

201006011A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 淳

平成23 (2011) 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-----7  
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-----13

# 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

ヒト ES, iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞をカニクイザルパーキンソン病モデルに移植した結果の解析を行った。移植後 1 年間の経過観察で、移植前に十分分化させた細胞は腫瘍を形成することなくサル脳内に生着し、行動改善をもたらすことが明らかになった。細胞増殖には FLT-PET、ドーパミン神経としての機能確認には FDOPA-PET が有用であった。移植片における FDOPA の取り込みと行動改善の変化率には相関関係がみられた。ヒト iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞のカニクイザルパーキンソン病モデルへの移植では、6 か月間の経過観察を行った。ドーパミン輸送 (DTBZ-PET) やドーパミン再取り込み (PE2I-PET) も行い、これらも脳内における移植細胞のドーパミン神経細胞としての機能を同定するのに有用であることを確認した。

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

A. 研究目的

パーキンソン病は特定疾患治療研究事業の対象（45 疾患）に指定された重要な疾患であり、しかも欧米で 400 を超える胎児黒質細胞移植が行われ、二重盲験試験でも 60 才以下、軽・中症例では有意な神経症状改善が確認されている (Freed, et al. N Engl J Med 2001; Olanow, et al. Ann Neurol 2003)。つまり臨床的に細胞移植の効果が確認されデータの蓄積がある。また、病態が比較的明らかでモデル動物も確立されているので科学的な解析を行うには妥当である。ES 細胞や iPS 細胞などを利用した細胞移植療法に期待が寄せられているが、その臨床応用の為には霊長類モデルを用いて効果と安全性を厳重に検証する必要がある。

申請者らは、世界に先駆けてカニクイザル ES 細

胞由来神経細胞の移植によるサルパーキンソン病モデルの行動改善、PET による移植細胞の機能解析に成功した (Takagi, et al. J Clin Invest 2005)。今後の臨床応用に向けての課題は、移植後の生着、機能、腫瘍形成を正しく評価し運動機能との関連性を明らかにすることである。つまり、どのような細胞をどこにどれだけ移植すればよいかを詳細に検討する必要がある。これらのデータの蓄積によって移植細胞や移植方法の至適化が可能になるが、これらの研究は齧歯類モデルましてや患者では行えないし、世界的にもヒト ES 細胞、iPS 細胞の霊長類パーキンソン病モデル移植での解析は報告されていない。

そこで本研究課題ではパーキンソン病に対する幹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、そのためにカニクイザル疾患モデルを用いて画像解析、行動解析、組織診断を行い、これらの関係性を明らかにすることを目的としている。

平成 22 年度はヒト ES, iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞をカニクイザルパーキンソン病モデルに



移植した結果の解析を行い、腫瘍形成を抑え移植効果を発揮させる条件の検討を行った。

## B. 研究方法

上記の目的を達成するために、特に以下の2点に重点において細胞移植評価システムの構築を試みた。

### 1) 腫瘍形成の同定と腫瘍形成抑制法の確立

ES細胞やiPS細胞を用いた細胞移植では脳内での腫瘍形成が報告されており、細胞移植の安全性を確立するためには、鋭敏かつ正確な腫瘍同定技術が不可欠である。本研究では、細胞移植後にMRIやPETを行ない、腫瘍の有無を継続的に評価する。また、新しいトレーサの開発を行い、移植細胞の癌化を早期に発見できる技術の開発を行う。

移植細胞の癌化の早期発見のためには、従来のFDGやメチオニンによるPETだけでは特異性に欠ける。理化学研究所では<sup>18</sup>F-fluorothymidine (FLT)による腫瘍の同定に成功しており、これを細胞移植後サルモデルに適用する。脳切片の組織化学的解析によって腫瘍の病理所見、増殖細胞の種類を明らかにし、画像解析結果に反映させる。これらの結果をヒトES、iPS細胞からの神経前駆細胞誘導法や細胞選別法にフィードバックし、霊長類の系で腫瘍形成抑制法を確立する。

### 2) 細胞生着の確認と機能解析

細胞移植の効果を最大限にするには移植細胞の質や量、移植部位や神経投射に関する詳細な検討が必要であるが、霊長類を用いた評価法は確立されていない。本研究ではサルモデルへの移植後のPETやMRIの結果と行動解析や脳切片の免疫染色結果とを併せて検討することにより、より効果的な細胞移植を行うための諸条件の最適化を行う。

移植細胞が脳内でドーパミン産生神経として機能しているかどうかについては、ドーパミン生合成酵

素 (<sup>18</sup>F-DOPA)、トランスポーターリガンド (<sup>11</sup>C-DTBZ, <sup>11</sup>C-PE2I) を用いたPETによる機能評価を行う。ビデオ撮影による行動解析を行い移植細胞のドーパミン機能と運動機能の関連を解析することにより、客観的な指標を画像化する。

