

201419093B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シュワン細胞による
脳梗塞の神経修復治療

平成 24 年度～平成 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 松瀬 大
(九州大学大学院医学研究院神経内科学 助教)

平成 27 (2015)年 5 月

目次

I. 総合研究報告書	1
骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シュワン細胞による脳梗塞の神経修復治療	
松瀬 大（九州大学大学院医学研究院神経内科学）	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	16

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））

総合研究報告書 概要版

骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シュワン細胞による脳梗塞の神経修復治療

研究代表者 松瀬 大 九州大学大学院医学研究院神経内科学 助教

研究要旨 脳梗塞は罹患率の高い疾患であり、かつ発症後の症状を改善する治療法に乏しいため、多くの患者が後遺症に苦しんでいるのが現状である。そのもっとも大きな理由の一つとして、中枢神経は通常軸索再生作用がほとんどない点が挙げられる。近年脳梗塞の新たな治療法の一つとして、細胞移植治療が注目されてきている。様々な細胞を用いた脳梗塞への移植研究がなされているが、中枢神経へも軸索再生を促す細胞が有用な細胞源となりうる可能性がある。本研究では、中枢、末梢神経へ軸索再生促進作用をもたらすシュワン細胞に注目した。そのシュワン細胞を間葉系細胞から誘導し、それを脳梗塞モデルへ移植する研究を行う。脳梗塞後の障害された軸索の再生を促し、神経症状を改善させる新たな治療法を確立することを目指す。また、脱髄疾患、パーキンソン病といった、他の神経疾患に対しても同細胞の移植治療を行い、神経疾患全般に対する本細胞の移植治療法の確立を試みる。

結果 ラット骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)、ヒト臍帯間葉系細胞(UC-MSCs)からシュワン細胞(BM-SCs、UC-SCs)を誘導し、シュワン細胞特異的なマーカーの発現を *vitro* で確認した。脳梗塞モデルとして、中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルラットを作成し、移植実験を行った。また、中枢性脱髄疾患に対する本細胞の治療応用についても検証し、また本細胞の中枢神経系における軸索再生能を確認する目的で、中枢性脱髄動物モデルも作成し、移植実験を行った。中枢性脱髄モデルとしては、当初は **experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)** ラット、**Cuprizone** を使用した脱髄モデルラットを作成し、細胞移植を行った。しかし前者は一定の臨床経過をとるモデル群の作成が困難であり、また後者は臨床症状により比較評価することがほぼ不可能で、また脱髄層が小さいために手技的に局所移植が困難であった。したがって最終的には **Ethidium bromide** を脊髄に局注し、局所の脱髄モデルを作成し、細胞を脱髄部に局注しての評価を行った。さらに、変性疾患モデルとしてパーキンソン病モデルも、**6-OHDA** 注入によって作成し、細胞移植を行って治療効果を評価した。しかしいずれのモデルでもこれまでのところ、個体差はあるものの、全体としては有意な機能改善、組織学的改善が得られなかった。移植細胞動態を解析したところ、誘導したシュワン細胞の中枢神経系への生着能が非常に低く、移植後数週間で生体内から排除されている所見が確認された。また移植後早期に、移植臓器内で確認された移植細胞も、シュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは発現を低下させている所見が得られ、間葉系細胞から誘導されたシュワン細胞は、少なくとも今回の実験系においては移植後シュワン細胞としての性質、機能を失っている可能性も示唆された。

研究分担者氏名・所属研究機関名
及び所属研究機関における職名

九州大学大学院医学研究院
神経内科学・助教
松瀬 大
九州大学大学院医学研究院
臨床神経免疫学・准教授
松下 拓也
九州大学大学院医学研究院
神経内科学・共同研究員
吉村 怜

A. 研究目的

脳梗塞は罹患率の高い疾患であり、罹患すると多くの後遺症を残し、ADLを大きく損ねることが少なくないが、発症後の症状を改善する治療法に乏しいのが現状である。過去の脳梗塞に対する細胞移植治療研究は多くなされており、機能改善を認めているものが多数見られるが、そのほとんどは機能改善の機序が明確にされていない。移植細胞もさまざまなものが使用されているが、移植した細胞そのものが失われた細胞の代わりとなって機能改善しているというよりむしろ、移植細胞の栄養効果等による改善が主である報告が少なくないと思われる。

シュワン細胞は軸索再生を促す作用を持ち、移植した場合、末梢神経だけでなく、中枢神経においても軸索の再生をサポートする。したがって、本来軸索再生能力に非常に乏しい中枢神経疾患において、シュワン細胞を用いた細胞移植治療は非常に高い可能性を持っていると思われる。しかし、

シュワン細胞を神経疾患の治療に実用化する際に、末梢神経由来のシュワン細胞を使用する場合は、シュワン細胞を得て培養するために他の健康な末梢神経を切除せざるを得ない。さらに、適切な時間の中で治療に十分な量のシュワン細胞を培養、増殖させることは技術的に困難である。したがって、末梢神経に代わって、シュワン細胞の機能を持った細胞を十分量容易に得ることができる細胞源が渴望されている。

我々は最近、間葉系細胞からシュワン細胞を誘導することに成功した。それを末梢神経障害部へ移植することで、移植細胞自身が再髄鞘化し軸索再生を促進することで神経機能回復を果たすことを明らかにした。これらの方法を用いて間葉系細胞から分化誘導したシュワン細胞を活用することで、健康な末梢神経を損傷することなく有効な細胞移植治療が可能となっている。

本研究では、間葉系細胞からシュワン細胞を誘導し、それを脳梗塞モデルへ移植することで軸索の再生を促し、脳梗塞後の神経症状を改善させる新たな治療法を確立することを目的とする。それにより、神経細胞を外部から補充するのではなく、hostの軸索再生機能を促進することによる移植治療が可能となる。脳梗塞モデルとして

