

Review Article

神経幹細胞を用いた中枢神経系の再生医療

岡田誠司¹⁾, 岩波明生²⁾, 石井 賢²⁾, 中村雅也²⁾, 戸山芳昭²⁾,
岡野栄之¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部生理学, ²⁾同 整形外科

Regeneration of central nervous system and neural stem cells

Neural stem cells (NSCs) are multipotential progenitor cells, which can generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, the three major cell types in the central nervous system. They also have the self-renewal activity and can be expanded in an undifferentiated state *in vitro*. Due to their capability of multipotency and chemotaxis for lesion site, there has been increasing interest in the identification and characterization of NSCs for therapeutic applications. However some numbers of recent studies demonstrated the existence of endogenous NSCs in adult mammalian central nerve system, their self-repairing activity is very faint. The cause of poor regenerative capability would be included microenvironmental factors that inhibit neurogenesis and axonal regeneration. We have investigated the effect of NSCs transplantation and modification the microenvironment for experimental spinal cord injury. This review will provide an overview of therapeutic strategy for neurodegenerative diseases and traumatic injury, such as Parkinson's disease and spinal cord injury.

Rec.9/27/2004, pp602-610

Seiji Okada¹⁾, Akio Iwanami²⁾, Ken Ishii²⁾, Masaya Nakamura²⁾, Yoshiaki Toyama²⁾ and Hideyuki Okano¹⁾

¹⁾Keio University School of Medicine, Department of Physiology

²⁾Keio University School of Medicine, Department of Orthopedic Surgery

Key words neural stem cell, spinal cord injury, transplantation, Interleukin-6, cell therapy

はじめに

19世紀初頭からの長きに渡り、一度損傷を受けた哺乳類の中枢神経は再生しないと信じられてきた。これは、神経細胞の新生が産後期以降は起こらないと考えられてきたからである。もともと哺乳類の中枢神経系は、発生過程において多分化能と自己再生能力を有する神経幹細胞から非対称性分裂や分泌性因子を含む巧妙かつ複雑な細胞間相互作用の結果として生じたものであるが、ここ数十年の中枢神経系の幹細胞生物学の急速な発展により、その神経幹細胞が胎生期のみならず成体にもこの神経幹細胞が存在することが明らかとなり、さらにそれらを分離培養・増殖することが可能となった。特に、神経幹細胞の持つ多分化能や障害部への遊走能といった特性は、これ

まで治療がほとんど不可能と考えられていた様々な疾患に対して将来の有望な治療法となる可能性があり、こうした内在性あるいは移植した神経幹細胞を用いて、変性や損傷により破綻した中枢神経系を再生し、機能修復を目指した再生医学の気運が高まっている¹⁻³⁾。神経幹細胞の分化制御という点においては、自己複製能と多分化能という一見矛盾する性質を合わせ持つ神経幹細胞の特性のため、未だそのメカニズムについては不明な点が多く残されており、治療を目的として神経幹細胞を利用するためにはこの点のさらなる解明が必要不可欠であるものの、様々な病態に対してこの神経幹細胞を用いた研究が行われ、一定の効果が報告されている。本稿では現在までに報告された様々な疾患に対する移植実験の治療戦略と、我々の脊髄損傷に対す

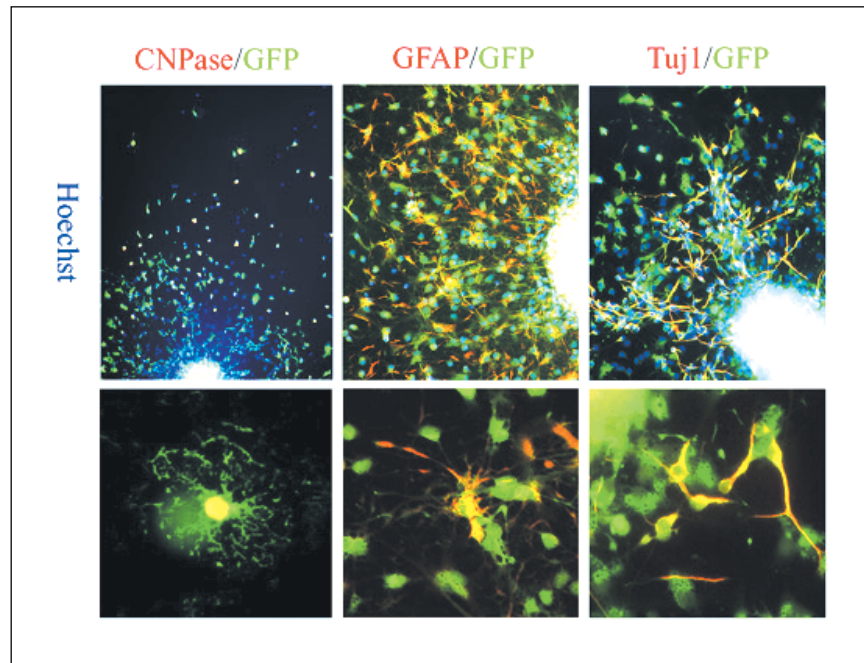


図1 神経幹細胞の多分化能

GFPトランスジェニックラットより採取した神経幹細胞をneurosphereの状態でのin vitroで分化させた像。それぞれCNPase陽性のオリゴデンドロサイト, GFAP陽性のアストロサイト, Tuj1陽性のニューロンへと分化する。下段は強拡大像。

