Mini Review

パーキンソン病に対する細胞治療 ドパミン・GDNF 産生細胞移植を中心に

伊達 勲

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態外科学(脳神経外科)

Cell therapy for Parkinson's disease: special reference to dopamine or GDNF producing cell grafting

Parkinson's disease is a chronic and progressive neurological disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Conventional stereotactic surgery has been performed as surgical therapy and cell grafting into the brain is the newest surgical therapy for that disorder. In order to deliver dopamine or neurotrophic factors into the host striatum, several types of cell lines have been created.

The merits of using cell lines as donors for neural grafting are that they are unlimited as donor source theoretically and they can be genetically modified. However, when using cell lines as donors, immunological rejection and tumor formation should be controlled. To overcome these issues, encapsulated cell grafting technique using semipermeable membrane consisted of polymer has been developed. This technique also has safety because the capsule is retrievable after transplantation. In this mini-review, encapsulated cell grafting research using neurotransmitter and/or neurotrophic factor secreting cell lines will be summarized and future perspectives will be performed from the aspects of therapy for neurological disorders.

Rec.10/23/2002, Acc.1/15/2003, pp99-103

Isao Date

Department of Neurological Surgery,

Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry

Key words neural transplantation, cell line, encapsulated cells, dopamine, neurotrophic factor

はじめに

パーキンソン病は、黒質線条体ドパミン神経系の慢性進行性変性疾患である。本疾患に対する外科的治療法としては、従来より定位脳手術(定位的凝固術、深部電気刺激療法など)が行われてきたが、新しい外科的療法として、脳内細胞移植が注目されている。線条体に欠落しているドパミンを補うためのドパミン産生細胞や、宿主内因性ドパミン系の再生・保護を目的としてglial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF)などの神経栄養因子産生細胞の脳内移植が検討されてきた。本稿では、ドパミンやGDNFを産生する細胞株の脳内細胞移植によるパーキンソン病の治療についてまとめる。

パーキンソン病に対する細胞移植の流れ

パーキンソン病に対する脳内細胞移植の目的は、大き

く3つに分類することができる。欠落した神経伝達物質を脳内移植によって宿主に供給する、移植したドナー細胞が宿主内に神経突起を伸展し、宿主神経細胞とシナプスを形成することによって神経回路の再構築を図る、ドナー細胞から神経栄養因子を宿主に供給し、宿主内因性の神経細胞の活性化を促進するの3つである。

これらの目的のためにまずドナー細胞として用いられたのは、胎児・胎児のドパミン産生細胞である黒質細胞である。このドナー細胞はドパミンの供給源であるだけでなく、移植後神経突起を宿主内にのばし、神経回路の再構築をするという利点がある¹⁾。しかしながら、胎児の細胞を使うという倫理的問題や、同種異系移植という免疫学的な問題がある。胎児細胞移植に伴うこれらの問題を回避するため、自己細胞である副腎髄質クロム親和細胞や、交感神経節細胞をドナーとする細胞移植の研究、

図1 カプセルからのドパミン供給と移植 12ヵ月後のカプセル

移植12ヵ月の長期にわたりドパミンは持続的に産生されており、移植12ヵ月後のカプセル内にはPC12細胞が良好に生着している。

臨床応用が行われてきた^{2,3)}。特にクロム親和細胞は、ドパミンなどのカテコールアミンだけでなく、種々の神経栄養因子の供給源でもあることから、移植後の生着率を向上させるための種々の方法が研究されてきた^{4,5)}。しかしながら、自己細胞であるため、加齢あるいはパーキンソン病自体によるドナー細胞の傷害の可能性がある。