は、中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) を用い、局所へ細胞移植することにより、治療効果の評価を行う。

また、中枢性の脱髄モデルに対する有効性を確認し、さらに中枢神経系での軸索再生能を証明するため、中枢性の脱髄モデルも作成した。さらに、変性疾患モデルとしてパーキンソン病モデルも作成。それらの動物モデルに対しても、誘導したシュワン細胞を移植し、機能的、組織学的改善、軸索再生の評価を行う。これらの実験を通して、脳梗塞のみならず、中枢神経疾患全般に対する間葉系細胞由来シュワン細胞の移植法樹立を行い、将来へのヒトへの臨床応用の基盤づくりを行う。

研究方法

1) ラット骨髄・ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

Wistar Rat (8 週齢、♂) の骨髄から間葉系細胞(BM-MSCs)を採取し、3 代継代培養。その後 beta-mercaptoethanol (BME)、All-trans retinoic acid (ATRA) で処理した後、human basic fibroblast growth factor (FGF)、forskolin (FSK)、platelet-derived growth factor-AA (PDGF)、heregulin-beta1-EGF-domain (HRG)の trophic factor を加えること

で、シュワン細胞(BM-SCs)の誘導を行った。細胞密度や誘導の日数、試薬の濃度は条件を変え、最適なものを選択した。

誘導細胞は、S100 β 、PMP22、GFAP、P0、O4 等の発現を免疫細胞化学で調べることで、シュワン細胞への分化を確認した。また S100 β については、定量的 PCR にて、誘導の段階ごとの mRNA の発現も調べた。さらに、誘導細胞について、中枢神経系への移行に重要といわれている PSA-NCAM の発現を免疫細胞化学的に確認した。

移植に際して、当初レンチウイルスによる緑色蛍光タンパク質(GFP)標識と、Hoechst による標識を当初試みていたが、GFP の標識率の低さと、Hoechst 標識の信頼性の問題が生じたため、GFP ラット (Wistar) を購入し、その大腿骨、脛骨から BMMSCs を採取。それから誘導した BM-SCs を用い、移植実験を行った。

また、ヒト臍帯の Wharton's jelly から間葉系細胞(UC-MSCs)を採取。BM-MSCs と同様に誘導、評価を行った。

2)中大脳動脈閉塞モデルラットに対する細胞移植

Wistar Rat (8 週齢、♂) に対し、イソフルレンで麻酔後、silicon coated monofilaments (Doccol Corporation)

を用い、2時間の中大脳動脈閉塞を行い、脳梗塞モデルを作成した。モデル作成後7日目に、再度イソフルレンで麻酔し、経頭蓋的にラット骨髄間葉系細胞を移植した。細胞はPBSにて 1.0×10^4 cells/ μ lに希釈。6 μ lを線条体 [from the bregma: anterior (A) 0.0mm, right (R) + 2.0mm, ventral (V) - 4.5 mm] と、4 μ lを皮質 [from the bregma: A 0.0mm, R + 2.0mm, V - 2.0 mm] へ移植した。移植細胞は、PBS(vehicle)群、BM-MSCs 由来シュワン細胞(BM-SCs)、を準備。移植細胞はGFPラット由来のため、すでにGFPで標識されている。

移植後の評価期間は当初2-3か月を予定していたが、35日時点で一旦評価を行うこととした。機能評価として、modified limb placing test (mLPT)を用いる。mLPTは移植後7日毎に施行した。

組織学的には、脳梗塞体積、移植細胞の生存率をまず確認。移植細胞が確認されれば、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか等について評価する。

3) 中枢神経系脱髄モデルラットに対する細胞移植

BM-SCsの中枢神経生着能と髄鞘化作用をvivoで確認するため、また、

中枢性の脱髄疾患に対する本治療法の有効性を確認するため、中枢神経系脱髄モデルラットを作成した。モデルとしては、

i) experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ラット
ii) Cuprizoneによる脱髄ラット
iii) Ethidium bromide(EB)による脱髄ラットを作成し、移植を行い、生着や軸索再生能についての解析を試みた。なお、当初はi)、ii)のモデルを利用した移植実験を予定していたが、後述する問題点が生じ、方法を変更しながら改善を試みたものの解決せず、最終的にはiii)のモデルを、中枢神経系脱髄モデルとして採用した。また、i)、ii)の実験の際はまだGFPラット入手前の段階であり、これらの移植実験に関しては、移植細胞をレンチウイルスによってGFPラベリングを行い、さらに移植前にHoechstにて染色して移植していた。

i) EAEモデル動物としては、より慢性に近い経過をとるDA Ratを選択。作成方法としては、7~9週齢、雌を使用し、内容としては、

a) 1 mg/ μ g の MOG 1-125
b) 4 μ g/ μ l の Mycobacterium tuberculosis を含む complete Freund adjuvant

a)とb)を1:1で混合し、ラットのテール基部に50 μ lずつ2か所に皮下注射

た。

EAE モデル作成 14 日後に、動物をイソフルレンで麻酔し、下部腰椎部分の背部を露出する。L5-6 の椎間を穿刺し、DA Rat 由来の BM-SCs を 2×10^6 cells/20 μ l PBS、髄腔内へ移植した。評価期間を移植 35 日後とし、しかし一部移植 7 日後に安楽死させ、病巣部への移植細胞の migration を確認した。

ii) Cuprizone による脱髄ラットは、Wistar Rat に 0.6% の cuprizone を含んだ餌を 21 日齢から連日与えることで作成。63 日齢の時点で、Wistar Rat 由来の BM-SCs を、 1.0×10^5 cells/2 μ l PBS、脳梁の脱髄部位へ経頭蓋的に移植して評価した。105 日齢で安楽死させ、組織評価を行った。

iii) EB による脱髄ラットは、Wistar Rat (8 週齢、♂) に対し、イソフルレンで麻酔後、laminectomy を行い、脊髄後面を露出。Th10 レベルに 0.3 mg/ml の EB を 3 μ l 局注。モデル作成 7 日後に、EB 注入部位に GFP ラット (Wistar) 由来の BM-SCs を 2×10^5 /2 μ l PBS にて移植した。評価方法としては、本モデルは明らかな下肢麻痺などの機能低下を来しにくく、行動評価は困難であったため、組織学的な評価を行った。組織学的には、脱髄巣体積、移植部位周辺の NF 陽性軸索数、移植細胞の生存率を評価した。NF

