総 説

幹細胞を用いた神経系の再生医学

—内耳再生へ応用の可能性—

楯谷 一郎・伊藤 壽一

Stem Cell Therapy for Diseases in the Nervous System

—A Potential for Regeneration of Inner Ear—

Ichiro Tateya and Juichi Ito

(Kyoto University)

Recent advances in stem cells research and its application to medicine are reviewed. Stem cells are composed of embryonic stem cells (ES cells) and somatic stem cells, in which neural stem cells, hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, and other forms have already been identified. Stem cells have a possibility of regenerating damaged organs, which were difficult to transplant, and may be able to serve as a source of donor organ to be used for transplantation. In nervous systems, ES cells, neural stem cells and mesenchymal stem cells are investigated to regenerate damaged central and peripheral neurons. ES cells and neural stem cells are reported to form synapses with host neurons when they are transplanted into the brain or spinal cords. Mesenchymal stem cells are reported to differentiate into neurons in vivo and are expected as a source of cells used for stem cell therapy in the future. The possibility of stem cell transplantation for the treatment of inner ear hearing loss is also discussed.

Key words : neural stem cell, embryonic stem cell, nervous system, mesenchymal stem cell, regeneration

はじめに

再生とは欠落した細胞や組織が幹細胞の増殖や分化で補われることと定義できる。この再生能力は多細胞生物が生きていく上で必須の能力であり、ヒトにおいても腸粘膜上皮や肝臓をはじめとして数多くの再生機構が備わっている。しかしながらその能力は有限であり、傷害が個体の再生能力を越えた場合その組織は「再生不能」となり、何らかの治療が必要となる。近年の医学の発達により再生不能となった臓器を他の個体（ドナー）から外科的に移植する移植医療が実用化され、多くの人に福音をもたらしている。しかしながら、臓器移植には拒絶反応、ドナー不足などいくつかの問題が残されている。

また、無数のニューロンがネットワークを形成している神経系では移植医療の応用は困難であり、手をこまねいてみているしかないのが現状であった。

一方 1998 年、すべての細胞に分化しうる全能細胞である ES 細胞（embryonic stem cell；胚性幹細胞）がヒトで樹立され¹⁾、この ES 細胞（図 1 A）を代表とする幹細胞が従来不可能であった臓器の再生を実現する再生医学の担い手として大きな注目を集めている。幹細胞は全能細胞である ES 細胞と組織特異的とされる体性幹細胞に大別できる。ES 細胞とは発生初期に存在する多能性幹細胞が株化された全能細胞であり、すべての細胞に分化する能力を持っている。これまでに知られている体性幹細胞

図1 幹細胞

- A: ヒト ES 細胞のコロニー (Thomson ら¹⁾ より改変)
 B: マウス神経幹細胞のコロニー (Reynolds ら²⁾ より改変)
 C: ヒト間葉系幹細胞 (Pittenger³⁾ より改変)

には神経幹細胞 (図1B)²⁾、造血系幹細胞、上皮幹細胞、肝幹細胞、間葉系幹細胞 (図1C)³⁾ などがある。このような幹細胞から必要な機能細胞を分化誘導する方法が確立できれば治療に必要なだけ機能細胞を供給することが可能になり、現在の移植医療がかかえる問題の一つであるドナー不足を解決でき、さらに移植が困難であった神経系などの組織の機能的再生も可能になるのではと期待されている。すでにこれらの細胞を用いて血管、骨、筋肉、皮膚、軟骨、臍ランゲルハンス島、角膜、網膜、歯、毛根などさまざまな組織に関して再生へ向けた研究がなされている。神経系においてもパーキンソン病やハンチントン舞踏病などを中心に研究が進められており、脳以外でも網膜の再生を目標とした研究がなされている。

本稿では神経系の再生という観点から各種の幹細胞の可塑性、臨床応用の可能性、それらの細胞を用いてこれまで報告された臨床応用へ向けての基礎的臨床的研究について概説し、さらに幹細胞移植による内耳再生の可能性について考えてみたい。

臓器再生医学の現状

失われた臓器を再生する場合、その臓器が機能的に再生するためには臓器を構成している細胞が再生し、さらにそれらの細胞構築が3次的に再生することが必要で

ある。臓器の再生にはその臓器固有の幹細胞のみから立体的な臓器全体を作り出すのが理想であるが、現時点では哺乳類では細胞のみから立体的な構築を形成するのは困難である。現在の再生医学は特定の細胞を生物学的に再生させることを目的とした再生生物学と、細胞を3次的に構築して臨床応用へとつなげることを目的としたティッシュエンジニアリングから成り立っている。ティッシュエンジニアリングとは細胞を立体的に構築するための足場 (骨組み) を形成する技術のことであり、アテロコラーゲンや各種のポリマーを足場として細胞が立体的に生着することをねらいに用いられている。

