

再生医学から見たパーキンソン病

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

キーワード ; Parkinson's disease, neural transplantation, regeneration

はじめに

脳・脊髄は、体の中で再生が最も困難な領域の一つと考えられ、心臓・腎臓・肝臓・肺などの他臓器の研究に比べて、再生に関する研究の歴史は比較的新しいものである。1970年代の後半から1980年代にかけて、パーキンソン病のモデル動物の作成が可能になったことをきっかけに、ドパミンを産生する胎仔黒質細胞などを脳内に移植する研究が行われるようになったのであるが、現在では、21世紀の医学の中心である再生医学・遺伝子治療などの対象疾患として筆頭にあげられる疾患の一つがパーキンソン病であり、これは、分子生物学的手法や細胞工学の発達などにより、種々の神経疾患が移植・再生療法の対象と考えられるようになったことと深く結びついている。

本稿では、再生医学から見たパーキンソン病について、これまでの基礎・臨床的研究の流れをまとめ、将来展望を行う。

パーキンソン病に対する移植・再生療法の流れ

パーキンソン病は、黒質線条体ドパミン神経系の変性を主体とする慢性進行性神経変性疾患である。正常人と比較して、線条体のドパミン濃度が20%以下、黒質細胞数が50%以下になるとパーキンソン病が発症するとされるが、これは、細胞移植によってドパミンを外因性に供給する、あるいは、神経栄養因子の供給で内因性のドパミン神経系を活性化することにより、この閾値を少し超えることができれば、症状の改善が期

待できるということを意味しており、パーキンソン病に対する細胞移植の有用性の根拠の一つとなっている。

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。①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、②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はかる、③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(図1)。

パーキンソン病に対する細胞移植のこれまでの歴史を振り返ると(図2)、まず、ドナー細胞として用いられたのは、胎仔・胎児の中脳黒質細胞(ドパミン細胞)であり、ラットパーキンソン病モデルの行動学的改善が著明に得られたことが報告され、その後の神経移植研究の発展の大きなきっかけとなったといえる。胎仔・胎児黒質細胞の移植に引き続いて行われたのが、副腎髄質クロム親和細胞・交感神経節細胞などの自己細胞をドナー細胞とする細胞移植である。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、多くの神経栄養因子を産生することが明らかにされてきた。図1における、①の目的に加えて、③の目的、すなわち細胞移植における神経栄養因子の脳内への供給という目的にスポットライトをあてたのは、クロム親和細胞の移植研究であった^{1,2)}。この研究の流れは、神経栄養因子の遺伝子を脳内に導入してドパミン神経系の回復を促進させたり、遺伝子導入により作製した神経栄養因子産生細胞を脳内移植に用いる研究へと発展してきている。

分子生物学的手法の発達により、種々の神経伝達物質・神経栄養因子を産生する細胞株を作製することが可能になっている。しかしながら、これらの細胞株を



図1 パーキンソン病に対する脳内細胞移植の目的

- ①ドパミンの減少した宿主線条体にドパミン産生細胞を移植することによって安定供給する。
- ②ドナー細胞からの神経突起を宿主内に伸展させ、神経回路の再構築をはかる。
- ③脳内ドパミン神経系を活性化させる働きのある神経栄養因子を移植によって線条体内に供給し、宿主内因性ドパミン系の活性化を促進する。

脳内移植に用いるためには、免疫学的拒絶反応や細胞の腫瘍化などを制御する必要がある。この目的のために、ドナー細胞を高分子半透膜製のカプセルに封入した後に移植する方法が開発され、すでに臨床応用も行われている（図2，図3）。

パーキンソン病に関連した遺伝子治療は、in vivo 遺伝子治療と ex vivo 遺伝子治療に分けることができる。ウイルスやリポソームを使って tyrosine hydroxylase (TH) や L-aromatic amino acid decarboxylase (AADC) などの神経伝達物質関連酵素の遺伝子や、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) などの神経栄養因子の遺伝子を直接脳内に運搬する方法は、in vivo 遺伝子治療である。一方、これらの遺伝子を培養細胞に導入し、その後、その細胞を脳内移植することによって、神経伝達物質や神経栄養因子を脳内に運搬する方法が ex vivo 遺伝子治療である。in vivo 遺伝子治療では多くのベクターが開発され、臨床応用を目的とした preclinical study が霊長類を用いて進行している。また、ex vivo 遺伝子治療は、培養した細胞を脳内移植するため、カプセル化細胞移植の研究とともに発展してきたといえる。

