

総 説

近年の脊髄損傷治療法の発達

山崎勤¹⁾, 山田直史²⁾, 中西徹^{1,2)}

¹⁾ 就実大学 薬学部 分子臨床診断学研究室

²⁾ 就実大学大学院 医療薬学研究科

Recent development of spinal cord injury treatments

Tsutomu Yamasaki¹⁾, Naofumi Yamada²⁾, Tohru Nakanishi^{1,2)}

¹⁾ *Department of Clinical Diagnosis, School of Pharmacy, Shujitsu University,*

²⁾ *Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University*

(Received 13 November 2020; accepted 8 January 2021)

Abstract

An estimated 5,000 people suffer spinal cord injuries annually in Japan, totaling more than 200,000 patients. Spinal cord injury have been considered untreatable, but novel treatments of spinal cord injury are being established due to the development of molecular biology and regenerative medicine. Treatments using neurotrophic factors such as hepatocyte growth factor (HGF), brain- derived neurotrophic factor (BDNF), growth factor granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), and chondroitinase has been studied. In addition, treatments using iPS cells and mesenchymal stem cells has been studied, and a treatment with injections type of mesenchymal stem cells has been approved as pharmaceuticals. In the future, these treatments are expected to completely recover from spinal cord injury, but there are still problems to be solved. In particular, there is a need to improve the establishment of treatments for chronic spinal cord injury and the high cost. In our laboratory, new stem cells have been established, and it is expected that the treatment with the new stem cells will solve the problem.

Keywords: spinal cord injury; neurotrophic factor; iPS cell; mesenchymal stem cell

緒言

脊髄損傷は、交通事故、運動における事故、転倒などによって、脊髄に損傷を受け、脊髄中の運動神経や感覚神経が傷つくことで、そこから下部の運動や感覚における障害が発生する障害で

ある。完全麻痺では四肢や下肢が全く動かなくなったり寝たきりになり、呼吸や排泄も困難となることもある。現在、日本国内において 20 万人以上の脊髄損傷患者がおり、毎年 5 千人以上の新たな患者が生じている状況である¹⁾。

脊髄損傷の治療とは、広義には運動機能の回復、狭義には損傷部位の神経細胞の修復を指している。運動神経のような中枢神経は一度損傷を受けると二度と再生しないので、この脊髄損傷は不治の病と言われてきた。

脊髄損傷における従来の治療法としては、除圧や脊椎固定術などの手術による治療、理学療法や作業療法、言語聴覚療法といったリハビリテーションが主体であった。また、脊髄損傷の急性期で、炎症軽減のために抗炎症作用を持つメチルプレドニゾロンの大量投与による治療法が考案されたが²⁾、2013年に Congress of Neurological Surgeons と American Association of Neurological Surgeons が治療ガイドラインを発表し、このメチルプレドニゾロンによる治療法は有効性が懐疑的であること、治療に関連する有害事象が高いエビデンスを持って生じうることから推奨しないことが記されている³⁾。そのため、近年まで脊髄損傷の根本的な治療法がなく、新たな脊髄損傷の治療法の確立が望まれていた。

近年、分子生物学や再生医療の進歩により、脳内での中枢神経ニューロンの再構築⁴⁾や幹細胞による神経ニューロンの再生⁵⁾などが可能となっており、脊椎損傷における神経細胞再生などの根本治療への応用が期待されている。また本研究室でも iPS 細胞や間葉系幹細胞よりも低コストで治療効果の高い新規幹細胞を樹立し、新たな脊髄損傷治療法の確立に向け研究を行っている。

そこで、本稿では近年発達してきた新たな脊髄損傷の治療法の紹介とそれらの課題や展望について解説する。

脊髄損傷の病態

脊椎損傷は、受傷後からの期間によって主に3つの期間に分類される。(図1)

一つ目は急性期で、受傷時損傷とそれによる炎症が収まる期間までを指す。この急性期における損傷としては、機械的外力による損傷を一次損傷、それに続く自己崩壊的な組織障害を二次損傷と定義される⁶⁾。一次損傷において、受傷時にどれだけの強さと衝撃が脊椎に加わるかがその後の損傷に影響してくる。二次損傷では浮腫や出血により損傷部位周辺に塞栓が生じ、血流障害から内皮細胞やグリア細胞の死滅とそれに伴うマクロファージやミクログリアの浸潤が起こり、炎症が惹起されて周辺組織の損傷が促進する⁷⁾。また、炎症に伴うサイトカイン放出やフリーラジカルにより、Na イオンや Ca イオンが神経軸索内へ流入し、イオンバランスが崩壊し神経伝達物質であるグルタミン酸が過剰に放出され、シナプス後神経で大量にグルタミン酸取り込みが起こり、軸索内で浮腫が増強し神経細胞のアポトーシスが促進される⁸⁾。このように急性期では受傷から約1週間は強い炎症反応が続く。

