神経細胞の脳内移植の現状と将来展望

—幹細胞を中心として—

板倉 徹 垣下 浩二* 中尾 直之 上松 右二

Overview and Future Development of Cell Transplantation Therapy with Special Reference to Stem Cells

by

Toru Itakura M.D., Koji Kakishita M.D.*, Naoyuki Nakao M.D., and Yuji Uematsu, M.D.

from

Department of Neurological Surgery, Wakayama Medical University, and

*Department of Neurosurgery, Hidaka General Hospital

Cell transplantation therapy has been developed recently. To recover the function lost in various neurological disorders, reconstruction of the neural network is crucial. The authors overviewed the present state of cell transplantation therapy and unsolved problems. Parkinson disease is a main target of this transplantation therapy because the background of the disorder is quite simple (loss of mesencephalic dopamine neurons). Various kinds of donor tissue for Parkinson disease are discussed. Recent development of stem cell transplantation is also described. Stems cells have totipotent and self-renewal ability, which are quite important as donor tissue. Critical issues to be solved in stem cell transplantation are described.

(Received May 29, 2002; accepted July 1, 2002)

Key words : stem cell, transplantation, Parkinson disease

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 11 : 643-649, 2002

はじめに

脳血管障害、神経外傷や神経変性疾患などで失われた脳機能はその再生能力の低さから、神経機能の脱落という後遺症として患者に多大の肉体的、精神的、社会的負担を強いている。この対策として薬物療法やリハビリテーションが行われているが、依然として確たる効果はみられていない。このような失われた脳機能の回復を目指して神経細胞の脳内移植が行われるようになった。それは神経細胞の脳内移植が、失われた神経回路網の再構築を可能とし、神経脱落症状を根本的に治しうることが

期待されるからである。またこの細胞移植は基礎医学の分野では神経系の発生の実験的環境を再現し、その機序を解く手がかりを与えるものとして期待されている。

本稿では、各種神経疾患に対する神経細胞の脳内移植を概説し、近年注目されている幹細胞の脳内移植について述べたい。

細胞移植の対象疾患

この分野で著しい進歩をとげているのはパーキンソン病に対する細胞移植の研究である (Table 1)。パーキンソ

和歌山県立医科大学脳神経外科 / 〒641-0012 和歌山市紀三井寺 811-1 [連絡先: 板倉 徹]

Address reprint requests to: Toru Itakura, M.D., Department of Neurological Surgery, Wakayama Medical University, 811-1 Kimiidera, Wakayama-shi, Wakayama 641-0012, Japan

* 国保日高総合病院脳神経外科

Table 1 Various kinds of neurological disorders for neural cell transplantation into the brain

Neurological disorder	Donor	Host animal
Parkinson disease	Fetus mesencephalon	Rat, monkey, human
	Adrenal medulla	Rat, monkey, human
	Sympathetic ganglion	Rat, monkey, human
	Encapsulated cell	Rat, monkey, human
	Stem cell	Rat
Huntington chorea	Fetus striatum	Rat, monkey, human
Cerebral infarction	Fetus striatum	Rat, human
	Stem cell	Rat
Spinal cord injury	Fetus spinal cord	Rat, monkey
	Stem cell	Rat, monkey
Optic nerve injury	Sciatic nerve	Rat, cat
Alzheimer disease	Fetus forebrain	Rat
Amyotrophic lateral sclerosis	Stem cell	Rat

ン病は中脳黒質のドーパミン細胞の変性脱落という比較的単純な病態をもち、MPTP や 6-OHDA 注入によるモデル動物がすでに完成し、基礎的にも臨床的にも研究が発展する基盤があった。胎児中脳、副腎髄質や自家交感神経節などがドナーとして使用されている。

ハンチントン舞踏病は不随意運動、痴呆をきたす遺伝性疾患で線条体 GABA (γアミノ酪酸) 含有細胞の脱落が主病態である。この疾患にも胎児線条体が移植され、移植片の生着、宿主脳とのシナプス形成や機能の改善が動物実験では確認されている。ただ一部の不十分な報告を除いて、臨床応用をしたという報告はない。近い将来臨床応用されるものと期待される。

脱髄疾患に対する治療を目的として、幼弱 oligodendrocyte の脳内移植を行い髄鞘化を促進させようとする実験も行われている。形態学的には移植された oligodendrocyte から髄鞘が再形成されていることは証明済みだが、これに伴う機能の改善は証明されていない。もしこのことが可能となれば多発性硬化症を中心とした各種脱髄疾患を細胞移植で治療することが可能となろう。