培養細胞を用いたティッシュエンジニアリングはさまざまな領域で試みられており、すでに臨床応用あるいは治験の段階にきているものもいくつか報告されている。特に体を形作る組織に関してはティッシュエンジニアリングを応用することですでにいくつか実用化されている。

皮膚ではすでに培養皮膚として市販されており、本邦でも企業化 (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.) が行われている。軟骨に関しても培養軟骨として市販されており、本邦においても培養軟骨細胞とアテロコラーゲンを組み合わせて膝軟骨の再生に用いる臨床応用が開始されている⁴⁾。骨再生については培養骨髄系幹細胞とセラ

図2 慢性閉塞性動脈硬化症に対する自家骨髄移植（嶋田ら⁷⁾より改変）

慢性閉塞性動脈硬化症患者に対し自家骨髄移植施行後の血管造影像。術前に比べ著明な血管新生と側副血管系の増加がみられる。（A：術前，B：術後）

ミックスを組み合わせることで骨形成が起こることが報告されており，森下ら⁵⁾により臨床応用が開始されている。血管系に関してはアメリカではブタから採取した心臓弁に患者の自己細胞を播種させて移植片を作製し，心臓弁膜症患者に対する臨床治験を開始している。本邦においても Shin'oka ら⁶⁾は生体吸収性ポリマー上に末梢自己血管壁細胞により作製した再生血管を用いて小児の心臓血管外科手術に応用し良好な成績を得ている。また眼科領域ではすでに培養角膜上皮の移植が行われている⁷⁾。

一方，幹細胞を主体とした細胞移植の試みは骨組みが必要ない臓器や組織の再生を中心として行われている。最も代表的なものは骨髄移植であり，Storb ら⁸⁾の報告を皮切りに1980年代から広く実用化されており，現在では末梢血液中の造血幹細胞，さらに臍帯血中の造血幹細胞への移植へと発展してきている。また近年では血管再生医療の分野においても臨床応用がなされつつあり，嶋田ら⁹⁾は慢性閉塞性動脈硬化症患者に自己骨髄細胞を移植したところ，有意な血管新生と側副血管系の増加，血流の増加を認めたと報告している（図2）。

また中枢神経系においてもパーキンソン病やハンチントン舞踏病などに対しES細胞や神経幹細胞の移植がマウスやサルを対象に試みられているが，ヒトにおいては胎児脳組織の移植の報告はあるものの，培養した幹細胞

を移植するには至っていない。

幹細胞と神経系への分化

幹細胞の定義に関しては種々の意見があり，また幹細胞自体の持つ可塑性や脱分化の性質によりその定義自体もあいまいになっているが，自己複製能を持つこと，多分化能を持つという点で一致している。幹細胞は前述したように，初期胚に由来しすべての細胞に分化しうる全能細胞であるES細胞（embryonic stem cell；胚性幹細胞）と，発生期や成体において組織特異的に存在し，組織や臓器の恒常性の維持に関与するとされている体性幹細胞に大別される。神経系再生への応用は，ES細胞に加えて体性幹細胞では神経幹細胞，間葉系幹細胞で試みられている。

1) ES細胞

ES細胞とは発生初期に存在する多能性幹細胞を取り出し，in vitroで培養できるよう株化したものであり，1981年にマウス¹⁰⁾において初めて樹立され，1998年ヒトにおいても樹立された¹¹⁾（図1A）。ES細胞は初期胚中の多能性幹細胞と同様に個体を構成するすべての細胞に分化する能力を保持し，無制限に増やすことができる。ES細胞の神経系の細胞への分化誘導は胚葉体を経由した誘導と経由しない誘導に分けられる。1995年Bainら¹¹⁾は胚葉

体からレチノイン酸により神経系への分化誘導に成功し、Lee ら¹²⁾ は ES 細胞の培養に必要な LIF を除去して bFGF, EGF などを加えることで胚葉体を経由して神経幹細胞を誘導できたことを報告した。一方 Kawasaki らは ES 細胞を間質系細胞株 (PA6) 上で培養することで ES 細胞から胚葉体を経ず、直接ドーパミンニューロンを誘導することに成功し¹³⁾、サル ES でも再現できたこと¹⁴⁾ を報告している。また Tropepe ら¹⁵⁾ は ES 細胞を低密度で培養することで直接的に神経系に分化誘導させることに成功している。また ES 細胞がオリゴデンドロサイトに分化してミエリン化することが Liu ら¹⁶⁾ により確認されている。

このように ES 細胞から神経系への分化誘導に関してはさまざまな方法が報告されているが、さらにこうして得られた神経幹細胞を効率よく採取し、移植治療へ応用するために、神経幹細胞に特異的なマーカーをラベルして、セルソーターを用いて神経幹細胞のみを選択的に収集する試みもなされている¹⁷⁾。