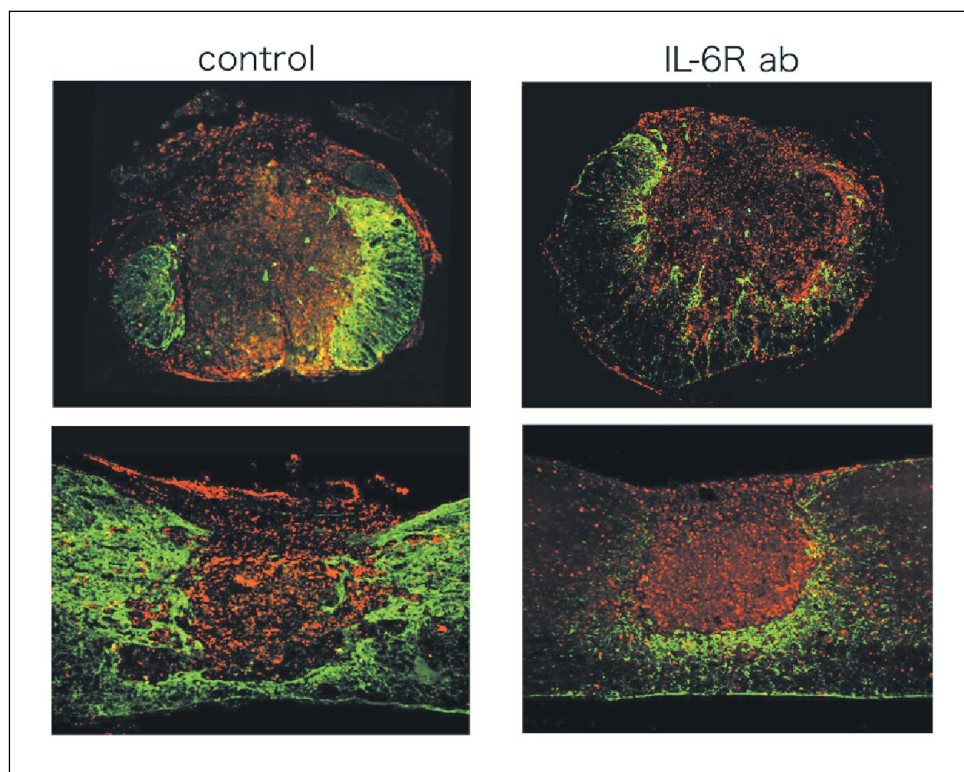


図2 損傷後2週の切片をGFAP(緑)とBrdU(赤)で免疫染色した像

上段がaxial section, 下段がsagittal section. controlに比べIL-6R抗体投与群ではGFAP陽性のアストログリオーシス領域が抑制されている。

る実験結果をふまえ、神経幹細胞の医療応用を含む将来の課題についても議論したい。なお、神経幹細胞の自己複製と分化の制御機構^{4,5)}、神経幹細胞の誘導と分化転換等に関しては非常に重要な問題ではあるが、誌面の制限の都合上、他の総説に譲りたい。

神経幹細胞の特性

一般に、神経幹細胞とは、脳や脊髄を構成するニューロンやグリア細胞を作り出すことができ(多分化能)、また自己増幅できる(自己複製能)能力を持つ細胞であるとされる。しかし、この定義はかなり概念的であり、実験的には“neurpsphereを形成する能力を有している細胞”として扱われることが多いため、本来であれば幹細胞と言う表現よりも神経前駆細胞や、neurosphere initiating cellsと表記するのが正しいのかもしれない。しかし、いずれにせよ成体哺乳類のこの神経幹細胞の局在部位としては、海馬歯状回(dentate gyrus:DG)の顆粒細胞層下部(subgranular zone:SGZ)や前脳の脳室下帯(subventricular zone:SVZ)が明らかになっており^{6,7)}、またこの局在は成体脳におけるニューロン新生部位に対応している。さらに、ニューロン新生の起きていない大脳皮質や成体脊髄においても神経幹細胞が存在する⁸⁾とした報告も散見される。

神経幹細胞が治療ソースとして期待される理由はいくつか挙げられるが、まず注目すべきは神経幹細胞が持つ自己複製能と多分化能であろう(図1)。特にReynoldsとWeissらの報告したneurosphere法⁹⁾を利用して簡単に*in vitro*の系で増幅させることができるため、現在骨髄移植の際に問題になっているドナー不足を回避できる利点がある。特に、ヒト胎児由来の神経幹細胞は2年以上に渡り、その性質を維持しながら増幅できることを我々は報告した¹⁰⁾。自己複製能あるいは多分化能に関してのメカニズムは非常に複雑であり、世界中で様々な研究が行われている。それに関わる因子、シグナル系、転写翻訳調節に関しては解明されているだけでも数多くあり、ここでは割愛させていただくが、神経幹細胞を特定のニューロンのサブタイプへ分化させる研究は臨床応用を目指す上でも大変重要である。例えばIL-1, IL-11, LIFなどの各種サイトカインを用いて¹¹⁾、あるいはFGF-2とglial cell conditioned mediaを用いて¹²⁾、神経幹細胞からチロシン水酸化酵素を発現する細胞へ誘導し、パーキンソン病モデル動物に移植する方法等が報告されている。また、FGF-2やヘパリン、ラミニンでブライミングすることで神経幹細胞をコリン作動性ニューロンへ分化させる報告¹³⁾等もあり、ALSモデル動物への移植等、疾患に応じた必要なニューロンへ分化させ補充するというストラテジーは非常に将来有望な治療法であると考えられ

