傷後の再生能が低く、同じ細胞体由来する2つの軸索の再生能の違いという点が、軸索再生のメカニズムを調べる上で、非常に有用なモデルとなっている要因の1つである。さらに興味深い事に、末梢側の軸索(坐骨神経)に先に損傷を加えた後に、中枢側の脊髄の dorsal column に損傷を加えると、通常はほとんど再生しない中枢側の

軸索の有意に促進された再生が認められ、これがこの系におけるいわゆる“conditioning lesion”の効果と呼ばれるものである¹⁾(図2)。実際、軸索再生のメカニズムを調べる上で、conditioning lesion の様に一貫して劇的な軸索再生促進効果が認められるモデルが現時点では他にほとんど知られていないため、本稿のテーマである軸索再生における分子生物学的制御機構を研究していく上で、非常に有用な貴重なモデルとなっている。

2. extrinsic factor としての軸索再生阻害因子とそのシグナル伝達のメカニズムの解明

1) ミエリン debris 中に存在する軸索再生阻害因子 (ミエリン関連蛋白質)

いわゆる extrinsic factor としての軸索再生阻害因子としては、先程述べた如く、損傷部のミエリン debris 中に存在する種々のミエリン関連蛋白質と、損傷部瘢痕組織中に存在する種々の細胞外基質の2つに大別されるが、前者として、Nogo-A^{2,3)}、MAG^{4,5)}、OMgp⁶⁾などの分子が、後者としてコンドロイチン硫酸プロテオグリ

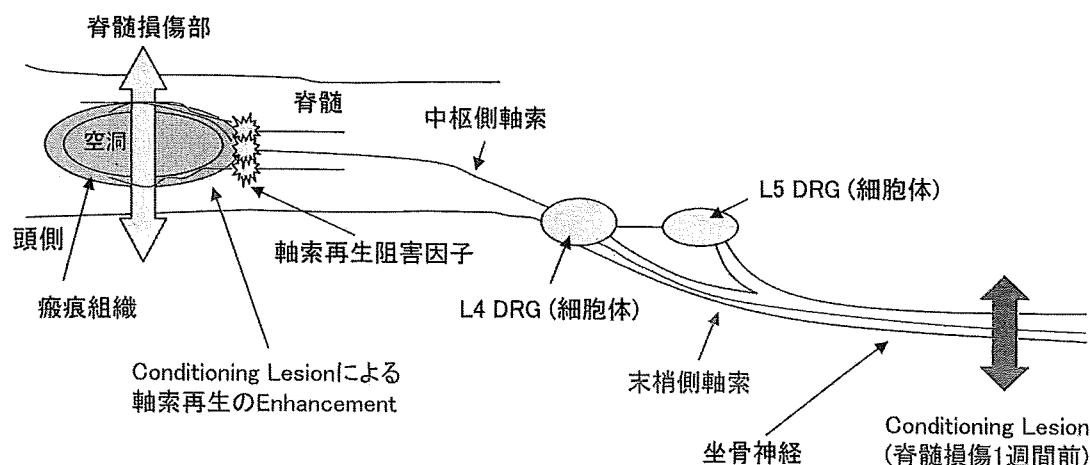


図2 後根神経節 (DRG) ニューロンにおける conditioning lesion モデル

後根神経節 (DRG) ニューロンは、(1)中枢側と末梢側に再生能の異なる2つの軸索 (枝) を持っている、また、(2)脊髄損傷を加える約1週間前に坐骨神経 (末梢側の枝) に損傷を加えておく (conditioning lesion) 事により脊髄損傷後の脊髄 dorsal column (中枢側の枝) における再生が促進される、という2点において軸索再生のメカニズムを調べる上で非常に有用な系である。

カン (CSPGs)⁷⁾ や Semaphorin3A^{8,9)} などの分子が同定されてきた (図1)。本稿においては、これらについての詳細は紙面の制限の都合上、割愛するが、前述の Nogo-A^{2,3)}、MAG^{4,5)}、OMgp⁶⁾ の3分子は、大変興味深い事に、構造上全く異なる分子でありながら、共通のレセプター、Nogo Receptor¹⁰⁾ に ligand として結合する^{4-6,10)}事が明らかにされ、その co-receptor として同定された p75¹¹⁻¹³⁾、TROY^{14,15)}、LINGO-1¹⁶⁾ などを通じて、軸索再生 (伸展) 阻害のシグナルを細胞内に伝達して行くというメカニズム (図3) が解明された事から、これらの分子のノックアウトマウスを用いた脊髄損傷モデルにおける軸索の再生能を調べる研究に近年、多くの研究者達の興味が集まった。しかしながら、Nogo-A¹⁷⁻¹⁹⁾、Nogo-Receptor^{20,21)}、p75 のノックアウトマウスを初めとして、これらのシグナル伝達系に関与する分子群のいずれのノックアウトマウスにおいても (研究室間でやや結果が異なるような要素も存在するものの基本的には) 期待された程の劇的な軸索の再生は認められず¹⁷⁻²¹⁾、これらの結果から、痕跡組織中の細胞外基質としての軸索再生阻害因子の役割やニューロンの軸索側の intrinsic な伸長能のメカニズムの解明といった方向に、現在の研究の中心は移行しつつある。

2) 損傷部痕跡組織中の軸索再生阻害因子

中枢神経系損傷部痕跡組織中に存在する細胞外基質としての代表的な軸索再生阻害因子のうち、グリア痕跡組織中に存在する CSPGs に関しては、その機能を減衰させる薬剤 (chondroitinase-ABC) による軸索再生促進

効果に関する報告²²⁾を初めとして、軸索再生を阻害する分子としての重要度に関する様々な報告がこれまでも成されて来たが、主に fibroblast (線維芽細胞) による痕跡組織中に存在する Semaphorin3A に関する同様の報告に関しては、これまで詳細には成されて来なかった (図3)。

すなわち、Semaphorin3A が脊髄損傷後の軸索再生を阻害する分子として重要な役割を果たしている可能性としては過去にも示唆されて来たが^{8,9)}、Semaphorin3A のノックアウトマウスの致死性の高さが原因となり、それを直接的に証明する報告は成されて来なかった。そこで我々は大規模なスクリーニングにより Semaphorin3A に対する阻害活性および選択性の極めて高い薬剤、SM-216289 を開発し、Semaphorin3A の損傷後の脊髄内における役割に関する薬理的なアプローチによる解明を試みた²³⁾。その結果、SM-216289 の投与により脊髄損傷後の、損傷部における軸索再生の促進、損傷部へのシュワン細胞の migration の促進と再生軸索に対する末梢神経型の髄鞘形成の促進、損傷部におけるアポトーシスの抑制、損傷部における血管再生の促進、さらにはこれらとの因果関係が示唆される運動機能の回復の有意な促進などを認め、Semaphorin3A 阻害薬の脊髄損傷の治療に対する有効性が示唆されるとともに、損傷後の脊髄内において、Semaphorin3A は様々な再生反応を阻害する因子として中心的役割を果たしている可能性が示唆された²³⁾。

