

中枢神経疾患に対する成体由来神経幹細胞移植

亀田雅博*, 新郷哲郎, 村岡賢一郎, 高橋和也, 安原隆雄, 伊達 勲

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経外科学

キーワード：成体由来神経幹細胞, 脳内移植, グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF), 脳虚血, パーキンソン病

Adult neural stem and progenitor cell transplantation in CNS diseases

Masahiro Kameda*, Tetsuro Shingo, Kenichiro Muraoka, Kazuya Takahashi, Takao Yasuhara, Isao Date

Department of the Neurological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

神経幹細胞は、自己複製能、多分化能をもち脳室下帯や海馬の歯状回に存在するとされている。これまでに in vivo では、脳虚血、脊髄損傷、パーキンソン病などの神経疾患に対して神経幹細胞の移植が行われ、治療効果が報告されている。また、成体由来神経幹細胞は、自己移植が可能であることから、再生医療における重要性が指摘されている。

岡山大学脳神経外科学教室移植グループでは、パーキンソン病、脳梗塞に対するカプセル化細胞移植の研究を長年にわたり行ってきた¹⁻⁵⁾。一方で当教室の新郷哲郎が、成体にも神経幹細胞が存在することを世界で最初に証明したカナダカルガリー大学 Samuel Weiss 教授⁶⁾のもとに留学し、平成14年成体由来神経幹細胞の採取ならびに培養の技術を持ち帰った。その当時、

すでに ES 細胞の有用性は数多く報告されていたが、腫瘍化のリスクがほぼゼロに等しいこと、自己移植の方法を用いれば、免疫学的・倫理的な問題がないことから、我々は成体由来神経幹細胞移植の臨床応用を目指し基礎研究を始めた。

本稿では我々がこれまでに行ってきた脳梗塞、パーキンソン病モデルラットへの成体由来神経幹細胞移植に関する研究成果を中心に、最新の知見も交えながら報告する。

脳梗塞、パーキンソン病モデルラットに対する成体由来神経幹細胞移植

脳梗塞に対する神経幹細胞移植の有効性については、すでに数多くの報告がなされているが、神経幹細胞を成体由来神経幹細胞に限定すると少数の報告が認められるのみである。

我々はまず成体由来神経幹細胞が他の神経幹細胞と同様に脳梗塞保護効果を認めるかどうか確認すべく、成体オス Wistar ラットより採取培養した成体由来神経幹細胞を一過性中大脳動脈閉塞脳虚血 (MCAO) モデル Wistar ラットに脳内移植したところ、梗塞巣が縮小する傾向が認められた (in submission)。

平成20年6月受理

*Queensland Brain Institute, QBI Building (79), University of Queensland, Brisbane, QLD, 4072, Australia
電話：+61-7-3870-1782 FAX：+61-7-3870-1782
E-mail：mrkameda@gmail.com

プロフィール



亀田 雅博

昭和49年4月8日生

平成12年3月 岡山大学医学部卒業

平成12年4月 岡山大学大学院医学研究科博士課程 入学

平成12年10月 姫路中央病院脳神経外科 医員

平成16年12月 4th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration にて Poster Presentation Award 受賞

平成17年6月 9th International Conference on Neural Transplantation and Repair にて Student Travel Award 受賞

岡山大学大学院医学研究科博士課程修了

平成19年12月 Queensland Brain Institute, University of Queensland, Australia に博士研究員として留学