2) 神経幹細胞

従来、発生を終えた成体においては神経組織が一度傷害を受けると二度と再生しないとされてきた。しかし、1994 年 Davis ら¹⁸⁾ は成体においても自己複製能を持ちニューロンやグリア細胞へ分化しうる神経幹細胞が脳室周囲に存在することを報告した。これらの神経幹細胞 (図 1 B) は bFGF, EGF を含む無血清培地で培養すると、培養液内に浮遊する球状の細胞塊 (neurosphere) を形成し²⁾、bFGF や EGF を除いてレチノイン酸を加えてやるとニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することが知られている。さらに近年神経幹細胞がニューロンやグリアなどの外胚葉系の細胞だけでなく、すべての胚葉系の細胞に分化した (transdifferentiation) という報告もされている¹⁹⁾。限られた種類の細胞にのみ分化すると思われていた体性幹細胞が、胚葉系を越えて分化する能力を持っているのではと注目を集めているが、その一方で否定的な意見²⁰⁾ もあり、いまだ一致した見解は得られていない。

3) 間葉系幹細胞, 他

骨髄には造血幹細胞が存在し、赤血球や白血球などすべての血球細胞に分化することが従来より知られているが、骨髄にはこのほかに骨髄間質細胞と呼ばれる付着系の細胞があり、そのなかに間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) (図 1 C) が存在することが明らかになってい

る。この間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪細胞、筋肉など中胚葉系の細胞に分化しうることが知られていた³⁾ が、近年この間葉系幹細胞が中胚葉系だけでなく、神経細胞、肝細胞など他の胚葉系の細胞にも分化しうることが報告されている^{21) ~ 23)}。再生移植医療を考えるにあたり、ドナー細胞をどのように供給するかという問題が常に存在しているが、間葉系幹細胞は骨髄から簡単に採取できることから、再生医療の実用化に向けた細胞の供給源として注目を集めている。しかしながら神経幹細胞と同様、間葉系幹細胞の持つ可塑性 (transdifferentiation) について疑問を投げかける報告もされている。Ying ら²⁴⁾ は in vitro において骨髄由来の細胞を ES 細胞と共培養したところ、骨髄由来細胞と ES 細胞が細胞融合を起こしたことを報告しており、従来報告されている間葉系幹細胞の可塑性は単に移植細胞とドナー細胞が癒合した結果をみているに過ぎないという可能性を指摘しており、神経幹細胞と同様 transdifferentiation の問題についてはいまだ一致した見解が得られていない。

間葉系幹細胞以外でも、Toma ら²⁵⁾ が皮膚組織から神経細胞を誘導することをマウスで成功しており、移植細胞の供給源として注目を集めている。

中枢神経系における細胞移植研究

1. 傷害に対する神経系の応答機転

成体の中枢神経組織が傷害を受けたとき、傷害に対する再生機転は存在するのであろうか。従来は傷害された神経組織はほとんど再生しないとされてきたが、成体においても内在的な神経形成能が存在し、成体脳への生理学的、病理学的な刺激により顕在化することがわかってきた。たとえば、ラットに対し虚血などの傷害を脳に与えると、脳室下層と海馬における神経形成が増加することが報告されている²⁶⁾。またヒトにおいても周産期の側頭葉てんかん児の脳を調べたところ、歯状回において神経幹細胞のマーカーであるネスチンに陽性を示す細胞が増加していることが報告されている²⁷⁾。

このような神経形成の機序について、Yoshimura ら²⁸⁾ は虚血傷害を与えたマウスでは海馬の FGF2 の発現が上昇していることを報告した。また彼らは FGF2 ノックアウトマウスを作製し、同様の傷害を与えてみたところ、正常マウスではみられた神経形成が観察されず、さらにそのマウスに FGF2 を強制発現させると神経形成がみられるようになる²⁸⁾ ことを報告した。FGF2 は神経への分

化を促進させることが知られており²⁹⁾, 傷害された脳組織では FGF2 などの因子の分泌により脳室下層や海馬, 歯状回などでの神経形成が誘導されているものと考えられる。

また, FGF2 以外にも, エリスロポイエチンが神経形成に関与していること³⁰⁾, BDNF が嗅球での神経形成に関与していること³¹⁾, パーキンソンモデルマウスの線条体に TGF- α を注入すると脳室下層から多くの細胞が産生され, 一部の細胞はドーパミンニューロンのマーカーに陽性を示したこと³²⁾, 逆に EGF を注入するとグリア細胞の数が増加したこと³³⁾ などが報告されている。

このように, 脳に加わった傷害に対して種々の因子が働き, 神経産生が促されることが明らかとなっている。しかしながらこれらの応答機転は脳室下層や海馬など, 従来より神経幹細胞の存在が知られ, 潜在的に神経再生を起こしうる場でのみ起こっており, ほかの部位についての報告はみられない。神経再生を自発的に起こさない部位では代償的な再生機構は期待できず, 再生にあたってはやはり移植治療を含む何らかの積極的なアプローチが必要と考えられる。

