

Title	外傷性脊髄損傷に対する神経幹細胞移植を用いた新規治療法の開発に向けて
Sub Title	
Author	小川, 祐人(Ogawa, Yuto) 中村, 雅也(Nakamura, Masaya) 戸山, 芳昭(Toyama, Yoshiaki) 岡野, 栄之(Okano, Hideyuki)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.125- 133
JaLC DOI	
Abstract	<p>従来,成人の中枢神経系には組織再生能はないとされてきた.しかし,近年の神経科学の進歩により神経幹細胞と呼ばれる中枢神経系を構成するニューロン,アストロサイト,オリゴデンドロサイトの何れにも分化することができ(多分化能),かつこの様な分化能を保ちつつ増殖することが可能な(自己複製能)細胞が成人の中枢神経系にも存在することが確認され.障害された成人の中枢神経系組織においても何らかの方法を用いれば組織再生が可能ではないかと考えられるようになってきた.障害中枢神経系組織の組織再生を目的とした治療法のひとつとして,細胞移植による治療法が現在考えられている.神経幹細胞は前述の多分化能と自己複製能を持ち,かつin vitroでの培養が可能で旺盛な増殖能を持つ細胞であるため,移植細胞の候補として期待が持たれている.</p> <p>われわれは中枢神経系疾患のひとつである外傷性脊髄損傷に対して,動物実験モデルを用い,胎児脊髄由来培養神経幹細胞を移植することで傷害脊髄内に新たにニューロンを導入し脊髄機能の改善を得ることに成功した.更にこの移植細胞由来ニューロンはホスニューロンとシナプスを形成しており,その軸索には髄鞘化が認められ.移植細胞由来のニューロンがホストの脊髄内にある程度組み込まれていることが確認された.神経幹細胞の移植に際して最も重要であった要素は撮傷脊髄内の微小環境であった.今後,この手法による治療法の開発を進めるにあたっては,移植部の微小環境について更なる検討を行うことが大切であると思われた.また,神経幹細胞と呼ばれる細胞は均質なものではないことが分かっており,移植細胞そのものに関する詳細な検討も重要であると思われた.</p>
Notes	講座
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040600-0125">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040600-0125</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 講 座

外傷性脊髄損傷に対する神経幹細胞移植を  
用いた新規治療法の開発に向けて<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部整形外科学教室, <sup>2)</sup>慶應義塾大学医学部生理学教室おがわゆうと<sup>1)</sup> なかむらまさや<sup>1)</sup> とやまよしあき<sup>1)</sup> おかのひでゆき<sup>2)</sup>  
小川祐人<sup>1)</sup>・中村雅也<sup>1)</sup>・戸山芳昭<sup>1)</sup>・岡野栄之<sup>2)</sup>

## 要 約

従来, 成人の中枢神経系には組織再生能はないとされてきた。しかし, 近年の神経科学の進歩により神経幹細胞と呼ばれる中枢神経系を構成するニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの何れにも分化することができ(多分化能), かつこの様な分化能を保ちつつ増殖することが可能な(自己複製能)細胞が成人の中枢神経系にも存在することが確認され, 障害された成人の中枢神経系組織においても何らかの方法を用いれば組織再生が可能ではないかと考えられるようになってきた。障害中枢神経系組織の組織再生を目的とした治療法のひとつとして, 細胞移植による治療法が現在考えられている。神経幹細胞は前述の多分化能と自己複製能を持ち, かつ *in vitro* での培養が可能で旺盛な増殖能を持つ細胞であるため, 移植細胞の候補として期待が持たれている。われわれは中枢神経系疾患のひとつである外傷性脊髄損傷に対して, 動物実験モデルを用い, 胎児脊髄由来培養神経幹細胞を移植することで傷害脊髄内に新たにニューロンを導入し脊髄機能の改善を得ることに成功した。更にこの移植細胞由来ニューロンは宿主ニューロンとシナプスを形成しており, その軸索には髄鞘化が認められ, 移植細胞由来のニューロンがホストの脊髄内にある程度組み込まれていることが確認された。神経幹細胞の移植に際して最も重要であった要素は損傷脊髄内の微小環境であった。今後, この手法による治療法の開発を進めるにあたっては, 移植部の微小環境について更なる検討を行うことが大切であると思われた。また, 神経幹細胞と呼ばれる細胞は均質なものではないことが分かっており, 移植細胞そのものに関する詳細な検討も重要であると思われた。

Key Words : neural stem cell, spinal cord injury, transplantation, rat

## はじめに

従来, 成体の中枢神経系には組織再生能はないとされてきた。しかし, 30年ほど前より哺乳類の成体脳においても海馬・歯状回と線状体の側脳室周辺ではニューロンの新生が起こっていることが, まずネズミで, ついで他の種でも明らかにされてきた。また, ヒトについても近年, 海馬・歯状回でニューロンの新生が成人になっても起こっていることが明らかにされた<sup>1)</sup>。さらに, 中枢神経系を構成するニューロン, オリゴデンドロサイト,