視神経損傷に対する神経移植治療は Aguayo ら¹⁾の末梢神経移植が有名である。視神経を切断しその断端に坐骨神経を吻合するものである。この一連の研究はただ視神経損傷に対する治療という観点からだけではなく、中枢神経も末梢神経という環境の中では十分再生能力を発揮するということを証明した重要なものである。移植により視神経は再生し、ある程度光認知を行うことは知られているが、より高度な視覚機能の再生は十分でないようである。

脊髄損傷に対してもこの細胞移植が治療として期待されている。対象患者の多さ、障害の重さなどを考慮する

と移植にかけられる期待は大きい。実験的には脊髄損傷部に胎児脊髄などを移植し、脊髄上行路や下行路の再生、機能の改善をみている。しかし、錐体路などの long tract の再生とその機能の改善をみた確実な証拠はない。

脳梗塞に対する神経細胞移植の実験も散見され⁹⁾、事実臨床応用も行われている。動物に脳虚血を作製し、虚血部位に胎児脳を移植するものである。移植により虚血範囲が縮小したという報告が多い。また迷路学習などの脳機能の改善も報告されている。しかし、脳梗塞で実際の患者が苦しんでいる脳機能は片麻痺と言語障害である。移植でこれらの機能が回復したという報告はない。まだまだ実験による基礎的事実の積み上げが必要である。

各種神経疾患に対して神経細胞の移植が実験的臨床的に行われているが、ここではもっとも進歩しているパーキンソン病に対する神経移植についてその現状と問題点を詳述したい。

パーキンソン病に対する細胞移植

パーキンソン病は無動、筋固縮、振戦、歩行障害や自律神経症状を主体とする進行性疾患で、中脳黒質のドーパミン含有細胞の変性脱落がその病態である。パーキンソン病の治療は、歴史的には淡蒼球や視床の定位的破壊術が唯一の治療法であったが、L-ドーパの出現により外科的治療はほとんど忘れられていた。しかし、L-ドーパの長期投与例が増加するにつけその問題点が明らかになってきた。つまり L-ドーパの長期投与ではその効果が減退する wearing off, on と off が突然出現する on-off 現象、L-ドーパ増量による dyskinesia や幻覚があり、患者を悩

Fig. 1 Results of sympathetic ganglion transplantation

The number of patients showing excellent outcome gradually decreased after sympathetic ganglion transplantation due to poor survival of grafted tissue.

ませている。このように L-ドーパを主体とした内科的治療の限界が明らかになり、再び外科的治療が注目されるようになった。

まず副腎髄質や胎児中脳の移植が実験的に試みられ³⁾、移植片の生着と生着細胞からのドーパミン放出や実験的パーキンソン症状の改善が証明された。この動物実験の事実を踏まえ、自家副腎髄質とヒト胎児の脳内移植がパーキンソン病患者に施行された²⁾⁵⁾。自家副腎髄質の脳内移植は持続的効果がないことが明らかとなるにつれて、ほとんど行われなくなった。

一方、胎児脳の移植はスウェーデンを中心にきわめて学際的に行われ、移植片の長期的生着とその臨床的効果が明らかにされた。しかし症状改善のために、1人のパーキンソン病患者に5、6体の胎児が必要とされ、いかにして大量の胎児脳を獲得するかが問題となってきた。

われわれは世界ではじめて自家交感神経節の脳内移植を行い、それなりの効果を確認している (Fig. 1)。しかしその効果は移植後の時間経過とともに減少することも事実である。これは移植された交感神経節細胞が長期間脳内で生着しないことを示唆している。最近ではより多くの細胞を獲得する意味から胸部交感神経節をドナーとして用いている。その結果、①1日に占める off の短縮、②L-ドーパの効果延長が、交感神経節の脳内移植による効果と考えている。これは移植片に L-ドーパが取り込まれ、貯蔵された結果もたらされたものと考えられる⁶⁾。

カプセル化細胞の脳内移植も検討されている。ドーパミンを放出するといわれている PC12 細胞をカプセルに封入して移植し、免疫反応をカプセルで防御しドーパミンのみ放出させようというものである⁴⁾。そもそも Aebischer ら⁸⁾によって考案されたもので一時期米国では臨床応用が検討されたが、実現に至っていない。この方法は、はじめから移植片と宿主脳間のシナプス形成を放棄しドーパミンの放出のみを目的としたものである。しかし、対象