二つ目は亜急性期で、受傷後の約2～4週の期間を指す。亜急性期では炎症反応が収まり神経

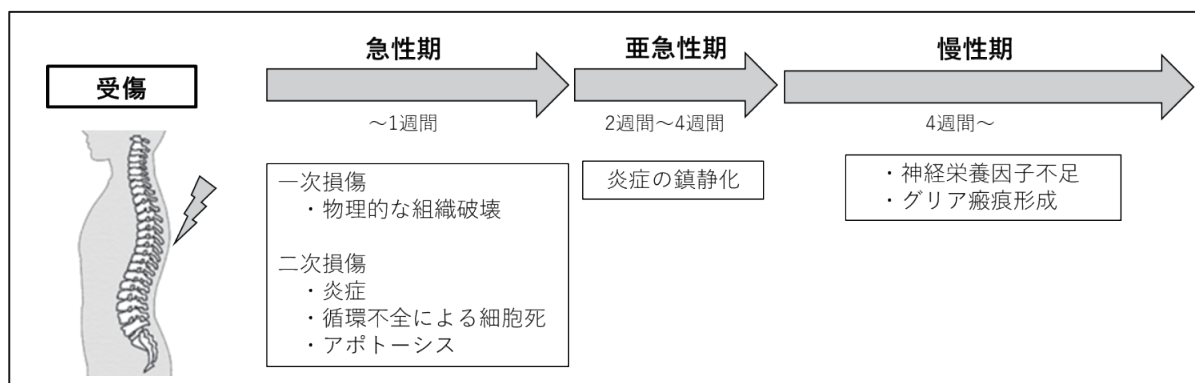


図1 脊髄損傷の病態

細胞の修復または再生の治療効果が最も得られる時期である。

三つ目は慢性期と呼ばれ、損傷部の血流不全や分泌細胞の減少による神経栄養因子不足や損傷により反応性アストロサイトの重合を起こすことによるグリア瘢痕形成が生じる⁹⁻¹⁰⁾。グリア瘢痕ではコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) などの軸索伸長阻害因子を豊富に含むため軸索伸長が阻害されて神経細胞やシナプスの再生が抑制されてしまい、この時期の治療は困難であると言われている。

神経栄養因子などによる脊髄損傷治療

神経細胞の研究や神経系の分化・発達の研究により、神経細胞の分化および成長には様々な神経栄養因子や増殖因子が関わっていることが明らかになっている^{11,12)}。特に最近の研究において神経栄養因子の Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や、増殖因子の Hepatocyte growth factor (HGF)、Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)、およびコンドロイチナーゼなどは脊髄損傷における臨床応用が期待されており、これらを用いた治療法の機序や効果について紹介する。

・ BDNF

BDNF は神経栄養因子とも呼ばれ 119 個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、二量体の形で存在する。高親和性 BDNF 受容体 (別名: TrkB 受容体) は 822 個のアミノ酸からなる糖蛋白質で、膜貫通ドメインを 1 つ持ち、細胞質ドメインにはチロシンキナーゼ活性を有し、BDNF と結合して BDNF-TrkB シグナル伝達経路が活性化し、シナプス末端のレセプター発現増加により伝達効率を増強する作用やそれに伴う神経細胞への長期間の刺激を誘発する。このことにより BDNF は神経細胞の分化・増殖や神経突起の伸長に関わる因子として知られている。

BDNF は動物モデルにおいて、脊髄損傷時に

神経細胞の生存や維持に関与していることが明らかになっている¹³⁾。また、脊髄損傷急性期においては、炎症反応によりシナプスの切断が連続的に引き起こされるが¹⁴⁾、動物実験においてウイルスベクターに組込んだ BDNF 遺伝子を発現させると、シナプス同士の接続数を増加させ、運動機能の回復が見られた¹⁵⁾。また、2016 年に BDNF を分泌する間葉系幹細胞を脳へ移植する臨床実験で安全性が確認されており¹⁶⁾、近年の脊髄損傷動物モデルでは、細胞外マトリックスであるラミニン $\alpha 1$ の一部である IKVAV モチーフを結合させた、チロシンとグルタミン酸およびリジンで構成された自己集合ペプチド (Ac-EYKYEYKY-NH₂) などの両親媒性物質ゲルに BDNF を含ませ、それを移植することにより急性期～亜急性期にかけて BDNF を持続的に投与する実験も行われており、運動機能の回復など有意な有効性が認められている¹⁷⁾。