以上、ここで挙げて来たそれぞれの分子の軸索再生阻害因子としての重要度 (関与の度合い) に関して、それ

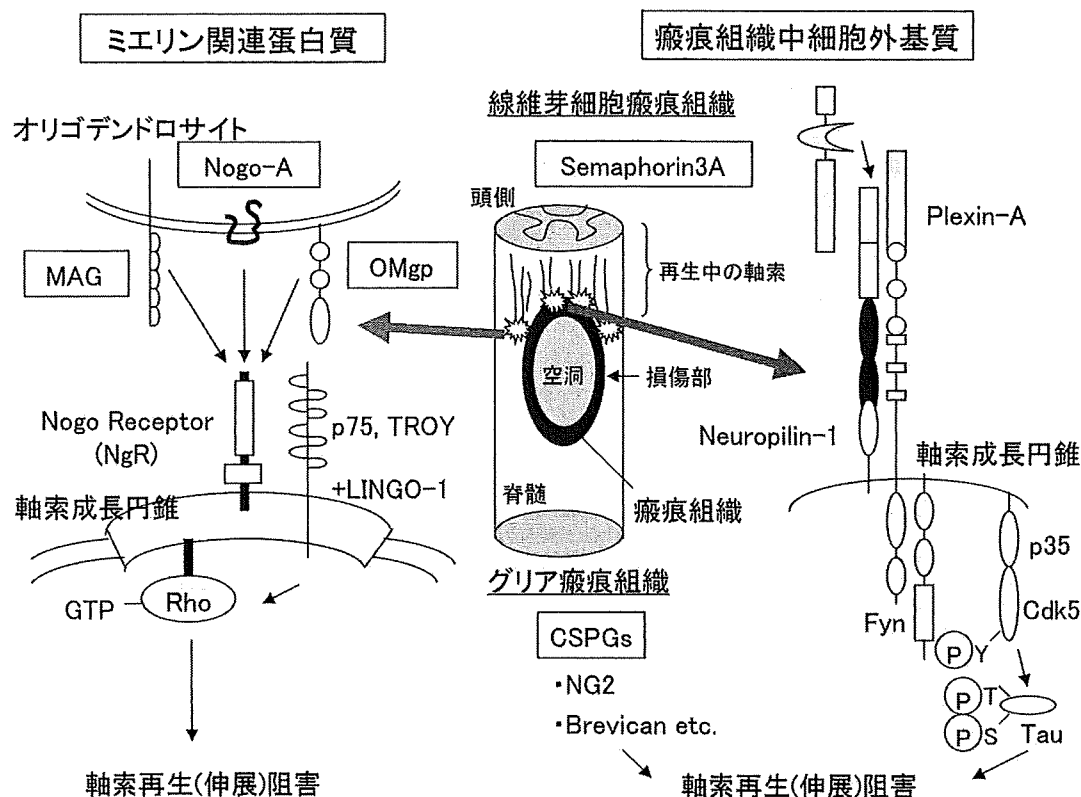


図3 中枢神経系における軸索再生(伸展)阻害因子のシグナル伝達経路
ミエリン関連蛋白質のうち Nogo-A, MAG, OMgp の3分子は、興味深い事に構造上全く異なる分子でありながら、共通のレセプター、Nogo Receptor に ligand として結合し、その co-receptor として同定された p75, TROY, LINGO-1 などを通じて、軸索再生阻害のシグナルを細胞内に伝達していく。

らを直接的に比較するような研究はこれまでは報告されていないが、それぞれの分子がそれぞれの場所で重要な役割を果たしているものと一般的には見なされており、これらを包括的にコントロールするような手段を開発する事が、臨床的にはより良い軸索再生を得るために重要な課題の1つであると考えられる。

3. ニューロンの軸索側の intrinsic な growth ability の制御機構の解明

一方、ニューロンの軸索側の intrinsic な伸長能の制御機構の解明という点においては、先程述べた DRG における conditioning lesion のシステム¹⁾(図2)を利用する事により、幾つかの興味深い報告が成されてきた。その1つとして、細胞内の cAMP の level を上昇させる事により、extrinsic な軸索再生阻害因子の作用を相殺する事が可能であり、また、DRG 内に *in vivo* で cAMP を注入する事により、conditioning lesion の効果¹⁾が mimic 可能である事などが報告されて来た²⁴⁾。また、細胞内の情報伝達路の中で、JAK2/STAT3 系の

pathway が、DRG ニューロンに対して同様な効果を持つ事も報告されて来ている²⁵⁾。DRG における conditioning lesion のシステム¹⁾の前述したような有用性を利用して、マイクロアレイなどを用いたスクリーニングも近年は多々行われており、軸索再生を制御する intrinsic なメカニズムに関する分子生物学的解明は、様々なアプローチから進んで来ている。

今後の課題・展望

初めにも述べた如く、哺乳類の成体中枢神経系のニューロンの軸索は末梢神経系のニューロンの軸索に比して再生能に乏しいが、これらの分子生物学的制御機構を解明する事は、脊髄損傷等の中枢神経系の損傷後に、より良い軸索の再生を得るためには極めて重要な課題の1つであり、本稿では主にこれらに焦点を当てて概説して来た。当然予測出来る事ながら、extrinsic な軸索再生阻害因子の機能の減衰と intrinsic な伸長能の促進をそれぞれ得る手段を併用した際に、相加的な軸索再生が認められ

たという報告もあり、こうした異なった様々なアプローチからの軸索再生促進戦略の併用といった点も、特に臨床的観点からは重要である。また同時に、再生後の軸索の適切な wiring の制御の問題も極めて重要な次なる課題の一つであり、これらを包括的に制御可能な手段の開発に向けて、様々なアプローチ・角度からの研究が世界各地で現在、行われている所である。

