

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。マウスの皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) は CaMK (Ca²⁺/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 DTT (b) を構築することが可能である。

② 霊長類コモンマウセット頭髄における DTT

われわれはヒトに近縁である霊長類コモンマウ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療の報告はないが、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的一次運動野 (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、コモンマウ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⁾、スピネ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頭髄半切損傷 (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ウセット脊髄の 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。

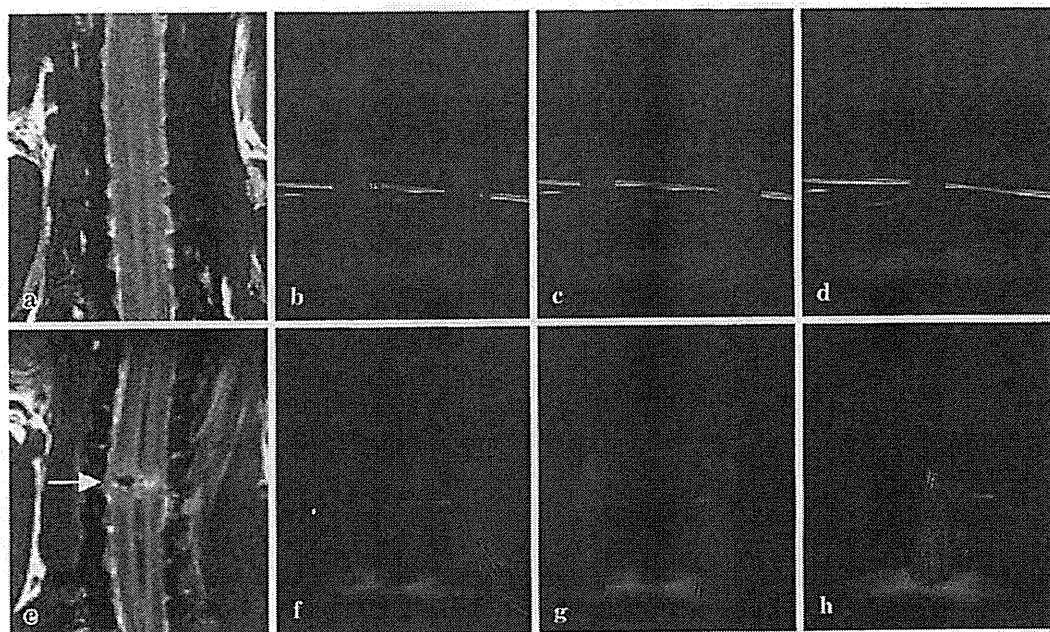


図5 マーモセット脊椎における投射路選択的 DTT (文献7より引用)
ROIの設定を変えることで、生きているコモマーマーモセットの頸椎の投射路選択的 DTT を描出した。a~d は正常な頸椎であり、e~h は脊椎半切モデルである。a, e: T2 強調 MR 像。b, f は皮質脊髄路の DTT, c, g は脊髄視床路, d, h は後索路を示している。DTT は脊椎半切損傷を反映していた。

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 $5 \mu\text{m}$ 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²⁴⁾、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椎における DTT の知見を生かし、すでにならぬ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、後縦靭帯骨化症、脊髄

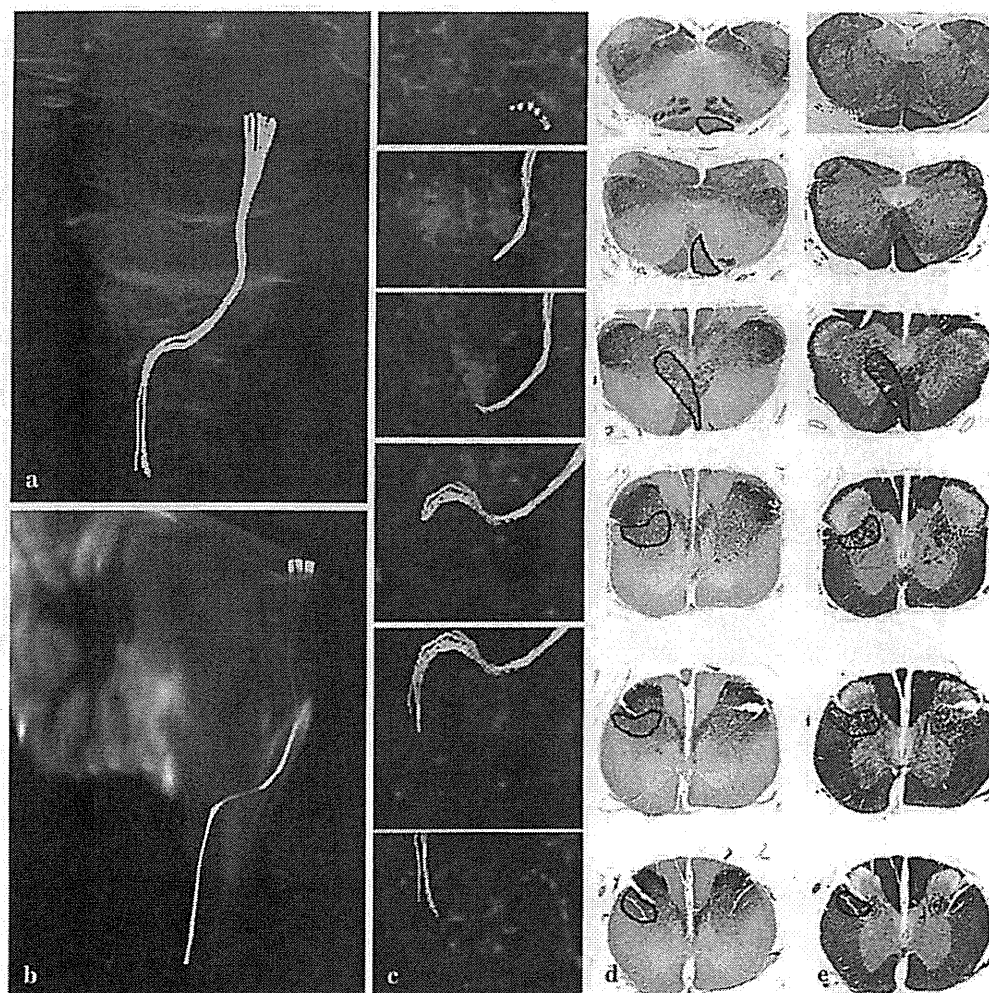


図 6 マーモセット錐体交叉における DTT (文献7より引用)

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

^{註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。

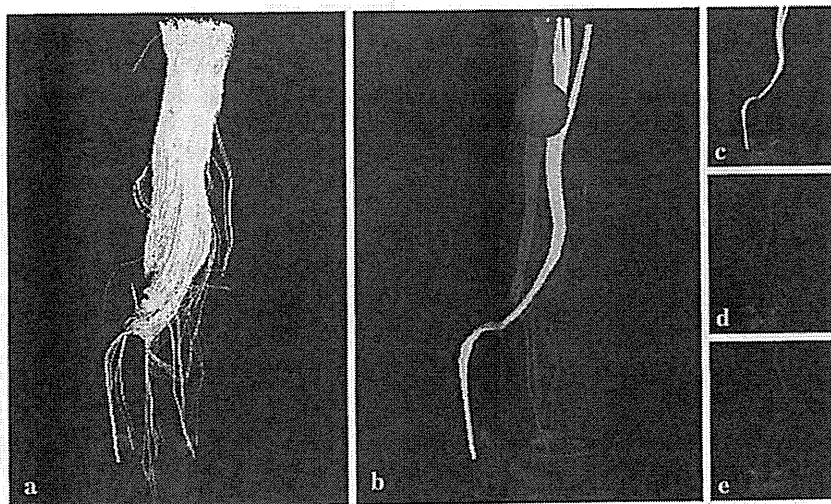


図7 マーモセット延髄における皮質脊髄路のDTT (文献7より引用)
 延髄錐体部における皮質脊髄路は90%が錐体交叉を通るが(c), 数%は同側の側索を下降する線維(赤, d)や, 対側の前索を下降する線維(青, e)が存在することが知られている。DTTはどの経路も明瞭に描出した(b~e)。これらの画像は上位と下位の2カ所にROIを設定することにより描出した。本結果はDTTがある程度の信頼性をもって投射路を描出できることを示唆している。

