<シンポジウムⅥ>

1. 神経幹細胞を用いた脳卒中治療

高橋 淳

京都大学大学院医学研究科 脳神経外科

Key words: 神経幹細胞, 海馬, 線維芽細胞増殖因子
(脳卒中 24: 350—354, 2002)

1. はじめに

「脳を守る」ということは脳神経外科医に託された使命であるが、従来は死にゆくニューロンの数をいかに最小限に食い止めるかということに主眼が置かれていた。それには血行再建を含めた脳血流の改善、ステロイド等の投与による神経保護などが挙げられる。これらの方法は一定の効果を上げているのであるが、特に慢性期の状態において、新たな神経回路の形成による機能再生というより積極的な治療法が望まれてきた。1980年代にパーキンソン病患者に対する細胞移植療法が始められ、特に胎児黒質細胞移植はその効果が認められているが、近年神経幹細胞の存在が明らかになるにつれてこの細胞を用いた治療に期待が寄せられるようになってきた。神経幹細胞を用いた機能再生の方法として細胞移植による方法と内在性幹細胞を賦活化する方法とがあるが(図1)、細胞移植によって新たな神経回路を構築することは「神経再建」と呼ぶことができる。これに対し、脳内にもともと存在する神経幹細胞からのニューロン新生を促進して神経回路を構築することは狭義の「神経再生」と呼ぶことができる。

本稿ではおもに神経幹細胞移植に注目し、この細胞を利用した脳卒中治療の展望について述べる。

2. 神経幹細胞を通じた見た脳

「神経幹細胞」という概念が導入されたことによって脳内の現象を改めて見直す必要がでてきた。例えば、パーキンソン病に対して行われてきた胎児中脳黒質細胞移植を考えてみる。従来の考え方では、この移植細胞の中に分化したあるいは未熟なドーパミン作動性ニューロンが含まれており、これらが宿主脳内に生着すると考えられてきた。しかし、神経幹細胞にも目を向けてみると、移植された胎児細胞の中にはドーパミ

ン作動性ニューロン以外に神経幹細胞すなわち多分化能・自己複製能を持つ細胞が含まれ、移植されたのちに宿主内で増殖し移動しドーパミン作動性ニューロンを含む複数のタイプのニューロンやグリアに分化すると考えられる。つまり、移植後に脳内でみられるTH陽性細胞はもともと移植細胞内に存在したものばかりでなく移植細胞内に含まれていた幹細胞が増殖し分化したことによるTH陽性細胞の場合もあるということである(図2)。

神経細胞死に対する保護効果を考える場合も同様である。よく用いられる実験系に海馬CA1錐体ニューロンの遅発性細胞死がある。例えば従来の考え方では、ある範囲にもともと1,000個あったニューロンが2個になるのがあるサイトカインの脳室内投与によって100個になった場合、その差98個はサイトカインの影響で細胞死を免れた細胞ということになる。ところが、神経幹細胞とりわけ内在性幹細胞からのニューロン新生という概念が導入されると、この現象の解釈はもっと複雑になる。つまり先の98個のニューロンの一部あるいはすべてが新たに生み出されたニューロンかも知れないのである。事実、神経細胞保護効果があるとされてきたFGF-2投与によって海馬におけるニューロン新生が促進されることが報告されている。虚血や外傷などによる脳損傷時の神経細胞保護においては、神経細胞死を最小限に抑えるという側面と内在性幹細胞からのニューロン新生を最大限に促進するという側面の両方を考える必要があるということになる。

3. 神経幹細胞の分化能

神経機能再生を目的として細胞移植を考える場合、移植された細胞が必要とされるタイプのニューロンに分化するということが前提となる。神経幹細胞は、果たしてどのようなタイプのニューロンに分化すること

図1 神経幹細胞を用いた中枢神経機能の再生

A) 神経幹細胞を胎児または成体の海馬や脳室下帯から分離・培養し、遺伝子導入や分化誘導の後に脳に移植する。脳内での移動・分化によってシナプス形成や髄鞘形成を期待する。B) 脳室内に FGF などのサイトカインを投与し、内在性幹細胞からのニューロン新生、グリア新生を期待する。

図3 移植後の海馬 CA1 領域でみられた神経幹細胞由来のニューロン

移植した神経幹細胞は b-gal に対する抗体で同定された(矢頭)。神経突起様構造がみられると同時にシナプトプレビンの発現がみられ、ニューロンに分化したものと考えられる。(文献6より改変)

