

図 2 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 11 を改変)
 GFAP : glial fibrillary acidic protein, EGF : epidermal growth factor

これを無血清の神経幹細胞用の培地中で塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor 2 : FGF2) 存在下に浮遊培養すると、ニューロスフェア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、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein : 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、ニューロスフェア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 1 次ニューロスフェア (primary neurosphere : PNS) は、2 次ニューロスフェア (secondary neurosphere : SNS), 3 次ニューロスフェア (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 1 次ニューロスフェアからはほとんどニューロンしか誘導されないのに対し、2 次、3 次ニューロスフェア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)。繰り返し継代培養が可能であること、神経系の 3 系統の細胞を産生する能力を有することにより、このマウス ES 細胞由来ニューロスフェアが自己複製能と多分化能をもつ神経幹細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、1 次ニューロスフェア形成時に腹側化因子である Sonic hedgehog (Shh) や、背側化因子である BMP4 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。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 2)。

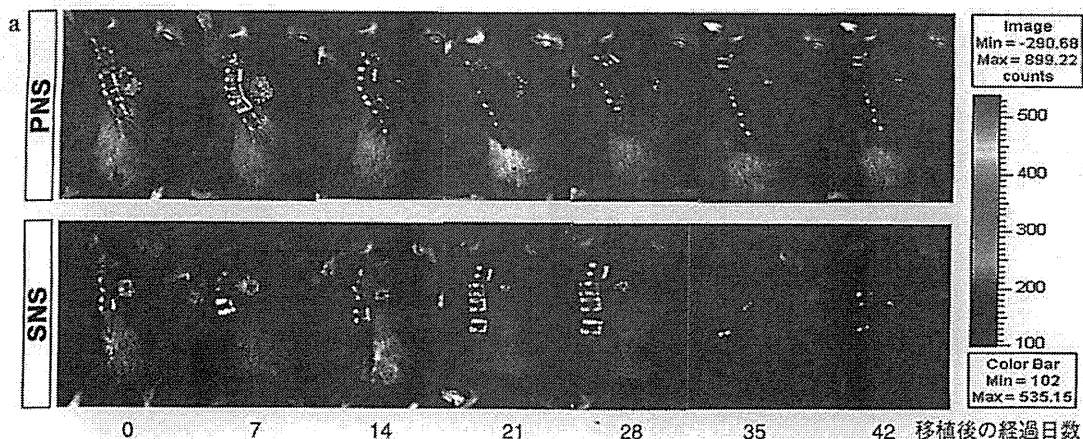


図4 移植されたES細胞由来PNS, SNSの動態(文献8を改変)
 a: ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメーキング。移植細胞による発光量は経時的に減少していった。
 b: 移植直後の発光量に対する比。移植後42日(6週)の時点でPNS移植群, SNS移植群ともに移植直後の約20%の細胞が損傷脊髄内に生着したことを示す。経過中に腫瘍増殖に伴う異常発光を認めたマウスはいなかった。*: $p < 0.05$ 。

ドロサイトの3系統へ分化することがわかっている(図3)。損傷脊髄に移植されたPNSとSNSは、ルシフェラーゼによるバイオイメーキングにおいて移植後6週の時点で移植直後と比較して約20%の発光量を示し、いずれの移植細胞も約20%の細胞が生着したと考えられる(図4)。経過中にPNS移植群, SNS移植群ともにバイオイメーキングで腫瘍増殖を疑う異常発光は認めず、組織学的検討においても腫瘍化は認めなかった。移植されたPNS/SNSはともに神経系3系統へ*in vivo*においても*in vitro*と同様の分化傾向を呈していた(図5)。つまり、損傷脊髄内でPNSはニューロン優位に、SNSはアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイト優位に分化していた(図5)。SNS移植群では圧挫損傷後の萎縮性変化と脱髄変化をControl群, PNS移植群と比較して有意に抑制していた(図6)。また、SNS移植群ではPNS移植群, Control群と比較して、血管新生や軸索再生が損傷脊髄内で有意に促進されていた。Basso Mouse Scaleによる後肢運動機能評価では、SNS移植群がPNS移植群, Control群と比較して有意差に良好な機能回復を示した(図

7G)。前述のように、PNSはニューロン優位に、SNSはアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイト優位に*in vivo*でも*in vitro*でも分化する。この分化傾向の違いが機能回復の違いに影響を与えた可能性がある。機能回復のメカニズムの1つとして、SNS由来の未熟なアストロサイトが軸索再生のガイダンスとして機能したことが考えられる(図7A, B)。過去にもグリア前駆細胞やグリア前駆細胞由来アストロサイトを損傷脊髄に移植し、同様の効果が報告されている^{4,5)}。また、別の機序として血管新生を介した機能回復効果が考えられる¹⁾。アストロサイトは低酸素状態で血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)などの血管促進因子を分泌するといわれている¹⁰⁾。われわれ⁸⁾の結果でもSNS由来アストロサイトがVEGFを発現し、SNS移植群で血管新生が有意に促進されていた。また、機能回復の

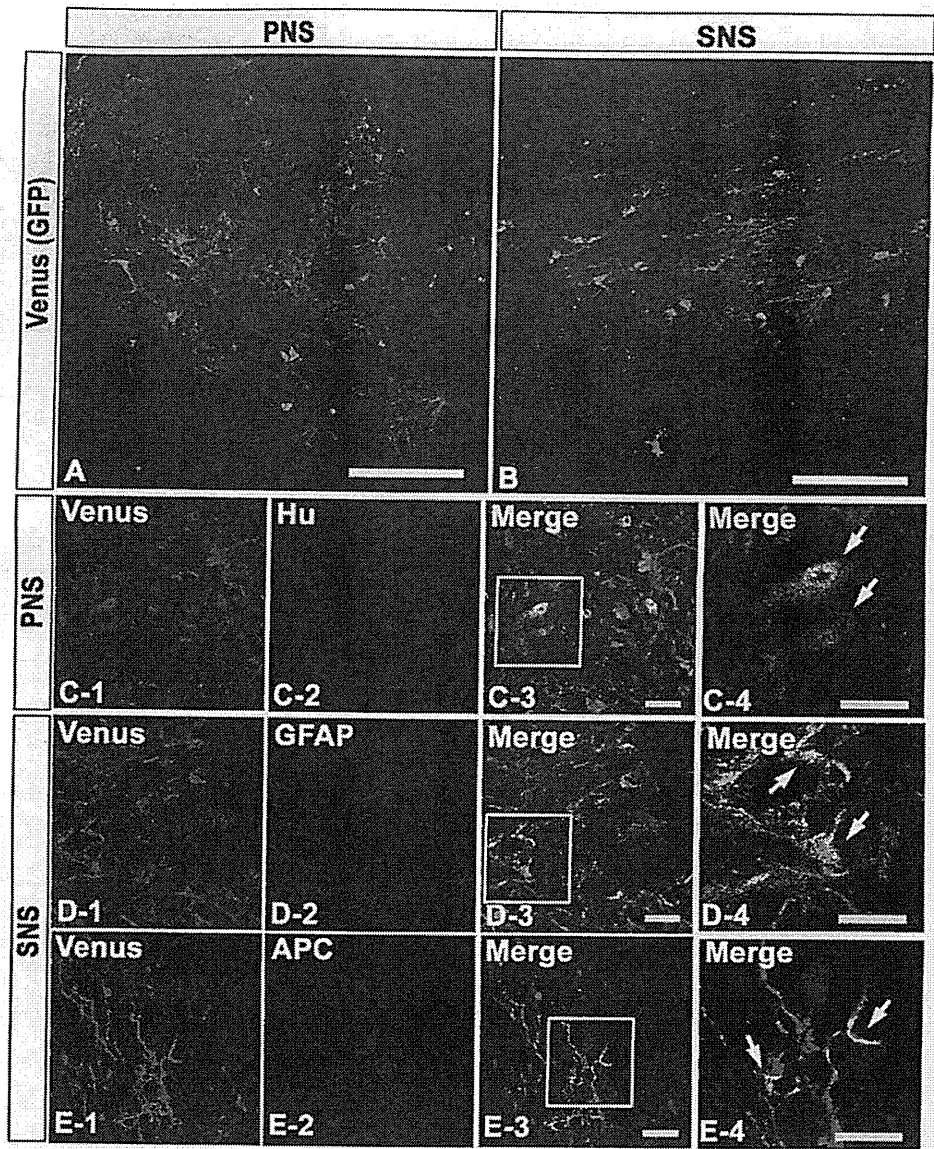
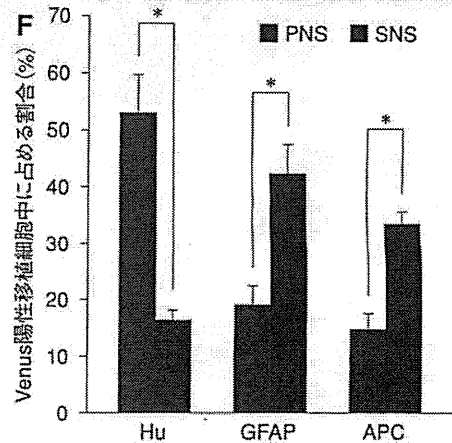