これらの事より、BDNF は急性期におけるシナプスの切断や、亜急性期に起こる神経細胞修復に伴う増殖や神経突起の伸長などに関与しており、急性期から亜急性期まで持続的に投与することが望ましいと考えられる。しかしながら、慢性期の脊髄損傷で治療効果があったという報告はなく、またヒトでの治療効果についても今後研究していく必要がある。

・ HGF

HGF は肝細胞の増殖因子として発見されたものであり、その受容体の c-Met も同定されている¹⁸⁻²⁰⁾。HGF は肝以外の組織でも細胞増殖や分化を促進し、損傷組織の修復に重要な役割を果たすことが知られている²¹⁾。しかしながら、脊髄損傷患者においては神経細胞で受容体 c-Met の発現が上昇するのに対し、神経細胞による HGF 産生はほとんど見られなかった。そこで HGF 遺伝子を挿入したウイルスベクターを脊髄へ注入すると、HGF 遺伝子ウイルスベクターを投与した群では脊髄損傷の急性期においてニュー

ーロンおよびオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制し、血管新生を促すことが確認され、セロトニン繊維の再生を促し、運動機能も有意に回復することが明らかになった²²⁾。また別の実験ではラット頸椎切断モデルで HGF を過剰発現する間葉系幹細胞の移植を行うと、HGF は TGF の発現を抑制する抗炎症作用を示し、炎症に伴うアポトーシスや反応性アストロサイトの活性を低下させることが報告されている²³⁾。さらに、組換え HGF を霊長類（マーモセット）脊髄損傷モデルに投与する実験も行っており、長期にわたる安全性や、急性期での四肢運動機能が有意に改善されるなど HGF の投与による脊髄損傷治療の有効性が確認されている²⁴⁾。現在では組換え HGF 蛋白の髄腔内投与の安全性および有効性を確認するための臨床試験（Phase I/II）が行われておりヒトへの有効性の調査中である。

このように HGF では急性期での抗炎症作用や亜急性期での神経細胞修復などで効果を示しており、臨床試験も行われていることから脊髄損傷の新たな治療法として期待される。しかしながら HGF は BDNF と同様に慢性期の脊髄損傷治療に関する報告はなく、急性期～亜急性期脊髄損傷患者に限定的な治療法となる可能性が考えられる。

・ G-CSF

G-CSF は顆粒球の分化・増殖に関与するサイトカインであり、骨髄間質細胞や単球、血小板などで分泌されるが、神経系でも脊髄損傷モデルラットで神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトでの発現が認められている²⁵⁾。脊髄損傷において分泌された G-CSF は、STAT3 経路が活性化され、結果として抗アポトーシス蛋白である bcl-2 遺伝子の発現が上昇し、抗アポトーシス作用を示すことが確認されている。また、亜急性期の脊髄損傷ラットモデルを用いた実験では神経細胞の髄鞘の保護を行っている他、オリゴデンドロサイトの生存性も高めていること

が明らかになった^{26,27)}。さらに、G-CSF はミエロペルオキシダーゼや脂質酸化反応の活性を抑制し、急性期の脊髄損傷における炎症性サイトカインの発現を抑制することが分かった^{25,28)}。加えて HGF や fibroblast growth factor (FGF) の発現を促進し、血管新生作用にも関与することが明らかになった²⁹⁾。これらのことから G-CSF の脊髄損傷における治療効果が期待され、2012 年から臨床試験が行われ、安全性の確認や脊髄損傷患者への G-CSF 投与により運動スコアなどで有効性が認められている^{30,31)}。

G-CSF は前述 BDNF や HGF などと同様に急性期や亜急性期までの脊髄損傷の治療に効果的で、その作用機序も明らかになっているものが多く、臨床試験も行われており安全性やヒトへ効果も認められているため、今後の臨床での活用が期待される治療法の一つである。

・ コンドロイチナーゼ

現在では様々な神経栄養因子や増殖因子が脊髄損傷の治療に効果を上げているが、それらは主に抗炎症やアポトーシスの抑制、細胞増殖、神経細胞の伸長など急性期に作用するものが多く、慢性期の脊髄損傷の治療では、効果が薄いと考えられる。その原因の一つとして、亜急性期から慢性期では損傷部に反応性アストロサイトや CSPG が沈着し、グリア瘢痕を形成することにより、神経細胞の軸索伸長や増殖を阻害しているからだと考えられている。このグリア瘢痕はコンドロイチナーゼで分解することが出来、その結果として脊髄損傷動物モデルにおいて運動・知覚機能が改善されたことが報告されている^{32,33)}。

