

図3 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復 (文献9より引用・改変)

- a. Basso mouse scaleによる後肢機能評価。当研究室でのES細胞を用いた研究において、一次ニューロスフェア(primary neurosphere: PNS, 胚様体形成を経て誘導されたニューロスフェア, 多くがニューロンに分化する)は脊髄損傷モデルマウスへの治療効果が無いこと、また、PNSを一度継代した二次ニューロスフェア(SNS: secondary neurosphere, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの三系統への分化傾向を有する)は脊髄損傷モデルへの治療効果を有することが示されている(30)。
- iPS細胞由来SNS移植群において、ES細胞由来SNS移植群と同等に後肢機能が回復する。一方、iPS細胞由来PNS移植群においては、ES細胞由来PNS移植時と同様に機能回復はみられない。
- b. 損傷脊髄のLFB染色。iPS細胞由来SNS移植群において、髄鞘化領域(青色の部位)が、コントロール群と比較して有意に保たれている。
- c. 移植されたiPS細胞由来SNS(RFP⁺)は成熟オリゴデンドロサイト(MBP⁺)へと分化し、ホストの神経線維(NF200KD⁺)を再髄鞘化する。
- d. iPS細胞由来SNSは、MBP-nullであるShivererマウス(ミエリン形成不全)の損傷脊髄内で、MBP⁺の成熟オリゴデンドロサイトに分化する。
- e. Shivererマウスの損傷脊髄の電子顕微鏡画像。移植したiPS細胞由来SNSによる髄鞘化がみられる。

であることがわかる。iPS細胞は簡便に多くの株を樹立できるというのが利点であるが、その一方で株間の質の差が大きいということも明らかになりつつある。安全性を事前に厳密に評価して用いれば、脊髄損傷治療への応用が期待できる。今後、簡便に質の良い株を選別できるようなスクリーニング系の確立が重要となってくるだろう。また、実際に脊髄損傷の患者さんへと移植する前に、前臨床試験として霊長類を用いた実験¹⁰⁾が必須であると言えよう。今後厳密な安全性の評価を経た後、脊髄損傷に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植が早期に実現するよう願ってやまない。

参考文献

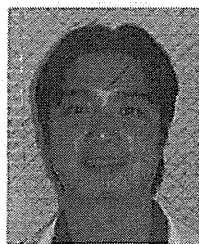
1) Miura K, Okada Y, Aoi T, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009;27:743-5.
 2) Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's

disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5856-61.
 3) Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, *et al.* Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6:e1000029.
 4) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
 5) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.
 6) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;322:949-53.
 7) Zhou H, Wu S, Joo JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:381-4.
 8) Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;2:525-8.
 9) Tsuji O, Miura K, Okada Y, *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.
 10) 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* 2005;80:172-81.

3 iPS細胞を用いた 脊髄再生医療の最前線

- | | | | |
|--------|------|--------|------|
| こばやし | よとおみ | のり | ざとし |
| ■ 小林喜臣 | 1) | ・海苔 聡 | 1) |
| やすだ | あきまさ | おかだ | ようへい |
| 安田明正 | 1) | ・岡田洋平 | 2) |
| ふじよし | かねひろ | つじ | おさひこ |
| 藤吉兼浩 | 3) | ・辻 収彦 | 1) |
| とやま | よしあき | なかむら | まさや |
| 戸山芳昭 | 1) | ・中村 雅也 | 1) |
| おかの | ひでゆき | | |
| 岡野 栄之 | 2) | | |

- 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教室
3) 独立行政法人国立病院機構村山医療センター



小林 喜臣
2004年慶應義塾大学医学部卒業。'06年初期臨床研修終了。同年慶應義塾大学医学部整形外科学教室入局。'09年慶應義塾大学医学部医学研究科博士課程専攻。研究テーマはヒトiPS細胞由来神経幹細胞による脊髄損傷に対する治療の検討。

Key words: 脊髄損傷, 人工多能性幹 (iPS) 細胞, 神経幹/前駆細胞, 胚性幹 (ES) 細胞, 細胞移植

Abstract

脊髄損傷は外傷などにより脊髄実質が損傷を受けることで、損傷部以下の知覚・運動・自律神経系の麻痺を呈する病態である。'生体哺乳類の中樞神経系は一度損傷を受けると再生しない' という通説が長く信じられてきたが、近年の神経科学、特に stem cell biology の著しい進歩により脊髄再生への期待が高まっている。本稿では、これまで行われてきた脊髄損傷に対する細胞移植研究を中心に脊髄再生の基礎研究の現状とその課題について概説し、最後に iPS 細胞関連の研究における問題点と今後の展望について言及する。

はじめに

脊髄損傷は、損傷部以下の知覚・運動・自律神経系の麻痺を呈する病態である。集学的医療の進歩により脊髄損傷患者の平均余命は健常人と変わらなくなってきたが、損傷した脊髄そのものを治すことはいまだできないため、日常生活の不自由さや精神的負担が長期間にわたり患者を苦しめる結果となり、社会的問題となっている。しかし基礎研究では1990年代に、ラット

脊髄損傷に対するマウス ES 細胞由来神経前駆細胞移植の有効性が報告され、損傷した脊髄でも微小環境を整えば再生することが示され、'中枢神経系は一度損傷を受けると再生しない' という通説が覆された¹⁾。

中枢神経系の再生医学の戦略は、神経栄養因子や軸索伸展阻害因子の阻害剤²⁾などを組み合わせた細胞移植療法以外の治療法と神経幹細胞・ES細胞・iPS細胞などを用いた細胞移植療法の2つのアプローチに大別される³⁾。これらの方法を組み合わせた治療を行うことで、損傷された神経組織を再生し機能を回復させることができれば、脊髄損傷の治療に新たな可能性が開けてくるであろう。本稿では現在再生医療における移植細胞の供給源として注目されている神経幹細胞・ES細胞・iPS細胞を中心にその移植療法について概説する。

1. 細胞移植療法

われわれは細胞移植の時期として脊髄損傷後9日目を至適時期と考えている。これは、急性炎症が沈静化した時期でかつグリア瘢痕が

Cell therapy for spinal cord regenerative medicine using induced pluripotent stem cells. : Yoshiomi Kobayashi¹⁾, Satoshi Nori¹⁾, Akimasa Yasuda¹⁾, Youhei Okada²⁾, Kanehiro Fujiyoshi³⁾, Osahiko Tsuji¹⁾, Yoshiaki Toyama¹⁾, Masaya Nakamura¹⁾, Hideyuki Okano²⁾, 1) Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, 2) Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 3) National Hospital Organization Murayama Medical Center

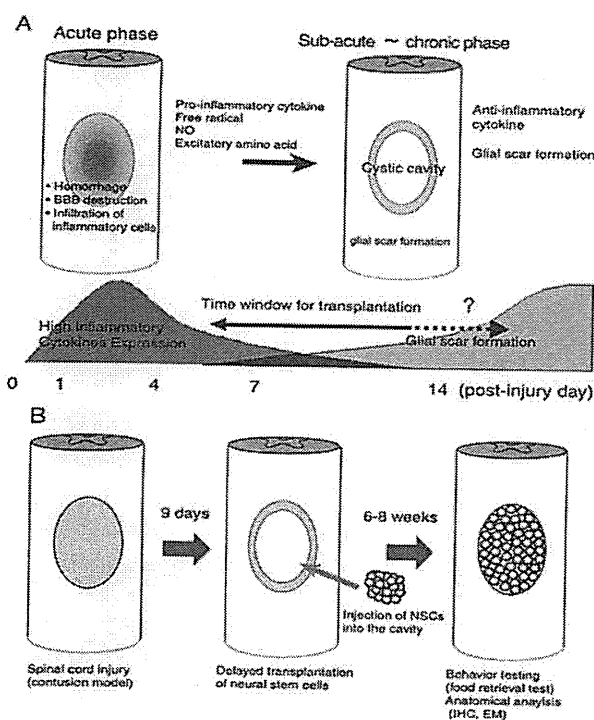


図1 脊髄損傷後の損傷部の微小環境の変化及び移植に至適な time window。われわれは急性炎症が沈静化した時期かつグリア瘢痕が完全に形成される慢性期まで至らない時期である脊髄損傷後9日目が細胞移植の至適時期として考えている⁹⁾。

完全に形成される慢性期まで至らない時期であり、移植細胞の生着率の上昇や neuron や oligodendrocyte への分化が起こるタイミングと考えているからである⁹⁾ (図1)。

移植に使用する神経幹細胞の選択的培養としては、Weiss らによって開発された Neurosphere 法⁹⁾ が使われることが多い。この方法は、胎生期の中枢神経系より採取した神経幹細胞を含む細胞群を分離した後に非接着性培養皿で EGF (epidermal growth factor) や FGF2 (fibroblast growth factor 2) の存在する無血清培地により培養する方法で、さまざまな細胞群の中に含まれている神経幹細胞が増殖因子に反応して、選択的に浮遊した状態で増殖し Neurosphere と呼ばれる細胞塊を形成する。

これらの細胞塊を分離し、同様の条件で培養すると再び Neurosphere が形成され、継代を

繰り返しても同様に Neurosphere が形成される (自己複製能)。これらの細胞は、接着培地皿上で、培地から増殖因子 (EGF, FGF2) を除くと neuron, astrocyte, oligodendrocyte に分化する (多分化能)。ES 細胞, iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導と継代は、当研究室で確立された独自の Neurosphere 法を用いている⁹⁾。

