

中枢神経疾患に対するカプセル化細胞移植

安原隆雄*, 新郷哲郎, 小林和樹, 竹内 亮, 矢野昭正, 村岡賢一郎,
亀田雅博, 元 文姫, 早瀬仁志, 上利 崇, 松井利浩, 三好康之,
伊達 勲

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経病態外科学

キーワード：カプセル化細胞移植, グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF), 血管内皮成長因子 (VEGF), 脳虚血, パーキンソン病

はじめに

一度損傷を受けた中枢神経系組織は再生しないと長い間信じられてきたが、マウス成体脳から神経幹細胞が分離培養されて以来¹⁾、一定の可塑性を有することが認められている。再生医療の柱の一つである細胞移植療法では、損傷を受けた組織に移植細胞が生着し、元の機能を補うように働くことが理想である²⁾。脳梗塞のように様々な種類の細胞が一度に損傷される場合、移植細胞の適切な分化および回路再構築が必要である。また、黒質線条体のドパミンニューロンの変性により生じるパーキンソン病に代表される神経変性疾患の場合、均一な型の細胞の生着が必要であり、例えばパーキンソン病に対しては特に ES 細胞から高率にドパミンニューロンを分化誘導可能ではあるが³⁾、腫瘍化の問題がクリアされていない⁴⁾。

一方、移植細胞から分泌される神経栄養因子や各種成長因子が神経保護作用を有したり、内在性の神経新

生を賦活化したりすることも知られており、細胞移植療法の有する治療効果に大きく寄与していると考えられている⁵⁾。岡山大学神経病態外科学（脳神経外科）教室神経移植グループでは、神経幹細胞の研究と平行して、カプセル化神経栄養因子産生細胞移植の研究を行っている。本稿では、特にグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) をめぐる最新の知見を交えて、我々の行ってきたカプセル化細胞移植について報告する。

カプセル化細胞移植

カプセル化細胞移植は、膵臓や副甲状腺に代表されるホルモン産生臓器の一部の疾患において、すでに臨床応用がなされている^{6,7)}。中枢神経系領域でも、筋萎縮性側索硬化症患者に対する毛様体神経栄養因子 (CNTF) 産生細胞移植や慢性疼痛患者に対する副腎髄質のクロマフィン細胞移植が、髄腔内カプセル化細胞移植という方法で報告されている^{8,9)}。カプセル化細胞移植の長所・短所を表1に、シェーマを図1に示すが、腫瘍化や免疫拒絶を心配する必要がなく、長期間にわたり移植細胞が機能するという長所が、本法の最大の特徴である。また、新鮮な栄養因子・成長因子を持続的に宿主脳に供給できる点も大きな魅力である。

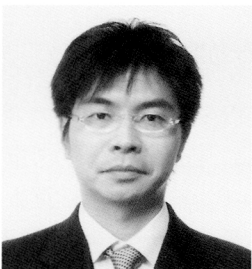
平成18年4月受理

*917 Bon Air Drive, Augusta, GA, 30907, USA

電話：1-706-733-0188.2487 FAX：1-706-823-3949

E-mail：tyasu37@cc.okayama-u.ac.jp；tyasuhara@mcg.edu

◆プロフィール◆



安原 隆雄

平成10年、岡山大学医学部卒、脳神経外科（現 神経病態外科）入局。平成13年11月より大本堯史前教授、伊達勲教授、新郷哲郎先生の指導の下、パーキンソン病に対するカプセル化細胞移植を中心とした中枢神経系の移植・再生に関する研究を行い、Eur J Neurosci（学位論文）、J Neurosurg, Rev Neurosci, Brain Resなどの論文発表を行う。また、愛媛大学医学部臨床薬理学教室、宮崎医科大学産婦人科学教室との共同研究も平行して行い数編の論文が掲載された。上記の研究が評価され平成17年日本脳神経外科学会奨励賞を受賞した。平成17年1月より、細胞移植の研究で世界的に有名な Dr. Cesario V. Borlonganのもとに留学（Medical College of Georgia）しており、骨髄細胞を用いた神経疾患の治療法やサル海馬虚血モデルについて研究中である。また、運動抑制と神経新生に関する新しい研究により平成18年上原記念生命科学財団より助成を受けている。