アストロサイトの3種類の細胞に分化しうる能力を持ち(多分化能)かつ多分化能を保ちつつ細胞分裂を行うことができる(自己複製能)中枢神経系神経幹細胞(Neural stem cell: NSC)と呼ばれる細胞の選択的培養法<sup>2,3)</sup>やNSCに対する細胞マーカー<sup>4-6)</sup>が開発され, これらを用いることで本来成体においてはニューロンの新生が起きていない中枢神経系の部位にもNSCが存在することが判明してきた<sup>3,7)</sup>。これらの知見から成体中枢神経系には組織再生能がないという概念は否定されるようになってきた。

外傷性脊髄損傷は四肢に重篤な障害を残す疾患である。

平成15年度三四会奨励賞受賞者

脊髄は中枢神経系組織であるため傷害脊髄の再生は従来不可能とされてきた。実際、現在行われている治療法は急性期における組織障害を最小限にすることを目的とした治療法と、慢性期における残存機能を最大限に活用することを目的とした治療法であり、傷害された脊髄組織の再生とそれに基づく脊髄機能の回復を目的とした治療法は行われていない。しかし、前述の如く、近年の神経科学の進歩により脊髄を含めた中枢神経系組織にも組織再生能がある可能性が示されたことで、近年、損傷により傷害された脊髄組織の再生と機能回復を目的とした治療法の開発が動物実験レベルで盛んに試みられるようになってきている。脊髄組織の再生を促すために、現在大きく分けて2つの方法が考えられている。一つは成体脊髄にも存在する内在性 NSC を利用し組織再生を得るというものである。もう一つは外部より NSC などの未分化な細胞を脊髄内に導入し組織再生を得るというものである。しかし、成体においてニューロンを新生していない脊髄では、脊髄損傷後に増殖する脊髄由来の内在性 NSC と思われる細胞はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化することが報告されており<sup>7)</sup>、現在のところ前者の方法により損傷脊髄の再生と機能回復が得られたとの報告はない。一方、後者の方法を用いた報告としては、未分化な神経系細胞を多く含む胎児脊髄組織を移植材料として用いた報告があり、ラットや猫を用いた実験では移植組織の宿主脊髄内での生着と障害脊髄機能の回復が認められている<sup>8-10)</sup>。また、パーキンソン病では既に胎児脳組織移植による治療法が臨床応用されており治療効果が示されている<sup>11-13)</sup>。しかし、胎児組織移植による治療法は倫理面やドナーの確保の面で多くの問題が指摘されている。一方で、NSC は旺盛な増殖能を持つ細胞であるため前述の NSC の選択的培養法<sup>2)</sup>を用いれば、少量の胎児組織より大量の NSC を確保すること可能である。従って、培養 NSC を移植材料として利用可能ならば、ドナーの確保という実際面での問題点は解決することができる。

本稿では、外傷性脊髄損傷に対する培養 NSC 移植による損傷脊髄の組織再生とそれに基づく機能回復を目的とした治療法の開発について、現在までわれわれが行ってきた研究の成果<sup>14)</sup>と今後の課題について述べる。

何らかの原因により変性または損傷した成体中枢神経系組織の再生には、適当な部位に、適当な細胞が存在し、更に適当な神経回路網が再構築されることが必要である。これを NSC の移植により実現するためには、NSC が適当な部位で適当な細胞に分化し、成熟していかなければ

ならない。NSC の分化・成熟は細胞そのものが持つ内的因子と細胞が存在する部位の微小環境(外的因子)の両方により規定されてくるため、NSC の移植による中枢神経系の再生には、これら二つの因子について常に考える必要がある。従って、脊髄損傷に対する NSC 移植による組織再生を目指す場合、NSC そのものについての検討と移植部位である損傷脊髄の微小環境についての検討が重要である。

## 移植材料としての NSC

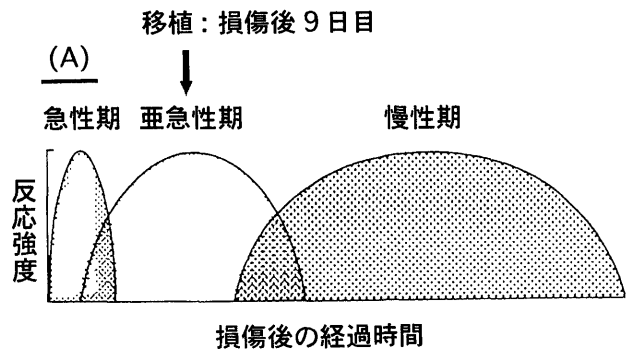
NSC とは前述の如き多分化能と自己複製能を持つ細胞と現在のところ定義されている。この様な性質を持った細胞は胎児から成体に至るまで中枢神経系の様々な部位に存在することが証明されているが、これらの細胞は均質なものではなく採取した時期および部位により細胞の性質が異なることが報告されている。すなわち、*in vitro* において同一条件で培養を行っても採取時期および部位が異なることで NSC の増殖能やニューロンやグリアへの分化能が異なるということである。また、*in vivo* においても同一部位に移植しても NSC の採取時期および部位が異なることで、NSC が異なる性質を持つ細胞へと分化することが報告されている<sup>15)</sup>。従って、脊髄損傷に対して NSC の移植を行う際に、前述の内的因子について考慮した場合、どの時期のどの部位から組織を採取し培養すべきか詳しく検討する必要があると思われる。古くから行われているラット脊髄損傷モデルに対するラット胎児脊髄移植の実験でも、胎生 16 日目以降の脊髄組織を移植するとそれ以前の胎児脊髄を移植したものに比べ生着率が低下することが報告されている<sup>9)</sup>。またネコの胎児新皮質または脊髄をネコ脊髄損傷モデルに移植した実験で、移植後の運動機能評価で新皮質を移植したものは脊髄を移植したものに比して運動機能の回復が劣っていたとの報告もある<sup>16)</sup>。もし胎児中枢神経系組織移植による機能回復が胎児中枢神経系組織中に多く存在する NSC によるものであるならば、これらの結果を NSC の移植に際して考慮する必要がある。そこで、われわれはラット脊髄損傷モデルを用いた NSC 移植による治療法の開発に関する基礎的実験を行うにあたり、移植細胞の採取部位は脊髄とし、脊髄のみの分離採取が技術的に可能となる胎生 14.5 日目を採用時期とし、移植に用いる NSC を培養した。培養は Weiss らの neurosphere 法<sup>2)</sup>に準じて行った。この方法は増殖因子を加えた無血清培地で細胞を浮遊培養するもので、われわれの実験では増殖因子として fibroblast growth

