

contrast, the pinhole created in the femur for bacterial inoculation in our model closed spontaneously and rapidly enough to keep the bacterial infection contained inside the medullary cavity of the femur. In fact, a strong bacterial bioluminescent signal was detected for over 3 months after inoculation in our model.

In the present study, the mean serum IL-6 and IL-1 β concentrations in the infected group were significantly higher than those in the control group. Marriott et al. (22) demonstrated that osteoblasts express IL-6 during bacterial bone infection in a mouse model and in human bone tissues. IL-6 (12, 17) and IL-1 β (4, 25), which are produced by stimulated monocytes/macrophages, stimulate osteoclasts and lead to bone resorption. Yoshii et al. reported that the local levels of IL-6 and IL-1 β in the infected bone were elevated in the early postinfection period in a staphylococcal osteomyelitis model. They suggested that the elevated IL-6 and IL-1 β levels induced by infection may be related to bone damage mainly in the early phase of infection (43). Our results also demonstrated that the mean serum IL-6 and IL-1 β concentrations in the infected group were significantly higher at the time pathological changes, such as new bone formation beneath the periosteum, appeared (approximately on day 7). The serum CRP levels in both groups were elevated during the first 3 days (days 0.5, 1, and 3), after which the high level of CRP in the infected group was prolonged through day 7. The elevated CRP level in the early phase might have been caused by the surgical invasion. However, the elevated level was sustained in the infected group for a longer period. The CRP level is one of the most valuable markers for evaluating infectious processes in the clinical field (10, 15, 40). In this study, there was a high correlation between the CRP level and bacterial PI *in vivo* during the chronic phase, suggesting that our model is useful for real-time, noninvasive monitoring of the chronic inflammatory processes in osteomyelitis. In contrast, the mean serum level of MCP-1 was significantly higher in the infected group on day 0.5 (12 h). Cultured osteoblasts produce high MCP-1 levels in response to *S. aureus*, leading to a proposal that MCP-1 causes the inflammation that results in progressive bone destruction (3, 9). Marriott et al. (23) reported that increased MCP-1 is the pivotal inflammatory chemokine during *S. aureus*-associated osteomyelitis *in vivo*. We also demonstrated here that the proportion of granulocytes in the peripheral blood was significantly higher in the infected group than in the control group after day 7, suggesting that granulocytes are induced by chemokine activities during the early phase and that systemic infection due to osteomyelitis was maintained during the chronic phase. Thus, the present osteomyelitis model mimics the infectious processes in humans well.

Additionally, the histological study also demonstrated the reproducibility of the present model. The histological analysis showed new bone formation beneath the periosteum at the early phase and trabecular bone resorption by osteoclasts and fibroblast proliferation during the chronic phase, demonstrating the pathological features of chronic osteomyelitis.

In conclusion, we have successfully visualized and quantified bacterial growth in a mouse osteomyelitis model using *in vivo* BLI. We were able to monitor the infectious processes throughout the course of the disease in both the acute and chronic phases without sacrificing the animals. To our knowledge, this is the first report describing a real-time, quantitative, and reproducible model for both acute and chronic osteomyelitis of the mouse femur with kinetics of immune cells and serum cytokine/chemokine levels.

This novel, quantitative, and reproducible model can be used to clarify the pathology and kinetics of osteomyelitis and to evaluate novel *in vivo* therapeutic strategies, including the development of new antibiotics and bacterium-resistant implants, before performing studies in larger animals and human subjects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Baba for technical assistance with the serological analyses.

This work was supported by a grant from the Japan Orthopaedics and Traumatology Foundation, Inc. (no.192); Keio Gijuku Academic Development Funds; and the General Insurance Association of Japan, Health Labor Sciences Research Grant and Research for Promoting Technological Seeds.

S.K. is a consultant for Medical and Biological Laboratories Co., Ltd. We have no other financial conflicts of interest.

REFERENCES

1. Aliabadi P, Nikpoor N. 1994. Imaging osteomyelitis. *Arthritis Rheum.* 37:617–622.
2. Bernthal NM, et al. 2010. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate *in vivo* the efficacy of antimicrobial implant coatings. *PLoS One* 5:e12580.
3. Bost KL, et al. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with *Staphylococcus aureus* or *Salmonella*. *J. Interferon Cytokine Res.* 21:297–304.
4. Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJP, Mundy GR. 1989. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 125:1142–1150.
5. Contag CH, et al. 1995. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol. Microbiol.* 18:593–603.
6. Costa GL, et al. 2001. Adoptive immunotherapy of experimental autoimmune encephalomyelitis via T cell delivery of the IL-12 p40 subunit. *J. Immunol.* 167:2379–2387.
7. Cremieux AC, Carbon C. 1997. Experimental models of bone and prosthetic joint infections. *Clin. Infect. Dis.* 25:1295–1302.
8. Darouiche RO. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350:1422–1429.
9. Dean RA, et al. 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112:3455–3464.
10. Du Clos TW. 2000. Function of C-reactive protein. *Ann. Med.* 32:274–278.
11. Francis KP, et al. 2000. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in live mice using a novel *luxABCDE* construct. *Infect. Immun.* 68:3594–3600.
12. Ishimi Y, et al. 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.* 145:3297–3303.
13. Johansson A, Svensson O, Blomgren G, Eliasson G, Nord CE. 1991. Anaerobic osteomyelitis. A new experimental rabbit model. *Clin. Orthop.* 265:297–301.
14. Kadurugamuwa JL, et al. 2003. Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3130–3137.
15. Khan MH, Smith PN, Rao N, Donaldson WF. 2006. Serum C-reactive protein levels correlate with clinical response in patients treated with antibiotics for wound infections after spinal surgery. *Spine J.* 6:311–315.
16. Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R. 2004. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 35:952–957.
17. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. 1990. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.* 144:4226–4230.
18. Kurtz SM, et al. 2007. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 89:144–151.
19. Lew DP, Waldvogel FA. 2004. Osteomyelitis. *Lancet* 364:369–379.
20. Li D, et al. 2008. Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. *J. Orthop. Res.* 26:96–105.

21. Mandl S, Schimmelpfennig C, Edinger M, Negrin RS, Contag CH. 2002. Understanding immune cell trafficking patterns via in vivo bioluminescence imaging. *J. Cell Biochem. Suppl.* 39:239–248.
22. Marriott I, et al. 2004. Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. *Am. J. Pathol.* 164:1399–1406.
23. Marriott I, et al. 2005. Osteoblasts produce monocyte chemoattractant protein-1 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. *Bone* 37:504–512.
24. Mortin LI, et al. 2007. Rapid bactericidal activity of daptomycin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* peritonitis in mice as measured with bioluminescent bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1787–1794.
25. Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, Koga T. 1989. Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J. Immunol.* 143:1881–1886.
26. Norden CW. 1970. Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. *J. Infect. Dis.* 122:410–418.
27. Okada S, et al. 2005. 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.
28. Pillon A, Servant N, Vignon F, Balaguer P, Nicolas JC. 2005. In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disruptors. *Anal. Biochem.* 340:295–302.
29. Pucci F, et al. 2009. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* 114:901–914.
30. Rice BW, Cable MD, Nelson MB. 2001. In vivo imaging of light-emitting probes. *J. Biomed. Opt.* 6:432–440.
31. Rissing JP. 1990. Animal models of osteomyelitis. Knowledge, hypothesis, and speculation. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 4:377–390.
32. Rissing JP. 1997. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clin. Infect. Dis.* 25:1327–1333.
33. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. 1985. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect. Immun.* 47:581–586.
34. Sadikot RT, et al. 2001. High-dose dexamethasone accentuates nuclear factor-kappa b activation in endotoxin-treated mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:873–878.
35. Scheman L, Janota M, Lewin P. 1941. The production of experimental osteomyelitis: preliminary report. *JAMA* 177:1525–1529.
36. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. 2006. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 37:S105–S112.
37. Sever D, et al. 2011. Evaluation of impaired beta-cell function in nonobese-diabetic (NOD) mouse model using bioluminescence imaging. *FASEB J.* 25:676–684.
38. Sweeney TJ, et al. 1999. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:12044–12049.
39. Toms AD, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. 2006. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Br.* 88:149–155.
40. Volanakis JE. 2001. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol. Immunol.* 38:189–197.
41. Wang X, et al. 2003. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 102:3478–3482.
42. Wiles S, Pickard KM, Peng K, MacDonald TT, Frankel G. 2006. In vivo bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 74:5391–5396.
43. Yoshii T, et al. 2002. Local levels of interleukin-1 β , -4, -6, and tumor necrosis factor in an experimental model of murine osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. *Cytokine* 19:59–65.
44. Zinner SH. 1999. Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 29:490–494.