図5 損傷脊髄内でのPNS, SNSの分化

(文献8よりA~Eは転載, Fは改変)

移植されたPNS/SNSはともに損傷脊髄内で生着し(A, B), 神経系3系統への分化傾向を *in vivo* においても呈し, PNSはニューロン優位に(C), SNSはアストロサイト, オリゴデンドロサイト優位に分化していた(D, E). Venus (GFP)は損傷脊髄内で生着した移植細胞のマーカーであり, Huはニューロン, GFAPはアストロサイト, APCはオリゴデンドロサイトのマーカーである. FはVenus陽性の細胞の中で, Hu, GFAP, APCのそれぞれが占める割合を示したグラフである. A, Bのscale bar: 100 μ m, C~Eのscale bar: 20 μ m. *: $p < 0.05$.



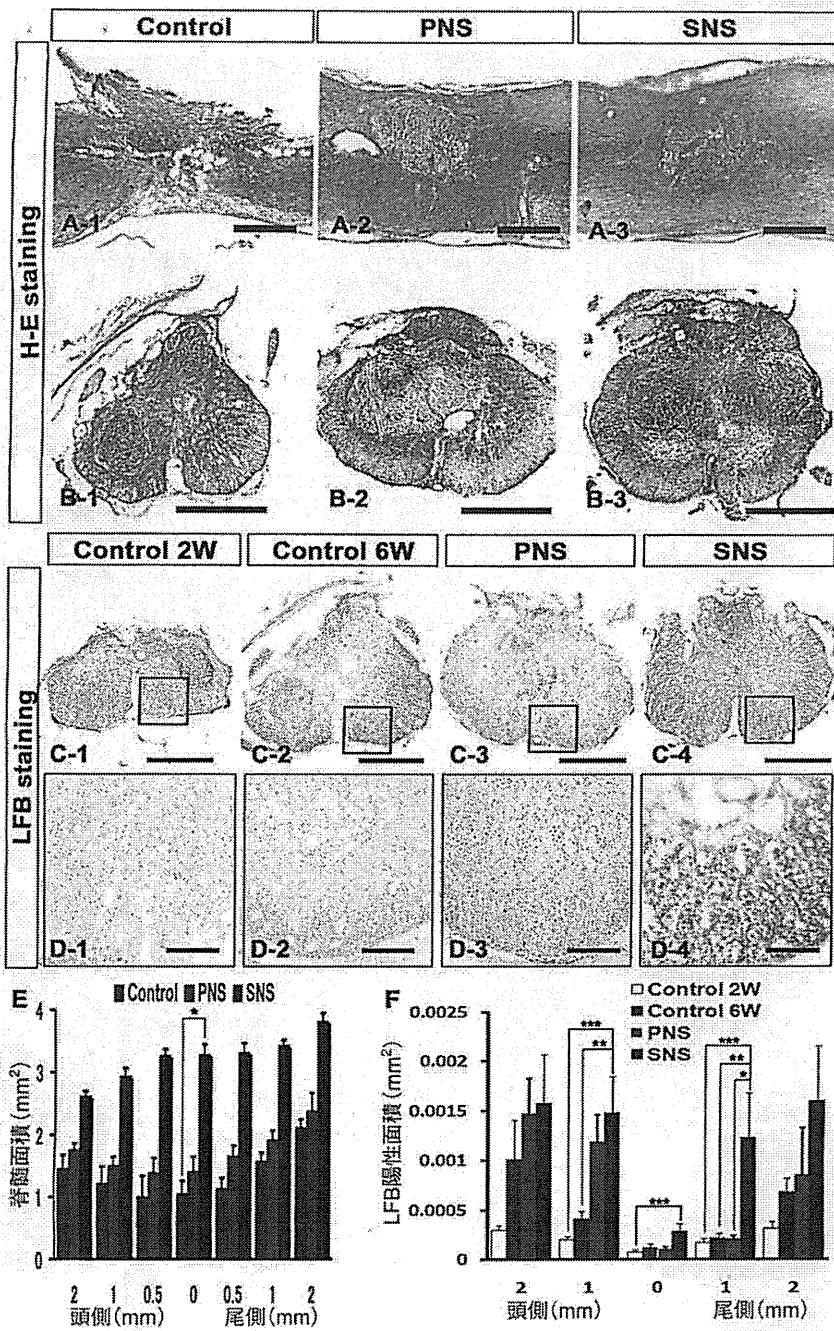


図6 損傷脊髄の萎縮、脱髄に関する評価 (文献8よりA~Dは転載、E、Fは改変)
 A, B: Hematoxyline-eosin (H-E) 染色による損傷脊髄の萎縮の評価。SNS移植群で萎縮が軽度である。損傷脊髄中心部の矢状断像 (A), 横断像 (B)。A, Bの scale bar: 500 μ m。
 C, D: Luxol Fast Blue (LFB) 染色による脱髄の評価。SNS移植群で脱髄が軽度であった。Cの scale bar: 500 μ m, Dの scale bar: 100 μ m。
 E: H-E 染色における脊髄面積の定量化。損傷中心部でSNS移植群はControl群と比較して有意に萎縮が軽度であった。*: $p < 0.05$ 。
 F: LFB陽性面積の定量化。SNS移植群はPNS移植群, Control群と比較して有意に脱髄が抑制されていた。*~***: $p < 0.05$ 。