表1 カプセル化細胞移植の長所・短所

長 所	短 所
<ul style="list-style-type: none"> 免疫拒絶反応が生じない 硬い外殻に被われ腫瘍化を防ぐ 長期間の良好な生存が可能 必要な栄養因子を供給可能 新鮮な栄養因子を供給可能 低用量持続投与が可能 多種多量の細胞・細胞株が移植可能 手術によりカプセルの除去が可能 システムによっては外部からの調節可能 倫理的問題が少ない 	<ul style="list-style-type: none"> 移植細胞による直接の神経回路の再構築はない カプセル移植に伴う侵襲 異種細胞を使う場合、未知の因子分泌の可能性 永久に移植細胞が生存するかは不明

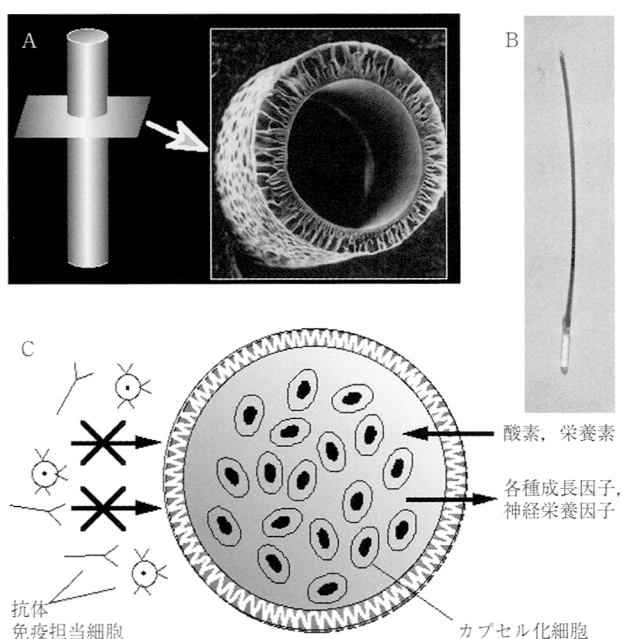


図1 カプセル化細胞の模式図

A: カプセルを顕微鏡下に拡大してみると多孔性の膜構造がよく分かる。B: カプセル断端に糸をつなげた状態で移植することにより、移植後何らかの問題が生じた際にはいつでも取り出し可能である。C: カプセルは半透膜製の中空糸より成っており、酸素や栄養素は自由に通過できるが、抗体や免疫担当細胞は通過できない。予め設定された分子篩より小さいサイズのカテコールアミン、神経栄養因子や成長因子はカプセルから周囲組織に拡散する。

血管内皮成長因子（VEGF）は生体内半減期が短く、単回大量投与では未熟な血管増生から出血をきたすことが知られているが、カプセル化細胞移植の方法を用いることで、新鮮な低用量の VEGF を持続的に組織に供給することが可能であり、パーキンソン病モデルや脳梗塞モデルラットに対し十分な治療効果が得られ

た¹⁰⁻¹³⁾。

先にも少しふれたが、我々の研究室では、パーキンソン病と脳梗塞に対するカプセル化細胞の脳内移植について研究してきた¹⁴⁻¹⁷⁾。サルパーキンソン病モデルに対して、ラット副腎褐色細胞腫由来のドパミン産生細胞株のカプセル化脳内移植を行い、移植後12ヶ月の長期にわたりパーキンソン病症状の改善効果を得た¹⁷⁾。一方、パーキンソン病に対してドパミンの長期過剰供給がジスキネジアや Wearing-off 現象の誘発を含め、病態を複雑に悪化させることが知られてきている。しかし、カプセル化細胞移植後も、抗生物質などで外部からドパミンの産生量をコントロールすることができれば、より安全に移植を行うことができる。我々は、テトラサイクリン投与により、ドパミン産生量を外部から調節できる細胞株についての研究を行った。in vitro においてテトラサイクリン用量依存性にドパミン産生量のコントロールが可能であることを確認した。さらに、パーキンソン病モデルラットに対するカプセル化細胞移植により、その髄液中のドパミン量の変化を確認した。長期的に in vivo では、ドパミン産生の On・Off を何度も切り替えしているうちに、徐々に制御が効きにくくなるという結果であったが、今後システムの改良により臨床応用も期待できると考えられた¹⁸⁾。

GDNF のパーキンソン病に対する効果

パーキンソン病の治療は L-DOPA やドパミンアゴニストを用いた薬物治療を柱とし、定位脳手術（深部核刺激術・深部核凝固術）や欧米では細胞移植も選択可能な治療法になっている。GDNF はパーキンソン病の新しい治療戦略の一つとして現在非常に注目されて