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、さらに脊髄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 これでわかる拡散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堂町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法でベルテス様変化をきたした症例の検討
 ベルテス病の治療・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、ウェブサイトのみに募集します。

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后

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

中枢神経系と末梢神経系の再生戦略*

岡野 栄之¹⁾, 辻 収彦^{1), 2)}, 三浦 恭子^{1), 3)}, 岡田 洋平¹⁾,
藤吉 兼浩^{1), 2)}, 高木 岳彦^{1), 2)}, 金子慎二郎^{1), 2)}, 戸山 芳昭²⁾,
山中 伸弥³⁾, 中村 雅也²⁾

要旨 中枢神経系(脳と脊髄)は、再生が困難な臓器の代表例と考えられてきた。しかしながら、我々を含むいくつかのグループにより、ヒトを含めた哺乳類の成体の中枢神経系にも幹細胞が存在し、成体の脳内でニューロン新生が起きるとが示されてからこの状況は、大きく変わりつつある^{1), 2), 3)}。中枢神経系の再生というと、①神経軸索の再生、②疾患によって失われた細胞の補充、③機能回復という3つの側面を意味している⁴⁾。ここでは、中枢神経系を中心に、末梢神経系と比較しながら、両者の再生能力の違いを含め、再生医療に到る基礎研究・現状を紹介し、今後の展望について議論したい。

Key Words: Regeneration (再生), Semaphorine (セマフォリン), neural stem cell (神経幹細胞), induced pluripotent stem cell (iPS cell) (人工多能性幹細胞), transplantation (移植)

Peripheral Nerve 2010; 20(2): 145-151

1. 神経軸索の再生

中枢神経系においては末梢神経系とは異なり軸索再生が起こりにくいということは、広く知られてきた事実である。近年、このよく知られた現象の裏には、実は軸索再生を阻害する中枢神経特有のメカニズムが存在することが明らかとなっており、この阻害機構をターゲットとした研究が進んでおり、まさに軸索再生を目指した創薬研究のホットな題材となってきた。特に脊髄損傷における損傷部以下のレベルにおける麻痺は、神経軸

索の断裂等に起因しており、損傷脊髄内での軸索再生の誘導が大きなテーマとなってきた。では、中枢神経系における軸索再生が何故難しいのか?この問題については、神経軸索の再生阻害活性を持つ膜蛋白が中枢神経系の髄鞘(ミエリン)に存在することが指摘されていたが、近年までその物質的な同定はなされていなかったのである。しかし現在では、中枢神経系における軸索再生阻害を担う分子の解明が進み、1. 中枢ミエリン由来タンパク質、2. グリア瘢痕由来の糖タンパク質、3. 線

Strategies for the regeneration of central and peripheral nervous systems.

¹⁾ Hideyuki OKANO, Osahiko TSUJI, Kyoko MIURA, Yohei OKADA and Kanehiro FUJIYOSHI: 慶應義塾大学医学部生理学教室 [〒160-8582 東京都新宿区信濃町35]: Departments of Physiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

²⁾ Osahiko TSUJI, Kanehiro FUJIYOSHI, Takehiko TAKAGI, Shinjiro KANEKO, Yoshiaki TOYAMA and Masaya NAKAMURA: 慶應義塾大学医学部整形外科教室 [〒160-8582 東京都新宿区信濃町35]: Departments of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo

³⁾ Kyoko MIURA and Shinya YAMANAKA: 京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53]: Center for Induced Pluripotent Stem Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto

維性癱瘓由来因子に大別されている⁵⁾。

いくつかのグループにより、中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞膜に存在する再生阻害因子がNogoというligand分子として同定された。さらに、Nogoタンパク質の細胞外領域に対する結合するタンパク質分子としてNogo受容体が発見され、この受容体に結合するligand分子としてMAG、OMgpといったミエリン由来軸索再生阻害因子が次々と同定された現在ではオリゴデンドロサイトの細胞膜表面に存在するNogo、OMgp、MAGはニューロンに存在するNogo受容体に結合し、p75分子を共役分子として、細胞内へシグナルを伝え、低分子量タンパク質Rhoの活性化と、それに引き続くアクチン分子の重合阻害により、軸索突起の発芽や軸索再生を抑制するものと考えられている。注目すべきは、中枢ミエリン特異的なNogoやOMgpとは異なり、MAGは、中枢神経系のみならず、末梢神経系のミエリンの構成成分でもあり、末梢神経系の軸索の再生を制御する因子の一つといえよう⁶⁾。

一方、グリア癱瘓由来した細胞外基質であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(chondroitin sulfate proteoglycan, CS-PG)が再生阻害タンパク質として重要である可能性が指摘されている。CS-PGは損傷周囲のグリア細胞から放出され、培養系でも軸索の伸展を阻害することが確認されている物質である。CS-PGによる再生阻害にはグルコサミノグリカン鎖による修飾が必要であることがわかっており、損傷部位にこのグルコサミノグリカン鎖を分解する酵素であるコンドロイチナーゼABCを投与することによって軸索の再生、運動機能の回復がみられたという報告がある⁷⁾。我々の研究グループの池上らは、脊髄損傷モデルラットへ神経幹細胞移植とコンドロイチナーゼABCの併用により、単独使用群と比べてより大きな神経軸索再生効果が得られたことを明らかにしている⁸⁾。CS-PGの受容体分子は、長年謎であった

が、最近の研究により、膜貫通型タンパク質脱リン酸化酵素であるPTPsigmaが、CS-PGの受容体であることが明らかになってきている。興味深いことに、PTPsigmaのノックアウトマウスにおいては、脊髄損傷後のCS-PG陽性のグリア癱瘓部分における軸索再生が誘導されることが明らかになってきている⁹⁾。

線維性癱瘓からは、セマフォリン、エフリンなどの軸索伸長阻害因子が供給されることもわかっており、われわれの研究グループにおいても、大日本住友製薬との共同により、新規のセマフォリン3A阻害剤xanthofulvinによる脊髄の軸索再生誘導と機能回復に成功している¹⁰⁾。セマフォリン3Aは、Neuropilin-1分子を受容体としており、その共役受容体であるPlexin-Aや非受容体型チロシンキナーゼFynなどを介して軸索伸長阻害活性を示す。同セマフォリン3A阻害剤は、セマフォリン3Aに結合し、セマフォリン3AのNeuropilin-1分子への結合をブロックすることにより、その活性を示す。我々は、脊髄損傷モデル成体ラット(第8胸椎レベルでの完全切断モデル)へ上記のセマフォリン3A阻害剤を4週間に渡って投与し、損傷14週間後に解析したところ、同阻害剤投与群では対照群と比較して有意に神経軸索の再生が誘導されることを観察した。また同阻害剤投与により、神経軸索の再生以外に、損傷部に末梢神経系タイプのミエリン形成細胞であるシュワン細胞が移動し、再生したと思われる軸索に対してPoタンパク質陽性の末梢神経型のミエリンの形成が誘導されることを確認している。さらには、損傷部における細胞死を抑制したり、セマフォリン3AのNeuropilin-1分子への結合をブロックするため、血管誘導因子であるVEGFがおそらくNeuropilin-1分子との結合が促進されることにより血管新生などの種々の再生機転を促していることを明らかにした。次に、我々は同阻害剤投与群で、同上の脊髄損傷ラット(上記の完全切断モデル)の機能回復への効果

を検討した。対照群では、脊髄完全切断による後肢の完全麻痺は全く回復しなかったが、同阻害剤投与群では後肢の運動機能が有意に回復し、この回復が脳幹に起始し、脊髄を下降するセロトニン作動性ニューロン（縫線核脊髄路）の軸索再生によることを明らかにした。これらの報告を鑑みると、今後こういった分子の発現の誘導を制御し、軸索の伸展を許容する環境を作ることが、治療方法の開発において重要なテーマとなることは間違いない。