陽性軸索数については、正常組織境界から 50 μ m 部位の NF 陽性軸索密度を測定し、コントロールとしての PBS 移植群(n=6)と BM-SC 移植群(n=6)で比較した。移植細胞が確認されれば、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、host の軸索の再髄鞘化を行っているか等について評価する。

4) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

275-290g の Wistar rat (♂) に対し、イソフルレンで麻酔後 6-OHDA 12 μ g (dissolved in 4 μ l of 0.9% saline containing 0.02% vitamin C) を線条体 (4.8mm PA, 1.8mm right lateral, 7.8mm ventral from bregma) へ注入することで作成。6 週後、アポモルフィン誘発回転運動を施行し、1 分間に 10 回転以上の個体をモデルとして選択。同部位へ細胞を移植 (1×10^5 cells/2 μ l PBS)。行動評価は、週に 1 回のアポモルフィン誘発回転運動で評価。PBS 移植群(n=3)と BM-SC 群(n=6)とで比較した。また、移植細胞の発現しているマーカーを確認し、移植細胞がシュワン細胞の性質を維持できているか、host の TH 陽性細胞の増加を来しているか等について評価する。移植細胞は GFP ラット由来

のものを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学の倫理委員会において承認を受け、動物実験においては当施設の動物実験施設の規約およびマニュアルにそって行う。臍帯については、当院婦人科学産科学教室・総合周産期母子医療センターでの満期帝王切開症例のうち同意を得られた症例から、分娩後に本来破棄予定である臍帯の一部の提供をいただく。臍帯の提供を受ける際には、インフォームドコンセントを徹底し、書類で確認をする。また、提供者の個人情報が入り込まないようプライバシーの保護に十分配慮する。これらの内容はすでに九州大学の倫理委員会で承認済みである。ヒト骨髄間葉系細胞の使用に関しても、すでに九州大学の倫理委員会で承認済みである。

C. 研究結果

1) ラット骨髄・ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞の誘導

8週齢の Wistar Rat 骨髄から間葉系細胞を採取し、3代継代培養。2.86 × 10³ cells/cm² の密度で細胞を撒き、BME(1 mmol/L) を含む無血清培地で24時間培養。その後 ATRA (35 ng/mL)、10%FBS を含む培地で72時間培養。最後に、10%FBS を含む培

地へ FGF(10 ng/mL)、FSK(5 μmol/L)、PDGF(5 ng/mL)、HRG(200 ng/mL) の栄養因子を加え、5-7日培養することで、シュワン細胞の誘導に成功した。

誘導した細胞は S100β、PMP22、GFAP などのシュワン細胞のマーカーを発現していた(図1)。また、S100βについては、誘導の最終段階で、FGF、FSK、PDGF、HRG といった4つの trophic factors (TF) を加えることで、大きく発現を上昇させることが分かった(図2)。さらに、細胞の中核移行性に必要といわれている PSA-NCAM の発現を調べたところ、誘導前の間葉系細胞は発現が軽度見られたものの、誘導後は発現が低下していることが免疫細胞化学にて確認された(図3)。

図1 ラット骨髄間葉系細胞(BM-MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)におけるマーカー発現

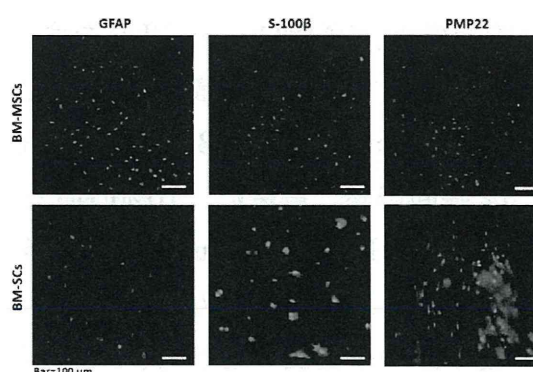


図2 BM-SCs誘導段階ごとのQ-PCRでの、S100βのmRNA発現

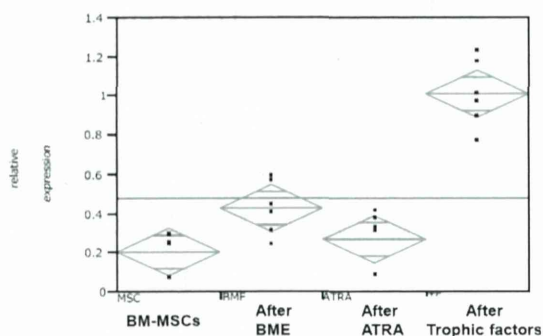


図4 ヒト臍帯間葉系細胞(UC-MSCs)から誘導したシュワン細胞(UC-SCs)におけるマーカー発現

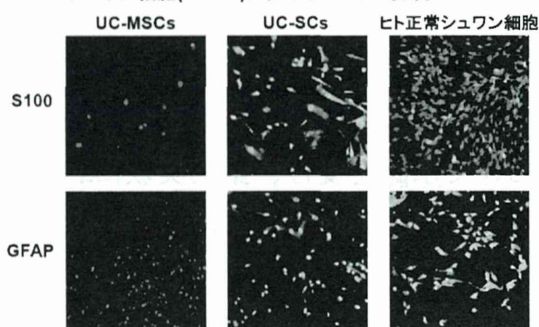
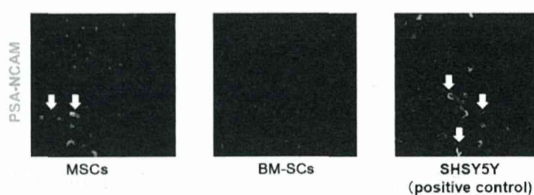