いる神経栄養因子である。2003年に5人のパーキンソン病患者に対する GDNF の線条体内直接注入が有効であったとする報告が出された¹⁹⁾。この報告では、体重減少などの GDNF による副作用は1例も生じておらず、患者の日常生活動作およびドパミン代謝を有意に改善している。GDNF の線条体内注入の方が、側脳室内注入に比べて効果が高いということは、我々の研究室でもすでに動物実験で証明してきているところであり²⁰⁾、このことが臨床応用でも証明されたといえる。その後、脳室内投与では治療効果が無かったとする報告²¹⁾、長期にわたり GDNF の効果が持続したとする報告²²⁾、片側 GDNF 投与で両側の臨床症状が改善したとする報告²³⁾、GDNF 投与により組織学的改善が認められたとする報告²⁴⁾が相次いだ。依然、有効な GDNF 投与時期・投与量に関しては不明な点が多い。

我々はより安全かつ有効な臨床応用に向けて、GDNF の投与方法に関する研究を行ってきた。GDNF 投与の有効性を投与回数・投与部位・投与される動物の年齢において検討した後^{20,25,26)}、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²⁷⁾。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。次いで、*in vitro*・*in vivo* のパーキンソン病モデルを用いて、GDNF の神経保護作用に対する、GDNF 投与量・投与時期の影響を検討した²⁸⁾。マウス胎仔ドパミンニューロンに対して、1～100ng/mlの GDNF を 6-OHDA の投与1日前、同時、2，4時間後に投与したところ、GDNF 投与時期が遅いほど神経保護作用は減弱し、6-OHDA 投与4時間後以外の GDNF 投与では有意な神経保護作用を示した。また、神経保護作用は GDNF 用量依存性であった。この結果に基づいて、GDNF 産生カプセル移植を線条体内 6-OHDA 注入1週間前、同時、1，2，4週間後に行い、行動学的・組織学的に評価した。コントロールカプセル移植群と比較するとすべての群において行動学的改善ならびにドパミンニューロンの生存

率向上を認めたが、改善の程度はカプセル移植が、より早期に行われた群ほど著明であった。これらの結果から、より良い効果を得るためには、パーキンソン病の比較的早い段階で GDNF 投与が開始されるのが望ましいと考えられた。さらに、臨床応用に近づくべく、MPTP によるパーキンソン病モデルマウスを用いた研究も行い、GDNF カプセルの治療効果を確認した²⁹⁾。

GDNF の脳虚血に対する効果

GDNF は脳虚血に対しても神経保護作用があることが明らかとなっている³⁰⁾。また、最近の報告の中には、移植細胞から分泌される GDNF が神経保護作用の中心となっているというものもある³¹⁾。我々は中大脳動脈閉塞 (MCAO) 脳梗塞モデルラットに対してカプセル化 GDNF 産生細胞移植を行った。GDNF カプセル移植群では MCAO 14日後に運動機能の改善と梗塞巣の体積の減少を認めた。また、MCAO 1日後には TUNEL 染色で TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が明らかに減少しており、GDNF の脳梗塞に対する神経保護作用は抗アポトーシス作用を介していることも示された (in submission)。また、新生仔ラットの全脳虚血モデルに対しても同様の実験を行い、予め GDNF カプセルを移植した群では組織学的・行動学的に改善がみられ、脳性マヒに対する治療戦略として GDNF の有効性が示唆された^{32,33)}。

おわりに

中枢神経疾患に対するカプセル化細胞移植について、我々の行ってきた GDNF 産生細胞移植を中心に報告した。安全性と更なる治療効果の向上を求めた前臨床研究が必要であるが、カプセル化細胞移植は、優れたドラッグデリバリーシステムとして、中枢神経疾患に対する治療の一つの選択肢に成り得ると考えられる。

文 献

- 1) Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* (1992) **255**, 1707-1710.
- 2) Goldman S: Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* (2005) **23**, 862-871.
- 3) Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T,