る。神経幹細胞のその他の特徴としては損傷部への遊走能が挙げられる。脳梗塞部あるいは腫瘍部に、内在性あるいは移植された神経幹細胞が遊走することは数多くの実験で証明されているが^{14,15)}、遊走をガイドする物質としてマイクログリア¹⁶⁾やstem cell factor¹⁷⁾の関与も明らかとなっている。こうした性質は治療だけでなく、脳腫瘍の早期診断等にも応用が考えられている。我々のグループではこの神経幹細胞を脊髄損傷治療に応用できないかと考え、実験を行っている。

脊髄損傷における病態と神経幹細胞—IL-6シグナルとの関連

脊髄においても神経幹細胞の存在は確認されているが、成体の神経幹細胞はニューロンの産生を活発に行っている側脳室周囲と海馬歯状回以外ではほとんど休止状態にあるようで、培養系に移して、なおかつEGFあるいはFGF-2で刺激することで初めて分裂を再開することができる。また、外部から神経幹細胞を移植しても、環境特異的に移植された細胞はニューロンへと分化しないといわれている。すなわち、ニューロン産生部位である海馬や嗅球に神経幹細胞を移植した場合は神経幹細胞のニューロンへの分化が確認されたが、脊髄等のニューロン新生が行われていない場所へ移植した場合は、神経幹細胞はすべてアストロサイトへ分化し、ニューロンへの分化は確認されなかった¹⁸⁾。この結果はニューロン新生の起こっていない脊髄由来の神経幹細胞を移植した場合でも、ニューロン新生が起こっている海馬由来の神経幹細胞を用いた場合でも同様の結果であった¹⁹⁾。このことから神経幹細胞の分化、特にニューロンへの分化のメカニズムの鍵はニューロン産生部位の特殊な環境にあると考えられ、neurogenic regionとnon-neurogenic regionを比較した研究によりNoggin等の因子が分化に影響を与えているのではないかと考えられている²⁰⁾。

一方、脊髄損傷時においては、損傷に反応して内在性の神経幹細胞が増殖することは明らかになっているものの、これらはニューロンへは全く分化しない上に、全てアストロサイトへと分化し、グリア瘢痕を形成していることが報告された⁸⁾。グリア瘢痕は、軸索伸展阻害因子の一つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)を多量に発現しており、物理的にも化学的にも軸索再生に対し大きな障害と考えられている。この神経幹細胞の限定的なアストロサイトへの分化には損傷脊髄内の微小環境変化が重要と考えられているが、中でもIL-6シグナルは神経幹細胞に作用し、これを強力にアストロサイトへと分化誘導することが*in vitro*の実験で報告されており²¹⁾、損傷急性期にIL-6の発現が急増することが脊髄に内在する神経幹細胞の

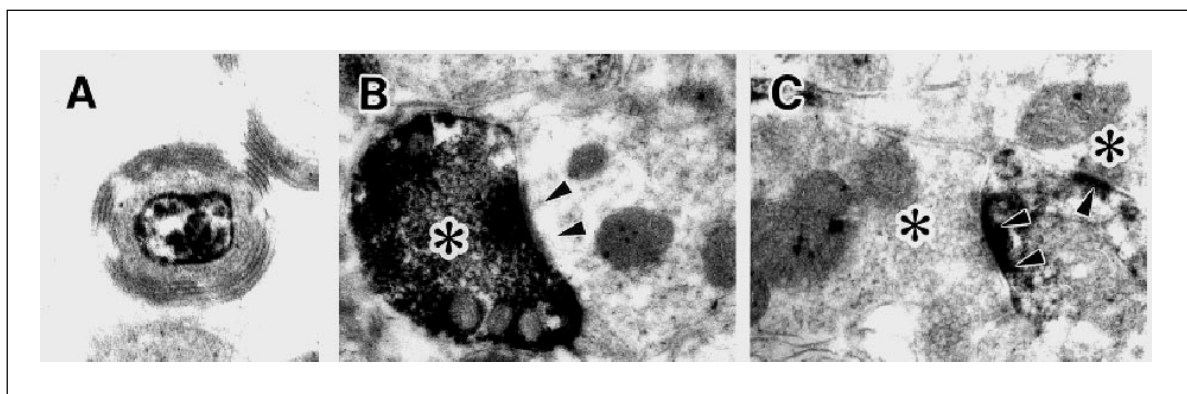


図3 損傷脊髄に移植された神経幹細胞の電顕像

移植された細胞がミエリンを巻いている像(A)や、シナプス前構造(B)やシナプス後構造(C)が確認される。*はシナプス前小胞、矢印は post synaptic density。