factor-2 (FGF-2) 20 ng/ml を 1 日おきに培養液に加えた。継代は 1 週間おきに行った。この方法で 3 回継代することにより、1 腹の胎児 (12~15 胎児) 脊髄から少なくとも 450 匹分の移植細胞を得ることが可能であった。このことから培養 NSC は将来の臨床応用を考えた場合、少量の胎児中枢神経系組織から大量の移植細胞が得られるという点で、胎児中枢神経系組織移植と比較してより実際的な移植材料であると考えられた。

### 損傷脊髄の微小環境

脊髄損傷部およびその周囲の微小環境は、正常脊髄のそれとは大きく異なり、また損傷後経時的に大きく変化していく。損傷直後の急性期においては強い炎症反応が損傷部およびその周囲で起きており、IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインが損傷後 6~12 時間をピークとし 4 日目まで損傷部周囲に多量に存在していることが報告されている<sup>17)</sup>。また、この時期には成体になっても脊髄に内在する NSC が盛んに細胞分裂を行い損傷部周囲へ細胞を供給することが報告されている<sup>18,19)</sup>。さらにこれらの報告には、損傷部へ供給される内在性 NSC 由来の細胞はアストロサイトへと分化し、ニューロンには分化しないことが記されている。なぜこれらの細胞はニューロンへ分化しないのか。Shihabuddin らは、成体脊髄由来の NSC を成体になってもニューロンの新生が起きている部位に移植するとニューロンへと分化するが、ニューロンの新生の起きていない正常脊髄などの部位に移植するとニューロンへは分化しないと報告している<sup>20)</sup>。この報告は *in vitro* のみならず *in vivo* においても成体脊髄に内在する NSC はニューロンへの分化能を持つこと、ニューロンへの分化には細胞が存在する周囲の微小環境が重要であることを示している。従って、急性期における内在性 NSC のアストロサイトへの分化は、成体脊髄に内在する NSC の内的因子によるものではなく急性期における損傷脊髄部の微小環境によるものと考えられた。実際、急性期に上昇する IL-1 $\beta$ , IL-6 は Jak/Stat シグナル経路を介して NSC をアストロサイトへと分化させることが知られている<sup>21)</sup>。このような微小環境を有する急性期の損傷脊髄に培養 NSC の移植を行っても内在性の NSC と同様に移植細胞はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化していくことが予想され、NSC の移植による組織再生は難しいと考えられた。また、この時期には TNF $\alpha$  などの cytotoxic なサイトカインが損傷部周囲に多く存在しており、細胞そのものの宿主への生着も困難であると考えられた。

実際、われわれはラット脊髄損傷モデルの損傷脊髄内に損傷後 24 時間で胎児脊髄由来の培養 NSC を移植する実験を行ったが、生着した移植細胞はほとんどなかった。これらのことより、培養 NSC の移植時期としては損傷直後の急性期は適当ではないと考えられた。しかし、あまり長い期間移植を遅らせると、損傷部に生じる組織欠損部 (空洞) の周囲には反応性にグリア瘢痕が形成される。グリア瘢痕が完成すると、損傷を免れた正常脊髄はグリア瘢痕により損傷部と完全に隔離されるため、損傷部周囲の微小環境は正常時のものへと回復することが予想される。従って、この時期に損傷部周囲に移植を行っても、正常脊髄に移植を行ったときと移植部の微小環境は同様であると考えられ、やはり移植細胞はニューロンへは分化しないことが予想された。また損傷部に生じた空洞に移植を行ってもグリア瘢痕により周囲の脊髄とは隔離されているため、やはり移植細胞と非損傷脊髄との間での機能的組織構築は困難と思われた。そこで、われわれは炎症性サイトカインが多く存在する急性期からグリア瘢痕が完成する慢性期への移行期である亜急性期に NSC の移植を行った (第 1 図)。具体的には損傷後 9 日目に NSC の移植を行った。実験は成体ラットの頸髄圧挫損傷モデル<sup>22)</sup>を用い、損傷後 9 日目に NSC を多く含むラット胎児脊髄由来培養神経前駆細胞を、この時期に既に損傷部に生じている空洞 (第 2 図) に移植した。結果であるが、脊髄機能のうち上肢巧緻運動機能につい