具体的な実験方法は以下の通り。

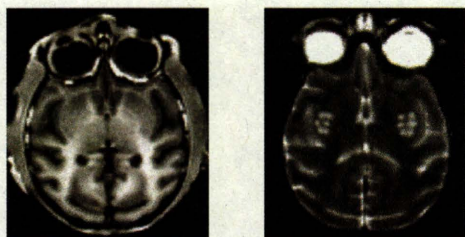
1) ヒトES細胞 (KhES-1, 2) をマトリゲル上でPA6 (マウス頭蓋骨髄由来間質フィーダー細胞) のconditioned mediumを加えた無血清培地で培養し (SDIA法変法)、神経系細胞へ誘導した。この方法では14日目にはまだ未分化ES細胞が残存していた。28日目には未分化ES細胞は消失するもののまだ多くの神経前駆細胞が残っていた。そこで次の実験ではドーパミン神経誘導を促進するShhやFGF8を培養液中に加え、28日目からはドーパミン神経細胞成熟に必要なGDNFやBDNFを加えた。これら分化状態の違う細胞 (14日、28日、さらにサイトカインを加えて35、42日間) を、免疫不全マウスおよびMPTP全身投与で作製したパーキンソン病モデルカニクイザルの線条体に細胞を移植した。移植後12か月間、MRIおよびPET解析を行い行動解析も行った。その後灌流固定を行い、脳切片の免疫組織学的解析を行った。

2) 以上の分化誘導法はマウス由来のマトリゲルやPA6 conditioned mediumを用いており、臨床応用に用いることができない。そこでヒトiPS細胞 (253G4) については、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ニ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、その後に脳切片を作製して免疫組織学的解析を行った。



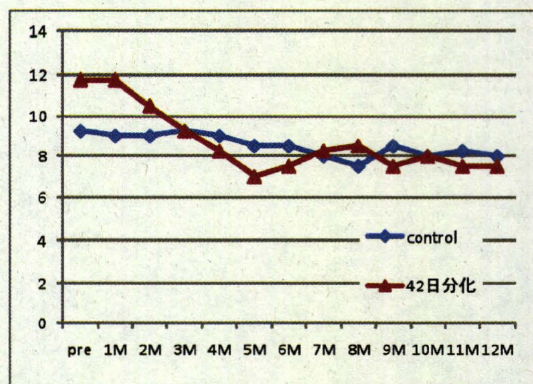
### C. 研究結果

1) 分化誘導日数が短く(14日間)未分化ES細胞が残存している細胞では、免疫不全マウス脳への移植で28日分化誘導細胞と比べると移植片は有意に大きく、サル脳内では9か月にわたってその未分化細胞が増殖し続け腫瘍を形成していた。ただし、未分化細胞の集積は一部に認められるものの大半は神経前駆細胞の増殖であり、核の異型性などの悪性所見はみられず、境界は鮮明で周囲脳への浸潤所見も認められなかった。未分化ES細胞が増殖している部分ではFLT-PETにおいてFLTの高い取り込みが観察され、脳切片の免疫染色ではOct3/4陽性細胞の集積が認められた。28日分化誘導細胞でもサル脳内の移植片サイズはより小さく、未分化ES細胞は認められなかった。サイトカインを加え35、42日間分化誘導した細胞では未分化ES細胞は残存しておらず最終分裂を終えたドーパミン神経細胞も10-30%混じっている。これらの細胞の移植では腫瘍形成はみられず特に42日分化細胞では4頭中3頭において6か月目からは移植片の増大がみられなくなった(図1)。



(図1: 42日分化細胞の移植。左右6トラクトずつ線条体に移植している。左=移植前のT1強調画像。右=移植12か月後のT2強調画像。)

42日分化細胞を移植したモデルサルでは移植3か月後から12か月後に渡り、コントロール群と比べて有意な行動改善が認められた(図2)。これらのサルではFDOPA-PETでは移植片におけるFDOPA取り込みの上昇が確認され、その取り込み上昇率は行動改善率と相関関係がみられた。

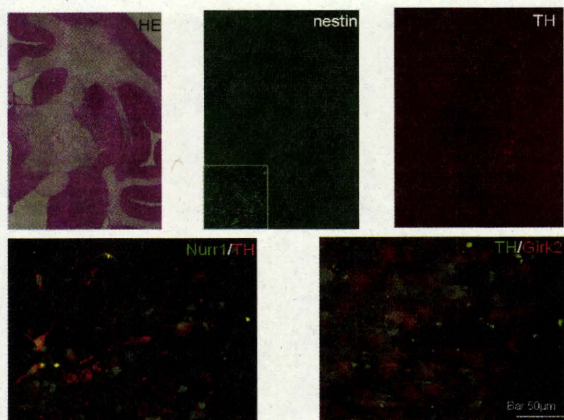


(図2: 移植前~12か月後の行動スコア変化。重症では高得点。)

2) まず無血清培地を用いた浮遊細胞系でBMPおよびTGF $\beta$ 、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。つまり、フィーダー細胞を用いずに機能的なドーパミン神経細胞に分化しうる神経前駆細胞を効率良く誘導することに成功した。続いて、分化日数が28日の細胞と42日の細胞をMPTP全身投与で作製したパーキンソン病モデルカニクイザルの線条体に移植し6か月間の経過観察をおこなった。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(94mm<sup>3</sup> vs. 17mm<sup>3</sup>)。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が<sup>18</sup>F-DOPA、<sup>11</sup>C-DTBZ、<sup>11</sup>C-PE2IによるPETにて確認した。さらに、移植6ヶ月後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。（図3）



（図3：ヒト iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞のサルパーキンソン病モデル脳への移植。TH, Nurr1, Girk2 はいずれもドーパミン神経細胞のマーカ。nestin は神経前駆細胞のマーカ。移植片の内部に神経前駆細胞が存在し周辺部にドーパミン神経細胞が存在している。）