図3 DAラット骨髄間葉系細胞(MSCs)から誘導したシュワン細胞(BM-SCs)の、PSA-NCAMの発現の変化

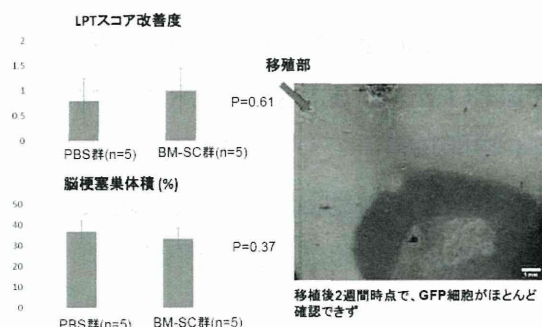


ヒト臍帯からも同様にシュワン細胞の誘導を確認した。提供を受けた臍帯から間葉系細胞を採取し、3代継代培養。3.81 × 10³ cells/cm²の密度で細胞を撒き、BME(1 mmol/L)を含む無血清培地で24時間培養。その後ATRA(35 ng/mL)、10%FBSを含む培地で72時間培養。最後に、10%FBSを含む培地へFGF(10 ng/mL)、FSK(5 μmol/L)、PDGF(5 ng/mL)、HRG(200 ng/mL)の栄養因子を加え、3-5日培養することで、シュワン細胞の誘導に成功した。誘導した細胞はS100βやGFAP等を発現していた(図4)。

2) 中大脳動脈閉塞モデルラットに対する細胞移植

Wistar Ratの中大脳動脈閉塞モデルに対する細胞移植は、移植35日目におけるPBS群(n=5)、BM-SCs群(n=5)を評価。移植35日目のmLPTの改善度は、PBS群、BM-SCs群それぞれ0.8 ± 0.4、1.0 ± 0.7 (p=0.61)、であった。また脳梗塞体積は、対側大脳半球と比較した梗塞巣体積の割合はそれぞれ37.0 ± 5.3%、33.6 ± 5.2% (p=0.37)、であった(図5)。いずれも平均値としてはBM-SCs群により改善を認めたが、統計的に有意な差は示せなかった。移植5週以降での評価を予定していたが、組織学的には移植2週後の時点で、すでにGFP陽性の移植細胞は確認できなかった(図5)。

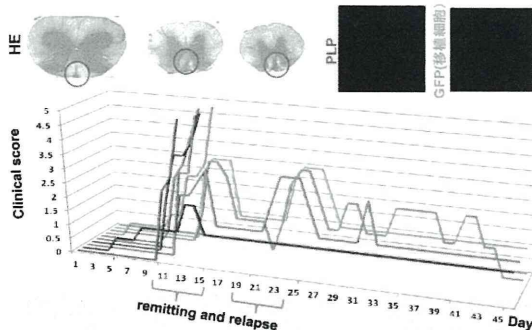
図5 脳梗塞モデルに対するBM-SCs移植



3) 中枢神経系脱髄モデルラットに対する細胞移植

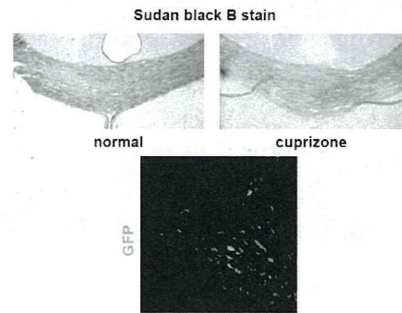
5) i)EAE モデルは、脊髄に長大病変が認められ、PLP 染色などで脱髄が確認された。移植細胞も、脊髄へ生着はしていたが、長大病変であり、また細胞移植に関わらず臨床症状の変動があり、そのために clinical score も変動の個体差が大きく、定量的な移植治療効果の判定が困難であった (図 6)。

図6 EAEモデルは脊髄に長大病変を作成しており、髄注した移植細胞は病変部位にいくらか浸潤していたが、組織学的、機能的な定量的評価が困難であった。



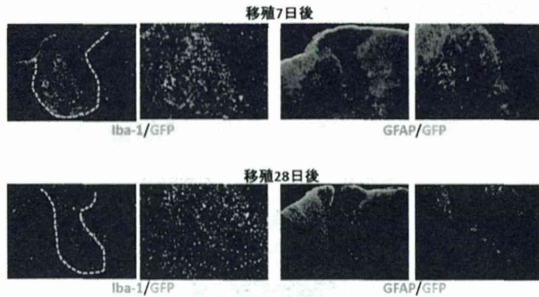
ii) cuprizone モデルは、脳梁部位を中心に脱髄病巣ができ (図 7)、またコントロール群と体重差も認めた。しかしこのモデルは神経学的症状を比較評価することがほぼ不可能で、また脱髄層が小さいために、正確な移植細胞の注入や、定量的な組織学的評価が困難であり、本実験系のモデルとして不適切と判断した。

