

## 脊髄損傷治療の分子生物学的アプローチ

緒方 徹\*

### Molecular Cell Biology in Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury

Toru OGATA\*

#### Abstract

Researches of spinal cord injury can be divided into neuroprotection, axonal regeneration and neural cell replacement. It is necessary to integrate all aspects of tissue reaction after injury to develop a new therapy for spinal cord injury.

キーワード：二次傷害、神経再生、細胞移植、臨床治験

2009年 8月20日 受付

2010年 1月 8日 採択

#### 1. はじめに

近年、多分化能をもつ幹細胞をもちいた再生医療が医学全般の関心を集めるとともに、脊髄損傷における神経再生の試みも社会的な注目を集めている。実際に脊損の患者さんから「神経移植の治療はいつ頃できるようになりますか？」と訊かれることもしばしばあり、再生医療への期待の大きさがうかがわれる。しかし神経幹細胞移植は数多く行なわれている脊損研究の中のひとつであり、実際には脊髄損傷の包括的な理解と多岐にわたる知見の融合が次世代の治療につながると思うべきであろう。本稿では現在すすめられている脊損研究の流れを分類し全体像を紹介する。はじめに脊髄損傷急性期における神経組織保護について、次いで損傷脊髄の再生の研究について述べる。最後に実際に研究成果を臨床に還元するための臨床試験における現状と課題について述べる。

#### 2. 急性期脊髄神経保護の試み

##### 2. 1. 二次傷害の概念

外力により損傷された脊髄の組織変化をラットの実

験モデルで観察すると、損傷領域は時間経過とともに数日間にわたって拡大していくことがわかる。すなわち損傷直後に観察される物理的傷害によって死に落ちている細胞（これを一次傷害とよぶ）の他に間接的な機序で死んでいく細胞が多数存在することが推測される。一次傷害を受けた細胞を救うことはできなくても間接的細胞死（＝二次傷害）は治療介入によって軽減できる、というのが現在に到る脊損急性期の治療薬開発の基本概念である。二次傷害のプロセスは興奮性神経伝達物質の上昇、アラキドン酸カスケードの活性化、フリーラジカルの発生による脂質過酸化・細胞膜傷害そして炎症性サイトカインといった複数の要因が関与していると考えられる。

##### 2. 2. 副腎皮質ステロイド

神経外傷においてステロイドは浮腫の軽減を目的に古くから使われており、脊損に対するメチルプレドニゾロンの治療効果は北米におけるNASCIS臨床治験により実証された<sup>[1]</sup>。現在に到るまでエビデンスの確立された唯一の治療薬物であるステロイドだがその作用機序は必ずしも明らかではない。一般にはフリーラジ

\* 国立障害者リハビリテーションセンター研究所運動機能系障害研究部

\* Department of Rehabilitation For Movement Functions, Research Institute, National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities

カルによって起こされる脂質過酸化を抑制することで細胞死を防ぐと考えられている。

### 2. 3. 興奮性神経伝達物質

グルタミン酸は神経伝達物質として働くだけでなく一過性脳虚血モデルの実験において中枢神経組織内で上昇し遅発性の細胞死を引き起こす。上昇したグルタミン酸は細胞膜に発現している受容体に結合し細胞にCaイオンの流入を起こし、最終的にこのCaイオンの流入によってフリーラジカルの生成と脂質過酸化反応、あるいはミトコンドリアの機能不全といった細胞障害を引き起こされる。虚血性脳疾患の分野ではすでにグルタミン酸受容体に対する選択的阻害剤の開発そして脳梗塞に対する臨床試験が行なわれている<sup>[2]</sup>。脊損においてもこのグルタミン酸による細胞毒性は二次傷害に関与しており、動物実験レベルではあるが、riluzole（グルタミン酸放出阻害剤）、MK-801(NMDA型受容体拮抗剤)やNBQX(AMPA型受容体拮抗剤)が検討されており神経保護作用が報告されている。

### 2. 4. 炎症性サイトカイン

ラットを用いた脊髄圧挫モデルの検討より、脊損では一連の炎症のカスケードが活性化されることが知られている。まず局在のマクロファージであるミクログリアが活性化し血中の好中球、マクロファージの遊走を引き起こす。この際細胞間の情報伝達物質として働くのがTNF $\alpha$ 、IL-1,6といった炎症性サイトカインである。本来遊走してきた炎症細胞は死んだ細胞や破壊された髄鞘（ミエリン）の除去を担っていると考えられるが、活性化炎症細胞から放出される酵素は残存組織あるいは血管内皮細胞を傷害し組織損傷あるいは微小循環障害を引き起こす。我々は近年、炎症性サイトカインの一つであるIFN $\gamma$ が損傷後の亜急性期に誘導され、損傷脊髄内の反応性グリア細胞を傷害することを明らかにした。この反応性グリア細胞は脊髄に内在する修復起点として知られており、この細胞がIFN $\gamma$ の作用によって細胞死に陥ることは脊髄損傷後の自然回復が乏しいことと関連していると予想される。実際に、IFN $\gamma$ を欠損したマウスを用いた脊髄損傷誘発実験において、この遺伝子欠損マウスは通常の野生型のマウスに比べ良好な神経機能回復を示したことから、生き残った反応性グリア細胞が回復に寄与したと考えられた。この原理を応用すると将来的に、ヒト急性期脊髄損傷においてもIFN $\gamma$ を選択的に遮断することにより、反応性グリア細胞を温存し、脊髄損傷からの回復を促進するという応用戦略が考えうる。