#### D. 考察

ヒト ES 細胞由来神経前駆細胞をサルパーキンソン病モデルに移植した報告例はまだなく、移植片増大の過程を MRI で解析し、しかも細胞増殖を FLT-PET で同定しうることを示したことは臨床応用を考えるうえで意義は大きい。形成された腫瘍がいわゆる三胚葉成分からなる奇形種ではなく、基本的に神経系の細胞であることも興味深い。また、境界鮮明で浸潤傾向がみられないことは、万が一腫瘍形成がみられた場合でも放射線照射や摘出が可能であることを示唆している。したがって MRI や FLT-PET で移植片の状態を観察し、移植片の増大と FLT の取り込みが持続する場合は、その hot-spot を中心にガンマナイ

フやエクスナイフを照射するという戦略が考えられる。

腫瘍形成を防ぐ方法として、分化日数を長くしてより分化した細胞を移植するという方法と安全な細胞のみを選別して移植するという方法が考えられる。後者の方法としてドーパミン神経前駆細胞のみをセルソーターで選別して移植できればパーキンソン病に対する移植治療としては最善だと考えられるが、残念ながら現時点ではドーパミン神経前駆細胞に特異的に発現する表面マーカーは同定されていない。そこで我々は分化日数を長くしさらにドーパミン神経細胞の成熟を促すサイトカインを加えて分化状態の違う細胞を移植した。興味深いことに 42 日間分化誘導した細胞の場合は 4 頭中 3 頭で 6 か月目から 12 か月目の間に移植片の増大は見られなかった。しかもこれらの細胞を移植したモデルサルでは移植後に行動改善がみられたという意義は大きい。35 日分化誘導の細胞では 2 頭中 2 頭ともゆっくりではあるが 12 か月間を通して移植片の増大がみられ、モデルサルの行動改善も観察されなかった。42 日分化細胞による移植片には 35 日分化細胞の移植片と比べて多くのドーパミン神経細胞 (TH 陽性細胞) が存在し、F-DOPA の取り込みもより高かった。これらの結果から安全かつ効果的な移植を行うには完全ではないにせよある程度成熟した神経細胞を移植したほうがよいことが明らかとなった。

しかし、42 日分化細胞の移植でも 12 か月後においてまだ神経前駆細胞の残存が認められており、わずかではあるが分裂細胞もみられた。今後はより安全かつ効果的な移植細胞を準備するために分化誘導法や細胞選別法をより一層至適化する必要がある。これまでの実験で評価系はかなり確立できたので、今後はコントロールも含めてより頭数を増やした実験を行う必要がある。



上記の実験では分化誘導にマウス由来のマトリゲルとマウス細胞 (PA6 細胞) の conditioned medium を用いており、この方法は臨床応用に使うことはできない。そこでヒト iPS 細胞の実験では、フィーダー細胞を用いず浮遊培養系で神経誘導を行った。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。ヒト ES 細胞の場合と同様に 42 日分化細胞の移植では 28 日分化細胞と比べて移植片はより小さくかつより多くのドーパミン神経細胞が生着していた。この移植において  $^{18}\text{F}$ -DOPA のみならず  $^{11}\text{C}$ -DTBZ、 $^{11}\text{C}$ -PE2I でも移植細胞による取り込み増加が観察されたことで、ドーパミン神経細胞としての *in vivo* 機能評価がより充実したものとなった。

スコア値やビデオモニタリングによる行動解析はこれまでも行ってきたが (Takagi et al., J Clin. Invest. 2005; Saiki et al., J Neurosci Methods 2010)、今回の実験でもこれらの解析は有用であった。特に DOPA-PET 結果とスコア改善値との間に相関関係がみられたことは移植細胞の脳内での機能をリアルタイムに評価しようという意味で興味深い。

## E. 結論

今回の実験で移植前に十分な神経分化をさせるとヒト ES、iPS 細胞の腫瘍形成は抑えられ、行動改善も期待しうることが明らかとなった。また MRI や PET などの画像解析が細胞の増殖や機能を同定するのに有用であることも明らかとなった。ES、iPS 細胞

の効果や安全性を検証するにはより多くのモデルやコントロールを用いた実験が必要であるが、これまでの研究を通して霊長類モデルを用いた細胞移植、画像解析、行動解析の評価系は確立しえたと思われる。

今回の実験で明らかになった課題は、症状改善をもたらしたヒト ES 細胞から 42 日間分化誘導させた細胞でも 12 か月後に神経前駆細胞が移植片内に残存していることである。したがって、分化誘導法や細胞選別法の改良が今後必要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 該当なし (結果 1, 2 とも投稿中)

### 2. 学会発表

- 高橋 淳: パーキンソン病に対する iPS 細胞移植療法の開発研究。第 47 回日本臨床分子医学会学術集会 (2010.4.10 東京)
- 高橋 淳: パーキンソン病に対する幹細胞移植治療の開発研究。第 25 回神経組織の成長・再生・移植研究会 (2010.5.22 大阪)
- 菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 尾上浩隆, 林 拓也, 川崎俊之, 高橋 淳: パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植。第 25 回神経組織の成長・再生・移植研究会 (2010.5.22 大阪)
- 高橋 淳: パーキンソン病に対する iPS 細胞移植療法の開発研究。第 2 回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会 (2010.7.23 京都)
- Takahashi J: ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease. NeuroStemcell Workshop September 2010 (2010.10.26 Mallorca, Spain)
- 高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療。

iPS 細胞研究の最前線ワークショップ (2010.10.2 東京)