21世紀の医学の中心の一つである再生医学の最大のトピックが幹細胞の医療への応用であろう。神経幹細胞についても、これをどのようにして特定の（例えば

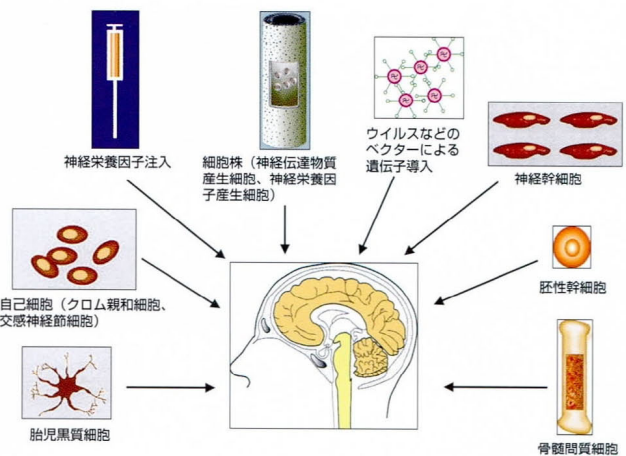


図2 パーキンソン病に対する移植・再生医療に用いられるドナー細胞，遺伝子療法

ドパミン系の) 神経細胞へ分化させるかの研究がすすんでおり、ドナー細胞の供給源としての期待は大きい。より上流に存在する胚性幹細胞 (ES 細胞)、自己細胞移植の可能性を秘めた骨髄間質細胞、などをドナー細胞としてパーキンソン病に対する細胞移植の目的に用いようとする試みも行われつつある（図2）。

胎仔・胎児黒質細胞移植

パーキンソン病に対する脳内細胞移植は、まず、胎仔・胎児のドパミン産生細胞である黒質細胞をドナーとして研究が進んだ。パーキンソン病モデル動物を用いた多くの研究により、胎仔・胎児黒質細胞を線条体に移植すると、ドナー細胞は神経突起を宿主線条体内に伸展し、宿主線条体ニューロンとシナプスを形成、宿主脳内にドパミンを供給し、宿主動物のパーキンソン病症状を改善させることが明らかにされてきた。多くの基礎研究の結果に基づき、ヒトのパーキンソン病患者に対して、ヒトの胎児黒質細胞を移植した報告が1988年になされたが、最初の報告では効果は十分ではなかった³⁾。その後、移植部位、移植方法などの検討が進み、移植細胞の宿主脳内での生着が PET scan や剖検例で確認され、臨床的にも神経症状の改善が報告されてきた。これまでの欧米での臨床応用は約350症例であるが、そのデータをまとめると、パーキンソン病に対する胎児黒質細胞の脳内移植によって、①臨床症状を示すUPDRS（パーキンソン病スコア）が術後改善、②一日の中で off 時（抗パーキンソン病薬の効果が切れている時間）の占める時間が減少、③L-ドパ

服量が術後減量，④PET scan でフルオロドパの取り込みが術後増加，などの効果が報告されている。

米国で1995年から施行された胎児黒質細胞移植の二重盲検は，この治療法の科学的有効性が確認できるかどうかに関して大いに注目を集めた。その報告の内容は，60歳以下の患者では，胎児黒質細胞移植群において，シャム手術群より有意な症状の改善が得られたが，60歳より高齢の患者では，症状の有意な改善は得られなかった，と要約することができる⁴⁾。60歳以下の患者での有効性を中心にとらえるか，60歳より高齢の患者で効果がなかったことを中心にとらえるか，によってこの報告の評価はさまざまである。さらに米国では，Olanow らが2003年に二重盲検の結果を発表している⁵⁾。その報告では，ドナー細胞を1体の胎児から得た治療群，4体の胎児から得た治療群にわけ，分析している。34症例の検討で，4体の胎児から得たドナー細胞を移植した群の方が，1体の胎児から得たドナー細胞を移植した群，あるいはプラセボ群に比べて有意な神経学的効果がみられたのであるが，移植群全体では，プラセボ群と有意差がなかった。術後ドパミン代謝の PET scan のデータあるいは剖検例の組織学的検討では，移植細胞の生着は良好であり，胎児細胞移植を受けた群の半数の患者に遅発性のジスキネジアが認められた。これら2つの米国での二重盲検の結果をまとめてみると，①プラセボ群にも神経学的改善効果がみられる（すなわち，パーキンソン病患者では治療効果に関して精神的な要素がかなり強く反映する可能性がある）ため，移植群との有意差がでにくい。②PET では移植群に有意に F-dopa の uptake が上昇し，剖検でも良好な移植細胞の生着が確認されているにもかかわらず，症状の有意な改善になかなかつながらない。③胎児黒質細胞をそのまま脳内に移植する場合，実際にはドパミン細胞以外の多くの細胞が混入しており，このため，十分な効果が上がっていない可能性がある。その意味で，より pure で性質のはっきりしている細胞株や，神経幹細胞へのドナー細胞としての期待が広がってきている。

