

脊髄再生を目指した基礎研究



医療と技術

岡田 誠 司*

Spinal Cord Regeneration by the Basic Research

Key Words : Spinal cord injury, Cell therapy, Glial scar

脊髄損傷

脊髄損傷は整形外科疾患の中でも最も悲惨な病態の一つである。発生率は近年減少傾向にはあるが、軽微な転倒等による高齢者の非骨傷性頸髄損傷が増加している。急性期管理の向上によりその死亡率は劇的に減少したものの、永続的な四肢麻痺や感覚障害を中心として、膀胱直腸障害・褥創・痙縮などの合併症に苦しんでいる患者総数は10万人以上と言われている。脊髄損傷に対して現在行なわれている臨床現場での治療は、麻痺を対象としたものではなく、急性期の全身管理の他、脱臼や骨折部を手術により除圧整復・安定化させ更なる麻痺の増悪を予防するための処置であり、脊髄自体にアプローチするものは存在しない。1990年代に動物実験や臨床治療により有効性が報告された急性期ステロイド大量療法は、期待されたほどの効果は得られず、最近ではその有効性を疑問視した報告が散見されるようになり、現在は見直しの時期に入っているとよい。ステロイド以外にも、ガングリオシド GM-1、NメチルDアスパラギン酸受容体拮抗剤、ナロキソンなどの『神経保護薬』を用いた急性期脊髄損傷に対する臨床治療が行なわれ、現在でもミノサイクリンやエリスロポイエチン、G-CSFなどの薬剤、あるいは神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた臨床治療が進行中である。しかしながら現在までのところ、

実際のせき損患者臨床治療で治療と呼べるほどの効果が確立されたものは存在せず、動物実験と臨床治療の乖離や臨床応用への難しさが改めてクローズアップされる結果となっている。この乖離の原因を明らかにし、せき損患者に福音をもたらす治療法確立のためには、せき損の急性期から慢性期に至るまでの病態を詳細に解析し、実際にせき損患者の臨床に携わっている整形外科医の視点から治療戦略を整理する必要があると著者は考えている。本稿では、これまでの基礎実験の結果とせき損患者の臨床データをふまえて脊髄損傷の病態について概説し、今後の治療研究の展望について考察したい。

二次損傷と反応性アストロサイト

上述のステロイドを含めた急性期薬剤治療の根拠は、1970年代以降に積極的になされた損傷脊髄の病態生理学的な研究にある。損傷時の直接的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古くから提唱されている。病理的観察により、脊髄は損傷後数十分で血管透過性亢進による小出血斑が確認され、数時間のうちに灰白質および白質の浮腫、虚血、出血巣が出現し、局所の微小循環が破綻し栄養や酸素不足による周囲の神経細胞の進行性壊死に進展することが示された。これらの過程での細胞内 Ca^{2+} の蓄積と細胞外 K^{+} の濃度上昇は neuronal circuit としての脊髄の機能を破綻させ、臨床的には損傷高位以下の全ての脊髄反射が消失するいわゆる spinal shock と呼ばれる状態となり、この状態が数時間から数週間続く。また、微小循環の破綻と同時に損傷後数分から数週に渡りフリーラジカルや興奮性の神経伝達物質（主にグルタミン酸）、NO、炎症性サイトカインの発現が過度に亢進し、アポトーシスを含むさらなる組織障害を引き起こす



* Seiji OKADA

1973年7月生まれ
九州大学医学部卒業 (1999年)
慶應義塾大学医学部大学院卒業 (2006年)
現在、大阪大学大学院 医学系研究科
器官制御外科学 (整形外科)
教授 医学博士
専門/整形外科学、脊椎脊髄外科学
TEL : 06-6879-3550
FAX : 06-6879-3559
E-mail : seokada@ort.med.osaka-u.ac.jp

と考えられている。これらのサイトカインはニューロンやアストロサイト自身が産生すると同時に血液脊髄関門の破綻による循環系から流入した好中球やマクロファージからも産生される。このような一連の続発的組織破綻を、様々な薬剤や抗体を用いて二次的損傷を抑制することで、麻痺の改善を促したとする動物実験の報告は多数あり、続発的な組織崩壊を軽減させることが脊髄損傷治療研究の一つの大きな柱となっている¹⁾。しかし、臨床の現場でせき損患者の治療に携わっていると、この“二次損傷”を意識する機会は殆ど無い。著者は2000年以降、労働福祉事業団総合せき損センターにて数多くのせき損患者の治療に携わってきたが、実際の脊髄損傷患者の麻痺の動態は損傷直後が最もシビアであり、不全麻痺であればほぼ例外なく亜急性期にかけて麻痺の回復が見られた。損傷後急性期に麻痺の悪化が見られる患者もいるが僅か数%であるし、これらの麻痺もいずれ回復するため損傷後に麻痺の恒久的な悪化が残る患者はほとんどいない。二次損傷が麻痺に与える影響がcriticalなものであれば実際には損傷後に麻痺の悪化が見られる患者は数多いはずであるし、薬剤投与により二次損傷が軽減するのであれば臨床治験等でもより劇的な効果が確認されるはずである。