文 献

- 1) Neumann S, et al. : Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23 : 83-91, 1999
- 2) Chen MS, et al. : Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403 : 434-439, 2000
- 3) GrandPre T, et al. : Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403 : 439-444, 2000
- 4) Liu BP, et al. : Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297 : 1190-1193, 2002
- 5) Domeniconi M, et al. : Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35 : 283-290, 2002
- 6) Wang KC, et al. : Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417 : 941-944, 2002
- 7) Jones LL, et al. : NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 22 : 2792-2803, 2002
- 8) Pasterkamp RJ, et al. : Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur. J. of Neurosci.* 13 : 457-471, 2001
- 9) Winter FD, et al. : Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 175 : 61-75, 2002
- 10) Fournier AE, et al. : Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409 : 341-346, 2001
- 11) Wang KC, et al. : P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420 : 74-78, 2002
- 12) Yamashita T, et al. : The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* 157 : 565-570, 2002
- 13) Yamashita T, et al. : Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24 : 585-593, 1999
- 14) Park JB, et al. : A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45 : 345-351, 2005
- 15) Shao Z, et al. : TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45 : 353-359, 2005
- 16) Mi S, et al. : LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* 7 : 221-228, 2004
- 17) Zheng B, et al. : Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38 : 213-224, 2003
- 18) Simonen M, et al. : Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38 : 201-211, 2003
- 19) Kim JE, et al. : Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38 : 187-199, 2003
- 20) Zheng B, et al. : Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 : 1205-1210, 2005
- 21) Kim JE, et al. : Nogo-66 receptor prevents raphe-spinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 44 : 439-451, 2004
- 22) Bradbury EJ, et al. : Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416 : 636-640, 2002
- 23) Kaneko S, et al. : A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat. Med.* 12 : 1380-1389, 2006
- 24) Qiu J, et al. : Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34 : 895-903, 2002
- 25) Qiu J, et al. : Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J. Neurosci.* 25 : 1645-1653, 2005

拡散テンソル tractography*

藤吉 兼浩** 辻 収彦 松本 守雄
千葉 一裕 戸山 芳昭 中村 雅也

はじめに

白質神経線維など、方向性を有する生体構造に生じる水分子の制限された拡散に着目し、その拡散異方性をとらえようとする磁気共鳴像を拡散テンソル MRI または拡散テンソルイメージング (diffusion tensor imaging: DTI) と呼ぶ。さらに、拡散異方性の最大方向を追跡することにより得た画像を拡散テンソル tractography (diffusion tensor (fiber) tractography: DTT) という。最近では脊髄領域における DTT の報告も多くなっている。本稿では DTT の基本的原理を概説するとともに、脊髄における DTT の特徴について述べることにする。

拡散 MRI と異方性

脊椎脊髄領域における核磁気共鳴像 (MRI) の有用性については異論の余地はないが、最近では拡散 MRI (diffusion MRI) という言葉も広く認知さ

れてきた。脳における拡散 MRI の報告は 1980 年代からはじまり^{11,12)}、1990 年代の急性期脳梗塞における有用性の報告によって世界中で知られることとなった^{3,4)}。最近では悪性腫瘍の転移を 3 次元的に評価し得る diffusion weighted whole body imaging with background body signal suppression (DWIBS) の出現によってますますその有用性が期待されている²⁴⁾。拡散とは“水分子の拡散”のことであり、これを利用した MRI 全般を拡散 MRI という。ここでいう拡散は水分子の Brown 運動を意味し、水分子の流れ (flow) とは厳密に区別される。Motion proving gradient (MPG) と呼ばれる傾斜磁場を付加することで、組織内の水分子の拡散情報を検出・可視化したものが拡散強調像 (diffusion weighted MR imaging: DWI^{注1)}) であり、われわれ臨床医が通常目にするのはこの DWI である。DWI は既存の MRI の撮像方法とは異なり、拡散に基づいたコントラストが多くの病変において新たな情報をもたらす。

生体組織では、水分子の拡散の方向は多かれ少なかれ制限を受ける。方向によって拡散の速度が

Key words

脊髄 (spinal cord)

拡散テンソル tractography

(diffusion tensor tractography)

MRI

注1) DWI は教科書では“プロトンの拡散運動をなんらかの方法で強調した MRI すべてを含むが、通常は狭義の使い方として拡散強調の傾斜磁場を加えて撮像した元画像をさす”とある¹⁾。

* Diffusion Tensor Tractography

** 慶應義塾大学医学部整形外科 [〒160-8582 新宿区信濃町 35] / Kanehiro FUJIYOSHI, Osahiko TSUJI, Morio MATSUMOTO, Kazuhiro CHIBA, Yoshiaki TOYAMA, Masaya NAKAMURA : Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

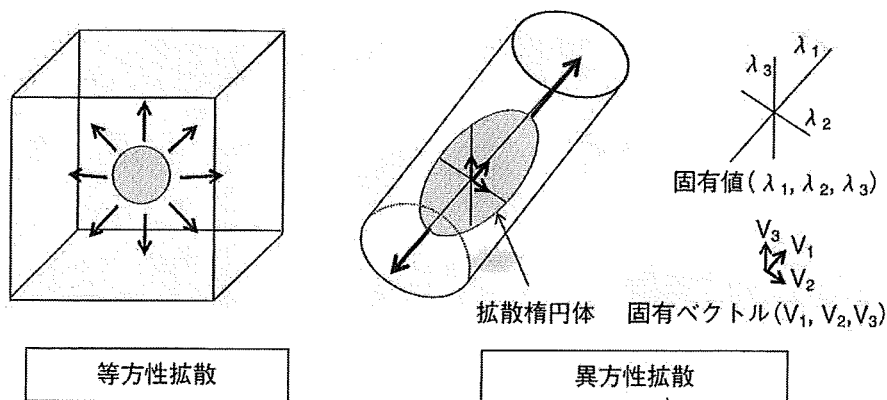


図 1 水分子の拡散

水分子の拡散は、球形で表される等方性拡散と、楕円体で表される異方性拡散の2つに分けられる。各ボクセルにおける異方性は拡散楕円体に近似される。

異なる性質のことを拡散の異方性または異方性拡散 (anisotropic diffusion) と呼ぶが¹³⁾、病巣の検出を目的とする DWI では正常な白質の信号値が変化するのを避けるため、あえて異方性が少なくなるような撮像法あるいは処理を行っている。このため異方性拡散の影響を排除した拡散強調像を、等方性拡散強調像 (isotropic diffusion-weighted image : isotropic DWI) と呼ぶこともある。異方性拡散は楕円体で表され、等方性拡散は球体で表される (図 1)。

脊髄白質は頭尾側方向に比較的整然と走行する神経線維束からなり、その中の水は構成要素である軸索の走行に沿って拡散する。このため白質は拡散異方性が高い。この異方性の情報から神経線維を追跡・可視化したものが DTT である。DTT を構築するためには拡散の大きさ表す見かけの拡散係数 (apparent diffusion coefficient : ADC) や、拡散の異方性を表す fractional anisotropy (FA) などのパラメーターを求める必要がある。これらのパラメーターを求める過程でテンソル解析を用いるが^{2,14,17)}、これが拡散テンソルの