患者の多くは L-ドーパを内服しても効果がないか副作用が強い症例である。カプセルからいくらドーパミンが放出されても、もはや受容体が減少しどうにもなくなっているものである。この点をカプセル化細胞移植でどう対応するか大きな問題である。

いずれの移植方法も実験的にはそれなりの効果をあげているが、いざ臨床応用となると、いくつかの問題点も指摘されている。第1に移植の効果を発揮させるには生着する細胞が少なく、いかにして十分量のドナーを獲得するかが問題である。第2に一部の報告を除いて移植片と宿主脳とに確実なシナプス形成が行われていない。神経移植術を各種神経疾患に応用するにはこの問題は避けて通れない。さらにもし胎児を使用するならその倫理的側面も問題となる。ドナー細胞の少なさや移植片の再生能力の問題点を解決するドナーとして幹細胞が注目されている。

幹細胞とは

細胞の発生分化は生殖細胞の結合による桑胚の形成に始まる。この時期の細胞を embryonic stem cell (ES cell) とよぶ。この ES 細胞は体のあらゆる細胞に分化する能力をもっている。言い換えるとこの ES 細胞が1個あればクローン動物を作成することが可能である。この ES 細胞はその後それぞれの幹細胞 (stem cell) へと分化する。それは生殖細胞に関する幹細胞と体細胞の幹細胞に分かれる。体細胞性幹細胞はその後、内皮性 (endodermal)、神経性や血液性幹細胞へと分化する。これらの幹細胞はそれぞれの系内の細胞へと分化する能力とともに自己複製能を有する (Fig. 2)。

神経幹細胞 (neural stem cell) はニューロンへの分化へつながる前駆細胞 (neural progenitor cell) とグリアへの分化へつながる前駆細胞 (glial progenitor cell) へと分

Fig. 2 Cell lineage of stem cells

Fig. 3 Differentiation of neural stem cells

化する。glial progenitor cell は oligodendrocyte progenitor cell と astrocyte progenitor cell へ分化し、oligodendrocyte と astrocyte が誕生することになる。neural progenitor cell は神経系のあらゆる種類のニューロンへ分化する (Fig. 3)。

実験的には胎児脳室周囲や海馬から幹細胞を抽出して、無血清培養液中で培養皿に coating しない状態で浮遊した状態に置くと、増殖し球形 (sphere) を形成し、増殖を繰り返す。この sphere は幹細胞のマーカーである nestin に陽性を示す。

成人脳内の幹細胞

幹細胞はその性質上胎児内にしか存在しないと考えられてきたが、最近の研究では成人脳内にも神経幹細胞類似の細胞が存在することが明らかになった。成熟マウスの subventricular zone には未成熟で分裂を繰り返す細胞があり、嗅脳へ神経前駆細胞を供給している。そのほか、成熟動物の海馬や側脳室周囲にも幹細胞が存在するといわれている。このような結果は従来、成熟脳では神経細胞は再生されないという概念がくつがえることになり、われわれ臨床家にとっては、神経再生へ向けた新しい方向性を示唆するものである。

幹細胞の分化

無血清培養液中で浮遊状態の幹細胞 sphere は各種因子の添加により、分化を開始する。培養皿への gelatin coating により細胞同士が接着し分化が促進される。ニューロンへの分化は retinoic acid の添加で推進されることはよく知られているが、いかなる因子がどのような神経細胞への分化に寄与するかは明らかでない。GDNF, CNTF, PDGF などがニューロンへの分化を誘導するという。ではドパミン含有細胞への分化はどのように誘導されるか。ある種の stromal cell との coculture でドパミン細胞へ分化することが示されている。また, sonic hedge hog (SHH) と fibroblast growth factor 8 (FGF8) はドパミンニューロンへの分化の重要な因子と考えられている。

神経幹細胞は神経系のあらゆる細胞へ分化する能力をもっている。しかし、近年の研究では神経幹細胞が肝細胞、筋細胞や血液細胞にも分化することが示された。さらに血液幹細胞が神経系細胞へ分化することも明らかになってきた。このことは神経移植のドナーとして神経幹細胞のみならず血液幹細胞やその他の幹細胞から神経系の細胞を作成することも可能であることを示している。