- 土井大輔、菊地哲広、森実飛鳥、高橋 淳：ヒト ES 細胞由来の神経細胞移植における霊長類パーキンソン病モデルでの腫瘍形成。第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2010.10.8 京都)
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳：パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植。第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2010.10.9 京都)
- Takahashi, J : ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease. 10th biennial meeting of APSN symposium (2010.10.17-19 Phuket, Thai)
- 菊地哲広、森実飛鳥、土井大輔、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、宮本 享、高橋 淳：パーキンソン病モデルサルに対するヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経移植。社団法人日本脳神経外科学会第 69 回学術総会 (2010.10.29 博多)
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Takahashi, J.: Transplantation of human iPS derived dopaminergic neurons to a primate model for Parkinson disease. SFN Annual Meeting 2010 (2010.11.15 San Diego, USA)
- 森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、吉川達也、五味正憲、高橋 淳：ヒト ES 細胞を用いたカニクイザルパーキンソン病モデルへの細胞移植。第 10 回日本再生医療学会総会 (2011. 3. 1 東京)

3. その他

該当なし

G. 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

## 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 細胞移植パーキンソン病モデルサルの安全性・有効性評価に応用するための PET 細胞機能イメージング法を分化過程の異なる ES 細胞を移植したパーキンソン病モデルサルを用いて確立した。また、様々な条件で分化誘導した iPS 細胞を移植し、複数の PET プローブを用いて安全性・有効性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 PET プローブで解析を行ない、分子イメージング評価法を確立する。

B. 研究方法

分化過程の異なる ES 細胞を移植したパーキンソン病モデルサルについて、移植 1 ヶ月前および移植後 1、3、6、12 ヶ月に PET 撮像を行った。また、iPS 細胞移植パーキンソン病モデルサルについて移植 1 ヶ月前および移植後 1、3、6 ヶ月に PET 撮像を行った。腫瘍の評価には、細胞増殖の指標としてチミジン誘導体である 3'-deoxy-3' [<sup>18</sup>F]fluorothymidine ([<sup>18</sup>F]FLT)を用いた。ドパミン神経細胞の機能評価には、ドパミンの合成能の指標として [<sup>18</sup>F]fluorodopa

( [<sup>18</sup>F]DOPA)、ドパミンの貯蔵能の指標として [<sup>11</sup>C]dihydratetabenazine ([<sup>11</sup>C]DTBZ)、ドパミン再取り込み能の指標として N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2β-carbo[<sup>11</sup>C]methoxy-3β-(4-methylphenyl)nortropane ([<sup>11</sup>C]PE2I)を用いた。 [<sup>18</sup>F]DOPA-PET では、末梢での [<sup>18</sup>F]DOPA の脱炭酸を抑えるため、末梢性脱炭酸酵素阻害剤カルビドパ(10 mg/kg)を5分前に前投与した。PET 撮像はサルをプロポフォル麻酔下、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。 [<sup>18</sup>F]FLT の解析は PET プローブ投与後 30 分から 90 分までの加算集積画像を算出し、小脳の取り込み量で補正した。 [<sup>18</sup>F]DOPA の解析は小脳を参照領域とし、パトラック解析により、ドパミンの合成能・貯蔵能の指標である取り込み定数 Ki を算出した。 [<sup>11</sup>C]DTBZ の解析は小脳を参照領域とし、Ichise の Multilinear Reference Tissue Model (MRTM) により小胞モノアミントランスポーター(VMAT)2 への結合活性 (BP) を、 [<sup>11</sup>C]PE2I の解析は小脳を参照領域とし、Simplified Reference Tissue



Model (SRTM) によりドパミントランスポーターへの BP を算出した。関心領域の設定は PET 撮像時と同時期に撮像した MRI の T1, T2 強調画像を用いて行なった。また、PET での細胞機能イメージングの評価が運動機能改善を反映するかを解析するため、同じタイムコースでの運動機能試験も行なった。

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なった。

### C. 研究結果

移植の安全性評価法を確立する目的で [ $^{18}\text{F}$ ]FLT を用いて癌化の有無についての PET イメージングを行った。14 日間分化誘導をした ES 細胞移植サル No. 602 の細胞移植 12 ヶ月後において、細胞移植部位の数か所で顕著な [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の高い取り込みが認められた。この取り込み増加は高い部位で小脳を取り込みの 3 倍を超え、移植部位全体としても小脳の 1.5 倍以上であった。さらに、この個体の剖検により、画像に一致した脳局所において病理学的にも腫瘍化が認められた。28 日間分化誘導をした ES 細胞移植サル No. 604-607 の細胞移植 12 ヶ月後においても、細胞移植部位の数か所で若干の [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込み増加が認められたが、その程度は、最も高い場所でも小脳比で 1.4 程度であり、移植部位全体では小脳比で 0.8-1.2 であった。一方、35 日間および 42 日間分化誘導をした ES 細胞移植サル No. 62, 63, 65, 67, 68, 75 の細胞移植 12 ヶ月後においては、細胞移植部位で [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込み増加はほとんど認められず、その程度は、最も高い場所でも小脳比で 1.2 程度であり、移植部位全体では小脳比で 0.8-1.0 程度であった。細胞を移植しなかったコントロールサル No. 66, 69 において、被殻の [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込みは小脳比で 0.8-1.0 程度であり、35 日間および 42 日間分化誘導した群と同程度であった(図 1)。