名前の由来である^{注2)}。

異方性の計測とテンソル解析

① FA と FA マップ

異方性の計測にはいろいろな方向における拡散の情報が必要であるため、最低 6 軸以上で MPG を付加した MRI と、MPG を付加しない T2 強調像を撮像する必要がある。これによって得られたデータをテンソル解析することで、拡散の大きさを決定する固有値 ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) と方向を決定する固有ベクトル (v_1, v_2, v_3) が算出される。これらの値から各ボクセルにおける異方性の情報は楕円体として近似されるが、これを拡散楕円体という (図 1)。この情報を 2 次元で描出したものを FA マップ (または異方性マップ) という (図 2)。FA とは異方性の大きさの指標として用いられ、0 から 1 の値をとるが、等方性拡散においては 0 となり、異方性が大きくなるほど 1 に近づく。FA に対し、ADC は拡散の方向とは無関係に拡散の大きさを表す指標である。FA は以下の式により算出される。

$$ADC = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} = \langle D \rangle$$

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2} \frac{(\lambda_1 - \langle D \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle D \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle D \rangle)^2}{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

注2) テンソルとは多線形性をもつベクトル変数の関数であり、ベクトルに (左から) かけるとベクトルを生むような行列で、行列の各成分が座標系と密接に関連しているものである¹³⁾。実際には 3×3 、2 階の行列演算が必要である。

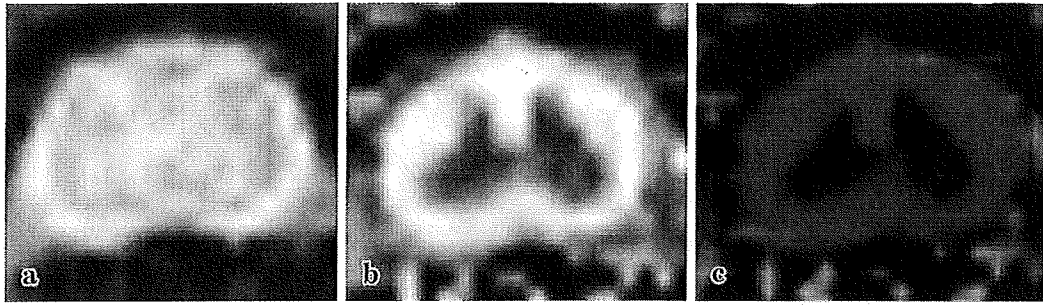


図 2 マーモセット脊髄における従来の MRI と拡散テンソル MRI
コモンマーモセット脊髄（軸位断像）における T2 強調像（T2 weighted image : T2WI, a）と DTI (b, c) を示す。FA マップ (b) では、異方性の大きい白質線維は高信号を呈している。カラーマップ (c) は異方性を軸ごとに色でコードしており、左右方向は赤、頭尾側方向は青、前後方向は緑でコードすることが多い (RGB カラー)。白質線維は青で描出されており、白質が頭尾側方向の軸索線維から構成されていることを示している。

等方性拡散においては $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3 = \langle D \rangle$ となり FA は 0 となる。

異方性が強くなると $\lambda_1 \gg \lambda_2 = \lambda_3$ となり FA は 1 に近づいていく。

FA マップにおける信号の強弱は FA の大きさを表し、従来の DWI と違い定量的である。脳梗塞、出血などの病変部において FA が低下することが知られているが、われわれは waller 変性においても FA が低下することを報告している²¹⁾。拡散テンソルは FA など異方性の定量が可能であるだけでなく、方向性を解析できるという画期的な面をもっている。

② カラーマップと RGB カラー

FA マップにおける異方性を軸ごとに色分けしたものを color coded FA マップ（通称カラーマップ）という。カラーマップはいろいろな線維をその走行方向から識別することが可能である。色は任意であるが、左右方向が赤 (red)、縦方向は青 (blue)、前後方向は緑 (green) に割り当てることが多く、RGB カラーと呼ばれる¹⁹⁾。FA マップ、カラーマップなどテンソル解析によって得た MRI 全体が DTI である。広義には DTT も DTI に属するが、あえて区別することが多いように思われる。コモンマーモセット脊髄の軸位断像におけるカラーマップをみると、青の部分が頭尾側方向に走行する白質であることがわかる（図 2）。

③ 拡散テンソル tractography の構築

ボクセルごとに楕円体の長軸方向、つまり異方性の最大方向を追跡し 3 次元構築することで白質などの線維走行を追跡したものが拡散テンソル tractography (DTT) である。異方性の追跡には無数のアルゴリズムが存在するが、fiber assignment by continuous tracking (FACT)¹⁸⁾ が有名である。あえて誤解を恐れずに端的にいうなら、隣り合うピクセル（ボクセル）ごとに最も大きい拡散楕円体の長軸を追跡していくことでトラクトが構築される。DTT は、従来の MRI では描出することが困難であった脳内の皮質脊髄路や脳梁などの白質線維の走行を明瞭に描出することが可能であり、脳神経外科領域では手術のナビゲーションにも用いられた報告もある¹⁰⁾。DTT は関心領域 (region of interest : ROI) と呼ばれる関心領域を設定することで、見たい情報を選択的に何度でも構築できる利点がある。DTT の解析にはいくつかのソフトが開発されているが、本稿における拡散テンソル解析と DTT の構築には、東京大学医学部放射線科で開発されたフリーソフトである VOLUME-ONE と dTV II SR を使用している¹⁶⁾。