幹細胞の移植

幹細胞は自己複製し神経系のあらゆる細胞に分化する能力をもっている。こういえば今すぐにでも幹細胞移植であらゆる神経難病が解決するように見える。しかし、事はそう簡単ではない。移植後、幹細胞は宿主脳に生着しそこで分裂分化することが困難である。Dunnet らはマウス幹細胞を培養後、実験的パーキンソン病モデルである 6-OHDA 注入ラットに移植したが、幹細胞は生着せず機能も発揮されなかったと述べている。われわれは澤本ら⁷⁾との共同研究で neural stem cell が移植後宿主脳内で生着分裂しその機能を発揮したことをはじめて示した (Fig. 4)。これは GFP と nestin を含む transgenic mouse を作成し、nestin 陽性細胞を FACS にて高率に採取する方法である。

幹細胞移植の課題

幹細胞はその自己複製能と多分化能から、神経移植のドナーとして最適である。理論的には夢のドナーといえるが、その克服すべき課題も多い。

Fig. 4 Tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry of grafted neural stem cells

Grafted cells exhibiting TH immunoreactivity extend to many axons in the host brain. These cells reveal TH and BrdU immunoreactivity⁷⁾.

① 生着率

自己複製能があるとはいえ *in vitro* での出来事である。ひとたび *in vivo* で脳内に移植すると自己複製能どころか幹細胞自身が生着しない。これはいかなる細胞にもいえることだが、移植細胞の脳内生着率は 3~5% 程度である。多くの細胞は機械的操作と酸素栄養不足から移植後死滅する。free radical による死滅が生着率不良の原因であるという実験もある。これをいかに克服するかが今後の課題である。

② 分化誘導

幹細胞は多分化能を有する。しかし、これはわれわれが自由に分化誘導できるということを意味しない。幹細胞は *in vitro* で自由に分化させると神経細胞へは分化せずほとんど glia 細胞へ分化する。多分化能はあるが分化誘導は容易ではない。分化の過程がどのように行われているかの機序が解明されていない。幹細胞の移植は技術的にはさほど難しいものではない。しかし、神経細胞への分化を移植後誘導することは並大抵のことではない。これも今後の課題である。

③ 神経伝達物質の放出

たとえ幹細胞が移植後ある種の神経に分化したとしても、その細胞がわれわれの欲している神経伝達物質を放出するとは限らない。しかもその放出は宿主脳の制御によるものでなければならない。

④ シナプス形成

最も重要な課題は、移植された幹細胞が神経に分化後、宿主脳との間にシナプスを形成しなければならないことである。多くの神経難病の治療を幹細胞移植のゴールと考えるなら、移植細胞が宿主脳に統合され、神経回路網が再構築される必要がある。現時点で移植幹細胞由来の神経細胞が宿主脳との間にシナプスを形成したという報告はない。

今後の展望

克服すべき課題があるとはいえ、幹細胞が神経移植のドナーとして優れていることに疑いはない。今後の神経移植は幹細胞を中心として活発になるだろう。ここで幹細胞による神経難病に対する移植の可能性について述べたい。

① 胎児幹細胞の移植

胎児脳から培養した幹細胞を直接脳内に移植する。従来の胎児脳の移植に準じるため、技術的には最も容易である。しかも実験的にも機能回復が証明され現実性が高い。しかし、*in vivo* でいかに幹細胞に分化誘導して必要な神経細胞を作成するかが問題で *in vitro* のデータがそのまま通用するとはいえない。さらに胎児脳使用に対する倫理的側面からの議論も必要となろう。

② 自家脳内幹細胞の移植

前述したように成人脳内にも幹細胞は存在する。患者脳内の幹細胞を手術的に採取し、複製分化させた後、患者脳内に移植することが考えられる。こうすれば胎児使用に関する倫理的問題からは免れる。しかしすでに病的プロセスが進行している患者自身の脳から幹細胞をいかに採取し分化させて戻せるか、容易なことではない。

③ 非神経系幹細胞の移植

血液系幹細胞から神経細胞への分化が実験的には証明されている。このことが可能とすると、自己血液幹細胞を採取し、*in vitro* で分裂分化させてから脳内移植することが可能となる。血液系幹細胞から分化した神経細胞が移植後、宿主脳内で長期間神経細胞としてとどまり、宿主脳に統合されるか、夢のような話であり、たやすいことではない。