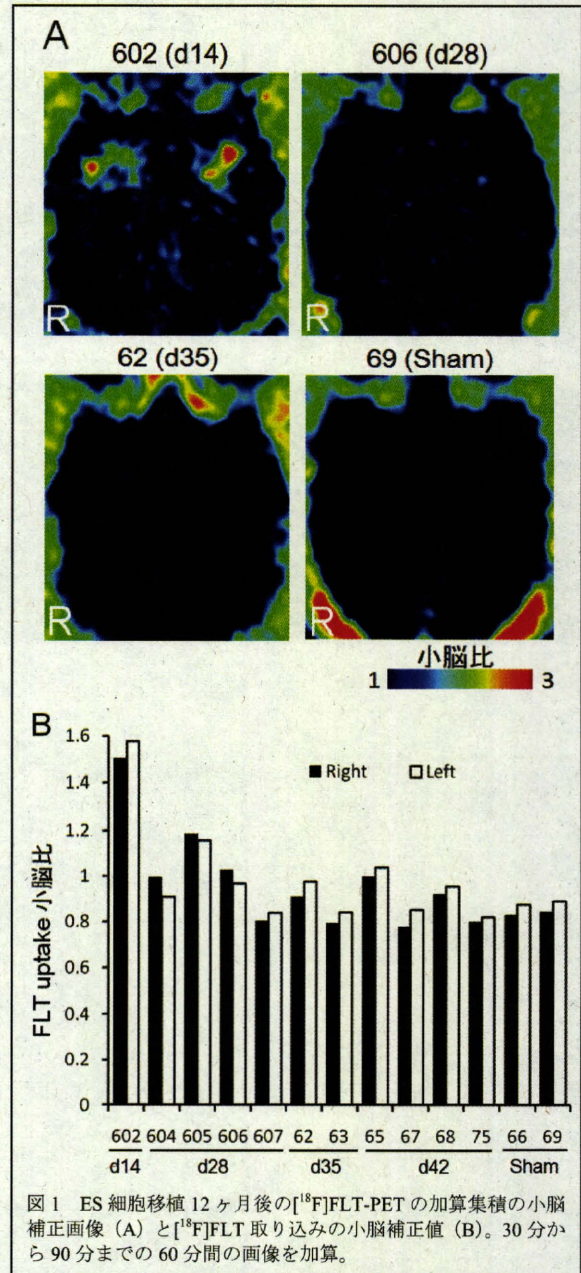
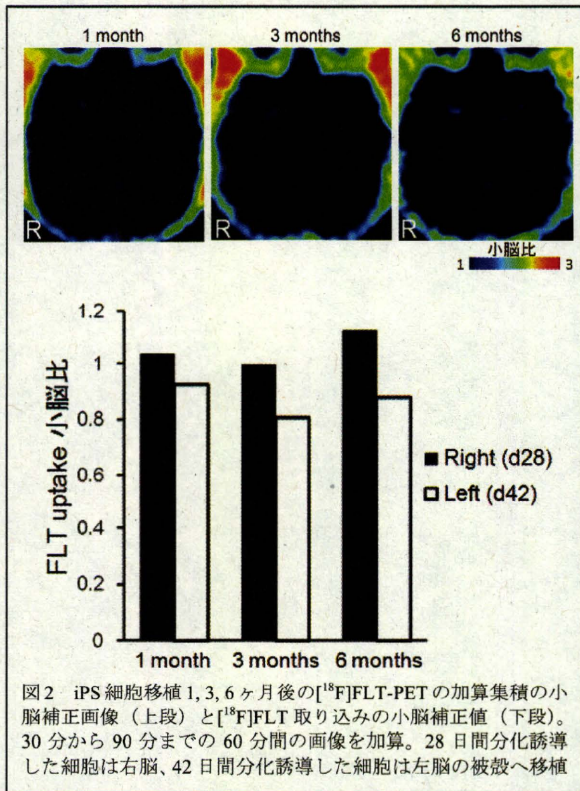


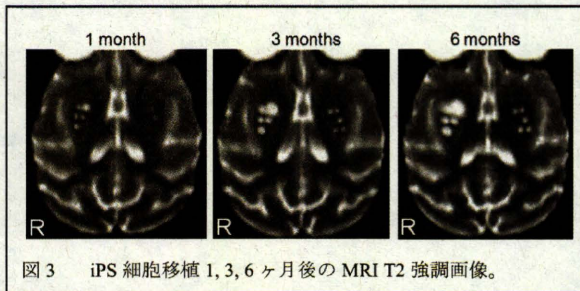
図 1 ES 細胞移植 12 ヶ月後の [ $^{18}\text{F}$ ]FLT-PET の加算集積の小脳補正画像 (A) と [ $^{18}\text{F}$ ]FLT 取り込みの小脳補正值 (B)。30 分から 90 分までの 60 分間の画像を加算。

さらに、iPS 細胞を移植したサルの [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込みを経時的に観察した結果、42 日間分化誘導した iPS 細胞を移植した左脳側(画像では右側)の [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込みは移植後 6 ヶ月までコントロールと同程度であったが、28 日間分化誘導した iPS 細胞を移植した右側では [ $^{18}\text{F}$ ]FLT の取り込みは移植後 6 ヶ月まで 1.0 程度と 42 日間の細胞よりわずかに高い傾向にあった。しかし、No. 602 のような異常に高い取り込みは認められなかった(図 2)。



