第３回　脊髄再生研究促進市民セミナー

2003 年６月９日（月）

午前 10 時半～12 時

【主　催】

社　団　法　人　　**全国脊髄損傷者連合会**

特定非営利活動法人　　**日本せきずい基金**

【講　師】

岡野　栄之　先生

（慶応大学医学部教授・生理学）

（社）全国脊髄損傷者連合会　（特）　日本せきずい基金

＜講師略歴＞

岡野　栄之（ｵｶﾉﾋﾃﾞﾕｷ）

略歴

1959 年生まれ。慶應義塾大学医学部卒業。医学博士。
筑波大学基礎医学系教授、大阪大学医学部教授を経て、
現在、慶應義塾大学医学部教授。
日本神経化学会理事，日本再生医療学会理事，
日本発生生物学会運営委員,日本分子生物学会評議員，
日本生理学会常任幹事，日本神経科学会理事　など
研究テーマ：中枢神経系の再生と発生。

論文

＊　Transplanted neural progenitor cells differentiate into neurons in vivo and improve motor　function after spinal cord contusion injury in rats. ***J. Neurosci. Res.*** 2002

＊　Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division.　***Nature*** 411, 94-98, 2001

右端の数字は本誌のページ番号です。
↓

【資料集・目次】

神経系について　2
脊髄について　5
『再生医療ーその可能性』より　6
中枢神経系再生への戦略　岡野栄之（慶大）　7
中枢神経再生への挑戦　岡田洋平　岡野栄之（慶大）　8
治癒のための５段階　ダルトン・デートリヒ（マイアミ・プロジェクト）　12
脊髄再生・移植に関する基礎知識　特集にあたって　岩崎喜信（北大）　15
中枢神経再生の最近の動向　黒田　敏ら（北大）　15
脊髄損傷に対する再生医療　金子慎二郎、中村雅也、岩波明生、小川佑人
岡野栄之、戸山芳昭（慶大）　16
神経再生医療の基礎知識　佐々木祐典、本望　修、宝金清博（札幌医大）　18
神経再生の研究の最新知見　高見俊宏、露口尚弘、原　充弘（阪大）　18
脊髄の修復　伊勢田努力、西尾健資（京大）　20
神経系幹細胞を用いた神経機能再生　高橋淳（京大）　21
ヒト ES 細胞株の樹立とその意義　中辻憲夫（京大）　23
ヒト ES 細胞と再生医療　中畑龍俊（京大）　26
神経幹細胞を用いた移植治療と再生医療
森　裕、武田雅敏、岡野栄之（阪大）　29
第２回日本再生医療学会総会・抄録より（2003-3）　31
再生医学用語集　34

＊　本資料集では掲載に際して 、英文表記の一部を和文にした。
また論文は一部を除き要旨のみを掲載した。〔JSCF 事務局〕

１．神経系について（参考資料）

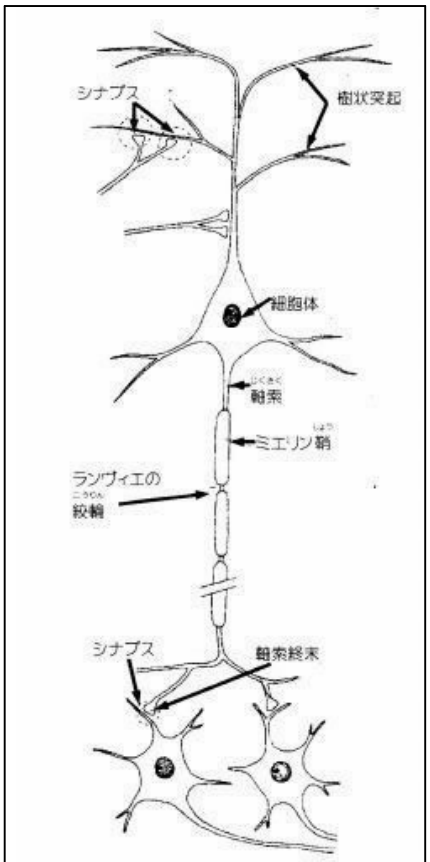
ニューロン（神経細胞）：体のほかの部位の細胞にはまったく見られない特殊化した形態をしている。またニューロンの形態は、存在部位や動物によってきわめて多様である。脳には１０の 12 乗のニューロンがあり、それぞれ 1000 にのぼる他のニューロンと繋がっている。ニューロンの機能は情報伝達にある。

ニューロンの情報伝達の方法：

① 電気的シグナル：細胞内部での情報処理と伝達に使われる
② 化学的シグナル：細胞間の情報伝達に使われる。

外界からの情報はシグナルが多様なため、処理が難しい。感覚ニューロンはそのために特殊化し、電気シグナルに変換している。

介在ニューロンは、感覚ニューロンの電気的シグナルを化学的シグナルに変換し次の細胞に伝える。この情報は細胞内で再び電気的シグナルに変えられる。この情報は最終的に運動ニューロンか分泌腺細胞などを刺激する他のニューロンに伝えられる。



脊椎動物のニューロン（神経細胞）の模式図（佐藤真彦著『脳・神経と行動』、岩波書店より）

樹状突起：細胞体から木の枝のように伸びた多数の突起

軸索：細胞体から樹状突起と反対の方向に伸びた長い１本の突起。
軸索の終末部は、次のニューロンや樹状突起、細胞体の上で終わっている。
軸索は活動電位と呼ばれる電気的インパルスを細胞体から末端に伝えるため特殊な構造となっている。活動電位とは、細胞膜をはさんでの電位の一連の急激な変化である。人の脳の軸索の太さは１μm。
ヒトの軸索の長さは１メートル以上のものがあるが、活動電位は毎秒 100 メートルにものぼり、末端まで伝わるのに２，３ミリ秒しかかからない。

シナプス：ニューロン同士のつなぎ目。
生物学者カハールが 100 年以上前に唱えた「ニューロン説」は今日の神経系を理解する基本となっている。

「ニューロン説」：

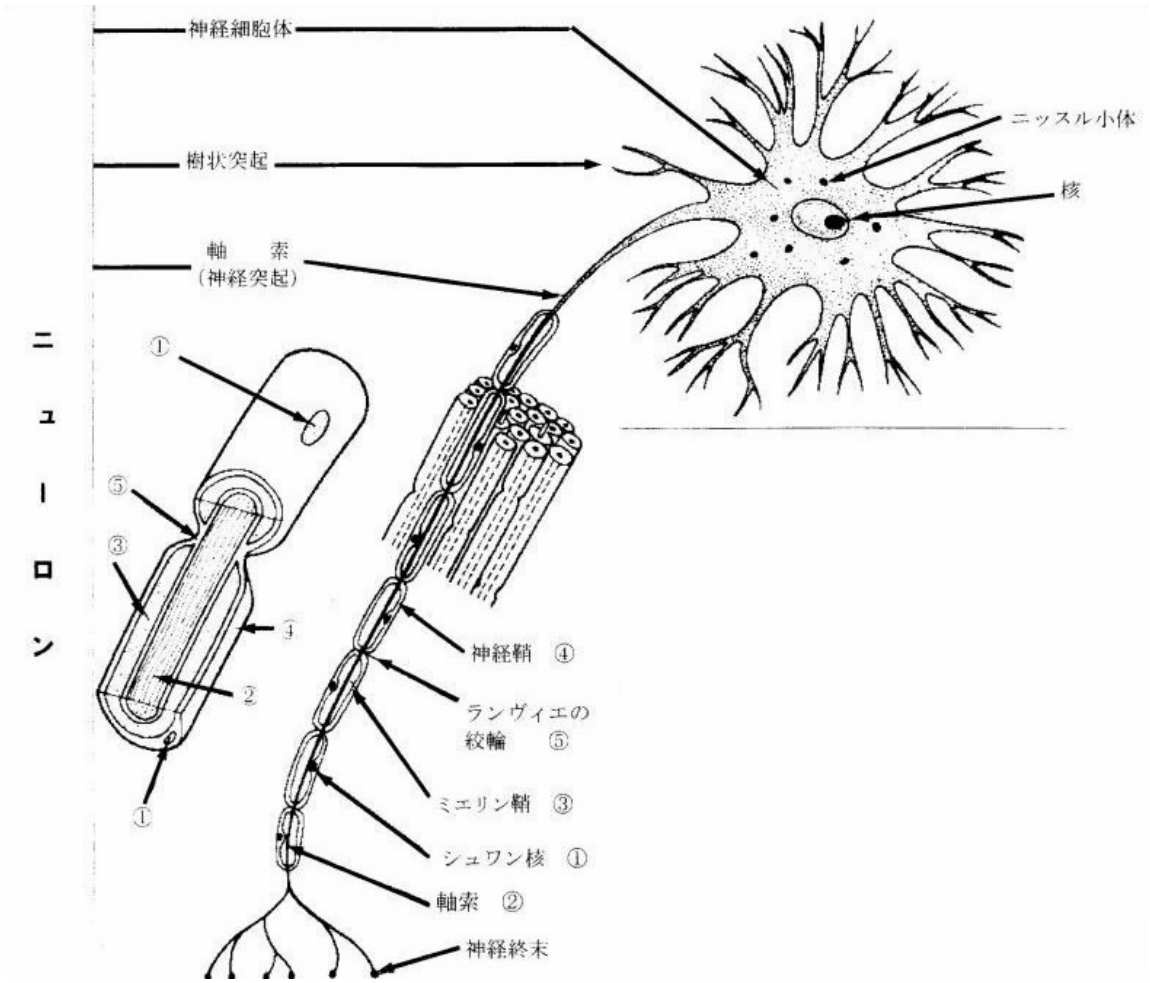
① それぞれのニューロン（神経細胞）は独立した単位であり、信号（インパルス、活動電位）はニューロン間の接触部を通して伝えられる。
② ニューロンには機能的な極性（磁石のＮ極とＳ極のような性質）が存在する。
樹状突起（受容器）が信号を受け取り、軸索（伝導器）が信号をニューロンの終末（実行器）に伝える。

ニューロンは軸索の長さにより２つに分類できる。

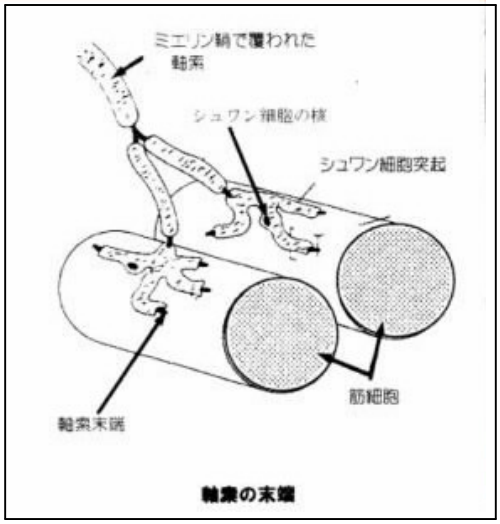
①　投射ニューロン：長い軸索を持ち、遠く離れた部位のニューロンに信号を送る。中継ニューロン、主要ニューロンとも言う。

②　固有ニューロン：短い軸索を持つかまったく軸索を持たない。局所介在ニューロンとも呼ばれ、神経系の神経核や皮質などの限られた領域での信号処理に関与する。

グリア細胞：ニューロンの細胞体や軸索を囲んでいる細胞。脊椎動物の中枢神経系では、グリア細胞の数はニューロンの数よりも 10〜50 倍も多い。
グリア細胞には、①オリゴデンドロサイト、②シュワン細胞、③アストロサイト、の３種類がある。
ニューロンは興奮性を示しいったん分化すると分裂できないが、グリア細胞は興奮性を示さず、大半のグリア細胞は分裂できる。



ミエリン鞘（髄鞘ｽﾞｲｼｮｳ）：オリゴデンドロサイトとシュワン細胞は、軸索を何重にも包み込んでミエリン鞘を形成し、軸索を電気的に絶縁する。ミエリン鞘で絶縁された軸索を有髄軸索と呼ぶ。
１つのオリゴデンドロサイトは、中枢神経系の白質で複数の軸索を囲んでいる。
１つのシュワン細胞は、末梢神経内で１本の軸索を取り囲む。

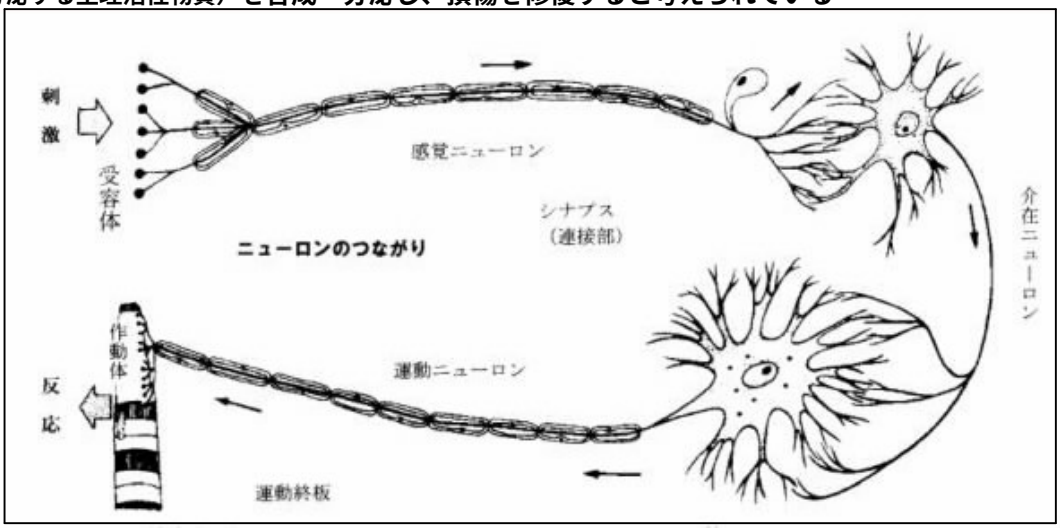


ランヴィエ絞輪（ｺｳﾘﾝ）：ミエリン鞘に覆われた有髄軸索には、約１mmごとにミエリン鞘におおわれたくびれた部分があり、これをランヴィエ絞輪という。
　　インパルスの信号は、この部分を飛び飛びに伝導する（跳躍伝導）ので、ミエリン鞘のない無髄軸索よりはるかに高速に信号を伝えられる。

アストロサイト：たくさんの放射状の突起を伸ばし、突起の末端が足状に広がってニューロンや毛細血管の内皮細胞（血管壁を覆う細胞）と接触する。

ミクログリア：造血組織に由来する小型の細胞で、変性したあるいは損傷したニューンを食べて（貪食）、環境を維持する。

　ニューロンが損傷すると、その周囲のミクログリアやアストロサイトが活性化されて、さまざまな神経栄養因子やサイトカイン（免疫細胞や様々な細胞が分泌する生理活性物質）を合成・分泌し、損傷を修復すると考えられている

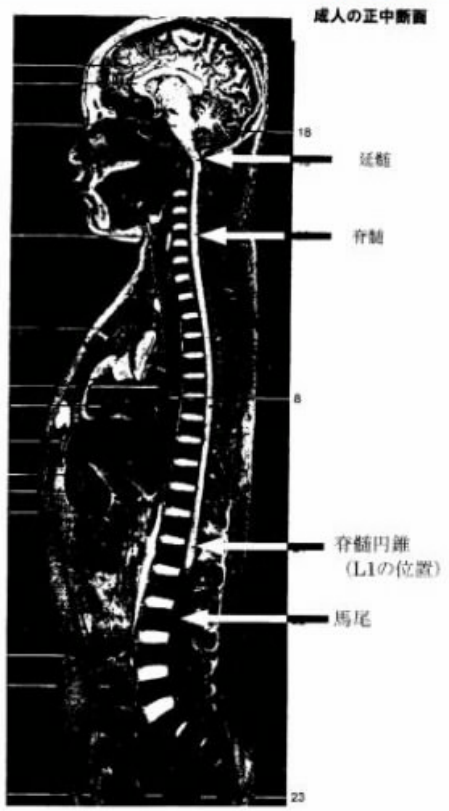


介在ニューロンは、感覚ニューロンの電気的シグナルを化学的シグナルに変換し次の細胞に伝える。この情報は細胞内で再び電気的シグナルに変えられる。この情報は最終的に運動ニューロンか分泌腺細胞などを刺激する他のニューロンに伝えられる。典型的運動ニューロン：細胞体から筋細胞まで伸びた１本の長い軸索がある。哺乳類の運動ニューロンはランビエ絞輪と軸索末端を除き、ほぼ全長に渡ってミエリン鞘（髄鞘）で覆われている。脊椎動物の感覚ニューロン：細胞体からたった１つだけの突起を出し、それが細胞体から少し離れたところで枝分かれする。一方は、感覚受容細胞からのインパルス（信号）を脊髄のすぐ近くの背部神経節にある細胞体に伝える。他方は細胞体からのインパルスを脊髄あるいは脳に伝える。

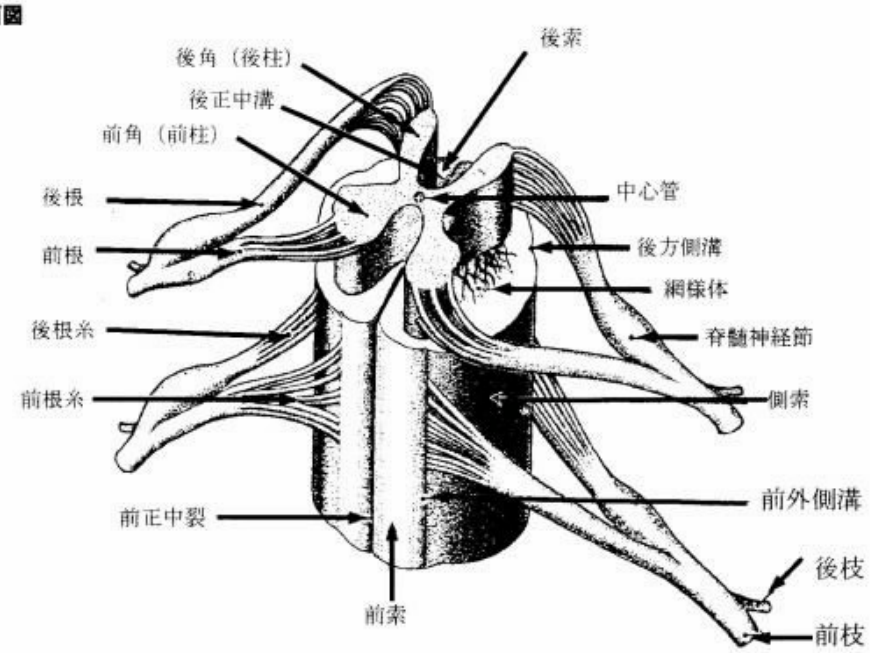
２．脊髄について

　脊髄は、脊柱管の中にあり、細長い円柱形の索（ﾛｰﾌﾟ）状をしていて、長さは40～45ｃｍ、重さは25グラム程度。
　太さは、胸部で前後の直径８mm、左右約10mmだが、頸部や腰部は紡錘形をしている。
　脊髄の上は延髄に連なり、下は第１～第２腰椎の高さで糸状の終糸に連なる（この部分を脊髄円錐という）。脊柱管の残りの隙間には脊髄はなく、脊髄下部に出入りする多数の脊髄神経根（馬尾）がある。

　脊髄の中心管のまわりには神経細胞に富み H 型をした「灰白質」があり、前角、側角、後角からなる。
　脊髄の「前角」には運動ニューロンがあり、前根から末梢神経が出ている。
　脊髄の「側角」には自律神経系（平滑筋、心筋、分泌腺）などの生命維持に必要な自律神経系のニューロンがある。
　脊髄の「後角」には知覚ニューロンがあり後根から末梢神経からのインパルスを脳に伝える。
　灰白質の周囲にある「白質」は主として有髄神経維であり、前索、側索、後索からなる。白質には上行性伝導路、下行性伝導路が走っている。



脊髄の断面図



・ 『再生医療－その可能性』より （じほう、2003 年 4 月刊.pp.179-183）

岡野栄之＜慶大教授・生理学＞　脊髄損傷の研究に関してわれわれは出来るだけ早くフェーズⅠ［第１相治験］に突入出来るよう頑張りたいと思いますが、その場合、幹細胞を用いたセルテラピー［細胞療法］に関するコンセンサスを、厚生労働省あるいは国レベルできちんとつくらなければいけない。そこが一番のネックになっているところです。

それから大量培養形態です。意外と思ったより難しく、スモールスケールでは確かに神経幹細胞をエクスパンド［増殖］出来ますが、企業ペースで何万人の方にディストリビュート〔分配〕するために生産するにはどういうシステムをつくるか、単にシャーレの数を増やせばよいという問題だけでなく、高品質で安定に供給するためにはどうするかが、トランスレーションリサーチ［基礎から臨床への橋渡しする研究］の一番重要なターゲットになると考えております。

脊髄損傷の一番の問題点は、移植するためのテラピューティックタイムウインドー［治療の最適な時期］が短いことがわかってきたことで、脊髄損傷の多くの方々に対して、どうやって対応していくか考えています。テラピューティックタイムウインドーを広げるためには、やはり動物実験を必要としますので、基礎研究を含め、実用まで何年も必要かと思います。意外にアメリカでの脊髄損傷の研究はあまりアグレッシブ〔意欲的〕でもないですし、比較的狭い世界でやっているといえます。海外のグループの多くは、アクソン［軸索］の伸展のほうにむしろ力を注いでいて、セルテラピー的なところの競争は、まだきつくはなく、われわれもあせって論文を出すことなく、じっくりと仕事に取り組むことが出来ます。

また神経系の場合に大事なのは、構成する細胞が多様性に富んでいるということです。特定の種類の細胞がやられるような変性疾患とかがいろいろあります。そのため疾患ごとに、セルテラピーのセルソース［細胞試料］も違ってきます。ある疾患では ES 細胞〔胚性幹細胞〕が適切であったり、損傷では組織幹細胞である神経幹細胞が適切であったりします。その場合に神経発生を考えてみると、ニューロン［神経細胞］の産生が起き、その後しかるべき場所に移動し定着する。それをヒストジェネシス［組織産生］と呼びますが、その後さらに神経回路網形成という組織構築上、一番際立って複雑な現象が起きていきます。ステムセルバイオロジー［幹細胞生物学］で何とか出来るのは最初のステップであるサイトジェネシス［細胞生成］のところで、あと２、３年で色々な細胞を ES 細胞から誘導させることが出来ます。その後、その細胞をいかにヒストジェネシスさせるか、ネットワークフォーメーション［情報網の形成］させるとかは膨大な仕事で、まだ 10 年や 20 年はかかると思います。

神経疾患とは疾患の病態によって相当ゴールが近いものから遠いものまであり、脊髄損傷やパーキンソン病はだいぶ見えてきたと思います。パーキンソン病に関しては ES 細胞から誘導する方法が出来てきましたし、あとはマウスのストロマセル［細胞基質］ではなくヒトのストロマセルかあるいは完全にディファイン［定義］された化合物を使って、ヒューマン［ヒト］の ES 細胞をドーパミンニューロンに誘導する。その後、誘導されたドーパミンニューロンを純化する。これらは比較的個々の技術の集結で何年か以内にいくのではないかと思います。