2. 神経幹細胞

神経幹細胞は未分化な状態を保ったまま増殖し継代することができる '自己複製能' と中枢神経系を構成する neuron, astrocyte, oligodendrocyte の3種類の細胞に分化することができる '多分化能' を併せ持つ細胞と定義される。成体中枢神経系における神経幹細胞の局在は側脳室に面する脳室下層や脊髄中心管周囲であることが示唆されている。われわれは、自己複製能と多分化能を兼ね備えた胎児由来神経幹/前駆細胞 (Neural stem/precursor cell, 以下 NS/PC) に着目し、ラット NS/PC をラット損傷脊髄に、さらにヒト NS/PC をサル (コモンマモセット) 損傷脊髄へと移植を行い、運動機能評価および組織学的評価において良好な結果を報告してきた¹⁰⁾。

いずれも、運動機能の回復および組織学的評価において良好な結果が得られたことから、胎児/胎児由来 NS/PC は脊髄損傷治療に非常に有用な移植細胞と考えてきた。2011年には米国において、stem cell 社の胎児由来 NS/PC を用いた損傷後6週以降の胸髄損傷に対する clinical trial (phase I / II) が FDA により認可され世界で大きな注目を集めている。しかし、中絶胎児からの細胞採取が必要となるため、倫理的観点から現時点では我が国において臨床応用の実現は不可能と言わざるを得ない。

3. ES 細胞

1981年にマウス胚盤胞期の受精卵から樹立された ES 細胞は多分化能と自己複製能を持ち世

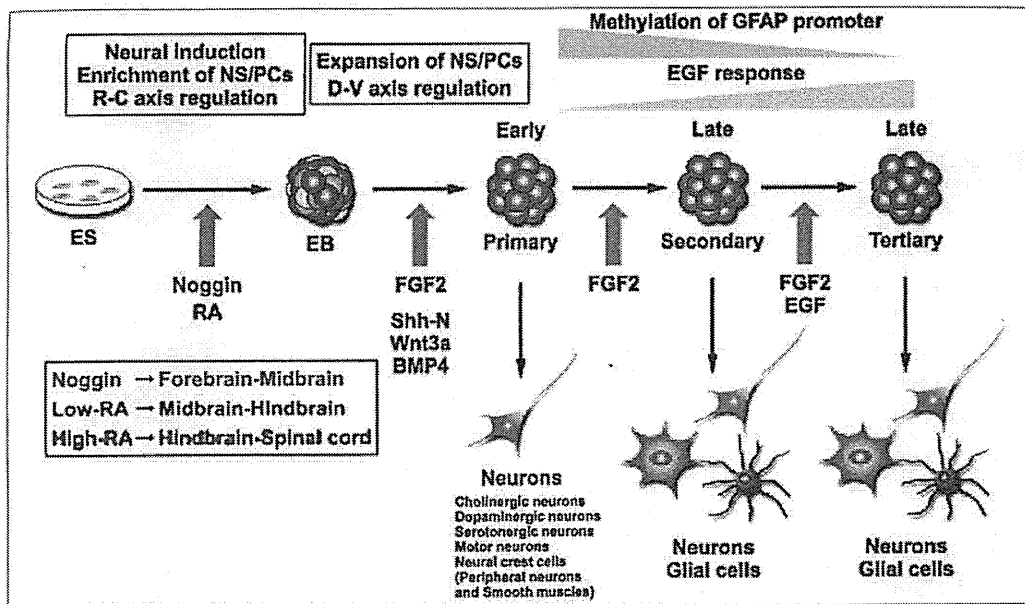


図2 マウス ES 細胞由来神経幹細胞 (neurosphere) による神経発生モデルシステム。ES 細胞から胚葉体 (embryoid body: EB) を形成したのち神経系に誘導をかけ neurosphere を形成する⁹⁾。

界に衝撃を与えた。1998 年に ES 細胞がヒト胚から作られて以来、ES 細胞は細胞移植の重要なソースとして認識されるようになった。

McDonald らはマウス ES 細胞をレチノイン酸で神経幹細胞に分化誘導したのち、ラット損傷脊髄内に移植した。移植後 2 週に移植細胞は neuron, astrocyte, oligodendrocyte へ分化し、5 週間には後肢運動機能が改善したと報告した⁹⁾。2005 年には Keirstead らがヒト ES 細胞から高純度へ誘導した oligodendrocyte 前駆細胞のラット脊髄損傷モデルへの移植で、損傷脊髄内で脱髄した軸索の再髄鞘化と後肢の機能回復を報告している¹⁰⁾。

当研究室の岡田らは、発生より早い時期に存在する内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) に由来する ES 細胞を用いて、高い可塑性を有する神経幹細胞を誘導するシステムを構築した⁹⁾。まず ES 細胞から未分化状態を維持するために必要な白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor: LIF) を取り除き、胚葉体 (embryoid body: EB) を形成し、その後神経系への誘導をかけ neurosphere を形成するシステムである (図 2)。

この方法で形成された primary neurosphere は secondary, tertiary neurosphere (以下 PNS, SNS, TNS) に継代していくことが可能である。また、これらの neurosphere を分化誘導することで得られる細胞は PNS からはほとんどの細胞が neuron であるが、SNS, TNS からは neuron のみならず、astrocyte や oligodendrocyte といった glia 細胞が誘導される (図 3)。

この知見をもとに、当研究室の熊谷らはマウス ES 細胞を PNS および一度継代した SNS を脊髄損傷モデルマウスに移植を行い運動機能の改善を確認している。組織学的評価でも、*in vitro* の実験結果と同様に PNS 移植群では neuron 優位の分化傾向、SNS 移植群では astrocyte や oligodendrocyte といった glia 優位の分化傾向を示し、さらに SNS 移植群では軸索の成長、再髄鞘化、血管新生を認めた。運動機能評価でも SNS 移植群は PNS 移植群に比べ有意に改善していた¹⁰⁾。このことは脊髄損傷後の機能回復に gliogenic な NS/PC がより効果的であり、機能回復のメカニズムを解く重要な知見である (図 4)。

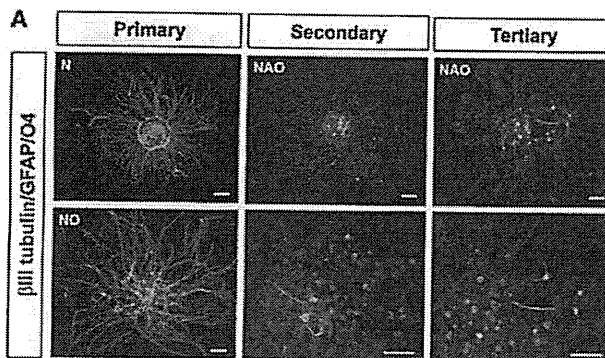


図3 ES細胞由来 primary neurosphere, secondary neurosphere, tertiary neurosphere の分化傾向の変化。分化した細胞の免疫染色像: β III tubulin は neuron, GFAP は astrocyte, O4 は oligodendrocyte。PNS では neuron 優位であるが, SNS, TNS に継代するにつれて astrocyte, oligodendrocyte への分化傾向が出現する⁶⁾。

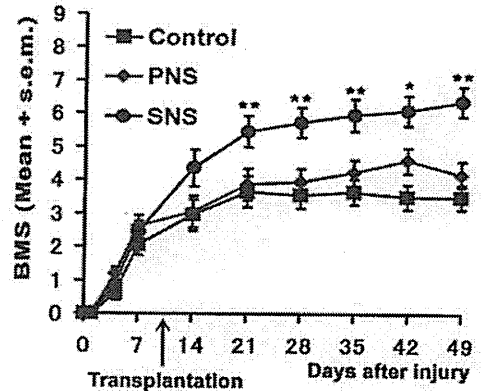


図4 脊髄損傷モデルマウスに対するマウスES細胞由来 neurosphere 移植後の運動機能評価。PNS 移植群に比べ SNS 移植群は優位に運動機能の改善を認めた。

4. iPS 細胞

先述のように、胎児由来 NS/PC, ES 細胞由来 NS/PC は共に脊髄損傷の治療において有用な細胞となり得るが、中絶胎児組織や受精卵を破壊するため、臨床応用に際し、倫理的問題及び免疫学的拒絶反応の問題を避けられない。

このような問題点を解決するのが、2006年、2007年に京都大学の山中教授らにより、マウス及びヒト線維芽細胞より樹立された iPS 細胞である^{11) 12)}。iPS 細胞は、マウス及びヒト線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc の3または4因子を導入することで体細胞をリプログラミングし、ES 細胞に類似した増殖能・分化能をもつ多能性幹細胞であり、自家組織が細胞の供給源となり得るためこれらの問題が解決できる。

当研究室では、マウス ES 細胞の NS/PC への誘導培養法⁶⁾ をマウス iPS 細胞¹³⁾ に応用し、neuron, astrocyte, oligodendrocyte への分化を確認した。脊髄損傷に対するマウス ES 細胞由来 NS/PC の治療効果を既に確認していたことから、iPS 細胞でも同様の効果が期待できる。しかし、iPS 細胞における最も大きな問題である

移植細胞による腫瘍化の検討が重要と考え、以下の研究を行った。

京都大学の山中研と当研究室の共同研究で、三浦らは胎仔マウス線維芽細胞 (MEF)、成体マウスの尾部由来線維芽細胞 (TTF)、肝細胞 (Hep)、胃上皮細胞 (Stm) に4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) または c-Myc (c-Myc の再活性化が腫瘍形成の一因として確認されている) を除く3因子を導入し、Nanog (未分化細胞のマーカー) 発現を指標とした細胞選択の有無の条件下 iPS 細胞を樹立した。それぞれの細胞から樹立された iPS 細胞由来の SNS を免疫不全マウスの脳に移植し腫瘍形成や腫瘍の大きさを指標に安全性を検証し、MEF や Stm は ES 細胞由来 SNS と同等の安全性を担保したが TTF 由来 iPS 細胞からの SNS では、分化抵抗性細胞の存在による奇形種の形成率が高いことを示した¹⁴⁾。これらの結果は、iPS 細胞を用いた細胞療法における細胞株選択の重要性を示し、その臨床的意義は大きいと考えている。