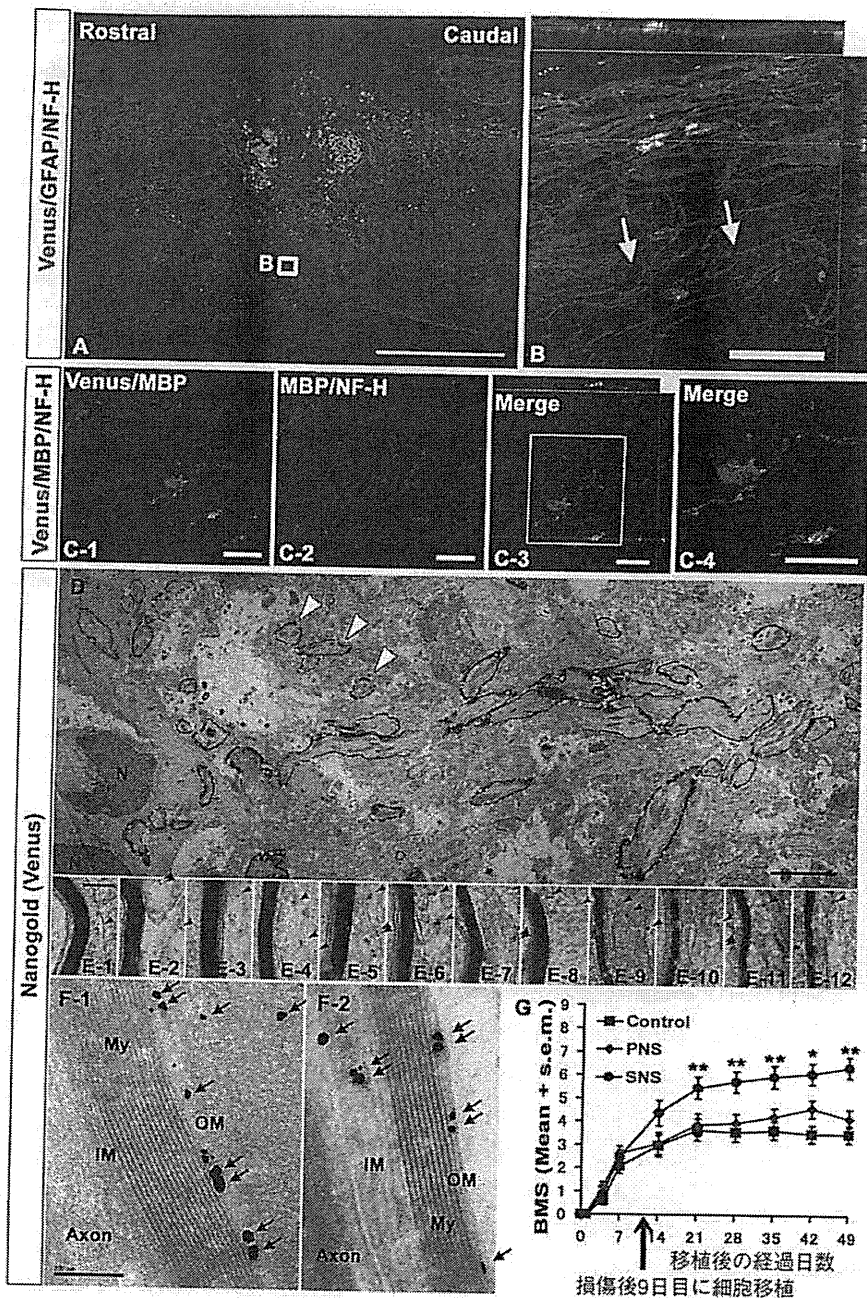


図7 SNS移植群における軸索再生と再髄鞘化、運動機能の回復促進 (文献8よりA~Fは転載、Gは改変)
 A, B: 損傷脊髄において内在性アストロサイトあるいはSNS由来アストロサイトが再生軸索のガイダンスとなっている (白矢印)。Venusは移植細胞、GFAPはアストロサイト、NF-Hは軸索のマーカーを示す。Aのscale bar: 500 μ m, Bのscale bar: 50 μ m。
 C: SNS由来のオリゴデンドロサイトが軸索を取り巻いている様子が観察される。MBPは髄鞘のマーカーを示す。Scale bar: 20 μ m。
 D~F: SNS由来のオリゴデンドロサイトによる再髄鞘化 (白矢頭, 黒矢頭) の電子顕微鏡像を示す。黒いドット (黒矢印) がVenus陽性の移植細胞を示す。Myは髄鞘, Nは核, IM/OMはミエリン細胞質の軸索間膜の内外側を示す。Dのscale bar: 5 μ m, E, Fのscale bar: 200 nm。
 G: Basso Mouse Scale (BMS) による後肢運動機能評価では、PNS移植群、Control群と比較してSNS移植群が有意差に良好な機能回復を示した。*: SNS vs Control ($p < 0.05$), **: SNS vs PNS or Control ($p < 0.05$).

メカニズムの1つとして、移植細胞由来のオリゴデンドロサイトによる再髄鞘化も考えられる⁷⁾。実際にわれわれの結果でも SNS 移植群で再髄鞘化が観察された (図 7C~F)。このように、SNS はアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイトであるグリア細胞優位に分化することで、これら細胞の複合的な作用により、機能回復が起こった可能性が示唆された。これらの結果により、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、ニューロンに加えて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。移植前に培養・継代を行うことにより、未分化で腫瘍化する危険性のある細胞の混入を予防できる可能性が示唆され、今後の ES 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。

おわりに

基礎研究の目覚ましい進歩により、医学界に再生医療の大きな流れができつつある。これまで不可能といわれてきた中枢神経系の再生において、神経幹細胞は中心的な役割を果たすものと考えている。しかし、胎児由来神経幹細胞のケースと同様に、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ても、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、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しているのが現状である。これらの問題を解決できる技術として人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : 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がある。ES 細胞研究は常に iPS 細胞

研究と両輪であると考え、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考えられる。

文 献 (太字番号は重要文献)

- 1) Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, et al : Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* 148 : 453-463, 1997
- 2) Bibel M, Richter J, Schrenk K, et al : Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 7 : 1003-1009, 2004
- 3) Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Reier PJ, et al : Recovery of function after spinal cord injury : mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* 123 : 3-16, 1993
- 4) Davies JE, Huang C, Proschel C, et al : Astrocytes derived from glial-restricted precursors promote spinal cord repair. *J Biol* 5 : 7, 2006
- 5) Hill CE, Proschel C, Noble M, et al : Acute transplantation of glial-restricted precursor cells into spinal cord contusion injuries : survival, differentiation, and effects on lesion environment and axonal regeneration. *Exp Neurol* 190 : 289-310, 2004
- 6) 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
- 7) Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, et al : Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25 : 4694-4705, 2005
- 8) 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
- 9) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410-1412, 1999
- 10) 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
- 11) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, et al : Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 3086-3098, 2008
- 12) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, et al : Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse

- embryonic stem cells. *Dev Biol* 275 : 124-142, 2004
- 13) Okano H : Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69 : 698-707, 2002
- 14) Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S : A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12 : 4565-4574, 1992
- 15) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1710, 1992
- 16) Yoshida H, Imaizumi T, Tanji K, et al : Platelet-activating factor enhances the expression of vascular endothelial growth factor in normal human astrocytes. *Brain Res* 944 : 65-72, 2002

次号予告

脊椎脊髄ジャーナル Vol. 23 No. 10

特集：脊髄障害の診断アルゴリズム

- 特集にあたって……………東京慈恵会医科大学脳神経外科 阿部 俊 昭
- 脊髄障害の診断アルゴリズム—総論……………安城更生病院神経内科 安藤 哲 朗
- 先天性病変による脊髄障害の診断アルゴリズム……………東京慈恵会医科大学脳神経外科 阿部 俊 昭
- 腫瘍性病変による脊髄障害の診断アルゴリズム……………北海道大学神経外科 青山 剛, 他
- 圧迫病変による脊髄障害の診断アルゴリズム……………日本大学整形外科 徳橋 泰 明
- 血管病変による脊髄障害の診断アルゴリズム……………札幌医科大学脳神経外科 小柳 泉
- 炎症性疾患, 免疫性疾患, 変性疾患による脊髄障害の診断アルゴリズム……………東北大学神経内科 黒田 宙, 他

Nomade

- 骨粗鬆症性椎体骨折の治療に対する一考察……………大阪市立大学整形外科 中村 博 亮
- ATLAS 脱髄・代謝・中毒4
- Adrenoleukodystrophy の脊髄の病理……………福祉村病院神経病理研究所 橋詰 良 夫
- 脊椎・脊髄のバイオメカニクス
- 脊椎高位と安定性：椎間安定性および不安定性
- 2) 中下位頸椎および頸胸椎移行部……………北海道大学整形外科 小谷 善 久
- 症例報告
- 頸椎椎弓形成術後のMRSA 深部感染に対して陰圧吸引療法と僧帽筋皮弁により治療した1例……………田附興風会北野病院形成外科 齊藤 晋, 他

脊髄損傷治療の現状とこれから

人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いた脊髄損傷治療

やすだ あきまさ^{1,2)}, つじ おさひこ¹⁾, ふじよしかわひろ^{1,3)}, とやまよしあき¹⁾, おかの ひでゆき²⁾, なかむらまさや¹⁾
 安田明正^{1,2)}, 辻 収彦¹⁾, 藤吉兼浩^{1,3)}, 戸山芳昭¹⁾, 岡野栄之²⁾, 中村雅也¹⁾

1) 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) E-mail : yasuda@z7.kciio.jp

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整形外科

SUMMARY

損傷脊髄の再生は困難であると考えられてきたが、幹細胞研究の急速な進歩により、細胞移植治療が脚光を浴びるようになってきた。胎児（胎仔）やES細胞由来神経幹/前駆細胞が脊髄損傷に対する移植細胞として期待されていたが、倫理的・免疫学的問題から臨床応用へ踏み切るのは難しい状態である。成体組織から採取した線維芽細胞で樹立するiPS細胞が2006年に報告され、以降、当研究室ではiPS細胞を用いた脊髄損傷治療の検討を行ってきた。我々は、免疫不全マウスへの移植実験で腫瘍化のリスクが低いことが確認できたマウスiPS細胞由来の神経幹/前駆細胞をマウス脊髄損傷モデルへ移植し、その有効性を確認することができた。しかし、腫瘍化能の高いiPS細胞クローン由来の神経幹/前駆細胞は移植後に損傷脊髄内で奇形腫を形成した。iPS細胞関連の研究は著しく進歩しているが、安全性を評価しつつ有効性を検討することが肝要である。