まとめますと複雑な組織構築や投射性ニューロンのシナプス［神経細胞相互の接合部位］形成を再現させるというところはまだまだまだ難しい。しかしながらシナプス形成について局所ですむ。すなわち局所なネットワークを形成するニューロンが破綻したことによる疾患に関しては、比較的ゴールが近く２、３年の勝負だと思います。

西川伸一＜理化学研究所＞　もともとのプロセスがあって、そこの一部が欠けたときに、細胞だけ入れてやれば後は個体のほうで何とかしてくれる可能性はないですか。

岡野　それは十分あるのです。決して組織レベルでは復元はしないですが、体が動くとか、全く不規則にでたらめにシナプスを作っているようだけど全体としての行動として回復しているようなことがあります。結構、体任せのところがあり、まだわれわれはサイエンティフィックに理解していないのです。

須田年生＜慶大教授・発生分化生物学＞　岡野先生がおっしゃられた、神経回路形成あるいは組織形成機構を知る方向に今の研究が進めばいいですが、あまり再生医学、再生医療のみクローズアップされフォーカスされると、技術的なことにここ２、３年はブームのように走ってしまう可能性があると思います。

岡野　そういう意味ではベーシックな神経発生の研究は何年もやっています。

須田　それを大事にしないといけないと思う。すぐ再生出来ますか、病気につながりますかという視点だけで動いてしまうのではないかと気にしています。

西川　ただ私はそんなに心配はしていません。そういう発想を今まで基礎の案件に持ってこなかったのは事実で、逆にそういう発想が持ち込まれると、今まで考えてなかったことを考えることで新しいものが生まれる方向にいくのではないかと思います。はっきりゴールが示されたときに、基礎の人たちが今まで自分がやってこなかったことを選択しなくてはいけないと気づくのではと思います。中でも重要な課題はデザイン問題で、生命のデザインというものを生物学では一切扱ってこなかった。

岡野　確かに神経発生研究のトップランナーたちは、デザインをして再生医学の進展を意識し出しています。バッタの神経回路がどのように出来ているかを研究し、かなりいいところまで行っていた人が大学を休業しバイオベンチャーをつくってしまった。バッタの基礎研究をしている人がそういうことを意識し出したことが、再生医学の明るい背景にあると思います。

〔〕内は事務局の補注　■

■「最新医学」2002 年 7 月号　特集：神経疾患と再生医療

中枢神経系再生への戦略

序文にかえて

慶應義塾大学医学部　生理学教室　教授
岡野栄之

かつて 20 世紀初頭に、神経科学の巨星であるラモニ・カハール博士が、「いったん発達が終れば、成長と再生の泉は枯れてしまって元に戻らない」と述べたように、成体哺乳類の中枢神経系は「再生」しないものと考えられていた。本稿で言う「再生」とは、神経軸索のみならず神経細胞そのものの再生を意味するものである。

では、なぜ成体哺乳類の中枢神経系の再生能力が低いと考えられていたのであろうか？

これは、神経細胞に分裂能がないことと、ミエリンなどに由来する軸索伸長阻害因子が存在するために、中枢神経系内は軸索再生に対して概して非許容的な環境になっているためと考えられる。

しかしながら、最近の神経生物学や幹細胞生物学の進展に伴って、この困難な状況が打破されつつある。ブレイクスルーを可能にすると考えられる次のような重要な研究成果が蓄積してきている。

① 神経細胞死のメカニズムの解明と、それに基づく神経保護の戦略の進歩

② ニューロトロフィン、HGF、GDNF などの重要な神経栄養因子の同定と、それに基づく神経保護の戦略の進歩

③ 中枢神経系における幹細胞生物学の進展に伴う、失われた神経細胞の補充療法への可能性が高まってきたこと

④ 胚性幹細胞（ES 細胞）の神経分化を利用した細胞補充療法への可能性が高まってきたこと

⑤ 非神経系組織由来前駆細胞の分化転換（神経分化）を用いた、自己細胞を用いた再生医学の可能性が見えてきたこと

⑥ Nogo、セマフォリン、MAG などの中枢ミエリン由来の軸索伸長阻害因子の分子的実体とそのシグナル機構が明らかになってきたことと、それに伴うドラッグデザインが可能になってきたこと

⑦ 組織工学、医工学の進展に伴う、軸索再生促進のための足場の開発

⑧ 遺伝子治療用ベクターの改良により、生理活性物質の遺伝子導入という形での中枢神経系へのドラッグデリバリーシステム（DDS）が飛躍的に進展したこと

本特集では、上記の戦略をなるべくカバーするべく、それぞれのスペシャリストの先生方に執筆をお願いしている。今後、より有効な神経再生の治療戦略を産み出していくためには、上記①～⑧の方法を組み合わせていく必要があるであろう。

先日（2002 年 3 月）、私は米国マサチューセッツ州ケンブリッジ市で行われた「神経移植、遺伝子療法、前駆細胞生物学の展望」に関する第 3 回会議へ招待されたが、ここでは、これまで臨床試験で有効性が確認できなかった因子であっても、幾つかの方法を巧みに組み合わせることにより、明らかな効果が新たに確認できたケースが報告されていた。

例えば GDNF〔グリア細胞由来神経栄養因子〕という分子は、生体外でドーパミンニューロンや運動ニューロンへの保護作用が認められるものの、髄腔内への遺伝子組換え型タンパク質の注入によるこれまでのパーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）を対象とした臨床試験は効果も少なく、重篤な副作用のため試験は中止されていた。しかしながらこれは、GDNF という分子を用いた治療が同疾患に対して無効であるということを意味しない。

このような病巣部位への選択性の低い非特異的な投与方法により、遺伝子組換え型タンパク質が拡散し、病巣部で治療効果のある有効濃度に達していなかったことと、髄液を介して脳の他の部位へ非特異的に作用し、予想外の副作用を来したものと考えられる。

一方、組換えレンチウイルスやアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた GDNF 遺伝子のパーキンソン病モデルサル（MPTP‐モデルサル）の病巣部（被殻）への直接注入が明らかな有効性が示されているとともに、英国では５人のパーキンソン病の患者に対して小型ポンプを用いて、GDNF の遺伝子組換え型タンパク質の大脳基底核の被殻への直接的かつ持続的注入による第Ｉ相臨床試験が 2001 年 1 月から行われており、これまでの結果では、安全性が確認でき治療効果も期待できるとのことである。

この方法をさらに改良するために、ウイスコンシン大学の C・スベンセンらは、培養したヒト神経幹細胞（ニューロスフェア）に GDNF 遺伝子を組換えレンチウイルスベクターを用いて導入し、安定導入細胞株をパーキンソン病患者の被殻へ移動することを計画中であるという。

いずれにせよ、被殻において GDNF の局所濃度が高まることにより周囲へ濃度勾配を作り、それに応答して中脳黒質に細胞体を置くドーパミン作動性 A9 神経細胞の軸索再生や神経保護作用が期待できそうである。しなしながら、GDNF を用いた治療は軸索再生や神経保護作用が目的であり、失われた細胞を補うという細胞補充療法ではない。幹細胞生物学を駆使した細胞補充療法との新たな組み合わせにより、より有効な治療法が開発されていくであろう。

今後、人類の英知を駆使し、カハールの金言も「成体哺乳類中枢神経系も、適切な操作を行うことにより、再生させることができる」と書き換えたいものである。

■「最新医学」2002 年 7 月号　特集：神経疾患と再生医療

アプローチ　中枢神経再生への挑戦

慶応大学医学部
岡田洋平　岡野栄之

要　　旨
損傷された中枢神経を再生するためには、神経幹細胞などの細胞移植や内在性神経幹細胞の活性化により失われた神経組織を補うことに加え、ニューロンを損傷から保護し軸索の伸長と神経回路の再生を促すための環境を整える必要がある。再生医療を神経疾患に応用していくためには、対象となる疾患の病態や神経再生のメカニズムを解明していくとともに、これまでの手法を組み合わせた新たな戦略を展開していくことが重要であろう。

はじめに

従来、中枢神経系は再生能力が低く、いったん損傷すると再生は困難であるとされてきた。しかし、最近の中枢神経の幹細胞生物学や、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた神経再生、また神経栄養因子、成長因子の同定と機能解析の進展により、神経疾患に対する再生医学の応用が期待されるようになってきた。

中枢神経系の再生医学の戦略としては、大きく分けて以下の 2 つが考えられる。
1 つは、神経幹細胞や特定の機能を持った神経細胞を移植したり、内在性の神経細胞を活性化したりすることで失われた神経の機能を補う方法。

もう 1 つは、種々の神経栄養因子や成長因子を用いることで損傷されたニューロンを細胞死から保護し、さらには軸索の伸長と神経回路の再構築を促す方法である。
これらの方法を組み合わせることで、いったん損傷された神経組織を再生し、機能を回復させることができれば、従来難治性とされてきた神経疾患の治療に新たな可能性が開けてくるかもしれない。本稿では、中枢神経系における再生医学の現状と今後の展望について紹介していきたい。

神経幹細胞の同定

近年、成体の脳にも神経幹細胞が存在し、ニューロンの新生が起こっていることが明らかとなり、中枢神経系の再生医学が一気に注目を浴びるようになった。神経幹細胞は中枢神経を構成するニューロンやグリア（オリゴデンドロサイト、アストロサイト）を生み出す多分化能を持ち、かつ増殖し継代を繰り返すことができる自己複製能を持つ未分化な細胞である。

神経幹細胞のマーカー（ネスチン、ムサシ‐1）の発見と、1992 年にレイノルズらにより開発されたニューロスフェア法という、選択的培養法により、この分野の研究は飛躍的に進歩した。中枢神経から分離してきた細胞を、インスリン、トランスフェリン、セレニウム、プロゲステロンを含む無血清培地で、細胞分裂促進因子である FGF2 や EGF の存在下で培養すると、未分化な神経系細胞の集まりである球形の細胞塊（ニューロスフェア）を形成する。この細胞塊を単一細胞に分散し同様に培養すると、再度ニューロスフェアを形成する。また、EGF や FGF2 を培地中から除いて接着させて培養すると、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 系統の細胞を作り出すことができる。

このニューロスフェア法は神経幹細胞を未分化な状態で増殖させることができ、さらに回顧的にではあるがニューロスフェア導入細胞（NS‐IC）として神経幹細胞を同定することができる。一方で、神経幹細胞を生きたままの状態で予期的に同定することも試みられてきた。

我々の研究室では、未分化な細胞のマーカーであるネスチンのエンハンサー制御下に、変異型緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現するトランスジェニック〔遺伝子改変〕マウスを作製し（ネスチン‐EGFP），EGFP を発現する細胞を FACS を用いて回収し、神経幹細胞を濃縮することに成功した。

さらに、コーネル大学のゴールドマン教授との共同で、ヒト成人海馬の細胞にネスチン‐EGFP を遺伝子導入したり、あるいはネスチン‐EGFP と、ムサシ‐1 プロモーター制御下に EGFP を発現する遺伝子をアデノウイルス〔ＤＮＡ腫瘍ウイルスの１つ〕を用いてヒト胎児脳由来の細胞に導入したりして、FACS〔蛍光自動細胞分離分析装置〕を用いてヒトの神経幹細胞を分離・同定している。

またリエツらは 12 ギマイクロ以上の細胞径で PNA^{low},$CD24^{low}$ の細胞を集めることで、内田らはヒト胎児の中枢神経の細胞を $CD133^{+}$,$CD34^{-}$,$CD45^{-}$を指標として、ニューロスフェア形成能を持つ細胞を分離した。このような予期的な神経幹細胞の同定は、神経幹細胞研究のみならず、神経幹細胞移植を臨床応用するためにも重要な手法となってくる。

神経幹細胞の可塑性

神経幹細胞やそれに由来する神経細胞を細胞移植に応用していくうえで、神経幹細胞の持つ可塑性について触れておく必要がある。

哺乳類中枢神経系における神経幹細胞は、マウスでは胎生 8 日目の神経板に始まり、成体に至るまで分裂を繰り返しながら主に脳室壁周辺に存在し、発生の初期にはニューロンを、後にグリアを産生するようになると言われている。

この間、発生の比較的早い時期にさまざまな因子が作用することで、体の前後軸、背腹軸に沿った領域特異性を獲得し、さらには時間的な制約も受けて、時間軸に沿って性質の異なるニューロンを生み出すことが知られている。

例えば、マウス胎児中枢神経の異なった場所から得られた神経幹細胞は、それぞれの部位特異的なマーカーを発現している。また、成体の神経幹細胞は、海馬歯状回と脳室下層においてニューロンの新生を行っているが、発生のごく初期段階に生み出される中脳腹側のドーパミンニューロンや、脊髄の運動ニューロンのような投射ニューロンを生み出すことはできないと言われている。

一方で、神経幹細胞がある一定の可塑性を持つことも示されてきた。例えば、成体ラットの脊髄中心管周囲には、生体外で多分化能を示す未分化な神経系前駆細胞が存在するが、この細胞は生体内では脊髄のグリアのみを産生し、決してニューロンを生み出さないにもかかわらず、成体海馬に移植するとニューロンを生み出す。また、成体海馬由来の神経幹細胞は脳室下層に移植すると嗅球のニューロンを生み出すと言われる。

このように、神経幹細胞はある一定の可塑性を持つ一方で、時間的・空間的に制約を受けているため、必ずしもすべての種類の神経幹細胞に分化できるわけではなく、細胞移植のドナーとしてどの疾患にでも適用できるわけではない。

神経幹細胞の臨床への応用

さて、それではどのようにしてこの神経幹細胞を臨床に応用していくのであろうか。

神経幹細胞は新たなニューロンやグリアを生み出す能力を持つ細胞であり、神経組織が非特異的に損傷される脊髄損傷や、脳梗塞などの疾患に対する移植細胞としても期待される。さらに、特定の機能を持つニューロンに分化することを運命づけられた神経前駆細胞や分化したニューロンそのものを移植することで、特定のニューロンが障害されるパーキンソン病などの疾患への適用も期待される（表 1)。

■表 1　細胞移植の対象疾患

疾患	障害される細胞	候補となる移植細胞	障害部位、移植部位
パーキンソン病	ドーパミンニューロン	ドーパミンニューロン	線条体、中脳黒質
ハンチントン病	GABA ニューロン	GABA ニューロン、胎児線条体	尾状核、被殻、大脳皮質
筋萎縮性側索硬化症	運動ニューロン	運動ニューロン（？）	脊髄前角
脊髄損傷	ニューロン、グリア	神経幹細胞	損傷部位
脳梗塞	ニューロン、グリア	神経幹細胞	損傷部位

GABA:ガンマアミノ酪酸

我々の研究室では、脊髄損傷モデルラットに胎仔脊髄由来のニューロスフェアを移植し、生着・分化させることに成功している。またネスチン‐EGFP や TH‐EGFP といったレポーターを用いることで、胎仔中脳腹側からネスチン陽性の未分化な細胞や TH 陽性のドーパミンニューロンを分離し、6‐ヒドロキシドーパミン（6‐OHDA）処理したパーキンソン病モデルラットの線条体に移植する実験を行い、これらの細胞が生着・分化し、機能的な改善も得られることを報告した。

実際に臨床に応用していくためには、これらの手法がサルなどの霊長類でも有効であることを確認するような前臨床的な研究も必要となってくる。

胚性幹細胞（ES 細胞）の利用

胎児または成体由来の神経幹細胞がある程度の可塑性を持ちながらも時間的・空間的制約を受けているのに対して、ES 細胞は体を形成する 3 胚葉のすべての細胞に分化することができる細胞であり、成体または胎児由来の神経幹細胞からは得られることのできない種類の移植細胞のドナー細胞として期待されている。

さらに、胎児や成体由来の細胞は移植に十分な細胞数を得るのが困難であるのに対し、無限に増殖できるというメリットがある。ES 細胞は、未分化状態を維持するために必要なフィーダー細胞や白血病抑制因子を取り除き、分化誘導因子を加えたり、他の種類の細胞とともに培養したりすることで、神経系を含むさまざまな種類の細胞へ分化誘導することができる。

マウス ES 細胞を用いた今までの研究で、ES 細胞由来の神経系細胞を利用した移植例が幾つか報告されている。

例えば、ミエリン欠損（髄鞘形成不全）ラットの脊髄に、マウス ES 細胞由来のグリア前駆細胞を移植したところ、ミエリン特異的マーカー・プロテオリピドタンパク質に対する抗体で染色された。同様に、レチノイン酸を作用させて誘導された神経系前駆細胞を脊髄損傷ラットに移植すると、ニューロンやグリアへ分化して生着し、運動機能の改善も見られた。また、PA6 と呼ばれるストローマ細胞とともに培養して分化誘導したドーパミンニューロンを、6‐OHDA で処理したパーキンソン病モデル動物の線条体に移植したところ、ES 細胞由来のドーパミンニューロンが生着したことも報告されている。

1998 年にはトムソンらによりヒト ES 細胞が樹立され、さらに 2001 年には、ヒト ES 細胞から誘導した神経系前駆細胞を新生マウスの脳に移植し、ニューロンやグリアに分化して生着しているという報告がなされた。

このように、ES 細胞由来のニューロンや神経系前駆細胞は、細胞治療のドナー細胞として大いに期待されるが、未分化な細胞を移植することで奇形腫を形成する危険や免疫学的拒絶反応などの問題点も多い。この問題に対しては、より特定の機能細胞へ分化した細胞を移植することや、核移植などの治療クローニングの技術を用いて患者自身の ES 細胞を作ることで解決しようという試みがなされている。

またヒト ES 細胞を用いる場合は、ヒト胚を用いるという倫理的問題も大きい。
このため、別のアプローチとして、神経系以外の組織に由来する細胞を分化転換あるいは脱分化させて利用する方法も試みられている。最近の研究では、骨髄間質の間葉系幹細胞や皮膚由来の前駆細胞（SKPs）などから神経系の細胞を分化誘導したことが報告されており、細胞移植のドナーとして重要な可能性を秘めている。

内在性幹細胞の活用

細胞移植以外に、損傷された神経組織を修復する手段として内在性幹細胞を利用することができる。先に述べたように、成体の脳では脳室下層や海馬歯状回でニューロンの新生が行われているうえに、脊髄中心管周囲の神経前駆細胞のように、生体内ではニューロンを生み出さないものの、生体外ではニューロンを新生することができる幹細胞としてのポテンシャルを持つ細胞が存在する。

このような内在性の幹細胞の分化と増殖の制御を行うことで、治療へと応用することも考えられている。例えば、生体外で細胞増殖活性を持つ EGF や FGF2 を脳室内に投与することで幹細胞の増殖が促されることや、神経栄養因子の BDNF を脳室内に投与したりアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで、ブロモデオキシウリジン（BrdU）で標識される新生ニューロンの産生が促されたことも報告されている。

神経栄養因子と成長因子

中枢神経系の再生医療におけるもう 1 つの試みとして、神経栄養因子や成長因子を用いてニューロンを変性から保護したり、神経伝達物質やその合成酵素の遺伝子を導入することで症状を改善しようということがなされている。そのような治療の対象として、最も研究が進んでいるのがパーキンソン病である。

1993 年に同定されて以来、GDNF は生体内・外で黒質のドーパミンニューロンに対して強い神経保護作用を持つことが知られてきた。このため、黒質のドーパミンニューロンが障害されるパーキンソン病に対する治療効果が期待されてきた。

最初の試みは、65 歳の男性の脳室内に遺伝子組換え型の GDNF を投与するというものであったが、残念ながら副作用のみが見られ、パーキンソン症状の改善は得られなかった。障害されている黒質‐線条体に十分な量の GDNF が到達できなかったことが原因と考えられた。

さらに、GDNF の受容体は生体内に広く存在することから、副作用を避けるためにも局所に十分量の GDNF を投与するためのデリバリーシステムが必要と考えられた。

2000 年、コルドワーらは、MPTP を投与したサルのパーキンソン病モデルの線条体と黒質に、レンチウイスルベクターを用いて GDNF を導入した。この実験では、GDNF を導入したサルでは運動機能障害が回復し、さらに MTPT 処理した 3 カ月後にフルオロドーパによる PET（ポジトロン断層撮影 ）を用いて解析すると、ドーパミンニューロンの線条体への投射が保たれていることが確認された。

このような中枢神経への遺伝子導入の手法として、レンチウイルスのほかにアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いたベクターが開発されているが、特にレンチウイルスや AAV は非分裂細胞にも遺伝子導入することが可能で、長期的な遺伝子発現が可能であり、病原性もないことから、中枢神経系への遺伝子導入に最も適していると期待されている。

ラットのモデルを用いた実験では、AAV やレンチウイルスベクターを用いて導入した GDNF は 6 か月間以上安定に発現し、神経保護作用を示したと言われている。またパーキンソン病の患者では、ドーパミン産生に必要な TH（チロシンヒドラキラーゼ）、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）あるいは GTP シクロヒドラーゼ I（GCH）などの酵素活性が低下しているが、これらの遺伝子を AAV ベクターに組み込んで線条体に導入することでドーパミン産生を促し、モデルラットの運動機能が改善されたことも報告されている。

さらに、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の細胞株で L‐ドーパやドーパミンを産生することが知られている。PC12 細胞や、GDNF 遺伝子を導入した GDNF 産生細胞株をカプセルの中に封入して、モデル動物の線条体に移植することも試みられており、一定の成果を上げている。

パーキンソン病以外でも、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）といった神経変性疾患に対しても、このようなニューロンを保護するための治療が試みられている。

ALS では、障害される運動ニューロンに対して神経保護作用を示すと言われている CNTF、BDNF, GDNF などによる臨床試験も行われてきたが、十分な成果を上げているとは言いがたい。しかし、これらの臨床試験も髄腔内投与などの全身的投与が中心であり、パーキンソン病の場合にそうであったように、デリバリーシステムを工夫することで効果が得られることも十分に期待できる。

さらに、肝細胞増殖因子として同定された HGF は、運動ニューロンに対して強力な保護作用を示すことがわかってきており、ALS 治療に応用できる可能性が示唆されている。

このような新たな神経栄養因子の同定や解析の進展、より優れたデリバリーシステムの開発により、さらに有効な神経保護効果が得られることが期待される。

許容的な環境と非許容的な環境

成体の脳や脊髄が損傷されたとき、損傷した軸索を再生したり、別の軸索が代償的に伸長する能力は極めて限られている。

その 1 つの理由は、損傷組織周囲にグリア新生が起こって瘢痕を形成するためである。このとき, コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG)、テネイシン、セマフォリン 3A などの活性が上昇し、軸索の進展を阻害する。　もう 1 つの理由は、軸索を取り巻くミエリン（オリゴデンドロサイト）からさまざまな軸索伸長阻害因子が産生されるためであり、これらの要因は神経再生にとって非許容的な環境を作り出している。