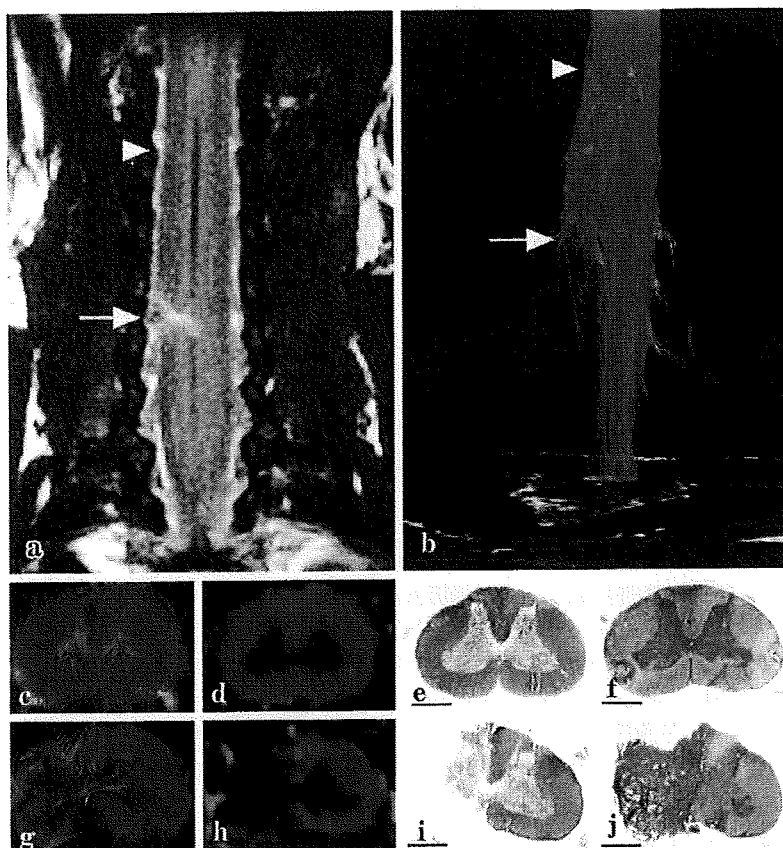


図3 マーモセット脊髄半切モデルにおけるMRI, DTT および組織像
(文献7より引用)

半切損傷(C5/6椎体高位)後2週で撮影したコモンマーモセット頸髄(死後モデル)。従来のMRIではAのようにT1, T2コントラストとしてしか描出されなかった半切脊髄が, DTTによって神経線維の途絶として描出されている(b)。HE染色(f, j)やLFB染色(e, i)による組織学的評価によって, 得られたDTT(b, c, g), カラーマップ(d, h)が組織像を反映していることが明らかとなった。c~gは半切高位から2cm頭側における脊髄であり, g~jは半切高位における脊髄を示す。

脊髄における拡散テンソル tractography

Ⅰ 脊髄における DTT の必要性

脊髄白質は多くの神経線維束からなるが, 組織標本においては一見すると均一な組織であり, 特殊な染色をしない限り個々の投射路を観察することは不可能である。また, 投射路の違いによるプロトンの緩和時間の差もほとんどないため, T1やT2による明暗のコントラストとしても識別不能である。したがって, 脊髄における投射路および軸索の情報は非常に重要であるが, 生体においてそれらを可視化するのは困難であった。アーチファクトを軽減する最新のシークエンスや高磁場のMRI装置を使用しても, 脊髄白質は均一な組織として描出され, 投射路を識別することは不可能である。われわれがこれまで取り組んできた脊髄損傷においても, 軸索がどこで破綻しているのか, どの程度の軸索が損傷を免れて残存しているのかを知ることは, 予後予測, 治療選択の面から

も非常に重要であるが, これまではT1, T2強調像から損傷の局在と圧迫の程度を知るのみであった。

一方, DTTは脳内白質神経線維を可視化できる方法として10年ほど前から多くの報告がなされていた。しかし, 脊髄は脳に比べて小さく, 体の深部に位置し, 狭い範囲に脊髄実質, 脳脊髄液, 椎骨, 筋肉, 空気など磁化率の異なる組織が混在するため, 高分解能データを得るのが困難であった^{2,15)}。このためヒトにおける脊髄のDTTの報告は散見されるものの, その精度は低く, 組織学的な検討を加えた報告はほとんどなかった^{5,6,22)}。脊髄のDTTを臨床応用するためには, DTTと組織を詳細に比較検討し, 精度検証を行う必要があった。そこで, われわれは霊長類コモンマーモセットの脊髄においてDTTの撮像を行い, 組織と比較検討しその精度検証を行ってきた。

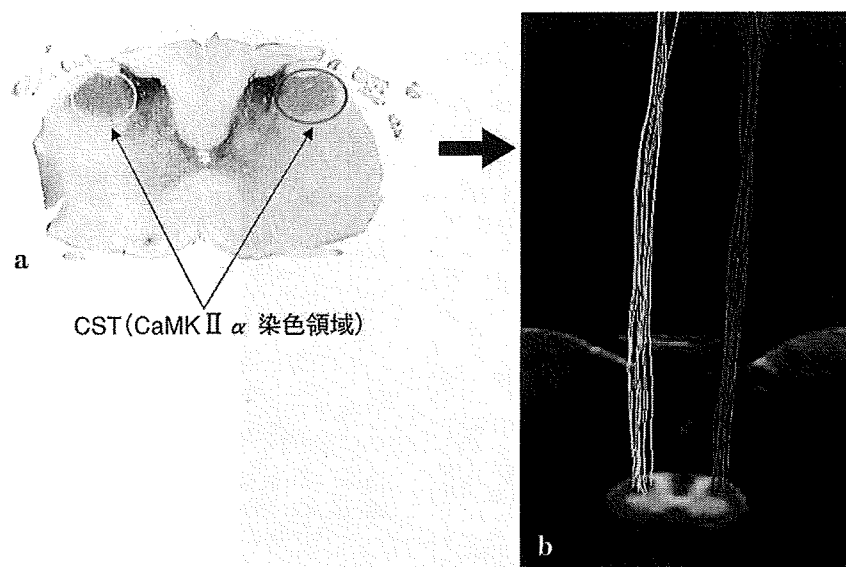


図 4 皮質脊髄路選択的 DTT の構築方法

DTT は解剖組織学的知見に基づき、ROI と呼ばれる関心領域を設定することでみたい情報のみを構築することが可能である。マーモセットの皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) は CaMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) II α 染色によって脊髄側索に同定でき (a), ここに ROI を設定することで皮質脊髄路選択的な DTT (b) を構築することが可能である。

② 霊長類コモンマーモセット頸髄における DTT

われわれはヒトに近縁である霊長類コモンマーモセットを用いて再現性のある脊髄損傷モデルを作製し、ヒト神経幹細胞移植が機能回復に寄与することを報告してきた^{8,9)}。残念ながらいまだにヒトの脊髄完全損傷の治癒の報告はないが、約 5~10% の軸索が損傷を免れれば機能回復が見込めることもわかってきている。動物実験レベルでは大脳の一次運動野 (primary motor cortex) に biotin dextran amine (BDA) などのトレーサーを注入することで損傷軸索を組織学的に評価することは可能であるが、当然のことながら臨床応用は不可能であった。そこで、前述した DTT の優れた特徴に着目し、コモンマーモセット損傷脊髄を対象として DTT の有用性を検討した。動物実験用 7 Tesla MRI のもと¹⁰⁾、スピンエコー法で撮像を行った。結果、世界で初めて霊長類実験動物脊髄の明瞭な DTT の描出に成功した⁷⁾。DTT が軸索の状態を反映しているかどうかをみるために、よりシンプルなモデルとして頸髄半切損傷 (C5/6 椎体高位) モデルを作製し、2 週後に DTT を撮