図7 Cuprizoneモデルは脳梁を中心に脱髄病変を作成していたが、病変部位が微小で、技術的な面も含め、組織学的な定量的評価が困難であった。



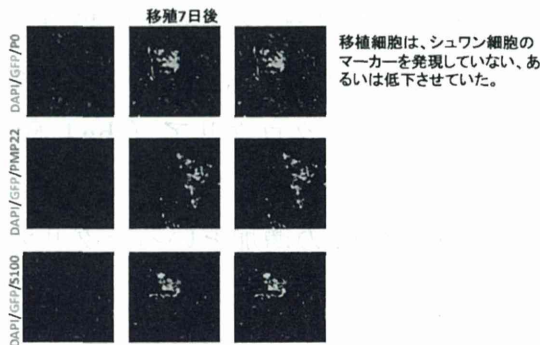
iii) EB 注入 7 日後に、注入部位周辺に fluoromyelin の染色性が低下している部位を認め、比較的広範に脱髄巣ができていたことが確認された。移植部位近辺では、ミクログリア (Iba1 陽性) の浸潤、反応性. アストロサイト (GFAP 陽性) の増加といったグリオシスの所見が観察された (図 8)。移植細胞は、移植 7 日後には生着しているように見えるものの、28 日後までには GFP 陽性細胞が確認できない状態になっており、移植細胞はグリオシスを起こして排除されていると考えられた (図 8)。また、移植 7 日後に移植細胞を染色したところ、P0、PM22、S100 といったシュワン細胞のマーカーを発現していない、あるいは低下させていた (図 9)。また、移植部位付近の NF 陽性軸索も PBS 群 $43.3 \pm 9.9/10^{-8}mm^2$ に対し、BM-SC 群 $48.7 \pm 4.6/10^{-8}mm^2$ ($p=0.26$) と、明らかな増加傾向を認めなかった (図 10)。

図8 EBを用いた脱髄モデルへのBM-SCs移植



移植細胞は、移植7日後には生着しているように見えるものの、28日後までにはグリオシスを起こして排除されている

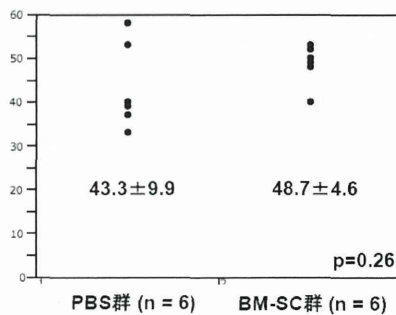
図9 移植後BM-SCsのシュワン細胞のマーカ-



移植細胞は、シュワン細胞のマーカ-を発現していない、あるいは低下させていた。

図10 移植部位周辺のNF陽性軸索密度

($\times 10^{-3} \text{ mm}^{-2}$)



4) パーキンソンモデルラットに対する細胞移植

移植後7日ごとに、アポモルフィン誘発回転運動による行動評価を行った。個体によっては移植後回転運動の改善を認めたが、全体としてはむしろ

増悪の経過をとった。移植後4週間での回転運動の増減は、PBS群 1.7 ± 1.5 、BM-SC群 2.5 ± 1.5 ($p=0.47$)と、コントロールと比べても数値上はより増加する結果となり、有意差を認めなかった(図11)。また、組織学的には、移植28日後ではGFP陽性細胞を認めず、移植7日目は移植細胞を確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカ-を発現していない、あるいは低下させていた(図12)。

図11 アポモルフィン誘発回転運動の変化(回)

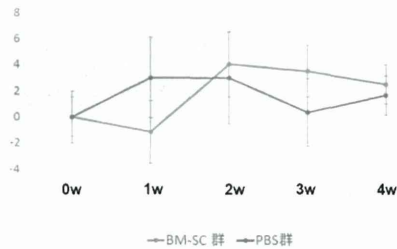


図12 移植後BM-SCsのシュワン細胞のマーカ-



移植28日後ではGFP陽性細胞を認めず、移植7日目は移植細胞確認できたが、移植細胞は、シュワン細胞のマーカ-を発現していない、あるいは低下させていた。

D. 考察

シュワン細胞は末梢神経のグリア細胞であり、軸索をミエリン化し、跳躍伝導などの神経機能に大きな役割を果たしている。末梢神経系が損傷され軸索がミエリンを喪失すると、シュ

ワン細胞は活性化・増殖し、様々な成長因子やサイトカインを放出し、軸索再生に適した微小環境を作る。シュワン細胞はまた、それ自身が機能的回復に必要な不可欠なミエリンを再形成し、末梢神経再生に重要な役割を果たす。さらに、シュワン細胞を移植した場合、末梢神経障害だけでなく、通常十分に再生しない脊髄損傷などの中枢神経障害においても、軸索の再生をサポートすることが最近知られるようになった。事実、中枢神経の脱髄性疾患である多発性硬化症の剖検例では、末梢からシュワン細胞が脊髄内に侵入し軸索を再髄鞘化している像が報告されている。これらの理由から、シュワン細胞は末梢神経のみならず中枢神経においても軸索再生と神経機能回復に大きな役割を担うと期待されている。

骨髄、臍帯等に存在する間葉系細胞は、他のタイプの細胞に分化する能力を持ち、培養も容易で増殖能も高い。細胞バンクも利用可能であり、腫瘍化の報告もないことから、細胞移植治療における細胞源としての実用化が期待されている。骨髄間葉系細胞は、自家移植への応用が可能な点で有用性が高く、臍帯間葉系細胞は採取に侵襲を伴わないため多くのドナーが期待でき、特に自己細胞が使用できない場合の細胞バンクを利用した移植治療

システムへの応用に期待が大きい。したがって本研究では、間葉系細胞をソースにシュワン細胞を誘導し、その軸先再生作用や **trophic effect** による中枢神経疾患の治療方法確立を目指した。

本研究では、中枢神経疾患モデルとして、MCAO モデル、EB による脊髄脱髄モデル、6-OHDA によるパーキンソン病モデルを作成し、それぞれ移植実験を行った。移植細胞としては、GFP ラット由来の BM-MSCs からシュワン細胞の誘導を用いた。しかし移植実験の結果、脳梗塞モデル、脱髄モデル、パーキンソン病モデルいずれにおいても、移植群において明らかな機能改善、組織学的な改善を認めなかった。移植細胞は、移植後 1 週間程度は生着していることが確認されたが、その後徐々に生体内から排除され、約 4 週間には確認できないレベルになっていることが判明した。脱髄モデルでの実験では、Iba1 陽性のミクログリアの浸潤、GFAP 陽性の反応性アストロサイトの増加といったグリオシスの所見が観察され、移植細胞がグリオシスを起こして排除されている可能性が示唆された。**Trophic effect** の可能性についても、脳梗塞モデル、パーキンソン病モデルで明らかな行動評価の改善が見られず、脱髄モデルにおいても、NF 陽性軸索数の有意な