I. ES 細胞, iPS 細胞

2. 脊髄損傷へのES/iPS細胞由来神経幹細胞移植

辻 収彦, 岡野栄之

ラット胎仔由来神経幹細胞移植による機能回復の報告以降, 脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けての機運が高まっている¹⁾。しかし, 胎仔組織を破壊するという倫理的問題が大きな障壁となっており, 実現へのハードルは未だ高い。それに替わる移植細胞源として近年, 胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) や, 自家移植の細胞源となりうる人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) に大きな注目が集まっている。

はじめに

20世紀初頭にスペインの神経解剖学者Ramón y Cajalが“Once the development was ended, the fonts of growth and regeneration... dried up irrevocably”と述べたように, 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定説として長い間考えられてきた。しかし, 1992年にReynoldsとWeissらにより神経幹細胞が同定され²⁾, その後ヒトを含め

【キーワード&略語】

脊髄損傷, ES細胞, iPS細胞, 細胞移植治療, neurosphere法

EGF : epidermal growth factor (上皮増殖因子)

FGF-2 : fibroblast growth factor-2 (線維芽細胞増殖因子)

LIF : leukemia inhibitory factor (白血病阻害因子)

MEF : mouse embryonic fibroblast (マウス胎仔線維芽細胞)

TTF : tail tip fibroblast (成体尾線維芽細胞)

た哺乳動物において, 神経幹細胞を含めた神経前駆細胞の培養法が確立され^{3)~5)}, 発生過程および成体の哺乳類中樞神経系における神経幹細胞の分子生物学的特性が明らかにされると^{6)~10)}, その多様な増殖能・分化能を生かして神経変性疾患や神経損傷においていったんは失われた神経系の細胞や組織を再生しようという試みがなされてきた。

神経幹細胞は, 未分化状態を維持しながら分裂・増殖して自己と同じ幹細胞を生み出す自己複製能をもち, 神経系の構成細胞であるニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトの3種類の細胞を生み出すことができる多分化能を有している。さらには*in vitro*でneurosphere法をはじめとするさまざまな方法で培養することが可能であり, 必要十分量の細胞数を得ることが可能となるため, 細胞治療のためのドナー細胞として期待されてきた。

特に脊髄損傷の研究においては, ラット脊髄損傷に対するラット胎仔脊髄移植の報告以降¹¹⁾, われわれの研究室においても, ラット脊髄損傷に対して*in vitro*で培養・増殖させたラット胎仔脊髄由来神経幹細胞の

Cell transplantation therapy using ES/iPS cells into spinal cord injury

Osahiko Tsuji^{1) 2)}/Hideyuki Okano²⁾ : Department of orthopedics, school of medicine, Keio university¹⁾ / Department of physiology, school of medicine, Keio university²⁾ (慶應義塾大学医学部整形外科教室¹⁾ / 慶應義塾大学医学部生理学教室²⁾)

損傷後亜急性期における移植の有効性¹⁾、さらにはより臨床応用を目指した前臨床試験として、ヒト胎児脳由来神経幹細胞移植の霊長類コモンマーモセット脊髄損傷に対する有効性¹²⁾に関してこれまで検討を行い、良好な機能回復を報告してきている。この結果は、*in vitro*で継代培養を行って培養・増幅したヒト神経幹細胞の神経再生への応用を強く期待させる結果であった。しかし、ヒト神経幹細胞の臨床応用を阻む大きな要因として、あくまでも中絶胎児の脳から採取しなければならぬという問題点があり、未だわが国において臨床応用の目処が立っていないのが現状である。本稿においては、胎児由来神経幹細胞に替わる細胞ソースとして可能性のある、ES細胞およびiPS細胞由来神経幹細胞の*in vitro*での誘導培養および脊髄損傷への移植研究について概説する。

■ ES細胞由来神経幹細胞

1) 試験管内神経発生モデルとマウスES細胞由来神経幹細胞

i) 神経幹細胞の発生モデル

神経幹細胞は前述のように自己複製能および多分化能を有する細胞と定義されているが、その生み出される時期と場所により、その分化能・増殖能は厳密に制御され、すべての神経幹細胞が同一の性質を有しているわけではない。

神経幹細胞は胎生5日目(E5.5)ころにはすでに存在することが知られている。この時期の神経幹細胞は白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor:LIF)存在下で培養することができると言われている¹³⁾。胎生期の比較的早い時期(E8.5~12.5)には、この神経幹細胞は*in vitro*で線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor-2:FGF-2)の存在下で培養することが可能となる。この時期から胎生後期にかけて脳室周囲に存在する放射状グリアは神経幹細胞としての性質を有し、対象分裂により自己複製する一方で、非対称分裂を行ってニューロンを産生する^{14) 15)}。

その後、発生後期から新生児期、成体の脳では神経幹細胞は主に脳室周囲に存在し、ニューロンのみならずグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)を産生する¹⁶⁾。胎生後期以降の神経幹細胞はFGF-2のみならず上皮増殖因子(epidermal growth

factor:EGF)により増殖する。しかし、この後期から出現する神経幹細胞は発生の早い段階にのみ生み出される前脳型コリン作動性ニューロン、ドパミン作動性ニューロン、運動ニューロンのような投射型のニューロン(early-born projection neurons)を生み出すことはできない。このように神経幹細胞はその生み出されるタイミングと場所によって付与される時間的・空間的特異性により厳密にその分化能や増殖能が制御されている。

ii) マウスES細胞を用いた試験管内神経発生モデルシステム

当研究室の岡田らは、内部細胞塊由来のマウスES細胞を用いて、発生の比較的早い段階で存在し高い可塑性をもつ神経幹細胞を誘導する、すなわち*in vitro*で時間的・空間的特異性を反映した神経発生を模倣する試験管内神経発生モデル培養システムを構築することに成功した(図1)¹⁷⁾。

その培養系とは、まずES細胞から未分化状態を維持するために必要なLIFを取り除き、浮遊培養することで三胚葉に由来する細胞を含む胚様体(embryoid body:EB)を形成させる。このEB中には比較的早期の神経幹細胞が含まれており、これを無血清の神経幹細胞用の培地中でFGF-2存在下に浮遊培養すると、neurosphereとして神経幹細胞を選択的に培養することができる。さらに、EBの形成中に、BMPを阻害することで神経上皮への分化を促し前脳の形成に重要な役割を果たすNoggin、あるいは神経誘導および後脳や前方脊髄の発生に重要な役割を果たすことで知られるレチノイン酸(retinoic acid:RA)を低濃度で加えることで、EB中の神経幹細胞の割合を高め、neurosphereの形成効率を高めることができる。