このコンドロイチナーゼは既に日本でヘルニアの治療薬として臨床使用されており安全性なども確認されていること³⁴⁾から、コンドロイチナーゼ単体または他の神経栄養因子や増殖因子と合わせて慢性期の脊髄損傷治療に用いられることが期待される。

幹細胞を用いた脊髄損傷治療

幹細胞に関する研究の発展により、損傷した神経細胞そのものを再生しようとする再生医療が注目を集めている。特に1990年にヒトの骨髄で間葉系幹細胞が発見されたこと³⁵⁾や2006年の京都大学の山中伸弥教授によるiPS細胞の樹立³⁶⁾などは神経細胞を再生するという脊髄損傷の再生医療において画期的な発見であった。iPS細胞による治療はおもに慶応義塾大学の岡野栄之教授のグループによって研究されており、間葉系幹細胞による治療は札幌医科大学の本望修教授と山下敏彦教授によって研究され「ステミラック注」として保険適用と薬価収載が承認されるに至っている。以下はこれら幹細胞による脊髄損傷治療について紹介する。

・iPS細胞を用いた脊髄損傷治療

以前より受精卵から樹立したES細胞を脊髄損傷モデル動物に投与し運動機能が回復することが報告されてきた³⁷⁾が、倫理的観点からヒトに対する臨床応用はほぼ不可能であった。しかしながら、iPS細胞の樹立により倫理問題をクリアできることから、ヒトにおける神経細胞の再生医療の道が開かれることになった。2006年より京都大学と慶応義塾大学でiPS細胞を用いた脊髄損傷治療の研究が開始された。亜急性期脊椎損傷モデルマウスを用いた実験では運動機能の回復、運動誘発電位の改善、移植細胞のニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化、ドナーとレシピエントの神経細胞によるシナプス形成など有効性を示すデータが得られている^{38,39)}。しかしながら、iPS細胞のクローンによっては奇形種や神経系腫瘍へ変異するものもあり、臨床応用に対して厳密な安全性を確立する必要があることが指摘されている⁴⁰⁾。

また、自家細胞からのiPS樹立などは時間と費用が非常にかかるため、京都大学iPS研究所(CiRA)による「iPS細胞バンク」の計画も進められている⁴¹⁾。このiPS細胞バンクではHLAホ

モ接合体のiPS細胞を作成し、腫瘍化試験や長期安定試験、ウイルス試験などの安全試験をあらかじめクリアしたiPS細胞クローンがストックされており、これらの細胞バンクにあるクローンを用いての臨床試験が計画されている。(図2)

iPS細胞による脊髄損傷治療は、亜急性期の神経細胞の再生という意味では非常に有効な治療法であり、その効果も実証されつつある。一方で、その作用機序から急性期における炎症作用などの二次損傷に対しての治療効果は薄いと考えられる。また、慢性期ではグリア瘢痕や軸索伸長阻害によって治療効果が弱まってしまうことが予想され、現状では限られた患者の治療にしか効果がないと考えられる。今後iPS細胞を用いて慢性期脊椎損傷患者にも効果の治療法が開発されることを期待する。

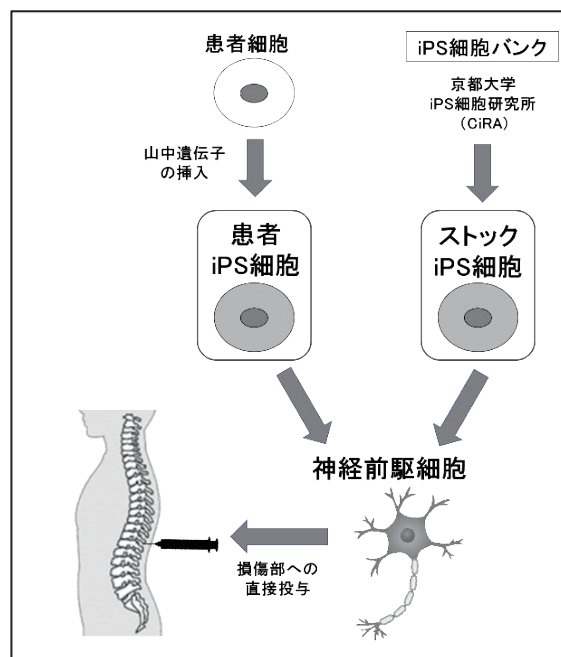


図2 iPS細胞による脊髄損傷治療

・間葉系幹細胞を用いた脊髄損傷の治療

間葉系幹細胞は間葉系に属する細胞への分化能をもつとされる細胞で、骨髄や結合組織中に存在することが明らかにされている⁴²⁾。また、

脳内に投与した骨髄間質細胞が定着し、中枢神経疾患が回復することが報告されており^{43,44)}、これらの骨髄間質細胞に間葉系幹細胞が混在していたことから、間葉系幹細胞の中枢神経系疾患の治療に応用するというアイデアが考えられた。