平成18年12月 現在に至る

続いて成体由来神経幹細胞のもつ脳梗塞保護効果をさらに増強させる目的で、アデノウイルスを用いてグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) 遺伝子を事前に導入した成体由来神経幹細胞を MCAO モデルラット脳内に移植し、虚血脳に対する保護効果について検討した⁷⁾。すると、コントロール群 (EGFP 導入成体由来神経幹細胞ならびに線維芽細胞) と比較して、梗塞巣は有意に小さく、また行動学的にも良好な結果を得た。組織学的には、移植細胞の生存率について差はなかったが、GDNF 導入成体由来神経幹細胞移植群では有意に遊走した細胞を多く認め、未熟な神経系のマーカーである PSA-NCAM 陽性細胞の割合が有意に高く、GDNF 導入成体由来神経幹細胞移植は神経系への分化を促進することが示唆された。ischemic boundary zone おいて、GDNF 導入成体由来神経幹細胞移植群では有意なマイクログリアの活性化の抑制、ならびに宿主細胞死の抑制が確認された。さらに移植の tract が含まれる部分をパンチアウトしてこの部分に含まれる GDNF の量を ELISA 法にて測定したところ、GDNF 導入成体由来神経幹細胞移植群ではより多量の GDNF 蛋白の分泌が確認された。

これらの結果から、GDNF 導入成体由来神経幹細胞移植群で有意に良好な結果を認めた理由について考えると、移植された細胞は梗塞巣へ向けて効率良く遊走し、そして ischemic boundary zone において GDNF を持続的に供給する。結果として、マイクログリアの活性化が抑制され、また ischemic boundary zone における宿主の細胞死も抑制され、それが最終的に梗塞巣の減少をもたらしたものと考えられる。

また、同様に GDNF 導入成体由来神経幹細胞をパーキンソン病モデルラットに移植したところ、コントロール群と比較してアンフェタミン誘発回転運動数は減少し、組織学的にも黒質 TH 陽性細胞残存数、線条体 TH 陽性線維残存濃度の点で良好な結果を得た⁸⁾。これらの結果から神経栄養因子と成体由来神経幹細胞を combine させた戦略が移植療法に有効であることが証明された。

移植細胞のソースとしての成体由来神経幹細胞

ここまで、脳梗塞、パーキンソン病を通して、成体由来神経幹細胞と栄養因子を組み合わせた移植治療 (allogenic transplantation) が中枢神経疾患に対して有効なことを示してきたが、では、成体由来神経幹細胞

の治療能力は胎児由来神経幹細胞の治療能力と比べて優れているのだろうか。この点について検討すべく、胎児ラット (E14) 由来神経幹細胞に EGFP 遺伝子を導入し、同様にパーキンソン病モデルラットに移植して比較してみた。in vitro における二つのドナーソース成体由来神経幹細胞と胎児由来神経幹細胞の特性としては、継代を繰り返すと neuron への分化率は同等であった。しかし、移植後のドナー細胞および宿主組織の動態観察結果、EGFP 導入群間における生存細胞数の比較では、成体由来群は胎児由来群と比べ有意に多くの細胞が生存していることが確認された。また、EGFP 導入成体由来神経幹細胞移植群では、組織学的、行動学的評価において EGFP 導入胎児由来神経幹細胞移植群との間に有意差を認めなかったものの、いずれの評価項目においても成体由来神経幹細胞移植群に良好である傾向が認められた。これらの結果から成体由来神経幹細胞は宿主組織の微小環境への組織適合性という観点から胎児由来神経幹細胞より適していると推察された。以上より成体由来神経幹細胞は、胎児由来神経幹細胞と移植細胞のソースとしてほぼ同等の能力もしくはそれ以上の能力を持つものと考えられた。

細胞移植療法の課題

成体由来神経幹細胞を用いた細胞移植療法で一定の効果が得られることを証明した我々であるが、この成体由来神経幹細胞を用いた細胞移植療法を臨床応用するために取り組むべき特に重要な2点についてまず述べる。

第1点は、病態モデルへの自己移植である。つまり、成体由来神経幹細胞の最大の利点である自己移植が可能であることを生かすために、自己移植の形で脳梗塞やパーキンソン病といった病態モデルへ移植を行い、治療効果を証明することである。当教室の村岡らは、定位的にラット成体脳組織を採取し、神経幹細胞を分離培養して増幅させて、元のラット脳内に移植細胞として戻すという、自己移植モデルの技術を確立している⁹⁾。然るに、ラット成体由来神経幹細胞の採取後、移植に必要な数まで細胞数を増やすのに約3週間かかり、霊長類を用いた研究では、3ヶ月程度の日数を要することが分かっている (unpublished data)。これまで幹細胞を用いた細胞移植療法 (allogenic transplantation) で治療効果を認めたと報告されている論文の