このようにして形成させたprimary neurosphereはsecondary, tertiary neurosphereと継代培養することが可能であり、さらに興味深いことにprimary neurosphereからはほぼニューロンしか誘導されないのに対し、secondary, tertiary neurosphereからはニューロンのみならずアストロサイト・オリゴデンドロサイトなどのグリア細胞が誘導される(図2)。繰り返し継代培養可能であること、神経系の3系統の細胞を産生する能力を有することより、このマウスES細胞由来neurosphereが自己複製能と多分化能をもつ神経幹細胞

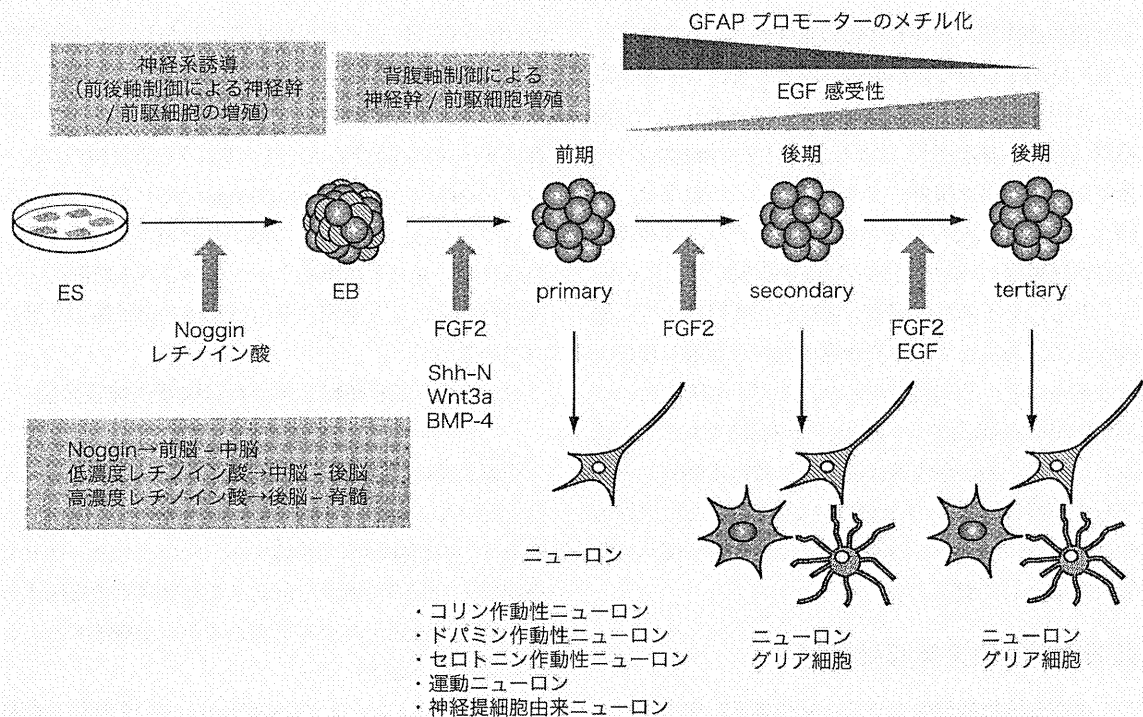


図1 マウスES細胞由来神経幹細胞による *in vitro* 神経発生モデルシステム (文献17より)

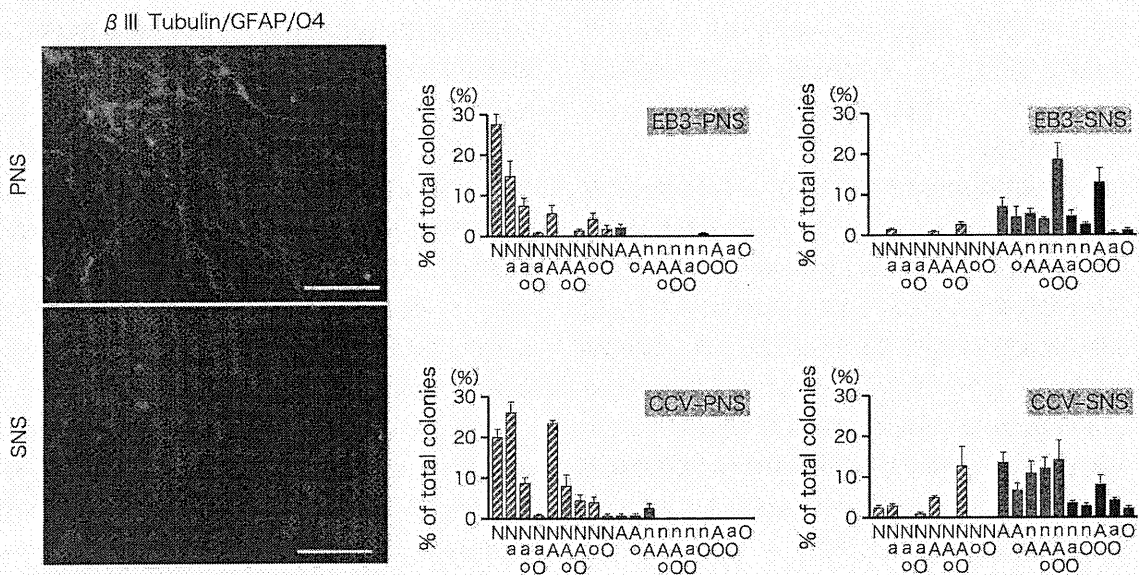


図2 ES細胞由来 primary neurosphere, secondary neurosphereからのニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの分化誘導 (巻頭カラー図1参照)
N:ニューロン (β III-Tubulin陽性), A:アストロサイト (GFA陽性), O:オリゴデンドロサイト (O4陽性), 大文字:1コロニー中20細胞以上がマーカー陽性, 小文字:1コロニー中19細胞以下がマーカー陽性 (文献23より)

胞を含有していることがわかる。また、このような継代に伴う分化能の変化は、発生初期にはニューロンしか生み出されず、中期以降になって初めてグリア細胞が生み出される *in vivo* における神経系の発生の時間的な変化をよく反映している。さらには、EB形成中にNogginを添加する、また加えるRAの濃度を変えることで、誘導される神経幹細胞の前後軸に沿った領域特異性を制御できる。また、primary neurosphere形成時に腹側化因子であるShh (Sonic Hedgehog) や、背側化因子であるBMP-4やWnt3aを添加することで背腹軸に沿った領域特異性も制御することに成功している¹⁷⁾。このことから、培養中の適切な時期に適切な因子を加えることで神経幹細胞の領域特異性を自在に制御できると考えられた (図1)。

2) 損傷脊髄へのマウスES細胞由来神経幹細胞移植

1) 神経幹細胞移植の現況

ES細胞は、その自己複製能・多分化能・そして遺伝学的順応性が魅力的であり、マウスES細胞を用いてニューロンへと誘導する方法はこれまでに広く研究され¹⁸⁾、ES細胞由来の神経幹/前駆細胞は理想的な移植細胞ソースと言える。ES細胞移植を考えるうえで、移植する細胞の分化段階としては、未分化ES細胞から胚様体、分化したニューロンまでさまざまであるが、分化度が低いほど移植細胞由来のテラトーマの発生確率は高いことが知られている¹⁹⁾。