そこで当研究室の辻らは、マウス脊髄損傷モデルに対するマウス MEF 由来 iPS 細胞から分化誘導した NS/PC の移植実験を行った¹⁵⁾。雌の8週齢 C57Bl6/J マウスを用いて、第10胸椎

高位に I-H impactor を用いて圧挫損傷を作製し、損傷後9日目に 5×10^5 個の細胞を損傷中心部へ移植した。移植細胞の生存をルシフェラーゼ発光によるバイオイメージングを用いて経時的モニタリングするために、移植前にホタル発光酵素ルシフェラーゼの一種である CBRluc 遺伝子と、赤色蛍光タンパク質遺伝子 mRFP を移植細胞に導入した。損傷後6週間の機能評価を行い、その後組織学的に検討した。その結果、移植細胞はバイオイメージングを用いた定量的評価により、移植後5週の時点で約20%が生着しており、明らかな発光量の増大は認めず、組織学的検討でも腫瘍形成を認めなかった。移植細胞はHu陽性の neuron, GFAP陽性の astrocyte, GST- π 陽性の oligodendrocyte へと分化しており、分化効率はそれぞれ neuron が約30%, astrocyte が約50%, oligodendrocyte が約15%であった。マウスの後肢運動機能を Basso Mouse Scale (以下 BMS) を用いた運動機能評価では、iPS 細胞由来 NS/PC 移植群はマウス ES 細胞由来 NS/PC 移植群とほぼ同等の回復を示し、後肢で体幹を支持しながら歩行できるまでに改善していた。

一方、培養液のみを注入した vehicle control 群では後肢で体幹を支持できなかった。以上より、iPS 細胞由来 NS/PC 移植により有意な下肢運動機能回復が得られることが明らかとなった。移植された iPS 細胞由来 NS/PC が MBP 陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた (図5)。LFB 染色でも損傷部髄鞘面積が vehicle control 群と比較して、iPS 細胞由来 NS/PC 移植群で有意に増加していた。また、移植細胞が双極性の突起を持つ幼若 astrocyte へと損傷脊髄内で分化し、軸索再生のガイドランスとして働いた可能性が考えられた。事実、この幼若 astrocyte の近傍に運動機能に大きな役割を持つとされる 5-HT 陽性の縫線核脊髄路神経線維が多数存在しており、損傷部から 4 mm 遠位部での定量で 5-HT 陽性線維は、移植群において有意に増加していた¹⁹⁾。以上の結果より、移植細胞による再髄鞘化と縫線核脊髄路神経線維への glial support が、iPS 由来

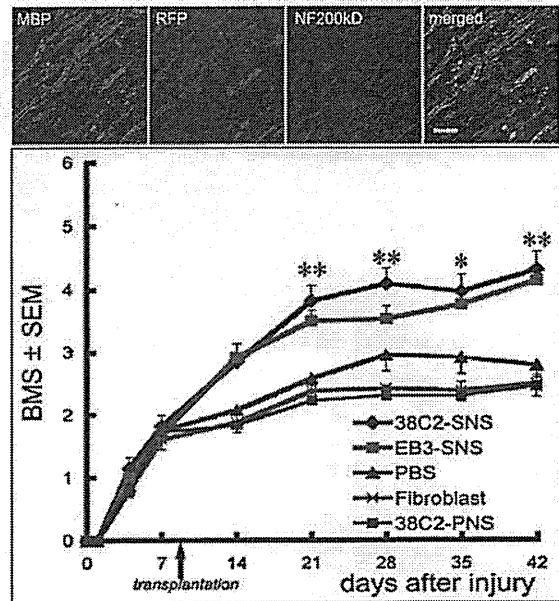


図5 脊髄損傷モデルマウスに対するマウス iPS 細胞由来 neurosphere 移植後の運動機能評価。移植された iPS 細胞由来 NS/PC が MBP 陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化し、有意な下肢運動機能回復が得られた。

NS/PC 移植による後肢機能回復の主なメカニズムであることが示唆された。

おわりに

iPS 細胞の樹立は、自己由来の多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の実現に向けた大きな一歩となった。しかし脊髄損傷に対する iPS 細胞を用いた細胞移植治療を実現するためには、前述の腫瘍化の問題など解決すべき課題は多い。iPS 細胞の樹立方法は近年急速に研究が進展し、レトロウイルスまたはレンチウイルスを用いずに、プラスミドベクターを用いた方法¹⁶⁾、トランスポゾン的一种である Piggy Bac を用いた手法^{17) 18)}、染色体外挿入し消滅するエピソームベクターの導入¹⁹⁾、プラスミドベクターよりも長期間の発現が可能である minicircle vector²⁰⁾、薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功^{21) 22)} など報告が相次いでいる。また培養

法においても、動物種由来の血清やフィーダー細胞を用いずに iPS 細胞を樹立する方法も報告された²³⁾。さらにマウス線維芽細胞から 1 週間程度で iPS 細胞へのリプログラミングを介さずに誘導した神経細胞である iN 細胞も報告された²⁴⁾。しかし、これらの方法で作製された iPS 細胞由来 NS/PC が、前述したレトロウイルスで作製された iPS 細胞由来 NS/PC と同等の多分化能と自己複製能を有しているか、移植細胞として安全性が高いのかなどについては、免疫不全動物への移植実験を経て今後詳細に評価する必要がある。iPS 細胞を用いた脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて、安全性を慎重に評価しつつ、その有効性を検討していくことで、近い将来脊髄損傷の麻痺に苦しむ多くの患者に希望の光を投げかけられるものと確信している。

文献

- 1) McDonald J.W, X.Z. Liu, Y. Qu, *et al.* Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999 ; 5(12) : 1410-2.
- 2) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, *et al.* A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med.* 2006 ; 12(12) : 1380-9.
- 3) Barnabe-Heider F and J. Frisen. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell*, 2008 ; 3(1) : 16-24.
- 4) Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2002 ; 69(6) : 698-707.
- 5) Reynolds B.A. and S. Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992 ; 255(5052) : 1707-10.
- 6) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, *et al.* Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 2008 ; 26(12) : 3086-98.
- 7) 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.* 2002 ; Res.69(6) : 925-33.
- 8) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, *et al.* Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res.* 2005 ; 80(2) : 182-90.
- 9) Keirstead H.S, *et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005 ; 25(19) : 4694-705.
- 10) Kumagai G, *et al.* Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. in *PLoS ONE.* 2009 ; 4(11) : e7706.
- 11) Yamanaka S. and Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2006 ; 51(15) : 2346-51.
- 12) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 ; 131(5) : 861-72.
- 13) Okita K, *et al.* Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007 ; 448(7151) : 313-7.
- 14) Miura K, Okada Y, Aoi T, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 2009 ; 27(8) : 743-5.
- 15) Tsuji O, *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 ; 107(28) : 12704-9.
- 16) Okita K, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008 ; 322(5903) : 949-53.
- 17) Woltjen K, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009 ; 458(7239) : 766-70.
- 18) Kaji K, *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* 2009 ; 458(7239) : 771-5.
- 19) Yu J, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009 ; 324(5928) : 797-801.
- 20) Jia F, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods.* 2010 ; 7(3) : 197-9.
- 21) Maherali N, and Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol.* 2009 ; 19(20) : 1718-23.
- 22) Zhou H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009 ; 4(5) : 381-4.
- 23) Hayashi Y, *et al.* Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS ONE.* 2010 ; 5(11) : e14099.
- 24) Vierbuchen T, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010 ; 463(7284) : 1035-41.

iPS 細胞由来神経幹細胞移植による脊髄損傷治療

海 苔 聡^{*1)} 辻 収彦^{*1)} 戸山 芳昭^{*1)}
岡野 栄之^{*2)} 中村 雅也^{*1)}

はじめに

20世紀初頭にスペインの神経解剖学者 Ramon y Cajal が「成体哺乳類の中樞神経系は一度損傷を受けると再生しない」と述べて以来、このことが長い間定説として信じられてきたが、1992年に Weiss ら¹⁾により神経幹細胞が同定されると、その増殖能・分化能を生かして神経変性疾患や神経損傷において失われた神経細胞や組織を再生しようという試みがなされてきた。また1999年には、McDonald ら²⁾によりマウス胚性幹細胞(以下ES細胞)由来神経幹細胞移植の脊髄損傷への有効性も報告され、幹細胞移植による脊髄損傷治療の機運が高まった。

しかし、これらの研究で使用されている移植細胞の多くは胎児組織由来の幹細胞であり、倫理的問題から臨床応用が困難であった。

そのような状況の中、2006年に京都大学の山中伸弥教授らにより iPS 細胞が世界で初めて報告された³⁾。iPS 細胞は体細胞に *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の初期化遺伝子を導入することにより、体細胞をリプログラミングして作製された人工多能性幹細胞である。iPS 細胞は成体組織から樹立が可能であるため、倫理的問題を克服できる可能性が高く、将来の臨床応用が期待されている。

本稿では、iPS 細胞の安全性および脊髄損傷に対する有効性についての最近の知見を解説し、再生医療への応用について概説する。

マウス iPS 細胞の安全性についての検討

われわれは、マウス iPS 細胞の神経幹細胞への誘導培養法を独自に開発した。この方法は LIF を取り除いて未分化 iPS 細胞の浮遊培養を行い、胚様体(embryoid body; EB)を形成させ、その

