

200906020A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

パーキンソン病に対する細胞移植治療確立のための
霊長類を用いた前臨床研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 淳

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- パーキンソン病に対する細胞移植治療確立のための霊長類を用いた前臨床研究-----1
高橋 淳（京都大学再生医科学研究所・iPS細胞研究所）

II. 分担研究報告

- iPS細胞移植パーキンソン病モデルサルを用いた細胞機能イメージング法の確立-----3
尾上 浩隆（独立行政法人理化学研究所 分子イメージング科学研究センター
分子プローブ機能評価研究チーム チームリーダー）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----5

I. 総括研究報告

パーキンソン病に対する細胞移植治療確立のための霊長類を用いた前臨床研究

研究代表者 高橋 淳（再生医科学研究所/iPS 細胞研究所 准教授）

研究要旨

パーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療の実現化を将来の目的としてヒト iPS 細胞からのドーパミン神経細胞誘導条件を最適化に取り組み、無血清培地を用いた浮遊細胞系で BMP および TGF β , Activin 阻害剤を加えることによって神経分化誘導効率が有意に上昇することを明らかにした。さらに、この方法を用いてヒト iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞をカンクイザルパーキンソン病モデル脳に移植し、この細胞がドーパミン神経細胞として生着しうることを画像解析および組織学的解析にて明らかにした。

研究分担者：

尾上浩隆・理化学研究所分子イメージング科学研究センター・チームリーダー

の直後に脳切片を作製して免疫組織学的解析を行った。

C. 研究結果

A. 研究目的

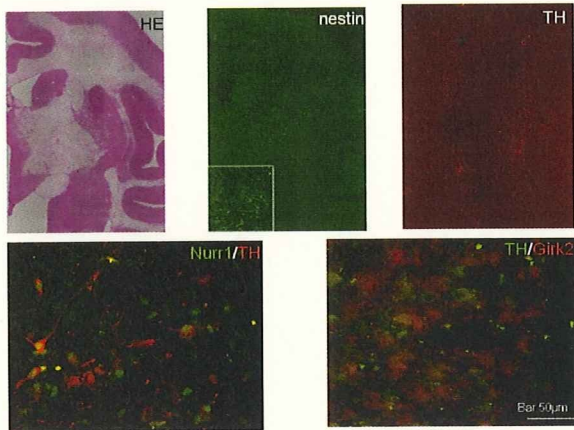
本研究課題ではパーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療実現化のための前臨床試験を最終目標としている。平成 21 年度は分化誘導条件を変えてヒト iPS 細胞から神経前駆細胞を誘導し、それらの細胞をパーキンソン病モデルカンクイザル脳に移植することによって移植条件を最適化することを目的とした。

B. 研究方法

すでに樹立されているヒト iPS 細胞（253G4, Takahashi et al. Cell 2007）を用いて、フィーダー細胞を用いない浮遊培養系によるドーパミン神経細胞分化誘導を試みた。さらに神経分化誘導日数を 28 日と 42 日に分け、分化状態の違うそれぞれの細胞を MPTP 全身投与で作製したパーキンソン病モデルカンクイザルの線条体に移植した。移植 1 カ月前および移植後 1、3、6 カ月に MRI および PET 撮像を行ない、そ

1) 無血清培地を用いた浮遊細胞系で BMP および TGF β , Activin 阻害剤を加えたところ、神経誘導効率と神経前駆細胞の生存が有意に向上した。浮遊培養系でこれらを作用させると神経系細胞マーカーである PSA-NCAM の陽性細胞が 2 週間で 99.8% になった。さらにこの細胞をラミニン/ポリオルニチン上で接着培養するとドーパミン神経細胞のマーカー (TH) 陽性細胞が多数出現し、HPLC でドーパミンの産生も確認することができた。2) MRI による計測で、移植 6 ヶ月後において、分化誘導 28 日目細胞の移植片は 42 日目細胞のものよりも有意にサイズが大きいことが明らかになった (94mm³ vs. 17mm³)。また、移植細胞が脳内でドーパミン神経細胞として機能していることを PET にて確認しえた (分担研究報告参照)。3) 移植 6 ヶ月目の脳切片の組織学的解析では、いずれの移植片でも悪性所見はみられず、奇形腫の病理所見 (骨や筋肉などの形成) もみられなかった。

免疫染色ではドーパミン神経細胞 (TH, Nurr1, Girk2 陽性) が移植片の周囲に生着していることが確認されたが、神経前駆細胞 (nestin 陽性) がまだ移植片の内部に存在した。(下図)