一方、このような齧歯類を用いた軸索再生の*in vivo*実験モデルには、限界があるのも事実である。第一の理由として、脊髄の構造と機能は、下行性線維の局在部位や局所の神経連絡など、種間、特に我々霊長類と齧歯類で著しく異なっている¹¹⁾。さらに、これまでの神経再生モデルでは、再生を誘導することが期待される薬剤や細胞移植を投与し、運動機能の回復などの観察により、十分効果が確認された後に、神経組織を固定し、標本作製し、神経軸索の再生を組織化学的に確認することが解析法の主体であった。すなわち、動物の運動機能の回復と平行し、神経軸索の再生がどの程度起きているか？をリアル・タイム性を持って解析できていなかった。このような弱点を補うために我々は、小型霊長類であるマーモセットの脊髄損傷モデルを作成し、脊髄損傷における神経軸索の状況を可視化することを試みた¹²⁾。現在の医療の場において、MRIは脊髄損傷患者の診断と治療の計画をたてるために必要不可欠である。われわれが作成したマーモセットの脊髄損傷モデルにおいても、MRIが脊髄損傷後の組織の変化を反映していた。しかし従来のT1やT2強調像によって得られる脊髄の情報からは、白質と灰白質を明瞭に区別するのは困難である。従来のMRIは白質を均一な組織として描出するが、脊髄白質は実際には方向性を持った神経線維が複雑に配列している。長い間、生き

たまの動物で白質の脊髄投射路を可視化する方法が求められていたが、近年、拡散テンソルトラクトグラフィ（Diffusion Tensor Tractography）（以下DTT）がこの能力を持つことが明らかとなった。拡散テンソルイメージング（拡散テンソルMRIと同義、以下DTI）によって得られたデータを解析し3次元に再構築することによってDTTが得られるが、DTTは例えば皮質脊髄路（Corticospinal Tract, ST）のような脳内の特定の神経投射路の走行を追跡することが可能である。しかし、依然としてDTTが解剖学的な軸索線維をどの程度反映しているのか、実際に組織と比較検討した報告はなかった。そこで我々は、マーモセットの正常および損傷脊髄におけるDTTを行い、組織と比較することでDTTの精度と有用性を検証した。本研究では高分解能の画像を得るために7.0テスラーのMRIを用い、磁化率の影響を最小限にするためスピンエコー法を使用した。さらに、生体内の動きの影響を除去するため、まず最初に死後モデルを用いて解析を開始した。死後モデルを用いることで平均約10時間という長時間のMRI走査を行うことが可能となり、結果として高い空間分解能をもった画像を取得した。生きている動物を使った系では、すべての動物は全身麻酔を維持し、生体内の動きの影響を最小限にするために心臓（による影響）を制御した撮像方法を導入した。全身麻酔の下、マーモセットを特別に設計された頭部固定装置のついたアクリルベット上に固定した。麻酔上の問題により撮影時間は平均で1.5時間に抑えられ、そのために撮像範囲と空間分解能は死後モデルに比べて制限された。しかしDTTが生体内の神経経路を明らかにできる唯一の利用できる、発達した方法であるため、DTTが生きている動物の正常な投射路だけでなく途絶した投射路をも可視化したことは非常に重要なことである。

CSTは運動機能に関して最も重要な経路で

あり、しばしば脊髄損傷治療のプロトコールにおいて精査の対象になるため、本研究では特にCSTに焦点を絞って投射路選択的DTTを行ってきた。CST選択的DTTは実際に延髄から脊髄におけるCSTの走行を描出し、これまでDTTによる可視化は不可能と考えられてきた錐体交叉の描出をも可能とした。さらに脊髄半切モデルにおけるCST選択的DTTは、損傷部におけるCSTの途絶を明らかにした。

さらに我々は、DTT法によるイメージングを末梢神経の再生研究への応用を試みた。MRIは臨床の現場では欠かせないツールであるが、末梢神経の場合、周囲組織とのコントラストがつきにくいことから、その疾患の診断に適用されることはまれであり、理学所見や電気生理学的所見による侵襲的な補助診断に頼るのが現状である。これまでMRIによる末梢神経可視化の様々な試みがなされている。MR neurographyでは末梢神経を描出するように特別な撮像条件が設定されているが、定性的かつ主観的なものであり加えて神経線維の連続性を描出することは不可能であるため末梢神経再生を追跡することができない。神経線維を描出する他の方法としては超常磁性酸化鉄やガドリニウム製剤のような造影剤の注射であるが、侵襲を伴う。そのためこれらの方法では現在の臨床の現場で末梢神経損傷を評価するには困難である。これらの欠点を克服するため、DTT法に注目した。実験では、ラットの坐骨神経に圧挫損傷を加え、拡散テンソルイメージングから得られたデータを解析した¹³⁾。このデータによって得られる画像であるDTTについては拡散異方性の指標であるfractional anisotropy (以下FA) 値の閾値が0.4以上の異方性の強いところを任意の関心領域より追跡して描くと損傷神経の回復過程を明確に描出することが可能であった。損傷後早期では近位から描かれた線維は損傷部を越えて描かれないが、時間が経ち損傷部のFA値が回復してくると徐々に損傷部を越え

て描けるようになり、損傷後3週で損傷前と同水準まで回復した。またこのDTTを描く指標となっているFA値と組織や機能評価の結果と比較した。末梢神経のFA値は髄鞘密度、髄鞘幅に比べ軸索密度、軸索径により強い相関を示した。この結果はこれまで報告されている軸索が髄鞘に比べ水分子の拡散異方性において重要な役割を果たしている仮説を支持するものであった。運動並びに機能評価についてはいずれも評価法においても損傷後1日に最も低下し、その後徐々に回復し6週には損傷前と同水準にまで回復した。これらの運動並びに知覚機能の回復は損傷部のFA値の回復と強い相関を示した。このように、組織学的、機能的変化とFA値との相関性が見出されたことで末梢神経のワーラー変性や再生に関わる種々の臨床的病態を評価するのに有用である可能性が示唆されるに至った。さらに今後の臨床応用に向けこの方法の有用性をみるため、生きたモデルにおけるさらに小さな神経を用いて撮像を試み、このトラクトグラフィによって同一の動物で圧挫された神経の回復過程を描出することに成功した。以上より、末梢神経のDTTはその特性と限界を明確に理解した上で、末梢神経損傷の評価に革新的なツールとなることが示唆される。

2. 細胞移植と細胞の補充

軸索再生の誘導に加えて、脊髄損傷の治療法として、脊髄損傷をきたす物理的なダメージ(一次損傷)に加えて、それに引き続く炎症・免疫学的反応などによる二次損傷によって失われたり、損傷を受けたニューロンやグリア、さらには血管系などを修復・補充するためには、幹細胞移植が期待されている¹⁴⁾。これまで私達は、既存の齧歯類の脊髄損傷モデルに加え、マーモセットを用いた霊長類の脊髄損傷モデル(C5レベルの圧挫損傷モデル)を独自に開発し¹⁵⁾、細胞移植をはじめとするいくつかの治療手段の有効性を検証して

きた¹⁶⁾。移植する細胞は、胎児由来神経幹・前駆細胞、ES細胞由来神経幹・前駆細胞、iPS細胞（後術）由来神経幹・前駆細胞、神経堤幹細胞などを検討してきた。例えば、この霊長類脊髄損傷モデルを活用し、ヒト胎児由来神経幹・前駆細胞移植を損傷後9日目に行った。2ヶ月後、移植したヒト胎児由来神経幹・前駆細胞は損傷部周囲に生着し、さらに頭尾側に移動し、ニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへと分化していることを確認した¹⁶⁾。運動機能評価においても移植群では非移植群と比較して有意な3次元自発運動量と上肢筋力の改善が得られた。脊髄損傷動物に対する神経幹細胞移植による機能回復のメカニズムとしては、解析していくと単に細胞補充だけではなく、次の3つの効果が考えられる。

①移植した神経幹・前駆細胞由来の介在ニューロンによる損傷脊髄内の局所神経回路網の部分的な修復、

②移植した神経幹・前駆細胞由来の幼弱なアストロサイトが産生する神経栄養因子・サイトカイン・細胞増殖因子や細胞外マトリックスによる細胞非自律的な栄養効果（宿主神経軸索の再生誘導、血管新生誘導）、