限定的なアストロサイトへの分化原因の一つではないかと我々は考えた。実際に IL-6 ノックアウトマウスを用いた研究では損傷の際にアストログリオーシスが抑制されていること²²⁾や、逆に IL-6 および IL-6 レセプターを過剰に発現させたマウスでは軽微な損傷でも顕著なグリオーシスが確認されている²³⁾。また、IL-6 シグナルを過剰に発現させたマウスに脊髄損傷を加えた場合、軸索伸張が通常マウスに比べ著しく減少することも明らかとなっている²⁴⁾。

そこで我々は実際のマウス脊髄損傷において、*in vivo*で IL-6 シグナルがグリア瘢痕形成に与える影響について検討した(図2)。マウス第9胸髄に圧挫損傷を作成し、直後に IL-6 レセプター抗体を one shot で腹腔内投与し、損傷2週後に組織切片を各種マーカーで免疫染色した。GFAP 陽性のグリア瘢痕は上述の結合組織瘢痕を取り囲むように形成されるが、我々は損傷後に新生された細胞をラベルするため、Brd-U を腹腔内投与し、Brd-U と GFAP の二重染色することでグリア瘢痕を新生したアストロサイトとして定量化した。その結果、損傷中心部のグリア瘢痕形成が抑制され、Brd-U / GFAP 二重陽性細胞数においても IL-6 レセプター抗体を損傷直後に投与した群では control 群に比して 25% の減少が見られた。また、IL-6 シグナルの下流分子である STAT3 のリン酸化を western blot により確認したが、こちらも IL-6 レセプター抗体投与群で有意な減少を認めため、損傷直後に one shot で腹腔内投与した薬剤が損傷脊髄にて作用したことを裏付ける結果であると考えられる。

さらに、脊髄損傷の病態形成には炎症反応も大きく関与している。すなわち、外力による一次的機械的損傷に加えて、それに続発する自己崩壊的な組織障害機序、いわゆる二次損傷の概念が提唱されている。病理的観察により、損傷後数時間のうちに灰白質および白質に浮腫、虚血、出血巣が出現し、栄養や酸素不足による周囲の神経細胞の進行

性壊死が生じることが明らかとなった。ラット等を用いた動物実験においては、ステロイドやエリスロポイエチン等を投与することにより二次的損傷を抑制し、続発的な組織崩壊を軽減させ、麻痺の改善を促したとする報告は枚挙にいとまがなく、この二次損傷を軽減させることが脊髄損傷治療の一つの大きな柱となっている^{25,26)}。中でも損傷急性期に脊髄で過剰に発現する炎症性サイトカインは二次的損傷の病態に深く関わっていると考えられ、我々もラット脊髄において損傷後12時間をピークとして IL-6、IL-1 β 、TNF α などの炎症性サイトカインの発現が急増していることを mRNA のレベルで確認している²⁷⁾。特に、IL-6 は sham 群に比べ約30倍の上昇が見られた。IL-6 シグナルは IL-6 単独では作用発現が非常に弱く、IL-6 と IL-6 レセプターと結合してこの複合体がリガンドの役割を果たし、膜結合型レセプターである gp130 と結合して細胞内へシグナルが伝えられるという trans signaling と呼ばれる特殊な形態をとるため、IL-6 レセプターの発現上昇がシグナルを伝える鍵となるが、マウス第9胸髄に圧挫損傷を加え、IL-6 レセプターの発現を western blot により定量化した結果では、損傷後12時間での測定においてレセプターの発現が非損傷時に比べ、約8倍上昇していることも確認した²⁸⁾。

我々は実際に脊髄損傷において、上述の IL-6 レセプター抗体投与が炎症反応を抑制し、二次損傷を軽減させようかどうかを検討するため、損傷後2週の脊髄組織切片において炎症細胞のマーカーである Mac1 (CD11b) 染色を行い、炎症細胞浸潤の程度を定量化した。その結果、Mac1 陽性細胞浸潤は control 群に比べ、IL-6 レセプター抗体投与群では約3分の1に抑制されていた。これは脊髄損傷後に IL-6 シグナルを強制発現させた結果、6倍近い好中球浸潤および2倍のマクロファージ浸潤が見られたという過去の報告と一致する²⁴⁾。さらに、マウス脊髄損傷においてはラット