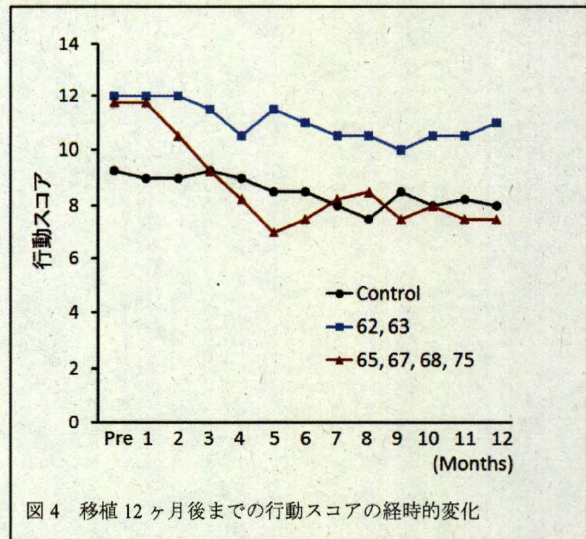


MRI T2 強調画像を用いて移植片サイズの経時的変化を移植後1ヶ月から6ヶ月まで比較した結果、28日間のiPS細胞移植片6ヶ所のうち1ヶ所は検出できなかったが、それ以外の5ヶ所では42日間の移植片のサイズに比べ大きかった(図3)。また、各移植片の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込み量の違いが増殖能を反映するかを解析するため、移植6ヶ月後のiPS細胞移植片サイズとそれに対応する移植片での $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込み量の相関を評価した結果、有意な強い正の相関が得られている(相関係数0.82、 $P<0.01$ )。



次に、移植後のin vivoでのドパミン合成能と症状の改善度との関係性を検討するために、ドパミン合

成能は $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ 、症状の改善の程度は行動観察により評価した。行動スコアはES細胞の42日間分化誘導した群(65, 67, 68, 75)において改善が認められたが、分化度が低い35日間分化群(62, 63)においては、改善の程度が弱かった(図4)。



行動スコアが改善した42日間分化誘導したNo. 67の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETにより、移植部位に一致して $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ が顕著に取り込まれていることが明らかになった(図5)。

移植部位におけるドパミン合成能を定量化するために、 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETデータをパトラック法により定量解析した結果、35日間、42日間分化群ともにコントロールと比較して高いKi値の増加が認められ、特に42日間分化群においてより高いKi値の増加が認められた。今回の検討では、移植前の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETを行えていないため、移植部位のKi値から被殻の中で移植されていない領域のKi値を引いた $\Delta\text{Ki}$ 値を算出し、35日間分化群と42日間分化群を比較した結果、有意ではなかったものの42日間分化群で $\Delta\text{Ki}$ 値の増加が認められた。また、 $\Delta\text{Ki}$ 値の増加が行動の改善と相関するかについて解析した結果、移植12ヶ月後の行動スコア改善率との有意な強い相関が認められた。



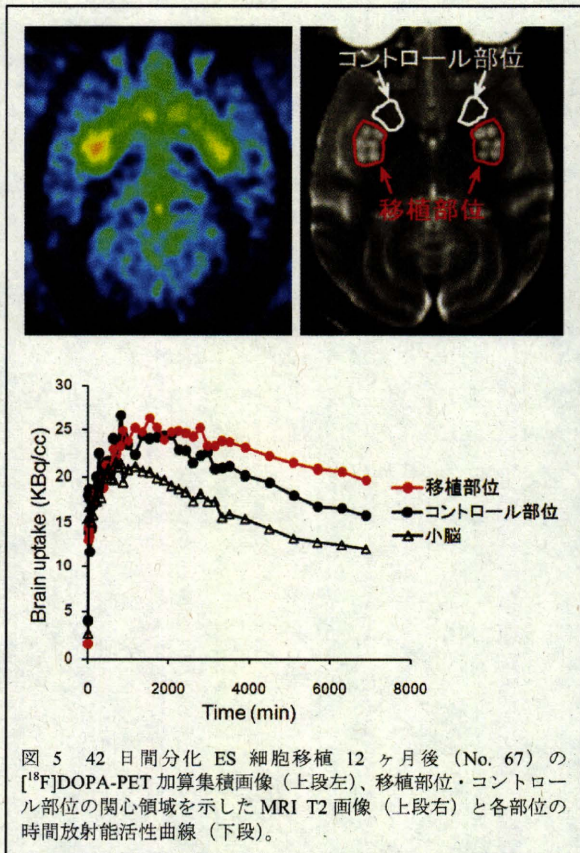


図5 42日間分化ES細胞移植12ヶ月後(No. 67)の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PET加算集積画像(上段左)、移植部位・コントロール部位の関心領域を示したMRI T2画像(上段右)と各部位の時間放射能活性曲線(下段)。

iPS細胞のドー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、ドーパミン合成能は $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ 、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による撮像を行った。 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETのKi値の増加はiPS細胞移植サルでも認められ、特に右脳の被殻に移植した移植期間が28日間移植片で顕著であった。また、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ に関しても移植部位において、移植周辺部に比べてBPが高いことが明らかとなった。しかし、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ のBPは移植前の結果と比較して増加は認められなかった。(図6)。

