

## 細胞移植による神経再生の将来

高橋 淳

(臨床神経, 49 : 834—836, 2009)

Key words : パーキンソン病, ドーパミン産生神経, 細胞移植

## 1. はじめに

本稿ではパーキンソン病を例にとり、神経変性疾患に対する細胞移植治療の現状と展望を考察する。そもそも成人の脳や脊髄に細胞を移植して生着し機能するのかという疑問があるが、パーキンソン病では胎児細胞移植治療が実際におこなわれその有効例が報告されている。1987年に第1例が報告され、その後欧米を中心にヒト中絶胎児の中脳黒質細胞をもちいた移植治療が試験的におこなわれてきた。現在までに約400例の手術症例が報告されている。一部では劇的な効果が見とめられ、移植後10年以上経っても移植細胞が生存し臨床効果も持続している。しかし、最近の二重盲検試験では幾つかの問題が明らかとなった<sup>1)2)</sup>。まず高齢者や重症例 (off時の Unified Parkinson's Disease Rating Scale : UPDRS スコアが50以上) ではコントロール群とくらべて症状改善に有意差がなく、効果が見とめられたのは60歳以下の中・軽症例であった。また15%から約半数の症例で移植後にジスキネジアがみられ、これはL-ドーパの投与を中止しても治まらなかった (graft-induced dyskinesia)。また胎児1体分と4体分の移植の比較では後者でしか有意な行動改善がえられなかった。これらの問題に加え胎児細胞を移植に使うには供給面の問題もあり、幹細胞の利用に期待が寄せられている。幹細胞は自己増殖可能なので培養によって大量かつ比較的均一な細胞をえることができ、凍結保存も可能である。分化をコントロールすることができれば理論的にはその疾患に必要な細胞を大量にえることができるという利点がある。ドナーの候補としてES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞、胎児や成体脳由来の神経幹細胞、自己の骨髄間葉系幹細胞などが考えられているが、主にES細胞の利用について述べる。

## 2. ES細胞移植実現化に向けての試み

ラットやカンクイザルモデルをもちいた移植実験では細胞生着や行動改善が報告されているが、臨床応用に向けては解決すべき問題は多い。とくに霊長類モデルをもちいて移植の効果と安全性を長期にわたって観察することが重要であろう。われわれはカンクイザルモデルへの移植実験で行動改善

を観察したが<sup>3)</sup>、そのまとめと今後の問題点を Fig. 1 にまとめた。

## (1) ヒト ES 細胞からのドーパミン産生ニューロン誘導

臨床応用のためには、当然、ヒト ES 細胞からのドーパミン産生ニューロン誘導が大前提であるが、すでにヒト ES 細胞からもドーパミン産生ニューロンが高率に分化誘導可能であることが多数報告されている<sup>4)</sup>。しかもドーパミン産生神経が生着したモデルラットでは行動改善もみとめられている<sup>5)6)</sup>。

## (2) 異種材料をもちいない神経誘導

現時点ではヒト ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導にはマウス由来のフィーダー細胞や生体マトリクスがもちいられているが、牛血清などもふくめ原則的には動物由来成分は臨床用の細胞培養にはもちいられない。動物由来成分をふくまない細胞維持培養、神経分化誘導法の開発が必要である。そもそもヒト ES 細胞はマウスフィーダー細胞上で樹立されており、培養培地にも牛血清由来の成分がふくまれている。臨床応用のためには、異種細胞はもちろん異種材料をもちいない培養条件でのヒト ES 細胞樹立が必要である。

## (3) 腫瘍形成抑制のための細胞選別

細胞移植における問題のひとつは腫瘍形成であり、実際マウス ES 細胞の同種移植のみならずヒト・ラット間の異種移植においても腫瘍形成が報告されている。その原因は未分化 ES 細胞の混入が考えられるが、われわれは神経系に分化した細胞 (Sox1 陽性) とまだ未分化な ES 細胞 (Oct3/4 陽性) をセルソーターで分離してそれぞれ正常マウス脳に移植したところ、後者では高率に腫瘍形成がみられたが前者ではまったくみられなかった<sup>7)</sup> (Fig. 2)。これらのことから神経系細胞のみを選別して移植することによって腫瘍形成が抑制されると考えられるが、神経系細胞を確実に選別するには神経幹細胞に特異的な表面マーカーをもちいたソーティング技術が必要である。