D. 考察

培地内の KSR および B27 supplement に BSA が含まれているので動物由来因子が完全に除かれているわけではないが、フィーダー細胞やマトリクスも用いずかなり臨床応用に近いプロトコールでヒト iPS 細胞からドーパミン神経細胞が誘導できたことは意義深い。また、この方法でヒト iPS 細胞から誘導した細胞が *in vitro* でも *in vivo* でもドーパミン神経細胞に分化したことは臨床応用を考えるうえで重要である。しかも分化誘導日数の違いで細胞の増殖や分化に違いがあることを霊長類モデルで示せたことは意義深い。

E. 結論

無血清培地を用いた浮遊細胞系に BMP および TGFβ, Activin 阻害剤を加えることで、ヒト iPS 細胞から効率良くドーパミン神経細胞を誘導することができた。この方法でヒト iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞は霊長類モデルの線条体に生着・分化し、6ヶ月後の免疫組織学的解析でドーパミン神経細胞として生着していることが明らかとなった。この結果

は安全かつ効果的な細胞移植を目指す上で重要なデータである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Takahashi, J.: Small molecules promote neural differentiation from human pluripotent stem cells in the stromal (PA6) cell co-culture condition: nanosymposium 113.5: Society for Neuroscience 39th Annual Meeting, October 17-21, 2009. Chicago, IL, USA.
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J.: Feeder-free and chemically-defined culture method to induce neural cells from human ES and iPScells: Poster session 808.10: Society for Neuroscience 39th Annual Meeting, October 17-21, 2009. Chicago, IL, USA.
- 森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、高橋淳：低分子化合物を用いたヒト多能性幹細胞からの神経誘導：第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日～19日、広島。
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、高橋淳：浮遊培養法によるヒトESおよびiPS細胞からの神経分化誘導：第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日～19日、広島。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告

iPS 細胞移植パーキンソン病モデルサルを用いた細胞機能イメージング法の確立

研究分担者 尾上 浩隆（独立行政法人理化学研究所 分子イメージング科学研究センター
分子プローブ機能評価研究チーム チームリーダー）

研究要旨

細胞移植治療において移植後の安全性・有効性を評価する上で、PET を用いた細胞機能イメージング法の確立は必須である。本研究では iPS 細胞を移植したパーキンソン病モデルサルにおいて、複数の PET 分子プローブを用いて多角的に評価し、ドパミン合成機能を持った細胞が腫瘍を形成することなく生着することを非侵襲的に捉えることに成功した。

A. 研究目的

人と同じ霊長類に属するマカクサル（カニクイザル）のパーキンソン病モデルを用い、細胞移植の機能評価・疾患の早期診断法・治療法の開発を目的とする。iPS 細胞の細胞移植治療を行ったパーキンソン病モデルサルに対し、移植細胞の生着、分化、炎症、腫瘍化などを、神経伝達・炎症・神経細胞死・マイクログリア・腫瘍細胞などのマーカーに対する PET プローブを用いた分子イメージング評価法を確立する。

B. 研究方法

iPS 細胞移植およびコントロール処置パーキンソン病モデルサルについて、移植 1 カ月前および移植後 1、3、6 カ月に PET 撮像を行った。トレーサーには、腫瘍マーカーである $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 、ドパミン神経細胞のマーカーである $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ を用いた。サルはプロポフォール麻酔下、イヤーパーで頭部を固定後、小動物 PET 装置（microPET Focus220; Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN,

USA）で 90 分間撮像した。また、本研究は動物実験審査委員会の承認のもと、動物実験実施規定に従い倫理的に行った。

C. 研究結果

腫瘍マーカーである $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ を用いて PET を行った結果、細胞移植 6 カ月後においても $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の顕著な取り込み増加は認められなかった（図 1）。