シュワブらのグループは、軸索伸長を強く抑制するミエリンタンパク質（後に Nogo‐A として同定された）に対するモノクローナル抗体（IN‐1）を作製して脊髄損傷ラットに投与したところ、軸索の伸長が促進され、さらに機能的にも改善することを示した。さらに、このミエリン由来の軸索伸長阻害因子に対する IN‐1 抗体やミエリンによるワクチン接種により、許容的な環境が生み出されることも示した。　このようなミエリン由来の軸索伸長阻害因子には、ほかにもミエリン関連性糖タンパク質（MAG）などが知られており、これらをコントロールして損傷神経組織を許容的な環境にすることが、先に述べた細胞移植や遺伝子治療の効果を得るために必要不可欠であろう。

おわりに

1987 年、中絶胎児の中脳組織をパーキンソン病患者の線条体に移植する治療が行われて以来、パーキンソン病に対する細胞移植が一定の効果をもたらすことが分かってきた。
パーキンソン病での細胞移植は、移植した細胞が単に脳内で生着してドーパミンを産生するのみでなく、ホストの線条体と機能的なネットワークを形成していることが重要であると考えられている。

このように、神経疾患に対する再生治療は、単に機能細胞を移植するのみでなく、移植した細胞とホストの中枢神経との間に機能的な回路を形成させることが重要である。運動ニューロンが変性する ALS のように、投射ニューロンが広範に障害される神経変性疾患を対象とする場合は特に、いかに機能的な回路を再建するかが重要な課題である。

いったん損傷された神経回路の効果的な再生のためには、神経疾患の病態や神経再生のメカニズムをさらに詳細に解明し、さらに、今まで述べてきた 1 つ 1 つの手法を単独ではなく、数々の手法を組み合わせた、例えば神経幹細胞の移植に GDNF などの神経栄養因子の導入を併用したり、細胞移植と同時に神経の再生にとって許容的な環境を作り出すために軸索伸長阻害因子の活性を抑えたりするといった、新たな戦略（図 1）が必要となってくるであろう。

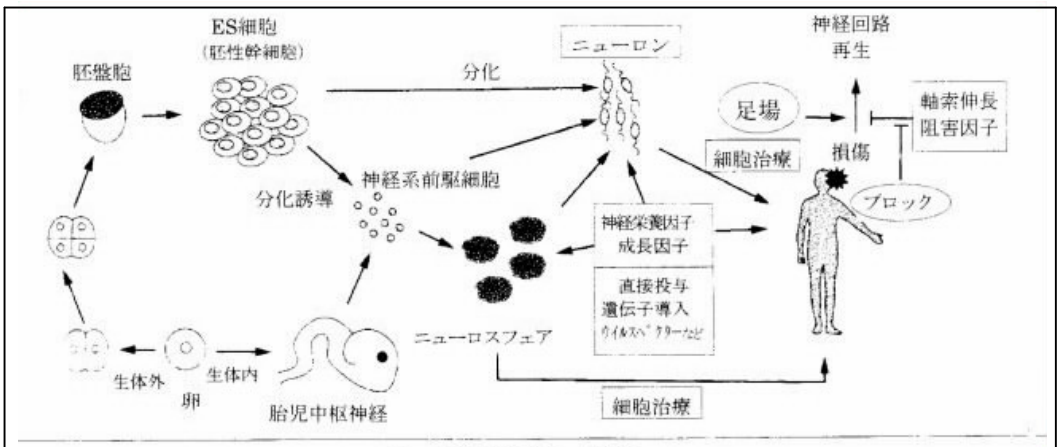


図1　神経再生医療への戦略

■　マイアミプロジェルト・ホームページ 2003 より

治癒のための５段階　＜要旨＞

ダルトン・デートリヒ（マイアミ・プロジェクト　科学ディレクター）

はじめに

「まひ治療のためのマイアミ・プロジェクト」のサイエンス・ディレクターとして、私は脊髄損傷による機能修復をいつの日か可能にするというこの科学的コミュニティの前例のない楽観主義に強い感銘を受け続けている。中枢神経系は修復できないという古いドグマは今日、正しくないことが証明された。世界中の多くの治験医は、複製できない脊髄神経組織を許容的にコンバートする新たな方法を提示している。

実にエキサイティングな事実は、再生を可能にするには複合的な方法があり、成人の中枢神経系に誘導することができ、それどころかいつの日か慢性脊髄損傷者の神経再生というゴールを達成することが出来るであろうことを示している。とは言っても、ただ１つの発見が直ちに脊髄損傷の治癒をもたらすものではないことが、私にとってはますます明白になってきている。ある１つの研究が魔法のような解決法をもたらさないであろうという概念は、神経再生の成功や脊髄損傷の治癒をもたらすものが物質的なもの（materialize）ではないということである。逆に言えば、小さなステップを重ねていくことが我々に治癒の切り札をもたらすのであり、そのことは多分、脊髄損傷の治癒という我々のゴールに出合うであろうことを意味している。

このことは「まひ治癒のためのマイアミ・プロジェクト」がまさしく専門的であり重要なプログラムであるということである。プロジェクトでは、広範な研究者、臨床医、セラピストが脊髄損傷の課題に共に兆戦している。電気生理学、移植、外科処置、再生医学、分子生物学の各分野の専門家が、治療を成功させる上での多くの難題を解くために必要とされている。研究の開始以来、マイアミ・プロジェクトの目標は脊髄損傷に対する我々の基本的理解を深め、その過程は再生をもたらすために必要なものであった。研究者がヒト脊髄損傷と動物モデルについて研究することによって、我々は研究室での移植の成果を臨床応用にすぐに生かせるよう努力している。

ゴールに達するための我々の研究方法は、組織の損傷について、またヒトの受傷後の回復の自然経過のよりよい評価技術を同時に開発することである。類似した損傷を研究し、臨床的に関連した動物モデルの治療戦略を革新し、移植用のヒト細胞を成長させて同定し、さらに動物実験の結果をヒトの損傷研究に応用していく。これは新たな治療法の有益な結果を、厳密で客観的に評価することによってのみ達成される。

現在までの成果は；

＊　ヒトの受傷後の脊髄に関する画期的な病理学研究
＊　新たな手術中のモニタリング技術および神経保護戦略の開発
＊　歩行動作の協応、及び受傷後の新たな回復途上の反射の同定を確実にする脊髄回路についての鋭い生理学的研究であり、それは成人の脊髄は機能的再結合できることを意味している。
＊　分離法、および増殖した大量の成人シュワン細胞（成長支持細胞）の有効な開発が、ヒト中枢神経系組織由来の神経線維の再生をもたらすこと。
挑戦的な新たな研究によって、移植細胞の多様な結合と、（神経）成長因子が前例のない脊髄神経の再生を引き出すことを示している。

第１段階：患者の選定および事前訓練

脊髄損傷の小グループの人々が移植試験を提案する最も適した対象となるだろうことを論議し決定していくことは重要である。脊髄損傷はきわめて異質の神経学的疾患であり、特定の損傷は治療戦略を確かに、より適切にすることは明白である。例えば、最初に治療されるべきは不全まひ者か完全まひ者かの論議が現在ある。

損傷していないが非機能的な脳脊髄の白質領域の存在は、リハビリプログラムと関連付けられた薬理学的戦略が一定の機能回復をもたらすのに最も有効であろうことを示唆している。しかしながら完全障害の患者においては、細胞移植か傷害した神経部位を超えて神経線維の成長を誘引するブリッジ（橋渡し）技術を含む戦略とは別の外科的介入を必要とするだろう。

他の論点は、頚部か胸部の障害において、介入の第一目標はどちらにすべきかに関するものである。頚部障害をターゲットにすることには明白な理論的根拠がある。損傷部位の短い距離を超えて再生することから、四肢まひ者の主要筋群のコントロールを修復することや、呼吸や腕の運動機能を修復することが出来る。

しかしながら我々が考慮しなければならないことは、移植戦略は侵襲的であり、手術中や術後に合併症を引き起こすことがあり、健康や個人の QOL レベルを低下させることである。

このため外科的手法の対象者としては、胸部あるいは頚髄の下位レベルにおいては安全性に基づいた判断をしなければならないだろう。生命維持のキーとなるシステムが手術部位の近くに存在すること、呼吸のような決定的機能を手術により危機に瀕することはできないからである。マイアミ・プロジェクトの研究者や世界中のシンポジウムに集う者はつねにこの種の論点を共有している。これらの論点は現に論議され、それぞれのアプローチに対する賛否両論をへて明白な理解とコンセンサスへと導かれるであろうことを、我々は願っている。

もし我々が今後、慢性脊髄損傷者の完全な再生を実現できたら、個人は立ち上がり歩き出すための心臓血管や完全な骨格を持つ必要がないことは明白だろう。従って、我々が慢性患者への個別の訓練プログラムを促進し発展させることを、外科手術前に実施すべきことはきわめて重要である。これらは患者の能力を最大化することであり、侵襲的移植戦略後の感覚の回復ないし運動コントロールに寄与するだろう。マイアミ・プロジェクトのリハビリ研究所である「バントレ・センター」を訪問する多くの慢性損傷患者は、心臓血管や筋肉の状態を改善するさまざまな訓練戦略に積極的に関与し成果を得ることが出来る。

従って、我々のゴールのひとつは、明確な外科的介入をターゲットとした事前訓練戦略を確定することであり、特定の脊髄回路の再生をしやすくなるよう助長することにある。

第２段階：外科的介入および神経保護

どのように細胞やブリッジを効果的に慢性脊髄損傷者に埋め込むことが出来るかは、現在のところ具体的に明確ではない。目下の戦略は相対的に侵襲的な手法を含む再生を引き出すためのテストが行われ（第３段階以降）、髄節の外科的曝露および瘢痕組織の除去の可能性が要求されるだろう。

最低限、髄腔内への細胞注入あるいは成長促進因子の導入がおそらく必要だろう。これらは脊髄損傷の部位に限定されないが、しかしまた比較的損傷されていない神経組織の上位や下位の一部の損傷された部位を含むものである。開発された手法、あるいはマイアミ・プロジェクトの研究所での生理学的モニタリングや脊椎手術中の運動神経機能の評価、MRI による損傷した脊髄部位の解剖

学的研究の連関は、外科的操作の安全性を確保し、細胞の懸濁液（volumes of cell suspensions）の量――それは嚢胞で満たされるか脊髄挫傷領域にあることが必要だろう――の予測を助けることを目標としている。

胎児組織片を脊髄損傷者に入れる最近の臨床研究から情報を得ることは可能であり、これらの外科的介入妥当なプランを開発する助けとなるだろう。

マイアミ・プロジェクトで活発に検討されている領域は、神経保護戦略の開発であり、それは急性期に脊髄を保護するものである。この研究は一次損傷レベルを拡大させない戦略への信頼性に基づくもので、これは外傷や機能回復を招くことを増強させることによって厳密にみた神経学的欠損を一部に留めることになるだろう。

さまざまな研究所からの最近のデータは、神経保護戦略は現在のところ急性期の処置が再生を標的とした移植戦略にも有益な効果をもたらすことを示す。長年にわたる文献的に見た細胞移植の課題は、胎児神経細胞あるいは幹細胞が成人の神経組織に注入されたときにわずか数パーセントだけが生き残るにすぎないことである。神経保護物質と結合させた移植戦略が移植細胞の生着を導き、再生をさらに容易にすることになるかもしれない。

マイアミ・プロジェクトで特筆される１領域は、外傷後の炎症に関係した移植の成功の効果である。したがって、他の神経保護戦略に先立つ炎症抑制物質の使用や外科的介入との組み合わせは脊髄神経再生の分野であらたな重要な戦略となるであろう

第３段階：移植／再生

現在のところ２つの主要な戦略が、脊髄損傷の再生誘導のために世界中の研究所で行われている。それは、脊髄への成長誘導された細胞や作用物質の導入と、神経の成長を阻害するその他の要因に関するものである。

第一の方法は、障害部位の受容環境をブリッジング戦略により置き換えるもので、特に末梢神経を用いるものである。この戦略は 20 世紀末から論議されているものであるが、カナダや英国の研究所では 1980 年代早期より再生研究の革命の契機をなすものものとなった。

スウェーデンからの 1996 年の研究データは、脊髄損傷モデルとなったげっ歯類の再生の成功と機能回復とを示した。それは複合した移植戦略によるもので、神経栄養因子を複数の末梢神経にともに投与するものであった。残念ながら、公表されたこの研究の再生および回復レベルについては、他の研究機関の研究者が再現できるものではなかった。その結果、末梢神経によるブリッジが完全損傷された脊髄神経の間隙をブリッジし再現する最良のアプローチであるかどうかは、現在のところ明らかでない。

世界中の治験医と同様、マイアミ・プロジェクトは再生を導くことに関連するアプローチとしてヘルパー細胞を用いている。再生に導くためにシュワン細胞を用いることはマイアミ・プロジェクトがパイオニアとなった。これらは、末梢神経内の細胞の伸長と再髄鞘化（remyelination）を導くものである。人の自己移植に必要とされる細胞数を獲得する手法はすでに開発され、これらの細胞はヒト成人中枢神経細胞から効果的に神経突起の成長を導くことができることをわれわれの研究は示している。

再三示されたように移植研究は、脊髄損傷モデル動物において移植されたシュワン細胞は再生を導き出した。しかしながら、移植片の及ぶ限りを超えて軸索再生を可能にする増殖能力は限定され、最近のデータは、目標とする部位の中に　シュワン細胞とともに嗅神経鞘細胞（OEG）をともに使うことによって、標的エリアの中に移植片をはるかに超えて再生をもたらすことを示唆している。

ニューロトロフィック因子（神経成長因子）もまた再生を導き、最近の研究のにおいて興味深いことは、遺伝的操作されたシュワン細胞あるいは線維芽細胞は合成され特定の神経栄養因子（neurotrophin）を分泌し、より活性のある再生を導くように試みることを示している。
研究は継続中であるが、細胞の結合と神経成長因子は再生と機能修復をどのように可能なように導くかを決定している。これは極めてアクティブな研究であり、そして科学者たちは移植と神経成長因子の投与の結合がおそらく治癒のために必要とされるであろうことに同意するだろう。

第４段階：再生への課題

抑制因子の証明を含む近年の研究の重要な進展は、脊髄損傷における軸索再生の自然発生的あるいは移植-誘導に帰する。この再生の阻害は元来、構造的なバリア（グリア瘢痕）によるにも関わらず、より最近のデータは生化学的バリアが損傷部位の周囲に作られ、正常組織から損傷組織が分離されバリアを越えて増大することを予防することを示唆している。現在、抗体と酵素は大学の科学者によって開発され、バイオ企業はこれらの抑制分子の形成を標的にして、これらの分子が損傷環境を除去するときに力強い再生を引き起こすことを目的として研究が進められている。このように、抑制因子の除去と結合した形で成長促進因子（上記、第３段階）を加えることは、我々の目標である再生の実現において極めて重要なアプローチである。

第５段階：リハビリテーション

膨大な量の実験や臨床文献から、中枢神経損傷後の運動・感覚機能の改善のための回復戦略は明白である。臨床治験は現在、マイアミ・プロジェクトや他の研究施設で不全及び完全まひの脊髄損傷患者の運動機能の改善へ向けた新たな戦略を開発中である。

受傷後のいくつかの脊髄回路の自然な修復は、脊髄の「学習」する能力として示されている。同様に、反射やトレーニングによる脊髄の移動運動リズムの発生のような既存の神経パターンの強度として示されている。それは、感覚情報の入力量や、回復パターンにおける主要な役割の出現を含む損傷動物の外部環境に関する実験的な脳研究の文献から明白である。本当に有効な損傷脊髄の再生をもたらす上で、十分なリハビリテーションが新たな脊髄再生を導き修正するために必要とされることも明らかである。

実際に、目下マイアミ・プロジェクトでテストされている運動リハビリテーション訓練は、基準となるデータを得る助けとなることが期待される。それは、我々の将来の多くの移植や薬理学的戦略の効果を評価する極めて重要なデータである。５段階のプランの第一ステップとしてまとめられた事前訓練手続きは　直接、手術後のリハビリテーションとワンセットに実施するために、目下バンテル・センターでテストされている。

要約すれば、この５段階のプログラムは個別のステージとして記述される。それは、我々の究極的なゴールである脊髄損傷後の機能回復を促進する上で極めて重要である。繰り返して言えば、論議されてきた多くの技術と処置は、治癒へ向けての過程を加速するためのマイアミ・プロジェクトにおいて詳細に調べられ、同時に評価された。実施中のプログラムの主要な長所は、世界中の他の研究機関からの新奇な情報や新たな発見はこの５段階のプランに組み込むことを容易にできることであり、それゆえ有効な再生と治癒の方法を将来見出すことが出来るだろう。〔JSCF 事務局訳〕■

■「脊椎・脊髄ジャーナル」2003 年 2 月号　要約

脊髄再生・移植に関する基礎知識

★ 特集にあたって

岩崎喜信（北大・脳神経外科）

最近、国際学会などで「ここ 10 年間は ”decade of spine” ＜脊椎の 10 年＞である」とよく言われる。脳神経外科領域でも脊髄の重要性が強く認識されるようになった。

この分野での現在の最大の注目すべき研究は、脳、脊髄をターゲットにした中枢神経系の再生である事は間違いない。ここにきて中枢神経系の再生の可能性が一気に現実味を帯びてきた。

この特集で再確認できた事は、移植された幹細胞が生体内で確かに生着および分化する能力を有しており、〔末梢神経である〕シュワン細胞移植により神経軸索へと誘導することが可能である事である。

・・・

★ 中枢神経再生の最近の動向

黒田　敏ら（北大・脳神経外科）

＊　中枢神経系損傷への２つのアプローチ

①　損傷の進行を軽減するもの：効果を期待できるものはカルシウムチャンネルブロッカー＊[1]、フリーラジカルスカベンジャー＊[2]、ステロイド、免疫抑制剤が挙げられてきた。

＊１：細胞内外のカルシウム代謝の阻害剤
＊２：大食細胞の遊離基

損傷の軽減には治療の有効な臨界期〔ﾀｲﾑﾘﾐｯﾄ〕が明らかになり、救急体制や専門医制度の確立、早期診断、早期専門治療の必要性を強く示している。

②　慢性期の神経症状の再建：神経機能の回復過程が見えるようになり、その実態がこれまで以上に明らかにされるようになった（MRI・PET・赤外線分光法/NIRS）。最近では細胞移植による中枢神経再生・機能再建への機運が非常に高まっている。
＊中枢神経再生への２つのアプローチ

①　再生誘導療法：成体の脳・脊髄に多分化能力を持つ神経幹細胞、神経前駆細胞の存在が確認された。この神経幹細胞の潜在的自己再生能力を促進し神経機能を再建させる（セルフ・リペア）研究が注目されるようになった。
しかし脊髄では神経幹細胞がニューロンへ分化することは確認できず、脊髄の〔損傷部位〕の微小環境が神経幹細胞の分化誘導に大きな影響を及ぼしていると考えられている。

② 修復療法――外来細胞の移植：

１）既存の細胞を移植する；パーキンソン病で行なわれたが１件の移植に５，６体の胎児細胞を要するなど倫理的な問題がある。

２）未分化で増殖・分化可能な幹細胞を移植する；1992 年にウエィスらが培養法を確立（ニューロスフェア法）して現実化した。この方法で培養した幹細胞は自己複製能力と神経組織を構成するアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンへと分化する能力を持つだけでなく、さまざまな神経伝達物質を生み出し、レセプター（受容体）の発現やシナプス（神経の樹状突起）の形成が確認された。

しかし、移植細胞をどこから求めるか、移植細胞をどのようにコントロールして機能的な再生ができるかが課題としてある。

最近は、さまざまな細胞に分化する能力を持つ間葉系細胞*の１つの骨髄の間質細胞（BMSC）がドナー細胞として注目されている。

＊：胚的結合組織を形成する中胚葉性の細胞。組織間物質中に埋没して散在する。

脳梗塞、脳挫傷、脊髄損傷、パーキンソン病などの動物実験で、移植された骨髄間質細胞が中枢神経系細胞に分化していることが確認され、神経症状も改善されたという報告も出ている。コントロールや長期の安全性などが今後の課題。

＊　中枢神経再生の次の課題＝神経回路の再生

移植後に機能再建するには神経回路の再構築が必要だが、そのためには神経突起が伸びる事を抑制する因子の影響を除去することが必要である*。

＊: 神経突起伸張抑制因子はミエリン〔髄鞘〕やオリゴデンドロサイトに存在し、Nago や MAG〔ミエリン関連性糖たんぱく質〕と呼ばれる

この抑制因子の働きを無効にする研究が進められているが、そこで再生された神経回路は現在のところ正常な機能を果たす事ができない（異所性投射のため）。

しかし最近、損傷部の状態が良好に保たれれば、哺乳動物においても軸索の伸張が十分かつ正確に生じるという報告もある（井上・川口、1998）。すなわち、神経回路を正しく導く戦略が、神経再生・機能再建の実現にきわめて重要であることを示している。■

■「脊椎・脊髄ジャーナル」2003 年 2 月号　要約

★　脊髄損傷に対する再生医療

金子慎二郎、中村雅也、岩波明生、小川佑人
岡野栄之、戸山芳昭（慶応大学医学部）

１．脊髄損傷に対する神経幹細胞移植

脊髄損傷に対する胎児脊髄移植の有効性に注目してきたが、ドナー不足と倫理的問題のため、それに代わり大量培養が可能な神経幹細胞に着目し研究を行ってきた。

２．神経幹細胞の最適な移植時期

生体外で神経幹細胞の分化誘導に影響する種々の因子が損傷脊髄内でどう変化するかを明らかにすることは極めて重要である。そこで、損傷脊髄内で神経幹細胞の分化に影響する神経栄養因子の発現がどのように変化するかを検討した。
神経幹細胞の移植至適時期は受傷直後ではなく、損傷後あまり経過すると損傷部周囲にグリア瘢痕が形成され軸索の再生を阻害するため、損傷後７～14 日頃であろう。

３．脊髄損傷への移植の現状と課題

われわれはラットの脊髄損傷モデルへのラットの胎児由来の神経幹細胞を亜急性期（受傷後７~14 日頃）における移植の有効性を立証した。
この結果を人への臨床応用につなげるためには、霊長類を用いた実験系で立証することが重要である。移植の有効性を高めるためには、移植細胞の分化の方向性を誘導する神経栄養因子や移植細胞の足場（scaffold）の併用も検討している。
移植後の中枢神経において軸索の伸張を阻害する因子としては、

① 中枢神経軸索を取り巻くミエリン関連タンパク
② 損傷部に形成されるグリア瘢痕組織に由来するセマフォリン、コンドロイチン硫酸
に大別される。ブレグマン(1995)は阻害因子への抗体を併用し、損傷軸索の良好な再生と運動機能の回復を報告している。
またグリア瘢痕組織に存在する軸索伸展阻害因子を抑制する化合物が開発されれば、その意義は大きい。これらの中和剤の併用も検討している。
慢性期の脊髄損傷への治療の応用についてはさまざまな戦略を駆使した集学的治療が必要であり今後の課題である。