本項では、これまで行われてきた脊髄損傷に対する細胞移植研究、さらには我々が行ってきたiPS(induced pluripotent stem: iPS)細胞を用いた研究について概説し、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も言及したい。

I. 胎児（胎仔）および胚性幹 (embryonic stem: 以下 ES) 細胞由来神経幹/前駆細胞を用いた脊髄損傷治療の検討

中枢神経である脊髄は、再生能力が非常に低く、一度損傷を受けると再生は困難であると考えられてきた。近年、幹細胞研究の急速な進歩により、動物実験レベルでは、細胞移植をはじめ、損傷脊髄の修復が得られる治療法が多数報告されるようになった。基礎研究で得られた結果を臨床の現場で応用できれば、脊髄損傷に対して新たな治療法を確立することも夢ではないと考えられる。

細胞移植は古くから注目を集めており、1980年代にスウェーデンLund大学のLindvallのグループが、パーキンソン病患者の脳へ胎児中脳を移植し、機能の回復が得られることを報告した¹⁾。その後、脊髄損傷に対しても、胎児脊髄移植の有効性が示された^{2,3)}。しかし、胎児組織の移植には多くを一度に得られない量的制約などが問題となり、神経幹細胞が脚光を浴びるようになった。

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
 腫瘍化

a) 神経幹/前駆細胞

神経幹/前駆細胞 (NS/PC) とは、中枢神経系を構成するニューロンやグリア細胞へ分化する多分化能を有し、自己複製能も持つ未分化な細胞である。1992年にReynoldsとWeissにより、NS/PCを効率よく増殖できるneurosphere法が報告され⁴⁾、必要十分量の細胞数を*in vitro*で増殖させることが可能となり、細胞移植材料として期待されるようになった。

当研究室でも脊髄損傷治療の研究において、ラット胎仔脊髄由来NS/PC移植のラット脊髄損傷への有効性⁵⁾、さらにはヒト胎児前脳由来NS/PC移植の霊長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルへの有効性^{6,7)}を報告してきた。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、胎仔/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。しかし、脊髄損傷患者への臨床応用を考慮すると、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わが国において臨床応用の実現は不可能といわざるを得ない。

b) ES細胞

胚性幹 (embryonic stem: 以下ES) 細胞は、受精卵の胚盤胞期の胚の一部である内細胞塊から作製される細胞で、理論上すべての細胞になる能力を有することから“万能細胞”ともいわれる。神経組織も含む胎児の全細胞は内細胞塊に由来しており、脊髄損傷治療の研究においても注目されてきた。1999年にはMcDonaldらがES細胞から形成したNS/PCをラット損傷脊髄へ移植し、良好な機能回復を報告し⁸⁾、2005年にはKeirsteadらがヒトES細胞から高純度へ誘導したオリゴデンドロサイト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⁹⁾。当研究室においてもマウスES細胞由来NS/PCを用いたマウス脊髄損傷治療の検討を行い、その有効性を確認した¹⁰⁾。しかし、ES細胞の作製には精子と卵子が結合した後の受精卵が必要となり、不妊治療で生じた余剰胚を用いるとはいえ、臨床応用を考えると倫理的問題が避けられない。(ES細胞由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞移植については、2010年10月に米国Geron社が実際に脊髄損傷患者への臨床試験を行った

と発表しており、世界的な注目を集めている¹¹⁾。)

c) 免疫拒絶反応

胎児およびES細胞由来NS/PCを移植治療に用いる際、通常では他人の細胞を移植するallograftとなるため、免疫拒絶反応が起こる可能性がある。拒絶反応には臓器障害を含む患者の全身反応も含まれるが、中枢神経においても他の臓器と同様に、MHC (主要組織適合遺伝子複合体) の違いによる免疫拒絶により組織の生着を妨げる^{12,13)}。脊髄損傷に対する細胞移植後の機能回復には、移植細胞からの液性因子のみならず、生着し分化した細胞が関与しているという報告が近年散見されており¹⁴⁾、細胞移植治療における免疫拒絶の問題は臨床応用を阻む大きな要因となっている。

II. iPS細胞を用いた脊髄損傷治療

これまで述べたような諸問題に解決の糸口を与えたのが、2006年、2007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人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: 以下iPS細胞) である^{15,16)}。iPS細胞は、マウス/ヒト線維芽細胞に*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, (*c-Myc*) などの初期化遺伝子を導入しリプログラミングすることで、ES細胞と同等の増殖能・分化能を持った多能性幹細胞である。iPS細胞は患者自身の体細胞から樹立することが可能であるため、先に述べた倫理的問題・免疫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。当研究室では、マウスES細胞のNS/PCへの誘導培養法¹⁷⁾をマウスiPS細胞¹⁸⁾に応用し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト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の治療効果をすで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。

a) iPS細胞由来の神経幹/前駆細胞の安全性

これまで脊髄損傷モデルへの移植検討を行ってきたiPS細胞では、ウイルス等による染色体への外来遺伝子挿入による遺伝子変異からES細胞にも増して腫

瘍化の危険性が危惧される。そこで三浦らは、36種類の個別に独立したマウス iPS 細胞株より NS/PC を分化誘導し、その安全性の検討を行った¹⁹⁾。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との相関についての解析では、予想と反して前癌遺伝子である *c-Myc* の有無とは腫瘍形成能との相関は無く、統計学的有意差があったのは iPS 細胞樹立時の起源細胞 (origin) のみであった。つまり、腫瘍形成能は iPS 細胞が胎児由来 (例, mouse embryonic fibroblast: MEF 由来) か成体由来であるか (例, tail tip fibroblast: TTF 由来) によって最も強く規定されていた¹⁹⁾。臨床応用に向けては、成体由来細胞を用いて iPS 細胞を樹立して移植療法を目指すのが理想的ではあるが、成体由来 iPS 細胞はより腫瘍形成をしやすいという結果となった。また、成体由来 iPS 細胞より低いとはいえ、胎児由来 iPS 細胞にも腫瘍形成を示すものが存在し、ニューロスフェアまで分化誘導した際に残存する分化抵抗性の未分化細胞の比率が腫瘍形成と関連していた。iPS 細胞由来 NS/PC による移植治療に向けては、未分化細胞がほとんど含まれておらず、且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全く形成しなかった、“安全な”クローンを選ぶことが重要である。

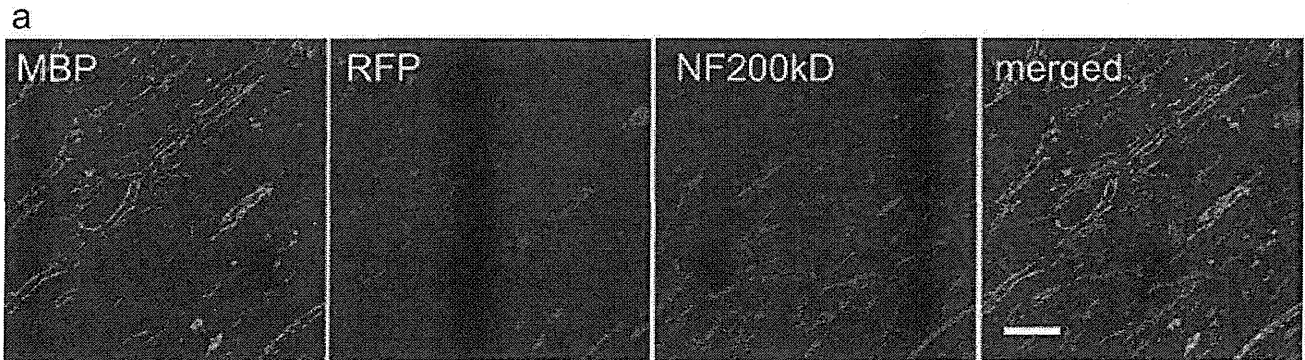
b) iPS 細胞由来 NS/PC の脊髄損傷モデルへの有効性

前述の24週間にわたり腫瘍を全く形成しなかった“安全な”クローンのうち、まずマウス胎仔由来線維芽細胞 MEF 由来のクローンから作製されたニューロスフェアを用いて、当研究室では脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った²⁰⁾。雌の8週齢 C57Bl6/J マウスを用いて、損傷は第10胸椎高位に I-H 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、赤色蛍光タンパク質遺伝子 mRFP を導入することで、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キングを用いて動物生存下に経時的モニタリングを行い、損傷後6週間の観察のち組織学的検討を行った。その結果、移植細胞はバイオイメーキ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、組織学的検討においても腫瘍形成を認めなかった。移植細胞は Hu 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイト、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。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 移植群とは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1)。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、軸索再生のガイダンスとして働いた可能性が考えられた。事実、この幼若アストロサイト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4mm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²⁰⁾。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線維への glial support が、iPS 由来 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。