後神経幹細胞を多く含む neurosphere を得る方法である。まず安全性を確認するために、36 clone のマウス iPS 細胞由来 neurosphere を用いて、それぞれを免疫不全マウス(NOD-scid マウス)の線条体に移植した。その結果、樹立に用いる細胞が胎仔由来のものであるか、成体由来のものであるかによって腫瘍形成能は最も強く規定されており、成体組織由来 iPS 細胞はより腫瘍形成しやすいことが判明した。また、neurosphere まで分化誘導させた際に残存する未分化細胞の比率が高いと腫瘍形成が起こりやすいことも判明した⁴⁾。すなわち、将来の臨床応用を想定すると、成人体細胞から iPS 細胞を樹立して移植療法を行う場合は、移植前に十分な安全性の検討が重要であることが示唆された。

成体組織由来の“安全な” iPS 細胞と“危険な” iPS 細胞を用いた損傷脊髄への移植実験

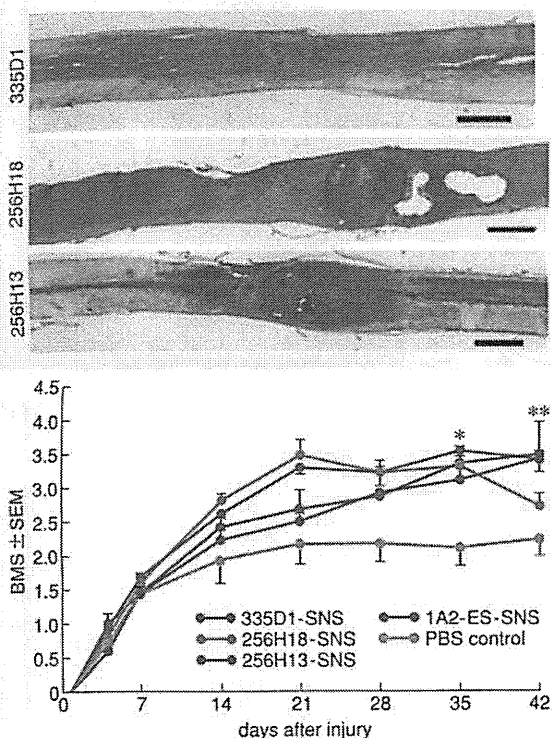
われわれは将来の臨床応用を考えて、成体組織(TTF; tail tip fibroblast)由来の iPS 細胞を用いて移植実験を行った。TTF 由来 iPS 細胞のうち、安全性が確認できた 335D1 と腫瘍形成が認められた“危険な”256H13 と 256H18 の3つの clone をそれぞれ neurosphere へと誘導し⁴⁾、マウス脊髄損傷モデルに移植を行った。下肢運動機能評価を Basso Mouse Scale で経時的に観察した。

その結果、全ての clone 由来の neurosphere 移植後に下肢運動機能の回復が得られたものの、“危険な”clone 由来の neurosphere 移植群においては、下肢運動機能が脊髄損傷後6週の時点で突然低下した。組織学的解析を行うと、脊髄内で巨大な奇形腫を形成していることが判明した。一方で“安全な”335D1 由来 neurosphere を移植した全てのマウスで腫瘍形成を認めず、ES 細胞由来 neurosphere と同等の下肢運動機能の回復が確認された(図1)。335D1 由来神経幹細胞は移植後に Hu 陽性の neuron, GFAP 陽性の astrocyte, GST- π 陽性の oligodendrocyte へと分化しており、

*1) Satoshi NORI et al, 慶應義塾大学医学部, 整形外科科学教室

*2) Hideyuki OKANO, 同上, 生理学教室

図1 TTF-iPS細胞由来neurosphere移植後の組織像と下肢運動機能評価〔文献5〕を改変

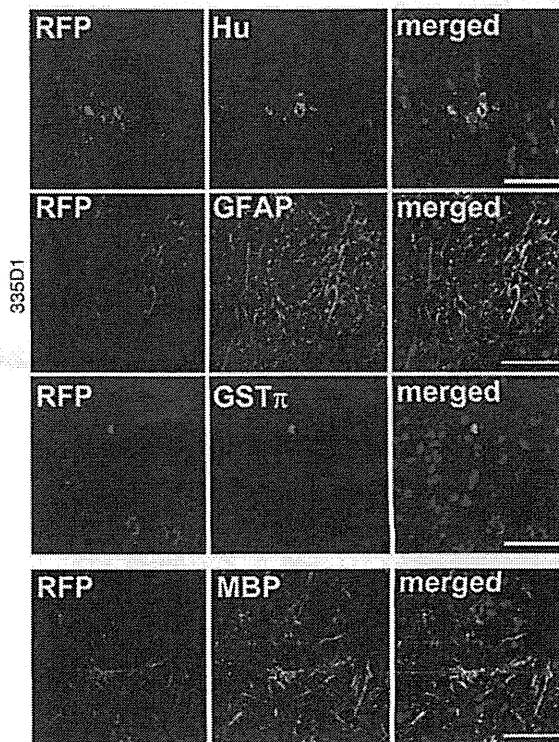


移植細胞がMBP陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた(図2)。このことより、臨床応用可能な成体組織由来のiPS細胞は胎仔組織由来のものと比較して危険性が高いものの、厳密にその安全性を検討すれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となることが示唆された⁵⁾。

おわりに

以上のように、iPS細胞は脊髄損傷に対する細胞移植療法の有力な細胞供給源となり得る大きな可能性を秘めている。最近、京都大学の山中教授らにより発表された「iPS細胞の作製効率のみならず安全性も飛躍的に向上させる Glis1 遺伝子の発見」は、iPS細胞の実用化を予感させる内容であり、世界中の幹細胞研究者を興奮させた⁶⁾。iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。脊髄損傷に対する幹細胞移植療法の確立という悲願に向かって、今後も研究を続けて行きたい。

図2 移植後マウス脊髄内でのiPS細胞由来神経幹細胞の分化〔文献5〕を改変



文献

- 1) Reynolds BA et al : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1170, 1992
- 2) McDonald JW et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410-1412, 1999
- 3) Takahashi K et al : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 4) Miura K et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 : 743-745, 2009
- 5) Tsuji O et al : Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 : 12704-12709, 2010
- 6) Maekawa M et al : Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474 : 225-229, 2011

脊髄再生関連

神経幹細胞の蛍光発光標識による
イメージングと応用脊髄損傷モデルでの移植細胞の Bioluminescence
Imaging高橋勇一朗*¹⁾ 岡野 栄之*²⁾ 戸山 芳昭*¹⁾
中村 雅也*¹⁾Fluorescence and Bioluminescence Imaging for Analysis of
Grafted Cells in Spinal Cord Injury ModelYuichiro TAKAHASHI*¹⁾, Hideyuki OKANO*²⁾, Yoshiaki TOYAMA*¹⁾,
Masaya NAKAMURA*¹⁾

臨整外 47 : 7~15, 2012

Key words : 脊髄損傷 (spinal cord injury), 細胞移植 (cell transplantation), 蛍光イメージング (bioluminescence imaging)

われわれは独自に開発した蛍光・発光蛋白質：ffLuc を用いて神経幹細胞を標識することで、移植された細胞を長期にわたり定量的かつ経時的に評価する bioluminescence imaging の系を確立した。これを応用して、脊髄損傷に細胞移植を行ううえで最も適切な移植方法を決めるために、マウス脊髄損傷モデルに対して神経幹細胞を3通りの投与方法で移植し、定量的に移植細胞の生着と分布を評価した。移植細胞の生着と安全性の面から、脊髄損傷への神経幹細胞の移植法で最もよい方法は髄内直接投与であることが明らかとなった。蛍光・発光レポーターとその解析法を応用することで、今後さらに脊髄損傷の病態や治療法が解明されることが期待される。

はじめに

細胞移植療法は脊髄損傷に対して臨床応用が期待されている治療法である。なかでも神経幹細胞 neural stem/progenitor cells (NS/PCs) は、これまでの研究結果から最も可能性の高い細胞と考えられている^{10,14)}。臨床応用において、細胞を損傷脊髄にどのように移植するかということは重要な問題であり、過去の研究では損傷脊髄への直接投与 intralésional (IL)、経くも膜下腔内投与 intrathecal (IT)、経静脈投与 intravenous (IV)

の3つの移植方法が用いられてきた。しかし、これまでに異なる投与方法による移植細胞の定量的および経時的な比較検討は行われていなかったため、細胞生着と安全性の点から、どの方法が最適であるのかは未解決の問題であった。われわれは独自に開発した蛍光・発光蛋白質を用いて NS/PCs を標識することで、移植された細胞を長期にわたり定量的かつ経時的に評価する系を確立した。これを応用して、脊髄損傷への NS/PCs 移植を行ううえで最も適切な移植方法を決めるために、マウス脊髄損傷モデルに対して NS/PCs を IL, IT, IV の3通りの投与方法で移植し、定量的

*¹⁾ 慶應義塾大学医学部整形外科 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Department of Orthopaedics Surgery, School of Medicine, Keio University