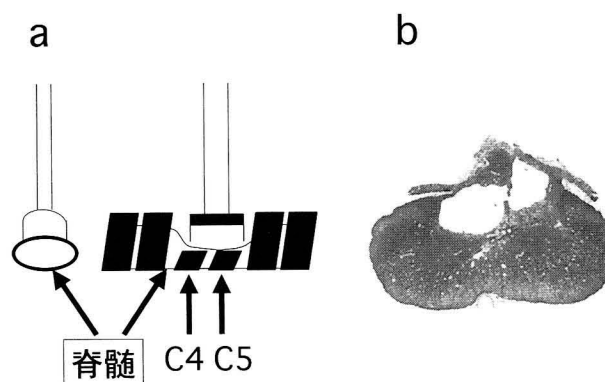
第 1 図 脊髄損傷後の損傷部およびその周囲の微小環境の変化。内在性の NSC が盛んに増殖する (A) の時期は、損傷部の微小環境が急性期にある。この微小環境により、内在性の NSC はニューロンへは分化せずアストロサイトへと分化していくのだと考えられた。一方、われわれが NSC の移植を行った損傷後 9 日目には損傷部の微小環境は急性期から亜急性期へと既に変化しており、移植細胞の生着やニューロンへの分化とその成熟に有利な環境になっていたと思われた。(文献 42. の Figure 2 を許可を得て転載、一部改変)

て損傷後6週目に評価したところ、神経系前駆細胞を移植した群で対照群と比較して有意な脊髄機能の改善を認めた(第3図a, b)。また移植部の脊髄について組織学的検討を行ったところ移植部には移植細胞の生着が認められ、移植細胞由来のアストロサイトのみならずニューロン、オリゴデンドロサイトも生着していることが確認された。また、移植細胞由来のニューロンの一部は移植後に移植部においてニューロンに分化したことも確認された。更に移植細胞由来のニューロンに髄鞘化されているものが存在すること(第4図a)、移植細胞由来のニューロンがホストのニューロンとシナプスを形成していることも確認された(第4図b, c, d)。

われわれは、上述の如く移植細胞と移植部周囲の微小環境について検討を加え、胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞をラット脊髄損傷モデルに損傷後亜急性期に移植することで、傷害脊髄内に新たにニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトを導入し脊髄機能の改善を得ることに成功した。更にこの移植細胞由来ニューロンの軸索には髄鞘化が認められ、ホストニューロンとシナプスを形成していることも確認され、ホスト脊髄内に組織学的にも組み込まれていることが確認された。なぜこの様なことが可能となったのかについて、以下に考察する。

#### ホスト脊髄での移植細胞由来のニューロン・オリゴデンドロサイト・アストロサイトの生着とニューロンの新生・成熟

Hammangらはマウス由来の培養NSCをミエリン欠損ラット脊髄に移植したところ移植細胞はオリゴデンドロサイトへと分化していき移植細胞由来のアストロサイト、ニューロンは認めなかったと報告している<sup>23)</sup>。またParkらはあらかじめ幼児期に坐骨神経を切断することで腰部において片側のみ前角細胞を欠損させたラットに対して、NSCを腰部に移植すると移植細胞は前角細胞へと分化するが、前角細胞の欠損していない正常ラットに移植しても前角細胞には分化しないことを報告している<sup>24)</sup>。これらの報告は、何らかの細胞が欠損している脊髄における微小環境はNSCを欠損している細胞へと分化させる方向に傾いていることを示していると思われた。脊髄損傷後、脊髄損傷部では多くのニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトが失われる。従って、損傷後経時的に微小環境が大きく変化する損傷脊髄においても、微小環境がNSCを失われた細胞へと分化させる方向へ傾いている時期がある一定期間存在すると