c) 成体組織由来の“安全な” iPS 細胞クローンと“危険な” iPS 細胞クローンの比較

自家組織からの移植が可能となれば、iPS 細胞を用いた脊髄損傷治療の実現に向けた大きな一歩となる。そのためより現実的なモデルである成体組織 (TTF) 由来の iPS 細胞を用いて同様の移植実験を行った。三浦らが行った安全性の検討において使用したマウス 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



b

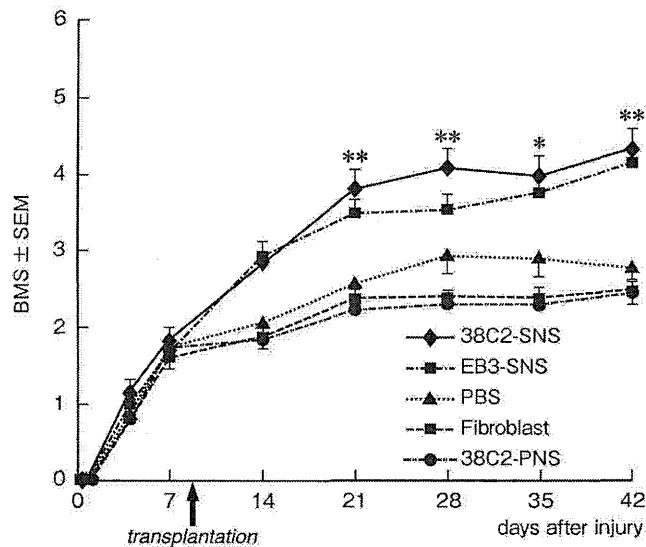


図1 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (文献 20) を改変)

a: 蛍光蛋白質 RFP で標識された iPS 細胞由来ニューロスフェア (SNS: secondary neurosphere, 継代を繰り返したもの) は移植後に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) を再髄鞘化していた。

Scale bar: 50 μ m. (p.6 カラー図参照)

b: Basso Mouse Scale (BMS) による後肢運動機能評価。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, 胚葉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, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトへの神経系 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¹⁰。

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運動機能が回復したが, 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確認出来なかった。

PBS: リン酸緩衝液 (細胞移植を行わない群に投与), * : p<0.05, ** : p<0.01

たものは 335D1 というクローンのみであった¹⁹。そこで, 335D1 と腫瘍形成能が認められた“危険な”クローンである 256H13 と 256H18 を用いて, ニューロスフェアへ誘導後にマウス損傷脊髄への移植実験を行った。いずれのクローン由来ニューロスフェアも移植後に

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, 損傷後 6 週に下肢運動機能が急速に失われ, さらに大多数のマウスがその後死亡した²⁰。組織学的解析の結果, 危険なクローン由来のニューロスフェアを移植した動物では, 脊髄

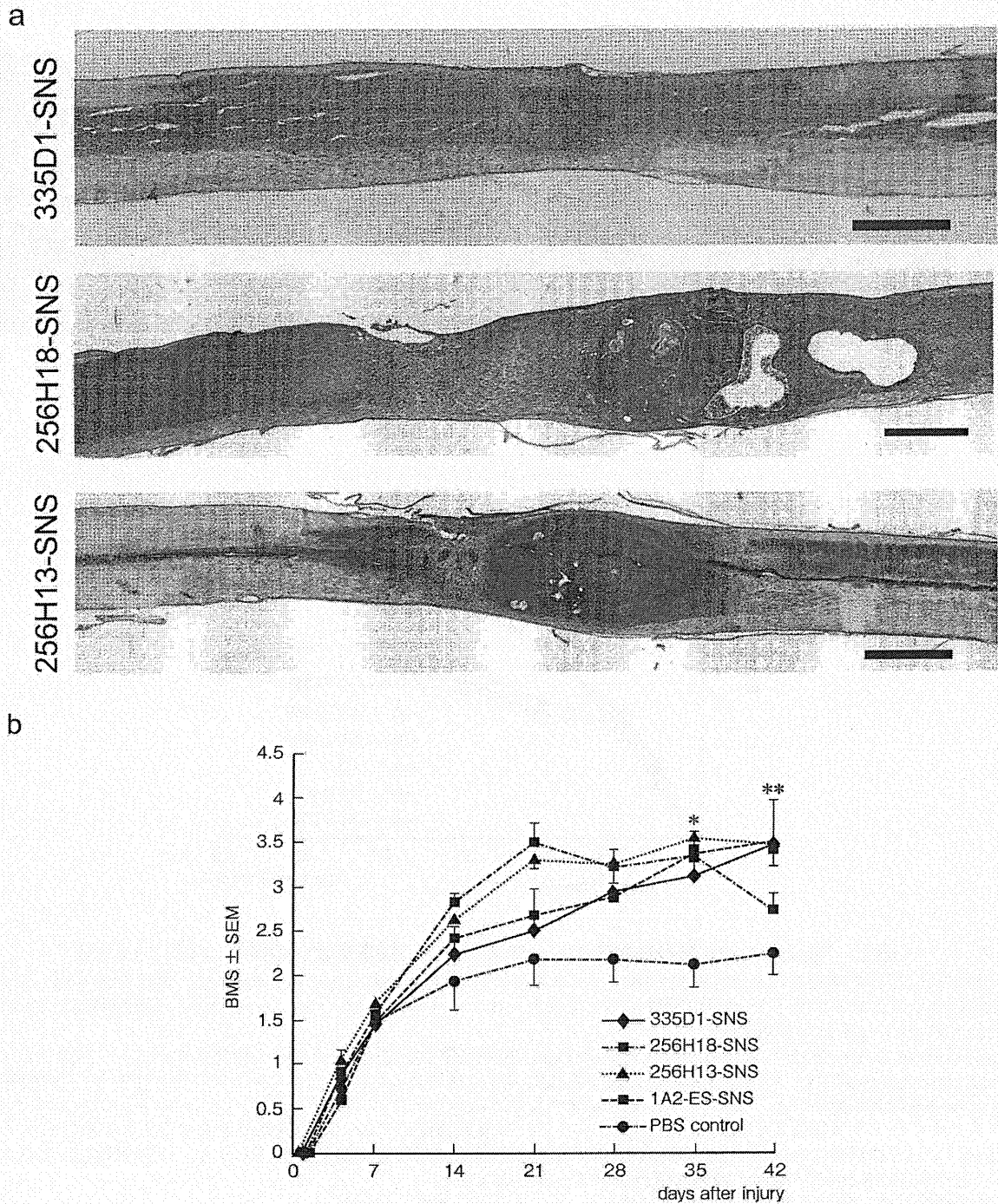


図2 成体マウス由来 iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (文献 20) を改変)

a: 細胞移植後の損傷脊髄像. 335D1-SNS: “安全な” 335D1-SNS 移植後の損傷脊髄像. 腫瘍形成は認めなかった. Scale bar: 1 mm. 256H18-SNS, 256H13-SNS: “危険な” iPS クローン由来のニューロスフェア移植後の損傷脊髄像. 奇形腫形成を認める. Scale bar: 1 mm. (p.7 カラー図参照)

b: BMS による後肢運動機能評価. “安全な” 335D1-SNS 移植群では, PBS 投与群と比較して, 損傷後 5 週目以降に有意な機能回復が認められた. “危険な” 256H18-SNS 移植群では損傷後 5 週目までに回復が認められた機能が 6 週目において低下した.