ES細胞移植による脊髄損傷への有効性についてはこれまでに、'99年にMcDonaldらがマウスES細胞からEBを形成しラット損傷脊髄へと移植し、良好な機能回復を報告したが²⁰⁾、より未分化なEBの段階で移植を行うことはより長期間の経過観察を経ると腫瘍化する危険性は否定できない。またKeirsteadらはインスリンや甲状腺ホルモンなどオリゴデンドロサイトの分化を促す因子を含んだ培養液を用いることで、ヒトES細胞から高純度のオリゴデンドロサイト前駆細胞へと効率的に誘導する方法を確立し、それらをラット損傷脊髄へと移植し、脱髄した軸索の再髄鞘化と後肢機能回復を報告している²¹⁾。その後、山田らはES細胞から胚様体を形成した後、電気的刺激を加えることでニューロンへと選択的に誘導したものを損傷脊髄へと移植し、損傷脊髄内において電気刺激を加えないEBを移植したものと比較した。その結果、電気刺激を加え

たEBは高率にニューロンへと分化しており、かつ増殖能が、加えないものと比較して低く抑えられており、安全性の面では有効な手段であったが、脊髄損傷後の後肢機能回復には至らなかった²²⁾。いずれの研究においても、ES細胞から厳密にどの段階にまで誘導した神経前駆細胞が最も亜急性期の移植療法に適しているかは不明であった。

ii) 試験管内神経発生モデルシステムを用いた細胞移植

そこで当研究室の熊谷らは、前述(■-1)に記した岡田の培養系を用いて、マウスES細胞からEB形成を経て誘導されたPNS (primary neurosphere) と、一度継代を経たSNS (secondary neurosphere) を用いてマウス脊髄圧挫損傷モデルへと損傷後9日目の亜急性期に移植を行い、その有効性について検討を行った²³⁾。前述のように、PNSからはほとんどニューロンへと分化するのに対し、SNSはニューロンに加えアストロサイト・オリゴデンドロサイトの3系統への分化傾向を呈することがわかっている¹⁷⁾。すると損傷脊髄に移植されたPNS/SNSともに、ルシフェラーゼによるバイオイメージングにおいては約20%の細胞が生着しており (図3A)、移植されたPNS/SNSはともに神経系3系統への分化傾向を *in vivo* においても呈していた (図3B)。またSNS移植群では圧挫損傷後の萎縮性変化と脱髄変化をPNS移植群と比較して有意に抑制しており (図3B④)、またSNS移植群では血管新生も損傷脊髄内で促進していた。

Basso mouse scaleによる後肢機能評価ではコントロール群 (PBS移植群) と比較してSNS移植群のみが統計学的有意差をもって良好な機能回復をきたした (図4A)。これは前述の萎縮性変化および脱髄の抑制・血管新生の促進に加え、軸索進展の促進、さらには移植細胞による再髄鞘化によりもたらされたと考えられた (図4B)。

これらの結果より、ES細胞を脊髄損傷治療に応用するには、ほとんどニューロンのみを生み出す神経幹/前駆細胞を移植するのではなく、ニューロンに加えグリア細胞も同時に生み出すことができる神経幹/前駆細胞にまで誘導して移植を行うことが望ましいと示唆され、今後のESおよびiPS細胞移植療法の実現に向けて非常に大きな意義のある結果が得られた。しかし胎

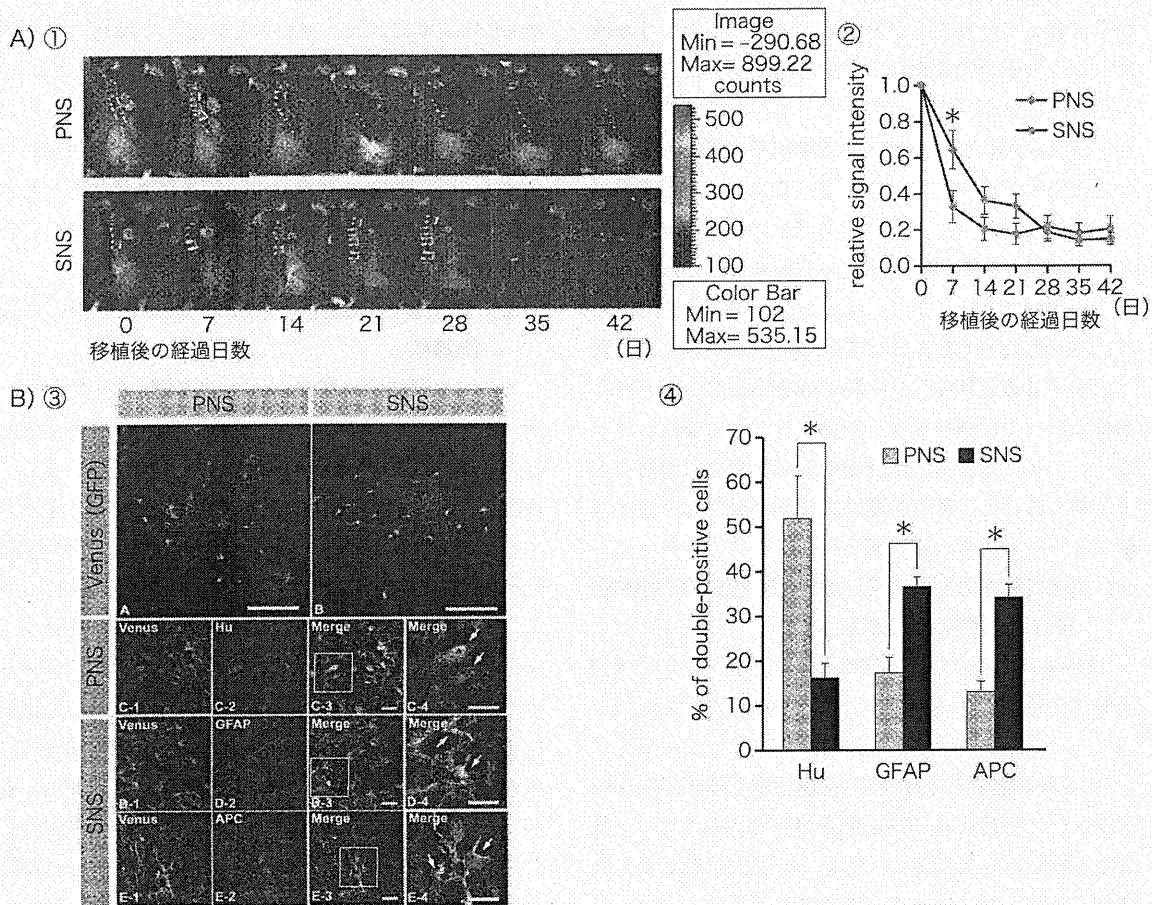


図3 移植されたES細胞由来PNS, SNSの動態 (Aの①, Bの③は巻頭カラー図2参照)
 A) ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメーjing. 移植後6週の時点で約20%の細胞が生着, B) 損傷脊髄内での3系統への分化 (Hu:ニューロンマーカー, GFAP:アストロサイトマーカー, APC:オリゴデンドロサイトマーカー, 文献23より)

児由来神経幹細胞のケース同様に、ヒトへの応用を見据えると、ES細胞も中絶胎児は用いないにしろ、不妊治療の余剰胚をその樹立に用いるため、倫理的問題が避けられない。また、胎児由来神経幹細胞も同様ではあるが、通常他人の細胞を移植する同種移植 (allograft) となるため、免疫学的拒絶反応の問題や、また、胎児期に存在する腫瘍性の高い細胞を用いることから、腫瘍化のリスクなど解決しなければならない問題が山積みしているのが現状である。

2 iPS細胞由来神経幹細胞

1) マウスiPS細胞由来神経幹細胞を用いた安全性の検討

これまで述べたような幹細胞を用いる諸問題に解決の糸口を与えたのが、2006年、'07年に京都大学山中伸弥教授らにより、それぞれマウス、ヒトの線維芽細胞より樹立されたiPS細胞である^{24) 25)}。iPS細胞は、マウス/ヒト線維芽細胞に、*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, (*c-Myc*) などの遺伝子を導入することで体細胞をリプログラミングし、ES細胞と同等の増殖能・分化能をもつ多能性幹細胞である。iPS細胞はそれぞれの患者の体