*²⁾ 慶應義塾大学医学部生理学 Department of Physiology, School of Medicine, Keio University

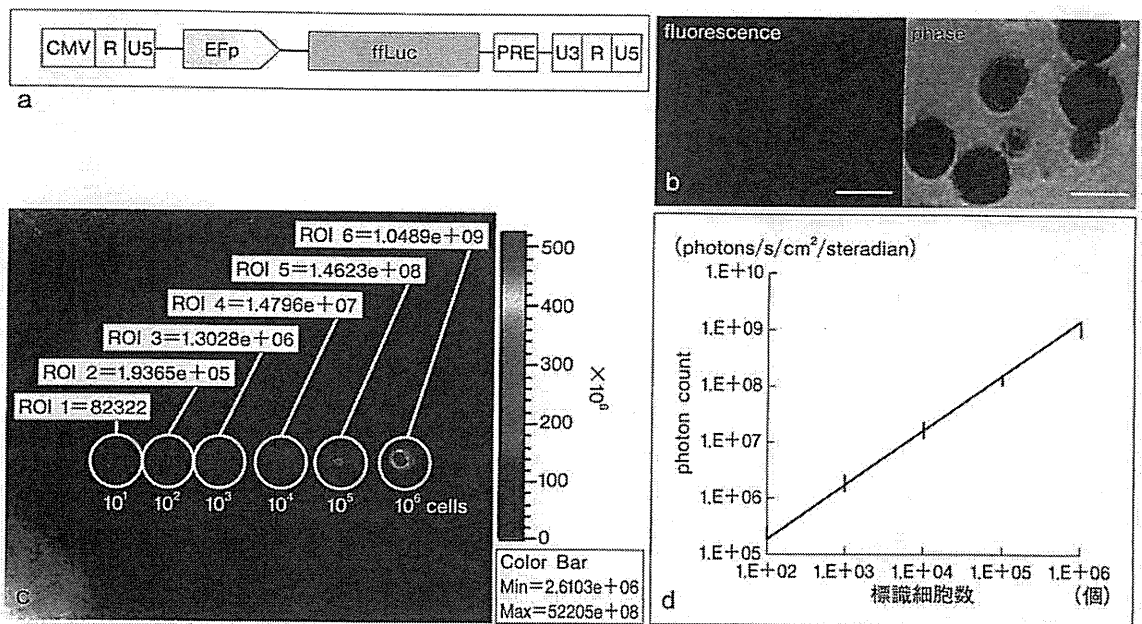


図1 蛍光・発光蛋白質 ffLuc による蛍光と発光

- a: ffLuc は elongation factor (EF)-1 α プロモーター下に発現する。
 b: ffLuc で標識された NS/PCs は蛍光(左)を発する。
 c: ffLuc で標識された NS/PCs は強い発光を生じる。
 d: *in vitro* の生体発光イメージング(BLI)で photon count (発光強度) と標識細胞数には正の相関がみられた。

に移植細胞の生着と分布を評価し、さらに細胞移植に伴う合併症(腫瘍形成や肺塞栓症)についても検討した¹⁹⁾。

蛍光発光蛋白質による NS/PCs の標識とイメージング

1. 蛍光発光レポーター

移植細胞として胎生 14 日目 C57BL/6J マウスの線条体由来の NS/PCs を neurosphere 法に準じて培養して使用した。移植細胞の標識は、EF1 α プロモーター下にわれわれが独自に開発した ffLuc (投稿中) を発現する新規融合レンチウイルスベクターを用いて行った(図 1-a)。ffLuc は Venus と Luc2 から構成されており、Venus は蛍光蛋白質 yellow fluorescence protein (YFP) の一種で、Luc2 はホタル由来発光酵素 luciferase である。この発光は luciferase が ATP と酸素を介して luciferin と反応することにより生じるので、生きている細胞のみを検出できる。この遺伝子ベクターの導入により、標識細胞は ffLuc を強く安定して発現することが可能となり、

luciferase による強い発光シグナルを生体発光イメージング bioluminescence imaging (BLI) として生きたままのマウス生体内でとらえることができる。さらに組織学的にも切片状で、移植細胞を green fluorescence protein (GFP) による蛍光シグナルとしてとらえることが可能となった(図 1-b, c)。

2. Bioluminescence imaging

BLI には Xenogen-IVIS 100 cooled CCD optical macroscopic imaging system (SC BioScience 社) を使用した¹⁹⁾。撮像した発光シグナルは photon count [photons/s/cm²/steradian] (あるいは photon-flux) として擬似カラーで表示される。この発光を定量的に解析するために、関心領域 (ROI) を同一部位に設定して各個体で測定した。*In vitro* での細胞数と BLI で測定された発光シグナルの関連を調べるために、標識された NS/PCs の細胞数をふって ($1 \times 10^2 \sim 10^6$ cells/ $10 \mu\text{l}$)、D-luciferin 投与後に発光シグナルを *in vitro* で定量的に測定した(図 1-c)。その結果、

BLIで測定可能な最小細胞数は100個であり、約1,000個の細胞のphoton countは 1×10^6 台、10,000個では 1×10^7 台、100,000個では 1×10^8 台と指数関数的に増加した(図1-d)。この結果から、BLIによる発光強度がわかれば、その細胞数を推測することが可能である。

次に、標識されたNS/PCsを成体C57BL/6Jマウスの正常脊髄へ移植して、*in vivo*でBLIを用いて細胞数と発光強度の関連を評価した。*in vivo*の撮像条件は焦点距離10cmでD-luciferin(0.3mg/g body weight)を腹腔内投与15分後から5分間とした。その結果、細胞約10,000個を移植した時のphoton countはおおよそ 1×10^7 台で、約100,000個では 1×10^8 で正の相関がみられた(図2-a, b)。この値は*in vitro*のphoton countと比べると約10分の1であった。BLIで測定可能な最小移植細胞数は約1,000個であり(図2-c)、*in vitro*での測定可能な最小細胞数である100個では*in vivo*では測定不能であった。しかし、この場合でも、移植部直上の皮膚を切開して測定すると検出が可能であった(図2-d)。

脊髄損傷モデルにおける移植細胞の生存と分布

1. 脊髄損傷モデルとNS/PCs移植

前述した評価系を用いて、損傷脊髄に対して異なる投与方法で移植された神経幹細胞の動態を評価した。脊髄損傷モデル動物は成体メスC57BL/6Jマウスを使用した。第10胸椎を椎弓切除して硬膜を露出させ、IH impactorを用いて60kdynの圧挫損傷モデルを作製した。標識されたNS/PCsを損傷直後にマウスへと移植した。移植方法はIL投与(IL群)、IT投与(IT群)、IV投与(IV群)のいずれかで施行した。IL群では微細ガラスピペットを損傷中心部に直接刺入して移植した。IT群では第3腰椎を椎弓切除後に、くも膜下腔内へ移植した。IV群では尾静脈あるいは大腿静脈から経静脈的に細胞移植を行った。すべての移植は同一条件で行い、移植細胞の細胞数と濃度は 5×10^5 個/2ul、注入速度は1ul/min、25ul Hamiltonシリンジとstereotaxic microinjectorを使用した。移植直前の生きている細胞数

はTrypan blue dyeでの定量と、BLIで移植細胞の発光シグナルを測定することで確認した。各動物は移植後6週間にわたり経時的にBLIで評価し、その後に組織学的検討を行った。

2. 移植細胞の*in vivo*イメージング

IL群では、脊髄損傷部における移植細胞のphoton countは1週後に初期値の約30%、6週間には平均9.4%まで減少したが、6週間にわたり発光が確認できた(図3-a, b)。IT群では、移植直後にくも膜下腔内全体に移植細胞による発光が広がった。1週後も損傷部で移植細胞の発光は確認できたが、その後消失した。Photon countも同様に減少し、1週後には初期値の約5%、6週間には0.3%であった(図3-c, d)。IV群では、6週間にわたって損傷部においても周囲の非損傷部においても発光を検出することはできなかった(図3-e, f)。その一方で、IV群10匹全例でNS/PCs移植直後に両側胸部に強い発光を認めた(図3-g)。そのうち3匹は移植直後に呼吸抑制が起こり死亡し、これらのマウスの肺で移植細胞の強い発光が認められた(図3-h)。生存したマウスでは翌日には胸部の発光は測定できなかったが、7匹中2匹は4日以内に死亡した。残りの5匹は6週間まで生存した。

3. 免疫組織化学的解析

移植細胞の生存と分布を組織学的に調べるために、移植後6週でGFPによる免疫組織化学染色を行った(ffLuc陽性細胞はGFPにより観察可能である)。IL、IT、IVの3群間で、ffLuc陽性細胞が損傷部で最も多く生存していたのはIL群であった(図4-a, b)。IT群では、移植細胞が損傷部でわずかに存在していた(図4-c, d)。IV群では、損傷部で移植細胞を認めることができなかった(図4-e, f)。IL群では、移植細胞はニューロン(Hu陽性)、アストロサイト(GFAP陽性)、オリゴデンドロサイト(APC陽性)へと分化していた(図4-g~i)。IT群では、一部のffLuc陽性細胞塊が脊髄(図5-a, c, d)や馬尾(図5-b, e, f)の表面に存在し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化していた(図5-g