おわりに

幹細胞移植の現状と展望について述べた。成人脳の神経細胞はひとたび死滅すると補充されない。このことが多くの疾患で後遺症という重荷を患者に強いている。この克服に神経細胞の移植は最も理にかなったものである。移植のドナーとして幹細胞が登場し、この分野の breakthrough が近づいている。この自己複製能と多分化能を有する幹細胞移植が成功すれば、われわれは多くの神経疾患を克服できる可能性がある。パーキンソン病のみならず脳梗塞、脊髄損傷や脱髄疾患が幹細胞移植で克服される日はそう遠くない。若き日本の脳神経外科医がこの分野で活躍し世界に先駆けて、神経難病の克服に貢献することを夢見つつこの稿を終えたい。

文 献

- 1) Aguayo AJ, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, McKerracher L, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Cater DA: Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 331: 33, 1991.
- 2) Backlund E-O, Granberg P-O, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L: Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism: First clinical trials. *J Neurosurg* 62: 169-173, 1985.
- 3) Brundin P, Strecker RE, Widner H, Clarke DJ, Nilsson OG, Astedt B, Lindvall O, Bjorklund A: Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: Immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res* 70: 192-208, 1988.
- 4) Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T: Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease: Long-term primate study. *Cell Transplant* 9: 705-709, 2000.
- 5) Freeman TB, Olanow W, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJG, Snow BJ, Calne D, Gauger LL: Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommisural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38: 379-388, 1995.
- 6) Nakao N, Kakishita K, Uematsu Y, Yoshimasu T, Bessho T, Nakai K, Naito Y, Itakura T: Enhancement of the response to levodopa therapy after intrastriatal transplantation of autologous sympathetic neurons in patients with Parkinson disease. *J Neurosurg* 95: 275-284, 2001.
- 7) Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman S, Itakura T, Okano H: Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 21: 3895-3903, 2001.
- 8) Tresco PA, Winn SR, Tan S, Jaeger CB, Greene LA, Aebischer P: Polymer-encapsulated PC 12 cells: Long-term survival and associated reduction in lesion-induced rotational behavior. *Cell Transplant* 1: 255-264, 1992.
- 9) Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie, Low

WC: Human bone marrow stem cell exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting

into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11-30, 2002.

要 旨

神経細胞の脳内移植の現状と将来展望

—幹細胞を中心として—

板倉 徹 垣下 浩二 中尾 直之 上松 右二

成熟ヒト脳は、ひとたび損傷を受けるともはや再生せず、脳機能障害による後遺症として永久に残ることになる。失われた脳機能を神経移植によって補うことは各種神経疾患における神経回路網の再構築を期待させるもので、最も根治的な治療法として注目されている。

本総説で、著者らは神経移植の対象疾患、移植治療の現状について詳述した。対象疾患としてはパーキンソン病があげられる。この疾患は中脳黒質のドーパミン細胞のみが変性脱落するという単純なもので、神経移植の対象として最適である。パーキンソン病に対する胎児脳移植、自家交感神経節移植の効果について述べた。さらに幹細胞はその自己複製能と多分化能を有することから、移植のドナーとして魅力的なものであるとして近年、注目を集めている。その幹細胞の生物学的特性と移植時の問題点を討議し、今後の展望についての著者たちの考えも詳しく述べた。

—脳外誌 11: 643-649, 2002—

「読者の意見 (Letters to the Editor)」原稿募集のお知らせ

本誌では「読者の意見 (Letters to the Editor)」欄を設けています。読者交流の場として意見交換にご利用いただきたく、下記の要領で編集室宛に原稿をお寄せください。

趣 旨: ①掲載論文に対する意見、②編集方針に対する意見、希望などを掲載いたします。①に関しては著者側からのコメントも掲載いたします。

執筆内容: ①本文は図表も含め 1,200 字以内 (文献は 3 個以内、写真・図・表は 1 個以内とし、その数に応じて本文を減じてください)、②筆者

名、所属を明記、③著者側からのコメントは 600 字以内

採 否: 編集委員会で決定いたします。不採用の場合は速やかに連絡いたしますが、理由はお知らせいたしません。また、採否のいかんにかかわらず、原稿は返却いたしません。

そ の 他: 論文掲載後 3 カ月以内に意見をお寄せください。文章は書簡の形式 (口語体) としてください。採用の場合は掲載誌 1 部をお送りいたします。

「脳神経外科ジャーナル」編集委員会