４．中枢神経系の再生医療における今後の課題

① 神経栄養因子および関連遺伝子導入により神経を保護する。
② 神経軸索の伸展を阻害する因子の機能を抑制し軸索を再生させる。
③ 患者自身に内在する神経幹細胞を活性化させる。
④ 神経幹細胞や胚性幹細胞（ES 細胞）由来の細胞を移植する。
⑤ 骨髄の間質細胞などの神経細胞ではないものを神経細胞に分化・転換させる。
マクドナルドら（1999）は ES 細胞から神経幹細胞を分化・誘導して損傷９日目のラットに移植し、2 週間後に移植細胞がニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトになることを確認した。しかし我々は、腫瘍化などの安全性の問題や倫理的問題を考慮すると、現時点では胎児由来幹細胞のほうがより臨床に近い移植材料と考えている。■

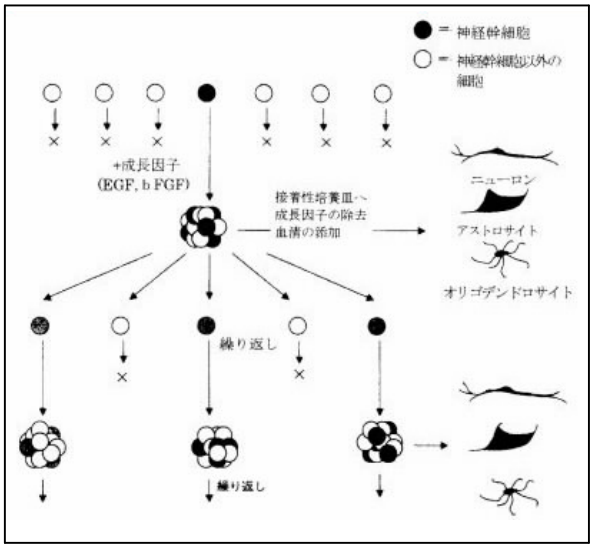


図１　ニューロスフェア法による神経幹細胞培養

固体から採取した神経幹細胞を含む細胞に対し、EGF またはｂFGF あるいはその両方の存在下で浮遊培養を行うと、自己複製能・多分化能を持つ神経幹細胞が選択的に増殖し、ニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成する。

この細胞塊を再度分離し培養を行うと、神経幹細胞は再びニューロスフェアを形成する。

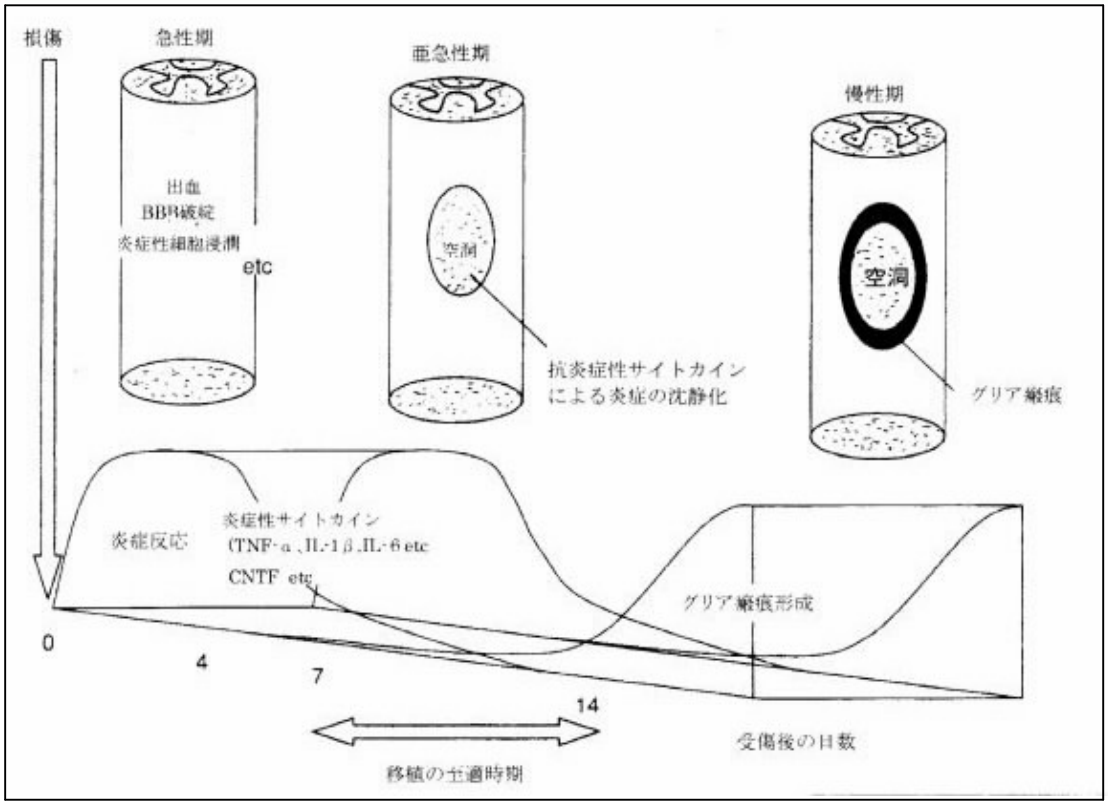


図２　損傷脊髄内微小環境の変化からみた神経幹細胞の至適移植時期
亜急性期の損傷脊髄内の微小環境が、移植細胞にとってより適した環境であると考えられる。

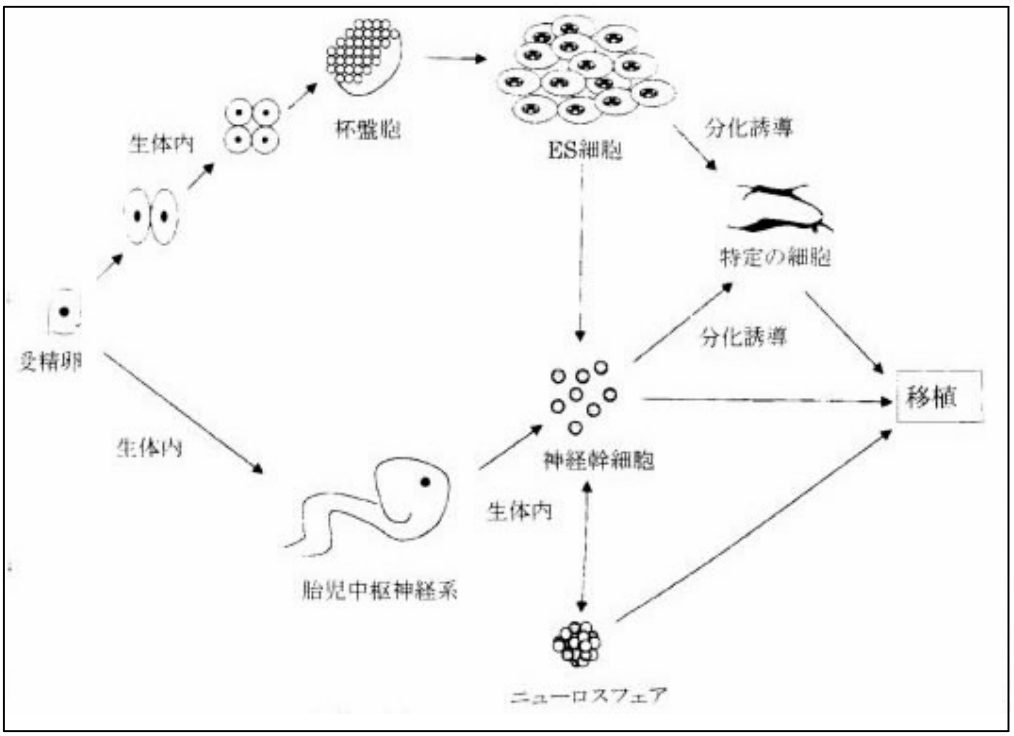


図３　中枢神経疾患への細胞移植におけるさまざまな戦略

増殖させた神経幹細胞をシングル・セルにばらして、またはニューロスフェアのままで、あるいは神経幹細胞や ES 細胞などから特定の細胞を分化誘導して移植を行うなど、さまざまな戦略が存在する。

■「脊椎・脊髄ジャーナル」2003 年 2 月号　要約

★　神経再生医療の基礎知識

佐々木祐典、本望　修、宝金清博
（札幌医大脳神経外科）

１．成熟脳由来神経幹細胞　　移植したヒト成熟脳由来の神経幹細胞は、ホスト（移植先）神経組織内でドナー細胞として以下のような優れた性質がある。

①生着率が高い、
②正常な脳組織内での遊走能力が高い、
③増殖・分化はホストからの制御を受ける、
④ホスト神経組織の状況が要求している方向へと分化誘導される、
⑤損傷部位（瘢痕形成部位）においても高い遊走能力を示す、
⑥ホストの神経再生を促進する、
⑦ホストの神経再生を促進する、
⑧損傷部位においてもホストの神経再生を促進する。

２．胎児由来神経幹細胞　　成人由来神経幹細胞がホストの微小環境に依存した増殖・分化を行うのに対して、胎児由来神経幹細胞は内因的（遺伝的）にプログラムされた時間経過で増殖・分化が進む傾向が強い。

胎児由来神経幹細胞を使う場合、倫理的・社会的受容の問題と、必要細胞量の確保の問題がある。現在でもある程度増殖技術が確立されているが、強力なサイトカインや長期間の培養が必要であり、神経再生能力を保持したままで生体外で安全に増殖するのは今後の課題と思われる。また、他人からの移植には常に免疫拒絶反応と感染症の危険性がある。

３．胚性幹細胞（ＥＳ細胞）　　受精後の初期胚の胚盤胞の内部細胞塊を試験管内で培養して得られる非常に未分化な細胞で、強い多分化能力と自己増殖能力を示す。このＥＳ細胞をドナーとして使用する場合の問題は

① 神経以外の組織にも容易に分化し、腫瘍を形成しやすい。
② ＥＳ細胞の可塑性の問題で長期間培養すると神　経系以外への分化が認められる。
③ 免疫拒絶反応を完全に抑制できない。また、ＥＳ細胞を作る際に細胞核の移植を行うが、この操作の過程で遺伝子に無視できない損傷が起こる事が報告されている。受精卵由来のＥＳ細胞研究では予測できない危険性を秘めている。
④ 倫理上解決しなければならない問題が多数存在する。日本では 2001 年９月の「ヒトＥＳ細胞指針」で、ＥＳ細胞の作成と基礎研究への利用が認められている。

４．骨髄細胞および臍帯血由来細胞　　骨髄の中にある細胞が血球系以外の細胞へ分化することが、近年報告され始めている。
これらをドナーとした移植の最大の利点は、中枢神経組織の損傷した局所への直接投与のほか、静脈内投与でも効果が期待できる事である。また、自己の細胞である事から、免疫拒絶反応、感染症、倫理的な問題が少ない。

＊　その他に、脂肪由来の細胞、毛根由来の細胞、鼻腔粘膜由来の細胞などのドナー候補細胞があるが、その可能性は明らかでない。

★ 神経再生研究の最新知見 グリア細胞移植による脊髄再生の現状と展望

高見俊宏・露口尚弘・原　充弘（大阪市大・脳神経外科）

＊　細胞移植による脊髄再生の試み

再生困難な理由：急性期に脊髄 2 次性カスケードが展開→損傷範囲の拡大→損傷部の自己修復として空洞が形成される。空洞の周囲に損傷に反応してアストロサイトが増殖しグリア瘢痕が形成される。これが再生の際に神経の軸索が伸張する大きな障害になる。

また、損傷局所に存在するオリゴデンドロサイト由来の中枢性ミエリン（髄鞘）関連因子も軸索が伸張する大きな障壁になる（図１）。

細胞移植による脊髄再生の試み：

① 損傷部位の神経細胞およびグリア細胞の補填を行い、機能的にシナプスをつなぐ事を目的とした神経細胞補填。

② 損傷神経の軸索を伸長を誘導するために、軸索伸長経路の構築を目的として神経軸索を誘導する。

細胞移植治療による神経軸索誘導は、シュワン細胞および嗅神経鞘細胞移植が代表的。

＊　損傷脊髄における神経軸索誘導

１．損傷脊髄へのシュワン細胞移植

シュワン細胞は成体の末梢神経から大量に純粋培養でき、神経の再生能力がある。シュワン細胞を移植すると中枢神経を髄鞘化することについては申し分ない効果を期待できる。しかし神経軸索を正しく誘導していく効果は限定的といわざるを得ない。

つまり、軸索成長は、主に脊髄内の神経回路に限定され、神経機能にとって重要な大脳皮質あるいは脳幹からの神経軸索に対しては限界が示唆された。さらに、切断された中枢神経の軸索がシュワン細胞移植部位内に効果的に誘導されても、移植部位から離れて脊髄遠位部へさらに伸長することは困難であった。

２．嗅神経鞘細胞（OEG）の登場

嗅細胞から嗅索への神経投射は、生涯を通じて細胞死と神経再生を繰り返すきわめて特異な神経回路である。いまだ不明点が多いが、特筆されるのは神経軸索を誘導する能力である。

シュワン細胞と大きく異なるのは脊髄内での遊走能伸びる能力）であり、移植から離れた部位まで軸索を誘導することが可能であった。特に運動機能においてもっとも重要な神経回路である皮質脊髄路の効果的な再生誘導が観察されており、脊髄を完全切断したラットが嗅神経鞘細胞の移植により効果的な機能回復を果たしたことは特筆に価する（Ramon-Cueto ら、2000）。

３．シュワン細胞と嗅神経鞘細胞のどちらが有効か

我々のラットの急性圧迫損傷モデルを使った亜急性期の移植実験では、シュワン細胞のほうが嗅神経鞘細胞より神経軸索誘導における優位性が示唆された。しかし、局所微小環境の克服という点は不十分だった。嗅神経鞘細胞が期待されたほど機能しなかった点は判然としない。

ヒトからヒトへの移植治療そのものが準備段階ではあるものの、安全に行える可能性が示唆されており、注目に値する（Wirth E.D.3rd ら、*J. Neurotrauma* 18, 2001）。

細胞移植治療を効果的にするためには移植補助医療の研究も重要であり最適な組み合わせが求められている。移植補助医療としては、神経保護、神経栄養因子の局所投与あるいは発現、グリア瘢痕抑制などがある。

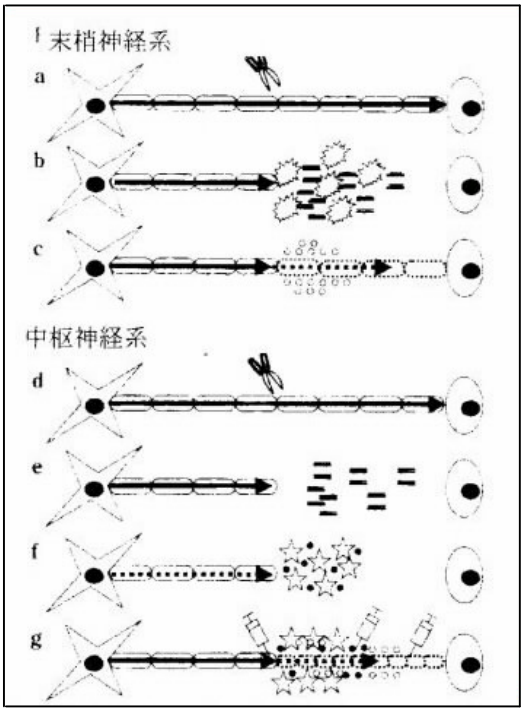


図　末梢神経（a-c）と中枢神経（d-g）における神経再生の違い

末梢神経では、神経軸索が切断されると(a)、切断より遠位部は Wallerian 変性に陥り、局所マクロファージ〔✧〕によりすばやく処理される(b)。

軸索を失ったシュワン細胞は髄鞘部分を分断して、増殖・肥大してビュグナー・バンドを形成する。このビュグナー・バンドにより、神経軸索伸張のための環境が整えられ神経再生が達成される c。

中枢神経では神経軸索が切断されても(d)、損傷遠位部の処理は遅延し、神経軸索伸張にとって好都合な環境は構築されない(e)。むしろ、崩壊したミエリン産物（●）や局所で増殖したアストロサイト（☆）が神経軸策伸張に阻害的に作用する(f)。そこで、末梢神経の神経再生機構を中枢神経に導入すべく、培養シュワン細胞移植などが実験的に試みられている(g)。

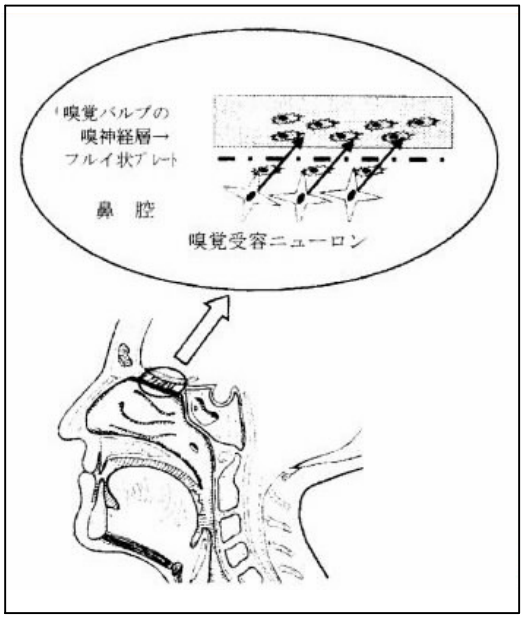


図　嗅神経系における嗅神経鞘細胞の役割

嗅細胞から嗅索への神経投射は、細胞死と神経再生を繰り返すくわめて特異的な神経回路である。

嗅神経軸索（矢印）の再生能力は、嗅神経鞘細胞（✧）によるところが大きいと考えられている。

【おわりに】　著者らの研究成果の一部は、「マイアミ・プロジェクト」の Bunge 及び Oudega 研究室で行ったものである。脊髄再生に関して全世界から発信される成果は膨大である。特に基礎研究において日々新たな成果が生まれ、脊髄再生実現に向けた着実な歩みが実感される。しかしながら、いざ臨床応用になると、その扉は重厚かつ巨大であるといわざるを得ない。

■「脊椎・脊髄ジャーナル」2003 年 2 月号　要約

★　脊髄の修復

伊勢田努力、西尾健資
（京大大学院・認知行動脳科学）

＊　許容的環境仮説と局所条件論

著者らの研究室では、子ネコやラットにおいて、種々の中枢神経路が鋭利な切断で局所の条件をできるだけ壊さないようにすれば、著明な自然再生が起こり、再生線維は正しい経路を通り、正しい部位に終止し、十分な機能回復をもたらすことを観察・証明してきた。

つまり、再生線維が非適切に伸びる異所性投射ではなく正常な投射になりうること、中枢神経は軸索再生の伸長に対して決して拒絶的ではなく、全体として許容的であり、軸索再生の成否の鍵を握っているのは損傷部の局所的な条件であることを証明してきた。

＊　成熟動物の中枢神経軸索再生は可能か

成熟ラットにおいて、中枢神経を鋭利に切断しても幼若な動物のような自然再生が起こらないのは損傷局所の問題ではないか。

そこで、脊髄・脊椎短縮を行った成熟マウスの切断部局所に、培養したグリア細胞の移植を試みた。その結果、下部胸髄の完全切断により対まひを示した成熟ラットは、四肢の協調歩行まではいかないが、体重を自力で支えることができるまで回復した。

これは成熟動物でも切断部局所の条件を改善すれば、軸索再生が可能であるとともに、脊髄損傷の慢性期での治療の可能性をも示唆している。

＊　神経修復による機能の回復

2 種類の神経投射：

① 広範性投射：比較的少数の神経細胞が、明白な体部位の局在なしに脳の広範な領域に終末を送り、シナプス環境の維持や神経細胞の活動性の調節を行っている。
ドパミン、ノルアドレナリン〔共に神経伝達物質〕、コリン作動性〔アセチルコリンが神経伝達物質であるシナプス〕の投射など。
　パーキンソン病への移植では、神経回路としての機能よりは、ドパミン、ノルアドレナリン、アセチルコリンなどを局所的に供給するミニポンプの役割と考えられる。

② 点対点投射：個々の神経細胞が精密な体部位局在をもって限局的に投射し、感覚や運動の時々刻々の情報処理に関わる。
　脊髄損傷では、広範性投射も障害されるが、主たる障害は運動神経路や感覚神経路の点対点投射の障害である。点対点投射の線維が再生して異所性投射になった場合には高い機能回復は起こらないと考えられる。
　脊髄損傷において随意的に手を動かしたり歩行できるように期待するには、体部位局在性の上行性ならびに下行性の脊髄伝道路の再構築が必要である。
我々の幼若動物の切断実験で、体部位局在の再現された伝導路の再生に、損傷局所の幼若アストロサイトが不可欠であることが分かった。
　さらに、成熟動物において、培養した中枢グリアを移植し損傷部の局所の条件を改善することで、体部位局在を伴う軸索再生が可能であることが示された。
これは、脊髄損傷を含むあらゆる神経疾患を伴う中枢神経障害の神経修復的治療を考える上で、新たな展望につながる画期的な成果であると考える。

■「最新医学」54 巻 12 号・1999 年 12 月【要旨】

神経系幹細胞を用いた神経機能再生

京都大学大学院医学研究科　脳神経外科
高橋　淳

神経系幹細胞

幹細胞とは、成熟個体に至るまで存在し続ける未分化な細胞のことで、①多分化能、すなわち複数の違った種類の細胞に分化する能力を持つ、②自己複製能、すなわち対称的あるいは非対称的な分裂によってまた新たな幹細胞を生み出す能力を持つ。

これに対し、ある分化細胞の系譜に入り、限られた回数の分裂の後に分化を遂げるように運命づけられた細胞は前駆細胞と呼ばれる。神経系幹細胞は自己複製能を持ち、またさまざまな因子に反応し、前駆細胞を経てニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化する（図１）

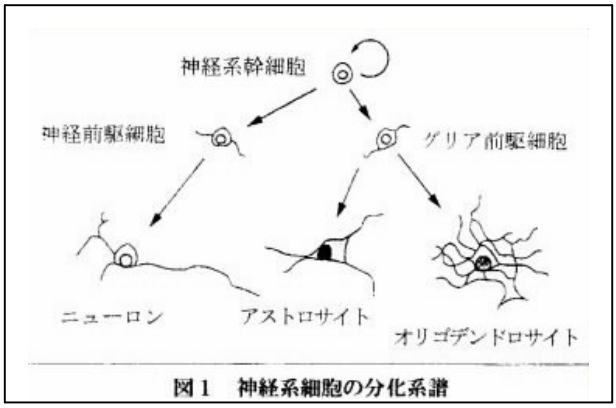


図１　神経系細胞の分化系譜

分化および自己複製の方向を矢印で示した。このように幹細胞は多分化能と自己複製能を持つ。

1999 年、成体脳神経系幹細胞の由来について、2 つの報告が相次いでなされた。

まずカロリンスカ研究所の Johansson らは、脳室壁の上衣細胞由来であると報告した。

これに対しロックフェラー大学の Doetsch らは、脳室下帯（SVZ）のアストロサイト由来であると報告した。成体脳に幹細胞が存在するという点、では一致しており、興味深い。