増加を認めなかった。

本研究での問題点は、移植細胞の生着能が非常に低かったことと、移植細胞が移植後にシュワン細胞の性質を失っている可能性が示唆されたことである。厚生労働省科学研究費としての期間は終了したが、引き続きこれらの問題点の解明、解決方法について検討を続けていきたい。移植細胞の生着に関しては、まずは免疫抑制剤使用による生着能の改善が得られるかを試みたい。また、1) レトロウィルスベクターを用いた遺伝子導入法により、PSA-NCAM の発現を維持させた誘導シュワン細胞の作成、2) 澤田らのグループ（名古屋大環境医学研究所）より、脳移行性ペプチドを発現できる融合タンパク質ベクターの供与を受け、脳移行性ペプチドを誘導シュワン細胞に発現させる、3) 移植細胞の足場としてコラーゲンスポンジを使用する、といった、中枢神経移行性、生着性を高める操作も検討していきたい。

移植後シュワン細胞の性質を失う可能性については、生着能の改善を得たのちに、移植後のシュワン細胞マーカー発現の推移を詳細に検討する。少なくとも末梢神経へ移植された際にはシュワン細胞の性質を維持することが確認されているが、中枢神経の部位や疾患の種類についても違いがあるかを検証する。本来シュワン細胞が存

在しない部位でのシュワン細胞性質の維持が難しい可能性もあり、必要に応じて HRG など、シュワン細胞分化に関する因子の徐放剤併用なども検討する。

E. 結論

ラット骨髄間葉系細胞、ヒト臍帯間葉系細胞からシュワン細胞を誘導し、シュワン細胞特異的なマーカーの発現を確認した。ラット骨髄間葉系細胞から誘導したシュワン細胞を用いて脳梗塞モデル、脊髄局所脱髄モデル、パーキンソン病モデルラットに対して病変部に細胞移植を行い、治療を試みた。しかしいずれのモデルでもこれまでのところ、有意な機能改善、組織学的改善が得られなかった。原因としては、誘導したシュワン細胞の中枢神経系への生着能が非常に低かったことが考えられた。また、移植細胞が移植後にシュワン細胞としての機能を失っている可能性も示唆された。この2点を改善させていくことが、今後の研究課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. Cells,

- tissues, organs. 2015; DOI: 10.1159/000368188.
- 2) Ogata H, Matsuse D, Yamasaki R, Kawamura N, Matsushita T, Yonekawa T, Hirotsu M, Murai H, Kira J. A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015; DOI: 10.1136/jnnp-2014-309831.
- 3) Song Z, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, Matsuse D, Murai H, Matsushita T, Kira J. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One*. 2014; DOI: 10.1371/journal.pone.0124923.
- 4) Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest* 2013;123:272-284.
- 5) Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Jorge J. Riera, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplant* 2013;22:1613-25.
- 6) Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M. Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats. *J Spinal Cord Med* 2013;36:134-9.
2. 総説
- 1) 松瀬大, 緒方英紀, 吉良潤一. 免疫性神経疾患 III. 中枢・末梢連合脱髄症 3. 中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療. 日本臨牀, (印刷中) .
- 2) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症のフィンゴリモド療法. *Minds 多発性硬化症トピックス*, 2014.
- 3) 松瀬大, 吉良潤一. 診療ガイドライン UP-TO-DATE2014-2015 中枢神経疾患 多発性硬化症・視神経脊髄炎. *メディカルレビュー社*, 2014 ; 524-529.
- 4) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症. 日本医師会雑誌「神経・精神疾患診療マニュアル」. 南山堂, 2013;218-219.
- 5) 松瀬大, 吉良潤一. 多発性硬化症.

免疫性神経疾患ハンドブック. 南江堂, 2013:68-89.

3. 学会発表

1) 松瀬大. 骨髄・臍帯間葉系細胞由来脳移行性シュワン細胞による脳梗塞の神経修復治療. 厚生労働科学研究(障害者対策総合研究推進事業(精神障害、神経・筋疾患分野)) 研究成果等普及啓発事業 研究成果発表会. 2015年2月5日 東京.

1) 松瀬大、北田容章、若尾昌平、小濱みさき、田畑泰彦、出澤真理、吉良

潤一: 骨髄間葉系細胞からの神経前駆細胞誘導と脳梗塞モデルへの生体材料を用いた有効な移植システムの検討. 第53回日本神経学会学術大会 2013年5月23日 東京.

G 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松瀬大, 緒 方英紀, 吉 良潤一	中枢・末梢連合 脱髄症の病態・ 診断・治療.		免疫性神経疾 患 III.	日本臨牀	東京	2015	印刷中
松瀬大, 吉 良潤一	多発性硬化症の フィンゴリモデ 療法		多発性硬化症 トピックス	Minds	東京	2014	Web公 開
松瀬大, 吉 良潤一	中枢神経疾患 多発性硬化症・ 視神経脊髄炎.		診療ガイドラ インUP-TO-D ATE2014-201 5	メディカルレ ビュー社	東京	2014	524-529
松瀬大, 吉 良潤一	多発性硬化症.		日本医師会雑 誌「神経・精神 疾患診療マニ ュアル」	南山堂	東京	2013	218-219
松瀬大, 吉 良潤一	多発性硬化症.		免疫性神経疾 患ハンドブッ ク	南江堂	東京	2013	68-89