影した (死後モデル)。DTT は従来の MRI では T1, T2 コントラストとしてしか描出されなかった半切脊髄を、神経線維の途絶を可視化することで明瞭に描出していた (図 3)。Hematoxylin-eosin (HE) 染色や luxol fast blue (LFB) 染色による組織学的評価によって、得られた DTI および DTT が組織像を反映していることを証明した。死後モデルにおける知見を踏まえ、至適な麻酔深度の設定をしたこと、呼吸性変動や脳脊髄液の拍動などのアーチファクトの原因になる要素をさまざまな工夫によって最小限に軽減することで、現在では生きているコモンマーモセット脊髄の DTT を投射路ごとに再現性をもって構築することが可能である (図 4, 5)。さらに、これまで DTT では描出困難といわれていた錐体交叉の描出にも成功しており (図 6, 7)、DTT が従来のトレーサーにかわる fiber tracking のツールとしてきわめて有用であることが証明された。

¹⁰⁾ テスラ (Tesla) とは磁場強度を表す単位で、1 Tesla=10,000 Gauss (ガウス) である。

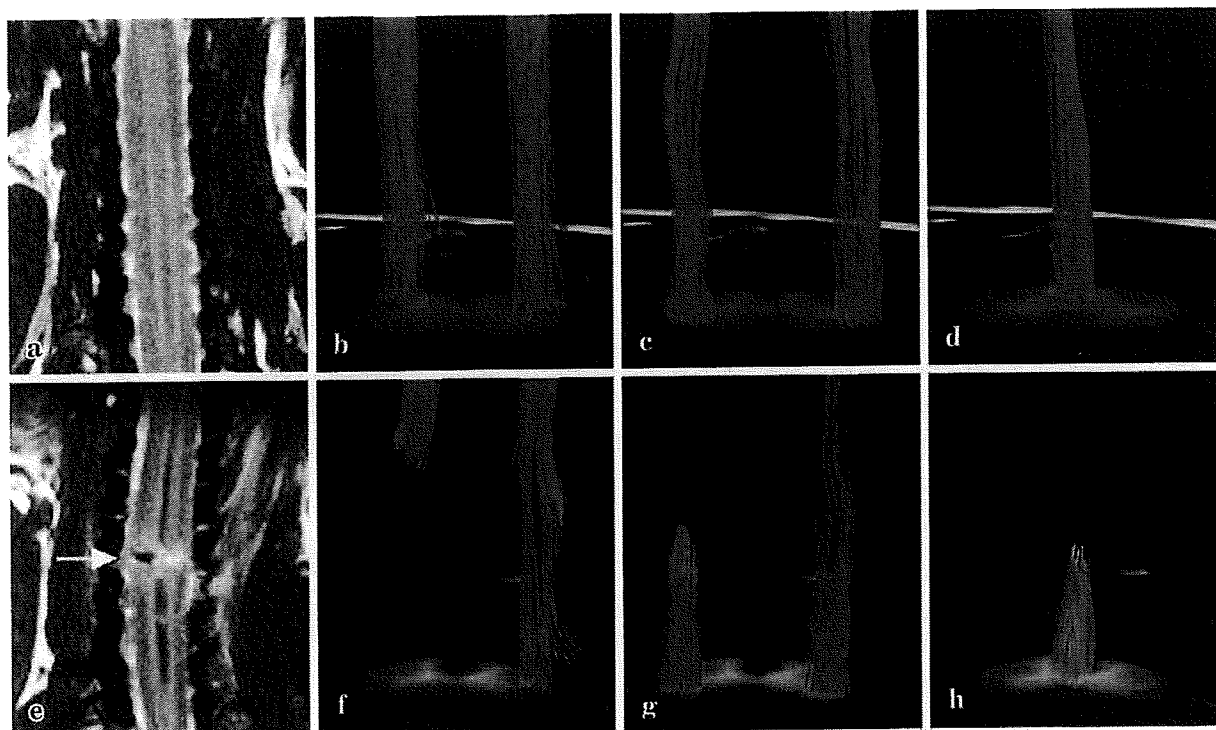


図5 マーモセット脊髄における投射路選択的 DTT (文献7より引用)
ROI の設定を変えることで、生きているコモンマーモセットの頸髄の投射路選択的 DTT を描出した。a~d は正常な頸髄であり、e~h は脊髄半切モデルである。a, e: T2 強調 MR 像。b, f は皮質脊髄路の DTT, c, g は脊髄視床路, d, h は後索路を示している。DTT は脊髄半切損傷を反映していた。

DTT の問題点と展望

① 解像度

よくある質問であるが、DTT は軸索そのものを描出しているのではない。前述のように DTT はボクセルごとに異方性を解析することで構築されるが、ボクセルサイズは軸索径よりもはるかに大きく、実際には 10^2 オーダー以上の軸索が集まった線維束の拡散異方性をみていることになる。図2におけるピクセル (ボクセル) サイズは 0.215 mm であるのに対し、軸索径は平均 5 μ m 程度である。

② 複雑な神経走行の描出

解像度の問題とも密接に関係するが、方向の異なる線維が同一ボクセル内に存在すると partial volume 効果によって異方性が相殺され、追跡を止めてしまうことがある。反対に異方性をもちさえすればトラクトをしつづけ、実際にはありえない構造を描出することもある。この事実は、

DTT が実際の解剖学的構造を必ずしも反映しないことを示している。われわれは誤ったトラクトを描出する確率を減少させるため、FA に閾値を設定したり、異方性の追跡の際に急な方向転換を防ぐために追跡角度にも閾値を設定したりすることで対処している。現段階においては通常の MRI の読影と同じように、解剖組織学的知識を総動員しながら慎重に解釈する必要があると考えている。

複雑な神経走行の描出に対しては high b value を用いた多軸神経走行^{20,23)}の解析が有用であり¹⁴⁾、われわれも視神経交叉や脳神経の鮮明な描出に成功しているが、これらの方法は膨大な撮像時間を要するために臨床応用には至っていない。

③ DTT の臨床応用

われわれはこれまでのマーモセット脊髄における DTT の知見を生かし、すでにかなり多くの症例に対して臨床応用を行っている。脊髄損傷だけでなく、頸椎症性脊髄症、後縦靱帯骨化症、脊髄