このように神経系幹細胞の由来や分布がはっきりせず生体外での解析が進まないのは、その特異的マーカーが存在しないのも一因である。しかし近年、神経系幹細胞に発現するタンパク質が幾つか報告されている。それらは、nestin,musashi, Notch Ⅰ受容体などで、これらを組み合わせることにより神経系幹細胞が同定できると考えられる。特異的マーカー、特に表面マーカーの発見が重要な理由は、細胞の同定に有用であるばかりでなく、脳組織を分散培養する際にそのマーカーを利用して神経系幹細胞だけを選別し培養効率を上げることができるからであり、現にそのような試みがなされ始めている。

成体脳の幹細胞

成体哺乳動物の中枢神経系においては神経新生は起こらないとされるが、例外の領域が２つある。１つは、側脳室外側のＳＶＺと呼ばれる部分で、嗅球における神経新生などに関与している。もう１つは海馬の歯状回で、歯状回自身における神経新生に関与している。これらのことから、成体ラット・マウスのＳＶＺや海馬の培養が試みられた。

1992 年、Reynolds と Weiss によって成体脳に幹細胞が存在する可能性が初めて報告された。しかしこの時点では、細胞の多分化能が証明されただけであった。Critti らは、単一細胞由来の細胞塊から得たサブクローンで同様の実験を行い、やはりニューロンとアストロサイトとオリゴデンドロサイトに分化すること、すなわち自己複製能も確認した。これによって、成体の脳にも多分化能と自己複製能を持つ幹細胞が存在することが証明された。その後 Weiss らは、同様の方法で脊髄にも幹細胞が存在することを示した。

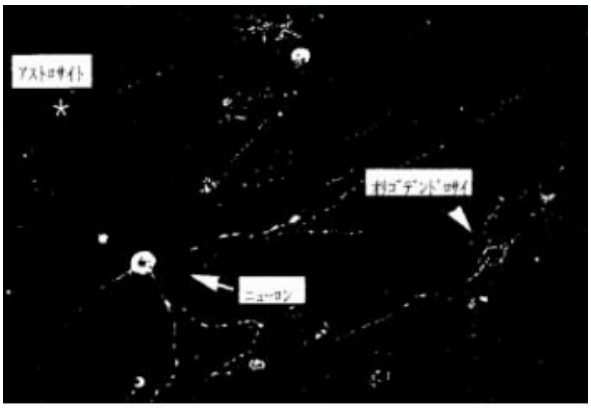


図２　ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化

図２　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

単一細胞由来のクローンを分化誘導した後の 3 重免疫染色、ニューロフィラメント（200ｋD）陽性のニューロン（矢印）、GFAP 陽性のアストロサイト（星印）、GalC 陽性のオリゴデンドロサイト（矢頭）が認められ、この細胞が多分化能を持つことを示す。青は DAPI による核染色。

GFAP：グリア繊維状酸性タンパク質
DAPI：ジアミジノフェニルインドール
GalC：ガラクトセレブロシド

成体ラット海馬の幹細胞

Gage 研究室からは、成体ラットの海馬に幹細胞が存在することが報告された。

これらの細胞は bFGF〔塩基性繊維芽細胞増殖因子〕存在下で増殖し続けて凍結保存も可能である。また、成体ラットの海馬に移植すると、ニューロンおよびアストロサイトに分化しうることが確認された。

この細胞が幹細胞としての性質、すなわち多分化能と自己複製能を持っているかどうかを調べるために、我々は実験により、成体ラットの海馬から得られる細胞は、多分化能、自己複製能を持つ幹細胞であることが示された。

次に、この細胞が RA〔レチノイン酸〕によって分化する際の変化を検討したところ、臭化デオキシウリジン（BrdU）取り込み細胞すなわち分裂増殖している細胞の数が減少していることが分かった。特にニューロンへの分化に注目して神経栄養因子受容体（trk 受容体および p75）の発現を調べると、成体ラット海馬由来の神経系幹細胞は、bFGF 存在下で自己複製し、RA 存在下でニューロンへと分化し、神経栄養因子の作用によって成熟すると考えられる（図３）。また、この神経系幹細胞由来のニューロンが培養下においてシナプスを形成しうることが電気生理学的にも観察されており、幹細胞由来のニューロンが神経回路の再構築に寄与しうることが期待される。

３　成体ラット海馬由来神経系幹細胞からニューロンへの分化

これらの細胞は bFGF 存在下で増殖し続けて凍結保存も可能である。また、成体ラットの海馬に移植すると、ニューロンおよびアストロサイトに分化しうることが確認された。

この細胞が幹細胞としての性質、すなわち多分化能と自己複製能を持っているかどうかであるが、我々の実験により成体ラットの海馬から得られる細胞は、多分化能、自己複製能を持つ幹細胞であることが示された。

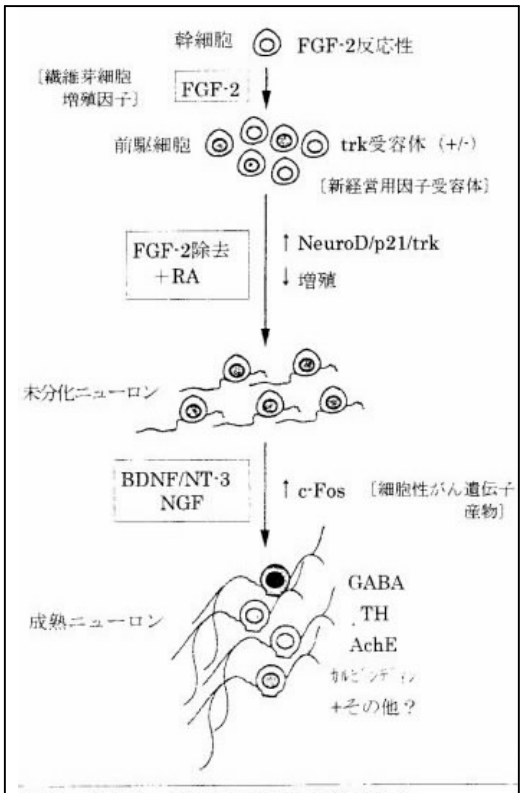


図３　成体ラット海馬由来神経系幹細胞から
ニューロンへの分化

次に、この細胞が RA によって分化する際の変化を検討したところ、臭化デオキシウリジン（BrdU）取り込み細胞すなわち分裂増殖している細胞の数が減少していることが分かった。

特にニューロンへの分化に注目して神経栄養因子受容体（trk 受容体および p75）の発現を調べると、成体ラット海馬由来の神経系幹細胞は、bFGF 存在下で自己複製し、RA 存在下でニューロンへと分化し、神経栄養因子の作用によって成熟すると考えられる（図３）。

また、この神経系幹細胞由来のニューロンが培養下においてシナプスを形成しうることが電気生理学的にも観察されており、幹細胞由来のニューロンが神経回路の再構築に寄与しうることが期待される。

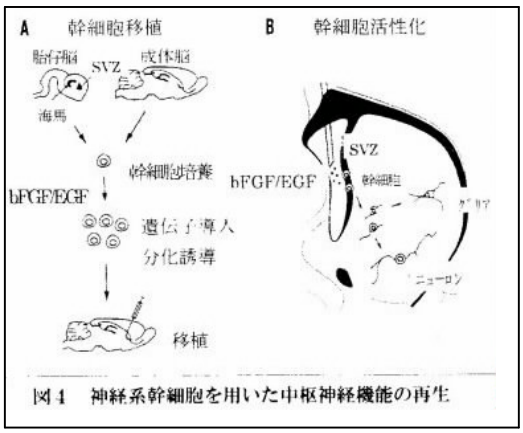


図４　神経系幹細胞を用いた中枢神経機能の再生

神経系幹細胞の移植

神経系幹細胞を用いた中枢神経機能の再生に関する実験には、大きく分けて以下の２つのアプローチがある（図４）。

① 幹細胞を移植し、生体内での神経やグリアへの分化を期待する。この際、幹細胞あるいは前駆細胞を移植材料として使う利点は表１のような点にあると考えられる。
② サイトカインを脳室内に投与して生体内の幹細胞を刺激し、神経やグリアの新生を促す。

図４　神経系幹細胞を用いた中枢神経機能の再生

A：幹細胞移植。幹細胞を胎仔あるいは成体の海馬や SVZ から分離・培養し、遺伝子導入や分化誘導の後に脳に移植する。脳内での移動・分化によって、シナプス形成や髄鞘形成を期待する。
B：内因性幹細胞の活性化。脳室内に bFGF や EGF などのサイトカインを脳室内投与し、ニューロン新生、グリア新生を期待する。
SVZ：脳室下帯、bFGF：塩基性繊維芽細胞増殖因子、
EGF：上皮増殖因子

脳内に移植された幹細胞がどのように振舞うのかを解析するために、成体ラット海馬から得られた幹細胞を成体ラット脳内に移植する実験が Gage 研究室で行われている。Suhonen らは、ラット海馬由来の幹細胞を成体ラットの海馬、小脳、RMP（脳室周囲帯から嗅球へ神経前駆細胞が移動するときの通り道)に移植し、その後の移動・分化について調べた。幹細胞を海馬に移植した場合、歯状回顆粒細胞層においてニューロンへの分化がみられたが、小脳に移植した場合はニューロンへの分化はみられなかった。RMP に移植された幹細胞はその通り道に沿って嗅球に移動し、嗅球に特徴的なカルビンディンまたは TH 陽性ニューロンや NeuN〔神経核？〕陽性ニューロンへと分化していた。このことは、移植された幹細胞が内因性の前駆細胞と同様に RMP に沿って嗅球に移動し、そこで局所的な因子に反応して特異的な細胞に分化したことを意味する。

内存性幹細胞の活性化

ラット海馬歯状回の門と顆粒細胞層との境界部に分裂細胞が存在することは以前から知られていた。外因性の因子によって幹細胞あるいは前駆細胞の増殖を促進させて、ニューロン新生やグリア新生を促す試みも行われている。これらの実験から言えることは、外界からの刺激によって内因性の幹細胞を活性化しニューロンやグリアの新生を促進しうるということであり、それに関与する因子の同定や機構の解析などが今後の焦点となると思われる。

長期間の培養が可能なので、
　均一かつ充分な量の細胞が得られる。
　予定を立てておくことができる。
　細胞の性質を前もって知ることができる。
　増殖速度や分化の方向を操作することができる。
　レトロウイルスを用いて遺伝子導入が可能。
神経系由来の細胞なので、
　神経系特異なタンパク質を発現する。
神経系特異的なプロモーターを持つ。
　宿主細胞と正常な細胞構造を構築する。
　（シナプス形成など）
その他
　腫瘍をつくらない。
多様な細胞に分化する。

表1　神経系幹細胞を移植材料として用いる利点

表１　神経系幹細胞を移植材料として用いる利点

ヒト由来神経系幹細胞

将来の目標として臨床応用を考える場合、ヒトにも神経系幹細胞が存在することが大前提となることは言うまでもない。Svendsen ら、Flax らの結果から、ヒト胎児脳には少なくとも多分化能を持つ細胞が存在すると考えられる。

成人脳に関して Kirschenbaum ら、Eriksson らの実験は必ずしも成人脳における幹細胞の存在を証明するものではないが、少なくとも成人脳においてニューロン新生を起こす細胞が存在することを示唆する。

■最新医学・54 巻 12 号・1999 年 12 月【要旨】

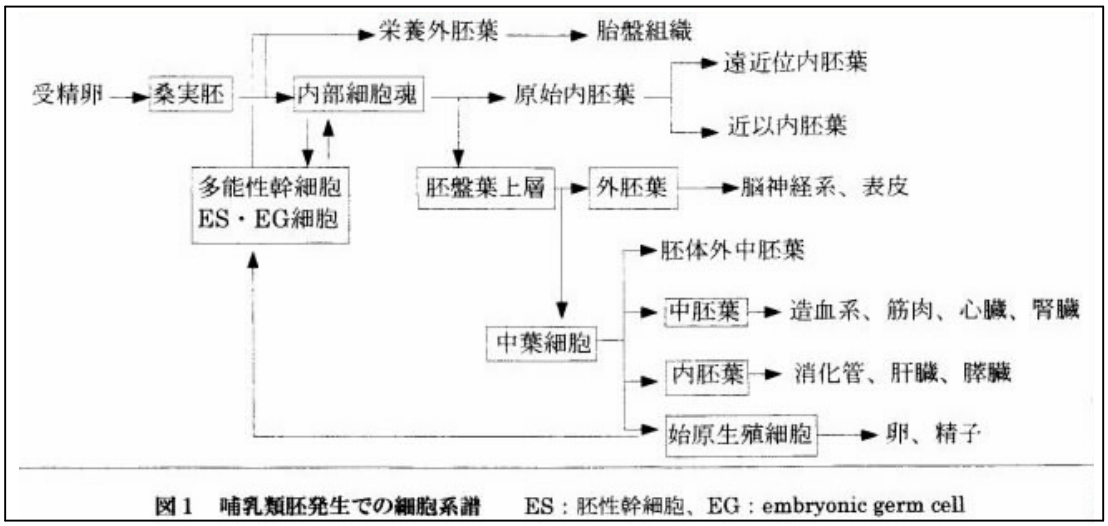
ヒト ES 細胞株の樹立とその意義

京都大学再生医科学研究所　発生分化研究分野
中辻　憲夫

マウス ES 細胞と EG 細胞

実験動物として広く使われているマウス（二十日鼠）の ES 細胞（胚幹細胞、胚性幹細胞）株が初めて樹立され発表されたのは 1981 年であり、生殖細胞由来のテラトーマ（奇形腫）が自然発症する 129 系統というマウス近交系統の初期胚（胚盤胞）内に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊を培養して樹立された。哺乳類の胚と胎児の発生に伴って分化する細胞系譜とその中での ES 細胞の位置づけを図１に示す。

図１　哺乳類胚発生での細胞系譜　　ES：胚性幹細胞、EG：embryonic germ cell



この細胞株は、培養下で未分化状態のまま増殖継代することが可能であるが、免疫拒絶を受けない同系マウスや免疫抑制系統マウスの皮下や精巣内などに移植すると多種類の組織が入り交じったテラトーマ〔奇形腫〕を作ることから、多種類の細胞への分化能、特に外胚葉、中胚葉、内胚葉の３胚葉に属する細胞への多分化能を保持していることが分かる。

また培養下で遺伝子導入と選別などの操作を加えられた後にも、胚盤胞に注入されると胚発生に参加してキメラマウス〔２つ以上の遺伝要因をもつ〕を作ることができる。この際に生殖細胞を作る基になる始原生殖細胞に分化することができれば、キメラマウスの交配によって、遺伝子操作を受けた ES 細胞由来の動物個体を作ることができる。このような ES 細胞株の特色を図２に示す。

図２　マウス ES 細胞株の樹立と細胞分化・キメラ作製

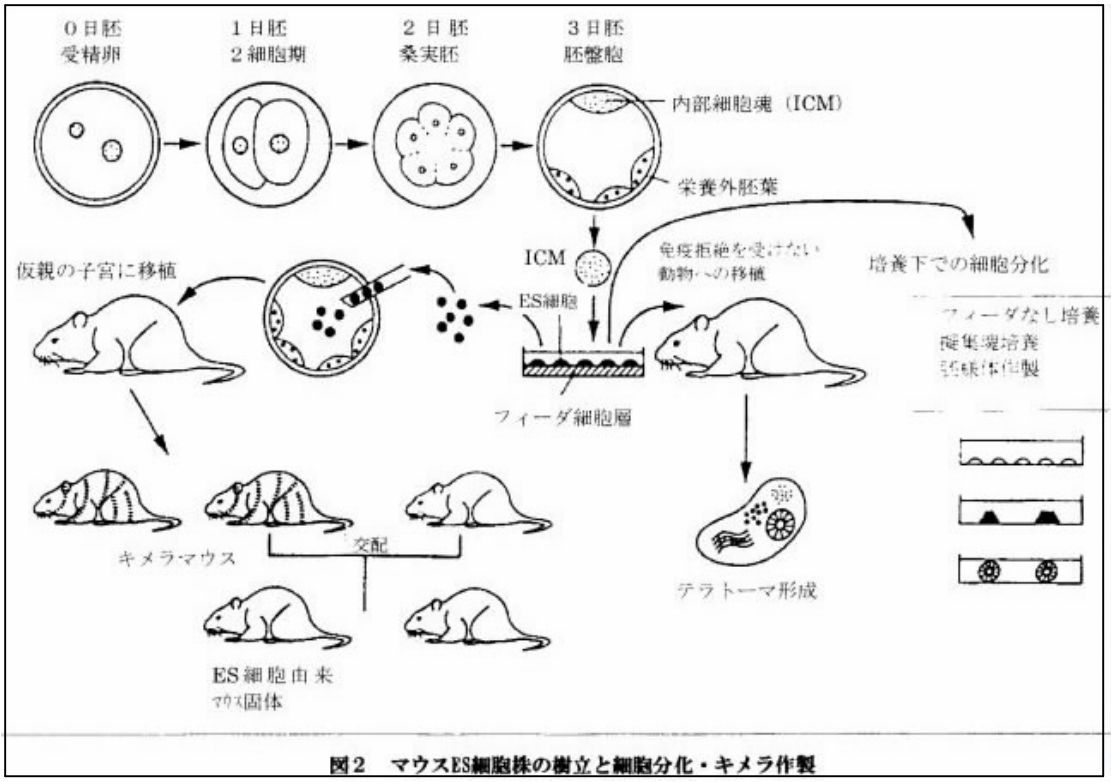


図２　マウスES細胞株の樹立と細胞分化・キメラ作製

ES 細胞からの細胞分化

マウス ES 細胞の培養条件を変えたり細胞魂を作らせたりすると、さまざまな細胞種に分化させることが可能である。特に注目される点として、多種類の血球細胞を作る造血系細胞が分化すること、また神経細胞やグリア細胞を作る神経系細胞も分化することが知られている。すなわち、培養下など人工的な環境で、図１に示した細胞系譜に類似する分化を誘導することができる。

ＥＳ細胞は、多分化能が高いために単一種類の細胞へ分化させることは困難で、同時に多種類の細胞へ分化してしまう。このような細胞群から特定の細胞種を得るためには選別が必要である。これらの方法については表１にまとめた。

霊長類 ES 細胞株の樹立

このような ES 細胞株をヒトにおいても作ることができれば細胞移植などに利用できる可能性があり、将来の移植再生医療にとって重要な材料を提供できる（図３）。

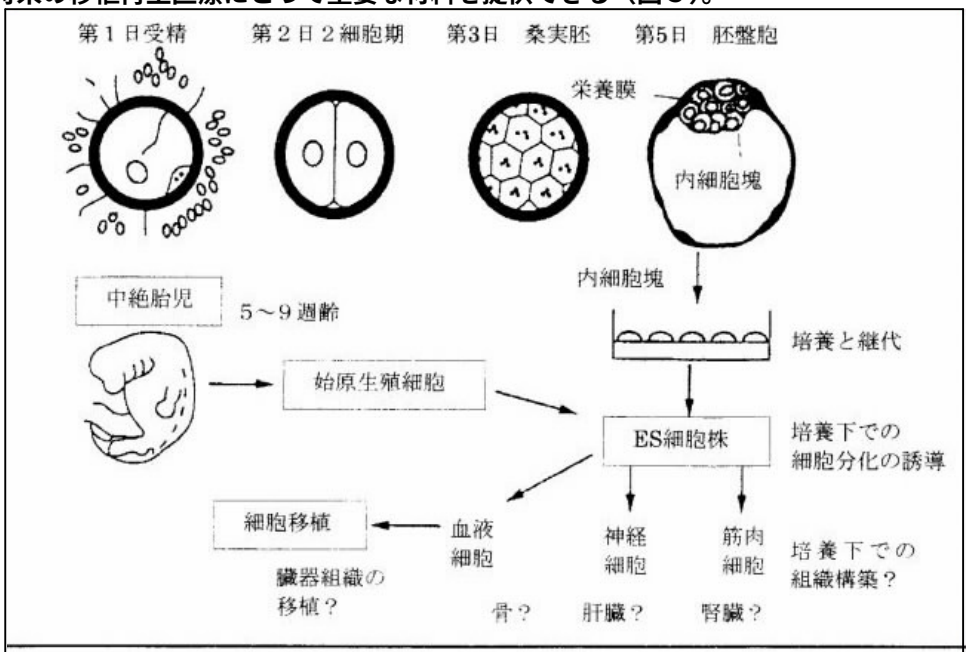


図３　ヒトES細胞株の樹立と移植医療

霊長類の ES 細胞株はマウス ES 細胞に比較して、幾つかの相違点があるようである。まず培養下で頻繁に栄養芽細胞へ分化することが、胎盤性ゴナドトロピンの分泌などによって確認されている。もう１つの違いは、マウス細胞においては分化抑制に効果を持ち、培養液に添加される LIF が霊長類 ES 細胞の場合は不必要で効果もないらしいことである。

表１　ES 細胞から各種の機能細胞を作る

幹細胞としての維持・増殖
フィーダー〔栄養〕細胞使用、LIF 添加（霊長類 ES 細胞では不必要？）
細胞塊の解離による頻繁な継代
細胞分化の誘導
フィーダー細胞除去、LIF 除去（霊長類では効果なし？）
レチノイン酸添加
細胞凝集塊の作製
胚様体（embryoid body）の作製
動物への移植によるテラトーマの作製
分化細胞の選別
表面抗原による細胞ソーティング
特異的プロモーターと蛍光遺伝子発現を用いた細胞　ソーティング
特異的プロモーターと薬剤耐性遺伝子発現を用いた細胞選別
分化させる機能細胞の種類
造血系細胞、神経系細胞、心筋細胞、間充織細胞、軟骨細胞、
膵島細胞？　幹細胞？

ES：胚性幹細胞、LIF：白血病抑制因子

ES 細胞と細胞移植

造血幹細胞の移植はすでに白血病治療に用いられ、神経細胞の移植は Parkinson 病の治療方法として検討されているが、このほかに心臓などの筋肉細胞の移植や膵島〔ランゲルハンス島〕移植などは新たな移植再生医療の可能性として注目されている。

これまでの研究成果をヒト ES 細胞株に応用すれば、培養下で分化させた造血系幹細胞や神経系細胞を細胞移植に用いて、白血病治療における骨髄移植や、Parkinson 病治療におけるドーパミン産生神経細胞の脳内移植などへの応用は直ちに想像できる。

ところで細胞移植を行う場合に問題になるのが、移植免疫による拒絶反応をどう克服するかという点である。拒絶反応を免疫抑制薬などによって克服できる可能性はあるが、移植免疫の問題は最後まで残るであろう。

これらとは全く別の方向から移植免疫の問題を解決する可能性が提起されている。すなわち移植を必要とする患者の組織から採取した体細胞の核を、除核受精卵に移植することによって受精卵と初期胚を作り、患者本人のゲノムを持つ ES 細胞を作る可能性である。