*: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$

内で巨大な teratoma を形成していた。一方、“安全な” 335D1 クローンを用いた場合は、移植された全マウスにおいて腫瘍形成は認めず、コントロール群と比較して有意に、且つ ES 細胞由来ニューロスフェアと同等に機能回復が得ることができた (図 2)。このことより、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評価すれば、脊髄損傷治療における有用な細胞源となり得ることが示された²⁰⁾。

III. 脊髄損傷治療として iPS 細胞 関連研究の課題と展望

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。しかし脊髄損傷治療としては、移植の至適時期と細胞の誘導期間との兼ね合いや前述の腫瘍化の問題など、実際の臨床応用実現の前に解決すべき課題はまだ多い。

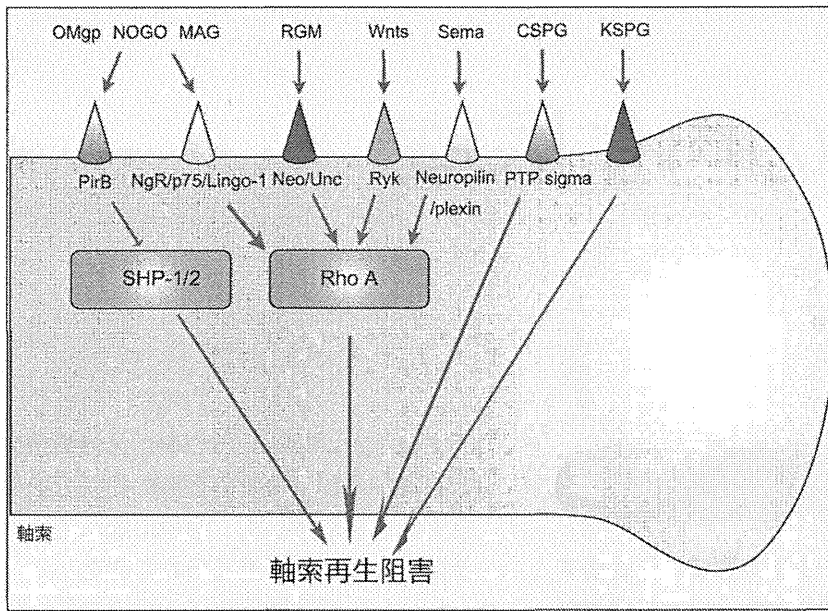
近年ヒト皮膚の線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立¹⁶⁾ に続き、一本の髪の毛²¹⁾ や一滴の血液²²⁾ からのヒト iPS 細胞樹立も報告された。実際に iPS 細胞を移植治療に用いる場合は、ゲノムに外来性の遺伝子が挿入されていない iPS 細胞を使用することが好ましいと考えられる²³⁾。iPS 細胞の樹立法に関しては近年急速に研究が進展し、レトロウイルスまたはレンチウイルスを用いずに、プラスミドベクターを用いた方法²⁴⁾、トランスポゾン的一种である piggyBac を用いた手法²⁵⁾、染色体外挿入しついで消失するエピソームベクターの導入²⁷⁾、プラスミドベクターよりも長期間の発現が可能である minicircle vector²⁸⁾、薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功^{29, 30)} 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(ウシ血清) やフィーダー細胞 (マウス由来) を用いずに iPS 細胞を樹立する方法も報告された³¹⁾。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³²⁾。今後、glia 細胞も誘導可能になれば有望な移植細胞となり得る可能性がある。しかし、これらの方法で作製された iPS 細胞由来 NS/PC が、マウス脊髄損傷モデルへの移植効果が確認できたレトロウイルスで作製された iPS 細胞と同等の多能性や分化

能力を有しているが、移植細胞として安全性が高いのかどうかについては、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 細胞による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が肝要である。

参考文献

- 1) Lindvall O, et al : Transplantation strategies in the treatment of Parkinson's disease: experimental basis and clinical trials. *Acta Neurol Scand. Suppl* 126 : 197-210, 1989.
- 2) Diener PS, et al : Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 18 : 763-778, 1998.
- 3) Diener PS, et al : Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci* 18 : 779-793, 1998.
- 4) Reynolds BA, et al : A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12 : 4565-4574, 1992.
- 5) Ogawa Y, 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.
- 6) Iwanami A, et al : Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80 : 182-190, 2005.
- 7) Yamane J, et al : Transplantation of galectin-1-expressing human neural stem cells into the injured spinal cord of adult common marmosets. *J Neurosci Res* 88 : 1394-1405, 2010.
- 8) McDonald J, et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 6126-6131, 1999.
- 9) Keirstead HS, et al : Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25 : 4694-4705, 2005.
- 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* 4 : e7706, 2009.
- 11) Mayor S : First patient enters trial to test safety of stem cells in spinal injury. *BMJ* 341 : p. c5724, 2010.
- 12) Mason DW, et al : The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19 : 685-694, 1986.
- 13) Nicholas MK, et al : Rejection of fetal neocortical neural transplants by H-2 incompatible mice. *J Immunol* 139 :

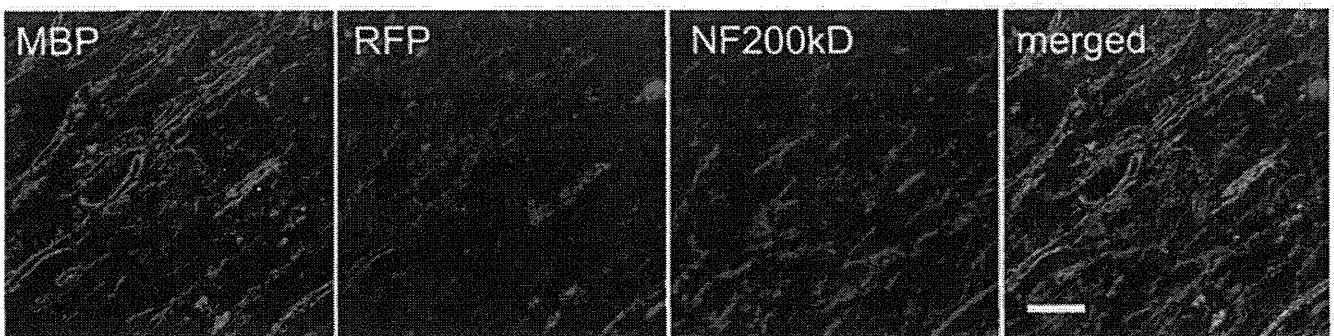
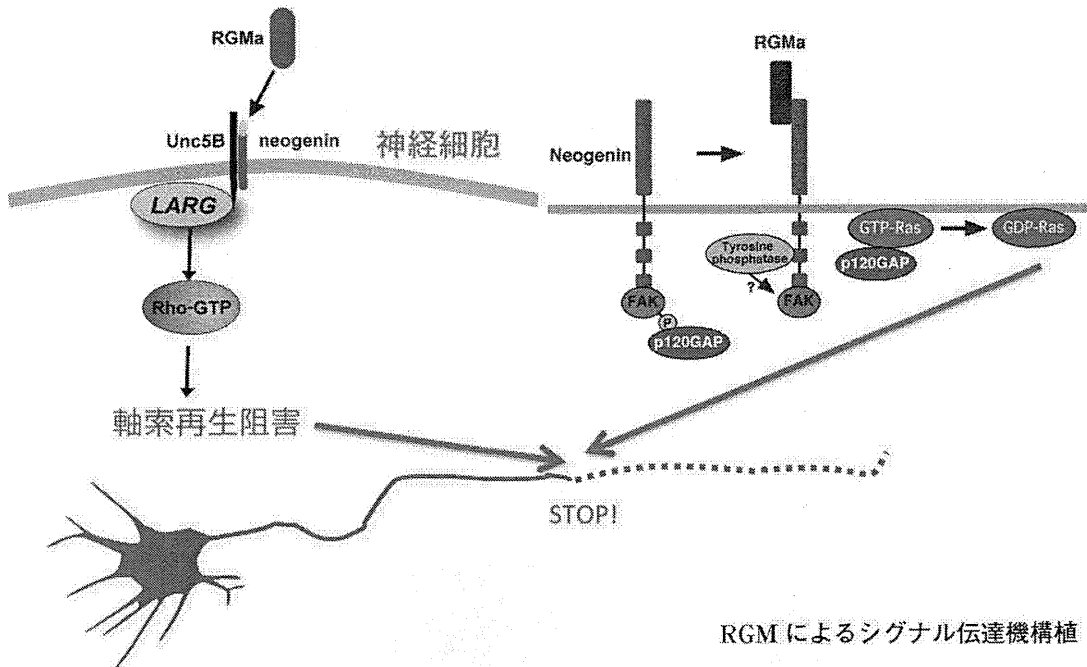
- 2275-2283, 1987.
- 14) Cummings BJ, et al : Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 14069-14074, 2005.
 - 15) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006.
 - 16) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007.
 - 17) Okada Y, et al : Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 3086-3098, 2008.
 - 18) Okita K, et al : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 : 313-317, 2007.
 - 19) Miura K, et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 448 : 743-745, 2009.
 - 20) 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.
 - 21) Aasen T, et al : Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26 : 1276-1284, 2008.
 - 22) Seki T, et al : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7 : 11-14, 2010.
 - 23) Hacein-Bey-Abina S, et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
 - 24) Okita K, et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949-953, 2008.
 - 25) Woltjen K, et al : piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458 : 766-770, 2009.
 - 26) Kaji K, et al : Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458 : 771-775, 2009.
 - 27) Yu J, et al : Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324 : 797-801, 2009.
 - 28) Jia F, et al : A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7 : 197-199, 2010.
 - 29) Maherali N, et al : Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19 : 1718-1723, 2009.
 - 30) Zhou H, et al : Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4 : 381-384, 2009.
 - 31) 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* 5 : e14099, 2010.
 - 32) Vierbuchen T, et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 : 1035-1041, 2010.