2. 胎児神経組織の移植

中枢神経に対する細胞移植治療が最初に行われたのは, パーキンソン病に対し胎仔(児)の脳組織を移植するというものであった。Bjorklund ら³⁴⁾ は, パーキンソン病モデルラットの線条体にラット胎仔の中脳組織を移植することでパーキンソン症状が回復したことを報告した。その後, ヒトでの応用が 1987 年³⁵⁾ に始められ, 現在までに 300³⁶⁾ の臨床応用例が報告されており, ハンチ

ントン舞蹈病³⁷⁾ でも同様の報告がされている。しかしながらこのような神経組織自体の移植では, 移植組織が長期的に生着していることが PET で確認されている³⁶⁾ もの(図 3), 治療効果が必ずしも十分ではなく, またジスキネジアなどの合併症を起こす可能性も少なくない。さらに, ドナー不足の問題, 倫理的問題などで広く普及するには至っていない。

3. 幹細胞移植

ES 細胞が樹立され, 神経幹細胞の存在が明らかとなるにつれ, 神経系においても幹細胞を移植することで傷害された神経組織を組織的, 機能的に再生させようという試みがなされている。

a) 生着の有無, 分化の方向性。

Brustle ら³⁸⁾ は, in vitro で ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞を胎生 16 ~ 18 日のラットの脳室に移植して出生後に調べた結果, 脳の広い範囲で移植細胞がニューロン, アストログリアに分化していることを確認した。また, Thomson ら¹⁾ はヒト ES 細胞を bFGF 存在下に長期間培養し, 胚葉体を形成したのちディスパーゼにより神経前駆細胞を分離してマウスの脳室に移植したところ, 移植細胞が生着して神経, グリアへ分化したことを報告している。

神経幹細胞の移植においても Lim ら³⁹⁾ は成体マウスの脳室周囲から採取した神経幹細胞を脳に移植し, ニューロン, アストロサイトへの分化を確認している。またヒトの細胞においても Brustle ら⁴⁰⁾ らはヒト胎児の脳組織を胎生期のラットに移植し, 移植細胞の生着, 分化を確認している(図 4)。

図 3 胎児脳組織移植後 10 年後の脳血流 (Lindvall³⁶⁾ より改変)

パーキンソン病に対し, 胎児脳組織を線条体に移植後 10 年の脳血流をポジトロン断層法で観察したもの。移植側の線条体(矢印)では正常者と同様に血流が保たれている。

図4 ヒトの神経幹細胞をラットの脳に移植したもの (Brustleら⁴⁰⁾より改変)

- A: 移植細胞 (黒) が大脳内で広範囲に生着している。
(St: 線条体, Co: 大脳皮質, CC: corpus callosum, *: 側脳室)
- B: 移植細胞 1 個の拡大写真。神経系のマーカーであるニューロフィラメントに陽性を示した。

このように ES 細胞から誘導した細胞、神経幹細胞ともに宿主の脳組織に生着してニューロン、グリアに分化しうることが確認されている。しかしながら、移植細胞の運命をたどってみると、移植幹細胞のほとんどがニューロンではなくグリア細胞に分化することが同時に明らかとなっている^{41)~43)}。

では、このような移植細胞の分化の方向性はどのように決定づけられるのであろうか。移植部位と分化の方向性に関する研究では、成体海馬の前駆細胞を海馬や嗅球に移植すると神経細胞が形成されるのに対し、小脳に移植すると形成されない⁴⁴⁾ことが知られている。また、Shihabuddinら⁴⁵⁾は、成体の脊髄から得られた幹細胞を成体の海馬に移植すると神経に分化したのに対し、脊髄に移植してもグリアしかできなかったと報告している。さらに、成体マウスの脳室下層から得られた前駆細胞を成体の嗅球に移植すると嗅球の介在ニューロンができるのに対し、これを海馬、新皮質、線条体に移植するとほとんどの細胞はアストロサイトになり、神経に分化するのはごく一部であることが知られている。このように移植

細胞の分化の方向性は移植部位により影響されることが明らかとなっているが、このような移植部位特異的な分化の方向性について Limら³⁹⁾は成体マウスの線条体での遺伝子発現と移植細胞の運命の関連を調べ、ほとんどの移植細胞がグリアになることが知られている線条体では、BMP が発現し Noggin が発現していないことを明らかにした。Noggin は神経への分化を促進し、BMP はグリア細胞への分化を促進することが知られており、線条体における BMP, Noggin の発現パターンがグリアへの分化を誘導していると考えられる。実際、線条体に Noggin を過剰発現させると移植細胞が神経系に分化がシフトしたことを彼らは確認している。だが、このように過剰発現によって産生された神経細胞は線条体固有の神経とはならず、本来なるべき嗅球介在神経の性質を保っていることも同時に明らかとなっており、移植細胞の分化は宿主の移植環境から分泌される外的な因子だけでなく、移植細胞の内因的な性質にも大きく影響を受けていることが推察される。