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wakao S, <u>Matsuse D</u> , Dezawa M.	Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration.	<i>Cells Tiss ues Organ s</i>		DOI: 10.115 9/0003 68188	2015
Ogata H, <u>Matsuse D</u> , Yamasaki R, Kawamu ra N, <u>Matsushita T</u> , Y onekawa T, Hirotani M, Murai H, Kira J	A nationwide survey of combine d central and peripheral demyel ination in Japan.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiatr y</i>		DOI: 10.113 6/jnnp -2014- 30983 1.	2015
Song Z, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, M asaki K, Yoshimura S, <u>Matsuse D</u> , Murai H, <u>Matsushita T</u> , Kira J.	Peripheral blood T cell dynamic s predict relapse in multiple scl erosis patients on fingolimod.	<i>PLoS One</i>		DOI: 10.137 1/journ al.pon e.0124 923	2014

Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, <u>Matsuse D</u> , Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M	Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques.	<i>J Clin Invest</i>	123	272-284	2013
Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, <u>Matsuse D</u> , Kuroda Y, Morita T, Jorge J. Riera, Kawashima R, Tomiyama T, Dezawa M	Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection.	<i>Cell Transplant</i>	22	1613-1625	2013
Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M, <u>Matsuse D</u> , Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M.	Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats.	<i>J Spinal Cord Med</i>	34	134-139	2013

中枢・末梢連合脱髄症の病態・診断・治療

Pathology, diagnosis, and treatment of combined central and peripheral demyelination

松瀬 大 緒方英紀 吉良潤一

Key words : 中枢・末梢連合脱髄症, 多発性硬化症, 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー, 脱髄

はじめに

炎症性の自己免疫性脱髄疾患は、中枢神経系を侵す群と末梢神経系を侵す群とに大別される。前者には多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) や急性散在性脳脊髄炎 (acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) があり、後者にはギラン・バレー症候群 (Guillain-Barré syndrome: GBS) や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: CIDP) が含まれる。通常これらの疾患は、中枢神経系、あるいは末梢神経系いずれかのみを侵し、他方を侵すことはない。その理由としては、自己免疫細胞が中枢、あるいは末梢神経のいずれかの抗原しか認識できないからであると考えられている。しかしながら、MS でありながら末梢神経にも脱髄の所見を呈する症例の報告や¹⁾、CIDP でありながら中枢神経へも脱髄病変を認める症例の報告もなされている²⁾。これらの疾患はひとつの独立した病態である可能性が考えられ、中枢・末梢連合脱髄症 (combined central and peripheral demyelination: CCPD)、あるいは他の種々の疾患名で報告されている³⁻⁶⁾。緒方らは、本疾患の疫学や病態を明らかにするために、本邦での全国調査を

行った⁷⁾。

本稿では、その全国調査の結果を中心に、CCPD の病態、診断、治療について述べる。

1 病態

全国調査における基本情報と症状、神経症候について表 1 に示す。年齢の分布は 8-59 歳と、高齢者を除いて幅広い分布であったが、平均発症年齢は 31.7 ± 14.1 歳と比較的若年であった。罹病期間は 137.9 ± 124.8 カ月であった。男女比については 1 : 2.6 と女性優位であった。

初発症状については、中枢神経症状 39.5%、末梢神経症状 39.5%、双方の同時または連続発症を認めたものは 21.0% であった。発症様式は急性型 19.4%、亜急性型 45.2%、慢性型 35.5% であった。また臨床経過は単相型が 26.3%、再発寛解型が 52.6%、慢性進行型が 21.1% であった。神経症候について最も多かったのは感覚障害 (94.9%) であり、それに続くのが筋力低下 (92.5%)、歩行障害 (79.5%) であった。47.5% に視力低下を認め、そのほぼ半数は両側性の障害であった。視神経以外の脳神経症状を 43.6% に認めた。深部腱反射の低下、亢進はそれぞれ 65.0%、22.5% に認め、10.0% は双方が

Dai Matsuse, Hidenori Ogata, Jun-ichi Kira: Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University 九州大学大学院医学研究院 神経内科学

表1 CCPD 40 症例の臨床像のまとめ
(文献⁷⁾より改変)

基本情報	N=40
性差(男性/女性)	11:29
発症年齢(歳, 平均±SD)	31.7±14.1
受診年齢(歳, 平均±SD)	36.5±14.6
フォローアップ期間(月, 平均±SD)	93.0±91.8
罹病期間(月, 平均±SD)	137.9±124.8
発症様式	n/N(%)
急性	6/31(19.4)
亜急性	14/31(45.2)
慢性	11/31(35.5)
臨床経過	n/N(%)
单相型	10/38(26.3)
再発寛解型	20/38(52.6)
慢性進行型	8/38(21.1)
初発症状	n/N(%)
中枢神経関連	15/38(39.5)
末梢神経関連	15/38(39.5)
同時もしくは連続発症	8/38(21.0)
MSおよびCIDPの診断基準満たすか否か	n/N(%)
McDonald 診断基準を満たす	27/40(67.5)
EFNS/PNS ガイドラインによる確実例	35/40(87.5)
症候および神経学的所見	n/N(%)
痙攣	3/40(7.5)
意識障害	5/40(12.5)
視力障害	19/40(47.5)
脳神経障害(視神経障害は除く)	17/39(43.6)
筋力低下	37/40(92.5)
筋萎縮	11/40(27.5)
呼吸障害	3/40(7.5)
歩行障害	31/39(79.5)
小脳失調	10/38(26.3)
感覚障害	37/39(94.9)
深部腱反射	
低下	26/40(65.0)
正常	1/40(2.5)
亢進	9/40(22.5)
混在	4/40(10.0)
病的反射	18/40(45.0)
直腸膀胱障害	18/38(47.4)

CIDP: 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー,
MS: 多発性硬化症.