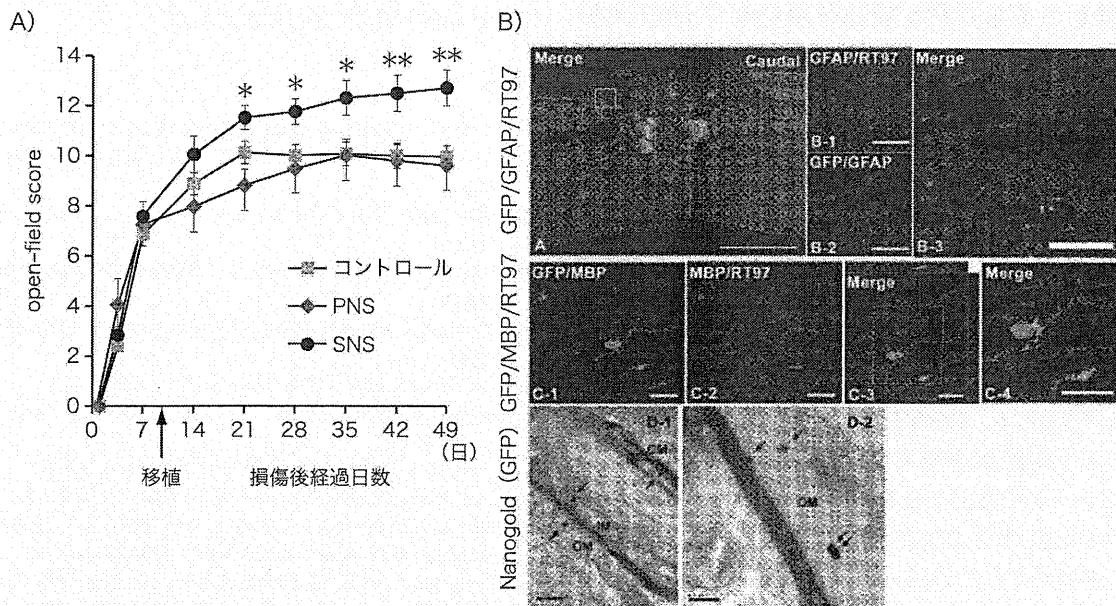


図4 移植されたES細胞由来SNSによる再髄鞘化像と後肢機能回復 (Bは巻頭カラー図3参照)
 A) Basso mouse scaleによる後肢機能評価. コントロール群と比較して, SNS移植群においてのみ機能回復を認めた. B) 移植細胞のオリゴデンドロサイトへの分化像. MBP陽性の成熟オリゴデンドロサイトへと分化し, 免疫電顕像にて移植細胞による髄鞘像が確認された (文献23より改変)

細胞から樹立することが可能と考えられ, 先に述べた倫理的・免疫学的拒絶反応などの問題を解決する技術として期待されている.

iPS細胞を用いるにあたって, ① (ウイルスなどを用いて) 外来遺伝子を導入していること, ② リプログラミングが必ずしも完全に行われていない可能性, などよりES細胞にもまして腫瘍化の危険性について危惧される. この安全性の検討を行うため, 京都大学物質-細胞統合システム拠点iPS細胞研究センターの三浦らは当研究室と共同で, 独立したマウスiPS細胞36クローンを用いて前述【1】で述べた培養法によりそれらすべてをSNSへと誘導培養し, 免疫不全マウスNOD/Scidマウスの成体脳へと移植を行い, 腫瘍化の有無について詳細な検討を行った. すると, SNSへと誘導した際の安全性を最も規定しているのは, c-Mycの有無や樹立の際のdrug selectionの有無ではなく, iPS細胞の由来 [マウス胎仔線維芽細胞: (mouse embryonic fibroblast: MEF) 由来か成体尾線維芽細胞: (tail tip fibroblast: TTF) 由来か] のみが腫瘍形成の有無と統計学的相関を有していたことが判明した

(詳しくは本誌第4章-3をご参照いただきたい)²⁶⁾. これらの検討により, iPS細胞を移植療法へと応用するに際しては, 事前の安全性についての検討が非常に重要であることが示唆された.

2) 脊髄損傷に対するマウスiPS細胞由来神経幹細胞移植

われわれは, 先述のようにNOD/Scidマウス成体脳への移植を経て安全性の確認されたマウスiPS細胞クローンよりSNSへと誘導培養し, C57Bl6/Jマウスの胸髄損傷モデルに対して, 損傷後9日目の亜急性期に損傷中心部へと安全なSNSを 5×10^5 個移植を行い, その有効性について検討を行い, 良好な機能回復を確認している (投稿中). 重要なことは, 将来の臨床応用を見据えるとより安全なMEFではなくより危険性の高いTTF由来のiPS細胞を用いることが現実的であると考えられ, その点についても詳細な検討を現在行っているところである.

③ ヒト ES/iPS 細胞を用いた今後の課題と検討

現在わが国においても厳密な管理のもと、ヒト ES 細胞を用いた研究が進められている。当研究室においてもヒト ES および iPS 細胞を用いて培養法の検討などをすでに開始しているが、ヒト ES 細胞を用いるにあってもやはりマウスの場合と同様の解決すべき問題点を抱えている。

最も重要なのは安全性の問題であり、臨床応用を考えると未分化 ES/iPS 細胞の混入は奇形腫形成をきたすと考えられる。未分化 ES 細胞の混入を防ぐための対策として系譜特異的なプロモーター下に薬剤耐性遺伝子やマーカー遺伝子を導入することで必要な細胞を 100% 選択する方法や²⁷⁾、細胞死を司る遺伝子の発現を薬剤で導入することで増殖性の高い細胞のみを死滅させる方法など²⁸⁾が考えられているが、実際の臨床現場で十分に利用可能な安全性を担保するまでにはまだ時間がかかりそうであり、安全性を担保する技術のさらなる発展が急務であろう。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²⁹⁾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、霊長類脊髄損傷モデルに対してヒト ES/iPS 細胞由来神経幹細胞移植が早期に実現するよう当研究室においても日々努力を続けている。

おわりに

'09 年に入り米国において、Geron 社の ES 細胞由来オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いた急性期脊髄損傷に対する clinical trial (Phase 1) が FDA により認可され、世界的に大きな注目を集めている。しかし、ヒト ES 細胞を用いるにあたっては倫理的・宗教的な側面について常に議論的となっている。これらの問題を解決できる技術として iPS 細胞が注目を集めているが、ヒト iPS 細胞による再生医療を進めるうえでも、その分化誘導法や腫瘍形成能の検討など、まずヒト ES 細胞で解決しなければならない問題である。ES 細胞研究は常に iPS 細胞研究と両輪であると言え、今後の臨床応用を目指すうえでも両者の研究を同時に進めていく