- Kishi Y, Fukuda H, Okamoto Y, Koyanagi M, Ideguchi M, Hayashi H, Imazato T, Kawasaki H, Suemori H, Omachi S, Iida H, Itoh N, Nakatsuji N, Sasai Y, Hashimoto N : Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* (2005) **115**, 102-109.
- 4) Vogel G : Cell biology. Ready or not? Human ES cells head toward the clinic. *Science* (2005) **308**, 1534-1538.
 - 5) Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G : Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* (2005) **436**, 266-271.
 - 6) Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Moller E, Bolinder J, Ostman J, Reinholdt FP, Hellerstrom C, Andersson A : Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* (1994) **344**, 1402-1404.
 - 7) Tibell A, Rafael E, Wennberg L, Nordenstrom J, Bergstrom M, Geller RL, Loudovaris T, Johnson RC, Brauker JH, Neuenfeldt S, Wernerson A : Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans. *Cell Transplant* (2001) **10**, 591-599.
 - 8) 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. *Nat Med* (1996) **2**, 696-699.
 - 9) 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* (1996) **85**, 1005-1012 ; discussion 29A-30A.
 - 10) Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Muraoka K, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H, Date I : Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* (2004) **19**, 1494-1504.
 - 11) Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Wen Ji Y, Kameda M, Takeuchi A, Yano A, Nishio S, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H, Date I : The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease model. *Brain Res* (2005) **1038**, 1-10.
 - 12) Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Agari T, Wen Ji Y, Hayase H, Hamada H, Borlongan CV, Date I : Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* (2005) **1053**, 10-18.
 - 13) Yano A, Shingo T, Takeuchi A, Yasuhara T, Kobayashi K, Takahashi K, Muraoka K, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H, Date I : Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* (2005) **103**, 104-114.
 - 14) 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* (2000) **9**, 705-709.
 - 15) Fujiwara K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Tamiya T, Ohmoto T : Reduction of infarct volume and apoptosis by grafting of encapsulated basic fibroblast growth factor-secreting cells in a model of middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* (2003) **99**, 1053-1062.
 - 16) Shingo T, Date I, Yoshida H, Ohmoto T : Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* (2002) **69**, 946-954.
 - 17) Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Kobayashi K, Miyoshi Y, Ohmoto T : Stereotactic transplantation of a dopamine-producing capsule into the striatum for treatment of Parkinson disease : a preclinical primate study. *J Neurosurg* (2003) **98**, 874-881.
 - 18) Kobayashi K, Yasuhara T, Agari T, Muraoka K, Kameda M, Wen Ji Y, Hayase H, Miyoshi Y, Matsui T, Shingo T, Date I : Control of dopamine-secretion by Tet-Off system in an in vivo model of Parkinsonian rat. *Brain Res Mol Brain Res* (2006) in press.
 - 19) Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P : Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* (2003) **9**, 589-595.
 - 20) Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T : GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Acta Neurochir* (2000) **142**, 805-810.
 - 21) Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF : Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* (2003) **60**, 69-73.
 - 22) Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS : Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD : a two-year outcome study. *Ann Neurol* (2005) **57**, 298-302.
 - 23) Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R, Young B : Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* (2005) **102**, 216-222.

- 24) Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ, Gill SS : Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med* (2005) **11**, 703-704.
- 25) Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T : Single or continuous injection of glial cell line-derived neurotrophic factor in the striatum induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurol Res* (2000) **22**, 832-836.
- 26) Date I, Aoi M, Tomita S, Collins F, Ohmoto T : GDNF administration induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system both in young and aged parkinsonian mice. *Neuroreport* (1998) **9**, 2365-2369.
- 27) 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* (2001) **10**, 397-401.
- 28) Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Wenji Y, Kameda M, Matsui T, Miyoshi Y, Date I : Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* (2005) **102**, 80-89.
- 29) 安原隆雄, 新郷哲郎, 村岡賢一郎, 亀田雅博, 元 文姫, 松井利浩, 三好康之, 張 捷, 野元正弘, 伊達 勲 : 臨床応用をめざしたパーキンソン病に対するカプセル化 GDNF 産生細胞移植の検討. *Progress in Medicine* (2004) **24**, 270-474.
- 30) Kitagawa H, Sasaki C, Sakai K, Mori A, Mitsumoto Y, Mori T, Fukuchi Y, Setoguchi Y, Abe K : Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* (1999) **19**, 1336-1344.
- 31) Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR : Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* (2004) **35**, 2385-2389.
- 32) Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Mishima K, Aoo N, Harada K, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T : Implantation of encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting cells prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Am J Obstet Gynecol* (2005) **192**, 1028-1037.
- 33) Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Ikenoue T : Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats. *Am J Obstet Gynecol* (2005) **192**, 1137-1145.