## (4) ドーパミン産生ニューロンの純化

ES 細胞からのドーパミン産生神経誘導では、それ以外に GABA やアセチルコリン、セロトニンなどの産生神経も誘導される。ヒト胎児黒質細胞移植後にみられたジストニアの原因として、セロトニン産生神経の影響も考えられており、ドーパミン産生神経のみを移植することによって効果が上昇するのかがどうか検討されなければならない。しかし、このばあいも

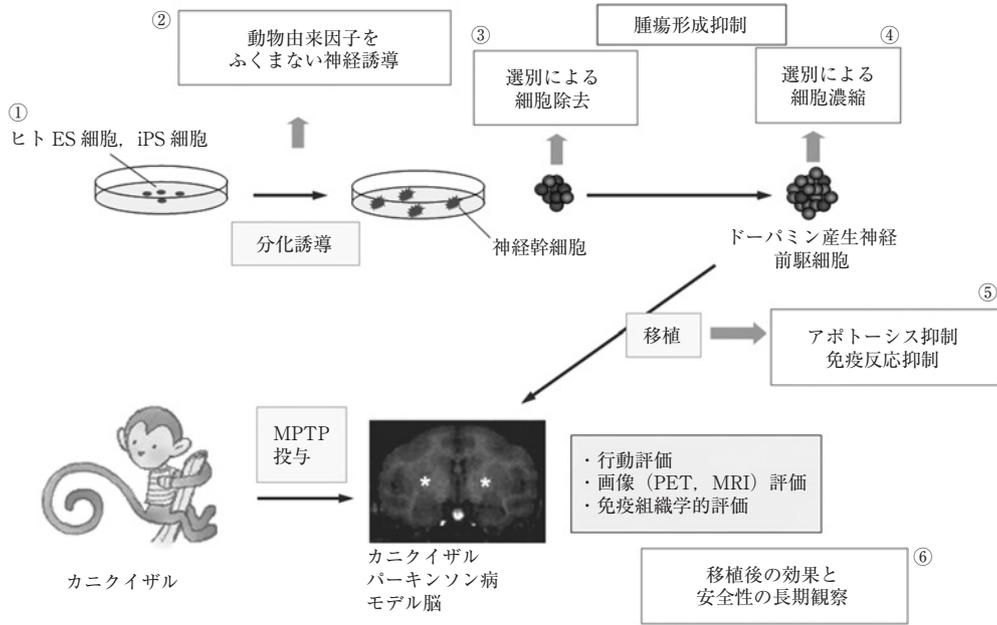


Fig. 1 ES細胞移植の臨床応用に向けて解決すべきポイント  
 モデルサルをもちいた実験の流れを示した。基本的には同様のアプローチでの治療になると思われるが、臨床応用のためには①～⑥で示した点をさらに解決する必要がある。(本文参照)

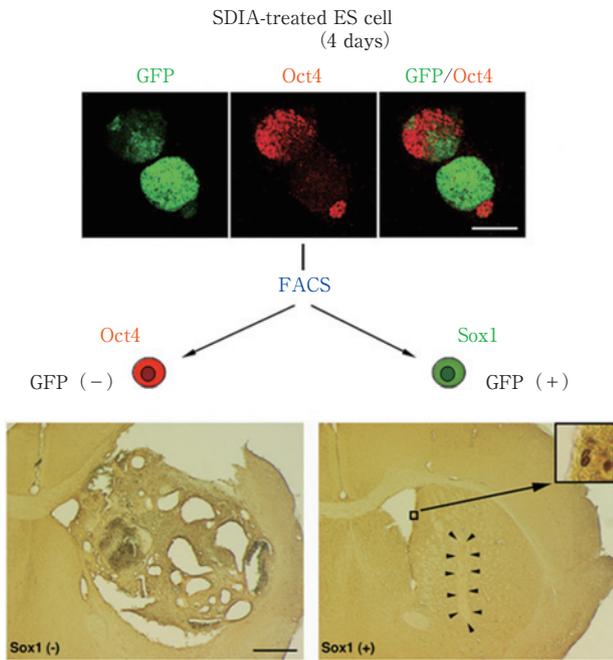


Fig. 2 細胞選別による腫瘍化の抑制 (文献2, 3より改変)  
 Sox1-GFP knock-in ES細胞を用いて4日間分化誘導 (SDIA法) を行い免疫染色で調べると、神経系に入った細胞はGFPを発現するが(緑)まだES細胞のままの細胞はOct3/4を発現している(赤)。それぞれの細胞を、免疫抑制をした正常マウスの脳に移植するとGFP陰性の細胞は高率に奇形種様の腫瘍を形成した。一方、GFP陽性細胞は腫瘍を形成せず線状体内に生着した(矢頭)。