次に移植環境に傷害を与えた場合の分化への影響についてみてみると、前述したとおり移植細胞の大部分はアストロサイトの方向に分化し、ニューロンになるのは一部の細胞であることが知られているが、このようなニューロンの形成⁴⁶⁾⁴⁷⁾は、傷害が軽度で多くの神経細胞が生き残っている部位で起こりやすいことが報告されている。傷害された神経組織では瘢痕形成機序を引き起こし、グリア細胞への分化の方向に働く⁴⁸⁾ことが知られているが、このような傷害部位では炎症系のサイトカインであるインターロイキン 6 が分泌されることが知られている。インターロイキン 6 は神経幹細胞をグリアの方向に分化させることが *in vitro* の実験で報告されており⁴⁹⁾、強い傷害が加わった部位ではインターロイキン 6 などの分泌により移植細胞の分化の方向がグリアへと誘導されるものと思われる。以上のことから、効率的な神経への分化誘導には神経を含む細胞構築がある程度保存されていることが重要と思われる。

また傷害後に移植を行う時期についてみてみると、詳細に検討した報告は少ないものの、Ogawaら⁵⁰⁾はラット胎児脊髄由来の神経幹細胞を損傷後 9 日目という急性炎症期と損傷部のグリア瘢痕化が進む慢性期の間の亜急性期の脊髄に移植したところ、移植細胞のニューロンへの効率的な分化、宿主軸索とのシナプス形成、さらに運動機能回復を認めたと報告している。瘢痕形成をきたす前

に移植を行うことが組織再生には重要であることが推察される。瘢痕形成後の組織をいかに再生にもっていくかは今後の課題であろう。

b) ネットワークの形成

移植した幹細胞により機能的に傷害部位が再生するには移植細胞が生着するだけでなく、宿主の細胞とシナプスを形成することが必要である。Toda ら⁵¹⁾ は *in vitro* において成人ラットの海馬由来の幹細胞と胎生期の海馬由来の神経を共培養したところ、これらの細胞が non-NMDA グルタミン酸レセプターと GABA レセプターを発現し、機能的シナプスを形成していることを電気生理学的に確認している。

一方 *in vivo* においては、プルキンエ細胞欠損マウスに移植した胎仔小脳が宿主の環境で生着し、症状も改善したという報告⁵²⁾ がある一方で、虚血傷害後の成体ラットに胎仔ラットの新皮質を移植したところ、移植細胞の大部分が宿主の小脳細胞と遠心性の結合を形成しなかった⁵³⁾ ことが報告されている。宿主と移植組織の神経回路網の形成について、胎生期脳の細胞が宿主のアクソンからの神経支配をえられたという報告はあるが、移植細胞が遠心性の結合を示したという明確な証拠を示した報告はない⁴⁸⁾ とされ、種々の移植実験で報告されている神経組織移植での行動学的な改善は移植細胞による破壊された神経回路の再形成というよりもむしろ何らかの分泌因子によるところが大きい⁵⁴⁾ のではとされている。

しかしその一方、幹細胞の移植では 2002 年に Kim ら⁵⁵⁾ がマウス ES 細胞から誘導したドーパミン産生ニューロンをパーキンソンモデルマウスに移植したところ、電気生理学的に宿主とシナプスを形成したことを報告している。また前述したとおり、Ogawa ら⁵⁰⁾ も神経幹細胞を脊髄に移植したところ宿主と移植細胞がシナプスを形成したことを確認している。真偽のほどに関しては今後の追試を待たねばならないが、幹細胞とシナプスを形成し、機能的に再生しようという期待を抱かせるものといえる。

c) 傷害モデル動物への応用

傷害モデル動物を用いた実験はパーキンソンモデル動物が最もよく報告されている。パーキンソン病は脳の線条体においてドーパミンを産生するドーパミンニューロンの変性により引き起こされるが、Svendsen ら⁵⁶⁾ は 1996 年ラットの神経幹細胞をパーキンソンモデルラット (6-OH ドーパミン投与ラット) の線条体に移植したとこ

ろ、移植細胞の多くはグリア細胞に分化したものの、少数ながらチロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞を認め、機能的にも改善を示したことを報告している。また 1997 年にはヒトの神経幹細胞をラット脳に移植し、同様の結果を得ている⁴¹⁾。ES 細胞に関しては Kawasaki ら¹³⁾ が ES 細胞から誘導した神経前駆細胞からドーパミン産生細胞を分化させ、その細胞をドーパミンモデルマウスの線条体に移植したところ約 2 割の細胞が生着したことを報告している。また前述のように Kim ら⁵⁵⁾ もマウス ES 細胞から誘導したドーパミン産生ニューロンを移植し、電気生理学的、行動学的に効果を確認している。一方、Bjorklund ら⁵⁷⁾ は ES 細胞を低濃度で脳に移植することでドーパミン作動性ニューロンへの分化に成功したことを報告している。Trapepe ら¹⁵⁾ の *in vitro* での報告同様、細胞濃度を低くすることで ES 細胞同士の相互作用が少なくなり、さらに移植された環境からの影響によりドーパミン作動性ニューロンへの分化が優位になった可能性が考えられ、移植治療を行う上で重要な知見と思われる。