## 3. 慢性期神経回復の試み

### 3. 1. 軸索再生と神経再生

20世紀初頭、中枢神経は（末梢神経と異なり）再生しないと考えられ、この場合の「再生」とは軸索の再伸長と成熟神経細胞の分裂増殖を意味していた。両者はしばしば混同されることがあるが脊髄の上下降路傷害においては軸索の再生が、各髄節の前角細胞の傷害においては新たな神経細胞の補充が必要になることは言うまでもない。

### 3. 2. 軸索再生の試み

中枢神経細胞には断裂した軸索を再び伸ばす能力がないという概念は1981年のAguayoの実験によって覆される。彼は切断された脊髄に末梢神経を移植し、グラフト内に中枢からの軸索が入り込んでいくことを確認した<sup>[3]</sup>。これ以降、中枢神経が軸索を再伸長しないのは何らかの条件が満たされていないためであり、そうした条件を整えることが脊損からの回復につながるとの考えが広まった。

軸索伸長に必要な条件は以下のように分類できる。

#### (1) 神経成長因子が軸索断端周囲に存在する

神経成長因子の中でBDNFやNT-3は中枢神経に対する活性が強く、動物実験モデルにおいてこれらの局所投与によって軸索伸長が促進される（図1①）。また、我々は軸索断端より神経細胞に遺伝子導入を行ない神経成長因子受容体の下流に位置する軸索伸長のシグナルを直接活性化することにより脊髄機能の回復が得られることをラット脊損モデルによって確認している<sup>[4]</sup>。

#### (2) 軸索伸長に対する物理的障害物がない

軸索に対する障害物として脊損後に形成されるグリア細胞による瘢痕組織が挙げられる。瘢痕組織の構成物にはいわゆる「硬く」軸索の通過を阻むものと、その物質が軸索の先端（growth cone）に作用し成長を停止させる活性を持つものがある。前者の一つに細胞外基質のプロテオグリカンがあり長年研究の対象となっていた。最近になりプロテオグリカンの分解酵素を髄腔内に持続注入することで軸索の再生および運動機能の改善が見られたとの報告があり興味深い（図1③）<sup>[5]</sup>。

(3) 軸索伸長を阻害する生理活性物質がない  
一方growth coneの阻害因子としてもっとも注目されているのが2000年に同定されたNogoであり、この生理活性を特異的抗体の投与によって中和することで軸索伸長が改善することが知られている（図1②）<sup>[6]</sup>。

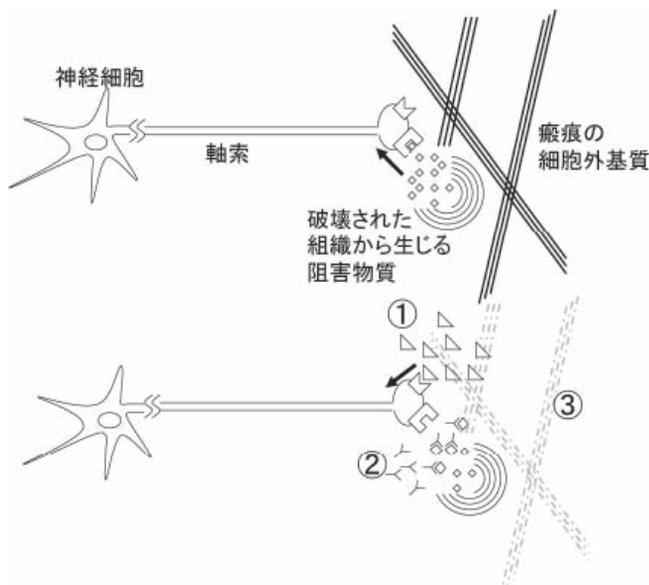


図1 再生軸索を阻害する環境（上段）およびそれに対する治療戦略（下段）

①神経成長因子の投与、②阻害活性物質の中和、③基質の融解（本文参照）

#### 4. 細胞治療による神経再生の試み

損傷によって失われた神経細胞を補充することは従来不可能と考えられてきたが、近年発生生物学の進歩とともに未分化で自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞を単離培養し増幅する技術が確立したことにより状況は一変した。すなわち他の個体から得た神経幹細胞を損傷脊髄内に移植し、その後細胞がその場で必要とされる神経細胞に分化し局所の神経回路を修復するという方法である。この方法はパーキンソン氏病におけるドーパミン産生ニューロンの移植治療が臨床的に成果を出したのが布石となり、現在脊損を含め幅広い神経病変への利用が考えられている。実際にラットを始めとしてサル脊損モデルにおいて実験が行なわれ、移植幹細胞が神経に分化することが報告されている<sup>17)</sup>。この治療アプローチは近年の万能細胞（iPS細胞）の発見により、神経幹細胞を得る過程での倫理的障害がクリアされる見通しがたったことから臨床応用への期待が高まっている。現在はiPS細胞を作成・移植する上での安全面の検討が国内をはじめ多くの研究室で精力的に進められている。