③移植した神経幹・前駆細胞由来のオリゴデンドロサイトによる宿主神経軸索の再髄鞘化

この研究結果は、将来における神経幹細胞移植の臨床応用の実現に向けた大きな前進と考えられた。しかし、我が国の「ヒト幹細胞を用いた臨床研究指針」（2006年施行）では、改正（2010年）後も、胎児由来の体性幹細胞は対象外であり、モラトリアム状態もしくは事実上の禁止状態が続いている。一方米国では、ステムセル社（StemCells, Inc.）による palmitoyl protein thioesterase-1（PPT1）というライソゾーム酵素欠損症（Batten病）に対する、胎児由来ヒト神経幹細胞（HuCNS-SC細胞）移植の臨床試験が進んでいる（第I相

終了）¹⁷⁾。

我が国では、現時点では、ES細胞も「ヒト幹細胞を用いた臨床研究指針」の対象外であり、倫理的なハードルの低い成体組織由来の神経系の前駆細胞を用いた細胞移植治療の開発に、我々も集中することに方針を変更した。成体組織由来の神経系の前駆細胞のソースは、前述したiPS細胞（人工多能性幹細胞）由来神経幹・前駆細胞、神経堤幹細胞¹⁸⁾などが期待できる。

皮膚などの体細胞にOct4, Sox2, Klf4, c-Mycといった少数の転写因子の遺伝子導入を行い、核情報のリプログラミングの結果を誘導した結果、ES細胞に類似した多能性幹細胞、すなわちiPS細胞が得られることが2006年に示された¹⁹⁾。iPS細胞技術を用いることにより、ES細胞使用に伴う免疫拒絶や倫理的な問題が回避されと考えられ、将来の再生医療への応用が期待されている。2006年の秋には、iPS細胞の脊髄損傷への応用に向け慶應義塾大学と京都大学との共同研究チームが発足した。起源細胞や樹立法の異なる計36種類のマウスiPS細胞株を用い、これらをマウスES細胞で我々が構築してきた分化系を用いて神経幹・前駆細胞への分化誘導を行った。誘導された神経幹・前駆細胞を免疫不全マウス脳へ移植した解析から、神経幹・前駆細胞細胞集団中に未分化な細胞が残存している場合は移植によりテラトーマが発生し、iPS細胞由来神経幹・前駆細胞（ニューロスフェア）の腫瘍源性（テラトーマ形成の危険性）は、iPS細胞樹立時の起源細胞に依存していることが明らかとなった²⁰⁾。次に安全性についての厳格な評価により、すなわちiPS細胞由来の神経幹・前駆細胞集団中に分化抵抗性の未分化細胞の含量が検出されず、iPS細胞由来の神経幹・前駆細胞移植によりテラトーマ形成の危険性が低いことが示された事により、安全性の担保されたiPS細胞株（38C2株）を同定した。同iPS細胞株から誘導された神経幹・前駆細胞移植の

脊髄損傷への治療効果が証明された²¹⁾。また、成体線維芽細胞より樹立されたiPS細胞由来の神経幹・前駆細胞の損傷脊髄への移植により、安全なiPS細胞株とそうでない細胞株の差が明瞭となった。このことは、iPS細胞を用いた再生医療において安全な細胞株を前もって準備するという他家移植の重要性を示唆している。運動機能の回復のメカニズムは、前出の神経幹細胞移植とほぼ同様のメカニズム(①~③)によるものと考えられる。現在、我々はヒトiPS細胞由来の神経幹細胞を用いた脊髄損傷モデルへの移植実験を進めている。

3. 機能回復

機能的な再生は、患者さんのQOLを考えると、治療上最も重要なものとなり、必然的に再生医療の一環としての機能再生を目指したリハビリテーション医学が必須のものとなってくる²¹⁾。上記の1. 神経軸索の誘導、2. 細胞移植と細胞補充のいずれもが、発生現象の再現を狙ったものであるが、発生過程では、シナプス形成を含むいろいろなイベントが、でたらめとまで言わないが比較的大雑把に進行し、その後神経系の機能成熟に伴い、activity-dependentに精細なものに集約していくことが知られている²²⁾。おそらく、中枢神経系の再生医療の過程に起きる機能再生過程においても同様なことが起きているものと予想出来る。従って、この観点からも、再生医療に伴う機能再生を増強するためにもリハビリテーションの効果が期待されている。現在臨床の現場で行われている亜急性および慢性期の脊髄損傷の患者さんを対象としたリハビリテーション療法として、体重を支えるトレッドミル・トレーニングによる歩行訓練や非麻痺側上肢抑制療法(麻痺側の上肢の強制使用)などが行われているが、これもこのような効果を狙ったものと考えられる。しかしその一方、臨床応用が始まっているとは言え、これらの治療法の神経メカニズムの解明には、

やはり再生医学的あるいは神経科学的な観点からの動物実験を用いた検討が必須のものとなる。メカニズムが解明されると、それが更に治療法の改善にもつながるであろう。この観点から、私達も、前出のセマフォリン3A阻害剤とリハビリテーションの併用によるラットの脊髄損傷の実験的治療を行っている。今後、さらに再生医療の治療効果を引き出すためにも、霊長類脊髄損傷モデルとBrain Machine Interface (BMI)を用いた次世代のリハビリテーションと再生医療の併用についても検討を行いたいと考える。これらの集学的な検討が、よりよい神経系の再生医療の開発につながるものと確信する。

文 献

- 1) Roy NS, Wang S, Jiang L, *et al.* In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 2000; 6: 271-277.
- 2) Okano H, Sawamoto K: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363: 2111-21122.
- 3) Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. *Proc Jpn Acad, Ser B* 2010; 86: 438-450.
- 4) Okano H. Making and repairing the mammalian brain: Introduction. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14: 159.
- 5) Okano H, Kaneko S, Okada S, Iwanami A, Nakamura M, Toyama Y. Regeneration-based therapies for spinal cord injuries. *Neurochem Int* 2007; 85: 2332-2342.
- 6) Shen YJ, DeBellard ME, Salzer JL *et al.* Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol Cell Neurosci* 1998; 12: 79-91.
- 7) Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ *et al.* Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 2002; 416: 636-640.
- 8) Ikegami T, Nakamura M, Yamane J *et al.*

- Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances their migration and axonal regeneration after rat spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 3036-3046.
- 9) Shen Y, Tenney AP, Busch SA *et al.* PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* 2009; 326: 592-596.
 - 10) 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: 1380-1389.
 - 11) Lemon RN. Descending pathways in motor control. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 195-218.
 - 12) 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* 2007; 27: 11991-11998.
 - 13) Takagi T, Nakamura M, Yamada M *et al.* Visualizing for peripheral nerve degeneration & regeneration: Monitoring with diffusion tensor tractography. *NeuroImage* 2009; 44: 884-892.
 - 14) Ogawa D, Okada Y, Nakamura M *et al.* Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res* 2009; 87: 307-317.
 - 15) Iwanami A, Yamane J, Katoh H *et al.* Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Non-human Primate: the Common Marmoset. *J Neurosci Res* 2005; 80: 172-181.
 - 16) Iwanami, A., Kakneko, S., Nakamura, M. *et al.* Transplantation of human neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmoset. *J Neurosci Res* 2005; 80: 182-190.
 - 17) Tamaki SJ, Jacobs Y, Dohse M *et al.* Neuroprotection of host cells by human central nervous system stem cells in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 310-319.
 - 18) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y *et al.* Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad of Adult Rodents. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 392-403.
 - 19) Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
 - 20) Miura K, Okada Y, Aoi T. *et al.*, Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnol* 2009; 27: 743-745.
 - 21) Tsuji O, Miura K, Okada Y *et al.* Therapeutic effect of the appropriately evaluated 'safe' iPS cells for spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 12704-12709.
 - 22) 岡野 栄之: 幹細胞医学の進展と中枢神経系の再生戦略. *あいみっく* 2010; 31: 3-6.
 - 23) Goodman CS, Shatz CJ. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 1993; 72: Suppl: 77-98.