自己細胞移植

パーキンソン病に対する胎児細胞移植に伴う倫理的問題あるいは免疫学的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，臨床応用が行われてきた。動物モデルでは，胎児黒質細胞をドナーとする場合と遜色ない効果が報告されてきたこともあり，実際にヒトのパーキンソン病患者で，最初に脳内移植の臨床応用が行われたのは，クロム親和細胞をドナーとする移植である。1987年には，クロム親和細胞移植による機能改善が報告され⁶⁾，その後多数例の臨床応用がなされたが，ドナー細胞が成体由来であるため，クロム親和細胞単独の移植では，長期の生着率が低いことが明らかとなった。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，臨床応用された。前切断した末梢神経の遠位端は神経成長因子 (NGF) を非常に多く含むため，これをクロム親和細胞と同時に移植すると，クロム親和細胞の生着率が著明に向上し，しかも宿主の内因性ドパミン神経の回復も有意に促進されることが動物実験で明らかとなり，臨床応用例でもその効果が剖検例で証明されている^{7,8)}。自己細胞をドナーとする移植では，ドナー細胞自体が加齢やパーキンソン病で傷害を受ける可能性がある。しかしながら，クロム親和細胞の移植の研究・臨床応用により，細胞移植と神経栄養因子の関係や，移植した細胞の生着向上の方法が明らかになり，パーキンソン病に対する細胞移植の分野に大いに貢献する結果となっている^{1,2)}。

最近，自己細胞のソースとして，頸動脈小体 (carotid body cell) を移植した報告がある。すなわち，Arjona らによる，Hoehn and Yahr score で3以上の進行したパーキンソン病患者に対する頸動脈小体の自己線条体内移植のパイロットスタディである⁹⁾。頸動脈小体は副腎髄質のクロム親和細胞同様，神経提由来のパラニューロンであり，別の報告では，頸動脈小体から分泌される GDNF による神経保護作用も非常に重要であるとされている¹⁰⁾。Arjona らは6人の患者に対して自己頸動脈小体の両側線条体移植を行い，術前と18ヶ月後の評価を行っている。副作用は1例も生じず，ジスキネジア等の不随意運動も生じなかった。6人中5人は臨床のスケール (off 時の UPDRS III) で改善を示している。正式な評価には，より多くの症例および二重盲検試験が必要だが，簡便で安全な治療法であり，自己移植であり倫理的な問題もないため，今後のさらなる

応用にも期待がもたれる。

神経栄養因子の脳内供給

神経移植の研究が盛んになるにつれ、移植片自体あるいは移植をうけた宿主脳から種々の神経栄養因子が分泌され、これが機能回復に大いに関与していることがわかってきた。特に、種々の神経栄養因子を含むドナー組織として、副腎髄質クロム親和細胞、精巣の Sertoli細胞などが注目され、その移植の研究によって神経栄養因子と神経再生の関係が明らかとなってきている^{1,2)}。パーキンソン病モデル動物にはドパミンニューロンに対する効果のある神経栄養因子の投与が有効であることが示されてきた。1993年ドパミン系に対して栄養作用のあることが始めて報告された GDNF は、これまで報告されてきた神経栄養因子の中では最もドパミン系に対する栄養作用が強いものの一つと考えられている¹¹⁾。我々は、パーキンソン病モデルラットを用いて、GDNF の種々の投与方法が脳内ドパミン系に対してどのような保護・再生作用を示すかを検討してきた¹²⁾。GDNF の効果は、用量依存性であり、ドパミン系に対して保護・再生の両作用を持つが保護作用の方がより強力である。また、側脳室内投与に比して線条体内投与の方がより効果的であり、投与総量が同じであれば、1回投与と少量持続投与との間に差がないことも明らかとなった。GDNF は若年動物のみならず高齢動物でもドパミン系の回復に有効である上、サルのパキンソン病モデルに対する治療効果が優れているところから、臨床応用に対する期待は大きい。