脊髄損傷モデルを用いた報告もいくつかなされている⁵⁰⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾。McDonald ら⁵⁸⁾ は ES 細胞から誘導した神経前駆細胞を胸髄損傷モデルラットに移植すると移植後 2 週間でニューロン、アストログリア、オリゴデンドロサイトの分化がみられ、後肢の運動機能が改善されたことを報告した。また、Vacanti ら⁵⁹⁾ は成体ラット由来の神経幹細胞をゲルに充填してラット胸髄完全切断モデルへの移植を行い、同様の結果を報告している。

網膜における細胞移植研究

網膜は発生学上中枢神経と同じ起源を持ち、また組織学的な構築が脳に比べて単純であることから、神経科学におけるモデルとしてよく用いられ、幹細胞の応用研究においてもさまざまな試みがなされている。また同じ感覚器であることから内耳の再生を考える上でも網膜での知見は参考になるとと思われる。

Takahashi ら⁶⁰⁾ は海馬由来の神経幹細胞を成体ラットの硝子体腔に注入したところ、網膜の内腔側に沿う形で移植細胞が生着していることを確認した。さらにこの神経幹細胞を発生期のラット胎仔に注入してみると、移植 4 週間後には網膜内に組み込まれて生着し、特異的なマーカーには陽性を示さなかったものの、形態学的、位置的に網膜の構成細胞に分化している可能性を示した。さらに Nishida ら⁶¹⁾ はあらかじめ成体ラットの網膜に針で機

図5 神経幹細胞の網膜移植 (Nishida ら⁶¹⁾ より改変)

ラットの硝子体腔に神経幹細胞を移植したもの。

A: 無処置のラットに神経幹細胞を移植したもの。移植細胞 (矢印) は網膜の内腔側に沿って生着している (矢印)。(上が内腔側, GCL: 顆粒細胞層, INL: 内顆粒層, ONL: 外顆粒層)

B: あらかじめ網膜に傷をつけたラットに移植したもの。移植細胞は傷害部位を中心に網膜の内部に入り込んで生着している。(細矢印: 網膜の障害部位, 太矢印: 移植細胞)

C, D: 移植細胞をβガラクトシダーゼで染めたもの。特異的なマーカーには染まらなかったものの、形態学的には網膜構成細胞の一つであるアマクリン細胞 (C 矢印), バイポーラー細胞 (D 矢印) に分化しているように見える。(IPL: 内網状層)

機械的な傷害を与えて同様の実験を行ったところ、傷害を与えないコントロールでは移植細胞は網膜の内腔側に沿って生着するのみであったのに対し、傷害を与えた網膜では傷害部位を中心に移植細胞が網膜内に入り込んで生着していることを確認した (図 5 A, B)。移植細胞はニューロン、グリアに分化し、さらに形態学的に網膜構成細胞への分化を疑わせる細胞もみられたが、やはり特異的なマーカーには陽性を示さなかったことを報告している (図 5 C, D)。また Wojciechowski ら⁶²⁾ は、ラット脳から採取して不死化させた細胞株 (RN33B) を成体ラットの網膜下 (網膜と網膜色素上皮の間) に注入したところ、4か月にわたって移植細胞は生着したが、網膜構成細胞のマーカーに陽性を示した細胞はやはり認めなかったと報告している。中枢神経系と同様に細胞の効率的な生着には移植部位に適度な傷害があることが必要であることがわかるが、少なくとも網膜においてはただ神

経幹細胞を移植するだけでは網膜構成細胞への分化を誘導することは難しいことが推察される。

一方 in vitro の実験では、Haruta ら⁶³⁾ が虹彩組織の細胞から視細胞への分化誘導に成功したことを報告している。虹彩の色素上皮は発生学的に網膜と同様の起源から成り立っていることが知られているが、彼らは虹彩組織から得られた細胞を培養し、視細胞の分化に重要な役割を担っているホメオボックス遺伝子 Crx を強制発現させたところ、視細胞の特異的なマーカーであるロドプシン陽性細胞を分化誘導させることに成功した。また興味深いことに彼らは成体ラット海馬から得られた神経幹細胞に Crx 遺伝子を強制発現させてもロドプシン陽性細胞は得られなかったことをあわせて報告している。効率的な分化誘導には発生学的に近い細胞を利用すること、発生にかかわる遺伝子の応用が重要であることが推察される。

図6 神経幹細胞の内耳移植 (Ito ら⁶⁴⁾より改変)

ラット内耳に神経幹細胞を移植後の蝸牛上皮、感覚上皮の上に移植細胞(太矢印)が巣状に生着している。一部の細胞(細矢印)は蝸牛の感覚上皮内に入り込んで有毛細胞に置き換わっているようにみえる。