図2 移植や神経細胞保護に対する考え方

A) 従来の考え方。B) 神経幹細胞の概念を導入すると、神経幹細胞が増殖・分化して新たなニューロンを生み出すという現象を考慮に入れる必要がある。

ができるのであろうか。我々は成体ラット海馬由来神経幹細胞を分離・培養し、さらに、ひとつの細胞から増殖したモノクローナルな細胞株を樹立しこの細胞の解析をおこなった¹⁾。これらの細胞はレチノイン酸や NGF, BDNF, NT-3 に反応して GABA 陽性, acetylcholinesterase 陽性, tyrosine hydroxylase (TH) 陽性あるいは calbindin 陽性ニューロンへと分化した。このように、神経幹細胞はひとつの細胞からであっても

様々なタイプのニューロンに分化する能力がある。また、上記のニューロン以外にもマウス神経幹細胞から glutamate や substance P 陽性のニューロンに分化することが観察されており²⁾、分化のコントロールや細胞の選別を的確に行えば様々な疾患に対応できると考えられる。

4. 神経幹細胞のシナプス形成能

脳内に移植された神経幹細胞が長期にわたって神経機能を再生させるには、幹細胞由来のニューロンが宿主ニューロンとシナプスを形成し、新たな神経回路を形成することが必要となる。その可能性を明らかにするために、我々は先ほどの成体ラット海馬由来神経幹細胞を用いてそのシナプス形成能を in vitro で検討した³⁾。

神経幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、その後、ラット胎児海馬のグリア細胞層上でこの神経幹細胞を培養した。レチノイン酸で分化誘導を行った後、BDNF, NT-3 存在下に胎児海馬由来初期培養ニューロンとの共培養を行った。免疫染色では神経幹細胞由来ニューロンの神経突起上でシナプトフィジンやシナプトプレビンといったシナプス小胞関連蛋白が確認され、電子顕微鏡でも未成熟な

図 4 成体ラット海馬由来神経幹細胞から機能的ニューロンへの分化

培養による分化誘導では、ネスチン陽性であった神経幹細胞が約 2 週間で GABA や TH など神経伝達物質関連蛋白を発現するようになり、さらにシナプス小胞関連蛋白も発現するようになる。ラット海馬アストロサイト上での培養では、12~18 日で活動電位が認められるようになり、約 1 カ月で後シナプス電流が記録されるようになる。この細胞をラット一過性脳虚血モデルの海馬に移植すると、後シナプス電流がみられる時期に一致して水迷路テストでの空間認識能の改善がみられるようになる。

がらシナプス小胞や細胞膜の肥厚などのシナプス構造が観察された。パッチクランプ法を用いて電気生理学的解析を行うと分化誘導開始から 12~18 日で活動電位が記録され、28~35 日には後シナプス電流が観察された。後シナプス電流を薬理的に検討すると約半数は AMPA 型グルタメイト受容体を介した興奮性電流、残り半数は GABA-A 受容体を介した抑制性電流であることが分かった。

他にもラット胎仔由来神経幹細胞から誘導されたニューロンで NMDA 型グルタメイト受容体を介した興奮性電流が観察され⁴⁾、さらに新生ラットの脳内でもシナプスを形成することが報告されている⁵⁾。これらの結果は、移植された神経幹細胞由来のニューロンが脳内で実際にシナプスを形成し新たな神経回路を構築することを期待させる。

5. 神経幹細胞移植の脳虚血モデルに対する効果

次に脳内での動態を検討するために上記の神経幹細胞をラット脳内に移植した。神経幹細胞の移植実験は数多く報告されているが、我々は一過性脳虚血モデルに注目して実験を行った⁶⁾。

側副血行路を遮断してから両側の内頸動脈を一時的に閉塞させると海馬の CA1 領域の錐体ニューロンが選択的に遅発性細胞死に陥る。この CA1 領域に先の海

馬由来神経幹細胞を移植し、脱落したニューロンに代わって新たなニューロンが生着しうるかどうかを検討した。一側につき 75,000 個の細胞を移植し、移植後 3 週間目から水迷路試験を開始して、その 10 日後に灌流固定をして免疫染色を行った。免疫染色による観察では、1~3% の細胞が CA1 領域に生着しそのうち 3~9% が NeuN 陽性のニューロンへと分化していた。CA1 に生着したニューロンは神経突起様の構造を呈し、シナプス小胞関連蛋白を発現していた (図 3)。水迷路試験による空間認識学習能を虚血のみのコントロール群と比較すると CA1 に生着したニューロンが 120 個以上のラットでは試験開始後 8~10 日後において有為な改善が認められた。