GDNF に関する最近の話題として、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 Gill らの報告がある¹³⁾。両側の被殻にミニポンプを使って GDNF を直接投与したものである。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。具体的には、注入1年後の時点で UPDRS の39%改善、PET での F-dopa の取り込みが28%上昇、と報告されている。さらに、ジスキネジアの改善効果も認められた。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筆者らもすでに動物実験で証明しているところであり¹⁴⁾、このことが臨床応用でも証明されたといえる。

これまで、神経栄養因子の脳内供給の方法としては、神経栄養因子自体を線条体や側脳室内に直接注入する方法が行われてきたが、最近では、神経栄養因子の遺伝子を種々のベクターを使って線条体に導入したり、神経栄養因子の遺伝子を導入した細胞を脳内移植する方法も行われるようになってきている。

細胞株の脳内移植

1. カプセル化細胞移植

細胞株を脳内移植のドナー細胞として用いる利点は、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しう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¹⁵⁻¹⁸⁾。

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(図3)。

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糸であるが、物理的に強く、シリコンの tether (ヒモ) を付着させ、その一端を頭蓋骨に固定しておけば、脳深部に移植して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(図3)。

2. 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、



図3 カプセル化細胞移植の模式図

高分子半透膜製のカプセルに細胞を封入して移植するので、酸素・栄養素は周囲脳から十分供給され、細胞から産生される神経伝達物質・神経栄養因子はカプセル外にスムーズに分泌されるが、カプセル内は免疫学的租界となっている(左)。カプセルにシリコンのひも(tether)を附着させて移植するため(中, 右上)、カプセル移植後もいつでも脳の外に簡単にとりだすことができる。右下はカプセルの断面図を走査電顕で示す。最も内面が半透膜である。

行動学的に確認された。この細胞を、異種であるサルの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¹⁹⁾。

以上のことから、PC12細胞をサルの脳内に移植し、その生存を期待するには、カプセル化移植が必要である。臨床応用を目的に、カプセル化PC12細胞の脳内移植について、サルのパーキンソン病モデルを用いて長期に検討した²⁰⁾。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カ月、6カ月、12カ月後に屠殺した。移植されたカプセルからのドパミン産生量は移植12カ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4)。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(図4)。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カ月の長

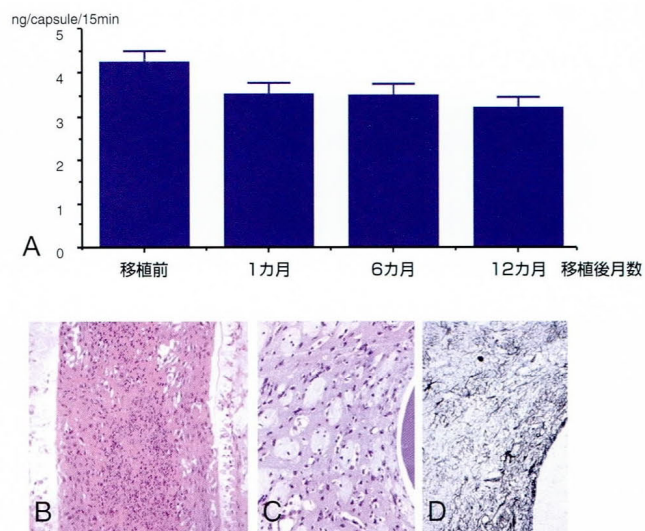


図4 サルのパーキンソン病モデルへのカプセル化PC12細胞移植 (A) カプセルからは、移植12カ月の長期にわたってドパミンが安定して産生されている。(B) 移植12カ月後のカプセル内にPC12細胞が良好に生着している。カプセル周辺の宿主脳については、ニッスル染色(C)、GFAP染色(D)で示されるように、組織反応はごくわずかであり、このカプセルが脳内でbiocompatibleであることがわかる。

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²¹⁾。

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^{1,2)}。

3. 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。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 は前述のように、脳内ドパミン神経系に対して強い効果をも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^{22, 30)}。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。カプセル化 GDNF 産生細胞脳内移植については、サルのパーク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。

4. 細胞株脳内移植の新しい工夫

1) 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、パーク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二つの目的がある。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、筆者らは新しい試みを行っている。

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を検討した。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た。パークンソン病モデルラットにカプセル化 PC12-GDNF 細胞を移植したところ、組織学的、生化学的、行動学的にパークンソン病の改善が認められた。