一方米国のベンチャー企業などから発表された方法は、除核ウシ卵子にヒト体細胞核を移植して作った初期胚から ES 細胞株を樹立しようというもので、細胞移植に用いることのできる造血系細胞などが正常に機能しさえすれば使える可能性がある。

これらの核移植による方法を実行する場合の問題点としては、治療が必要となった患者の体細胞採取に始まり、ES 細胞株樹立と細胞移植に用いるための細胞分化誘導のプロセスのために必要な日数である。治療に間に合う期間内にこれらの操作を確実に成功させることは、果たして可能であろうか、もし間に合わない場合は、将来必要になる場合を想定してあらかじめ各人から ES 細胞株を樹立しておく必要が生じる

倫理的側面

現在米国においてはヒト胚を用いた研究に対しては公的研究費の使用が禁じられているが、民間資金を用いた研究は行える。暫定的に公的資金は使えないが、それ以外の資金では研究を行えるという特異な状況になっている。世界的なコンセンサスとなりつつあるのは、受精２週間後に当たる原条期以前のヒト初期胚については、場合によっては研究に用いることができるというものである。

将来発生してくる胎児の正中線軸が決定する原条期以前は、医療や福祉にとって明確なメリットが存在する研究目的には使用できるというのが、現在広く受け入れらている立場である。

ただし、実験に使用するのを目的としてヒト受精卵を作ることには倫理的問題が大きいので、不妊治療の際に作られて母体へ移植されなかった受精卵が研究用に転用される場合が多い。また ES 細胞株樹立は、研究とは無関係の理由のために中絶された胎児（５～９週間）から始原生殖細胞を取り出して培養に用いている。

■「BIO　CLINICA」15（6）2000【要旨】

ヒト ES 細胞と再生医療

京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座
発達小児科学
中畑　龍俊

１．ES 細胞

マウス ES 細胞株が最初に樹立されたのは 1981 年である（図１）。

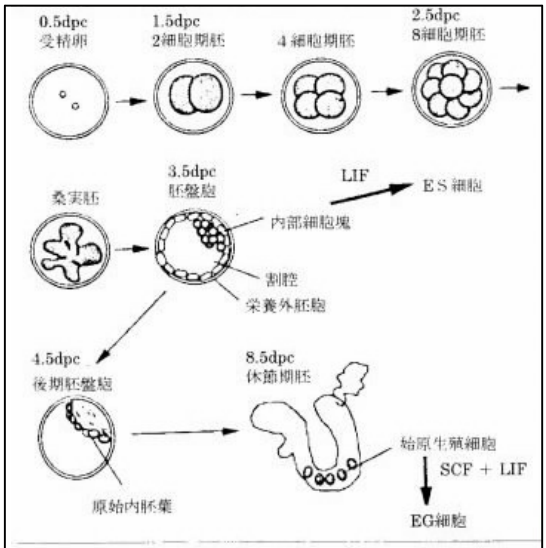


図１　ES細胞とEG細胞の作成法（マウス）

この細胞株はフィーダー細胞、LIF 存在下に培養すると未分化な状態のまま継代培養することができるが、一旦同系マウスに移植するとテラトカルチノーマを作り、外胚葉、中胚葉、内胚葉の３胚葉に属する様々な細胞に分化できることが示された。

また、特記すべきことは、培養条件下で遺伝子操作を加えられた ES 細胞を胚盤胞に注入すると胚の発生に参加しキメラマウスを作ることができるということである。この際、ES 細胞が生殖細胞系列に分化できた場合には、キメラマウスを交配することにより、遺伝子操作を受けた ES 細胞由来の動物個体を作ることができる。

このように ES 細胞を用いて、遺伝子ターゲッティング法の技術により特定の遺伝子を破壊したノックアウトマウスが数多く作られ、未知の遺伝子の機能解析に広く用いられている。ES 細胞の簡単な特徴を表１に示した。

表１　ES 細胞（胚性幹細胞）の特徴

１．受精卵を培養し、胚盤胞（blastcyst）の内部細胞塊（inner cell mass）より樹立された細胞株
２．LIF（白血病抑制因子）存在下に自己複製可能な細胞
３．あらゆる細胞に分化する全能性を持つ
４．外胚葉（神経、皮膚）、中胚葉（筋肉、骨、血液）、内胚葉（消化管）に分化可能
５．未分化状態、正常の染色体を維持しながら継代可能な細胞
６．多分化能を有し、培養から LIF を除くと種々の細胞に分化
７．マウスでは胚盤胞に注入して宿主胚の細胞と混ぜ子宮に戻すとキメラ動物作成可能
８．キメラ動物を交配させて ES 細胞由来のマウスを作ることができる

２．ES 細胞からの細胞分化

マウス ES 細胞の培養条件を変化させると、様々な細胞に生体外で分化可能なことが知られている。既に神経細胞、筋肉細胞（特に心筋細胞）、血管内皮細胞、軟骨や骨の細胞、赤血球、マクロファージ、肥満細胞、巨核球などの血液細胞を ES 細胞から分化させることが可能である。生体内では身体を構成する全ての臓器に分化可能なことから、至適な培養条件さえ見いだすことができれば、生体外でも全ての細胞を ES 細胞から作り出すことが可能であると考えられる。

現在のところ目的とする細胞系列だけを ES 細胞から分化させることには成功していない。

３．ヒト ES 細胞株の樹立

Thomson らは将来のヒト ES 細胞株の樹立を視野に入れて霊長類（アカゲザルとマーモセット）の胚盤胞から ES 細胞株の樹立を試み、成功した。1998 年、彼らはヒト ES 細胞株の樹立に成功したとする論文を *Science* 誌上に発表し世界中に大きな衝撃を与えた。

彼らの樹立した細胞株はマウス ES 細胞と同様長期間未分化な状態を維持し、正常な染色体を保持している（表２）。

表２　ヒト ES 細胞，EG 細胞の樹立

	ES 細胞	EG 細胞
樹立年	1998	1998
樹立した人	Thomson	Gearhart
用いた細胞	新鮮卵，凍結卵	人工中絶胎児
受精後	人工授精後５－９日	妊娠５－９週後
ステージ	胎盤胞	体節期胚
培養細胞	内部細胞塊	始原生殖細胞
Feeder cell	マウス胎児線維芽細胞	マウス STO 線維芽細胞
サイトカイン	(LIF)	LIF，bFGF，forscolin
培養期間	８ヶ月以上	20 代
染色体	正常	正常
未分化度	未分化	未分化
分化能	多分化能	多分化能
ライセンス	Geron 社	Geron 社

また、免疫不全マウス（SCID/beige マウス）へこの細胞を移植するとテラトーマが形成され、その組織を解析すると消化管、神経、骨、軟骨、筋肉、胎児腎糸球体様の構造が認められたとしている。このヒト ES 細胞がマウス ES 細胞と同様に全能性、全ての臓器への分化能、自己複製能を保有しているかは定かではないが、マウス ES 細胞に極めて近い能力を持った細胞と考えられる。

一方、霊長類の ES 細胞株とマウス ES 細胞株を比較すると、幾つかの相違点があるようである。まずマウスでは比較的稀な培養下で頻繁に栄養芽細胞へ分化することが、胎盤性ゴナドトロピン〔性腺刺激ホルモン〕の分泌などによって確認されている。また、マウス ES 細胞においては分化抑制に効果を持ち、培養液に必ず添加される LIF がヒト ES 細胞の場合は必ずしも必要ないらしい。

３．ヒト EG 細胞株の樹立（略）

４．ヒト ES 細胞/EG 細胞の研究的、臨床的応用

ヒト ES 細胞/EG 細胞の研究面での応用として種々のことが考えられている（図２）。

図２　ヒト ES 細胞/EG 細胞の研究的および臨床的応用

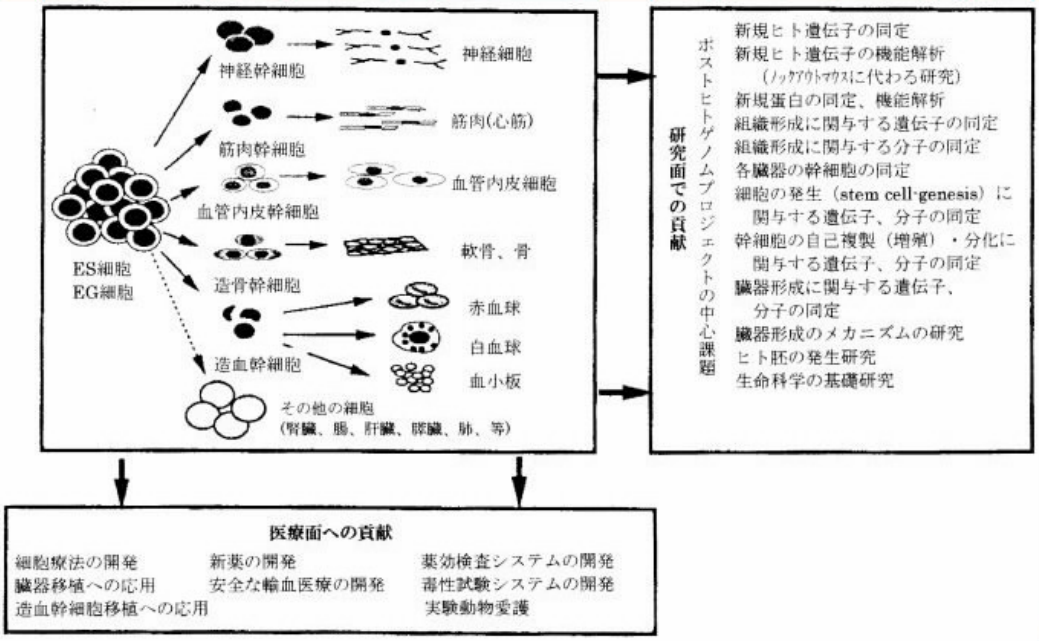


図２　ヒトES細胞/EG細胞の研究的および臨床的応用

中でもポストヒトゲノムプロジェクトに果たす役割は極めて大きいだろうと想像される。

今後、研究が進みヒト ES 細胞から全ての系列の細胞を分化させることができるようになれば、未知の遺伝子をノックアウトした ES 細胞の運命を解析することにより、その遺伝子の機能を知ることができるであろう。また、各臓器や組織の基になる幹細胞の同定、その増殖分化に必須な因子の解明など様々な分野にヒト ES 細胞研究が貢献できるものと考えられる。

医療面では ES 細胞を利用して慢性的に不足している移植用の臓器を産生できるのではないかという期待が大きい。今後、各臓器（細胞）の幹細胞を同定し、ES 細胞からそれぞれの臓器の幹細胞のみを誘導するシステムの開発、各臓器の幹細胞から成熟した細胞を特異的に産生させる技術の開発、いくつかの胚葉からなる臓器を作るための細胞社会学的研究などが盛んに行われることになるであろう。既に欧米ではヒト ES 細胞から誘導した神経細胞や心筋細胞を用いた臨床治療も視野に入れた研究が行われている（図３）。

図３　　ヒト ES 細胞/EG 細胞を用いた移植療法の開発

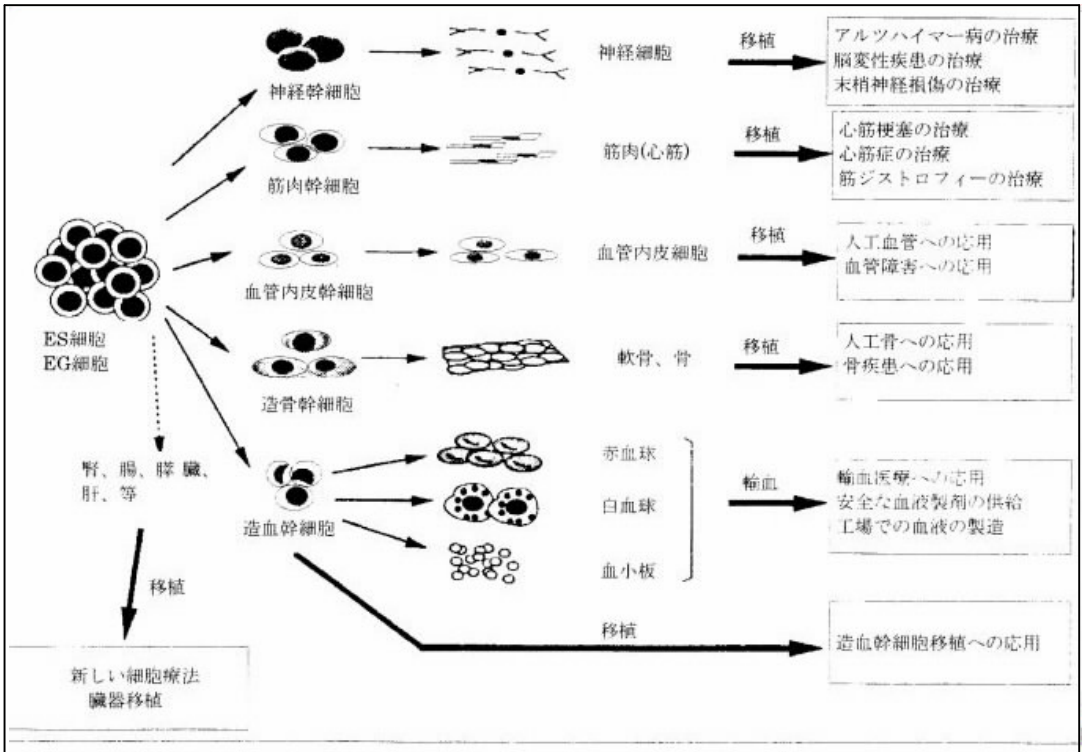


図３　ヒトES細胞/EG細胞を用いた移植療法の開発

また、臓器移植の１つの壁である HLA **の問題を解決するために、患者に合った（オーダーメード）臓器を作り出すことも考えられる。**

さらに、HLA **遺伝子を破壊（**knockout**）した** ES **細胞作成し、この細胞から誰にでも使用することのできる臓器（**universal organ**）を作り出す研究も開始されている。このようにヒト** ES **細胞や** EG **細胞を用いた臓器の大量生産という、最近までわれわれが想像もしなかった研究が爆発的な広がりを見せている。**

１．ES 細胞樹立における問題点

Ａ．余剰卵、余剰胚提供施設

責任体制
研究者の資格、原則医師、専門的知識、能力、設備
余剰卵、余剰胚を扱う施設の倫理、技術規定
余剰卵の生殖医療への厳格な使用禁止規制
クローン実験を目的とした余剰卵の使用禁止規制
インフォームドコンセント
余剰卵提供者のプライバシーの保護
施設内倫理委員会（IRB）および国の審査機関での審議を経る公開性、（プロトコールの内容）
を担保する、審査過程を 公開する
無償で ES 細胞樹立機関へ提供
記録の保管、報告義務、立ち入り検査 国に対する手続き、罰則規定

B. ES 細胞樹立施設

責任体制
研究者の資格、専門的知識、能力、設備
余剰卵、余剰胚から ES 細胞樹立の倫理、技術規定
ES 細胞樹立以外の目的での余剰卵の使用禁止
余剰卵の生殖医療への厳格な使用禁止規制
クローン実験を目的とした余剰卵の使用禁止規制
インフォームドコンセントの内容に沿った実験
余剰卵提供者のプライバシーの保護
公開性、（プロトコールの内容）を担保する、審査過程を公開する
施設内倫理委員会（IRB）および国の審査機関での審議を経る
無償で ES 細胞使用機関へ提供
記録の保管、報告義務、立ち入り検査
特許は認める
国に対する手続き、罰則規定

２. ES 細胞使用における問題点

Ａ．ES 細胞使用施設

責任体制
研究者の資格、専門的知識、能力、設備
施設内倫理委員会（IRB）および国の審査機関での審議経る
公開性、（プロトコールの内容）を担保する。審査過程を公開する
研究は ES 細胞から臓器、細胞を作るまでの範囲に限定する
クローン実験を目的とした ES 細胞の使用禁止規制
ES 細胞を他施設への提供禁止
記録の保管、報告義務、立ち入り検査
特許は認める
国に対する手続き、罰則規定
当面は研究のみに限定して使用する

３　ES 細胞から作成した幹細胞、成熟細胞を用いた臨床応用の問題点検討中

BIO　CLINICA」15（6）2000【要旨】

神経幹細胞を用いた移植治療と再生医療

大阪大学大学院医学系研究科
森　裕・武田　雅敏・岡野　栄之

１．神経幹細胞

哺乳類中枢神経系はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびミクログリアなどから成る多様な細胞集団によって構成されている。
哺乳類中枢神経系の多様な細胞は同一の神経幹細胞に由来し、発生過程や部位に応じてそれぞれの細胞系譜をたどっていくという事が分かってきた。

さて、げっ歯類においては成体においても神経幹細胞が存在することが明らかとなってきたが、果たしてヒトにおいてはどうなのか？

これまでのげっ歯類などで神経幹細胞の存在を証明してきた方法は、ヒトには適用できなかった。しかし、Eriksson らにより成人の脳にも神経幹細胞が存在する可能性が大きく示唆されるようになった。また、筆者らの大阪大学神経機能解剖研究室では米国 Cornell 大学のGoldman 博士との共同研究により、nestin とともに神経系前駆細胞のマーカーである Musashi I を指標として、側頭葉切除術を受けた難治性てんかん患者の側脳室の脳室下帯（SVZ：subventricular zone）に神経幹細胞あるいは神経系前駆細胞が存在することを示した。Musashi I は RNA 結合性タンパク質で、種間でその構造が非常によく保存されており、Musashi I 抗体を用いることにより様々な種の神経系前駆細胞を同定することができ、神経幹細胞を含む神経系前駆細胞の有用なマーカーと考えられている。これらの報告により、成人の脳にも神経幹細胞が存在することが明らかとなってきたのである、

１．側脳室脳室下帯、海馬歯状回における神経新生とその後の運命

ヒトにおいては側脳室下帯および海馬の歯状回でニューロンの新生が明らかとなっている。残念ながらヒトにおいては脳室下帯、海馬歯状回で新生したニューロンの新生後の運命についての報告はまだない。

しかし、昨年にサルの成体脳でのニューロンの新生について衝撃的な報告が Gould らによってなされた。それは大脳の高次機能を司る大脳新皮質のニューロンが成人においてもなんらかの条件が整った時に新生する可能性を示唆しており、今後、大脳新皮質の他の領域への移動がみられるか、あるいはヒトにおいても実際にサルと同様の側脳室脳室下帯から大脳新皮質への移動が見られるかなどについて更なる報告が待たれる。

一方、海馬ではラット成体脳において検討がなされている。Kuhn らは BrdU でラベルされる歯状回の hilum（門）と顆粒細胞層との境界付近で新生したニューロンが顆粒細胞層まで移動したことを報告している。

大脳皮質連合野、とりわけ前頭前野は霊長類およびヒトで顕著に発達している。この部位の両側性の傷害（眼窩部脳腫瘍、前頭葉外傷など）によって人格の変化、知性の低下、自発性や道徳性の低下などの精神脱落症状を呈することは以前より知られている。

一方、海馬は大脳辺縁系の重要な構成要素であり、両側海馬の切除により、前頭前野の障害でも見られるような自発性の欠如や人格の変化、無感情などの精神症状が見られる。また、意識障害や時間および空間に対する失見当識、短期記憶の障害が見られる。アルツハイマー型痴呆では“記銘力障害”、“見当識障害”で代表される痴呆症状が病相初期より見られるが、まさにその痴呆症状の責任病巣として、前頭前野を含めた大脳新皮質に投射するマイネルト基底核に細胞体を持つコリン作動性ニューロンと中隔核に細胞体を持ち、海馬へ投射するコリン作動性ニューロンの脱落および変性が挙げられる。

アルツハイマー型痴呆で障害されるコリン作動性ニューロンの軸索投射部位と新生したニューロンの行き着く部位が一致しているのは偶然であろうか？　この両者の一致はアルツハイマー型痴呆に対して、神経幹細胞によって新生されるニューロンを利用することは出来ないかというアルツハイマー型痴呆に対する新しい治療法のヒントを与えてくれる。
そこで、次章以降で、神経変性疾患のうち神経幹細胞を用いた移植治療、再生治療の研究が最も進んでいるパーキンソン病と上述したアルツハイマー型痴呆への神経幹細胞を利用した、移植治療、再生医療について述べることにする。

２．移植治療、再生治療へのアプローチ

神経幹細胞を用いた治療の方法は大きく二つに分けることが出来る。一つは移植ではないが、患者の海馬の歯状回や側脳室の脳室下帯（SVZ）に存在する神経幹細胞を患者の脳内において、何らかの液性因子（神経幹細胞を in vivo において増殖、分化させる外的因子）の投与により増殖、分化させる方法である。

必要な数だけ神経幹細胞を増やし、必要な場所に必要な機能をもったニューロン、或いはグリアを増やす。その液性因子と効果的なドラッグデリバリーシステム(DDS)を併用することにより患者にとっては自分の神経幹細胞を利用するという点においてもより生理的であり、免疫反応や感染症、或いは外科的侵襲から開放される利点がある。

しかしそのためには、神経幹細胞があるにも係わらず、なぜ成人では恒常的にニューロンが新生しないのかという疑問にも答えなければならず、神経幹細胞を増殖させる内的因子や外的因子や、ニューロンやグリアなどへ分化させる内的因子および外的因子の分子機構が詳細に解明されなければならない。もう一つは神経幹細胞を患者の体外で増殖、分化させて移植する方法である。

先に述べたように神経幹細胞は自己複製能があるため条件によっては無限に増やすことができる。Roy らは筆者らの研究室との共同研究において、nestin のエンハンサー制御下に EGFP（変異型緑色蛍光タンパク質）を組み込んだプラスミド、或いは若いニューロンのマーカーであるＴα１tubulin のプロモータ制御下に GFP（緑色蛍光タンパク質）を組み込んだプラスミド〔細胞質因子。ベクターとして使用〕を脳外科的手術を受けた成人患者の海馬および側脳室脳室下帯由来の細胞群にトランスフェクション〔細胞に核酸を取り込み増殖〕させた。

そしてフローサイトメトリー(FACS：蛍光自動細胞分離分析装置)を用いて EGFP または GFP 陽性の神経系前駆細胞を濃縮することに成功した。FACS で集めてきたこれらの神経前駆細胞を種々の神経細胞に分化させることにより、移植治療の材料として用いることが可能となる。

４．パーキンソン病への神経幹細胞を用いた移植治療、再生医療の適応（略）
５．アルツハイマー型痴呆への神経幹細胞を用いた移植治療、再生医療の適応（略）

表３　1gM パラプロティン血症を伴うニューロパチー〔末梢神経障害〕
における 1gM M 蛋白の反応性と臨床的特徴の対応

1gM M 蛋白の結合する抗原	臨床的特徴
MAG、SGPG、 PO、PMP-22	脱髄性ニューロパチー 感覚障害優位型が多い
GD1b、GD3,GT1b、GO1b 等ジシアロシル基をもつ ガングリオシド	感覚障害性失調性ニューロパチー
GM1、GD1b、GA1、など	運動障害優位型、運動・感覚型
Gal-Ga1NAc 基をもつ糖脂質	感覚障害優位型などさまざま
GD1a あるいは GD1a を含む シアロシルガラクトシル 基をもつガングリオシド	運動障害優位型ニューロパチー