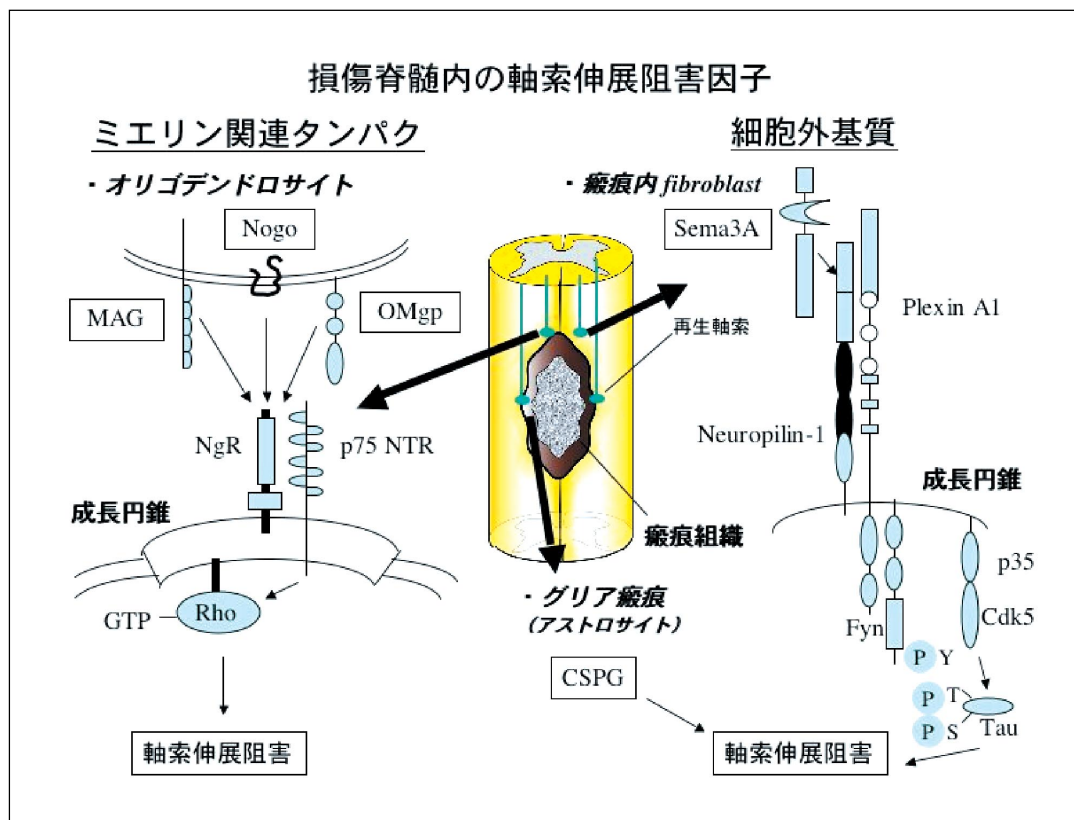
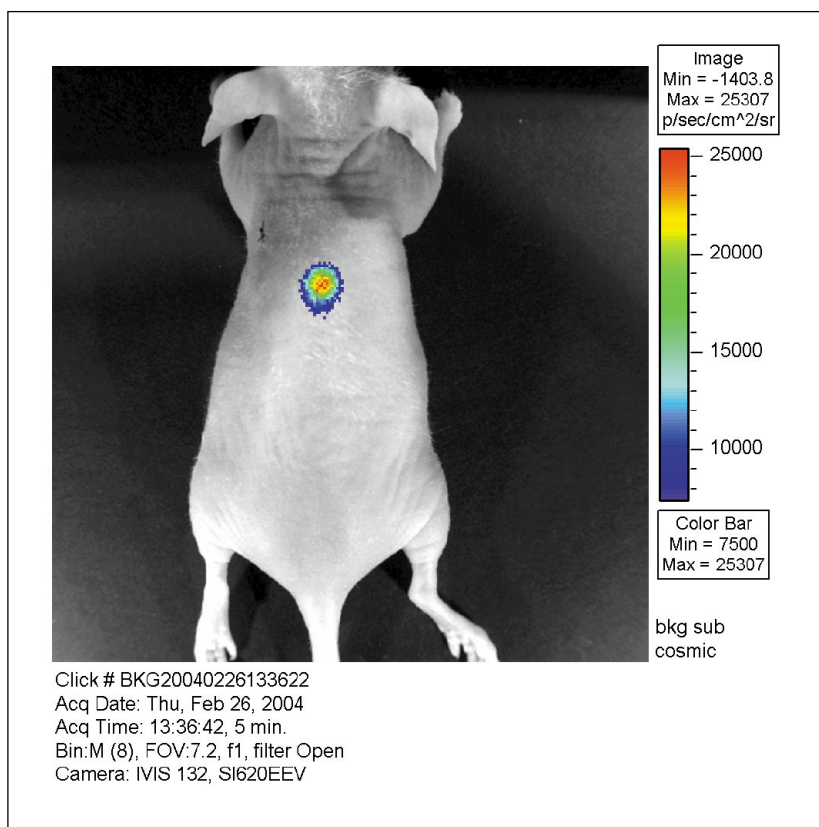


図4 損傷脊髄内の軸索伸展阻害因子

オリゴデンドロサイトからはミエリン関連タンパクとして、Nogo, MAG, Omgpが、癒痕組織内のアストロサイトからはCSPGが、fibroblastからはSema3Aが発現し、軸索の伸展を阻害すると考えられている。

図5 BLIを用いた移植神経幹細胞の*in vivo* imaging像

Luciferase transgenic mouse 胎児より採取した神経幹細胞をヌードマウス脊髄に移植した。発光強度を測定することで生存する細胞量を定量化できる。