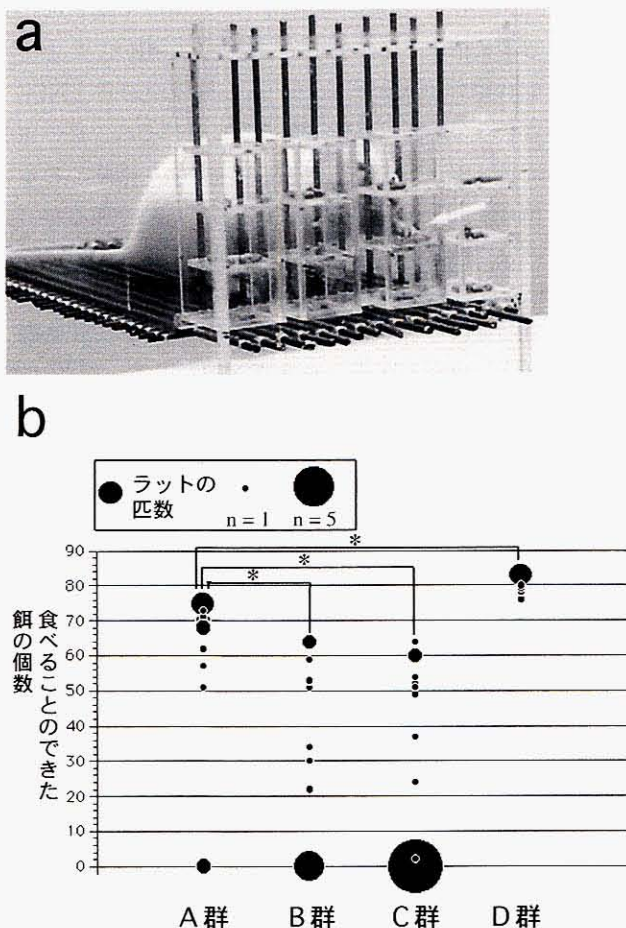


第2図 ラット頸髄損傷モデルの作成とNSC移植(文献42.のFigure 1を許可を得て転載,一部改変)。a.成体ラット頸髄圧挫損傷モデルの作成は、第4,5頸椎に椎弓切除を加え、同部において脊髄背側に35gの重錘を15分間静置することにより作成した。b.NSCの移植は損傷部に生じた空洞に、細胞濃度を $5\sim 10 \times 10^6$ ヶ/mlに調製した細胞含有液をマイクロシリンジを用いて20~40 $\mu$ l注入することにより行った。

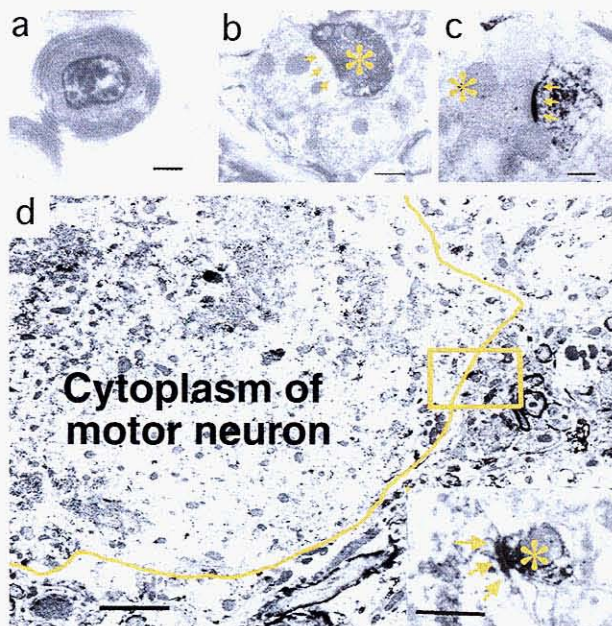
考えられた。今回われわれが移植を行った損傷後9日目がちょうどその期間に含まれていたため、正常脊髄ではアストロサイトへと分化していく移植細胞が移植後にホスト脊髄内でニューロンへと分化したのだと考えられた。移植細胞由来のオリゴデンドロサイトの生着が認められたのも同様な理由によると考えられた。また、移植を行った損傷後9日目は損傷部に血管新生が盛んに起こる時期でもあり<sup>25)</sup>、このことも移植細胞の生着に関して有利に働いたと考えられた。他に、ホストの微小環境のみならず大量の神経系前駆細胞を移植したことにより、移植細胞自身の何らかの因子がautocrine, paracrine的に働き、移植細胞の生着とニューロン、オリゴデンドロサイトへの分化を促した可能性も考えられた。

#### 移植による脊髄機能回復のメカニズム

Schrimsherらはラット頸髄部分切断モデルを用いて脊髄の傷害部位別ごとの前肢運動機能の変化を報告している<sup>26)</sup>。それによると餌取り動作のような前肢の巧緻運動には後索を通る上行性知覚線維が重要な役割を果たしているとされている。われわれの実験に用いたラット脊髄損傷モデルではもっとも傷害される部位は後索、後角および灰白質中心部であり、本実験において餌取り試験を用いた行動評価で神経系前駆細胞を移植した群が対照群と比較して有意な脊髄機能の改善を認めたのは、傷害