内耳における細胞移植研究と今後の展望

内耳有毛細胞の再生を考えた場合、その方法としてはいくつかの選択肢が考えられている。まず考えられるのは有毛細胞が残存している場合、残存している細胞が自己を修復して再び有毛細胞の機能を取り戻すという方法、2つ目は支持細胞から有毛細胞へ分化させる方法である。これらの再生経路は鳥類で確認されているが、哺乳類では前庭においてごくまれに認めるのみで、蝸牛においては現在のところ難しいとされている。そこでわれわれ⁶⁴⁾は幹細胞を用いて内耳再生ができないかと考え、神経幹細胞の内耳移植を試みた。

新生ラット(生後2～3日)の内耳に海馬由来の神経幹細胞を移植し、投与2～4週間後の移植した細胞の様子を観察した。結果、蝸牛の鼓室階、前庭階、蝸牛管の内部、管腔壁に移植細胞が一塊となって見出され、神経幹細胞が移植後数週間たっても生着しつづけている像が観察された。また一部に神経幹細胞が有毛細胞上に生着し、蝸牛コルチ器内に侵入して一部有毛細胞に置き換わっているのではないかとする所見も確認され(図6)、神経幹細胞が内耳障害の治療に応用できる可能性が示された。

まとめ

幹細胞を用いた神経組織の再生研究は緒についたばかりであり、今後克服しなければならない問題は数多く残されている。われわれの実験で幹細胞移植が内耳再生医療にも応用できる可能性が示されたが、移植細胞のうち感覚上皮内に生着している細胞はごく一部であった。将

来的な臨床応用を考えた場合、内耳の効果的な再生には移植細胞の効率的な生着と分化誘導が必須である。移植した細胞の生死には宿主環境の低酸素、機械的損傷、傷害部位から産生されるフリーラジカル、宿主環境の過度の破壊による成長因子の不足などが関わっているとされる⁶⁵⁾が、これらの問題を解決して生着効率を上げるにはカスパーゼインヒビターや神経栄養因子などの応用が必要であろう⁶⁵⁾。また適切な細胞への分化を促すにはただ移植するだけではなくウイルスなどのベクターを介して積極的な分化誘導を促すことが必要と思われる。Kim ら⁵⁵⁾は中枢神経系においてES細胞からドーパミン産生ニューロンを誘導して移植治療に応用して機能的なシナプスの形成に成功しており、内耳においても分化誘導を考える上で今後のヒントになるとと思われる。また、内耳の再生には有毛細胞への分化だけでなく、有毛細胞が再生した後に蝸牛神経と再生有毛細胞がシナプスを形成して内耳が機能的に再生されることが必要であるが、これらを考える上でも前述の中枢神経系における知見は参考になろう。in vivo での移植実験に加えて、このような神経系における in vivo, in vitro での研究で得られた知見をあわせていけば遠くない将来に内耳の再生が可能になるのではと期待される。

参考文献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145 ~ 1147, 1998.
- 2) Reynolds BA and Weiss S : Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175** : 1 ~ 13, 1996.
- 3) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** : 143 ~ 147, 1999.
- 4) Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, et al. : Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* **84** : 571 ~ 578, 2002.
- 5) 森下 亨, 朴木寛弥, 大串 始, 他 : 患者骨髄由来再生培養骨を用いた骨腫瘍の治療 (A case report). *日本再生医療学会雑誌* **1** : 52, 2002.
- 6) Shin'oka T, Imai Y and Ikada Y : Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* **344** : 532 ~ 533, 2001.
- 7) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. : Cultivated corneal epi-

- thelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* **119** : 298 ~ 300, 2001.
- 8) Storb R, Epstein RB, Bryant J, et al. : Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* **6** : 587 ~ 593, 1968.
 - 9) 嶋田寿文, 室原豊明 : 自己骨髓細胞移植による血管再生医療. 再生医学再生医療 (室田誠逸編). 102 ~ 108 頁, 東京化学同人, 東京, 2002.
 - 10) Evans MJ and Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* **292** : 154 ~ 156, 1981.
 - 11) Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. : Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168** : 342 ~ 357, 1995.
 - 12) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al. : Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18** : 675 ~ 679, 2000.
 - 13) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. : Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28** : 31 ~ 40, 2000.
 - 14) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al. : Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 1580 ~ 1585, 2002.
 - 15) Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, et al. : Direct neural fate specification from embryonic stem cells; a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30** : 65 ~ 78, 2001.
 - 16) Liu S, Qu Y, Stewart TJ, et al. : Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 6126 ~ 6131, 2000.
 - 17) Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, et al. : Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* **19** : 419 ~ 424, 2001.
 - 18) Davis AA and Temple S : A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* **372** : 263 ~ 266, 1994.
 - 19) Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, et al. : Turning brain into blood; a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283** : 534 ~ 537, 1999.
 - 20) Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, et al. : Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* **8** : 268 ~ 273, 2002.
 - 21) Weissman IL : Translating stem and progenitor cell biology to the clinic; barriers and opportunities. *Science* **287** : 1442 ~ 1446, 2000.
 - 22) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. : Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61** : 364 ~ 370, 2000.
 - 23) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418** : 41 ~ 49, 2002.
 - 24) Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al. : Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416** : 545 ~ 548, 2002.
 - 25) Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3** : 778 ~ 784, 2001.
 - 26) Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. : Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 4710 ~ 4715, 2001.
 - 27) Blumcke I, Schewe JC, Normann S, et al. : Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* **11** : 311 ~ 321, 2001.
 - 28) Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, et al. : FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 5874 ~ 5879, 2001.
 - 29) Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, et al. : Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* **19** : 8487 ~ 8497, 1999.
 - 30) Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. : Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* **8** : 666 ~ 676, 1996.
 - 31) Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, et al. : Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* **21** : 6718 ~ 6731, 2001.
 - 32) Fallon J, Reid S, Kinyamu R, et al. : In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 14686 ~ 14691, 2000.
 - 33) Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al. : Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17** : 5820 ~ 5829, 1997.
 - 34) Bjorklund A and Stenevi U : Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* **177** : 555 ~ 560, 1979.
 - 35) Michejda M : Treatment of Parkinson's disease in adult

- patients by transplantation of human fetal brain tissue obtained from elective abortions. *Fetal Ther* 2 : 129 ~ 134, 1987.
- 36) Lindvall O : Parkinson disease; stem cell transplantation. *Lancet* 358 Suppl : S48, 2001.
 - 37) Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, et al. : Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356 : 1975 ~ 1979, 2000.
 - 38) Brustle O, Spiro AC, Karram K, et al. : In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 14809 ~ 14814, 1997.
 - 39) Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. : Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28 : 713 ~ 726, 2000.
 - 40) Brustle O, Choudhary K, Karram K, et al. : Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat Biotechnol* 16 : 1040 ~ 1044, 1998.
 - 41) Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, et al. : Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 148 : 135 ~ 146, 1997.
 - 42) Cao QL, Zhang YP, Howard RM, et al. : Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 167 : 48 ~ 58, 2001.
 - 43) Chow SY, Moul J, Tobias CA, et al. : Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord. *Brain Res* 874 : 87 ~ 106, 2000.
 - 44) Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al. : Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383 : 624 ~ 627, 1996.
 - 45) Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. : Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20 : 8727 ~ 8735, 2000.
 - 46) Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. : Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 11879 ~ 11883, 1995.
 - 47) Macklis JD : Transplanted neocortical neurons migrate selectively into regions of neuronal degeneration produced by chromophore-targeted laser photolysis. *J Neurosci* 13 : 3848 ~ 3863, 1993.
 - 48) Rossi F and Cattaneo E : Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases; dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3 : 401 ~ 409, 2002.
 - 49) Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, et al. : Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278 : 477 ~ 483, 1997.
 - 50) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. : *J Neurosci Res* 69 : 925 ~ 933, 2002.
 - 51) Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, et al. : Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol* 165 : 66 ~ 76, 2000.
 - 52) Zhang W, Lee WH and Triarhou LC : Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat Med* 2 : 65 ~ 71, 1996.
 - 53) Sotelo C and Alvarado-Mallart RM : The reconstruction of cerebellar circuits. *Trends Neurosci* 14 : 350 ~ 355, 1991.
 - 54) Mattsson B, Sorensen JC, Zimmer J, et al. : Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* 28 : 1225 ~ 1231, 1997.
 - 55) Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. : Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418 : 50 ~ 56, 2002.
 - 56) Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, et al. : Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137 : 376 ~ 388, 1996.
 - 57) Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. : Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 2344 ~ 2349, 2002.
 - 58) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al. : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410 ~ 1412, 1999.
 - 59) Vacanti MP, Leonard JL, Dore B, et al. : Tissue-engineered spinal cord. *Transplant Proc* 33 : 592 ~ 598, 2001.
 - 60) Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, et al. : Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12 : 340 ~ 348, 1998.
 - 61) Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, et al. : Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 4268 ~ 4274, 2000.
 - 62) Wojciechowski AB, Englund U, Lundberg C, et al. : Long-term survival and glial differentiation of the brain-derived precursor cell line RN33B after subretinal transplantation to adult normal rats. *Stem cells* 20 : 163 ~ 173, 2002.
 - 63) Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, et al. : Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4 : 1163 ~ 1164, 2001.
 - 64) Ito J, Kojima K and Kawaguchi S : Survival of neural stem cells

- in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 121 : 140 ~ 142, 2001.
- 65) Brundin P, Karlsson J, Emgard M, et al. : Improving the survival of grafted dopaminergic neurons; a review over current approaches. *Cell Transplant* 9 : 179 ~ 195, 2000.

原稿受付：平成15年 3 月24日
原稿採択：平成15年 4 月30日
別刷請求先：楯谷一郎
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科