間葉系幹細胞は中枢神経損傷部位に投与されると神経細胞や血管細胞、血管平滑筋に近い細胞へ分化し、失われた機能を回復することが報告されている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。さらに間葉系幹細胞からHGFやBDNFなどの神経栄養因子が分泌されており、損傷時のダメージから細胞を保護することが分かっている⁴⁹⁾。これらの結果から、最初に脳梗塞治療へ間葉系幹細胞の投与臨床試験が行われ、安全性や有意な回復が確かめられ⁵⁰⁻⁵²⁾、その後、脊髄損傷患者への臨床試験も行われた。

そして、2018年に札幌医科大学と株式会社ニプロが脊髄損傷患者に対し「ステラミック注」という製品名で製品化され、期限および条件付き承認として保険適用されている。この「ステラミック注」は脊髄損傷患者の骨髄液または末梢血より、間葉系幹細胞を分離・増殖させた後に静脈注射によって患者へ投与するものである(図3)。

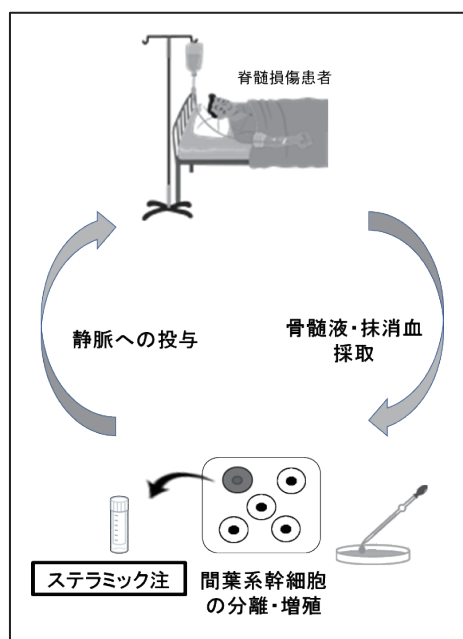


図3 ステラミック注による脊髄損傷治療

「ステラミック注」を含めた間葉系幹細胞の脊髄損傷治療は、HGFやBDNFなどの分泌による急性期での二次損傷に対し効果が伺えること、また間葉系幹細胞が、神経細胞やその周辺の血管への分化がみられることから亜急性期の治療にも効果があると考えられる。しかしながらiPS細胞の時同様に慢性期の脊髄損傷患者に対しては効果が薄いことも予想される。

間葉系幹細胞は分離される組織や時期、培養条件等により性質・特性が異なることがあり、組織から分離する際に均一な存在でなく細胞群として分離されることから、一律で安定的な効果が得られるかどうかという点が懸念され、今後の間葉系幹細胞の分離法などでより研究を進めてゆく必要があると考えられる。

・脊椎損傷治療の課題と展望

幹細胞や因子または酵素などにより、不可能と言われていた神経細胞の修復や再生が可能になり、脊椎損傷における新たな治療法の確立が期待されている。しかしながら、これらが実際に患者の治療のために用いられるにはさらなる課題や問題が存在する。

課題の一つとして挙げられるのが慢性期の脊椎損傷患者の治療についてである。現在の脊椎損傷患者はその大部分が慢性期脊椎損傷であるが、先にあげた神経栄養因子や増殖因子、幹細胞移植での治療はコンドロイチナーゼ治療を除き、すべて急性期～亜急性期の脊椎損傷に対する効果であり、同様の治療を慢性期脊椎損傷に対して行ってもその効果は限定的である^{53,54)}。慢性期脊椎損傷では、グリア瘢痕や長期における身体不随生活における治療抵抗性を示す廃用性筋委縮などが治療効果を下げていると考えられ、コンドロイチナーゼ治療と併用治療^{55,56)}や、リハビリテーションを併用^{57,58)}することで慢性期への治療効果を向上させることが報告されており、臨床治療に応用できるための研究を進めていく必要がある。