ドーパミン産生神経のみを誘導する方法やそれのみに発現する表面マーカーがわかっていないので、どうやってえたい細胞のみを純化するのが問題である。

(5) 移植時における細胞死の抑制

細胞移植における細胞死の約90%は移植後4日以内におこるといわれている。その原因は、①細胞の準備や移植過程における機械的なダメージ、②栄養因子の不足、③急性の炎症反応であると考えられている。細胞移植の際に細胞を分散する(あるいは操作で細胞が分散される)ことがあるが、この際、細胞内のRho-ROCK経路が活性化されており、この経路の阻害剤を投与することによって細胞死を減少させることができる<sup>8)</sup>。また、細胞生存の足場として様々なマトリクスとの同時投与も検討されている。

(6) 移植後の長期経過観察

われわれのサルパーキンソン病モデルに対する移植実験では移植後約3カ月の経過観察であった。しかし、臨床応用を考えるとより長期にわたって(最低1年間)効果と安全性を検証する必要がある。移植細胞の癌化、腫瘍形成の早期発見は重要であり、移植細胞のドーパミン産生神経としての機能解析とともにMRIやポジトロンCTなどの技術が有用であろう。最初に述べたように、パーキンソン病患者に対する胎児中脳黒質細胞移植の結果から移植細胞の量や質、移植部位などの再検討が迫られており、サルモデルをもちいた移植後の解析を詳細におこなうことによってこれらの条件の至適化が図られなければならない。

### 3. 終わりに

神経変性疾患のモデルケースとしてパーキンソン病を対象疾患とした幹細胞治療について述べた。過去の臨床例から学べることは、5~10万個のA9ニューロンをその神経突起が均一に線条体をカバーするように生着させる必要があるということであり、ES細胞やiPS細胞の出現によりそれが実現に近づきつつある。他の神経変性疾患でも基本的な戦略は同じであるが、脱落する神経の種類や範囲がより広範であり、治療の実現化にはさらなる困難が待ち受けていると思われる。

#### 文 献

- 1) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710—719
- 2) Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403—414
- 3) Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, et al: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 2005; 115: 102—119
- 4) Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al: Derivation of mid-brain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12543—12548
- 5) Ben-Hur T, Idelson M, Khaner H, et al: Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells* 2004; 22: 1246—1255
- 6) Roy NS, Cleren C, Singh SK, et al: Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized mid-brain astrocytes. *Nat Med* 2006; 12: 1259—1268
- 7) Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, et al: FACS-based purification of ES cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 2006; 24: 763—771
- 8) Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2007; 25: 681—686

#### Abstract

#### Future of stem cell therapy for neuronal regeneration

Jun Takahashi, M.D.

Department of Biological Repair Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

Embryonic stem (ES) cells are expected as promising donor cells for cell transplantation therapy. For example, mouse or monkey ES cell-derived dopamine (DA) neurons can survive in the brain and relieve Parkinson's disease (PD) symptoms in rat or monkey models. In 2001 and 2003, the results of a double-blind trial of the transplantation of human embryonic DA neurons into patients with PD were reported. These results teach us two things. First, cell transplantation has been clinically proven to be effective as a treatment for PD, although the effects are still far from optimal. Second, several problems remain to be solved, including patient selection, optimal donor cell volume, targeting of injection, immunosuppression, and control of dyskinesia.

DA neurons have also been generated from several human ES cell lines. Furthermore, functional recovery of rat PD models after transplantation was observed. One of the major problems in ES cell transplantation is tumor formation, which is caused by a small fraction of undifferentiated ES cells in the graft. So, it is essential for undifferentiated ES cells to be eliminated from the graft for clinical application. These efforts will lead to clinical application of ES cell transplantation to the patients with PD.

(*Clin Neurol*, 49: 834—836, 2009)

**Key words:** Parkinson's disease, dopaminergic neuron, cell transplantation