おわりに

高齢化社会の到来と共にアルツハイマー型痴呆、パーキンソン病を患う患者が増えてくることは明らかであり、神経幹細胞を用いた移植治療および再生医療は神経新生に向けて非常に有用な治療法になることが期待される。中枢神経において空間特異的、時期特異的にどのような内的因子や外的因子によって神経幹細胞が制御されているのか？　これらが詳細に解明されることはもちろんであるが、神経幹細胞を用いた移植、再生医学をより臨床的に有用な治療法として確立していくためには、それらだけでなく神経産生をうながすための固体レベルでの環境の調整、訓練などについても検討が必要となってくるだろう。

移植 “ 医学 ”、再生 “ 医学 ” が “ 医療 ” に変わる日はそう遠くはない。神経の免疫組織染色ではミエリンが染色され、患者の末梢神経ではミエリンへ 1gM の沈着がみられる。また 1gM M 蛋白のニワトリへの全身投与により、脱髄をきたすとの報告もある。したがって 1gM M 蛋白が MAG〔ミエリン由来の軸索成長阻害因子〕や SGPG などのミエリン抗原を標的として結合し、脱髄を引き起こすというメカニズムが考えられる。

一方症例数は少ないが、ジシアロシル基（シアル酸が２個連続したエピトープ）をもつ GD1b などのガングリオシドに結合する 1gM M 蛋白は、感覚障害による失調症状のつよいニューロパチーに特異的に関連することが知られる(表３)。一次感覚神経細胞である後根神経節細胞には GD1b が局在することから、このタイプの 1gM M 蛋白の標的となっていると考えられる。ウサギに GD1b を免疫することにより、感覚障害性失調性ニューロパチー〔末梢神経障害〕の動物モデルをつくることができる。これはガングリオシド〔臓器にあるシアロ糖物質〕に対する免疫反応により、明らかな臨床症状をきたす免疫性ニューロパチーの動物モデルが確立されたはじめてのケースである。

1gM パラプロティン血症〔生理活性を失ったものが血漿中に存在する疾患〕を伴うニューロパチーは難治性である。しかし免疫制御薬の投与、プラズマフェレーシス〔血漿交換〕、免疫グロブリン大量療法などの有効例が報告されている。またステロイドの有効例もある。

＊　＊＊　自己免疫性ニューロパチーについて概説した。特に GBS と 1gM パラプティン血症を伴うニューロパチーは、末梢神経の糖鎖抗原に対する血中抗体の結合が臨床病理を規定するうえで重要な役割を果たすことをいくつかの例を上げて述べた。今後さらに病態が詳細に解明されることにより、新たな治療法が開発されることが期待される。■

■ 第2回日本再生医療学会総会･抄録より

（2003 年３月）

SP6－4　アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを使用した神経変性疾患の遺伝子治療

自治医大神経内科 1)，同 遺伝子治療 2)
○村松慎一 1)，王立軍 1）2)，池口邦彦 1)，藤本健一 1)，永田三保子 1)，中野今治 1)，小澤敬也 2)

AAV ベクターにより神経細胞や筋肉へ効率よく治療用遺伝子を導入し長期間発現させることが可能になった。パーキンソン病に対しては，ドパミン合成に必要なチロシン水酸化酵素，芳香族アミノ酸脱炭酸酵素，GTP－Cyclohydrolase I の各遺伝子を発現する AAV ベクターの注入により線条体内で直接ドパミンを合成する方法と，神経細胞の保護作用のある Glial cell line－derived neurotrophic factor（GDNF）などの遺伝子導入によりドパミン神経細胞の変性脱落を抑制する方法がある。また，筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対しては，筋肉で GDNF を発現させることにより脊髄の運動神経の脱落を抑制する方法がある。AAV ベクターを使用したこれらの遺伝子治療について，モデル動物における実験結果を報告し，臨床応用への展望を紹介したい。

SP6－5　脊髄損傷に対する神経幹細胞移植療法の確立

慶應義塾大学整形外科 1)，同生理学 2)
○中村雅也 1)，岩波明生 1)，金子慎二郎 1)，三上裕嗣 1)，小川　裕人 1)，千葉一裕 1)，岡野栄之 2)，戸山芳昭 1)

近年の神経科学の目覚ましい進歩により，これまで不可能と考えられてきた中枢神経系の再生を目指した新しい移植材料として神経幹細胞が脚光を浴びている。損傷脊髄に対する神経幹細胞の応用も期待されているが，移植療法として確立するためには，1）神経幹細胞の分化誘導メカニズムの解明，2）損傷脊髄内の微小環境の変化からみた移植時期の検討，3）ラット損傷脊髄に対する神経幹細胞移植の有効性の確立と移植法の改良，4）霊長類損傷脊髄に対するヒト神経幹細胞移植の有効性の確立など，山積する問題を解決しなければならない。本発表では，これらの問題点についてわれわれが行ってきた基礎的研究を紹介し，さらに脊髄損傷に対する神経幹細胞移植療法の確立に向けた今後の展望について述べたい。

SP6－6　脊髄損傷における内在性神経幹細胞への遺伝子導入

東京大学・医学部・整形外科 1)，同・大学院医学系研究科・神経生物 2)
○山本真一 1)，中村耕三 1)，中福雅人 2)

近年，成体脊髄には神経前駆軸胞が広範囲に存在することが明らかとなり，その潜在的再生能を利用した損傷組織再生の可能性が示唆されている。我々はこれまでに，内在性前駆細胞は損傷に応答し増殖するも，そのニューロン分化が環境因子により抑制されていることを明らかにしてきた。この抑制機構として，既報の Notch シグナル系の他，BMP や CNTF 等の関与が考えられる。成体

前駆細胞の培養系において，BMP4 や CNTF はアストロサイト分化を促進し，ニューロン，オリゴデンドロサイト分化を抑制した。Smad6／7，dominant negative STAT3 の強制発現は，逆の効果を示した。また，Neurogenin2（Ngn2）の強制発現によりニューロン分化は著明に促進し，これは BMP4 や CNTF の存在下でも観察された。そこで，切断損傷脊髄内に直接 Ngn2 発現ウイルスを導入したところ，ニューロンの新生を誘導し得た。同時に，グリア瘢痕形成に寄与するアストロサイト分化を抑制し得た。遺伝子療法や薬物療法を併用することで，内在性神経前駆細胞を用いた損傷脊髄の再生誘導療法につながる可能性が示唆された。

SP7－1　単一生細胞を対象とする機能分子マッピングと採取・同定法

東京工業大学生命理工学研究科
○猪飼　篤，長田俊哉，レハナ・アフリン，金賢徹

これからの再生医療および細胞生物学研究の一つの方法として，培養生細胞上での機能分子分布のマッピング法と，細胞表面および細胞質からの分子採取と同定法の開発の現状について報告する。方法は主に原子間力顕微鏡（AFM）の探針を目的に応じて機能化した上で，細胞との接触を通じて行うものであり，次のような研究を行っている。1）特異的リガンド分子で修飾した探針を用いて細胞表面の受容体分子の存在箇所をマッピングする。2）オリゴ T で修飾した探針あるいは無修飾の探針を用いて細胞質から mRNA を採取し，これを増幅後同定することにより単一生細胞内での発現されている遺伝子を一定の時間間隔をおいて同定する。3）共有結合性架橋剤で修飾した探針をもちいて細胞表面及び細胞質からタンパク質分子を採取し同定する。これらの方法を用いて，単一生細胞のレベルでの機能分子の発現状態と分布状態を解析する，「単一生細胞ナノ分析法」の開発を目指している。

SP7－6　細胞ナノサージャリー

産総研ティッシュエンジニアリング研究センター
○中村　史，韓成雄，小幡谷育夫，武田晴治，中村徳幸，三宅　淳

本研究では，径がナノスケールの超微細な針を用いて，低侵典な細胞操作技術を開発することを目的としている。この針に DNA など様々な分子を担持し・細胞内部へ導入することによって，細胞へのダメージを抑えた状態で，外部からの直接的な操作を行う。このような微細な針は光学的に観察することが困難である。そこで，針の細胞への挿入の情報を正確に捉え，操作する装置として原子間力顕微鏡（AFM）を用いた。

針を結合した AFM カンチレバーにかかる微小な力をモニタすることで，細胞への針の挿入を制御する。針にはカーボンナノチューブを担持した針（直径約 20nm），エッチングによってシリコン製 AFM 探針を先鋭化した針（直径約 200nm）などを使用し，細胞への挿入操作を試みた。針を細胞に徐々に接近させると，針が細胞膜に接触していることを示す斥力が観察され，針を細胞から引き抜く過程では逆方向の弱い引力が観察される。このように一連の動作において観測される力変化から，針と細胞との接触状況をリアルタイムにモニタすることが可能であることが分かった。現在、ヒト培養細胞を用いて GFP 遺伝子の導入等を試みている。

SP8（1）－1 成人多能性幹細胞（MAPC）の再生医学への応用

東海大学医学部再生医学センター1)，同血液・腫瘍内科 2)
○六車ゆかり 1)，中村嘉彦 1)，安藤潔 1）2)，堀田知光 1）2)

ヒトやマウスの骨髄中に骨，軟骨，脂肪細胞など沿軸中胚葉由来の細胞に分化しうる間葉系幹細胞（MSC）が存在することが知られている。さらに胚葉を超えた分化能力を有する成人多能性幹細胞（MAPC）の存在が報告され、その再生医学への応用の期待が高まっている。特に神経，骨格筋，心臓，肝臓などの再生医療においては骨髄を出発材料とできる点には大きな利点がある。しかしながら・現時点ではミネソタ大学以外から報告は乏しい。追試の困難な理由として誘導および増殖培養の難しさ，さらにヒトでは in vivo 分化実験の良いモデルがないことなどが考えられる。我々の施設では凍結ヒト骨髄液より，30 cell doubling population 以上の継代数の MAPC の誘導に成功している。これらの MAPC は現在のところ，骨格筋，血管内皮，骨，軟骨，脂肪細胞，肝細胞の計 6 方向の分化誘導能を示した。本シンポジウムにおいてはわれわれの経験を踏まえてその現状および医療応用の可能性について考察する。

SP8（1）－2　ES 細胞と再生医療

京都大学再生医科学研究所発生分化研究分野／幹細胞医学研究センター
中辻憲夫

無制限の増殖能をもち，あらゆる種類の細胞種に分化可能なヒト ES 細胞株の利用による再生医療が期待されている。ヒト ES 細胞は無尽蔵なヒト組織細胞の供給源として医学や創薬研究に利用できるとともに、様々な難治疾患に対する細胞治療を可能にする。我々はカニクイザル胚盤胞から ES 細胞株を樹立した。サル ES 細胞は、再生医学を目指した様々な基礎研究に利用されるとともに，疾患モデルサルへの同種異系間の細胞移植治療のモデル系として，前臨床研究の重要なツールになる。ヒト ES 細胞株の樹立と使用に関する政府指針が施行されて，厳格な条件下での研究が開始しつつある。京都大学再生医科学研究所では樹立計画を進めている。

国内で樹立され品質が確認されたヒト ES 細胞の供給体制を確立することが，我が国における再生医学研究を発展させるうえで極めて重要である。今後重要となる研究テーマは細胞や核の再プログラム化（リプログラミング）である。クローン動物の誕生は，分化したのちの体細胞核でも未受精卵に存在する未知因子の働きによって初期化されうることを示した。これと類似の脱分化または初期化現象が体細胞を ES 細胞と融合させることによっても引き起こされる。再プログラム化の機構解明と，それを利用して細胞の万能性を引き出す研究が極めて重要である。

SP8（1）－3　中枢神経系の幹細胞生物学と再生医学

慶應義塾大学医学部生理学教室
岡野栄之

神経幹細胞は，多分化能と自己再生能力を有する中枢神経系の組織幹細胞である。今回は，同細胞を用いた脊髄損傷や神経変性疾患の治療戦略への私達の取り組みについてお話したい。

SP8（2）－1　クローンと再生医療

大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野
仲野　徹

ヒト ES 細胞が再生医学のリソースとして注目されている。ES 細胞から必要な細胞へと分化誘導をおこない，細胞移植に用いようというアイデアである。しかし，この場合にも拒絶反応が問題になる。そこで，核移植クローン技術を用いて，患者さんと同じ遺伝子をもった ES 細胞を樹立し，その「テーラーメード ES 細胞」から分化誘導することができれば，拒絶反応のない細胞をいくらでも利用できるのではないか，というわけである。

このような方法が原理的に可能であることはマウスの実験から示されているが，ヒトについては未知の分野である。また，このような核移植クローニング「治療用クローニング（therapeutic cloning)」は，クローン人間作成である「個体作成クローニング（reproductive cloning)」と区別して研究を推進すべきだとする意見もあるが，現時点ではコンセンサスが得られていない。セッションのイントロダクションとして，クローンの再生医学への利用について，現状の概略を解説したい。

SP8（2）－2　クローン技術の発展と再生医学

理化学研究所神戸研究所　発生・再生科学総合研究センター　ゲノム・リプログラミング研究チーム　チームリーダー
若山照彦

現在，いくつもの動物種でクローンの作出に成功している。しかしいずれの動物種でもクローンの成功率はわずか 5%以下であり，たとえ生まれてきても肥満や肺炎などの異常が生じることがあり，いまだ不完全な技術である。だがこのクローン技術を利用することで，体細胞から胚性幹細胞（核移植由来 ES 細胞：ntES 細胞）の樹立もマウスでは可能になった。つまり自分の体細胞から自分自身の ES 細胞を作ることも理論的に可能になったのである。ES 細胞は分化誘導の研究から再生医療の強力な手段になりうると言われているが，そのままでは免疫による拒絶反応が起こってしまう。だが自分の体細胞由来 ntES 細胞から作られた臓器ならば拒絶反応は生じない。この技術を人に応用することが技術的および倫理的に許されるかどうかを判断するためにも，実験動物を用いた基礎研究は不可欠である。

SP8（2）－3　クローン研究と社会

京都大学人文科学研究所・文化研究創成部門
加藤和人

クローン羊ドリーの誕生は，かつて SF の中の存在であったクローン人間が実現する可能性を生み出した。以来，世界各国でクローン研究（と技術）に関する議論が行なわれ，日本やイギリス，ドイツなどを含む多数の国でヒトクローン個体の作製が法律で禁止されるようになった。ところが，クローン研究を巡る社会的な議論はいくつかの点で現在も混乱している。主な問題点は，(1) 目的によってはヒトクローン個体を作っても良いのではないかという主張をどう扱うかという問題と，

（2）再生医療のための「ヒトクローン胚」を作ってよいかどうかという問題である。
　これらには，文化的および宗教的要素など，科学的立場のみで判断できない問題が含まれている。ヒトクローン個体を作ることは科学的に許されないと研究者が主張するだけでは問題は解決せず，ヒトクローン胚についても異なる立場の意見がお互いに譲らずに対立している。本講演では，クローン研究（と技術）を巡る社会的議論の歴史と現状を紹介し，「社会の中のクローン研究」に関して広く議論するための素材を提供することを目指したい。

1716　機能面に着目した神経幹細胞移植の検討

慶應義塾大学医学部脳神経外科 1)，慶應義塾大学医学部生理学教室 2)，岡崎国立共同研究機構生理学研究所 3)
戸田康夫 1)，内田耕一 1)，林　拓郎 1)，峯　裕 1)，河瀬　斌 1)，小泉　周 2)，岡野栄之 2)，籾山俊彦 3)

【目的】神経上皮型幹細胞（NESC）の移植ドナーとしての有用性を機能面から検討することを目的とした。すなわち、①NESC が形態のみならず、活動電位をもった機能的神経細胞に分化するか，②NESC を移植した場合、どのような細胞に分化し，いかなる電気的活動を生じるのか、について検討した。

【方法】①E10 ラット中脳胞部神経板由来 NESC を血清存在下に培養し，バッチクランプ法を用いて活動電位と膜電流を記録した。②GFP 遺伝子を導入した中脳胞部神経板組織を正常ラット線条体に定位的に移植し・免疫組織化学的，および電気生理学的検討を加えた。

【結果】①培養 2 日日で電流刺激により活動電位の発生を認めた。②移植した NESC はホスト線条体に生者し、その多くは神経細胞へ分化した。この分化神経細胞は Glutamate，
GAD，または TH を発現していた。さらにドナー由来の GFP 陽性神経細胞から抑制性および興奮性の 2 種類のシナプス後電流が記録された。

【結論】NESC は機能的神経細胞へ分化し・成熟正常脳へ良好に生着し，神経回路を構築する能力がある。この能力により損傷された神経回路網の再構築を介する機能回復が期待できる。

2512　損傷部脊髄内セマフォリン 3A 阻害剤による損傷軸索の再生

慶應義塾大学整形外科 l)，同生理学 2)，住友製薬研究本部 3)
○　金子慎二郎 1）2)，岩波明生 l）2)，中村雅也 1)，宮尾幸代 2)，岸野晶祥 3)，木村　徹 3)，熊谷和夫 3)，戸山芳昭 l)，岡野栄之 2)

　われわれはこれまでラットとサルを用いて，脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の有効性を報告してきた。さらなる損傷軸索の再生を目指すためには，中枢神経系に存在する軸索伸展阻害因子の問題の解決が重要となってくる。そこで今回われわれは，軸索伸展阻害因子のうち損傷部グリア瘢痕組織内に存在するセマフオリン 3A に対する阻害剤を開発し，その脊髄損傷に対する有効性を検討したので報告する。成体ラット胸髄完全切断モデルを作製し，切断部にミニポンプを留置して 4 週間薬剤を持続投与した。損傷後 BBB スコアーによる後肢運動機能評価を行い，また損傷後 3 ヵ月の時点で経心臓的環流固定を行い組織学的解析を加えた。薬剤投与群では非投与群と比較して有意

な後肢運動機能の回復が認められ，さらに薬剤投与群では切断部およびその尾側部に再生軸索が認められた。今後，神経幹細胞移植との併用によりさらなる機能回復が得られるかどうか検討する予定である。

2513　マウス胚性肝（ES）細胞からの神経肝細胞の分化誘導と脊髄損傷モデルでの移植治療の有用性

聖マリアンナ医科大学救急医学教室 1)，整形外科学教室 2)，免疫学・病害動物学 3)
○　濱田真里 1)，千葉俊明 3)，明石勝也 1)，青木治人 2)．鈴木　登 3)

ES 細胞から神経系細胞を分化させ脊髄損傷マウスに移植しその有用性を評価した。雌マウス胸髄を 1.5 mm 切除し完全離断した。ES 細胞（雄）をレチノイン酸（RA）により分化誘導した神経系細胞を移植（RA 群）し，PBS 群，未分化 ES 移植群と比較した。温熱と針刺激に対する下肢の反応を観察し，Open field score と Vertical grid を用い運動機能を評価した。また Y 染色体特異的遺伝子（Sry）を使い移植細胞を同定した。RT-PCR で mRNA 発現を検討し組織学的検討も行った。RA 処理細胞はネスチン陽性の神経幹細胞であった。移植後脊髄内では神経細胞，アストロサイト，オリゴデンドロサイトが生存していた。Sry＋の移植細胞は損傷脊髄内を上下に数椎体分移動した。未分化 ES 群と RA 群は BDNF－NT3＋NGF＋で神経成長因子による神経保護作用も示唆された。PBS 群に比べ未分化 ES 群と RA 群では下肢機能が改善した。RA 群では早期より機能改善を認めやがて下肢 3 関節を使った。RA 群では奇形種発生を認めなかった。以上 ES 細胞より誘導した神経幹細胞の脊髄損傷での有用性が示唆された。

2517　急性期脊髄損傷に対する IL-6 レセプター抗体の効果

慶応義塾大学生理学 1)，慶応義塾大学整形外科 2)，中外製薬株式会社 3)，大阪大学健康体育部 4)
○岡田誠司 1)，中村雅也 2)，大杉義征 3)，吉崎和幸 4)，戸山芳昭 2)，岡野栄之 1)

脊髄損傷後の急性期に移植された神経幹細胞も内在性神経幹細胞もアストロサイトへと分化してしまいニューロンへは分化しないことが報告され，その要因として損傷脊髄内の微少環境の変化が重要と考えられている。特に損傷急性期に上昇する炎症性サイトカインである IL-6 は，in vitro の実験で神経幹細胞をアストロサイトへと分化誘導することが証明されており，これを抑制することで損傷脊髄内にみられる反応性アストロサイトによる瘢痕形成を抑制し，運動機能回復へとつながる可能性がある。

そこで今回われわれは，IL-6 レセプター抗体の脊髄損傷に対する治療応用の可能性について検討した。損傷モデルは成体マウスを用いて MASCIC モデルに準じた重錘落下法により胸髄損傷を作製し，マウス IL-6 レセプター抗体を腹腔内投与した。損傷後脊髄内で IL-6 レセプターが上昇することは western blotting により確認した。免疫組織学的検討では対照群に比して新生 GFAP 陽性細胞数は有意に少なく，さらに炎症細胞浸潤の範囲も減少した。また，複数の運動機能評価で対照群に比して有意に良好な回復が得られた。

2521　骨髄間質細胞のドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導と移植応用

京都大学院医・生体構造医学 1)，形成外科 2)，横浜市大・医・脳外科 3)
○　出澤真理 1)，菅野　洋 3)，鈴木義久 2)，井出千束 1)

Notch 細胞質ドメインを導入し bFGF などの神経栄養因子を投与することによってヒトおよびラットの骨髄間質細胞から選択的に post－mitotic neuron が誘導されることを見いだした。この系はグリア細胞を含まない。

これらの細胞に GDNF を投与すると約 40%が TH 陽性となり，ラットおよびヒトの細胞から誘導したものをパーキンソンモデルラットに移植したところ，apomorphine 誘導の回転運動が顕著に改善し，移植線条体において neurofilament，TH，dopamine transporter 陽性の神経細胞に分化した。骨髄間質細胞の神経疾患への応用が示唆される。

2522　脊髄損傷に対する樹状細胞移植による神経再生

慶應義塾大学医学部神経免疫研究グループ 1)，同整形外科 2)，同生理学 3)，同先端医科学研究所細胞情報部門 4)
○　三上裕嗣 1)-4)，岡野栄之 3)，坂口昌徳 3)，中村雅也 2)，島崎啄也 3)，岡野 James 洋尚 3)，河上　裕 4)，戸山芳昭 2)，戸田正博 1)-4)

成熟哺乳類の中枢神経系は再生困難であり，特に損傷後の脊髄ではニューロン新生は起こらないと考えられてきた。一方，我々は神経再生が困難な要因の一つとして，中枢神経系が免疫学的に寛容であることに着目してきた。

そこで本研究では，免疫系を制御する樹状細胞を移植することにより，損傷脊髄の神経再生が可能であるかを検討した。マウス（BALB／c，C57BL／6，*nestin*- EGFP トランスジェニック）胸髄切断モデルを作製し，同種マウス脾臓からソーティングにより単離した CD11c 陽性未成熟樹状細胞（DC；1×10^6 個／匹）を損傷部に移植した。