このように神経伝達物質と神経栄養因子を同時に宿

主脳内に供給することが可能となれば、治療効果がより高まるものと期待される。

2) ヒト由来細胞株の脳内移植

神経伝達物質や神経栄養因子の産生細胞株の脳内移植の臨床応用にあたっては、ヒト由来の細胞株での検討も必要である。ヒト由来の細胞として、細胞移植・再生医療の研究に用いられてきたものの一つに羊膜上皮細胞がある²³⁾。羊膜上皮細胞は、ドパミンやアセチルコリンなどの神経伝達物質と、種々の神経栄養因子を産生することが知られている。不死化されたヒト羊膜上皮細胞株をカプセル化し、6-OHDA 線条体注入によって作成したパークンソン病モデルラットの脳内に移植した。

移植したカプセルからは、ドパミンが持続的に分泌され、ドパミン神経系に働く神経栄養因子としては、bFGF と TGF- β が産生されていた。また、宿主の黒質線条体ドパミン系に対する修復効果とそれに伴う機能的改善効果が認められた。ヒト由来の細胞株でもカプセル化によって免疫反応や腫瘍化を起こすことなく脳内移植が可能であることが確認され、臨床応用に関しての有用な結果と考えられる。

3) 移植細胞株からの神経伝達物質や神経栄養因子産生量の制御

細胞株を脳内移植する場合、移植細胞から産生される神経伝達物質や神経栄養因子の量を外部から制御できることが望ましい。そのための試みが行われつつある。

L-dopa の産生量を外部からの刺激によって調節可能な細胞株である PC12th Tet-Off 細胞株を作成した。この細胞株は L-dopa やドパミン生合成の律速段階酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子をテトラサイクリン調節システムの下流に導入することによって、テトラサイクリンやそのアナログであるドキシサイクリンを添加することで L-dopa の産生量を制御できる細胞株である。

この細胞株を前述の高分子半透膜製カプセルに封入し、L-dopa の産生量を測定した。TH 遺伝子が導入されているので、ドキシサイクリンを無添加の状態では通常の PC12細胞に比べて 6 倍量の L-dopa が産生されていたが、ドキシサイクリンを添加して off 状態にしたところ、L-dopa の産生量は 60 分の 1 まで減少した (図 5)。さらにカプセル化した PC12th Tet-off 細胞株をパークンソン病モデルラットの線条体に移植したと

ころ、機能的評価のめやすとなる薬物誘発回転運動について、ドキシサイクリンの投与によって調節が可能であった。

このように移植した細胞株からの神経伝達物質や神経栄養因子の産生量を外部から調節することも次第に可能になりつつあり、細胞株脳内移植の臨床応用に際して問題となる点が克服されつつある。

遺伝子治療

遺伝子治療は *in vivo* と *ex vivo* 遺伝子治療に分類される。*In vivo* 遺伝子治療とは、ウイルスやリポソームを使って TH などのドーパミン産生関連酵素や GDNF などの神経栄養因子の遺伝子を直接脳内に運搬する方法であり、*ex vivo* 遺伝子治療とは、培養細胞にこれらの遺伝子導入を行い、その細胞を脳内に移植する方法である。

ウイルスベクターを用いた *in vivo* 法では、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスなどのベクターを用いてパーキンソン病モデル動物の線条体に TH、AADC などのドーパミン産生関連酵素の遺伝子を導入したり、ドーパミンニューロンに対する神経栄養因子の遺伝子を導入した報告が多くみられる。現時点では、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた報告が最も多い。

ウイルスベクターを用いない *in vivo* 遺伝子治療の一

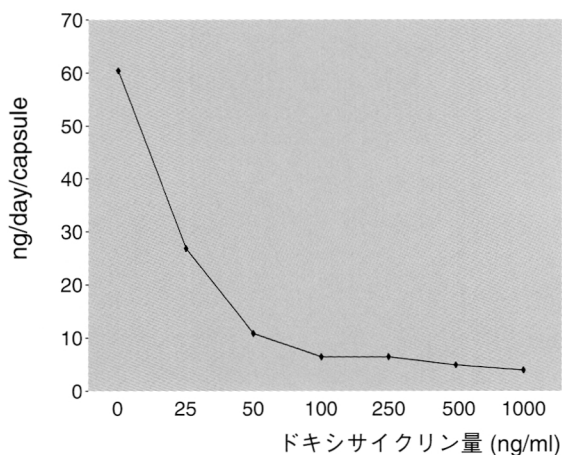


図5 Tet-off システムを組み込んだ PC12細胞からのドーパミン産生量

ドキシサイクリンを加えることにより、Tet-off システムが機能し、ドーパミンの産生量が減少する。この細胞を脳内に移植した後でドキシサイクリンを投与すると、移植細胞のドーパミン産生量を外部から調節可能となる。