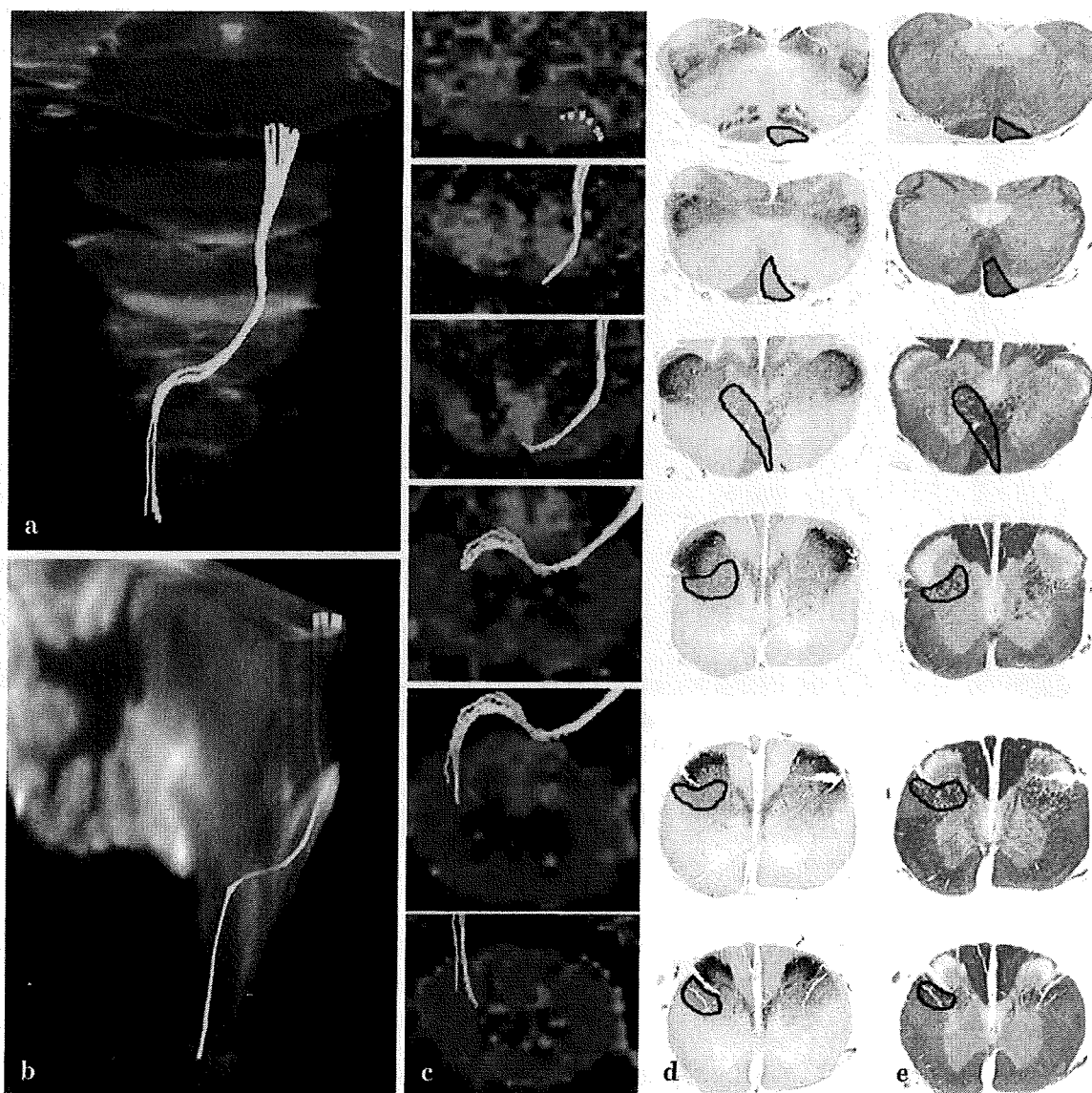


図 6 マーモセット錐体交叉における DTT (文献7より引用)

われわれは、皮質脊髄路の唯一の解剖学的特徴である延髄錐体交叉の明瞭な DTT を描出することに成功した (a, b)。FA マップと DTT を superimpose した画像 (c) と CaMK II α 染色 (d)、LFB 染色 (e) を比較すると、描出したトラクトは確かに延髄で交叉し、対側の上位脊髄側索を下降していることがわかる。

腫瘍などにおける DTT の有用性も同時に検討しているところである。頸部の症例に限局している

のは、体幹部では高分解能の画像を得にくく、詳細な解析が困難だからである。今後、MRI におけ

注4) b とは b value (b 値) のことで、DWI における拡散の設定に関する値である。b value は磁気回転比を γ (MHz)、MPG の大きさを G (mT/m)、MPG の印加時間を δ (msec)、1 対の傾斜磁場のそれぞれの始まりの時間を Δ (msec)、とすると以下の式で表される。

$$b = \gamma^2 G_x^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

つまり、b value は拡散の程度を表す指標であ

り、b value が高いほうがより拡散を強調していることになる。本稿でわれわれが得ている DTT は $b=1,000$ で撮影している。これに対し、high b value とは b を 2,500 以上に上げることで、従来の DWI ではとらえることができなかった細胞内の拡散や、複雑な神経走行の拡散を検出することが可能となる。