カプセル化細胞脳内移植

細胞株を脳内移植のドナー細胞として用いる利点としては、理論的に供給源として無限であるという点と、遺伝子操作が行いやすいという点をあげることができる。現時点では、神経伝達物質や神経栄養因子の供給源として安定性のあるものは、ほとんどが異種由来の細胞株であるため、免疫反応抑制と腫瘍化の制御が課題である。高分子半透膜製のカプセルにこれらの細胞株を封入して移植することにより、これらの問題を克服することがこれまでの研究で示され、臨床応用も行われてきた^{6,7)}。半透膜製のカプセルに封入して移植するわけであるから、カプセル内への酸素、栄養素の供給は自由に行われ、カプセル内の細胞から産生される神経伝達物質や神経栄養因子は自由に外に出ることができる。しかしながら、分子量の大きな抗体や免疫担当細胞は、中に入ることができず、カプセル内は免疫学的租界になっている。また、カプセルに一定の硬度があるため、中の細胞が腫瘍化して脳内に浸潤していくことを防

ぐことが可能である。

現在カプセルとして用いているのは、ポリスルホンなどを素材とする円筒形の中空系であるが、物理的に強く、シリコンのtether（ヒモ）を附着させ、その一端を頭蓋骨に固定しておけば、脳深部に移植した後も容易に脳の外に取り出すことができるという長所を持つ。ヒトへの臨床応用を考える場合、移植後何か問題が生じた時に、脳の外に容易に取り出せるということは、安全性の上からも重要である。

神経伝達物質産生細胞株の移植

カプセル化ドパミン産生細胞の脳内移植のドナー細胞としては、ラット副腎褐色細胞腫由来のドパミン産生細胞株であるPC12細胞が用いられている。パーキンソン病モデルラットの線条体に移植することによって、改善効果が得られることが、組織学的、生化学的、行動学的に確認された。この細胞を、異種であるサル線条体内にカプセル化しない状態でそのまま移植した場合は、移植2週後まではサルの脳内にPC12細胞が生存することができるものの、拒絶反応のために移植4週後には生存するPC12細胞はごくわずかとなり、8週後には完全に消失してしまうことが、MRIと組織学的検討によって確認された⁸⁾。

以上のことから、PC12細胞をサルの脳内に移植し、その生着を期待するには、カプセル化移植が必要である。臨

図2 ドパミンと GDNF を同時に供給するための 2 つの方法

上のパネルは PC12細胞に遺伝子導入によってGDNF産生能を持たせた細胞(PC12-GDNF)をカプセル化する方法を示す。下のパネルは従来のPC12細胞とBHK-GDNF細胞の 2 種類の細胞を1つのカプセルに封入する方法を示す。

床応用を目的に、カプセル化PC12細胞の脳内移植について、サルのパークンソン病モデルを用いて長期に検討した⁹⁾。宿主のサルには、左側の内頸動脈にMPTPという脳内ドパミン系に対する神経毒を注入し、片側パーキンソン病モデルとした。左側の線条体内に、カプセル化PC12細胞を移植し、移植1ヵ月、6ヵ月、12ヵ月後に屠殺した。移植されたカプセルからのドパミン産生量は移植12ヵ月後も十分量が保たれており、組織学的にも多数のPC12細胞の生着が認められた(図1)。免疫抑制剤は使用していないにもかかわらず、宿主脳内には移植細胞の腫瘍化や免疫学的拒絶反応は認められず、カプセル周辺のグリオーシスはわずかであった。血液学的検索でも移植後白血球数、CD4/CD8値などの異常は観察されなかった。PC12細胞の移植を受けたサルでは、移植後12ヵ月の長期にわたってパーキンソン病症状の改善効果が得られた。同様のカプセル化PC12細胞移植を行ったサルで、カプセルからのドパミン産生がpositron emission tomography (PET) によっても証明されている¹⁰⁾。

多くの動物実験の結果に基づき、カプセル化ドパミン産生細胞の脳内移植は臨床応用可能な方法と考えられ、従来の定位脳手術に併用する方法が、より効果的なパーキンソン病に対する外科的治療法として期待される。この方法に