つであるリポソーム法は安全かつ簡便な方法であるが、遺伝子導入効率を向上させる必要がある。その一つの方法として、プラスミド DNA-リポソーム複合体を osmotic pump を用いて 1 週間持続注入する方法で TH 遺伝子をパーキンソン病モデルラットの線条体に導入したところ、良好な TH 遺伝子の発現が認められ、移植後 8 週にわたって宿主の機能改善が得られた³¹⁾。この研究では、osmotic pump を脳内に埋め込むことによって周辺にグリオシスが起こり、そのグリアが遺伝子を取りこみ、発現していると考えられた。事実、免疫組織学的に二重染色を行うと TH 遺伝子が主にグリア細胞に発現していることが確認されている。最近著者らは、GDNF 遺伝子を同様の方法でパーキンソン病モデルラットの線条体に導入し、宿主黒質線条体ドーパミン系の回復および保護効果が認められることを観察している。

Ex vivo 遺伝子治療では、細胞への遺伝子導入の過程を制御・モニターした上で、これを移植という方法で宿主に戻すことが可能である。つまり、遺伝子導入された細胞の生化学的性質や、細胞の腫瘍化、用いたウイルスの毒性などをチェックすることができる。移植のドナーとして神経疾患の治療に用いることを考えると、その細胞は、入手することが容易で、培養ができ、導入された遺伝子を発現し、必要とする性質を持った細胞を選択する過程に耐えうるものが条件となる。異種細胞を *ex vivo* 遺伝子治療のドナーとして用いる場合は、免疫反応と腫瘍化の問題をクリアする必要があるが、そのための一つの方法としてのカプセル化細胞脳内移植については、前項にて解説した。とくに神経栄養因子産生細胞を遺伝子導入によって作成し、カプセル化して移植する方法は *ex vivo* 遺伝子治療の新しい方法の一つといえる。

以上のように、*in vivo*、*ex vivo* の遺伝子治療の研究が進んでいるが、臨床応用を目指して今後の課題としてあげられる点としては、いかに安全性の高いベクターを用いるか、遺伝子発現をいかにして長期間持続させるか、導入した遺伝子の発現と蛋白合成の安定性をどのようにかはるか、さらに導入した遺伝子の発現調節をどのように行うか、などがある。

神経幹細胞、ES 細胞、骨髄細胞への期待

神経幹細胞は、自己複製能を有し、ニューロン、ア

ストロサイト, オリゴデンドロサイトに分化できる多分化能を有する。さらに, 神経幹細胞は, 胎児脳のみでなく, 成体脳の脳室周囲からも分離, 同定され, EGF や FGF-2などの存在下で増殖させることができ, また種々の神経栄養因子などの存在下で様々なタイプの神経細胞に分化可能である。

Svendsen らは, ヒト胎児神経幹細胞をパーキンソン病モデル動物に移植し, 機能回復とドパミンニューロンへの分化を認めたと報告している²⁴⁾。成体マウスにおいて, 側脳室周囲の神経幹細胞は嗅球に移動し, それらの一部は, ドパミンニューロンになることが知られている。そこから取り出した神経幹細胞を, EGF 存在下にて培養し数回継体培養後, EGF および血清がない状態で, TH (tyrosine hydroxylase) 誘導カクテル下で分化誘導すると, 約40%がドパミンニューロンに分化した²⁵⁾。これら神経幹細胞から分化したドパミンニューロンをドナー細胞とする脳内細胞移植をパーキンソン病モデル動物に対して行うと, ドパミンニューロンが生着し, 機能的回復が認められた。また, 成体サルの側脳室周囲からも同様の方法で神経幹細胞を取り出し, ドパミンニューロンへ分化させることに成功している。このことは, ヒトのパーキンソン病患者の脳から神経幹細胞を取り出し, これをドパミンニューロンへ分化させた後に, 線条体に移植を行うという, 自己移植の可能性を示唆しており, 新しいパーキンソン病の治療法としての期待を持たせる (図6)。