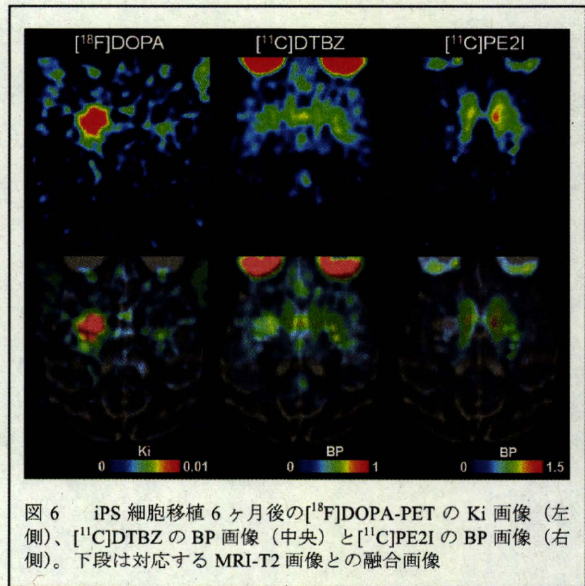


図6 iPS細胞移植6ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETのKi画像(左側)、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ のBP画像(中央)と $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ のBP画像(右側)。下段は対応するMRI-T2画像との融合画像

#### D. 考察

本研究において、ES細胞の移植後12ヶ月のNo. 602で $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込みが小脳比で3以上と非常に高い部位が認められた。また、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 画像に一致した部位において病理学的にも腫瘍化が認められ、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ のPETイメージングにより幹細胞の腫瘍化を非侵襲的に検出できることが実証された。No. 602ではES細胞の分化誘導期間が短く、移植した細胞の一部に未分化なES細胞が混入していたと考えられる。さらに分化誘導期間が28日間以上で純化方法を改良した個体では病理学的にも腫瘍化は認められておらず、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込みも若干高い部位があったものの正常な細胞増殖による範囲内であると推測される。iPS細胞移植サルにおいても、分化誘導期間が28日間の右側移植部位において42日間の左側移植部位よりも $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込みが高かったが、これも病理学的に腫瘍化は認められておらず、正常な細胞増殖であると考えられる。また、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込みと移植片のサイズに有意な正の相関があったことから、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PETは移植片の正常な細胞増殖能も捉えることが可能であることが示された。しかし、どの範囲以上が腫瘍の指





標になるかについては不明であり、病理組織と比較しながら閾値を推測し、より確実に安全な判断基準を作成する必要がある。

ES 細胞移植 12 ヶ月後の生着・分化については、分化誘導期間が 42 日間の群で 35 日間の群と比較し、より高い行動スコアの改善率と $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  の  $\Delta\text{Ki}$  値の増加が認められた。また、各個体の行動スコアの改善率と $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  の  $\Delta\text{Ki}$  値は有意な強い相関を示したことから、移植の有効性を判定する指標として客観的で有用な PET イメージングであることが示唆された。iPS 細胞移植サルにおいても $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  の  $\Delta\text{Ki}$  値は増加していたが、分化誘導期間が 28 日間の移植片において、42 日間と比較して顕著な  $\Delta\text{Ki}$  値の増加が認められた。ES 細胞では分化期間が長い 42 日間の移植群の方が 35 日間の群よりも  $\Delta\text{Ki}$  値の増加量が高かったことと矛盾するが、単に ES 細胞・iPS 細胞の性質の違い以外にも、分化期間が短い 28 日間の群では細胞の生着率が良く、より高いドパミン合成能を有した可能性がある。これらを明らかにするために、病理学的な検討、行動解析と比較し PET イメージングの有用性を多角的に検証する必要がある。これらのことより、多くの課題が山積しているものの、 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$  および $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  を用いた PET イメージングは、細胞移植治療の安全性・有効性のモニタリングに極めて有用性が高いことが示唆された。

## E. 結論

$[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  を用いた PET イメージングにより、ES 細胞移植パーキンソン病モデルサルでの有効性・安全性を評価する方法を確立し、iPS 細胞移植の評価にも成功した。今後、本評価系に新たな PET プローブを加えた PET イメージング解析の発展により、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るものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Takashima-Hirano M, Shukuri M, Takashima T, Goto M, Wada Y, Watanabe Y, Onoe H, Doi H, Suzuki M.; General Method for the ( $^{11}\text{C}$ )-Labeling of 2-Arylpropionic Acids and Their Esters: Construction of a PET Tracer Library for a Study of Biological Events Involved in COXs Expression. *Chemistry*. 16(14):4250-8, 2010.

### 2. 学会発表

- 尾上浩隆：PET 生体分子イメージングの基礎と創薬への活用；九州工業大学特別講演、北九州、2010 年 6 月 18 日
- 尾上浩隆：病態モデル動物を用いた陽電子放出型断層撮像法(PET)による生体分子イメージング；岡山大&理研ジョイントシンポジウム 最先端計測技術のトレンド 2010 - 先端計測技術と分析科学イノベーション -、岡山、2010 年 6 月 28 日
- 尾上浩隆：無麻酔下の動物を用いた PET イメージング研究の可能性；第 11 回 Wako つくばフォーラム 医薬研究に向けた最先端ライブイメージング；つくば、2010 年 7 月 13 日
- 尾上浩隆：無麻酔下の動物を用いた PET イメージング研究；脳科学研究戦略推進プログラム課題 C 分科会、札幌、2010 年 7 月 28 日
- 尾上浩隆：創薬と病態科学のための分子イメージング；PET サマーセミナー 2010 in 岡山、岡山、2010 年 8 月 20 日
- Takahashi J, Doi D, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Morizane A.; Brain Imaging in Stem Cell Therapy for Primate Parkinson's Disease Models.: 2010 World Molecular Imaging Congress, Kyoto, Sep 10,