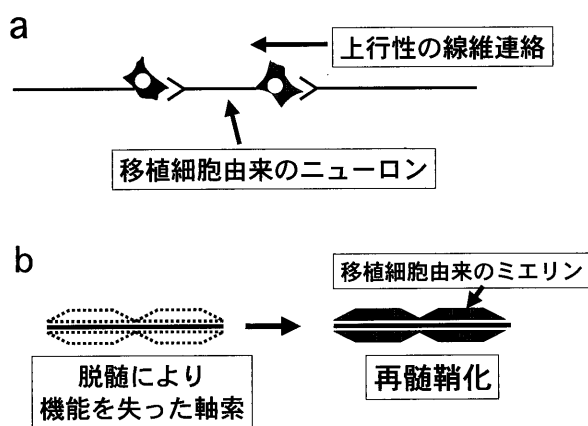


第3図 餌とり試験による脊髄機能の評価 (文献 14. の Figure 5 を許可を得て転載). a. 餌とり試験は Diener らの方法に準じて行った<sup>10)</sup>. 具体的には 12 個のマス目の中にそれぞれ 5 個ずつの小さな餌を入れ, マス目とラットを鉄柵で仕切り, 前肢 (矢印) でのみ餌を取ることができるような檻を作成する. 予め絶食させておいたラットをこの檻に入れ, 前肢で餌を取る訓練をさせる (Figure 5 A). この訓練は脊髄損傷作成前に 1 週間連日行い, 更に移植後 4 週目から同様に 1 週間連日行う. 移植後 5 週目に 2 日間連続で試験を行い, 2 日間で取れた餌の数の合計を検討した. b. 5 個以上餌を食べられたラットは, 移植群 (A 群) では 15 匹中 13 匹であったが, 培養液のみを注入した群 (B 群) と損傷のみの群 (C 群) ではそれぞれ 17 匹中 9 匹, 13 匹中 8 匹であった. 統計学的に検討すると移植群は対照群と比較して有意に多くの餌をとることができていた. しかし, 非損傷群 (D 群) と比較すると移植群の餌のとれた数は有意に少なかった (\* $p < 0.01$ ).



第4図 移植細胞由来ニューロンのホスト脊髄内での組織構築 (電子顕微鏡による所見) (文献 14. の Figure 4 を許可を得て転載). a. EYFP 陽性 (黒) の軸索が髄鞘化されている. スケールバー:  $0.2 \mu\text{m}$ . b. EYFP 陽性 (黒) のシナプス前構造と EYFP 陰性のシナプス後構造によりシナプスが形成されている. スケールバー:  $0.5 \mu\text{m}$ . c. EYFP 陰性のシナプス前構造と EYFP 陽性 (黒) のシナプス後構造によりシナプスが形成されている. スケールバー:  $0.2 \mu\text{m}$ . d. ホスト前角細胞と移植細胞由来ニューロンとのシナプス形成. スケールバー:  $1 \mu\text{m}$ , 枠内  $0.3 \mu\text{m}$ . 星印: シナプス小胞, 矢印: post-synaptic density

された後索の機能が何らかの機構により改善されたためと考えられた. 本実験においてわれわれは神経系前駆細胞の移植により傷害脊髄内に新たなニューロンを導入することができ, それらのニューロンの軸索が髄鞘化され, ホストニューロンとの間にシナプスを形成していることを示した. このことから後索機能が改善した理由の一つとして, 傷害された上行性の線維連絡を新たに導入された移植細胞由来のニューロンが中継することで, 中枢側へと信号が伝達された可能性が考えられた (第5図 a). また Crowe らはサルとラットの脊髄圧挫モデルを用いて傷害軸索のワラー変性に伴って傷害軸索にミエリンを巻いているオリゴデンドロサイトに損傷後 8 日目をピークとしてアポトーシスが生じると報告し, 中枢神経系ではオリゴデンドロサイトは複数のニューロンにミエリンを巻いているため, このオリゴデンドロサイトのアポトーシスにより傷害を免れた軸索にも脱髄が起こり, 脊髄機能が 2 次的に更に障害されると述べている<sup>27)</sup>. わ



第5図 脊髄機能回復のメカニズム (文献42.のFigure 4を許可を得て転載,一部改変). a. 傷害された上行性の線維連絡を新たに導入された移植細胞由来のニューロンが中継することで, 中枢側へと信号が伝達された可能性. b. そのものは傷害されていないが脱髄により機能が障害された軸索が, 移植細胞由来のオリゴデンドロサイトにより再髄鞘化され機能回復した可能性.

われわれは本実験で移植細胞由来のオリゴデンドロサイトをホスト脊髄内に確認している。これら移植細胞由来のオリゴデンドロサイトにより, そのものは傷害されていないが脱髄により機能が障害された軸索に再髄鞘化が生じ障害軸索の機能回復がなされたことが後索機能改善のもう一つの理由として考えられた (図5b)。

### 今後の展望

われわれはこれまでの研究でラット脊髄損傷モデルを用いた実験において胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を移植することで損傷脊髄へのニューロンおよびオリゴデンドロサイトの導入と障害脊髄機能の回復を得ることができた。しかし, 今後実際の臨床応用を考えた場合, 多くの問題が存在する。倫理的問題については, 今後様々な見地からの更なる議論が必要であると思われるが, 本稿では実際面での問題点について考えたい。

細胞移植による傷害脊髄の再生を考えた場合, よりよい治療法の開発には前述の如く移植細胞と移植を受ける脊髄の微小環境の両面からの検討が必要である。

今回われわれは移植細胞としてNSCを多く含む胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を用いた。しかし, 移植細胞の候補はNSCだけではなく, 他にも胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES細胞) をNSCに分化させたもの<sup>28)</sup>, Olfactory ensheathing glial cell<sup>29~31)</sup>,