等で見られる脊髄組織の軟化空洞の代わりに結合組織瘢痕が形成されるが、この大きさは損傷程度と相関することが明らかとなっている²⁹⁾。この結合組織瘢痕の大きさを定量化し、control群とIL-6レセプター抗体投与群と比較したが、後者においてはこの領域が損傷中心部において有意に減少していた。これらの結果から、IL-6シグナルをブロックすることで炎症反応ならびに二次的な損傷を抑制し、より多くの正常組織が残存すると考えられた。さらに、複数の下肢運動機能評価において、control群よりも有意に良好な機能改善を示した²⁸⁾。

IL-6自体はこれまでに*in vitro*で神経細胞に対し保護的な働きをすると考えられており、脳虚血においてはIL-6投与により梗塞巣の大きさが縮小するなどの報告もあり³⁰⁾、その働きは病態やIL-6シグナルの発現程度、タイミングにより大きく異なっているようである。しかし、脊髄損傷においては損傷後にIL-6シグナルを過度に発現させた場合は、炎症性サイトカインとしての働きが神経保護作用を大きく上回り、逆に損傷範囲の拡大や軸索再生が大きく障害された結果が報告された²⁴⁾。損傷後亜急性期から慢性期にかけてはIL-6がneurotrophicな働きをする可能性は否定できないが、この点においてIL-6レセプター抗体はその半減期が数日と短いため、急性期のneurotoxicなIL-6シグナルのみをブロックし、その後のneuroprotectiveな作用は阻害しないと予測されるため、非常に合理的な薬理作用を示すと我々は考えている。本薬剤は慢性関節リウマチに対し数年以内に臨床の現場で使用される予定であり、現在その効果が疑問視されているステロイド大量療法に代わり脊髄損傷に対する急性期治療の一つとなりうると考えられ、早急な臨床試験に向け体制を整備している。

脊髄損傷に対する神経幹細胞移植と軸索再生阻害因子

内在性の神経幹細胞の再生能力が低いのであれば、これを外部から補うという戦略が考えられる。しかし、損傷直後に神経幹細胞を移植してもほとんど生着しないか、あるいは生着したとしてもアストロサイトにしか分化しなかった³¹⁾。これは、上述の通り損傷脊髄における微小環境の変化、つまり炎症性サイトカインの急増やグリアへ誘導する因子の発現が大きく関与しているものと推測される。逆に抗炎症性作用を持つと言われるTGFβの発現は損傷後4日以降の亜急性期に発現が上昇するため、移植細胞の生存、分化の観点からは少なくとも損傷後急性期は至適な移植時期ではないのではないかと考えられた。ただし、損傷後あまり時間が経過すると、損傷

部周囲にはグリア瘢痕が強固に形成され、軸索の再生を阻害するため、我々は至適移植時期を損傷後7日から14日頃と考えた。この考えに基づき、我々は頸髄損傷後9日目のラットに 1×10^6 個の神経幹細胞を移植した。その結果、移植後5週間の組織切片で移植神経幹細胞の*in vivo*におけるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化ならびに宿主軸索とのシナプス形成を認めた(図3)。さらに、運動機能評価(food retrieval test)において有意に良好な回復を認めた³¹⁾。この機能改善のメカニズムについては今後明らかにされねばならない課題であるが、可能性としては、1)移植された細胞による新しいinputの形成(neurotransmitterの分泌、シナプスの形成など)、2)遮断された神経路に対し、インターニューロンによる新しい連絡路の形成、3)幹細胞自身が分泌する神経栄養因子による神経保護あるいは修復作用、4)オリゴデンドロサイトに分化し髄鞘を形成、5)側副からの異常な軸索伸長や有害因子に対するバリアーを形成、などがあげられる。現在のところ移植された細胞が新しく神経回路網を形成したというよりも、幹細胞自体が分泌する栄養因子による作用が大きいのではないかと考えられているが、移植された細胞がニューロンへと分化し、さらにシナプスを形成していることが確認されているため、このような細胞を増やすことがより劇的な機能回復につながるかどうかを研究する必要があると考えている。

また、我々はコモンマーマウス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を認めた。さらにMRI撮像を経時的に行い、その結果が組織的な変化と対応していることも明らかとなった³²⁾。これらの結果は前臨床試験と言えるものであり、将来有望な治療法と考えている。

しかしながら、我々の実験結果も含め、これまでに報告された神経幹細胞を用いた中枢神経外傷治療に関する論文の機能改善は部分的であり、再生というよりは部分修復といったほうが現段階では適切なものかもしれない。さらなる機能改善を得るためには、もともと脊髄に存在する軸索伸展阻害因子をクリアしなければ難しいと考えている。軸索伸展阻害因子は脊髄損傷後に損傷軸索が再生しない根本的な要因の一つと考えられており、中枢神経系ミエリンや損傷部周囲瘢痕組織に発現が確認されている。近年これらの阻害因子を投与あるいはそのシグナル伝達系を阻害することにより、損傷後の軸索再生を促進し、脊髄損傷後の機能回復を図ろうと、世界で様々な報告がなされている。