神経幹細胞のパーキンソン病治療への応用として, 種々の因子を脳内に投与することにより, 内因性の神経幹細胞を増殖させ, 目的の細胞に分化させ, さらに目的の場所に誘導させる方法が考えられる。Fallon らは, ラットのパーキンソン病モデルの線条体に TGF alpha を注入すると, 脳室周囲の細胞が, 線条体の方へ移動し, ドパミンニューロンに分化し, さらに, 行動学的改善を認めたと報告している²⁶⁾。この移動した細胞が神経幹細胞であるかどうかは明らかではないが, 内在性の細胞がドパミンニューロンに変わったことは非常に興味ある結果である。著者らも, 前述の TH 誘導カクテルの脳内投与により, ドパミンニューロンが新生し, パーキンソン病モデル動物の行動学的改善が得られることを観察している。

神経幹細胞は, 神経変性疾患に対する細胞移植のドナーとして大きな期待が寄せられている。しかし, 神

経幹細胞のまま, 脳内移植してもほとんど目的の細胞に分化させることができない。今後, 神経幹細胞の増殖と維持, 分化と遊走のメカニズムについてのさらなる解明が重要な課題である²⁷⁾。また, 成体脳にある内因性の神経幹細胞がどのような働きをしているのか, 今後解析が進むであろう。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は, 神経幹細胞より上流に存在し, 全能性の分化能を持つことから, 神経移植のドナー細胞としての注目が集まっている。脳内移植については, ES 細胞を未分化のまま移植すると腫瘍化する可能性があり, いかにかに100%純粋な神経系細胞に分化させるか, さらにいかにかにドパミンニューロンへ分化誘導させるかが課題である。ES 細胞を骨髄間質細胞と共培養することにより, 大量のドパミンニューロンへの分化が報告されており³²⁾, パーキンソン病モデル動物への移植の効果が期待される。Bjorklund らは, ES 細胞をレチノイン酸を使って, ドパミンニューロンまでの分化ではなく, 神経前駆細胞の段階まで分化させ, その細胞を低い細胞密度で移植する方法を報告している²⁸⁾。この方法により, 移植細胞の腫瘍化を防ぐことができ, 移植細胞のドパミンニューロンへの分化を確認し, さらに, 宿主動物の行動学的な改善を認めたと報告している。この報告では, 移植細胞の腫瘍化や生着率の問題は検討されているが, 移植細胞が脳を構成する細胞以外に分化しないことを確認する必要がある。

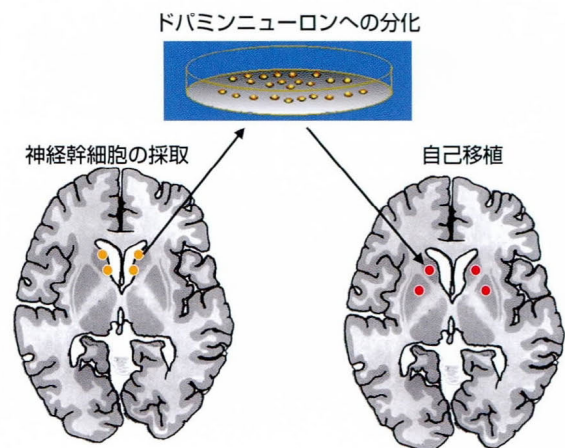


図6 パーキンソン病に対する神経幹細胞を用いた自己移植の模式図

パーキンソン病患者の側脳室周囲から神経幹細胞を採取し, これをドパミンニューロンに分化させた後, 本人の線条体に自己移植する。

骨髄間質細胞については、ニューロンへ分化させることが最近の研究で明らかになりつつあり、パーキンソン病モデルマウスの脳内に骨髄間質細胞を移植するとその一部がドパミンニューロンに分化し、行動学的改善効果があったと報告されている²⁹⁾。骨髄間質細胞の応用は成体由来の神経幹細胞と同様に自己移植の可能性を示すものであり、今後の発展が期待される。

おわりに

再生医学から見たパーキンソン病についてまとめた。まだ動物モデルを用いた基礎実験の段階にある研究もかなり含まれているが、これまでのこの分野の流れをみると、基礎実験の結果が、よく臨床結果に反映されており、慎重な基礎実験を積み重ねることによって、臨床応用が間近いと考えられる研究も多くある。再生医学の一分野としての脳内細胞移植はますます発展をとげることが期待される。