Schwann cell<sup>32)</sup>, 骨髄間質細胞<sup>33~35)</sup>, 免疫系細胞の一つである樹状細胞<sup>36)</sup>などを移植細胞として用いることで障害脊髄の機能回復が得られたとの報告がある。NSCを含めこれらの細胞は移植細胞としてそれぞれ一長一短がある。例えば, ES細胞は非常に未分化な細胞であるため, motor neuronへの分化も容易に可能であるが, 一方で, 分化を完全に制御することは未だできていないため, 移植後に移植部に奇形腫が発生する危険性がある。骨髄間質細胞は自家移植が可能であるが, その分化制御についてES細胞と同様にやはり課題がある。NSCについても, 検討すべき課題は多い。今回われわれは胎児脊髄由来のNSCを用いたが, ヒトのNSCはラットのNSCに比して増殖能が低く, 更に胎児脊髄由来のNSCは*in vitro*での増殖能が胎児前脳由来のNSCと比較してかなり劣っている。従って, 実際の臨床応用を考えた場合, 移植細胞の確保という点で, もし胎児前脳由来のNSCを用いても同様な機能回復が得られるならば移植細胞の確保はさらに容易となる。われわれはラット胸髄圧挫損傷モデルを用いた実験で, 胎児前脳由来のNSCを移植材料として用いても胎児脊髄由来のNSCを移植した場合と同等な機能回復が得られることを既に確認しており<sup>37)</sup>, 現在さらに詳細な検討を進めている。また成人の大脳由来のNSCを用いても機能回復が得られるならば, 自家移植による治療も可能となり, ドナーの問題のみならず倫理面での問題も解決される。更に, 由来する組織の違いによるNSCの性質の差異に関する研究が進めば, 成人大脳由来のNSCに何らかの操作を加えることで移植に最適な性質を持つNSCを作成することも可能になると思われる。どの細胞が移植細胞として最適であるか, 或いはこれらの細胞を組み合わせることが有効であるのか, 今後の更なる検討が必要である。

今回のわれわれの研究から脊髄損傷に対するNSCを用いた治療法を有効に行うには移植の時期すなわち移植部における微小環境が重要であることが判明した。移植部の微小環境は移植細胞の生着・分化・移動・成熟の全てに関与する。今後この手法を用いた治療法により, より良い治療効果を得るためには, 経時的に変化する損傷脊髄の微小環境を更に詳細に検討し移植に最適な時期を明確にしていくことが必要であると思われた。また更に進んで, 何らかの操作を行うことで移植部の微小環境をより良いものにする必要であると思われた。今回の実験では移植細胞は損傷部に生じた空洞の辺縁部には生着するが空洞の中心部にはその生着は認められなかった。このことから, 移植細胞の生着には細胞を栄養する血管の存在が非常に重要であると思われた。従って, 移

植の際に hepatocyte growth factor や vascular endothelial growth factor などの血管増殖因子を直接添加したり, またはこれらの因子を分泌する細胞を同時に移植することなどにより, 移植部に血管を増生させることで, 移植細胞の生着率を上げることができるのではないかと考えられた。また, 損傷後急性期に損傷部に盛んに分泌される炎症性サイトカインは外傷により機械的に傷害された脊髄にさらに化学的な傷害を加えると考えられている。損傷脊髄の微小環境についての研究が進めば, 何らかの方法によりこの化学的傷害を抑制することも可能になると考えられ, 脊髄が受ける障害を最小限にしたうえで, 障害機能の再生を目的とした治療を行えばよりよい治療効果が得られると思われる。従来はこの化学的傷害を抑制する薬剤としてステロイド剤であるメチルプレドニゾロンが唯一臨床応用されてきたが, われわれは急性期に分泌される炎症性サイトカインの一つである IL-6 の作用を抑制する抗体をマウス胸髄圧挫損傷モデルに投与することで脊髄に対する化学的傷害を抑制し損傷後の脊髄機能障害を抑制することに成功しており<sup>38)</sup>, 臨床応用に向けて研究を進めている。この様な観点からも損傷脊髄の微小環境についての研究は重要であると思われた。

NSC 移植による治療が成功するには, 移植した細胞が損傷前の細胞と同様な細胞に分化し同様な位置に移動し更に同様な神経回路網が再構築されることが理想であるが, 実際にこの様なことを実行するのは現時点では不可能と思われる。そのため, 現在どのような細胞に優先的に分化させることが機能回復に対して有効なのかが, 盛んに検討されている。最近, ニューロンの新生・分化・成熟や軸索伸展にある種のアストロサイトが強く関与していることが報告されており<sup>39-41)</sup>, 必ずしもニューロンやオリゴデンドロサイトだけが機能回復に関与しているとは限らない。今回のわれわれの研究において NSC 移植により脊髄機能の回復が認められたが, 機能回復のメカニズムについては未だ推測の域を出ていない。このメカニズムを解明することができれば, 自ずと機能回復に重要な細胞が判明すると思われ, 今後この方面からの研究もより有効な治療法の開発のために重要であると思われた。

## まとめ

われわれは, 胎児脊髄由来培養 NSC を移植することでラット脊髄損傷モデルにおいて傷害脊髄にニューロン・オリゴデンドロサイト・アストロサイトを新たに導入す

ることができ, 脊髄機能の回復を得ることができた。しかし, 実際の臨床応用を考えた場合, 検討すべき課題は未だ多い。今後, 移植細胞そのもの, 移植部である脊髄損傷部およびその周囲の微小環境, および細胞移植による脊髄機能の回復のメカニズムについて更に詳細な検討を加えることが臨床応用に向けて重要であると思われた。