著者はこの“急性期から亜急性期にかけての機能回復”という事実と、せき損に関するあらゆる教科書や総説論文に描写されている“二次損傷”とのdiscrepancyを解明するため、マウス脊髄損傷モデルを用いて経時的な組織切片および運動機能の解析を詳細に行った²⁾。その結果、確かに損傷後数日の切片ではニューロンやグリア細胞そのものの脱失が経時的に拡大し、その一部はcaspase3陽性のアポトーシスによる二次的な損傷拡大と考えられ、組織学的には確かに二次損傷が生じることが確認できたが、この時期には機能的な回復はほとんど見られなかった。しかし、損傷後1週間前後で拡大した損傷部周囲では、アストロサイトが反応性に細胞肥大や突起伸展といった形態変化を起こし反応性アストロサイトと呼ばれるようになるが、この細胞が損傷亜急性期には徐々に損傷中心部へ向かって移動し、浸潤した炎症細胞や損傷部を収束させ、結局損傷後2週以降の切片に於いては機械的損傷と同程度の幅のtissue disruptionに落ち着くということが明らかと

なった。すなわち、二次損傷による損傷部の拡大は確かに存在するが、拡大した損傷部は拡大したままではなく、修復機転によりほぼ一次損傷と同等の空間的損傷に還元するということが明らかとなった。さらに注目すべき事に、ちょうどこの時期と対応して運動機能の回復が見られた。これまで反応性アストロサイトはグリア瘢痕を形成し、物理的にも化学的にも軸索再生に対し阻害的な働きをされると考えられており、中枢神経系で再生がおこらない原因のひとつと考えられていたが、この実験の結果から、反応性アストロサイトが実はグリア瘢痕を形成する過程で組織修復に積極的に関わっており、さらに損傷後亜急性期の機能回復に重要な役割を果たしていることが示唆された²⁾。この修復機転のために、二次損傷による麻痺の悪化が顕在化しにくいものと推測している。反応性アストロサイトの重要性については、細胞の移動に重要な分子であるSTAT3 (signal transducers and activators of transcription) を反応性アストロサイト選択的に欠損させた結果、この修復機転が著明に阻害され、不全麻痺損傷を加えたにもかかわらず運動機能回復も認められなかったことから証明された。このシグナルの下流には亜鉛シグナルが関与しており、亜鉛欠乏ラットや亜鉛修飾蛋白欠損マウスの脳損傷後ではこの反応性アストロサイトによる修復機転が阻害されることが知られている。これらの結果は中枢神経系自身が損傷後に修復能を持つ事を初めて明らかにしたものであり、新しい中枢神経系外傷後の治療法提言に繋がるものと考えている。

反応性アストロサイトとマクロファージの相互作用

さらに我々は、この反応性アストロサイトによる組織修復機構には、損傷脊髄部に浸潤したマクロファージの能動的なmigrationとの協調運動が必須であることを最近見出した³⁾。脊髄損傷後の炎症反応は二次的な組織障害と深く関連するが、せき損後の炎症反応のトリガリングは脊髄ミクログリアが主要な役割を果たすことを過去に我々は報告した⁴⁾。近年、このミクログリアの活性化に転写因子であるInterferon Regulatory Factor (IRF)8が重要であるとの報告があり、我々もIRF8欠損マウスにおける脊髄損傷では損傷後の炎症反応が軽減し、より良好な運動機能回復が得られるものと予測し実験を行な