脊髄損傷に対する iPS 細胞および 神経堤幹細胞移植^{*1}

辻 収彦^{*2,3} 名越 慈人^{*2,3,4} 藤吉 兼浩^{*2,3}
戸山 芳昭^{*2} 岡野 栄之^{*3} 中村 雅也^{*2}

はじめに

難治性神経疾患に対する細胞移植治療の有効性は、研究レベルにおいて多数報告されている。当研究室においても、これまでに脊髄損傷に対する齧歯類胎仔由来神経幹細胞移植の有効性^{20,21,23)}や、ヒト胎児由来神経幹細胞移植の霊長類コモンマウスセット脊髄損傷モデルへの有効性^{8,9)}を報告してきた。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仔/胎児由来の幹細胞であり、倫理的な問題から臨床応用へと踏み切るのが難しい状況である。また、骨髄や脂肪などの成体組織において、神経細胞を生み出す幹細胞が存在し、それらを用いた移植研究の報告が散見されるが、移植細胞自体の発生学的根拠が明らかでないことが多い。そんな中、2006年に京都大学の山中のグループ³²⁾により人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) が世界で初めて報告

された。iPS 細胞は線維芽細胞などの体細胞に初期化因子 (例 : *Sox2*, *Oct3/4*, *Klf4*, *c-Myc* などの遺伝子) を導入することにより、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等にリプログラミングされ、多能性を獲得した幹細胞である。また、iPS 細胞に加えて、われわれ¹⁸⁾は成体幹細胞である神経堤幹細胞にも着目して研究を進めてきた。iPS 細胞および神経堤幹細胞は成体の自家組織から採取が可能であるため、安全性が高く、倫理的・免疫学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 細胞および神経堤幹細胞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2006年の山中のグループによる iPS 細胞の発表以降、慶應義塾大学と京都大学で、脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経幹細胞移植の共同研究を開始した³²⁾。まず、当研究室の岡田ら²²⁾が独自に開発したマウス ES 細胞の神経幹細胞への誘導培養法をマウス iPS 細胞に応用し培養

Key words

脊髄損傷 (spinal cord injury)
人工多能性幹細胞
(induced pluripotent stem cell : iPS cell)
神経堤幹細胞 (neural crest stem cell)

^{*1} Cell Therapy for Spinal Cord Injury Using Induced Pluripotent Stem Cells and Neural Crest Stem Cells

^{*2} 慶應義塾大学医学部整形外科学教室 (〒162-8582 新宿区信濃町 35) / Osahiko TSUJI, Narihito NAGOSHI, Kanehiro FUJUYOSHI, Yoshiaki TOYAMA, Masaya NAKAMURA : Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

^{*3} 慶應義塾大学医学部生理学教室 / Hideyuki OKANO

^{*4} 国立病院機構村山医療センター整形外科

を行った。この方法は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を取り除いて未分化 iPS 細胞の浮遊培養を行い、3 胚葉に由来する細胞を含む胚様体 (embryoid body : EB) を形成させ、その後いわゆる “ニューロスフェア法^{26,27)}” により神経幹/前駆細胞を多く含むニューロスフェアを得る方法である¹³⁾ (詳細は本特集の熊谷らの論文を参照)。この方法により、*Nanog* 遺伝子発現を指標として樹立された *Nanog*-iPS 細胞²⁴⁾ の各クローンからニューロスフェアの作製に成功し、これらのニューロスフェアは接着培養によりニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系 3 系統へと分化する多分化能を有することが示された (図 1)。

ついで、これらのニューロスフェアの安全性を確認するため、当研究室の三浦ら¹⁷⁾ はマウス iPS 細胞 36 クローンから誘導したニューロスフェアを用いて、それぞれを免疫不全マウスである NOD/SCID マウス (B 細胞, T 細胞を欠失しており、免疫拒絶反応がないといわれている) の大脳 (線条体) に移植を行い、腫瘍形成能と樹立時の *c-Myc* 遺伝子の有無や薬剤選択の有無¹⁹⁾ との相関について解析を行った。予想と反して、癌遺伝子である *c-Myc* の有無は腫瘍形成能との相関がなく、樹立時に用いた細胞の由来 (origin) のみで統計学的有意差があった。すなわち、樹立時の細胞が胎児由来のものであるか (例 ; mouse embryonic fibroblast : MEF 由来)、成体由来のものであるか (例 ; tail tip fibroblast : TTF 由来) によって、最も強く規定されていた。成体由来 iPS 細胞はより腫瘍形成をしやすい傾向があり、将来の臨床応用に向けては、成体から自身の細胞より iPS 細胞を樹立して移植を目指すのが現時点での理想的な戦略ではあるが、移植前に慎重な安全性の検討を行うことが重要という結果であった。また、腫瘍形成能は、成体由来 iPS 細胞より低いとはいえ、胎児由来 iPS 細胞も腫瘍を形成するかどうかは、ニューロスフェアまで分化誘導した際に残存する未分化細胞の比率と関係があることも明らかとなった。さらに、iPS 細胞ニューロスフェア移

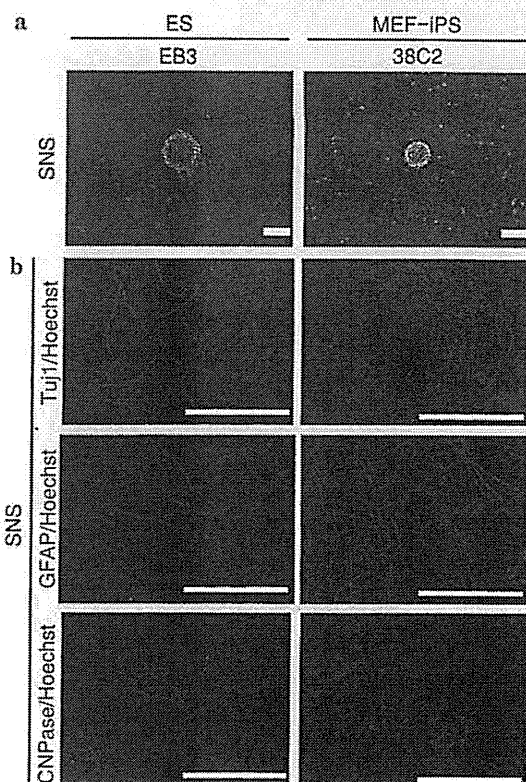


図 1 *Nanog*-iPS 細胞 (38C2 クローン) から誘導したニューロスフェア (文献 34 を改変)

a : ES 細胞 (EB3) と *Nanog*-iPS 細胞 (38C2 クローン) から誘導したニューロスフェアの明視野像。SNS : 二次ニューロスフェア (継代を一度経たニューロスフェア)。Scale bar : 100 μ m。

b : *In vitro* で分化誘導した ES 細胞および *Nanog*-iPS 細胞由来ニューロスフェア。Tuji1 陽性のニューロン, glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性のアストロサイト, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) 陽性のオリゴデンドロサイト (それぞれ赤色) の神経系 3 系統へと正常に分化している。Scale bar : 100 μ m。

植に向けては、未分化細胞がほとんど含まれておらず、かつ免疫不全マウス大脳への移植実験を経て 24 週間にわたって腫瘍をまったく形成しなかった、安全なクローンを選ぶべき、との結果であった¹⁷⁾。