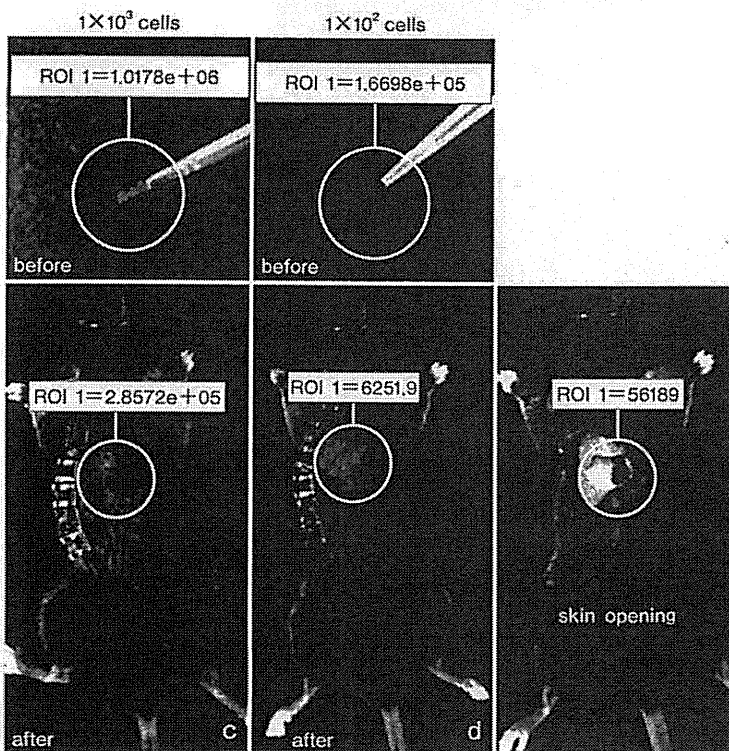
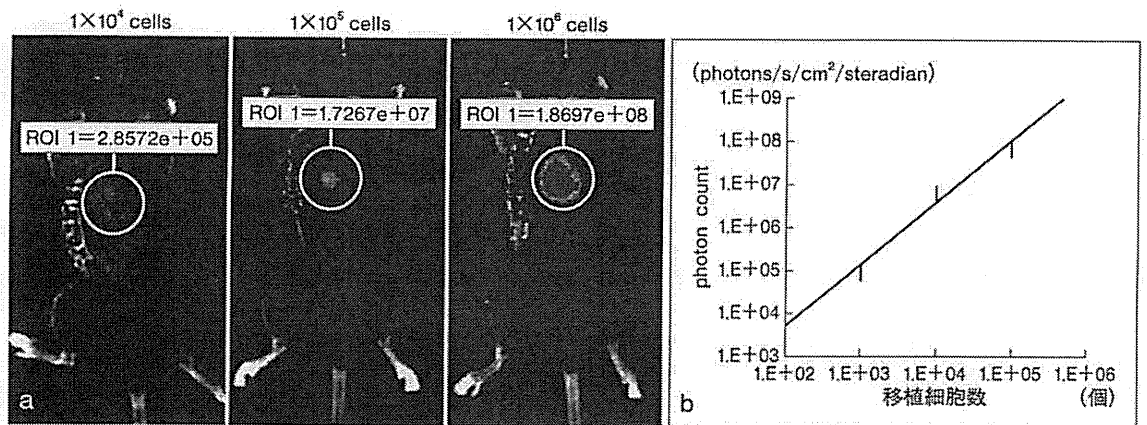


図2 ffLuc 導入神経幹細胞の *in vivo* bioluminescence imaging

- a: マウス脊髄内へ移植された移植細胞は *in vivo* の BLI で定量的に測定できる。
- b: *in vivo* においても移植細胞数と発光強度 (photon count) に正の相関がみられた。
- c: *in vitro* で測定可能な最小移植細胞数は約 1,000 個であった。
- d: *in vitro* での測定可能な最小細胞数である 100 個では *in vivo* では測定不能であった。しかし、この場合でも移植部直上の皮膚を切開すると、検出可能であった。

～i)。これらの細胞は非損傷部の脊髄軟膜上に付着していて、神経組織内へは浸潤していなかった(図 5-c～f)。IV 群では、ffLuc 陽性細胞が肺と脾臓で、ffLuc 陽性細胞の断片が腎臓系球体で認められた(図 6)。3 群とも明らかな腫瘍形成は認めなかった。

4. 結果

以上をまとめると、IL 投与方法による NS/PCs

移植は 3 つの投与方法のうちで最も移植細胞の生存率が高く、合併症も認められなかった。IT 投与方法による移植では損傷部での移植細胞の生存はわずかであり、一部の移植細胞はくも膜下腔内に沿った損傷していない脊髄表面上でも認められた。つまり、損傷部への移植効率が低く、周囲の正常脊髄に細胞が生着していた。IV 投与方法では、移植後に損傷部で移植細胞を認めることができず、胸部での発光を全例で認めた。これは IV 投

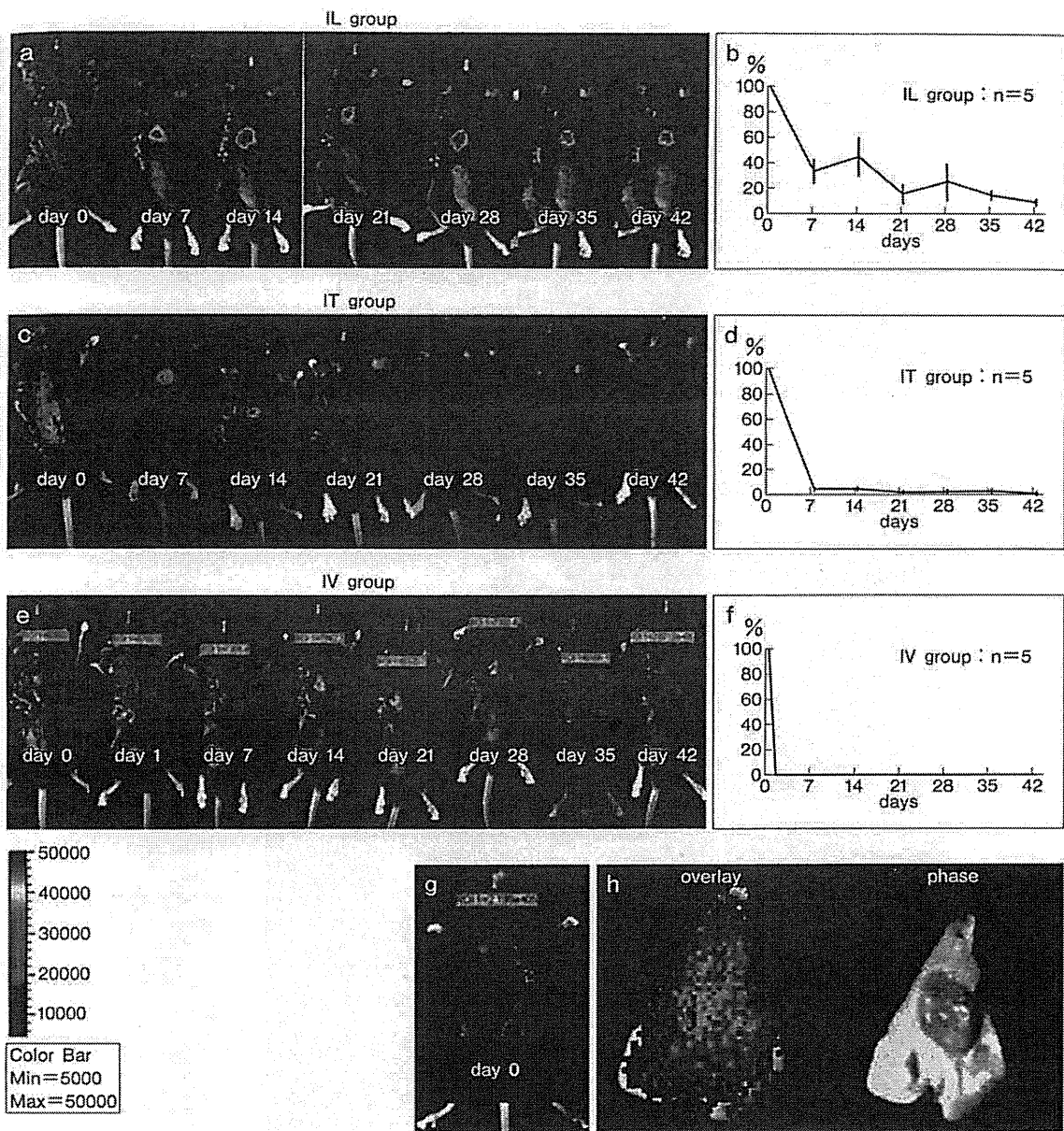


図3 脊髄損傷モデルでの移植細胞の *in vivo* bioluminescence imaging

- a, b: 直接投与(IL)群では移植細胞の発光が6週間目まで継続した。
 c, d: 経くも膜下腔内投与(IT)群では移植直後にくも膜下腔内全体へ広がり、その後、損傷部では徐々に減少した。
 e, f: 経静脈投与(IV)群では損傷部で発光を認めることができなかったが、全例で胸部の発光を認めた(g)。IV移植した10例中3例は移植直後に呼吸抑制が起こり死亡した。
 h: IV群の肺を取り出してBLIで測定すると強い発光が観察された。

与直後に移植細胞による肺梗塞が生じていることを示唆しており、約1/3の例では移植直後に死亡していることから、安全面での課題もある投与方法と考えられた。したがって、移植細胞の生着と安全性の面から、脊髄損傷へのNS/PCsの移植法で最もよい方法はIL投与方法であると考えられた。