った。しかし非常に興味深い事に、結果は我々の予想と全く逆であり、この IRF8 欠損マウスのせき損後の病理像は反応性アストロサイト選択的に STAT3 が欠損させたマウスとほぼ同等であり、広範な脱髄と炎症細胞浸潤や運動機能回復阻害が確認された。もともと IRF8 はミクログリアを含めた組織型マクロファージや末血中の単球にしか発現していないため、なぜこのマウスが反応性アストロサイトの migration に影響を与えるのか、当初は皆目見当がつかなかった。しかも、この phenotype は IRF8 欠損マウス骨髄をドナーとし、放射線照射をしたレシピエント正常マウスでの脊髄損傷でも認められたが、逆に正常マウス骨髄をドナーとし IRF8 欠損マウスをレシピエントとした場合には認められなかったことから、ミクログリアではなく脊髄損傷部に浸潤したマクロファージに於ける IRF8 が重要な役割を果たしていることを示していた。そこで我々は、損傷脊髄に浸潤したマクロファージが能動的に損傷中心部へ向かって migration していると仮定し、脊髄損傷作成後に正常マウス由来の単球と IRF8 欠損マウス由来の単球を損傷部頭側へ移植し、経時的にその局在を追跡した。その結果、正常マウス由来の単球は宿主由来の浸潤マクロファージ同様に徐々に損傷中心部へ向かって移動することが確認されたが、IRF8 欠損単球では全く移動しないことが確認された。さらにこの移動メカニズムとしてマクロファージの補体 C5a に対する走化性と下流のプリン受容体シグナルの関与が重要であることを明らかにした。では、反応性アストロサイトと浸潤マクロファージのどちらの migration が組織修復機構に dominant であるのか調べるために、IRF8 欠損マウス由来の骨髄を、反応性アストロサイト選択的に

SOCS3 を欠損させたマウスに移植し脊髄損傷を作成した。その結果はほぼ IRF8 欠損マウスと同等であったことから、反応性アストロサイトよりも浸潤マクロファージの migration の方が dominant であることが示唆された。さらに、IRF8 シグナルの活性化が脊髄損傷後の組織修復機構を促進させることも確認しており、これは損傷後亜急性期に於ける新たな治療戦略となるものと考えている (図 1)。

癒痕形成メカニズムと可逆性

永きに亘りグリア癒痕は軸索伸張を阻害し再生を妨げると提唱されていたが、最近グリア癒痕形成反応が軸索伸張を促進するとの論文が報告され注目を浴びた⁵⁾。しかし、この論文では一見グリア癒痕そのものが軸索伸張を促進するとも受け取れる主張がなされているが、この論文で示されたのは、反応性アストロサイト自身は軸索伸張を阻害するものではなくむしろ促進させるプロファイルを示していることと、グリア癒痕形成過程、すなわち反応性アストロサイトの修復機構全体が阻害された際に著明な軸索伸張の阻害が認められることであり、決してグリア癒痕自体が軸索伸張を促進させるという結果ではない。むしろ、形成されてしまったグリア癒痕が軸索伸張反応を阻害し再生を困難にしているエビデンスは枚挙に暇無い⁶⁾。いずれにせよ、これらの混乱は正常アストロサイト、反応性アストロサイト、癒痕アストロサイトの定義自体が不明瞭であり、それぞれの phenotype を明確に区別が出来ないことが原因と考えられた。そこで我々は、正常脊髄から正常アストロサイトを、損傷亜急性期から反応性アストロサイトを、慢性期の癒痕部から癒痕アストロサイトをレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて選択的に採取し、発現遺伝子のプロファイル解析を行うことで、それぞれの phenotype で選択的に上昇している遺伝子群をマーカー遺伝子として定義した¹⁴⁾。その結果、反応性アストロサイトでは Nestin や β カテニン経路のシグナル分子などが選択的に上昇している一方で、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどの軸索伸張阻害因子の発現は低かった。逆に、これらの因子は癒痕アストロサイトで有意に上昇していた。このような複数のマーカー遺伝子の発現を指標とすることで、これまでは形態学的な分類でそれぞれの phenotype を曖昧に決定して