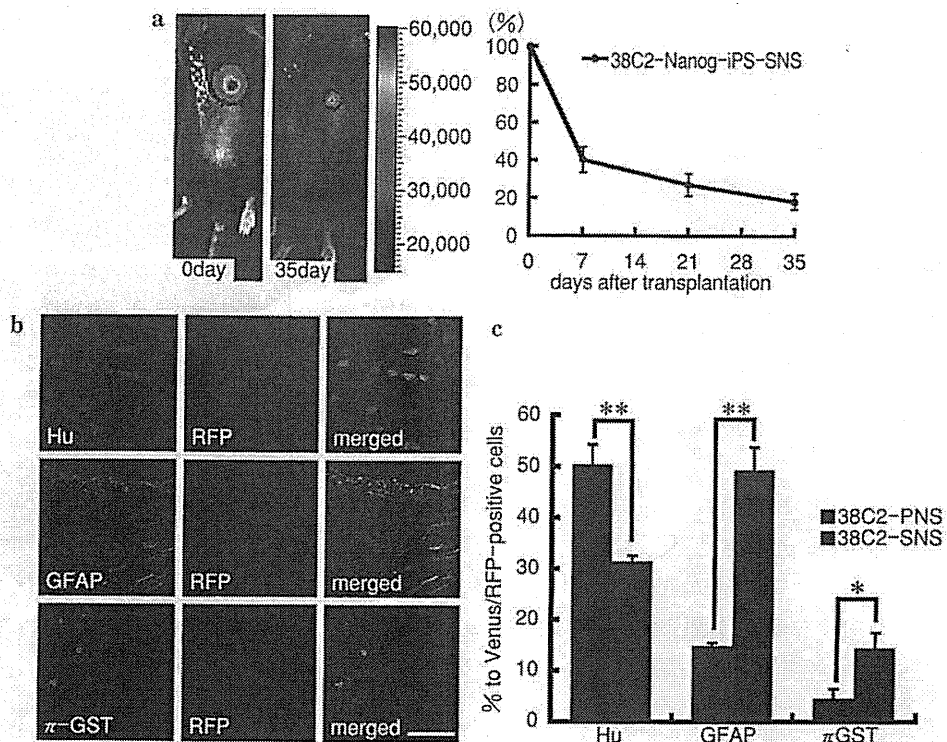


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株(38C2クローン)由来ニューロスフェアの動態(文献34を改変)

- 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5週の時点で約20%の細胞が生着している。
 b: iPS細胞由来ニューロスフェアは損傷脊髄内において神経系3系統へ分化する。RFP:移植細胞, Hu:ニューロンマーカー, GFAP:アストロサイトマーカー, π-GST:オリゴデンドロサイトマーカー。Scale bar: 50 μm。
 c: 38C2クローン由来ニューロスフェアの*in vivo*での分化効率。PNS:一次ニューロスフェア, SNS:二次ニューロスフェア。*: p<0.05, **: p<0.01。

“安全な”iPS細胞クローン由来ニューロスフェアを用いた脊髄損傷治療

前記の免疫不全マウスへの移植実験を経て、6カ月にわたり腫瘍をまったく形成しなかった“安全な”クローンのうち、まずMEF由来(Nanog-EGFPトランスジェニックマウス由来のMEF)のクローンである38C2クローンを用いて作製されたニューロスフェアを用いて、われわれは脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った³⁴⁾。雌の8週齢C57Bl6/Jマウスを用いて、第10胸椎高位にInfinite Horizon (IH) impactorを用いてコンピュータ制御下に圧挫損傷を作製し、損傷後亜急性期となる9日目^{20,21)}に 5×10^5 個を損傷中心部へと移植した。移植細胞にはレンチウイルスを用い

て、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、単量体赤色蛍光タンパク質である*mRFP*遺伝子を導入しておき、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で、動物を生かしたまま経時的にモニタリングを行い²¹⁾、損傷後6週に灌流固定を行い、組織学的検討も行った。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を認めず、組織学的検討においても腫瘍形成を認めなかった(図2)。移植細胞はHu陽性のニューロン、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイト、glutathione S-transferase π (GST-π)陽性のオリゴデンドロサイトへと分化しており、分化効率は

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 34 を改変)

Basso Mouse Scale (BMS) 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ないこと、また、PNS を一度継代した二次ニューロスフェア (secondary neurosphere: SNS, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの神経 3 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¹⁹⁾。

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 移植群と同様に機能回復はみられない。

PBS: リン酸緩衝液。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

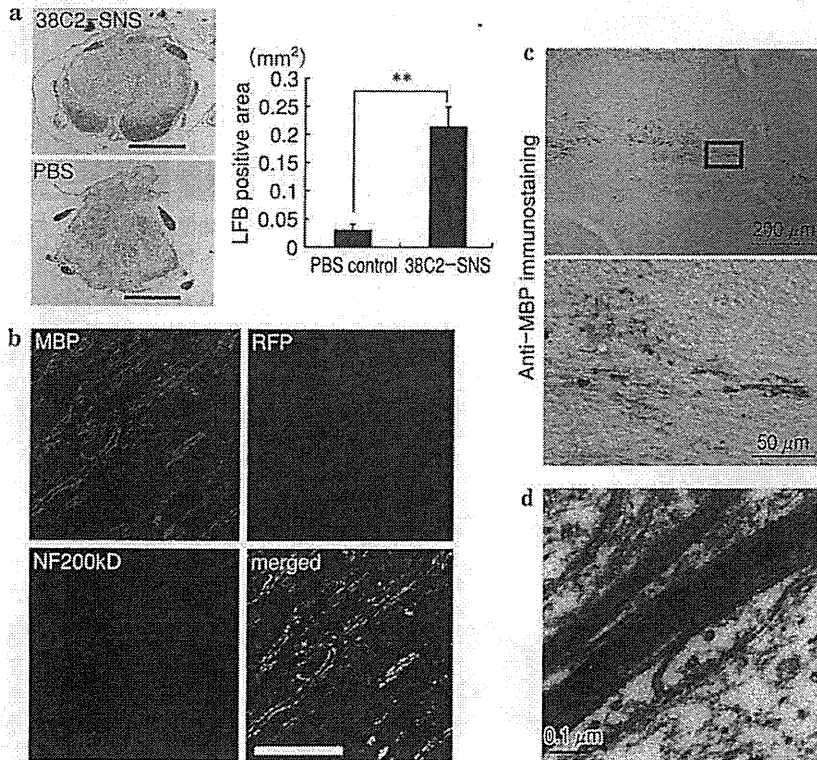
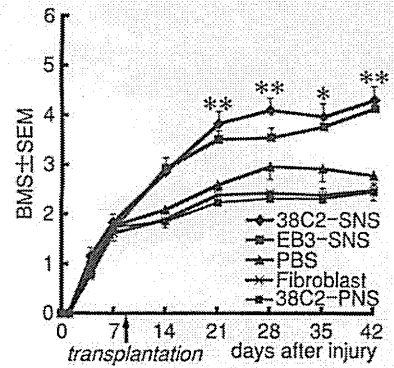


図4 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの移植による再髄鞘化 (文献 34 を改変)

a: 損傷脊髄の LFB 染色像。iPS 細胞由来 SNS 移植群において、髄鞘化領域 (青色) がコントロール群と比較して有意に保たれている。Scale bar: $500 \mu\text{m}$, **: $p < 0.05$ 。

b: 移植された iPS 細胞由来 SNS (RFP 陽性) は成熟オリゴデンドロサイト (MBP 陽性) へと分化し、ホストの神経線維 (NF200 kD 陽性) を再髄鞘化する。

c: 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 陽性の成熟オリゴデンドロサイトに分化する。Scale bar: $50 \mu\text{m}$ 。

d: shiverer マウスの損傷脊髄の電子顕微鏡像。移植した iPS 細胞由来 SNS による、major dense line および compact lamellae を有する正常髄鞘がみられる。