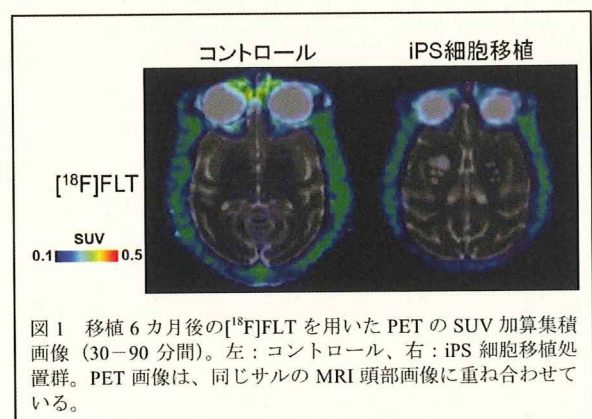
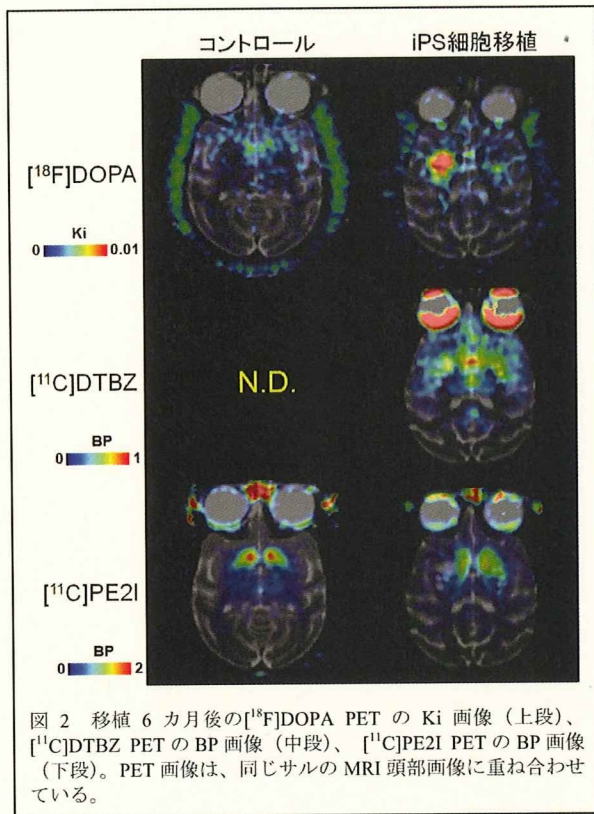


図 1 移植 6 カ月後の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ を用いた PET の SUV 加算集積画像（30–90 分間）。左：コントロール、右：iPS 細胞移植処置群。PET 画像は、同じサルの MRI 頭部画像に重ね合わせている。

一方、ドパミン神経細胞の分化・生着について、移植後の *in vivo* での段階的な分化状態を評価するために、ドパミン合成能は $[^{18}\text{F}]\text{Dopa}$ 、シナプス小胞に

発現する VMAT2 は $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ 、前シナプス発現する DAT は $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ を用いて PET の撮像を行った。その結果、iPS 移植 6 カ月後において、移植コントロールと比較し $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ の顕著な取り込み増加 (Ki 値の上昇) が認められた。 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ に関しては、最近実験系に導入したことから、移植前の PET 実験がまだ行えていないため正確な比較は出来ないが、移植部位において、移植周辺部に比べて結合活性 (Binding potential, BP) が高いことが明らかとなった。しかし、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ の BP は移植コントロールもしくは移植前の結果と比較して増加は認められなかった (図 2)。



D. 考察

本研究において、iPS 細胞の移植後 6 カ月においても、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 集積はなく、今回分化誘導した iPS 細胞には腫瘍形成能は認められなかった。また、iPS 細胞移植 6 カ月後の生着・分化については、 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ が陽性であったのに対し、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ は陰

性であった。これは、移植した細胞がドパミン合成能およびシナプス小胞での貯蓄能を有しているが、シナプス間隙に遊離されたドパミンの取り込みを行う DAT を発現するまでには分化していないことを示している。パーキンソン病の移植効果は、ドパミン合成能により発揮されるが、シナプス間隙でのドパミン濃度を高度に調節する DAT 発現は治療効率の増大や副作用を軽減させる上で必須であり、行動評価だけでは有効性を判定するのに不十分である。このことより、分化過程に合わせた複数の分子プローブでの PET イメージングは iPS 細胞移植治療のモニタリングに極めて有効性が高いことが示唆された。

E. 結論

複数の PET 分子プローブを用いたイメージングにより、iPS 細胞移植パーキンソン病モデルサルでの iPS 細胞移植の有効性・安全性を評価する方法を確立した。特に有効性については、異なる分化過程で発現するバイオマーカー分子を特異的に認識する PET 分子プローブを用いることで移植後の分化状態を非侵襲的に評価でき、非臨床試験の研究効率を飛躍的に向上させる技術の構築に繋がった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