多くは病態モデルを作成し急性期に移植治療を行っており、必然的に亜急性期から慢性期の移植となる自己移植で効果を得るためには単なる細胞移植といった枠を超えた何らかの工夫が必要となるかもしれない。なお、自己移植という点では、骨髄幹細胞の方が成体由来神経幹細胞より現時点では臨床に近い。臨床がらみでは、心筋梗塞への骨髄幹細胞の自己移植についてはすでに multicenter での trial の結果が出ており、有意に左室機能の改善をもたらすことが証明された¹⁰。また、脳梗塞、脊髄損傷に関しても、骨髄幹細胞を用いた自己移植を行いその安全性を検証したという臨床報告がある¹¹⁻¹⁴。さらに、札幌医大でも脳梗塞に対して治験が進行中である。自己移植が可能な細胞という点では骨髄幹細胞と成体由来神経幹細胞は共通であり、成体由来神経幹細胞を用いた細胞移植療法についても自己移植を目指した取り組みという方向性は妥当であろう。そして、これは現状の細胞移植療法の問題点である細胞の生存率の低さを解決する方法の一つとなるものと思われる。Pfeifer らは成体ラットの SVZ より採取した神経幹細胞と fibroblast を co-culture して、これを自己移植の形で脊髄損傷モデルに移植した場合、allogenic transplantation と比較して約10倍の生存率の向上を認めたと報告している¹⁵。

第2点は、移植治療の最大のメリットは障害された部位を移植細胞で置き換える cell-replacement であり、その点に立った実験を行うことである。我々は、これまでに成体由来神経幹細胞から分泌される栄養因子による神経保護効果を示すことはできたが、厳密な意味での cell-replacement については更なる証明が必要であると考えている。効率の良い cell-replacement を目指した細胞移植療法の取り組みとして、in vitro にて低酸素下に置いた ES 細胞を脳梗塞モデルへ移植すると、移植細胞の生存率の向上と約5割の移植細胞をニューロンに分化させることができたという報告がある¹⁶。また、Nurr1 を過剰発現させた神経幹細胞をパーキンソン病モデルに移植すると、非常に高率にドーパミンニューロンを得ることができたという報告がある¹⁷。中枢神経疾患に対する幹細胞を用いた細胞移植療法は、一部で臨床治験がスタートしているが、cell-replacement に関する考察はまだ不足していると思われ、移植細胞の生存率を上げ、障害を受けた部位を移植細胞で効率良く置き換えるという取り組みは引き続き重要であるものとする。

cell-replacement をどのように証明するか

神経幹細胞を in vitro で分化させ、免疫染色でニューロンのマーカーである beta-III tubulin を発現している細胞をパッチクランプした場合、電気生理学的には機能的神経の指標となる神経活動電位が確認できないことも多い。(unpublished data)。つまり、免疫染色上は成熟したニューロンとして分類されるマーカーを発現しているにもかかわらず、電気生理学的には、まだニューロンへの分化の途中の過程であるということである。この結果の乖離が示唆するところは、我々が病態モデルへ細胞移植療法を行う場合、移植細胞がニューロンに分化したことを組織学的に証明するだけでは不十分であり、電気生理学的にも移植細胞がニューロンとして機能していることを証明する必要があるということである。実際に近年の論文ではその点を意識し、幹細胞を病態モデルへ移植した後、スライス標本を作成しパッチクランプを行い、その後そのスライス標本にて免疫染色を行い、電気生理学的にも組織学的にもニューロンに分化したことを証明した報告がある¹⁸。