2010. Symposium.

- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Takahashi J.; Transplantation of human iPS derived dopaminergic neurons to a primate model for Parkinson disease.: Neuroscience 2010, San Diego, Nov 15, 2010. Poster Session

G. 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
川崎俊之、田原強、宿里充穂、尾上浩隆	再生医療への分子イメージングの応用	佐治英郎	遺伝子医学MOOK18 創薬研究への分子イメージング応用	株式会社メディカルドゥ	大阪	2010	206-213
尾上浩隆、川崎俊之	PET分子イメージングと再生医療	米倉義晴、伊藤雅敏、窪田和雄、佐治英郎、玉木長良、中川恵一、畑澤 順、間賀田泰寛、渡辺恭良、寺田弘司	先端医療シリーズ14 臨床医とコメディカルのための最新クリニカルPET	株式会社寺田国際事務所/先端医療技術研究所	東京	2010	292-296

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
Takashima-Hirano M, Shukuri M, Takashima T, Goto M, Wada Y, Watanabe Y, Onoe H, Doi H, Suzuki M.	General Method for the (11)C-Labeling of 2-Arylpropionic Acids and Their Esters: Construction of a PET Tracer Library for a Study of Biological Events Involved in COXs Expression.	Chemistry	16(14)	4250-4258	2010

## General Method for the $^{11}\text{C}$ -Labeling of 2-Arylpropionic Acids and Their Esters: Construction of a PET Tracer Library for a Study of Biological Events Involved in COXs Expression

Misato Takashima-Hirano, Miho Shukuri, Tadayuki Takashima, Miki Goto, Yasuhiro Wada, Yasuyoshi Watanabe, Hiroataka Onoe, Hisashi Doi, and Masaaki Suzuki\*<sup>[a]</sup>

**Abstract:** Cyclooxygenase (COX) is a critical enzyme in prostaglandin biosynthesis that modulates a wide range of biological functions, such as pain, fever, and so on. To perform in vivo COX imaging by positron emission tomography (PET), we developed a method to incorporate  $^{11}\text{C}$  radionuclide into various 2-arylpropionic acids that have a common methylated structure, particularly among nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Thus, we developed a novel  $^{11}\text{C}$ -radiolabeling methodology based on rapid C- $^{11}\text{C}$  methylation by the reaction of  $^{11}\text{C}$ CH<sub>3</sub>I with enolate intermediates generated from the corresponding esters under basic conditions. One-pot hydrolysis of the above

$^{11}\text{C}$  methylation products also allows the synthesis of desired  $^{11}\text{C}$ -incorporated acids. We demonstrated the utility of this method in the syntheses of six PET tracers,  $^{11}\text{C}$ ibuprofen,  $^{11}\text{C}$ naproxen,  $^{11}\text{C}$ flurbiprofen,  $^{11}\text{C}$ fenoprofen,  $^{11}\text{C}$ ketoprofen, and  $^{11}\text{C}$ loxoprofen. Notably, we found that their methyl esters were particularly useful as praradiotracers for a study of neuroinflammation. The microPET studies of rats with lipopolysaccharide (LPS)-induced brain inflammation

clearly showed that the radioactivity of PET tracers accumulated in the inflamed region. Among these PET tracers, the specificity of  $^{11}\text{C}$ ketoprofen methyl ester was demonstrated by a blocking study. Metabolite analysis in the rat brain revealed that the methyl esters were initially taken up in the brain and then underwent hydrolysis to form pharmacologically active forms of the corresponding acids. Thus, we succeeded in general  $^{11}\text{C}$ -labeling of 2-arylpropionic acids and their methyl esters as PET tracers of NSAIDs to construct a potentially useful PET tracer library for in vivo imaging of inflammation involved in COXs expression.

**Keywords:** anti-inflammatory drugs • C–C coupling • cyclooxygenase • inflammation • positron emission tomography

### Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely prescribed drugs worldwide, because they are the first choice in the treatment of rheumatic disorders and other degenerative inflammatory diseases.<sup>[1]</sup> One of the pharmacological actions of NSAIDs is an inhibitory effect

on cyclooxygenase (COX), which is a critical enzyme in converting arachidonic acid into prostaglandins and thromboxanes. Mainly, two distinct isoforms, COX-1 and COX-2, are known as a constitutive and an inducible form, respectively. Recently, a novel COX-1 splice variant termed as COX-3 has also been reported.<sup>[2]</sup> COX-1 enzyme exists in most mammalian cells including the endothelium, stomach, and kidney, and is responsible for maintaining homeostasis. In contrast, COX-2 is found in the brain and kidney, it is primarily induced in response to cytokines, mitogens, and endotoxins in a variety of cell types including macrophages and tumors. Therefore, the quantification of COX-2 in many disease processes has great potential as a useful biomarker for early diagnosis, a monitor of disease progression, and an indicator of effective medical treatment.

[a] M. Takashima-Hirano, M. Shukuri, T. Takashima, M. Goto, Y. Wada, Prof. Dr. Y. Watanabe, Dr. H. Onoe, Dr. H. Doi, Prof. Dr. M. Suzuki  
RIKEN Center for Molecular Imaging Science (CMIS)  
6-7-3 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku  
Kobe, Hyogo, 650-0047 (Japan)  
Fax: (+81) 78-304-7131  
E-mail: masaaki.suzuki@riken.jp

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200903044>.