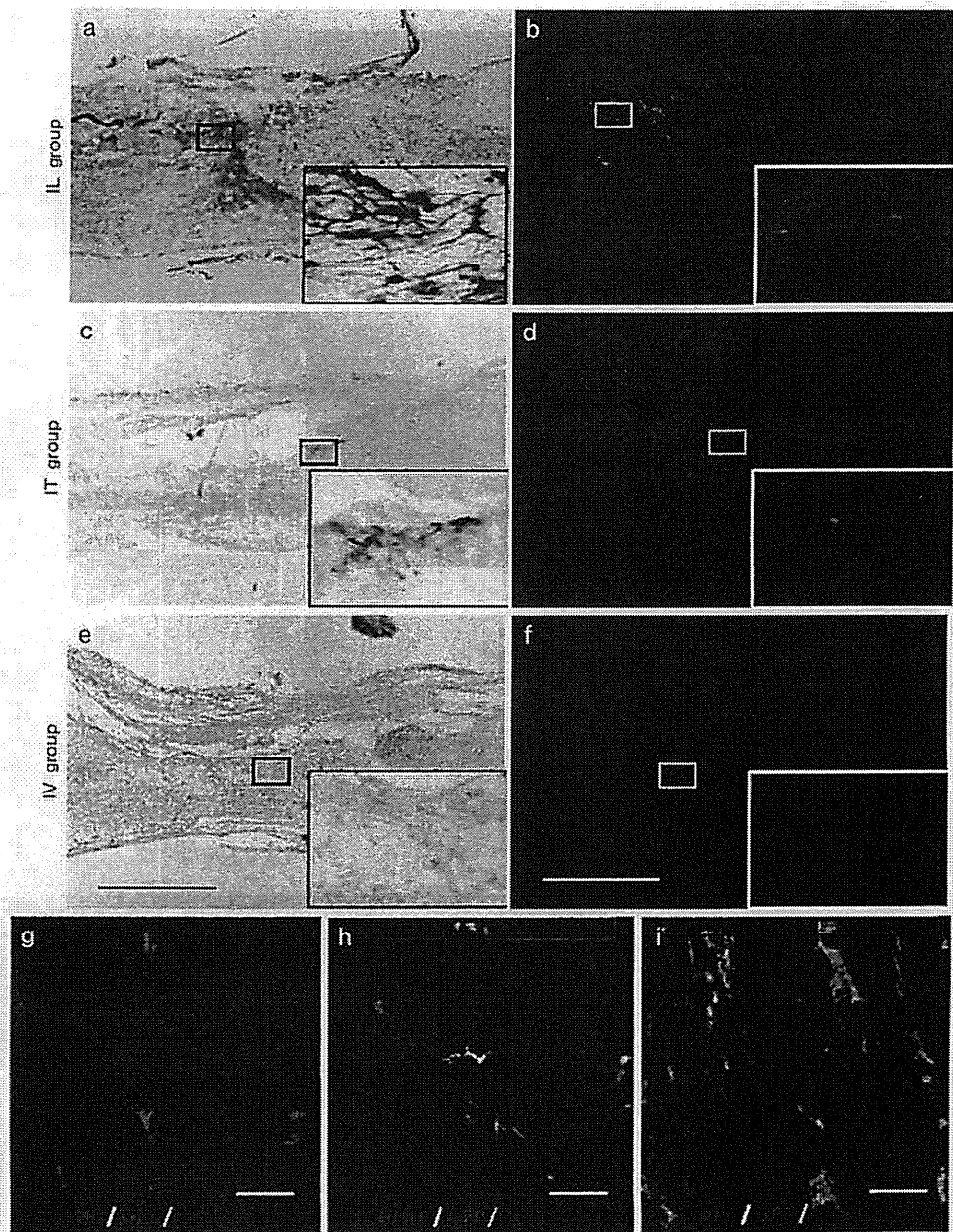


図4 免疫組織化学染色による損傷部での移植細胞生着の比較

a, b: 損傷部ではIL群で最も多くのffLuc陽性細胞が認められた。

c, d: IT群で認められた移植細胞はわずかであった。

e, f: IV群では移植細胞が認められなかった。

IL群で移植細胞はHu陽性ニューロン(g), GFAP陽性アストロサイト(h), APC陽性オリゴデンドロサイト(i)へと分化していた。

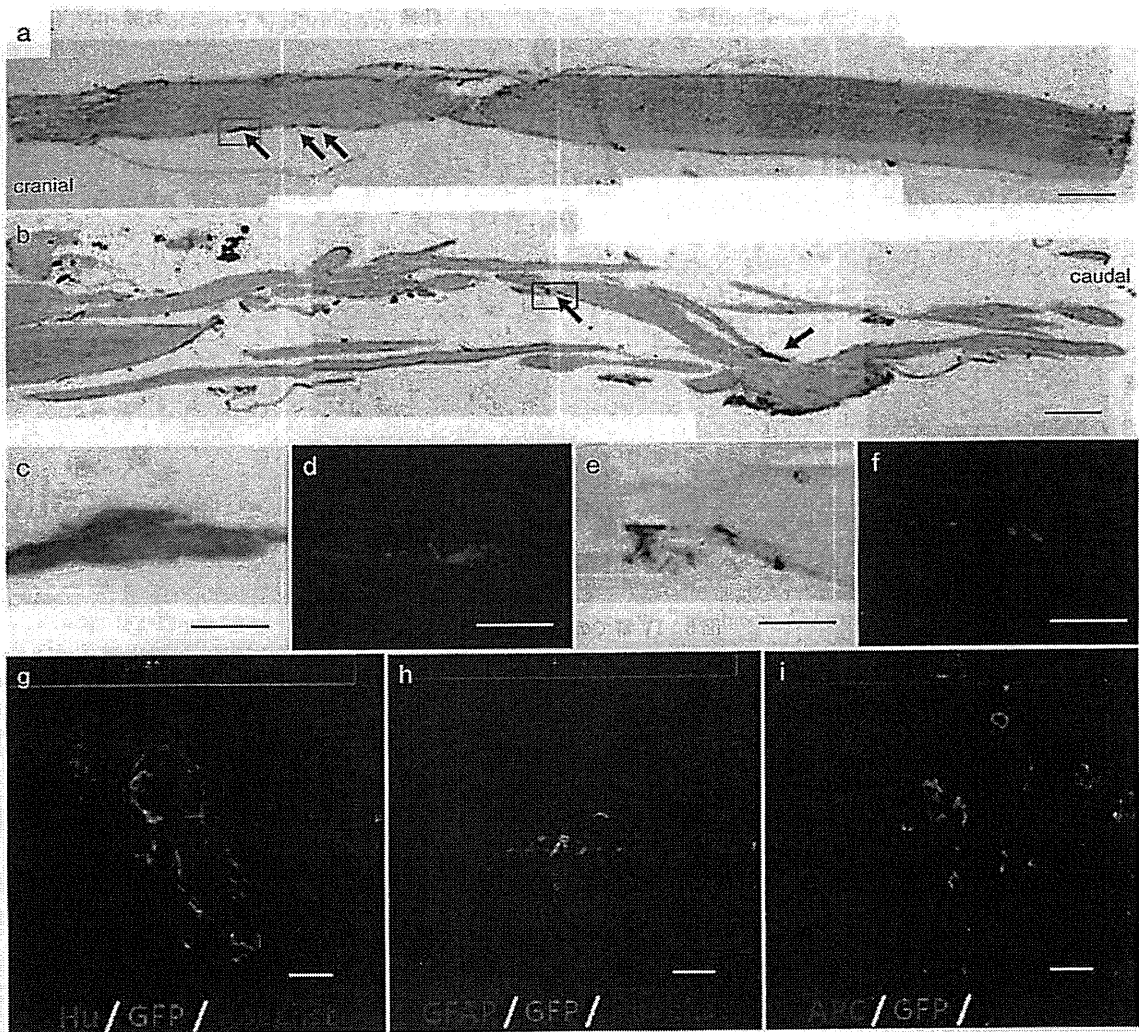


図5 IT群での移植細胞の分布

- a, b : IT群では損傷部以外の脊髄(a)・馬尾(b)神経表面でffLuc陽性細胞が認められた(矢印).
 c, d : a 枠内高倍率
 e, f : b 枠内高倍率
 g : Hu 陽性ニューロン
 h : GFAP 陽性アストロサイト
 i : APC 陽性オリゴデンドロサイト

生体内での 移植細胞解析について

損傷脊髄に移植された細胞の動態を解析するために、これまでに報告されている方法は免疫組織化学的手法、シンチグラフィ^{1,3,5,7)}、MRI^{2,9,11,16)}などである。しかし、これらの方法はいずれも移植細胞を定量的かつ継続的に評価することはでき

ない。免疫組織化学的解析は動物を移植後に屠殺しなければならないので、同一動物を経時的に観察することができない。シンチグラフィは放射線性トレーサーで移植細胞を標識して、*in vivo*でその存在を調べられるが、観察期間は放射線の半減期と細胞分裂による希釈の影響により短期間に限られる。MRIは高感度に移植細胞の分布を調べることができるが、死んでいる細胞と生きてい