ことが必要不可欠であると言えよう。

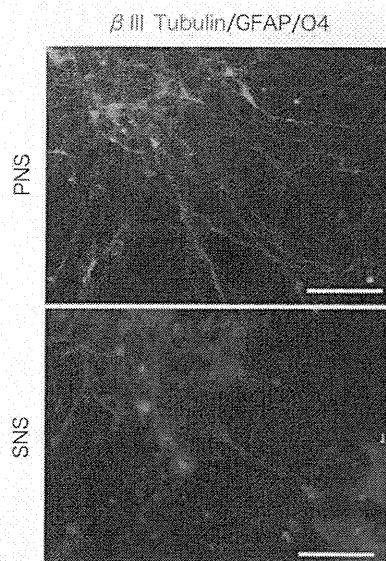
文献

- 1) Ogawa, Y. et al. : J. Neurosci. Res., 69 : 925-933, 2002
- 2) Reynolds, B. A. & Weiss, S. : Science, 255 : 1707-1710, 1992
- 3) Kilpatrick, T. J. & Bartlett, P. F. : Neuron, 10 : 255-265, 1993
- 4) Davis, A. A. & Temple, S. A. : Nature, 372 : 263-266, 1994
- 5) Palmer, T. D. et al. : Mol. Cell Neurosci., 6 : 474-486, 1995
- 6) Doetsch, F. et al. : Cell, 97 : 703-716, 1999
- 7) Alvarez-Buylla, A. et al. : Nat. Rev. Neurosci., 2 : 287-293, 2001
- 8) Seri, B. et al. : J. Neurosci., 21 : 7153-7160, 2001
- 9) van Praag, H. et al. : Nature, 415 : 1030-1034, 2002
- 10) Eriksson, P. S. et al. : Nat. Med., 4 : 1313-1317, 1998
- 11) Bregman, B. S. et al. : Exp. Neurol., 123 : 3-16, 1993
- 12) Iwanami, A. et al. : J. Neurosci. Res., 80 : 182-190, 2005
- 13) Hitoshi, S. et al. : Genes Dev., 18 : 1806-1811, 2004
- 14) Miyata, T. et al. : Neuron, 31 : 727-741, 2001
- 15) Noctor, S. C. et al. : Nature, 409 : 714-720, 2001
- 16) Temple, S. : Nature, 414 : 112-117, 2001
- 17) Okada, Y. et al. : Stem Cells, 26 : 3086-3098, 2008
- 18) Bibel, M. et al. : Nat. Neurosci., 7 : 1003-1009, 2004
- 19) Brederlau, A. et al. : Stem Cells, 24 : 1433-1440, 2006
- 20) McDonald, J. W. et al. : Nat. Med., 5 : 1410-1412, 1999
- 21) Keirstead, H. S. et al. : J. Neurosci., 25 : 4694-4705, 2005
- 22) Yamada, M. et al. : Stem Cells, 25 : 562-570, 2007
- 23) Kumagai, G. et al. : PLoS One, 4 : e7706, 2009
- 24) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : Cell, 126 : 663-676, 2006
- 25) Takahashi, K. et al. : Cell, 131 : 861-872, 2007
- 26) Miura, K. et al. : Nat. Biotechnol., 27 : 743-745, 2009
- 27) Marchetti, S. et al. : J. Cell Sci., 115 : 2075-2085, 2002
- 28) Schuldiner, M. et al. : Stem Cells, 21 : 257-265, 2003
- 29) Iwanami, A. et al. : J. Neurosci. Res., 80 : 172-181, 2005

<筆頭著者プロフィール>

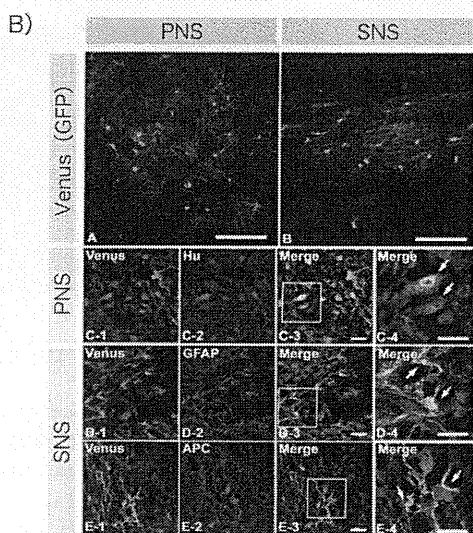
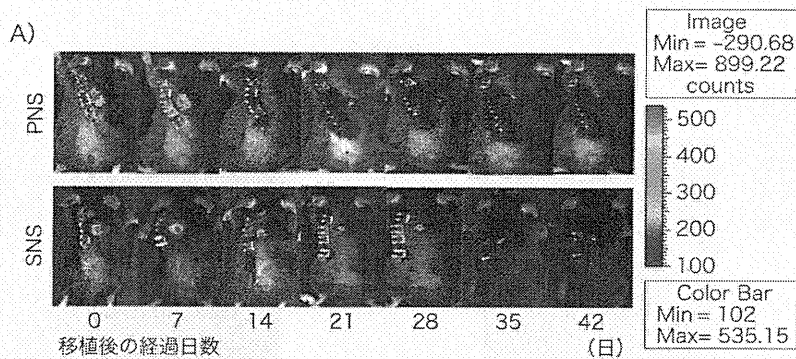
辻 取彦 : 1996年3月 久留米大学附設高等学校卒業, 2003年3月 慶應義塾大学医学部卒業, '03年4月 慶應義塾大学整形外科学教室入局, '04年7月 済生会宇都宮病院整形外科, '05年4月 慶應義塾大学大学院博士課程(外科系整形外科学専攻)入学, '09年3月 同課程修了。現在慶應義塾大学整形外科戸山芳昭教授・中村雅也講師, 同生理学岡野榮之教授の指導のもと, 脊髄損傷患者さんへの再生医療の実現に向け, 大学病院での診療と同時に iPS 細胞移植や神経損傷後の慢性疼痛の研究などに取り組んでいる。

● 図 1



ES細胞由来 primary neurosphere, secondary neurosphereからのニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの分化誘導
(91ページ図2参照, 95ページ文献23より)

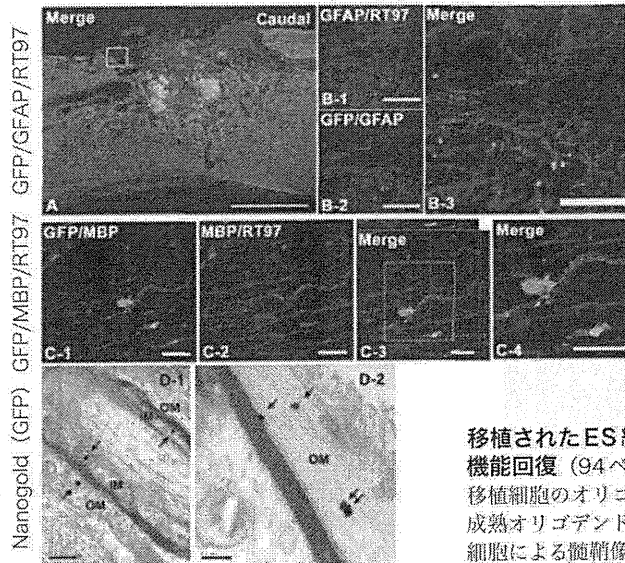
● 図 2



移植されたES細胞由来PNS, SNSの動態
(93ページ図3参照)

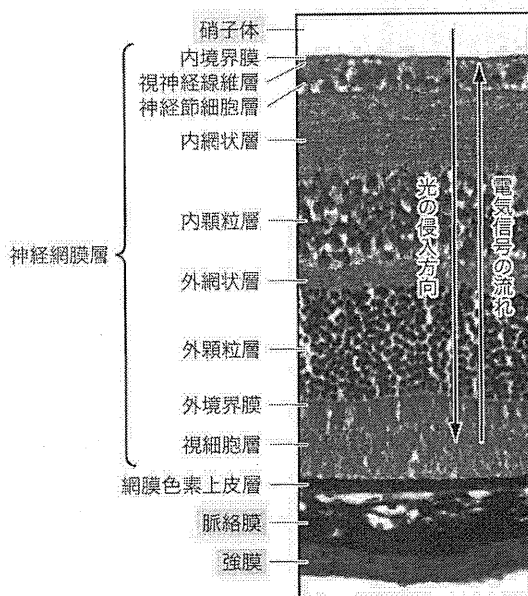
A) ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメー
ジング, 移植後6週の時点で約20%の細胞が生着,
B) 損傷脊髄内での3系統への分化 (95ページ文献
23より)