以上の結果をまとめると、神経幹細胞は様々なタイプのニューロンに分化する能力をもち、脳内に移植されたのちも神経機能の再生をもたらすと考えられる。そのタイムコースに注目すると、水迷路試験で空間認識能の改善が出始めたタイミングは *in vitro* の実験で後シナプス電流が記録されだしたタイミングと一致する (図 4)。このことは移植された神経幹細胞から分化したニューロンがシナプスを形成し新たな神経回路構築に関与していることを示唆する。つまり、脳虚血などによって失われたニューロンを神経幹細胞移植によって補い、もう一度神経回路を構築させることがで

きる可能性があるということである。

6. 内在性幹細胞の賦活化

最近の研究で、虚血や薬剤による脳損傷時に内在性幹細胞の賦活化機構が働いていることが明らかになってきている。例えば、マウスの前脳虚血モデルにおいて海馬でのニューロン新生亢進が報告されている⁷⁸⁾。しかし、これらの報告ではBrdU陽性細胞の増加が見られたのは再還流後約1週間前後のみであった。その後、その神経幹細胞から分化したと思われるNeuN/BrdU陽性ニューロンが26~40日後に増加している。また、マウスへのカイニン酸腹腔内投与や中大脳動脈閉塞モデルでも海馬でもニューロン新生が亢進することが報告されているが、この場合においてもBrdU陽性細胞の増加が見られたのは損傷後約1~2週間後であった⁹⁾。かつ、この効果にはFGF-2が重要な役割を果たしている。同様に、6-OHDAを用いて黒質ドーパミンニューロンを脱落させたラットの線条体にTGF- α を投与すると脳室壁に存在する神経幹細胞の増殖、遊走によって線条体にTH陽性ニューロンが出現する¹⁰⁾。この場合、脳室壁の神経幹細胞は4~6日の間増殖し、その後線条体に向かって遊走する。また、明らかなメカニズムは示されていないが、MPTP投与によって黒質ドーパミンニューロンを脱落させたサル線条体においてもTH陽性ニューロンの増加が報告されている。

つまり、脳虚血モデルやパーキンソンモデルにおいて、脳損傷に応じて内在性幹細胞の賦活化によるニューロン新生機構が働くことは働くのであるが、それは急性期または亜急性期に限られる。その後には、むしろグリオーシスが起こってくる。従って、サイトカインなどを投与するタイミングが重要となるであろう。

7. おわりに

以上のように、従来の治療に加えて神経幹細胞を用いた脳卒中治療の可能性がおぼろげながら見えてきた。特に急性期においてはFGFの脳室内投与などによる内在性幹細胞の賦活化が中心となり、病態や症状が落ち着いた慢性期においては細胞移植が中心となる。細胞移植も急性期の方が生着・分化が良いという報告もあり、治療のタイミングは重要なポイントとなる。

脳卒中によって失われた大脳機能、特に高次脳機能が再生するということは拡大解釈すれば人格の維持にも関与する重大な問題である。そのためにまた新たな倫理的問題が生じるかも知れない。また、パーキンソン病のように必要なニューロンのタイプ、神経回路が単純ではないのでどのサブタイプのニューロンがどこに必要なのか、などを明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) Takahashi J, Palmer TD, Gage FH: Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38: 65—81, 1999
- 2) Gritti A, Parati EA, Cova L, et al: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091—1100, 1996
- 3) 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
- 4) Vicario-Abejón C, Collin C, Tsoulfas P, et al: Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* 12: 677—688, 2000
- 5) Auerbach JM, Eiden MV, McKay RDG: Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur J Neurosci* 12: 1696—1704, 2000
- 6) Toda H, Takahashi J, Iwakami N, et al: Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett* 316: 9—12, 2001
- 7) Liu J, Solway K, Messing RO, et al: Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18: 7768—7778, 1998
- 8) Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, et al: Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831: 283—287, 1999
- 9) 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
- 10) 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

Abstract

Treatment of stroke by using neural stem cells

Jun Takahashi, M.D.

Neural stem cells form functional synapses, and differentiate into neurons in the hippocampus of the ischemic rats. The possibility of treating stroke patients by using these cells will be discussed.

(Jpn J Stroke 24 : 350—354, 2002)

Key words : neural stem cells, hippocampus, fibroblast growth factor (FGF)