謝 辞

本稿の研究の一部は、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) 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* (1996) 137, 333-344.
- 2) Date I : Parkinson's disease, trophic factors, and adrenal medullary chromaffin cell grafting : basic and clinical studies. *Brain Res Bull* (1996) 40, 1-19.
- 3) Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. : Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* (1990) 247, 574-577.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, et al. : Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* (1987) 316, 831-834.
- 7) Date I, Yoshimoto Y, Gohda Y, et al. : Long-term effects of cogafts of pretransected peripheral nerve with adrenal medulla in animal models of Parkinson's disease. *Neurosurgery* (1993) 33, 685-690.
- 8) Date I, Imaoka T, Miyoshi Y, et al. : Chromaffin cell survival and host dopaminergic fiber recovery in a patient with Parkinson's disease treated by cogafts of adrenal medulla and pretransected peripheral nerve : case report. *J Neurosurg* (1996) 84, 685-689.
- 9) Arjona V, Minguez-Castellanos A, Montoro RJ, et al. : Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* (2003) 53, 321-328.
- 10) Toledo-Aral JJ, Mendez-Ferrer S, Pardal R, et al. : Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* (2003) 23, 141-148.
- 11) Lin L-FH, Doherty DH, Lile JD, et al. : GDNF : a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* (1993) 260, 1130-1132.
- 12) Aoi M, Date I, Tomita S, et al. : The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: behavioral and histological studies using two different dosages. *Neurosci Res* (2000) 36, 319-325.
- 13) Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. : Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Med* (2003) 9, 589-595.
- 14) Aoi M, Date I, Tomita S, et al. : GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Acta Neurochir* (2000) 142, 805-810.
- 15) Aebischer P, Schluep M, Deglon N, et al. : Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Med* (1996) 2, 696-699.
- 16) Date I, Ohmoto T, Imaoka T, et al. : Cograftering 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.
- 17) Date I, Shingo T, Ohmoto T, et al. : Long-term enhanced chromaffin cell survival and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with co-grafted polymer-encapsulated human NGF-secreting cells. *Exp Neurol* (1997) 147, 10-17.
- 18) Emerich DF, Winn SR, Christenson L, et al. : A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease : Use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosci*

- Biobehav Rev (1992) 16, 437-447.
- 19) Yoshida H, Date I, Shingo T, et al. : 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.
 - 20) Date I, Shingo T, Yoshida H, et al. : Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease : long-term primate study. *Cell Transplantation* (2000) 9, 705-709.
 - 21) Subramanian T, Emerich DF, Bakay RA, et al. : 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 Transplantation* (1997) 6, 469-477.
 - 22) Date I, Shingo T, Yoshida H, et al. : Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. *Cell Transplantation* (2001) 10, 397-401.
 - 23) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. : Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* (2003) 341, 1-4.
 - 24) Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, et al. : Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* (1997) 148, 135-146.
 - 25) Shingo T, Weiss S : Robust induction of tyrosine hydroxylase in embryonic and adult striatal neural stem cell-derived neurons in defined media and the absence of gene transfer. *Soc Neurosci Abstr* (2000) 26, 830.
 - 26) 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* (2000) 97, 14686-14691.
 - 27) Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, et al. : Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neural progenitor by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* (2001) 21, 9733-9743.
 - 28) Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. : Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99, 2344-2349.
 - 29) Li Y, Chen J, Wang L, et al. : Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* (2001) 316, 67-70.
 - 30) Shingo T, Date I, Yoshida H, et al. : 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.
 - 31) Imaoka T, Date I, Ohmoto T, et al. : Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex. *Hum Gene Ther* (1998) 9, 1093-1102.
 - 32) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. : Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* (2000) 28, 31-40.

Parkinson's disease from a viewpoint of regenerative medicine

Isao DATE

**Department of Neurological Surgery, Okayama University
Graduate School of Medicine and Dentistry,
Okayama 700-8558, Japan**

It has long been considered that central nervous system would not regenerate after injury, but this concept has recently been changing due to the development of neuroscience research. Cell grafting, gene transfer and neurotrophic factor administration into the brain and spinal cord are the examples of methods to perform protection and repair. These techniques are expected to be applied to certain neurological disorders such as Parkinson's disease, cerebral ischemia and spinal cord injury. Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system. Fetal neurons, chromaffin cells, cell lines, certain genes, neural stem cells, ES cells and bone marrow cells have been investigated as donor cells and vectors to treat Parkinson's disease. This review will summarize the history of neural transplantation in Parkinson's disease and features and prospects of each donor will be discussed.