● 図3



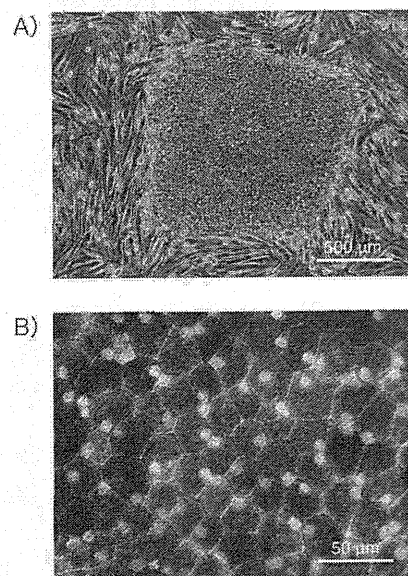
移植されたES細胞由来SNSによる再髄鞘化像と後肢機能回復 (94ページ図4参照)
 移植細胞のオリゴデンドロサイトへの分化像。MBP陽性の成熟オリゴデンドロサイトへと分化し、免疫電顕像にて移植細胞による髄鞘像が確認された (95ページ文献23より改変)

● 図4



網膜の構造 (97ページ図1参照)
 網膜は神経網膜9層および網膜色素上皮層からなる厚さ0.1～0.5 mmの膜状組織である

● 図5



サルモデルを用いた網膜色素上皮細胞移植実験 (100ページ図3参照)
 A) カニクイザル皮膚細胞より作製されたiPS細胞、フィーダー細胞 (写真ではSTO細胞) およびbFGF存在下で未分化状態を維持しながら増殖する。B) SDIA法を用いてA)より分化誘導されたRPE。色素をもつ多角形の細胞が単層上皮を形成する。

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 なか むら まさ や と やま よし あき おかの ひでゆき
金子慎二郎¹⁻⁴・中村雅也¹・戸山芳昭¹・岡野栄之²

¹Keio University School of Medicine, Department of Orthopaedic Surgery

²Keio University School of Medicine, Department of Physiology

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

⁴National 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。

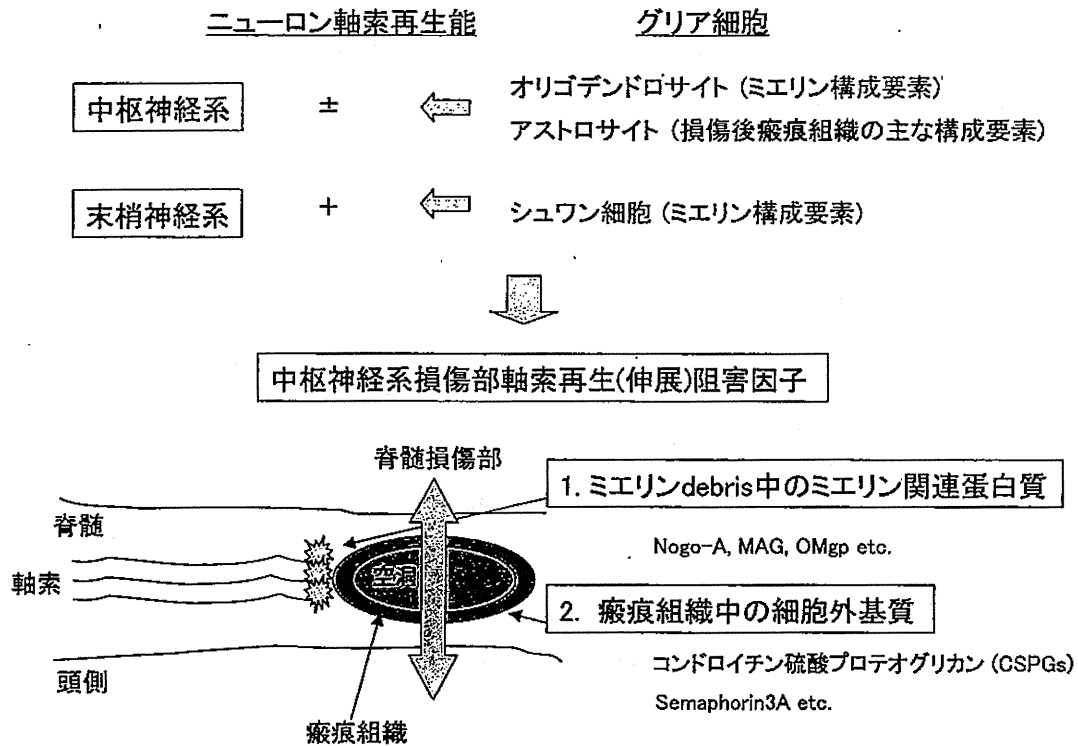


図1 末梢神経系と中枢神経系のニューロン軸索再生能の相違と構成要素の相違の関係/中枢神経系における様々な軸索再生(伸展)阻害因子
 末梢神経系と中枢神経系のニューロン軸索再生能の相違は、その構成要素の相違などとも密接な関係がある。中枢神経系に存在する様々な軸索再生阻害因子は、主に、(1)損傷部ミエリン debris 中等に存在する種々のミエリン関連蛋白質と、(2)損傷部瘢痕組織中に存在する種々の細胞外基質の2つに大別される。

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”(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

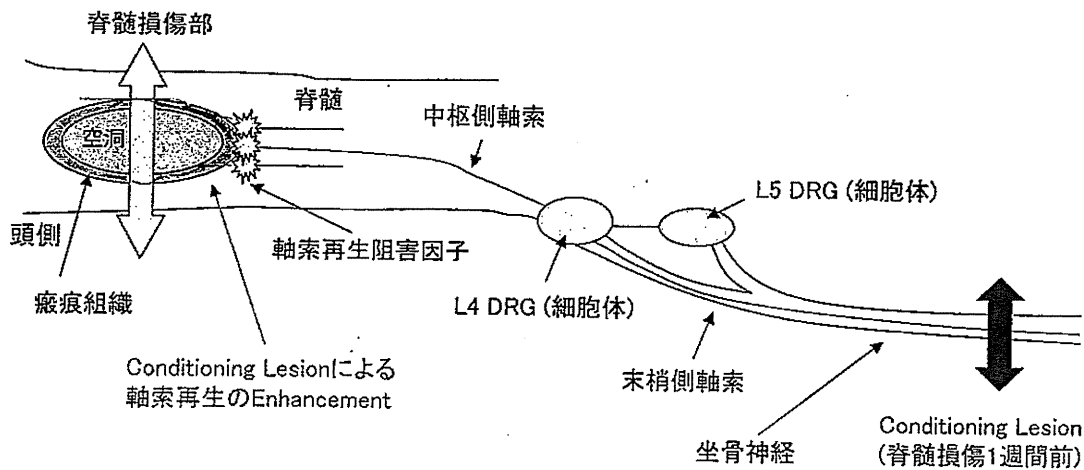


図2 後根神経節 (DRG) ニューロンにおける conditioning lesion モデル
後根神経節 (DRG) ニューロンは、(1)中枢側と末梢側に再生能の異なる2つの軸索 (枝) を持っている、また、(2)脊髄損傷を加える約1週間前に坐骨神経 (末梢側の枝) に損傷を加えておく (conditioning lesion) 事により脊髄損傷後の脊髄 dorsal column (中枢側の枝) における再生が促進される、という2点において軸索再生のメカニズムを調べる上で非常に有用な系である。

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^{4,9)}、OMgp⁹⁾ 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、瘢痕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) 損傷部瘢痕組織中の軸索再生阻害因子