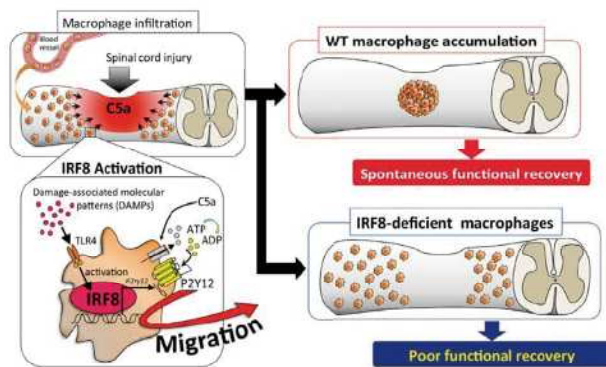


図 1

いたものを、客観的にそれぞれのアストロサイト phenotype を決定することが可能となった。

一方、細胞の表現型の変化は環境依存性に行われるものと非依存性（細胞自律性）に行われるものに大別されるが、グリア瘢痕が形成される過程でのアストロサイトの表現型変化はどちらによるものか不明であった。しかし我々は、反応性アストロサイトで選択的に GFP が発現するトランスジェニックマウスを用い、採取した反応性アストロサイトを正常脊髄あるいは損傷脊髄へ移植し、生着後にさらに LMD による選択的採取と網羅的発現遺伝子の解析を行うことにより、このアストロサイトの表現型変化は環境依存型であることを明らかにした⁷⁾。また、反応性アストロサイトが $\beta 1$ インテグリンを介した 1 型コラーゲンとの interaction により瘢痕アストロサイトへと変化することを確認した。さらに、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体を投与することにより、この反応性アストロサイトから瘢痕アストロサイトへの形質変化を *in vitro* および *in vivo* で阻害可能であることを示した⁷⁾。グリア瘢痕形成は永らく非可逆的、つまり一方通行であると考えられていたが、これらの結果はグリア瘢痕形成が可逆性を持つことを示しており、さらに瘢痕形成の軽減は損傷部を超えた軸索再生を促進し運動機能改善効果に繋がることも確認している（図2）。同時に、グリア瘢痕の manipulation が中枢神経外傷後の新たな治療戦略となることも提唱している⁷⁾。

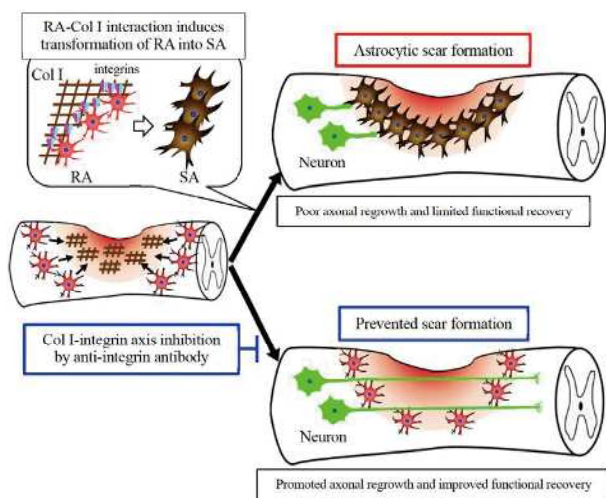


図2

細胞移植療法と急性期治療の問題点

近年の幹細胞医学の発展により、脊髄損傷も幹細胞移植で治療が可能なのではないかとの気運が高まっている。しかし、幹細胞を移植したからといって、それが即治療に直結するわけでは決して無い。誌面の都合上、細胞移植に関しては他の総説に譲るが、細胞移植療法を臨床応用する際の最も大きな障害は、腫瘍化などの細胞の安全性ももちろんであるが、それに加えて損傷後急性期から亜急性期移植でしか効果が見られない点が挙げられる。一般的に脊髄損傷に対する幹細胞移植は、損傷により欠落した細胞を補充することで病態を改善させたと考えられがちだが、それ以外にも移植細胞が『神経細胞保護効果』や『炎症反応制御』により二次損傷を改善させ、その結果として機能改善をもたらされた可能性も高いと考えられている。損傷を受けて死滅した細胞・組織の代替として移植細胞自身が損傷組織内に生着分化し機能することが細胞移植による効果であれば、当然慢性期の病態に移植しても何らかの効果は見られるはずであるが、慢性期の脳梗塞や脊髄損傷に対して神経幹細胞を移植しても全く機能改善は認められず、損傷早期に移植した場合のみ機能改善効果が確認されているからである。実際、神経細胞には分化しない骨髄間質細胞や嗅粘膜細胞移植でも、脊髄損傷急性期に移植した際に神経幹細胞と同程度の効果が確認されている。

上述のように動物実験レベルでは、急性期脊髄損傷に対しては細胞移植療法の外、多くの神経保護薬や抗炎症薬で一定の効果が報告されている。しかしながら、慢性期の脊髄損傷に効果があったとされる論文は殆ど存在せず、また方法も確立されていない。それゆえ、患者への臨床応用という観点からは急性期治療を行なうのが自然な流れであることは理解できる。しかしながら、病態急性期に治療を行なった場合、その際に認められた麻痺の改善が治療による効果であるのか、あるいは自然経過によるものであるのかを区別することはかなり困難である。これまでに行なわれた急性期脊髄損傷に対する細胞移植治療に於いても、『少なくとも有害事象は認められなかったが効果に関しては不明であり、今後の検討が引き続き必要である』と結論付けたものばかりである⁵⁾。