もう一つの課題として、特に幹細胞による再生医療による治療法では非常にコストが高くなることがあげられる。実際に製品化された間葉系幹細胞の治療薬「ステラミック注」が2019年に薬価収載される際には1495万7755円となっており、また脊椎損傷の治療ではないが、iPS細胞を用いた加齢黄斑変性の治療では約1億円の費用が掛かったと言われており、幹細胞の再生医療コストが問題視されている。この解決法として、細胞バンクやより低コストの細胞増殖・分化方法の確立が切望されている。

当研究室でも、間葉系幹細胞やiPS細胞よりも維持・分化コストが低く、安定して増殖する新規幹細胞クローンを見出した。この新規幹細胞は、12時間～24時間で2倍に増殖し、iPS細胞と比較すると2倍以上の速度で増殖することが分かっている。また、一般的に皮膚由来iPS細胞の場合でも神経誘導培地を用いて分化させると14日以上かかるが、新規幹細胞を同様に神経誘導培地で分化させると、5日～7日で神経細胞への分化が可能であった（データ未発表）。さらに神経栄養因子を大量に分泌しており、動物実験では亜急性期の脊髄損傷治療モデルラットに投与した場合、投与後2週間後では歩けなかったラットが自力で歩行できるようになるなど、間葉系幹細胞のみのコントロール群よりも高い治療効果が見られた（データ未発表）。この新規幹細胞は現在特許申請を行っており、その内容は特許庁の公開特許公報でも開示されている⁵⁹⁾。

新規幹細胞による脊髄損傷治療では、現在亜急性期の脊髄損傷モデルでの治療効果しか確認されていないが、コンドロイチナーゼなど他の治療法と併用することにより、低コストで慢性期脊髄損傷を治療できる新しい治療法を確立することが期待される。

以上のことをまとめると、未だ臨床応用にまで至った新たな脊髄損傷治療法は「ステラミック注」のみであり、その「ステラミック注」も

脊椎損傷患者の大多数をしめる慢性脊髄損傷を治療薬としては用いられていない。慢性期で唯一の治療効果が見られたコンドロイチナーゼは、その作用機序からBDNFやHFG、G-CSFそしてiPS細胞や間葉系幹細胞、新規幹細胞の移植と併用することで今まで治療できなかった慢性期脊髄損傷患者の道が開ける可能性がある。

また、神経栄養因子や増殖因子、そしてコンドロイチナーゼなどを分泌する新たな幹細胞などを樹立することで、急性期から慢性期まで広く脊髄損傷の治療出来る治療法を開発できるのではないと思われる。当研究室が樹立した新規幹細胞は神経栄養因子を分泌していることが確認されており、今後コンドロイチナーゼの分泌についても調べつつ、慢性期脊髄損傷の治療に効果があるかを調べてゆくことが重要である。

引用文献

- 1) Tsukamoto A, Uchida N, Capela A, Gorba T, Huhn S.: Clinical translation of human neural stem cells., *Stem Cell Res Ther*, 4 : 102 (2013).
- 2) Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W.: Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study., National Acute Spinal Cord Injury Study., *JAMA*. 277(20):1597-604 (1997).
- 3) Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Rozzelle CJ, Ryken TC, Theodore N.: Pharmacological therapy for acute spinal cord injury., *Neurosurgery*, 2:93-105 (2013).