中枢神経系損傷部瘢痕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、グリア瘢痕組織中に存在する 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) による瘢痕組織中に存在する 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などが原因となり、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

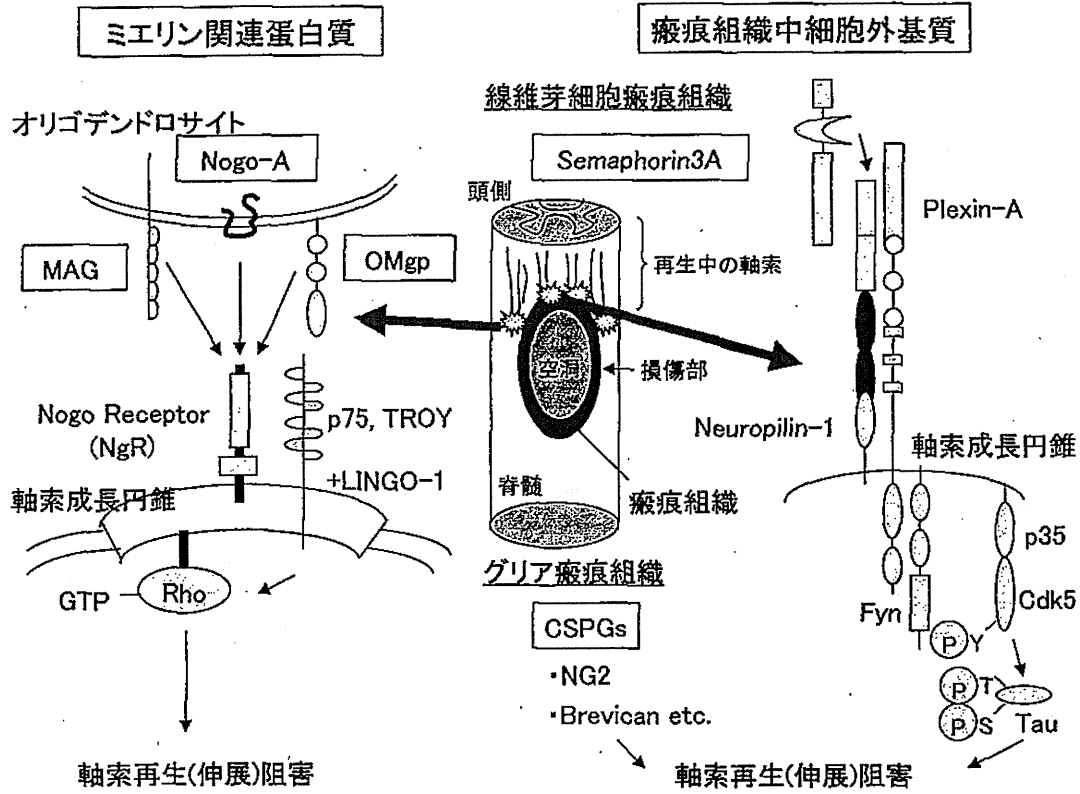


図3 中枢神経系における軸索再生(伸展)阻害因子のシグナル伝達経路
 ミエリン関連蛋白質のうち Nogo-A, MAG, OMgp の3分子は、興味深い事に構造上全く異なる分子でありながら、共通のレセプター、Nogo Receptor に ligand として結合し、その co-receptor として同定された p75, TROY, LINGO-1 などを通じて、軸索再生阻害のシグナルを細胞内に伝達していく。

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きている。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: DWI²¹⁾) 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

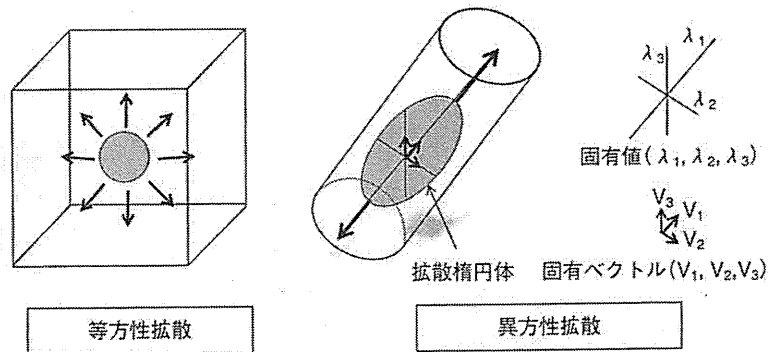


図1 水分子の拡散

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大きい。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

^{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。

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。

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

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

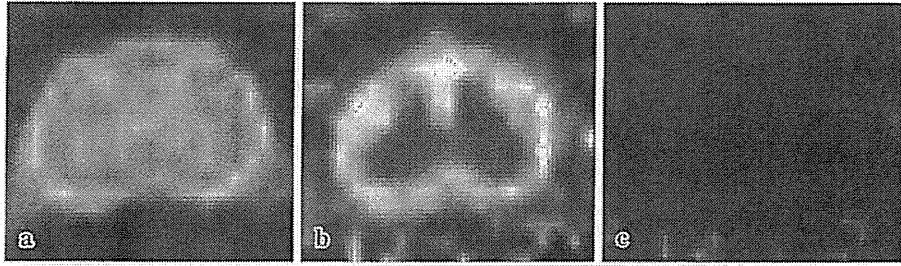


図2 マーモセット脊髄における従来のMRIと拡散テンソルMRI
 コモンマーモセット脊髄(軸位断像)におけるT2強調像(T2 weighted image: T2WI, a)とDTI(b, c)を示す。FAマップ(b)では、異方性の大きい白質線維は高信号を呈している。カラーマップ(c)は異方性を軸ごとに色でコードしており、左右方向は赤、頭尾側方向は青、前後方向は緑でコードすることが多い(RBGカラー)。白質線維は青で描出されており、白質が頭尾側方向の軸索線維から構成されていることを示している。

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などで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RBG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、RBG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行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 IISRを使用している¹⁶⁾。

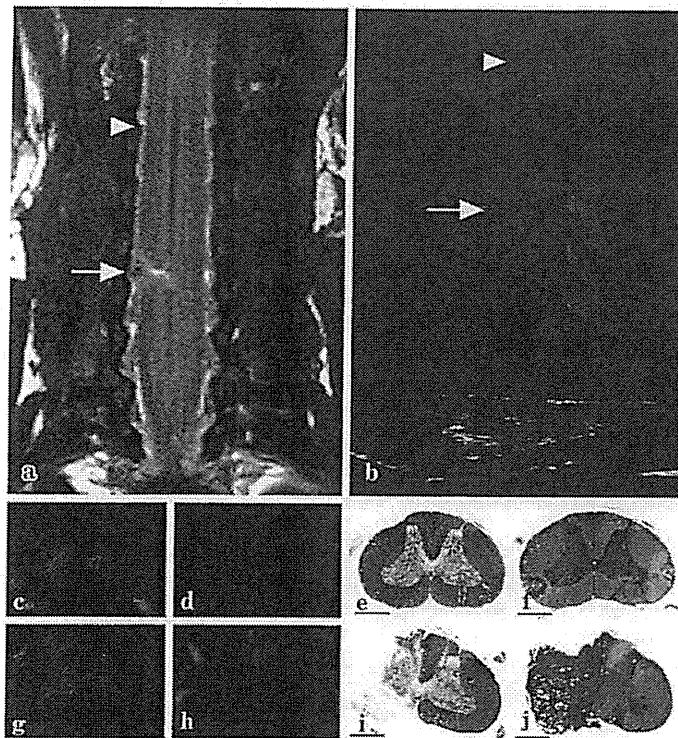


図3 マーモセット脊髄半切モデルにおけるMRI, DTT および組織像 (文献7より引用)

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頭髄 (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。e~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強調画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。