軸索再生阻害をもたらす複数のタンパク質 (p.20)

RhoAの活性化

Rasの不活性化



“安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (p.37)

損傷脊髄の再生医療

向野雅彦¹⁾ 中村雅也²⁾

はじめに

脊髄損傷は交通事故やスポーツ事故等により受傷するケースが多いとされ、毎年約5,000人以上の患者が新たに発生している。症状は四肢の運動麻痺が中心であり、高度な損傷により完全麻痺を呈する例も少なくない。その他にも、感覚障害、膀胱直腸障害、褥瘡等の合併症が発生し、患者のQOLを著しく阻害する。現在、国内で後遺症に苦しんでいる患者の総数は10

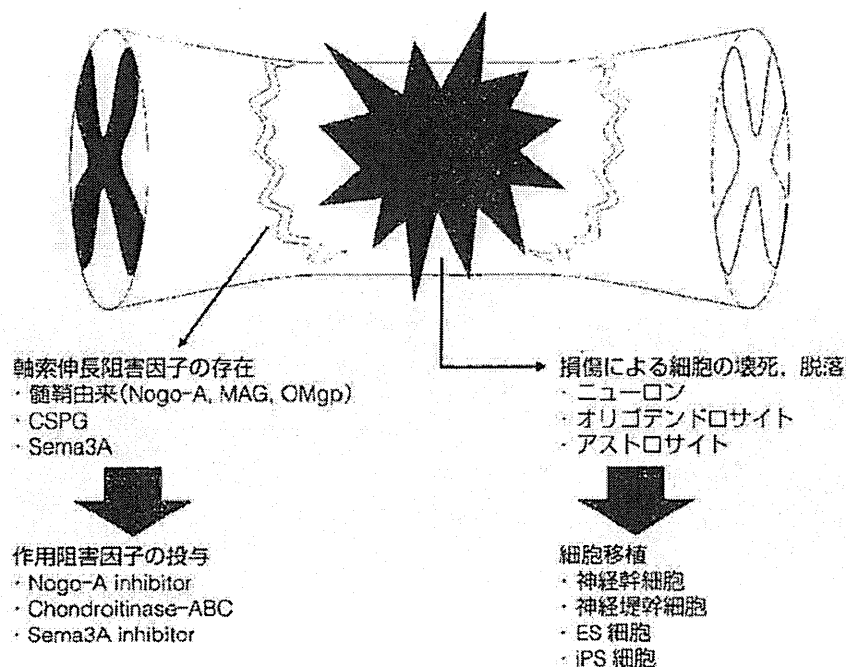
万人以上といわれており新たな治療法の出現が待ち望まれているが、現行の医療の範囲で機能改善を得る手立てはないに等しく、治療に際しては専ら二次損傷の予防のみに焦点が当てられてきた。

しかし、幹細胞研究に代表される近年の再生医療の分野における研究の進展により、中枢神経の損傷はいったん完成してしまえば不可逆なもの、という常識は覆されつつある。再生医療の研究はさまざまな分野で行われているが、脊髄損傷の分野は研究が特に盛んに行われている分野のひとつである。1980年代のAguayoらのグループによるラット脊髄損傷モデルに対する末梢神経移植とそれに伴う軸索伸張の報告¹⁾に始まり、軸索伸長阻害因子のブロック、神経幹細胞の移植、さらに最近ではES細胞やiPS細胞といった万

¹⁾ Masahiko Mukaino MD PhD
慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター

²⁾ Masaya Nakamura MD PhD
慶應義塾大学医学部整形外科教室

■ 図 脊髄損傷に対する再生医学研究のターゲット



能幹細胞を用いた治療に至るまで、神経再生を実現し機能回復につなげようという試みが活発に行われている(図)。

本稿ではこれまで明らかにされた脊髄損傷の分野における再生医学研究の近年の進展について概説する。

軸索伸長阻害因子の発見

20世紀初頭に Ramon Y Cajal が中枢神経系の解剖について詳細にわたる報告²⁾を行い、中枢神経系においては新たな連絡の形成という意味での実質的な軸索の再生は起こらないと結論付けた。このことは疾患としての中枢神経損傷の示す経過ともよく符合しており、中枢神経系がそもそもそういった組織の再生を許容しない性質をもっているという事実は、神経生理学の分野においても常識として扱われてきた。しかし一方で、中枢神経において何が再生を阻害するのかというメカニズムについては合理的な説明はなされていなかった。

それが明らかとなってきたのは、1980年代に入り、Schwabらによって中枢神経の髄鞘(ミエリン)を構成する物質のなかに、軸索の再生を阻害する因子が存在することが発見されてからのことである³⁾。後にこの物質は Nogo-A という蛋白として同定されるわけであるが、この発見を端緒として、他にも MAG、OMgp といったミエリン由来の軸索伸長阻害因子が同定された^{4,5)}。実際に Nogo-A に対するモノクローナル抗体を損傷部脊髄に持続投与し、機能回復を認めたと報告されたこともあり、この軸索阻害因子が治療のターゲットとして注目を集めることとなった。さらに、損傷周囲のグリア細胞から放出されるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が軸索の伸展を阻害することも明らかとなった⁶⁾。CSPG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、Bradburyらは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報告した⁷⁾。その他にも神経回路形成に際しての軸索のガイダンス因子として、線維芽細胞性癒痕からはセマフォリン、エフリン等の軸索伸長阻害因子が供給されており、筆者らの研究グループにおいてもわが国の製薬企業のグループとの共同研究により、新規のセマフォリン 3A 阻害剤による脊髄の軸索再生誘導と機能回復に成功している⁸⁾。

こうした研究の結果を受けて、最近では軸索再生阻害因子の作用を制御し軸索の伸展を許容する環境をつ

くることが、再生医学の分野における1つの重要なテーマとなっている。しかしその一方で、これらの分子は損傷部の拡大を防ぎ、あるいは異常な sprouting を防ぐことによって損傷の修復に有利な一面をもつことも指摘されている。これらをターゲットとした治療的な介入を考慮するうえでは、損傷の拡大や allodynia の出現のような副作用の発生等のリスクも考慮に入れ、作用の両面についての理解を深めることが必要であると考えられる。