## 文 献

- 1) Eriksson, PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordcrg C, Peterson DA, Gage FH : Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4 : 1313-1317, 1998
- 2) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1710, 1992
- 3) Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA : Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16 : 7599-7609, 1996
- 4) Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H : Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176 : 230-242, 1996
- 5) Lendahl u, Zimmerman LB, McKay RD : CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60 : 585-595, 1990
- 6) Penvy LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R : A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125 : 1967-1978, 1998
- 7) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J : Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96 : 25-34, 1999
- 8) Reier PJ, Perlow MJ, Guth L : Development of embryonic spinal cord transplants in the rat. *Brain Res* 10 : 201-219, 1983
- 9) Anderson DK, Howland DR, Reier PJ : Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. *Brain Pathol* 5 : 451-457, 1995
- 10) Diener PS and Bregman BS : 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
- 11) Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, Bjorklund A : Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247 : 574-577, 1990



- 12) Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, Lone T, Zhang YB, Snyder JA, Wells TH, Olson RL, Thompson L, Mazziotta JC, Huang SC, Grafton ST, Brooks D, Sawle G, Schroter G, Ansari AA : Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327 : 1549-1555, 1992
- 13) Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ, Snow BJ, Calne D, Gauger LL : Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38 : 379-388, 1995
- 14) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Koike M, Uchiyama Y, Bregman BS, Okano H : Transplantation of *in vitro* expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 69 : 925-933, 2002
- 15) Na, E, McCarthy M, Neyt C, Lai E, Fishell G : Telen cephalic progenitors maintain anteroposterior identities cell autonomously, *Curr Biol* 27 : 987-990, 1998
- 16) Reier PJ, Stokes BT, Thompson FJ, Anderson DK : Fetal cell graft into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord, *Exp Neurol* 115 : 177-188, 1992
- 17) Nakamura M., Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS : Differences in cytokine gene expression profile between acutely and chronically injured adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 184 : 313-325, 2003
- 18) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J : Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96 : 25-34, 1999
- 19) Namiki J, Tator CH : Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 : 489-498, 1999
- 20) Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH : Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20 : 8727-8735, 2000
- 21) Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg M : Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the Jak/Stat-signaling pathway. *Science* 278 : 477-483, 1997
- 22) Holtz A, Nystrom B, Gerdin B : Spinal blood flow measured by <sup>14</sup>C-iodoantipyrine autoradiography during and after graded spinal compression in rats. *Surg Neurol* 31 : 350-360, 1989
- 23) Hammang JP, Archer DR, Duncan ID : Transplantation of epidermal growth factor-responsive neural stem cell progeny into the murine central nervous system. *Exp Neurol* 147 : 84-95, 1997
- 24) Park KI, Liu S, Flax JD, Nissim S, Stieg PE, Snyder EY : Transplantation of neural progenitor and stem cells : developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction. *J Neurotrauma* 16 : 675-687, 1999
- 25) Casella GT, Marcillo A, Bunge MB, Wood PM : New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. *Exp Neurol* 173 : 63-76, 2002
- 26) Schrimsher GW, Reier PJ : Forelimb motor performance following dorsal column, dorsolateral funiculi, or ventrolateral funiculi lesions of the cervical spinal cord in the rat. *Exp Neurol* 120 : 264-276, 1993
- 27) Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS : Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3 : 73-76, 1997
- 28) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410-1412, 1999
- 29) Keyvan-Fouladi N, Raismaan G, Li Y : Functional repair of the corticospinal tract by delayed transplantation of olfactory ensheathing cells in adult rats. *J Neurosci* 23 : 9428-9434, 2003
- 30) Santos-Benito FF, Ramon-Cueto A : Olfactory ensheathing glia transplantation : a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system. *Anat Rec* 271B : 77-85, 2003
- 31) Verdu E, Garcia-Alias G, Fores J, Lopez-Vales R, Navarro X : Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* 42 : 275-286, 2003
- 32) Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB : Schwann cells but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci* 22 : 6670-6681, 2002
- 33) Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M, Murasawa M, Hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H, Yamazaki M : Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 : 64-72, 2004
- 34) Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L : Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 :

- 2199-2204, 2002
- 35) Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A : Brain from bone : efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 68 : 235-244, 2001
- 36) Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M : Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis, and functional recovery. *J Neurosci Res*, in press
- 37) Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H : Comparison between fetal spinal cord-and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. *Dev Neurosci*, in press
- 38) Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H : Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res*, in press
- 39) Garcia-Abreu J, Mendes FA, Onofre GR, De Freitas MS, Silva FC, Moura Neto V, Cavalcante LA : Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. *Glia* 29 : 260-272, 2000
- 40) Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD : A glial-derived signal regulation neuronal differentiation. *J Neurosci* 20 : 8012-8020, 2000
- 41) Song H, Stevens CF, Gage FH : Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417 : 39-44, 2002
- 42) Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y : Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Seminars in cell & Development Biology* 14 : 191-198, 2003