細胞移植が目される一方で損傷脊髄内に存在する細胞を分化誘導の対象にする試みもなされている。これは発生期の胎児のみならず成体神経組織にも神経前駆細胞が存在するという新しい知見に基づいており、移植医療に伴うと予想される社会的問題を回避できる点で注目される。我々は成体ラット脊髄内に多数の神

経幹細胞が存在し、これらが脊髄の損傷に反応して分裂増殖をおこない、やがて種々のグリア細胞に分化することを見出している<sup>18)</sup>。これらの細胞の増殖・分化をコントロールすることも脊髄組織の修復における可能性のひとつにあげられる。

#### 5. 臨床治験の現状

これまで述べてきた動物実験で得られている成果をみると明日にでも脊損の新たな治療法が生まれてもよさそうなものだが、実際にメチルプレドニゾロン有効性を立証した米国のNASCIS治験以来、大規模と言える治験は92—97年に同じく米国で行われたSygen (GM1 ganglioside)の臨床試験のみである。その他、本稿で述べた基礎研究を進展させ現在臨床治験の準備あるいは開始段階にある治療を表1にまとめた。

表1

軸索再生誘導		
コンドロイチン硫酸分解酵素	英国	準備中
Nogo受容体拮抗薬(ATI-355)	欧州	Phase1 急性
Rho阻害剤Cethrin	米国	Phase2 急性
Semaphorin3A阻害剤	日本	準備中
神経保護治療		
ミノサイクリン投与	カナダ	Phase1 急性
顆粒球コロニー刺激因子	日本	Phase1 急性
Riluzole	カナダ	Phase1 急性
イノシン	米国	準備中 急性
細胞移植治療		
自己骨髄間質細胞	ブラジル	Phase2 慢性
	チェコ	Phase1 慢性
	韓国	慢性
	日本	Phase1 急性
鼻粘膜細胞移植	ポルトガル	臨床 慢性
	オーストラリア	Phase1 慢性
	中国	臨床 急性・慢性
	日本	Phase1 慢性
ES細胞（由来）移植	米国	準備中 急性
シュワン細胞移植	米国	準備中

ここで強調したいのはその治験デザインの難しさである。先のSygenでは二重盲検試験で薬効を証明するために760例の患者登録を（もちろん多施設で）行っている<sup>19)</sup>。これだけの症例数が必要となる背景には脊髄損傷における神経機能自然回復の存在が挙げられる。受傷後早期、特に1週間以内は神経機能の自然回復が症例によっては著明に観察されるため、治療介入の効果自然回復と識別することが容易ではない。治療介入を遅く開始すれば自然回復の影響を受けにくく

なるものの、脊髄損傷の病態を考えると早期からの治療開始が望まれる面も多い。こうした問題の解決には神経症状によらない脊髄損傷重症度の客観的評価方法が求められる。現在、MRIを用いた画像技術や、血液中の神経関連たんぱく質をバイオマーカーとして測定する技術などが検討されており、今後の展開が期待される。

## 6. まとめ

新しい医療技術の一環として脊損治療について述べたが、残念ながら現在動物実験レベルで効果を示している方法が近々臨床に登場するとは考えにくい。その理由は個別の現象については実験条件をうまく設定してその現象をクローズアップすることで有効性を示すことが可能だが、脊髄損傷という過程全体のなかでの個々の位置付け、相互作用、各因子の寄与度（重要性）の評価という作業はできておらず、それはすなわち脊損の生物学的現象を我々がまだ十分に把握しきれていないことに起因している。また、最後の項に述べたように実際に新しい技術を臨床に適応する際にはより詳細な脊損の分類、臨床機能評価方法とともに多施設間の連携また場合によってはセンター施設の設置といった課題もクリアされなければならない。こうした基礎生物学的知見の蓄積と臨床面での体制がととのって初めて脊髄損傷への新たな治療技術の導入が可能になると思われる。

## 7. 文献

- 1) Bracken, M. B. et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N. Engl. J. Med.* 322(20), 1990, p.1405-1411.
- 2) Sacco, R. L. et al. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA.* 285(13), 2001, p.1719-1728.
- 3) David, S. et al. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 214(4523), 1981, p.931-933.
- 4) Miura, T. et al. Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1. *Exp. Neurol.* 166(1), 2000, p.115-126.
- 5) Bradbury, E. J. et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 416(6881), 2002, p.636-640.
- 6) Merkler, D. et al. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.* 21(10), 2001, p.3665-3673.
- 7) McDonald, J. W. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* 5(12), 1999, p.1410-1412.
- 8) Yamamoto, S. et al. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172(1), 2001, p.115-127.
- 9) Geisler, F. H. et al. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine.* 26(24 Suppl.), 2001, p.S87-98.