表2 CCPD 40 例における検査所見
(文献⁷⁾より改変)

血液検査	n/N(%)
HbA1c 高値	0/37(0)
CRP>1.0mg/dL	4/38(10.5)
甲状腺機能亢進	1/37(2.7)
甲状腺機能低下	3/37(8.1)
リウマトイド因子	1/31(3.2)
抗核抗体≥1:160	1/31(3.2)
抗SS-A抗体	0/35(0)
抗SS-B抗体	0/35(0)
MPO-ANCA	1/27(3.7)
PR3-ANCA	0/25(0)
抗AQP4抗体	0/29(0)
抗ganglioside抗体	2/24(8.3)
抗neurofascin155抗体	5/11(45.5)
Mタンパク	1/28(3.6)
脳脊髄液検査	n/N(%)
タンパク>40mg/dL	33/40(82.5)
細胞数>5 μ L	11/40(27.5)
タンパク細胞解離	23/40(57.5)
オリゴクローナルIgGバンド	2/27(7.4)
IgG index 高値	5/27(18.5)

混在していた。病的反射は45.0%, 膀胱直腸障害は47.4%に認めた。筋萎縮を27.5%に認め、呼吸障害は7.5%にみられた。

検査所見(表2)についてはHbA1cはいずれの症例でも正常範囲内であった。CRPの上昇例は、10.5%にとどまった。抗核抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、ANCA関連抗体、抗AQP4抗体、抗ガングリオシド抗体など代表的な自己抗体の陽性率はいずれも低かった。河村らは既に、CCPD症例中にランビエ傍絞輪部に存在するneurofascin155(NF155)に対する自己抗体が陽性となる例が多いことを報告しているが⁵⁾、本調査におけるNF155抗体陽性率は45.5%(5/11)であった。髄液タンパクは82.5%で上昇し、タンパク細胞解離を57.5%に認めた。一方、髄液中のオリゴクローナルIgGバンドの陽性率、IgG index上昇を認める症例は7.4%、18.5%と低値であった。Kammら⁴⁾やZéphirら⁶⁾が、中枢・末梢神経系双方に脱髄をきたす複数例を報告しているが、同様に髄液中のオリゴクロー

表3 CCPD 40例におけるMRIおよび
視覚誘発電位所見(文献⁷⁾より改変)

MRI	n/N(%)
大脳病変	30/40(75.0)
≤3	6/30(20.0)
4-8	13/30(43.3)
≥9	11/30(36.7)
造影効果あり	7/40(17.5)
径3cmを超える病変	10/40(25.0)
小脳病変	6/40(15.0)
造影効果あり	2/40(5.0)
脳幹病変	13/40(32.5)
造影効果あり	3/40(7.5)
視神経病変	7/40(17.5)
造影効果あり	1/40(2.5)
脊髄病変	30/40(75.0)
LESCLs	3/40(7.5)
造影効果あり	11/40(27.5)
視覚誘発電位	n/N(%)
異常あり	15/21(71.4)
右	2/15(13.3)
左	5/15(33.3)
両側	8/15(53.3)

LESCLs: longitudinally extensive spinal cord lesions.

ルIgGバンドの陽性例, IgG index 上昇例が少ないことを指摘している。

MRI上, 大脳, 小脳, 脳幹, 視神経病変をそれぞれ75.0%, 15.0%, 32.5%, 17.5%に認めた(表3)。大脳病変をもつ症例のうち, 36.7%が9カ所以上の病変を認めた。径3cmを超える病変は25.0%に認め, ガドリニウム増強病変を認めたものは17.5%にとどまった。脊髄病変は75.0%(30/40)に認め, そのうち11例にガドリニウム増強を認めた(表3)。視覚誘発電位所見(VEP)異常は71.4%(15/21)に認め, そのうち53.3%は両側性であった(表3)。

また, サブ解析として中枢神経障害と末梢神経障害の発症に時間的な隔たりが存在する分散発症型(n=30)と同時発症型(n=8)の2群に分け両群の臨床像について検討したところ, 同時発症型は単相性でかつ重症度が高い傾向にあることが示された。その詳細については本誌III-1「中枢・末梢連合脱髄症の概念・疫学」の稿

を参照されたい。

2 診 断

本疾患は現在のところ, 明確な診断基準はない。全国調査においては, CCPDの暫定的な診断基準を①MRI上明らかなT2高信号病巣を脳もしくは脊髄に認める, あるいは視神経にMRIまたはVEPで異常を認める, ②末梢神経伝導検査で脱髄に合致する所見を認める, ③原因疾患が明らかでない症例, と定め, また電気生理学的適格基準として, 正中神経, 尺骨神経, 脛骨神経のうち, 少なくとも2つの神経において, 脱髄を示唆する所見(遠位潜時の延長, 神経伝導速度の延長, 伝導ブロック, 時間的分散, F波潜時の延長)を認める症例, とした(表4)。この暫定診断基準を満たす症例は, MSやCIDPの診断基準をも満たすものが多く, 全国調査においては, MSのMcDonald診断基準, EFNS/PNSガイドラインによるCIDPのdefinite criteriaを満たす症例はそれぞれ67.5%, 87.5%であった(表1)。

3 治 療

全国調査の結果からは, CCPD患者はステロイドパルス療法, あるいはプレドニゾロン内服によって治療された群が最も多く, 次に多かったのが大量免疫グロブリン静注療法(intravenous immunoglobulin: IVIg)を受けた群であった。有効率は, ステロイドパルス療法群が83.3%, プレドニゾロン内服群が75.0%, IVIg群が66.7%であった(表5)。血漿交換療法を行った症例は8例のみと少数ではあったが, うち7例(87.5%)に改善を認めた。これらの治療法に関しては, 一定の効果を認めているようであるが, 一方でインターフェロンβ(IFN-β)療法に関しては, 10例中1例(10.0%)にしか効果を認めず(表5), また3例においては治療後症状がむしろ悪化を認めていた。前述のKammら⁴⁾やZéphirら⁹⁾の報告でも, IFN-β療法によって症状が悪化する症例が複数報告されている。