スライス標本で電気生理学的な考察を行うことの重要性は理解できるものの、臨床での利用を想定すると、非侵襲的に同一個体で繰り返し評価をすることができ、さらに電気生理学的な考察も加えることもできる方法があるのであればそちらの方が望ましい。例えば、fMRI は空間分解能に優れており脳血流動態を可視化するために用いられる。fMRI ではパッチクランプでみるような細胞1個のレベルで起こっている反応を直接見ることはできないものの、類推することは可能だろうともいわれている¹⁹。また、空間分解能に優れた fMRI と時間分解能に優れた MEG を併用してより精度の高い解析をしようという試みもなされてきた。これらの試みは、パッチクランプでターゲットにするより広範囲のものを対象とすることが可能という点で大きなメリットがあると思われる。

MRI 関連の進歩は目覚ましく、移植細胞の tracking は超常磁性の酸化鉄である SPIO (superparamagnetic iron oxides) やそれよりもさらに径が小さい USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxides) といったものを用いてすでに可能である²⁰。実際に移植した幹細胞が遊走していく様子を同一個体にて経時的に追うことに成功している。また、近年ラット中大脳動脈

閉塞一過性脳虚血モデルの長期経過を fMRI, SSEP (somatosensory evoked potentials) といった観点から評価したものがあり、この中で fMRI と SSEP の良好な関連性が示されている²¹⁾。脳梗塞モデルを作成し、行動学的な経過を追うと、特に治療を行わなくともある程度の機能回復が通常みられるが、実際に彼らは、虚血急性期に forepaw stimulation を行い、somatosensory 領域に fMRI でシグナルが認められず、かつ SSEP でも障害が確認されていたにもかかわらず、亜急性期・慢性期と再び同領域に fMRI でシグナルが認められるようになり、同時に SSEP でも改善しているのをとらえることに成功している。これらの手法を用いることで、将来的には、fMRI で虚血亜急性期・慢性期に再びシグナルが得られるようになった場所は、MRI 画像とフュージョンすると USPIO でラベルさせた stem cell が行き着いた場所だったということが証明できるようになるものと思われる。現時点で細胞 1 つ 1 つをラベルすることはできず、また fMRI も厳密な意味では電気生理のターゲットとは異なるものの、USPIO 法と fMRI の併用は、同一個体で繰り返し、移植された細胞がホストのネットワークの中に組み込まれて活動しているということを証明することができる有力な方法になるものと思われる。

脳神経外科医の立場からみた細胞移植療法

移植細胞が生着、分化して、成熟神経細胞に特徴的な電気生理学的な性質を持ち、更にはシナプス伝達を確認するなどして、移植細胞がホストの回路に組み込まれて機能していることが証明されたとき、障害部位の修復・再生が果たせたと言えることになり、この時我々は、単なる栄養因子の投与よりも細胞移植の方が効果的であると言えることができるのであろう。そしてこの時重要となるのは、再生の役割を果たす移植細胞がどれだけ脳内に存在するかという点になる。脳内への移植細胞の直接投与は、静注や動注での投与方法と比べ侵襲が高いのが欠点であるといわれており、MSC を用いた虚血脳への移植では、静注が一般的に行われているが、実際のところ、脳内への直接投与と比べて、移植細胞の脳内への移行率は非常に低い。MSC を静注・動注の両方の投与方法で虚血脳に移植した場合、静注投与では移植細胞を MRI で同定することは不可能であり、また動注投与の場合、投与後 20% 程度にまで血流量が落ちた致死的なケースの場合に最も高率に移

植細胞を同定できたという報告もあり²²⁾、安定して移植細胞を脳内へ届けることは難しいようである。脳内への直接投与は確かに侵襲が高いだろうが、再生の役割を果たす移植細胞がどれだけ脳内に存在するかという観点に立った時、安定して多くの移植細胞を届けることができる直接脳内投与は改めて評価される可能性もあるのではと思われる。