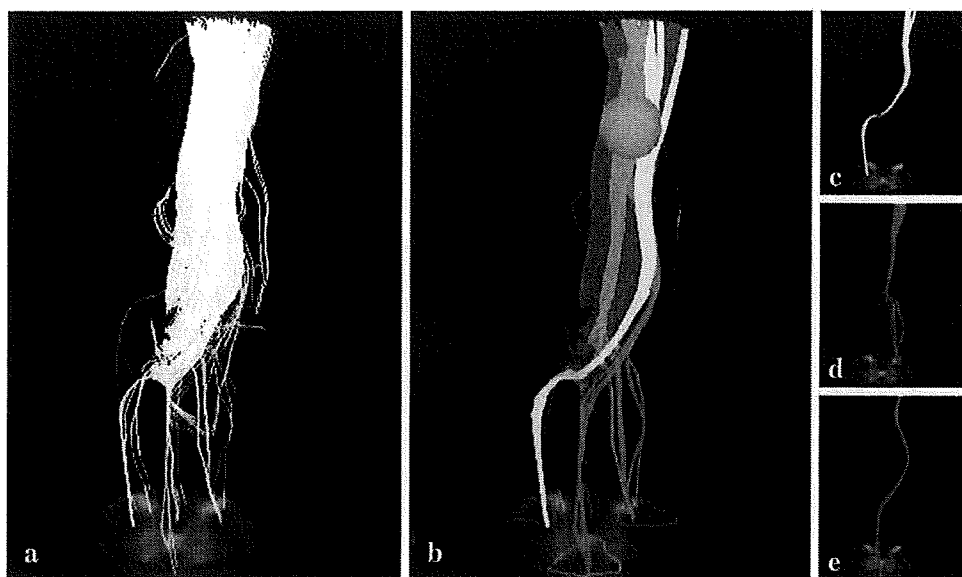


図 7 マーモセット延髄における皮質脊髄路の DTT (文献 7 より引用)
延髄錐体部における皮質脊髄路は 90% が錐体交叉を通るが (c), 数% は同側の側索を下降する線維 (赤, d) や, 対側の前索を下降する線維 (青, e) が存在することが知られている. DTT はどの経路も明瞭に描出した (b~e). これらの画像は上位と下位の 2 カ所に ROI を設定することにより描出した. 本結果は DTT がある程度の信頼性をもって投射路を描出できることを示唆している.

るハードとソフトの開発が進み, 撮影時間の長さや解像度の問題は克服されていくことを期待する一方, 解剖構造的な情報であるトラクトに機能的な情報を付加することによって, さらに脊髓疾患の病態に迫れると考えている.

文 献 (太字番号は重要文献)

- 1) 青木茂樹, 阿部 修, 増谷佳孝 (編): 新版 これぞわかる拡散 MRI. 学研メディカル秀潤社, 2005
- 2) Basser PJ, Jones DK: Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis—a technical review. *NMR Biomed* 15: 456-467, 2002
- 3) Burdette JH, Elster AD, Ricci PE: Acute cerebral infarction: quantification of spin-density and T2 shine-through phenomena on diffusion-weighted MR images. *Radiology* 212: 333-339, 1999
- 4) Burdette JH, Ricci PE, Petitti N, et al: Cerebral infarction: time course of signal changes on diffusion-weighted MR images. *AJR Am J Roentgenol* 171: 791-795, 1998
- 5) Ducreux D, Lepeintre JF, Fillard P, et al: MR diffusion tensor imaging and fiber tracking in 5 spinal cord astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 27: 214-216, 2006
- 6) Facon D, Ozanne A, Fillard P, et al: MR diffusion tensor imaging and fiber tracking in spinal cord compression. *AJNR Am J Neuroradiol* 26: 1587-1594, 2005
- 7) Fujiyoshi K, Yamada M, et al: *In vivo* tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 27: 11991-11998, 2007
- 8) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80: 182-190, 2005
- 9) Iwanami A, Yamane J, Katoh H, et al: Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate: the common marmoset. *J Neurosci Res* 80: 172-181, 2005
- 10) Kamada K, Todo T, Masutani Y, et al: Combined use of tractography-integrated functional neuronavigation and direct fiber stimulation. *J Neurosurg* 102: 664-672, 2005
- 11) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al: MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161: 401-407, 1986
- 12) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al: Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology* 168: 497-505, 1988
- 13) Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, et al: Diffusion tensor imaging concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 13: 534-546, 2001
- 14) Le Bihan, D, van Zijl P: From the diffusion coefficient

- to the diffusion tensor. *NMR Biomed* 15 : 431-434, 2002
- 15) Maier SE, Mamata H : Diffusion tensor imaging of the spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 1064 : 50-60, 2005
 - 16) Masutani Y, Aoki S, Abe O, et al : MR diffusion tensor imaging : recent advance and new techniques for diffusion tensor visualization. *Eur J Radiol* 46 : 53-66, 2003
 - 17) Mori S, Zhang J : Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 51 : 527-539, 2006
 - 18) Mori S, van Zijl PC : Fiber tracking : principles and strategies—a technical review. *NMR Biomed* 15 : 468-480, 2002
 - 19) Pajevic S, Pierpaoli C : Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data : application to white matter fiber tract mapping in the human brain. *Magn Reson Med* 42 : 526-540, 1999
 - 20) Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R, et al : Association fibre pathways of the brain : parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130 : 630-653, 2007
 - 21) Takagi T, Nakamura M, Yamada M, et al : Visualization of peripheral nerve degeneration and regeneration : monitoring with diffusion tensor tractography. *Neuroimaging* 44 : 884-92, 2009
 - 22) Tsuchiya K, Fujikawa A, Suzuki Y : Diffusion tractography of the cervical spinal cord by using parallel imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 26 : 398-400, 2005
 - 23) Tuch DS, Reese TG, Wiegell MR, et al : Diffusion MRI of complex neural architecture. *Neuron* 40 : 885-895, 2003
 - 24) Yamashita T, Kwee TC, Takahara T : Whole-body magnetic resonance neurography. *N Engl J Med* 361 : 538-539, 2009

ご 案 内

第 49 回 日本小児股関節研究会

- 会 期 2010 年 6 月 11 日 (金)～12 日 (土)
- 会 長 金 郁 喆 (京都府立医科大学大学院医学研究科運動器機能再生外科学 准教授)
- 会 場 京都府立医科大学合同講義棟図書館ホール (〒 602-0857 京都市上京区清和院口寺町
東入ル中御霊町 410)
- テーマ 小児股関節疾患のこども達に確かな歩みを
- プログラム ・セミナー・特別講演 (予定)
- よい胎教・出産・乳幼児育児 柴田美智子
 - 胎児の超音波診断 岩破一博 (京都府立医科大学産婦人科学教室)
 - ・主題・パネルディスカッション
 - 先天性股関節脱臼の予防活動—過去・現在・未来
 - Rb 法でペルテス様変化をきたした症例の検討
 - ペルテス病の治療・予後判定法
 - 診断・治療に難渋している症例の検討
 - ・一般口演
 - ・症例検討
- 演題募集 主題・パネルディスカッション, 一般口演, 症例検討について, ウェブサイトのみ
で募集します。
- 応募資格 日本小児股関節研究会の会員。非会員の場合には入会後
- 参加登録 当日に会場での参加登録
- ウェブサイト <http://phip49.jtbcom.co.jp/>
- 問合せ先 第 49 回日本小児股関節研究会運営事務局
(株) ジェイコム コンベンション事業本部内
〒 530-0001 大阪市北区梅田 2-2-22 ハービス ENT 11 階
TEL : 06-6348-1391, FAX : 06-6456-4105
E-mail : phip49@jtbcom.co.jp