よって、定位脳手術後に患者が内服するL-ドパ量を減少させることが期待でき、ひいてはL-ドパ長期服用による副作用を軽減させることになると考えられる。

神経栄養因子産生細胞株の移植

種々の神経疾患に対して、神経栄養因子を脳内投与することにより、関与する神経細胞の保護や再生が期待できることが示されてきた。一方、分子生物学的手法の発達により、種々の神経栄養因子産生細胞株を作製することが可能になっている。これらの細胞株をカプセル化し脳内移植することにより、神経栄養因子を脳内に安定供給することができる。これまでに nerve growth factor (NGF)、ciliary neurotrophic factor (CNTF)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)などの神経栄養因子産生細胞をカプセル化して移植した報告がある^{4, 6, 11-13)}。いずれの場合も遺伝子導入細胞としては、baby hamster kidney (BHK) 細胞が使われ、これに遺伝子操作を加えて、種々の神経栄養因子の遺伝子を組み込み、安定産生する細胞株を作製している。

GDNFは、脳内ドパミン神経系に対して強い効果を持つ神経栄養因子である。遺伝子操作によってGDNFを産生する細胞株を作製し、カプセルに封入後、ラットの右線条体

内に移植した。宿主ラットの右線条体には、移植前あるいは移植後にドパミン系に対する神経毒である 6-OHDA を注入し、GDNF 産生カプセルの宿主ドパミン神経系に対する長期の保護および再生効果について検討した。移植したカプセルからは 6 ヶ月間持続的に GDNF が産生され、カプセル内には GDNF 産生細胞が良好に生着した。宿主線条体および黒質のドパミン線維およびドパミンニューロンの良好な生存および再生が観察され、行動学的にも改善が得られた¹²⁾。カプセル化 GDNF 産生細胞脳内移植については、サルのパーキンソン病モデルを用いた検討でも有用であることが報告されている。

神経伝達物質と神経栄養因子の同時供給

これまでの研究で示されたように、パーキンソン病に対する細胞移植では、欠落したドパミンを供給することに加えて、GDNF 等の神経栄養因子を供給することで内因性のドパミン系を活性化させるという 2 つの目的がある。従来の研究では、この両者は、別々のアプローチを用いて試みられてきたが、カプセル化細胞の移植では、神経伝達物質と神経栄養因子を同時に脳内に供給することが可能であり、筆者らはそれを目的に 2 つの新しい試みを行っている (図 2)。

一つは PC12 細胞に GDNF 遺伝子を組み込んで、PC12-GDNF 細胞株を作り、これをカプセル化して移植に用いる方法である。PC12 細胞はドパミンは安定産生するが、GDNF は全く産生しない。リポソーム法で GDNF 遺伝子を PC12 細胞に導入することによって、ドパミンと GDNF の両者を産生することが確認され、*in vitro*、*in vivo* での検討を進めている。

もう一つの方法は、すでに存在している PC12 細胞と、BHK-GDNF 細胞の 2 種類の細胞を 1 つのカプセルに封入する方法である。これまでカプセル化細胞の移植の研究は多くあるが、全て、1 種類の細胞株を封入して移植しており、2 種類の細胞株を同時に 1 つのカプセルの中に封入した研究は報告されていない。両方の細胞株を、どの割合で封入すればよいかなど検討課題は多いものの、再生医学の面からは興味深い試みと考えている。

カプセル化細胞中枢神経系移植の臨床応用報告

神経疾患に対するカプセル化細胞移植の臨床応用としては、癌性疼痛の患者の脊髄腔内にカプセル化したウシのクロム親和細胞(カテコールアミンの他にオピオイドペプチドを産生する)を移植し、術後鎮痛薬の内服量を減量できたという報告がなされている¹⁴⁾。

その他の臨床応用として、カプセル化 CNTF 産生細胞を筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄腔内に移植し、脳脊髄液から十分量の CNTF が長期間検出されたという報告⁶⁾、カプセル化 CNTF 産生細胞をハンチントン病の患者の脳内に移植するためのプロトコールに関する報告¹⁵⁾、がある。いずれの臨床例においてもカプセルの移植に伴う免疫反応や感染などの問題は全く起こっておらず¹⁶⁾、今後、カプセル化細胞の中枢神経系内移植の臨床応用が種々の神経疾患に対して行われていく期待を持たせる報告である。