幹細胞医学の進展

1980年代以降、Aguayoらによるラット脊髄損傷モデルに対する末梢神経移植とそれに伴う軸索伸張の報告、Freundらによる脳への胎児黒質組織の移植に伴うシナプス形成の報告⁹⁾といったように、ある一定の条件下においては中枢神経組織が移植組織の存在を許容し、軸索を介した連絡をつくることが知られていたが、さらに神経幹細胞を移植材料として用いるところから移植医療の研究は大きく発展していった。神経幹細胞は中枢神経系に存在する組織幹細胞とよばれる未分化な細胞であり、神経組織を形成するニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトに分化し(多分化能)、分裂を繰り返して増殖する能力(自己複製能)を有している。神経生理学の発展のなかで成体の中枢神経内にも未分化な神経幹細胞が存在することが明らかにされ、さまざまな病態で組織修復に働いていることがわかってきたことから、培養した幹細胞を移植することによって組織修復を促進しようとする研究が行われるようになった。当初は損傷脊髄内では移植細胞のほとんどがアストロサイトへ分化していることから神経幹細胞移植の有用性を疑問視する向きもあったが、筆者らは急性期に分泌されるサイトカインや神経栄養因子によりこういった分化の誘導がコントロールされている可能性を考え、亜急性期に移植を行うことで組織への新たなニューロンやオリゴデンドロサイトの供給、またその結果として有意な機能回復の改善効果が得られることを報告した¹⁰⁾。さらに、コモンマーモセットを用いた霊長類での脊髄損傷モデルに、ヒト中絶胎児由来の神経幹細胞を移植し、同様に in vivo におけるニューロン分化や有意な機能改善がみられることも明らかとなった¹¹⁾。

こうした結果から、次に期待されるのは臨床への応用ということになるが、実際には神経幹細胞は胎児組織から採取するため、臨床応用の実現は非常に困難である。中絶胎児から採取することに唯一実現の可能性

があるが、それが倫理上許されるかどうかについては議論の分かれるところである。そのような背景から、最近では実際の臨床応用を見据え、細胞の供給源をより倫理的な障害の少ない皮膚、骨髄等の成体の組織由来で神経への分化能もつ神経堤幹細胞、あるいは組織幹細胞よりもさらに未分化な形態である受精卵由来の胚性幹細胞(ES細胞)や線維芽細胞等への遺伝子導入により未分化な形質を獲得させた人工多能性幹細胞(iPS細胞)といった新たな手法を用いた幹細胞に関する研究が盛んに行われるようになってきた。Millerらは、皮膚由来神経堤幹細胞をシュワン細胞へ分化させたのちに、ラット脊髄圧挫損傷モデルに移植すると、軸索伸長と内在性シュワン細胞の集積を認め、さらに下肢運動機能が回復することを報告した¹²⁾。しかし、これらの研究で用いられた細胞は胎仔由来であり、臨床応用の鍵となる成体由来の細胞を用いた治療の有効性はいまだ報告されていない。

一方、神経幹細胞による治療の有効性が多くの研究で示されていることから、さらに未熟な細胞である胎性幹細胞(ES細胞)、さらには2006年に京都大学の山中教授らが発表したiPS細胞(人工多能幹細胞)を神経幹細胞等に分化させ移植することが試みられており、これらの研究には一定の成果が報告されている¹³⁾。しかし、このアプローチにも移植細胞の腫瘍化という高いハードルが存在する。元来、ES細胞を含め多能性幹細胞にはすべての組織に分化する能力、自己複製を行う能力があるため容易に腫瘍を形成することが知られている。そこで安全性の検討のために、マウスES細胞とiPS細胞から神経幹/前駆細胞を作製し、免疫不全マウスの脳線条体へ移植したところ、ES細胞由来の神経幹細胞移植マウス群の1割、iPS細胞由来の細胞移植マウス群の4割において、混入した分化抵抗性細胞由来の奇形腫形成が観察された¹⁴⁾。この問題を解決するため、さまざまな手法で多能性を維持しつつ腫瘍化を予防するための研究が進められているが、現在のところはその懸念を完全に払拭するには至っていない。

とはいえ、幹細胞を移植することで細胞補充をするという考えかたは非常に魅力的であり、軸索伸長阻害因子の中和抗体や分解酵素を用いた治療とともに、それらとの併用も視野に入れた今後の研究の進展が大いに期待されるところである。これらの努力によって安全性、倫理上の問題に答えが出され、幹細胞移植医療がさまざまな中枢神経疾患の治療における重要な選択肢のひとつとなる日もそう遠くはないかもしれない。

リハビリテーションの併用

これらの治療の臨床応用を考えた際に、介入の成果を実際の機能改善に結び付ける段階では、新たな神経ネットワークの形成のためのリハビリテーションが重要な役割を担うことが予想される。ただし、細胞移植、軸索再生、リハビリテーションについてはそれぞれ既に多くの報告でその有効性が実証されているものの、その併用についての報告は多くない。細胞移植に関してはKubasakらが嗅粘膜下のグリア細胞(幹細胞が含まれる可能性が示唆されている)の移植に訓練を組み合わせると、細胞単独よりもさらに軸索の伸展とともに機能の改善を認めたことを報告している¹⁵⁾。また、軸索再生の促進との併用効果については、Garcia-AllasらがCSPGの軸索伸長阻害作用をブロックするコンドロイチナーゼABCの投与と機能訓練を組み合わせることにより、コンドロイチナーゼ単独ではほとんどみられなかった機能改善が有意に観察され、軸索の連絡が改善したことを報告している¹⁶⁾。一方、Maierらの報告では同じく抗NogoA抗体による軸索伸長阻害のブロックと、トレッドミルを使った運動機能訓練がそれぞれ機能回復をもたらしたが、併用による効果の増強はみられなかったとしている¹⁷⁾。

このように一部では幹細胞移植あるいは軸索再生の促進とリハビリテーションの併用の有効性を示した報告もなされてはいるものの、数が少なく評価は一定していない。一方では、Hummらの報告のように運動負荷によるNMDA型グルタミン酸シナプスの活動増加がcytotoxicな環境をつくる可能性も指摘されており¹⁸⁾、このような併用効果の検討にあたっては、介入が与える影響、起こり得る事象について、メカニズムの全体像をもう少し明らかにする必要があるのかもしれない。

まとめ

脊髄損傷を対象とした再生医学研究の近年の進展について述べた。これまで長い間、中枢神経組織における障害は不可逆であるとの観点からその治療に関する研究は専ら損傷の拡大の予防に焦点が当てられてきたが、軸索再生、細胞移植を柱とする再生医療の研究のさらなる発展は、現在も重篤な麻痺等の後遺症に苦しむ多くの患者にこの先新たな希望をもたらすことができるかもしれない。本稿にあげたような基礎的な研究成果を積み重ねていくことで、安全かつ効果的な臨床応用を実現することが切に望まれる。

文献

- 1) David S, Aguayo AJ : Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214(4523) : 931-933, 1981.
- 2) Ramon Y Cajals : Structure and connections of neurons. *Bull Los Angel Neuro Soc* 17(1-2) : 5-46, 1952.
- 3) Schwab ME, Caroni P : Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8(7) : 2381-2393, 1988.
- 4) Mukhopadhyay G et al : A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13(3) : 757-767, 1994.
- 5) Wang KC et al : Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417(6892) : 941-944, 2002.
- 6) McKee RJ et al : Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136(1) : 32-43, 1995.
- 7) Bradbury EJ et al : Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416(6881) : 636-640, 2002.
- 8) Kaneko S et al : A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12(12) : 1380-1389, 2006.
- 9) Freund TF et al : Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum : a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5(3) : 603-616, 1985.
- 10) Ogawa Y 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(6) : 925-933, 2002.
- 11) Iwanami A et al : Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80(2) : 182-190, 2005.
- 12) Biernaskie J et al : Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27(36) : 9545-9559, 2007.
- 13) Tsuji O et al : Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(28) : 12704-12709, 2010.
- 14) Miura K et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27(8) : 743-745, 2009.
- 15) Kubasak MD et al : OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131(Pt 1) : 264-276, 2008.
- 16) Garcia-Alias G et al : Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12(9) : 1145-1151, 2009.
- 17) Maier IC et al : Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain* 132(Pt 6) : 1426-1440, 2009.
- 18) Humm JL et al : Use-dependent exaggeration of brain injury : is glutamate involved? *Exp Neurol* 157(2) : 349-358, 1999.