まず、オリゴデンドロサイトからは、Nogo、MAG (Myelin-Associated Glycoprotein)、Omgp (Oligodendrocyte-

myelin glycoprotein) などのミエリン関連タンパクが発現し、いずれも軸索の成長円錐部にある Nogo レセプター (NgR) およびその共役受容体である p75NTR を介して軸索の伸長を抑制することが、近年明らかにされた。これに基づき、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する報告³³⁾や、Nogo や p75NTR のノックアウトマウスに脊髄損傷を作製し、対照群との機能回復を検討した報告などが相次いだ。しかし、Nogo ノックアウトマウスによっては軸索の再生・機能回復を認めなかった報告もあり(3つの相異なる研究室からそれぞれ独自の Nogo ノックアウトマウスを作製し、これに脊髄損傷を作製して機能評価を検討した論文が同時に雑誌に掲載され、論文によって結論が異なっていた³⁴⁻³⁶⁾)、また p75 NTR ノックアウトマウスに関しても軸索の再生を促進するには至らなかったことから³⁷⁾、少なくともこれら単独の障害のみではまだ損傷脊髄の再生は十分ではないと思われる。一方、最近新たに LINGO-1 という、NgR-p75NTR 複合体との共役受容体の存在が報告され³⁸⁾、Rho kinase 系(アクチン-ミオシン系を制御し、細胞骨格の形成に関与する)を介した軸索伸長障害のシグナル伝達がより直接的に解明されてきている。今後これらの受容体の機能がさらに解明され、ミエリン関連タンパクによる軸索伸長障害が抑制される、より強力な薬剤・抗体が作製されれば、脊髄損傷に対しても有効性が出てくるのではと期待されている。

また、損傷軸索の再生を阻むのはミエリン関連タンパクだけではない。損傷部周囲に形成される大量のアストロサイトからは上述の CSPG を代表とするプロテオグリカンが発現され、再生軸索の伸長を障害する。また、fibroblast からはセマフォリン 3A (Sema3A) が発現され、同様に成長円錐の退縮、崩壊をもたらす。これら3つの要因が複雑に絡み合っており、脊髄損傷後の軸索再生を障害している(図4)。

CSPG などのプロテオグリカンが軸索再生を障害している機構については、詳細は不明であるが、共有結合している GAG 鎖(グリコサミノグリカン)が重要とされる。Bradbury らは、脊髄部分切断ラットの損傷脊髄に GAG 鎖の分解酵素である Chondroitinase ABC を投与し、対照群と比較して有意な皮質脊髄路の軸索再生と運動機能の回復を認めたと報告している³⁹⁾。Sema3A に関しては、ニワトリ後根神経節の成長円錐を崩壊させる因子として 1993 年に同定された物質であるが、Neuropilin-1 とその共役受容体 PlexinA1 がこの 10 年の間に同定され、軸索伸展障害の分子メカニズムが解明されつつある。我々は、住友製薬との共同研究により、強力な Sema3A 阻害剤を胸髄全切断ラットの損傷部に持続投与し、対照群に比し有意な軸索の再生

と運動機能の回復をもたらすことを報告した⁴⁰⁾。

このように、様々な因子が損傷後に発現を上昇させて軸索の伸展を阻害している。今後はこれら軸索伸展障害因子の抑制と神経幹細胞移植を組み合わせることで、より劇的な機能回復が可能なのではと考え研究を行っている。

移植細胞の *in vivo* imaging

神経幹細胞移植の一定の効果は得られているものの、何個の細胞を移植するのが最も効果的なのか、どのような細胞が機能改善には必要なのか、あるいは損傷中心部に移植する場合と損傷部周囲(例えば頭尾側)に移植した場合では効果に差があるのか、など基本的な解明すべき課題は多々ある。特に、これまで移植細胞の生存や体内移動等の経時的動態評価は組織切片に基づくものであり、*in vivo*での移植細胞の腫瘍化や distribution 解析を含め、同一動物における移植細胞の real-time の動態把握は困難であった。何個の細胞が正確に移植され、何%の細胞がどの時期にどれだけ生着しているかを把握することができれば、現在解明されていない移植細胞による機能回復のメカニズムを考察する強力なツールとなりうる。そこで我々は、発光酵素である firefly luciferase とその基質である luciferin の反応による微弱な発光を超高感度 CCD カメラにより検出する bioluminescence imaging system (以下 BLI) を用いて移植神経幹細胞の *in vivo* imaging を試みた。この firefly luciferase の発光反応は、酸素と ATP 依存性であるため、生きた細胞のみしか発光しないという特性があり、さらに発光の強度と細胞数は相関関係にあるため、腫瘍や感染巣の増大や転移⁴¹⁾、あるいは遺伝子の発現など⁴²⁾を、動物を生かしたまま皮膚の上から目で見える形で、経時的かつ定量的に測定することが可能である。従来は増殖する細胞、つまり腫瘍や感染といった分野での使用しか困難であったが、我々はこのシステムを移植細胞の同定に応用した。その結果、長期経過後も十分に可視化でき、動物を殺すことなく移植細胞を追跡するシステムを立ち上げた(図5)。今後はこのシステムを利用してさらに効果的な神経幹細胞移植の方法を開発してゆく予定である。また、同時に並行して 7 テスラー(現在臨床では通常 1.5T) という長高感度 MRI を用いて移植神経幹細胞の *in vivo*での追跡を可能とした研究を行っている。BLI に比べ MRI は空間解像度に優れるため、より詳細な解剖学的考察が得られる。神経幹細胞に取り込ませる iron nanoparticle についても改良が進んでおり⁴³⁾、BLI と併せて強力な研究ツールとなるものと確信している。