- 4) Björklund A, Stenevi U.: Intracerebral neural implants: neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries., *Annu Rev Neurosci*, 7:279-308 (1984).
- 5) Okano H.: Stem cell biology of the central nervous system., *J Neurosci Res.*, 69(6):698-707 (2002)
- 6) Tator CH, Fehlings MG.: Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms., *J Neurosurg*, 75(1):15-26 (1991).
- 7) Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH.: Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury., *Front Cell Neurosci*, 13(10):98 (2016).
- 8) Park E, Velumian AA, Fehlings MG.: The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration., *J Neurotrauma*, 21(6):754-74 (2004).
- 9) 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(1):313-325 (2003).
- 11) Watanabe M, Fujimura Y, Nakamura M, Yato Y, Ohta K, Okai H, Ogawa Y.: Changes of amino acid levels and aspartate distribution in the cervical spinal cord after traumatic spinal cord injury., *J Neurotrauma*, 15(4):285-93 (1998).
- 11) Awad BI, Carmody MA, Steinmetz MP.: Potential role of growth factors in the management of spinal cord injury., *World Neurosurg*, 83(1):120-131 (2015).
- 12) Harvey AR, Lovett SJ, Majda BT, Yoon JH, Wheeler LP, Hodgetts SL.: Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time?, *Brain Res*, 1619:36-71 (2015).
- 13) Diener PS, Bregman BS.: Neurotrophic factors prevent the death of CNS neurons after spinal cord lesions in newborn rats., *Neuroreport*, 3;5(15):1913-7 (1994).
- 14) Takano M, Kawabata S, Komaki Y, Shibata S, Hikishima K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Inflammatory cascades mediate synapse elimination in spinal cord compression., *J Neuroinflammation*, 4;11:40 (2014)
- 15) Charsar BA, Brinton MA, Locke K, Chen AY, Ghosh B, Urban MW, Komaravolu S, Krishnamurthy K, Smit R, Pasinelli P, Wright MC, Smith GM, Lepore AC.: AAV2-BDNF promotes respiratory axon plasticity and recovery of diaphragm function following spinal cord injury., *FASEB J*, 33(12):13775-13793 (2019).
- 16) Deng P, Torrest A, Pollock K, Dahlenburg H, Annett G, Nolte JA, Fink KD.: Clinical trial perspective for adult and juvenile Huntington's disease using genetically-engineered mesenchymal stem cells., *Neural Regen Res*, 11(5):702-5 (2016)
- 17) Hassannejad Z, Zadegan SA, Vaccaro AR, Rahimi-Movaghar V, Sabzevari O.: Biofunctionalized peptide-based hydrogel as an injectable scaffold for BDNF delivery can improve regeneration after spinal cord injury., *Injury*, 50(2):278-285 (2019).
- 18) Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S.: Hepatocyte growth factor attenuates cerebral ischemia-induced learning dysfunction., *Biochem Biophys Res Commun*, 319(4):1152-1158 (2004)
- 19) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor., *Nature*, 1989 342(6248):440-3 (1989).
- 20) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA.: Identification of the hepatocyte growth factor

- receptor as the c-met proto-oncogene product., *Science*, 251(4995):802-804 (1991).
- 21) Funakoshi H, Nakamura T.: Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications., *Clin Chim Acta*, 327(1-2):1-23 (2003).
- 22) Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, Miyazawa D, Shibata S, Funakoshi H, Miyatake S, Coffin RS, Nakamura T, Toyama Y, Okano H.: Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury., *J Neurosci Res*, 85(11):2332-42 (2007)
- 23) Jeong SR, Kwon MJ, Lee HG, Joe EH, Lee JH, Kim SS, Suh-Kim H, Kim BG.: Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury., *Exp Neurol* 233(1):312-22 (2012)
- 24) Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.: Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury., *PLoS One*, 6(11):e27706 (2011)
- 25) Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, Miyashita T, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M.: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats., *PLoS One*, 7(11):e50391 (2012)
- 26) Pitzer C, Klusmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A.: The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury., *J Neurochem* 113(4):930-42 (2010)
- 27) Osada T, Watanabe M, Hasuo A, Imai M, Suyama K, Sakai D, Kawada H, Matsumae M, Mochida J.: Efficacy of the coadministration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor in the activation of intrinsic cells after spinal cord injury in mice., *J Neurosurg Spine*, 13(4):516-23 (2010)
- 28) Chen WF, Chen CH, Chen NF, Sung CS, Wen ZH.: Neuroprotective Effects of Direct Intrathecal Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Rats with Spinal Cord Injury., *CNS Neurosci Ther*, 21(9):698-707 (2015)
- 29) Kawabe J, Koda M, Hashimoto M, Fujiyoshi T, Furuya T, Endo T, Okawa A, Yamazaki M.: Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor and relationship to promotion of angiogenesis after spinal cord injury in rats: laboratory investigation., *J Neurosurg Spine*, 15(4):414-21 (2011)
- 30) Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Yamauchi T, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi K, Koda M.: Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial., *Eur Spine J*, 21(12):2580-7 (2012)
- 31) Inada T, Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Someya Y, Ikeda O, Hashimoto M, Suda K, Kajino T, Ueda H, Ito Y, Ueta T, Hanaoka H, Takahashi K, Koda M.: Multicenter prospective nonrandomized controlled clinical trial to prove neurotherapeutic effects of granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: analyses of follow-up cases after at least 1 year., *Spine*, 39(3):213-9 (2014)