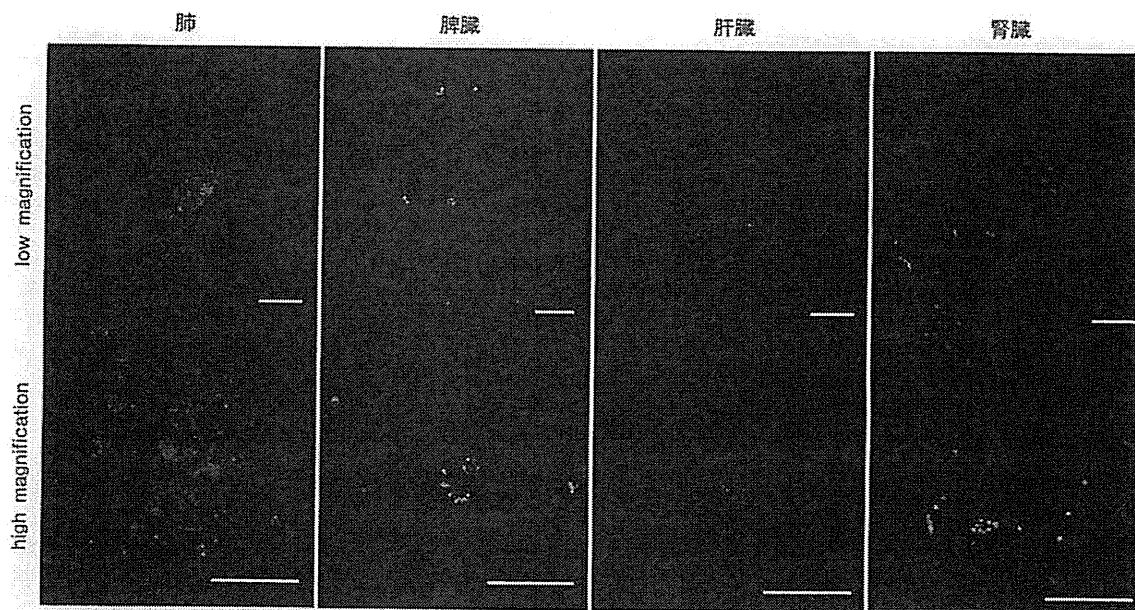


図6 IV群での移植細胞の分布
IV群では肺, 脾臓, 腎臓内でffLuc陽性細胞が認められた。

る細胞のシグナルを区別することができないので、定量的評価をすることは困難である。これらの問題を克服するために、われわれはBLIを用いて、同一動物で経時的に追跡し生きている移植細胞からの発光をphoton countとして定量化することを可能にした。BLIを移植細胞の追跡に利用した研究は様々な分野で開始されている^{4,5,8,13,17,18,21}。われわれも過去に脊髄損傷モデルの移植細胞追跡に応用しているが^{12,15,20}、ffLucを発現するNS/PCsの発光シグナルは従来のものよりも約10倍強力であるため、移植細胞が少数であっても、マウスのより深い体内に存在していても、発光シグナルをとらえることが可能となった。また、ffLucはレンチウイルスによって遺伝子導入されているので、NS/PCsにおける発現は永久的で、移植後長期間にわたり正確に移植細胞を追跡することができた。

おわりに

新しい蛍光・発光レポーターであるffLucとBLIシステムを用いて、標識された移植細胞を*in vivo*で経時的かつ定量的に評価することが可能となった。これを利用することで、移植された

NS/PCsの脊髄損傷モデル内での分布や生着を定量的に評価することが可能となった。今後も様々な蛍光・発光レポーターを用いた解析方法が開発応用されることで、移植細胞による機能回復メカニズムや、さらには脊髄損傷の病態まで細胞・分子レベルで解明されるであろう。

文 献

- 1) Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al: Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 107:2134-2139, 2003
- 2) Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al: Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104:1217-1223, 2004
- 3) Brenner W, Aicher A, Eckey T, et al: ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* 45:512-518, 2004
- 4) Contag CH, Bachmann MH: Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 4:235-260, 2002
- 5) de Haro J, Zurita M, Ayllon L, et al: Detection of ¹¹¹In-oxine-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Lett* 377:7-11, 2005

- 6) Edinger M, Cao YA, Hornig YS, et al : Advancing animal models of neoplasia through *in vivo* bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38: 2128-2136, 2002
- 7) Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al: The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12-20, 2001
- 8) Hara M, Murakami T, Kobayashi E: *In vivo* bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 30: 163-171, 2008
- 9) Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al: Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16267-16272, 2002
- 10) 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
- 11) Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, et al: Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* 76: 232-243, 2004
- 12) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, et al: Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS ONE* 4: e7706, 2009
- 13) Lee Z, Dennis JE, Gerson SL: Imaging stem cell implant for cellular-based therapies. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 930-940, 2008
- 14) 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
- 15) Okada S, Ishii K, Yamane J, 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
- 16) Partlow KC, Chen J, Brant JA, et al: 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB J* 21: 1647-1654, 2007
- 17) Rice BW, Cable MD, Nelson MB: *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt* 6: 432-440, 2001
- 18) Sher F, van Dam G, Boddeke E, et al: Bioluminescence imaging of Olig2-neural stem cells reveals improved engraftment in a demyelination mouse model. *Stem Cells* 27: 1582-1591, 2009
- 19) Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, et al: Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant* 20: 727-739, 2011
- 20) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12704-12709, 2010
- 21) Tögel F, Yang Y, Zhang P, et al: Bioluminescence imaging to monitor the *in vivo* distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F315-321, 2008

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

問題解決型救急初期診療 第2版

田中和豊

●B6変型 頁608 2011年
定価5,040円(本体4,800円+税5%)
[ISBN978-4-260-01391-8]

救急患者の診断からマネジメントまで、フローチャートなどを用いて優先順位をつけ、考えること・すべきことの流れを理解し、初期診療につなげる。特に基本的症候へのアプローチに重点を置き、単に手順を示すのではなく、真に理解しながら学べるよう問題解決のプロセスに焦点を当てた。最新のエビデンスとガイドラインに基づいた内容を盛り込み、マイナー系救急の内容も加わり、ますます充実した研修医必携の待望の改訂版。

炎症・感染症

整形外科の基礎研究における
蛍光・バイオイメージング法
感染症領域への応用船尾 陽生* 石井 賢* 蔵本 哲也*
塩野 雄太* 吉岡 研之* 石濱 寛子*
中村 雅也* 戸山 芳昭* 千葉 一裕*
松本 守雄*Establishment of Real-time and Quantitative Mouse Model of
Musculoskeletal Infections Using Bio-imaging TechniquesHaruki FUNAO, Ken ISHII, Tetsuya KURAMOTO, Yuta SHIONO,
Kenji YOSHIOKA, Hiroko ISHIHAMA, Masaya NAKAMURA,
Yoshiaki TOYAMA, Kazuhiro CHIBA, Morio MATSUMOTO

臨整外 47 : 43~49, 2012

Key words : バイオイメージング (bio-imaging), バイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging : BLI), 蛍光イメージング (fluorescence reflectance imaging : FRI)

われわれは、バイオイメージングの手法を用い、とくに感染症領域での研究を進めている。骨軟部組織感染症の病態はまだまだ不明な点も多く、診断や治療に難渋することが少なくない。過去の動物モデルは、同一個体における細菌感染動態の空間的・時間的な把握が困難であった。本稿で紹介する骨軟部組織感染症モデルは、同一個体におけるリアルタイムな細菌感染動態の可視化が可能であり、病態解明や新たな抗生剤・抗菌素材などの開発、また治療効果判定にも極めて有用であると考えられる。バイオイメージングは今後さらなる他分野への応用が期待される技術である。

はじめに

近年、臨床現場における各種画像診断法の急速な進歩により、非侵襲的で迅速かつ正確な診断や治療が可能となった。しかし、整形外科領域の疾患や外傷では時に身体・画像所見に乏しく、器質的異常の有無の診断に苦慮することも少なくない。画像診断が困難な理由として、①加齢現象がもたらす組織の退行変性所見の存在、②微小病変が描出されない限界例が存在すること、などが考

えられる。生体内における遺伝子発現や細胞動態などの分子・細胞レベルでの変化や異常を描出することができれば、診断精度はさらに向上し、組織診断も可能になると思われる。

一方、基礎研究分野においては分子画像診断法が古くから導入され、今日では必要不可欠なツールとなっている。われわれは過去10年にわたり、*in vivo* イメージング法(表1)であるバイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging : BLI) と蛍光イメージング (fluorescence reflectance imaging : FRI) の手法を基礎研究領域

* 慶應義塾大学医学部整形外科〔〒160-8582 東京都新宿区信濃町35〕 Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

表1 基礎研究に用いられている *in vivo* イメージングシステム

	解像度	深度	時間	薬剤	利点	欠点
超音波	50 μ m	mm-cm	Min	microbubbles	マウスの表面に近い組織形態と生理機能	骨または肺のイメージでは能力が限られる
CT	50 μ m	無制限	Min	ヨード	解剖学的検出に優れる	軟部組織のコントラストが低い
PET	1-2 mm	無制限	Min	プローブまたは基質	高感度 細胞代謝を定量化 プローブの多様性	低解像度 非結合プローブによるノイズ
MRI	10-100 μ m	無制限	Min-Hours	常磁性体陽イオンプローブ	高空間解像度 解剖学的・機能的検出に優れる	低感度 撮像時間が長い
BLI	1-3 mm	cm	Min	ルシフェラーゼおよび基質	高感度 細胞の生存・機能を定量化 ハイスループット 遺伝子導入可能	解剖学的解像度低い 組織深度に依存
FRI	1-3 mm	<1 cm	Sec-Min	蛍光蛋白, 蛍光色素	多重イメージング ハイスループット 遺伝子導入可能	600 nm 以下は組織深度に依存 自家蛍光によるノイズ



図1 ジョルジュ・ド・ラ・トゥール (1593-1652)

Secure data storage: Louvre, Paris

へ導入し、動物生体内での各種遺伝子発現⁹⁾、再生医療の移植細胞動態^{9,10,12,17)}、感染症の細菌動態や各種治療効果判定などに利用してきた。本稿では蛍光・バイオイメージングの基礎と、整形外科の感染症研究領域でわれわれが行ってきた研究

成果の一部を紹介する。

分子画像診断法とは?

400年以上前のフランスの画家ラ・トゥールの作品(図1)では、ろうそくの光が女の子の手を透過している画が描かれている。これは、驚くことに400年以上前から一部の波長の光は組織透過性を有していることが知られていたことを意味する。特に赤い光は、緑の光よりも透過性が高いことが知られている。分子画像診断法とは、これらの光の組織透過性の性質を応用し、生体内での発光や蛍光を生体外から捉えることにより、遺伝子発現や特定の分子、細胞を非侵襲的かつリアルタイムに描出する *in vivo* イメージング法である(図2)。

1. 発光による *in vivo* イメージング:

バイオルミネッセンスイメージング (bioluminescence imaging: BLI)

ホタル、ウミシイタケ(*Renilla*)、コメツキムシ(*Pyrophorus plagiophthalmus*)や細菌類(*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*)などは、発光酵素であるルシフェラーゼを有している。発光による *in*