おわりに

現在我々は、神経幹細胞の培養方法の確立、未分化維持機構の解明、分化制御メカニズムの詳細な検討といった基礎的なレベルから、マウスやサル等を用いた疾患モデル動物における神経幹細胞移植実験を行い、より臨床的に近い研究を行う一方で、将来の臨床応用を見据えた安全性の確証された細胞を安定供給する体制の確立も目指している。そのため、現在我々の研究室内には高度なレベルの安全検査システムやクリーンルームを備えたセルプロセッシングセンターが設立され、研究が進められている。近年、中国で胎児由来の鼻粘膜細胞が脊髄損傷患者に移植され、本邦の患者さんたちが相次いで治療を望み中国へ渡っているという現状があるが、その安全性や治療効果についてはほとんど明らかにされていない。再生医療の実践においては、急ぐことなく着実に有効性、安全性、化学的根拠を明らかにすることが言うまでもなく必要であるが、わが国において制度的な問題や安全体制を整えることも急務であると考えている。近い将来、多くの患者さんにとって安全で確実性の高い科学的根拠に基づいた治療法として再生医療が実践されることを心から願っている。

文 献

- 1) Okano H: Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res*, 69: 698-707, 2002.
- 2) Bjorklund A, Lindvall O: Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci*, 3: 537-544, 2000.
- 3) Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A: Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med*, 10: S42-S50, 2004.
- 4) Shimazaki T: Biology and clinical application of neural stem cells. *Horm Res*, 60: 1-9, 2003.
- 5) Cayouette M, Raff M: Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nat Neurosci*, 5: 1265-1269, 2002.
- 6) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4: 1313-1317, 1998.
- 7) Goldman SA: Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol*, 36: 267-286, 1998.
- 8) 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.
- 9) Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 12: 4565-4574, 1992.
- 10) Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, Nakanishi Y, Arita N, Yamasaki M, Okano H, Hara M, Miyake J: Evaluation of in vitro proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res*, 69: 869-879, 2002.
- 11) Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ: A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 171: 98-108, 2001.
- 12) Daadi MM, Weiss S: Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci*, 19: 4484-4497, 1999.
- 13) Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, Huang LY, Coggeshall RE, Yu Y: Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci*, 5: 1271-1278, 2002.
- 14) Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R: Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke*, 35: 952-957, 2004.
- 15) Tang Y, Shah K, Messerli SM, Snyder E, Breakefield X, Weissleder R: In vivo tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas. *Hum Gene Ther*, 14: 1247-1254, 2003.
- 16) Aarum J, Sandberg K, Haerberlein SL, Persson MA: Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 15983-15988, 2003.
- 17) Sun L, Lee J, Fine HA: Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *J Clin Invest*, 113: 1364-1374, 2004.
- 18) Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH: Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, 383: 624-627, 1996.
- 19) 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.
- 20) Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28: 713-726, 2000.
- 21) Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME:

- Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, 278: 477-483, 1997.
- 22) Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich GI: Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*, 19: 227-233, 1997.
 - 23) Brunello AG, Weissenberger J, Kappeler A, Vallan C, Peters M, Rose-John S, Weis J: Astrocytic alterations in interleukin-6/Soluble interleukin-6 receptor alpha double-transgenic mice. *Am J Pathol*, 157: 1485-1493, 2000.
 - 24) Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH: Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*, 454: 213-228, 2002.
 - 25) Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian RJ: Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Curr Opin Neurol*, 15: 713-720, 2002.
 - 26) Popovich PG, Jones TB: Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 13-17, 2003.
 - 27) Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS: Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, 184: 313-325, 2003.
 - 28) 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*, 76: 265-276, 2004.
 - 29) Ma M, Basso DM, Walters P, Stokes BT, Jakeman LB: Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Exp Neurol*, 169: 239-254, 2001.
 - 30) Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ: Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 176-179, 1998.
 - 31) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H: 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.
 - 32) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of human neural stem cell for spinal cord injury in primates. (投稿中)
 - 33) Brosamle C, Huber AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME: Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci*, 20: 8061-8068, 2000.
 - 34) Kim JE, Li S, Grandpre T, Qiu D, Strittmatter SM: Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38: 187-199, 2003.
 - 35) Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, Christ F, Sansig G, van der Putten H, Schwab ME: Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron*, 38: 201-211, 2003.
 - 36) Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M: Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron*, 38: 213-224, 2003.
 - 37) Song XY, Zhong JH, Wang X, Zhou XF: Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice. *J Neurosci*, 24: 542-546, 2004.
 - 38) Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB: LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7: 221-228, 2004.
 - 39) Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416: 636-640, 2002.
 - 40) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Axonal regeneration by administration of Semaphorin3A inhibitor in the injured spinal cord. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, CD-ROM Program No.775.6, 2003.
 - 41) Shah K, Jacobs A, Breakefield XO, Weissleder R: Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther*, 11: 1175-1187, 2004.
 - 42) Contag CH, Bachmann MH: Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng*, 4: 235-260, 2002.
 - 43) Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R: Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 18: 410-414, 2000.