では、急性期の脊髄損傷において、治療介入の有

効性を証明するためにはどの程度の規模の前向き無作為試験が必要であろうか？この問題に対しては、世界 24 カ国で行なわれた急性期脳梗塞に対する Free radical scavenger NXY-059 の大規模臨床治験 (SAINT : Stroke Acute Ischemia NXY-059 Treatment) の結果が大変参考になると著者は考えている。この治験では脳梗塞発症 6 時間以内にこの薬を投与した群と、プラセボ群の神経学的予後 (modified Rankin scale) が比較され、1722 名の患者解析結果では薬剤投与群で有意に良好な神経回復が認められたと New England Journal of Medicine 誌に掲載されたが⁸⁾、翌年の同誌に報告された 3306 名の患者解析結果第 2 報では、両群に全く差が認められなかったと報告され⁹⁾、ついにこの薬は開発中止に追い込まれた。すなわち、急性期に自然回復が見られる病態に於いては、治療の効果がマスク (あるいは希釈) されるため、正確な解析は極めて困難になる良い例だと考えられ、脊髄損傷も脳梗塞同様に数千例以上の膨大な解析サンプル数が必要であることは容易に推測される。ましてや脊髄損傷の発症率は脳梗塞の比ではなく、神経保護という治療ストラテジーは脊髄損傷よりも脳梗塞の方がより適正が高いと考えられるが、脳梗塞でさえ急性期治療の現状はこの程度であるため、脊髄損傷治験ではさらなる困難が予測される。参考までに、脳梗塞では、これまでに 1000 種類以上の神経保護薬が有効であるとの動物実験結果があり、実際に臨床治験が行なわれた薬剤は実に 114 種類にのぼるが、このうちアメリカ食品医薬品局 (FDA) に認証された薬はひとつもないという衝撃の事実がある。こういった状況を考えると、動物実験レベルでの有効性と、臨床現場での有効性には如何に大きな乖離があるということが実感される。考えてみると、脊髄損傷や脳梗塞での動物実験の場合は、損傷の形態・程度・部位・性差・年齢と、ありとあらゆる条件を出来るだけ同一にして、ようやく僅かな統計学的有意差が確認されるのみであるが、一方で臨床現場ではひとつとして同一の条件を示す症例など存在しない。急性期に治療を行っても、よほど大きな効果を持つものでなければ、自然回復が含まれなおかつ症例ごとに病態が大きくばらつく臨床の疾患に対して有効性が実感できないのは当然のことであろう。そもそも、脊

髄損傷を pharmaceutical に薬で治療しようという発想は、せき損の治療を行なっている整形外科医にとっては「焼け石に水」的な感覚であり、大きな違和感を感じざるを得ない。おそらく動物実験レベルで効果の確認された脊髄損傷モデルは、臨床的に言えば中等度から軽度の脊髄損傷であり、特に治療を行わずともかなりの自然回復が見込まれる病態といえるが、真に治療効果を必要とするより重度の症例には効果を確認することが出来ないのではないかと著者は考えている。このことは、完全麻痺の患者には効果が認められなかったが、軽度の脊髄損傷には多少の効果があるのではないかと推測されているステロイド大量療法の臨床論文¹⁰⁾からも推測可能なのではないだろうか。いずれにせよ、我が国内に於いて脊髄損傷に対する臨床治験実施の基盤整備を進めることも重要であるが、急性期の脊髄損傷の病態を客観的に評価し予後予測が可能なツールを開発することと¹¹⁾、脊髄損傷のメカニズムを解明し重度の損傷に対しても劇的な効果をもたらす治療法開発へ繋げることが、確実な臨床応用へのロードマップであることは間違いない。さらにいえば、真に治療を必要としているのは実際に麻痺で困っている慢性期の脊髄損傷患者であるので、ハードルは高くとも慢性期の脊髄損傷治療研究を継続的に支援できる体制を整備することが何よりも重要であると考えている。

参考文献

1. Okada S, et al: *Inflammation and Regeneration*. 28:440-446, 2008
2. Okada S, et al: *Nat Med*, 12:829-34, 2006
3. Kobayakawa K, et al: *Sci Adv*, 5:eaav5086, 2019
4. Kumamaru H, et al: *J Cell Physiol*, 227:1335-46, 2012
5. Anderson MA, et al: *Nature*, 532:195-200, 2016
6. Silver J: *Exp Neurol*, 286:147-9, 2016
7. Hara M, et al: *Nat Med*, 23:818-28, 2017
8. Lees KR, et al: *NEJM*, 354:588-600, 2006
9. Shuaib A, et al: *NEJM*, 357:562-71, 2007
10. Tsutsumi S, et al: *Spine*, 31:2992-6, 2006
11. Kijima K, et al: *EBioMedicine*. 41:659-69, 2019