おわりに

細胞株を脳内移植のドナーとして用いるという考え方はかなり以前からこの分野の研究者の間では広まっていたが、免疫反応や腫瘍化の制御が大きな課題であった。本総説で示したようなカプセル化細胞の移植が可能となり、しかも遺伝子操作によって種々の神経伝達物質や神経栄養因子を産生する細胞株を作製できるようになり、この方法を用いた研究は、多くの神経疾患の一治療法としてさらに進んでいくことが期待される。

謝 辞

この研究の一部は、科学技術庁科学技術振興調整費、厚生科学研究費補助金、および文部省科学研究費補助金の援助を受けた。ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Bjorklund A, Stenevi U: Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral transplants. *Brain Res*, 177: 555-560, 1979.
- 2) Date I, Ohmoto T: Neural transplantation and trophic factors in Parkinson's disease: special reference to chromaffin cell grafting, NGF support from pretransected peripheral nerve and encapsulated dopamine-secreting cell grafting. *Exp Neurol*, 137: 333-344, 1996.
- 3) Date I: Parkinson's disease, trophic factors, and adrenal medullary chromaffin cell grafting: basic and clinical studies. *Brain Res Bull*, 40: 1-19, 1996.
- 4) Date I, Ohmoto T, Imaoka T, Ono T, Hammang JP, Francis J, Greco C, Emerich DF: Cografting with polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting cells and chromaffin cell survival and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats. *J Neurosurg*, 84: 1006-1012, 1996.
- 5) Date I, Imaoka T, Miyoshi Y, Ono T, Asari S, Ohmoto T: Chromaffin cell survival and host dopaminergic fiber recovery in a patient with Parkinson's disease treated by

- cografts of adrenal medulla and pretransected peripheral nerve: case report. *J Neurosurg*, 84: 685-689, 1996.
- 6) Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE: Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Med*, 2: 696-699, 1996.
 - 7) Emerich DF, Winn SR, Christenson L, Palmatier MA, Gentile FT, Sanberg PR: A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: Use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosci Biobehav Rev*, 16: 437-447, 1992.
 - 8) Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T, Ohmoto T: Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells. *Cell Transplant*, 8: 427-430, 1999.
 - 9) 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.
 - 10) Subramanian T, Emerich DF, Bakay RA, Hoffman JM, Goodman MM, Shoup TM, Miller GW, Levey AI, Hubert GW, Batchelor S, Winn SR, Saydoff JA, Watts RL: Polymer-encapsulated PC-12 cells demonstrate high-affinity uptake of dopamine in vitro and 18F-Dopa uptake and metabolism after intracerebral implantation in nonhuman primates. *Cell Transplant*, 6: 469-477, 1997.
 - 11) Date I, Shingo T, Ohmoto T, Emerich DF: Long-term enhanced chromaffin cell survival and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with co-grafted polymer-encapsulated human NGF-secreting cells. *Exp Neurol*, 147: 10-17, 1997.
 - 12) Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Takeuchi A, Ohmoto T: Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. *Cell Transplant*, 10: 397-401, 2001.
 - 13) Fujiwara K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Kobayashi K, Takeuchi A, Tamiya T, Ohmoto T: Neurotrophic factor-secreting cell grafting for cerebral ischemia: preliminary report. *Cell Transplant*, 10: 419-422, 2001.
 - 14) Buchser E, Goddard M, Heyd B, Joseph JM, Favre J, de Tribolet N, Lysaght M, Aebischer P: Immunisolated xenogenic chromaffin cell therapy for chronic pain. Initial clinical experience. *Anesthesiology*, 85: 1005-1012, 1996.
 - 15) Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, Aebischer P: Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther*, 11: 1723-1729, 2000.
 - 16) Zurn AD, Henry H, Schluep M, Aubert V, Winkel L, Eilers B, Bachmann C, Aebischer P: Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplant*, 9: 471-484, 2000.