- 32) Bradbury EJ, Carter LM.: Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury., *Brain Res Bull*, 10;84(4-5):306-16 (2011)
- 33) Muir E, De Winter F, Verhaagen J, Fawcett J.: Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC., *Exp Neurol*, 321:113032 (2019)
- 34) Matsuyama Y, Chiba K, Iwata H, Seo T, Toyama Y.: A multicenter, randomized, double-blind, dose-finding study of chondroitinase in patients with lumbar disc herniation., *J Neurosurg Spine*, 28(5):499-511 (2018).
- 35) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells., *Science*, 2;284(5411):143-7 (1991).
- 36) Takahashi K, Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors., *Cell*, 25;126(4):663-76 (2006).
- 37) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.: Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury., *PLoS One*, 6;4(11):e7706 (2009)
- 38) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H.: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury., *Proc Natl Acad Sci USA*, 13;107(28):12704-9 (2010).
- 39) Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H.: Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice., *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(40):16825-30 (2011).
- 40) Sugai K, Fukuzawa R, Shofuda T, Fukusumi H, Kawabata S, Nishiyama Y, Higuchi Y, Kawai K, Isoda M, Kanematsu D, Hashimoto-Tamaoki T, Kohyama J, Iwanami A, Suemizu H, Ikeda E, Matsumoto M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H.: Pathological classification of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells towards safety assessment of transplantation therapy for CNS diseases., *Mol Brain*, 9(1):85 (2016)
- 41) 京都大学 iPS 細胞研究所「再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクト」 <https://www.cira-foundation.or.jp/j/project-ja/index.html>
- 42) da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB.: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues., *J Cell Sci*, 119(Pt 11):2204-13 (2006)
- 43) Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ.: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts., *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(7):3908-13 (1998)
- 44) Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carroll J, Hess DC.: Intracerebral xenografts of mouse bone marrow cells in adult rats facilitate restoration of cerebral blood flow and blood-brain barrier., *Brain Res*, 1009(1-2):26-33 (2004)
- 45) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG.: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and

- cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains., *Proc Natl Acad Sci USA*, 14;96(19):10711-6 (1999)
- 46) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR.: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro., *Exp Neurol*, 164(2):247-56 (2000).
- 47) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB.: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons., *J Neurosci Res*, 15;61(4):364-70 (2000).
- 48) Ito M, Kuroda S, Sugiyama T, Maruichi K, Kawabori M, Nakayama N, Houkin K, Iwasaki Y.: Transplanted bone marrow stromal cells protect neurovascular units and ameliorate brain damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rats., *Neuropathology*, 2(5):522-33 (2012).
- 49) Zhong C, Qin Z, Zhong CJ, Wang Y, Shen XY.: Neuroprotective effects of bone marrow stromal cells on rat organotypic hippocampal slice culture model of cerebral ischemia., *Neurosci Lett*, 15;342(1-2):93-6 (2003).
- 50) Hess DC, Borlongan CV.: Cell-based therapy in ischemic stroke., *Expert Rev Neurother*, (8):1193-201 (2008).
- 51) Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD.: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke., *Brain*, 134(Pt 6):1790-807 (2011).
- 52) Shichinohe H, Kawabori M, Iijima H, Teramoto T, Abumiya T, Nakayama N, Kazumata K, Terasaka S, Arato T, Houkin K.: Research on advanced intervention using novel bone marrow stem cell (RAINBOW): a study protocol for a phase I, open-label, uncontrolled, dose-response trial of autologous bone marrow stromal cell transplantation in patients with acute ischemic stroke., *BMC Neurol*, 8;17(1):179 (2017).
- 53) Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Kobayakawa K, Yokota K, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y, Okada S.: Therapeutic activities of engrafted neural stem/precursor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord., *Stem Cells*, 31(8):1535-47 (2013).
- 54) Derakhshanrad N, Saberi H, Yekaninejad MS, Joghataei MT, Sheikhrzaei A.: Granulocyte-colony stimulating factor administration for neurological improvement in patients with postrehabilitation chronic incomplete traumatic spinal cord injuries: a double-blind randomized controlled clinical trial., *J Neurosurg Spine*, 29(1):97-107 (2018).
- 55) Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Schut D, Fehlings MG.: Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord., *J Neurosci*, 3;30(5):1657-76 (2010).
- 56) Fouad K, Schnell L, Bunge MB, Schwab ME, Liebscher T, Pearse DD.: Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord., *J Neurosci*, 2;25(5):1169-78 (2005).
- 57) Rando TA, Ambrosio F.: Regenerative Rehabilitation: Applied Biophysics Meets Stem Cell Therapeutics., *Cell Stem Cell*, 5;22(4):608 (2018).
- 58) Mu J, Li M, Wang T, Li X, Bai M, Zhang G, Kong J.: Myelin Damage in Diffuse Axonal Injury., *Front Neurosci*, 19;13:217 (2019).
- 59) 日本国特許庁「公開特許公報」, 令和元年 5 月 23 日, 特開 2019-76008 発明者 中西徹