それぞれニューロンが約 30%、アストロサイトが約 50%、オリゴデンドロサイトが約 15%であった (図 2)。マウスの後肢機能を Basso Mouse

Scale (BMS) を用いて経時的に評価を行ったところ、38C2 クローン由来ニューロスフェア (38C2-NS) 移植群は、マウス ES 細胞由来ニュー

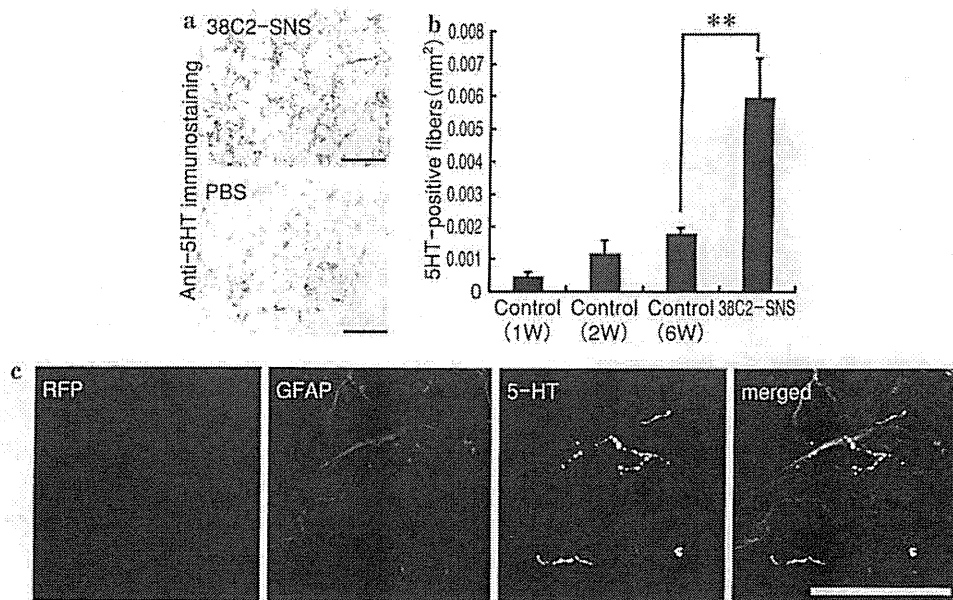


図5 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植による縫線核脊髄路軸索伸展の促進 (文献34を改変)
 a, b: 損傷部から4mm遠位部での5-HT陽性の神経線維染色像。移植群において有意に促進されている。
 Scale bar: 100 μ m, **: $p < 0.01$.
 c: 移植細胞由来のGFAP陽性の幼若アストロサイトに近接した5-HT陽性の神経線維。Scale bar: 50 μ m.

ロスフェア (ES-NS) 移植群とほぼ同等の機能回復を呈し、培養液のみを注入した vehicle control 群と比較して有意な下肢運動機能の回復が得られていた (図3)。この機能回復のメカニズムを解析したところ、移植された 38C2-NS が myelin basic protein (MBP) 陽性の成熟オリゴデンドロサイトへと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた (図4)。これにより、Luxol Fast Blue (LFB) 染色にて陽性となる髄鞘面積が vehicle control 群と比較して、38C2-NS 移植群において有意に増加していた (図4)。さらに、移植細胞が双極性の突起をもつ幼若アストロサイト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る。事実、この幼若アストロサイトの近傍に、齧歯類の運動機能に大きな役割をもつとされる 5-hydroxytryptamine (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4mm遠位部でこれら5-HT陽性線維を定量すると、移植群において有意に増加していた (図5)。この移植細胞による再

髄鞘化と縫線核脊髄路線維への glial support が、38C2-NS 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された³⁴⁾。

成体組織由来の“安全な” iPS 細胞クローンと“危険な” iPS 細胞クローン

次に、われわれは、より現実的な臨床応用へのモデルに近い成体組織 (TTF) 由来の iPS 細胞を用いて、同様の移植実験を行った。当研究室の三浦ら¹⁷⁾が行った安全性の検討の中で使用したマウス iPS 細胞 36 クローンのうち、TTF 由来のクローンは6クローンあったが、そのうち安全性が確認できたものは 335D1 というクローンのみであった。この 335D1 クローンと同時に、同様に TTF 由来のクローンで腫瘍形成能が認められた“危険な”クローン (256H13, 256H18) も用いて、ニューロスフェアへと誘導後 38C2 クローンと同様に脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った。その結果、各クローン (335D1, 256H13,

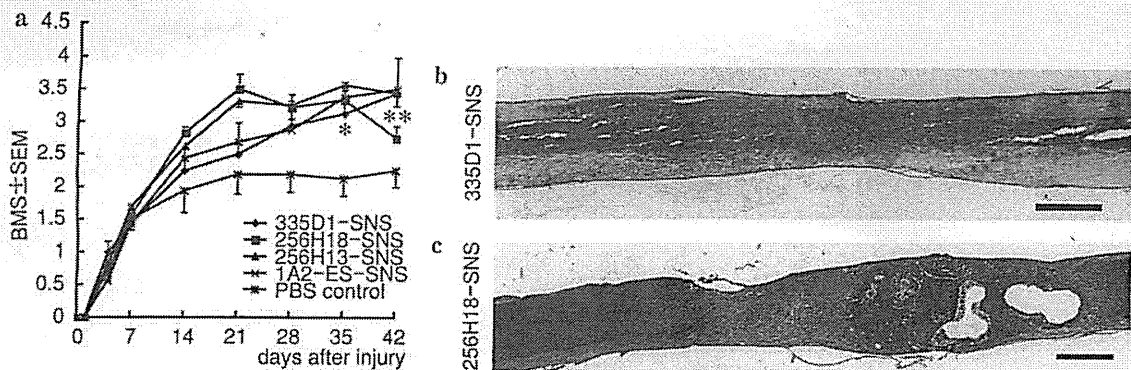


図6 TTF-iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復 (文献34を改変)
 a: Basso Mouse Scaleによる後肢機能評価。“安全な”335D1-SNS移植群では、PBSコントロール群と比較して、損傷後5週目以降に有意な機能回復がみられる。“危険な”256H18-SNS移植群では損傷後6週目において得られていた機能回復の低下がみられる。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。
 b: “安全な”335D1-SNSを移植された損傷脊髄像。腫瘍形成を認めない。Scale bar: 1 mm。
 c: “危険な”256H18-SNSを移植された脊髄像。奇形腫形成を認める。Scale bar: 1 mm。

256H18) 由来ニューロスフェアは、損傷脊髄への移植後に機能回復が得られたものの、“危険な”クローン由来ニューロスフェア移植群においては、一時的に得られていた機能回復が損傷後6週の時点で突然失われ、かつ大多数のマウスが突然死亡した(図6)。組織学的解析を行うと、“危険な”クローン由来ニューロスフェアを移植したマウスでは、脊髄内で巨大な奇形腫(teratoma)を形成していることが判明した(図6)。一方、“安全な”335D1クローンをを用いた場合では、予想どおりに移植された全マウスにおいて腫瘍形成を認めず、コントロール群と比較して有意に、かつES細胞由来ニューロスフェアと同等に機能回復を得ることができた。このことから、成体組織由来のiPS細胞クローン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事前に検討してあれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となり得る可能性を有していることが示された³⁴⁾。

神経堤幹細胞の可能性

iPS細胞と並んで、近年、成体内に存在する組織幹細胞として、神経堤幹細胞も注目を集めている。神経堤細胞は脊椎動物のみにみられる細胞集団で、表皮外胚葉と神経板との相互作用によって

両者の境界部に誘導され、神経管が閉塞した直後に周囲の組織へ移動する細胞である(図7)。遊走した神経堤細胞は、感覚神経系および自律神経系のニューロンとグリア、副腎髄質、色素細胞のほか、頭部では骨格系(骨および軟骨)、歯(象牙芽細胞)、動脈系の血管平滑筋など、実にバラエティーに富んだ組織へ分化することが知られている。このように多分化能をもち、多くの器官発生の局面において重要な役割を果たすことから“第4の胚葉”とも呼ばれている¹⁴⁾。

遊走した神経堤細胞は、その目的地の微小環境下で細胞同士が集合して各組織へ分化する。しかし、その中の一部の細胞は未分化な状態で維持され、成体においても多能性を保持する細胞として、さまざまな組織に潜伏していると考えられている。これが神経堤幹細胞である。神経堤幹細胞は、自己複製能を有するとともに、ニューロン、グリアおよび筋線維芽細胞の3系統へ分化する多能性幹細胞であり、近年、自家組織由来の細胞供給源として注目を集めている⁴⁾。これまで、成体マウスの皮膚⁵⁾、腸管¹²⁾、心臓³³⁾、角膜³⁶⁾といったさまざまな組織に神経堤幹細胞が存在していることが報告されている。当研究室の名越ら¹⁸⁾は、神経堤細胞を特異的に標識できるP0-Cre/Floxed-EGFPおよびWnt1-Cre/Floxed-EGFPマウスを