最後に、我々のここまでの実験の成果をもって、臨床への応用を考えると、成体由来神経幹細胞の採取や移植は、脳神経外科医にとって頻繁に行っている手術手技の応用で可能である。もちろん倫理的な側面については十分な議論が必要なことはいままでの間もないが、例えば、成体由来神経幹細胞の移植により脳梗塞保護効果が認められたという事実は、脳内出血の患者に対して、血腫除去術を行う際に、同時に脳室下帯の神経幹細胞を神経内視鏡もしくは定位脳手術装置を使って採取、これを in vitro で培養・増殖させ、万が一将来において脳梗塞を発症した場合にこの細胞を用いて自己移植を行うといった新しい治療法の可能性を示唆するものである。齧歯類レベルでの結果しか現時点では得られておらず臨床応用にはかなり遠いが、成体由来神経幹細胞を用いた自己移植の実現へ向けて引き続き取り組んでいきたい。

謝 辞

この原稿を作成するにあたり、Dr. Takahiro Yasuda (Queensland Brain Institute) より貴重な助言を賜りました。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) 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* (1996) 84, 1006-1012.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
 - 6) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* (1992) 255, 1707-1710.
 - 7) Kameda M, Shingo T, Takahashi K, Muraoka K, Kurozumi K, Yasuhara T, Maruo T, Tsuboi T, Uozumi T, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H, et al. : Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* (2007) 26, 1462-1478.
 - 8) Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuen WJ, Uozumi T, Matsui T, Miyoshi Y, Date I : Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* (2008) 108, 149-159.
 - 9) Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuan W, Hayase H, Matsui T, Miyoshi Y, Date I : The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. *Exp Neurol* (2006) 199, 311-327.
 - 10) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, et al. : Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* (2006) 355, 1210-1221.
 - 11) Sykova E, Jendelova P, Urdzikova L, Lesny P, Hejcl A : Bone marrow stem cells and polymer hydrogels--two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol* (2006) 26, 1113-1129.
 - 12) Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G : Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* (2005) 57, 874-882.
 - 13) Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, Manfrim A, Falcao CH, Gonzales C, Andre C, Dohmann HF, Borojevic R, Otero RM : Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke. *Arq Bras Cardiol* (2006) 86, 52-55.
 - 14) Moviglia GA, Fernandez Vina R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Bastos F, Farina P, Etchegaray G, Barbieri M, Martinez G, Picasso F, et al. : Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy* (2006) 8, 202-209.
 - 15) Pfeifer K, Vroemen M, Caioni M, Aigner L, Bogdahn U, Weidner N : Autologous adult rodent neural progenitor cell transplantation represents a feasible strategy to promote structural repair in the chronically injured spinal cord. *Regen Med* (2006) 1, 255-266.
 - 16) Theus MH, Wei L, Cui L, Francis K, Hu X, Keogh C, Yu SP : In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. *Exp Neurol* (2008) 210, 656-670.
 - 17) Shim JW, Park CH, Bae YC, Bae JY, Chung S, Chang MY, Koh HC, Lee HS, Hwang SJ, Lee KH, Lee YS, Choi CY, et al. : Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurrl overexpression. *Stem Cells* (2007) 25, 1252-1262.
 - 18) Buhnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, Dihne M : Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* (2006) 129, 3238-3248.
 - 19) Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A : Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* (2001) 412, 150-157.
 - 20) Politi LS, Bacigaluppi M, Brambilla E, Cadioli M, Falini A, Comi G, Scotti G, Martino G, Pluchino S : Magnetic-resonance-based tracking and quantification of intravenously injected neural stem cell accumulation in the brains of mice with experimental multiple sclerosis. *Stem Cells* (2007) 25, 2583-2592.
 - 21) Weber R, Ramos-Cabrera P, Justicia C, Wiedermann D, Strecker C, Sprenger C, Hoehn M : Early prediction of functional recovery after experimental stroke : functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J Neurosci* (2008) 28, 1022-1029.
 - 22) Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, Pittenger MF, van Zijl PC, Huang J, Bulte JW : Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke* (2008) 39, 1569-1574.