DC 移植群では，内在性神経幹細胞／前駆細胞（EGFP＋／BrdU＋／GFAP ー）の有意な増加，内在性神経幹細胞／前駆細胞からのニューロンの新生（Hu＋／BrdU＋）が観察され，さらに損傷尾側での軸索再生，運動機能（BBB score，RG score）の有意な回復が認められた。以上のことから，脊髄損傷に対する樹状細胞移植は，ニューロンの新生，軸索再生を誘導し，有意な機能回復をもたらすと考えられた。

2523　MPSVII新生児マウスへの遺伝子改変骨髄間葉系細胞の脳室内移植による CNS 病変の改善

京慈恵会医科大学 DNA（研）遺伝子治療研究部門 1)．小児科 2)，
慶応義塾大学医学部病理学教室 3)
○　櫻井　謙 1）2)，飯塚佐代子 1)，沈　剄松 1)，森　泰呂 3)，梅澤明弘 3)，大橋十也 1）2)，衛藤義勝 1）2)

【緒論】MPSⅦは，β－glucuronidase（HBG）の遺伝的欠損により，ムコ多糖がライソゾーム内に蓄積し，CNS 症状等を引き起こす。今回骨髄間葉系細胞（MSCs）を用いた MPSⅦマウスの CNS 病変の治療効果を検討した。

【方法及び結果】 MSCs に retrovirus で HBG gene を導入し，MPSⅦ新生児マウスの脳室内に移植。脳の HBG 染色で広範囲に HBG 陽性細胞を認め，定量でも上昇を認めた。ムコ多糖の定量では，治療群で低下を認めた。Toluisine blue 染色による形態学的検討では，無治療群で蓄積を示す泡沫状細胞を認めたが，治療群では認めなかった。

【考察】MSCs は採取が容易，自己の細胞を使用でき免疫学的問題が少ない。本方法により，ライソゾーム蓄積症の CNS 症状の改善が期待できるものと思われた。

2524　アルギン酸ゲルを用いた神経再生

京都大学形成外科 l)，機能微細形態学 2)，奈良先端科学技術大学院大学 3)
○　橋本正 1）2)，鈴木義久 1)，Wu Sufanl)，北田容章 2)，片岡和哉 l)，鈴木茂彦 1)，谷原正夫 3)，井出千束 2)

共有結合架橋アルギン酸ゲルをネコおよびラットの末梢神経再生に用いた。ラット坐骨神経に 10mm のギャップを作成し，アルギン酸ゲルを用いて架橋した。術後 4 日では，再生軸索は裸で部分的に分解したアルギン酸ゲルに直接接しながら伸び，術後 1～2 週では，共通のシュワン細胞に取囲まれた小神経束を形成し，その周囲の軸索がアルギン酸ゲルに直接接しながら伸びていた。また，末梢断端から基底膜を持たない多数のシュワン細胞がアルギン酸ゲル中に遊走していた。術後 21 ヵ月経過後には正常神経と同等程度まで回復した。次に，ネコ坐骨神経の 50mm のギャップをアルギン酸を移植した。術後 3 ヵ月で電気生理学的に再生が確認され，術後 8 ヵ月では多数の再生有髄軸索が観察された。アルギン酸ゲルは再生軸索の仲良とシュワン細胞の遊走に好ましい生体適合性をもち，再生軸索は術後長期経過後には正常神経と同等程度まで回復することが分かった。

2525　脳脊髄液経由でニューロスフェアーを脊髄損傷部へ移植する方法の開発

京都大学形成外科 1〉，機能微細形態学 2)
○　鈴木義久 1)，Wu Sufanl)，北田容章 2)，片岡和哉 l)，張弘富 1)，太招正佳 1)，江尻洋子 l)，鈴木茂彦 l)，野田　亨 2)，井出千束 2)

脊髄損傷の治療に神経幹細胞の有効性が期待されている。そこで，脳脊髄液経由で神経幹細胞を脊髄損傷部に移植できないかを検討した。GFP ラットより海馬由来のニューロスフェアーを作成した。4 週令のラットの T8－9 のレベルで脊髄に圧挫損傷を加え，第 4 脳室に注入した。術後 1 ヵ月の観察では，脳脊髄液と共にクモ膜下腔を移動し脊髄表面の軟膜に付着していた。また損傷部で多くの移植細胞が脊髄実質へ遊走し突起を出して宿主組織に組み込まれていた。免疫組織染色ではアストロサイト，オリゴデンドロサイトへの分化が観察された。神経根内ではシュワン細胞様の形状を呈していた。これらのことから周囲の環境により幹細胞の分化の方向が決定されると考えられる。以上，脳脊髄液中に注入した神経幹細胞は損傷された脊髄および神経根の表面に付着し，さらに組織実質内に侵入，分化することが明らかとなった。

2526　炭素負イオンを注入したシリコンチューブによる末梢神経再生に関する研究

京都大学大学院医研究科整形外科 1)，京都大学大学院工学研究科 2)
○　池口良輔 1)，柿木良介 l)，松本泰一 l)，中村孝志 l)，辻　博司 2)，石川順三 2)

シリコンチューブを用いて末梢神経欠損を架橋修復するとチューブ内に神経再生がおこることが知られているが，その再生距離には限界があり，実験的にはラット坐骨神経では10mm が限界である。また，炭素負イオン（C^-）を注入することによってシリコン表面は改質し細胞接着特性が向上することが知られている。

今回,ラット坐骨神経での 15mm 神経欠損部を C^-を注入したシリコンチューブを用いて架橋し，C^-を注入していないシリコンチューブをコントロールとし，神経再生を比較検討した。

コントロール群では神経再生は全く認められなかったのに対して，12 過で C^-を注入したシリコンチューブ群では神経架橋の形成が認められ，組織形態学的にも再生神経遠位部で再生軸索が認められた。24 週で電気生理学的には pedal adductor muscle で複合筋活動電位が認められた。C^-を注入することによってシリコンチューブ内での細胞接着特性が向上し神経再生に有利に働いたと考えられる。

2527　神経上皮型幹細胞の増殖と分化制御

慶應義塾大学医学部脳神経外科
○　林　拓郎，　内田耕一，戸田康夫，峯　裕，河瀬　斌

【目的】神経上皮型幹細胞（NESC）は神経細胞への旺盛な分化能を有する。この性質を維持したまま NESC を培養系で増殖することが可能か否か，栄養因子に対する反応性とその神経細胞への分化能を検討した。

【方法】①E10 ラット中脳胞部神経板由来 NESC を bFGF 添加，EGF 添加，無添加群で浮遊培養し，NESC の増殖能を MTS アッセイで評価した。②bFGF 反応性 neurosphere の培養期間による分化能の差異を，1 週間及び 2 週間培養して得られた primary 1 week-old ／2 week-old sphere を 2 日間分化誘導し，その分化能について免疫組織学的に比較検討した。③1 week-old sphere より分化した神経細胞の phenotype について免疫組織学的に検討した。

【結果】
① NESC は bFGF にのみ反応し，培養 1 週間後に約 7．5 倍に増殖した。
② 1week-old　sphere は神経細胞に 100%分化したが，2week-old sphere では 32.5%のみが神経細胞に分化した。
③ 1 week-old sphere 分化 2 日後の神経細胞には glutamate（79.9%），GABA（12.4%），TH（1.3%）の発現がみられた。

【結論】bFGF は NESC の増殖に関与するが，bFGF 反応性 sphere の神経細胞への分化能は時間の経過とともに低下する。

■　再生医学用語集

(1)

アデノウイルス：ハムスターに腫瘍を作るタイプもあり、実験的腫瘍ウイルスとしても研究されている。

インターフェロン（INF）：刺激に続いてマクロファージから、あるいはウイルス感染後に多くの細胞から放出される小型のタンパク質のグループ。抗ウイルス状態に繋がる遺伝子発現の変化、あるいは免疫応答に重要な他の細胞応答を誘導する。

エンハンサー：SV_{40}（サル由来のポリオーマウイルス）やポリオーマウイルス（新生マウスに接種すると種々の腫瘍を誘発する）などの初期遺伝子のプロモーター（RNA ポリメラーゼが転写を開始するため認識し結合する DNA 領域）の上流に発見された約 100 塩基対のヌクレオチド配列。プロモーターからの転写高率を著しく高める DNA 部分。

海馬歯状回：歯状回（ｼｼﾞｮｳｶｲ）自身における神経新生に関与。

活動電位：ニューロンや筋細胞の細胞膜を伝わる全てか無かの速い電気的活動。電圧感受性イオンチャンネルの開閉および Na^+や K^+の流入により、ニューロン軸索を伝わっていく。活動電位により、神経系における長距離のシグナル伝達が可能になる。

カスケード：いくつかの生化学的・生理学的反応を介して、１つのシグナルを段階的に増幅させる生物学的過程。

幹細胞：成熟個体に至るまで存在し続ける未分化な細胞で、①多分化能、すなわち複数の違った種類の細胞に分化する能力を持つ、②自己複製能、すなわち対称的あるいは非対称的な分裂によってまた新たな幹細胞を生み出す能力を持つ。

間葉（ｶﾝﾖｳ）細胞：胚的結合組織を形成する中胚葉性の細胞。組織間物質中に埋没して散在し、細かい細胞質突起により間葉細胞どうし、または上皮組織と結合する事が多い。上皮組織の分化・形態形成において主導的役割を果たすが、逆に上皮組織からの作用を受けて相互作用系をなす。骨や筋肉を生じる細胞も未分化段階では間葉細胞の形態を示す。

ギャップ結合：＝細胞間結合。隣り合った細胞間に存在するタンパク質で裏打ちされたチャンネルで、イオンや小さな分子間を行き来する。

嗅神経鞘細胞：OEG,　olfactory ensheeathing cell

グリア：神経膠（ｼﾝｹｲｺｳ）細胞。

グリア性瘢痕：グリオーシス、神経膠症。何らかの病変が加わると星状膠細胞が反応性に肥大し、突起も発達してくる。その後時間と共にこの反応性アストロサイトは増加し、病変部や周辺は細線維（突起）の豊富な組織に置き換わる。この状態をグリオーシスという。この反応性アストロサイトの胞体や突起の中にはフィラメントの増加が見られる。

蛍光染色：注目する要素に特異的に結合する蛍光標識された物質で細胞を処理することによってその細胞構成要素を視覚化し、その後に蛍光顕微鏡で細胞を観察する一般的な技術。

形質細胞（プラズマ細胞）：各種の免疫グロブリンを産生し、リンパ球の B 細胞の最も分化した分化過程に位置付けられる抗体産生細胞。

コリン作動性シナプス：アセチルコリンが神経伝達物質であるシナプス。

サイトカイン：特定の細胞の細胞表面受容体に結合し、その分化・増殖を促すさまざまな分泌タンパク質の総称（インターロイキンやインターフェロンなど分子量の小さいもの）。ある種のサイトカイン（リンホカインなど）は、免疫応答の強度と継続期間の調節を行う。

細胞外マトリックス：動物細胞が分泌するグリコサミノグリカン、コラーゲン及びさまざまな接着タンパク質からなる。

細胞分裂促進因子：FGF２、EGF など。

軸索（Axon）:神経突起。神経細胞体または太い樹状突起の基部から通常１本出る神経の長い突起。髄鞘を被ったものと被っていないものがある。神経伝導を担う。

樹状突起（Dendrite）：神経細胞体から出る軸索以外の突起で１本以上ある。星型の神経細胞（アストロサイト）

シュワン細胞（Schwan cell）：鞘（ｼｮｳ）細胞。末梢膠細胞の１つで、有髄神経においては軸索に沿って一列に並び、これをその細胞で幾重にも取り巻いて髄鞘を作り、無髄細胞では幾本かの軸索をその細胞質の溝の中にかかえ込んで支持する。

ストローマ：細胞間の物質または器官にある結合組織の構成物質。

神経栄養因子：ニューロトロフィン、HGF、GDNF などで、損傷ニューロンの保護効果がある。

神経幹細胞：中枢神経を構成するニューロンやグリア（オリゴデンドロサイト、アストロサイト）を生み出す多分化能を持つ。⇔幹細胞

神経伝達物質：化学シナプスの前シナプスニューロンから放出され、シグナルを後シナプス細胞へ伝える細胞外シグナル伝達分子。興奮性か抑制性の反応を引き起こすが、その反応は神経伝達物質により活性化される受容体によって決定される。アセチルコリン、ドーパミン、GABA（γ-アミノ酪酸）、セロトニンなどがある。

神経ペプチド：ニューロンから分泌されるペプチドで、シナプスあるいは他の部位でシグナル伝達分子として機能する。これらの分子は神経伝達物質に比べて、多様な長期にわたる効果をもつ。

錐体外路〔運動系〕：脊髄に向かって大脳皮質から下行する運動経路のうち、延髄錐体を通過する経路を「錐体路」というのに対して、それ以外の下行性運道経路を「錐体外路」という。中脳の諸核から脊髄へと運動経路が下降する。不随意性の
運動が自発するようになると共に、随意運動も巧みに行われにくくなる。

錐体外路徴候：筋緊張の異常（亢進、低下）、運動低下（無動）、や過剰（異常運動）が組み合わさって出現する。筋力低下はあるが、麻痺はない。

成長因子：細胞表面受容体に結合し、細胞増殖あるいは特殊な分化反応につながるシグナル伝達経路の引き金になる細胞外ポリペプチド分子。

星状膠（ｾｲｼﾞｮｳｺｳ）細胞：＝星状神経膠細胞、大グリア細胞、アストログリア細胞、星状グリア。中枢膠細胞の１つ。灰白質に多く突起の薄く短い形質性星状膠細胞と、白質に多く細長い繊維状星状膠細胞とに分けられる。神経組織を機械的に支え、ニューロン間を隔離し、グリコーゲンの貯蔵所となり、神経活動に際して環境の陽イオンや炭酸ガス濃度を復元し、病的状態を復元する。

前駆細胞（progenitor cell）：ある分化細胞の系譜に入り、限られた回数の分裂後に分化を遂げるように運命づけられた細胞。

線条体：大脳基底殻にあり、錐体外路運動系の重要　な中枢の１つ。

脱髄疾患：中枢神経系において、髄鞘が一次的に変性または脱落した疾患。

テラトーマ：奇形腫

投射：感覚は受容器の興奮により生じるが、その感覚の所在や作用方向を実際に受容器のある部位ではなく、受容器に対応する空間上の一定の位置に感じること。神経解剖学では、神経細胞が離れた神経細胞に軸索を送ることを意味する場合がある。

ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）：薬物輸送システム。必要部位のみに薬物を送達し他の部位での作用発現を抑制することで薬物治療を最適化する投与法。

トランスジェニック・マウス：受精卵に外来性遺伝子を導入して得られる新しい形質をもつマウス。遺伝子発現の臓器特異性の解析や発生過程における遺伝子発現の制御機構の解明、病態モデルマウスの開発に利用される。

ニューロスフェア：Neurosphere。未分化な神経系細胞の集まりである球形の細胞塊。

ニューロスフェア法：選択的培養法の１つ。神経幹細胞を未分化な状態で増殖させることが出来る。

ニューロン：神経細胞。神経系のインパルス（活動電位）伝達細胞の総称。

ノックアウトマウス：特定の遺伝子を破壊したマウスで、遺伝子機能解析のためや疾患モデル動物として使われている

胚性幹細胞：ES 細胞

ハイブリドーマ：ミエローマ（骨髄腫）細胞と、他の特定の機能を持った細胞を融合させ、その機能を持ちつつ、増殖し続けることができる細胞。

プラスミド：細菌の細胞質因子。細菌細胞質内で宿主染色体とは物理的に独立して自律的増殖を行い、細胞分裂ごとに娘（ﾑｽﾒ）細胞（細胞分裂で生じた新しい２個の細胞）に伝えられていく環状 DNA（サーキュラーDNA。末端のない c DNA）の総称で、ベクターとして用いられる。

ベクター：遺伝子操作の際、特定の遺伝子組み込んで細胞内に運び込む小型環状 DNA 分子。

補体：アレキシン。新鮮血清中に存在する 20 種類ほどのタンパク質で構成され、抗原抗体複合体や細菌細胞壁など種々の物質により活性化され、細胞溶解反応などの生物活性を表すようになる反応系。

乏突起〔神経〕膠細胞：オロゴデンドログリオーマ。神経膠細胞の１種。舌状の突起がそれぞれ別の軸索を取り巻いて髄鞘をつくり、末梢神経における鞘細胞（シュワン細胞）と同じ役割を果たす。また神経細胞を取り囲むように配列するが、これらは衛星オリゴデンドログリアと呼ばれる。

マーカー〔遺伝子〕：標識遺伝子。特定の遺伝子に突然変異を起こし、遺伝研究においてそれを標識に用いる。「Nestin」や「Musashi１」が著名。

ミエリン（鞘）：髄鞘（ｽﾞｲｼｮｳ）。脊椎動物の軸索の周囲に絶縁層を形成し、インパルス伝達のスピードを上昇させる、重なり合い、特殊化した細胞。末梢神経のシュワン細胞および中枢神経神経系の希状突起膠細胞から生じる。神経の興奮は髄鞘の切れ目（絞輪）を介して跳躍伝導される。

ミエリン由来の軸索伸長阻害因子：Nogo、Semaphorin、MAG など

ミエローマ：骨髄腫。中年以降に見られ高ガンマグロブリン血症を示す形質細胞の腫瘍性増殖性疾患。

免疫グロブリン：血清の電気泳動で移動度最小のタンパクで、構造・機能の上で密接に関連した一群の血清タンパクの総称。形質細胞とそれに類似のリンパ球で合成され、抗体活性を有す。

モノクローナル抗体：単一クローンのハイブリドーマ細胞から、生体外または同系マウスの腹水として産生される免疫グロブリン。目的の抗原の単一の抗原決定基に対してのみ、特異的に反応する抗体で力価も高い。

リガンド：巨大分子（ふつうはタンパク質）に特異的に強固に結合し、巨大分子‐リガンド複合体を形成する酵素基質以外の分子の総称。何らかの細胞応答を伴う。

レンチウイルス：レトロウイルスの一種。非分裂細胞であるニューロンや筋細胞などにも効率的に感染し、宿主染色体に組み込まれ長期間の発現が維持される。レンチウイルスベクターとしては HIV-1 ベクターが代表的

2)

AADC：芳香族アミノ酸脱炭酸酵素

AAV：アデノ随伴ウイルス。レンチウイルスとともに非分裂細胞に遺伝子導入ができ長期的な遺伝子発現が可能であり、病原性もないことから中枢神経系への遺伝子導入に最も適しているといわれる。臨床段階での大量調製が難しい。

AchE：アセチルコリンエストテラーゼ

BDNF：脳由来神経栄養因子。神経栄養因子の１つ。

bFGF：塩基性繊維芽細胞増殖因子　basic fibroblast growth factor

BMP：骨形成たんぱく質

BrdU：標識遺伝子の１つ、ブロモデオキシウリジン、臭化デオキシウリジン　bromodeoxyuridine

CNS：中枢神経系

CNTF：毛様体神経栄養因子

CRMP-2：collapsin response mediator protein-2. 神経再生に関係すると思われる分子。Semaphorin 3A の下流分子として同定され、発生における軸索の運命決定に関与。微小管タンパク質に結合しその安定化能をもつ。神経突起退縮活性をもつ Rho キナーゼによりリン酸化されるとその機能を失う。末梢神経損傷時に損傷ニューロンで誘導されることから、神経軸索再生時の軸索伸展に重要な役割を担っていることが予測される。

CSPG：コンドロイチン硫酸プロテオグリカン

DA：ドーパミン

DAPI：ジアミジノフェニルインドール

EG 細胞：embryonic germ cell

EGF：上皮増殖因子　epidermal growth factor

EGFP：変異型緑色蛍光タンパク質　Enhanced green fluorescent protein

ex vivo：（エクスビボ）　多細胞生物の実験において、生体機能の一部を組織培養系あるいは組織培養系で行わせることをいう。

FACS：蛍光自動細胞分離分析装置

FGF：繊維芽細胞増殖因子

GalC：ガラクトセレブロシド

GDNF：グリア細胞由来神経栄養因子

GCH：GPT シドロヒドラーゼ。

GFAP：グリア繊維状酸性タンパク質

GPT:グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナー60ゼ＝アラミンアミノトランスフェラーゼ（ALT）。ほぼ全身の細胞に分布、血清 ALT の高値は細胞から炎症、壊死、損傷などによる血中への逸脱の存在を示す。

HGF：肝細胞増殖因子

HIV-1 ベクター：代表的なレンチウイルスベクター

ICM：胚盤胞の初期胚に存在する内部細胞魂（inner cell mass）

IL：インターロイキン　→サイトカインを参照

in vitro：（インビトロ）試験管内（生体外）の

in vivo：（インビボ）生体内の

IRB：施設内倫理委員会

L-DOPA：レポドーパ。メラニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンの前駆体としてパーキンソン病治療に有効である。

LIF：白血病抑制因子　leukemia inhibitory factor

MAG：ミエリン由来の糖タンパク質。軸索伸長阻害因子。myelin associated glycoprotein

MAO-B：モノアミン水酸化酵素Ｂ

MAP2：微小管付随タンパク質２

MHC 遺伝子：主要組織〔適合〕遺伝子。特定の染色体の特定の部位に同種移植片拒絶、細胞性免疫、MLR（リンパ球混合美容反応）、免疫反応調節、補体活性、疾病感受性などを支配する遺伝子群。高等動物に存在する。

Musashi Ⅰ：神経系前駆細胞のマーカー。RNA 結合性タンパク質で、種間でその構造が非常によく保存されており、Musashi Ⅰ抗体を用いることにより様々な種の神経系前駆細胞を同定することができ、神経幹細胞を含む神経系前駆細胞の有用なマーカーと考えられている。

Nestin：神経幹細胞のマーカーである中間径のフィラメント

NGF：神経成長因子

Nogo-A：軸索伸長を強く抑制するミエリンタンパク質

NT：ニューロトロフィン　神経栄養物質

ｐ53：がん発現遺伝子の１つ

PA６：ストローマ細胞

PDGF：血小板由来成長因子

PDNF：血小板由来神経栄養因子

PET：ポジトロン断層撮影

PLP：ミエリン特異的マーカー

PNS：末梢神経

RA：レチノイン酸。天然のビタミン A の酸化生成物。上皮の増殖維持、悪性細胞の抑制にも働く。

RMP：rostral migratory pathway　脳室周囲帯から嗅球へ神経前駆細胞が移動する通り道

scaffold：足場

SCG10：ニューロン特異的発現遺伝子。成長円錐に存在し、微小管を崩壊することにより神経突起の伸長を誘導する。

SCIDマウス：重症免疫不全マウス

SKPs：皮膚由来の前駆細胞

SVZ：脳室下帯。嗅球における神経新生などに関与。
subventricular zone

TGF-α：トランスフォーミング増殖因子α

TH：チロシン水酸化酵素

TNF：腫瘍壊死因子

■