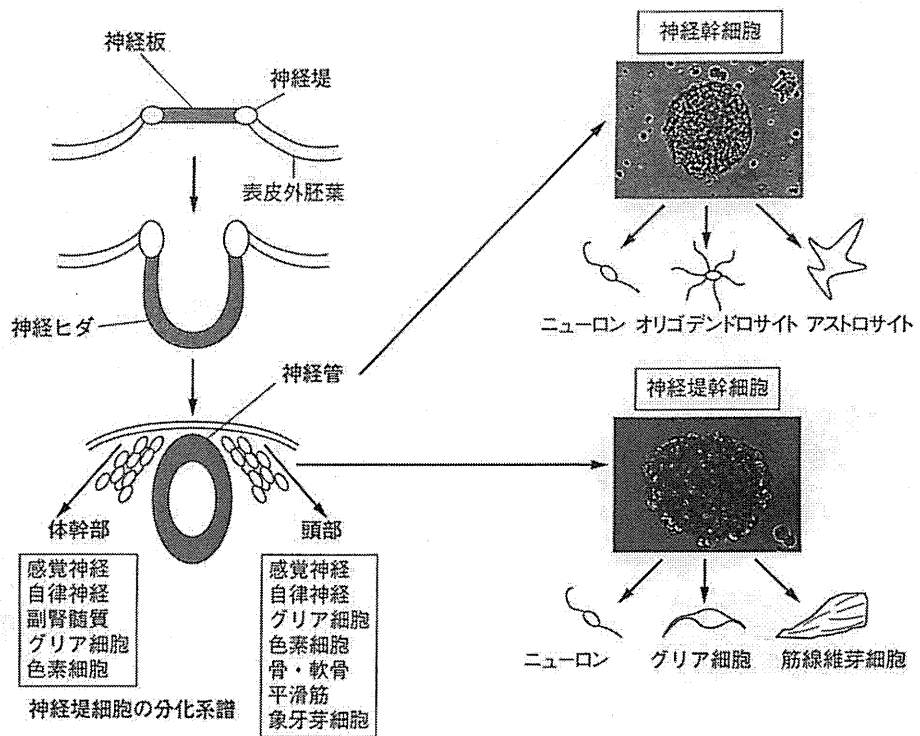


図7 神経管と神経堤の発生

発生学的に、神経幹細胞は神経管内に存在し、神経堤幹細胞は神経管が閉塞する際に、その背側から遊離する。神経堤幹細胞は、体中に移動してさまざまな細胞へ分化する。

用いて、成体の後根神経節や骨髄にも神経堤幹細胞が存在することを突き止めている。特に骨髄において、これまで神経細胞を生み出す幹細胞の存在が多数報告されてきたが、その発生学的起源や分化能力に疑問がもたれていた。つまり、なぜ中胚葉由来の骨髄から外胚葉由来の神経細胞が分化するのか、その胚葉転換や脱分化といった現象を説明した報告はこれまでなかった。したがって、神経堤幹細胞が胎生期に血中を介して骨髄へ移動し、成体に至るまで潜伏し、ニューロンやグリアを生み出すというわれわれの理論は非常に合理的であり、画期的な発見と考えている。さらに、成体の後根神経節、皮膚および骨髄由来の神経堤幹細胞の性質を比較したところ、その分化能や遺伝子発現に大きな相違があった。すなわち、成体の各組織に潜伏している神経堤幹細胞は均一の性質をもっているのではなく、由来する組織によって固有の性質を保持していることが明らかになっ

た。したがって、神経堤幹細胞の臨床応用を目指すうえでは、さまざまな神経疾患の病態を十分に把握し、どの組織由来の神経堤幹細胞が移植治療に相応であるかを評価する必要があると考えられる。

神経堤幹細胞を用いた移植研究

神経堤幹細胞を用いた移植研究は、採取しやすい皮膚由来の細胞を用いた報告が、近年、散見されるようになった。Millerら¹⁶⁾は、皮膚由来神経堤幹細胞を Schwann 細胞へ分化させ、脱髄した中枢・末梢神経に移植したところ、再髄鞘化されることを確認した。また、この分化誘導した Schwann 細胞をラット脊髄圧挫損傷モデルに移植したところ、軸索の伸長と内在性 Schwann 細胞の集積が認められ、運動機能が回復したと報告している²⁾。しかし、どちらの報告においても、

用いられている神経堤幹細胞はマウスの新生児由来のものであり、臨床応用を考えた場合には成体由来の細胞を用いて評価することが重要である。同じ組織に存在する神経堤幹細胞でも、新生児期に回収した細胞に比べて成体の細胞はシグナルの応答性が低くなるという報告¹³⁾があり、成体由来の細胞を効率よく増殖・分化させることが今後の課題といえる。実際、マウス成体の皮膚由来神経堤幹細胞をマウス脊髄損傷モデルに移植した報告があるが、一部細胞の生着はみられたものの行動学的機能評価については言及しておらず、その有効性を示すためにはさらなる検討が必要である³⁰⁾。神経堤幹細胞は皮膚以外にもさまざまな組織に存在しており、その特性を評価したうえで細胞を選択し、移植治療を行うことが重要と考えられる。

今後の課題と展望

以上のように、iPS細胞と神経堤幹細胞は自家移植の細胞供給源となり得る大きな可能性を秘めているといえる。近年、ヒト皮膚の線維芽細胞からiPS細胞を樹立すること、1滴の血液からもヒトiPS細胞を樹立することも可能になっており^{25,28,31)}、iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。しかし、iPS細胞樹立で初期化因子を導入する際に、レトロウイルスやレンチウイルスを用いているが、これらのウイルスは遺伝子のプロモーター付近に組み込まれることが多く、近傍の内在性遺伝子の発現状態を変化させて腫瘍化をもたらす危険性がある。実際、X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency: X-SCID)患者において、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療を行った10例中2例で、白血病を発症した事例が報告されている⁷⁾。この問題に関しては、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ない一過性の遺伝子発現によるiPS細胞の作製^{10,29,35,37)}、タンパク質導入によるiPS細胞作製^{11,38)}、および薬剤による導入遺伝子の一部置き

換え^{15,29)}の成功が報告されている。細胞移植治療に用いる場合には、ゲノムに外来性の遺伝子が挿入されていないiPS細胞を使用することが好ましいと考えられる。しかし、これらの方法で作製されたiPS細胞が、レトロウイルスで作製されたiPS細胞と同等の多能性や*in vitro*での分化能力を有しているかどうかについては、今後、詳細に性質を比較する必要がある。

さらに、脊髄損傷の病態自体に目を向けると、実際の臨床応用に向けては、まだ解決すべき課題は多い。移植細胞が機能回復に寄与するメカニズムについては、①移植細胞によるシナプス形成(synaptic formation)・軸索再生、②移植細胞による再髄鞘化、③移植細胞による栄養的支援(trophic support)、の主に3つのメカニズムが提唱されている¹⁾。実際に臨床応用に向けては、前記の3つのメカニズムについて、さらに詳細な検討・証明が必須であると考えられるが、実際の臨床においても、超急性期の状態での麻痺とその予後予測が一定しないことなど、いまだ脊髄損傷の病態そのものがブラックボックスに包まれている部分が多いといわざるを得ない。

損傷脊髄における微細な組織の変化を生きている動物において経時的に評価できないことが、現状を打破できない要因の1つと考えられるが、われわれはこの課題を一步一步克服すべく研究を進めている。当研究室の藤吉ら⁶⁾は、脊髄白質における拡散の異方性に着目し、MRIを用いた軸索特異的な新たな評価系である拡散テンソルtractography(diffusion tensor tractography: DTT)を構築することに成功し、現在は脊椎脊髄疾患患者に応用して解析を進めている。また、藤吉らは組織における拡散の変位に着目したq-space imaging(QSI)という最新のストラテジーを霊長類脊髄損傷モデルに応用し、さらに詳細な組織評価を可能としており、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、“基礎と臨床が一体となって”夢の実現へ向け、日々努力を続けている。