

201106005A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 淳

平成24 (2012) 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-----8  
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

厚生労働省科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

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。平成 23 年度はこれらのデータをまとめて、論文として発表した。

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 23 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、論文にまとめて報告した。

## 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を行わない、腫瘍の有無を継続的に評価する。また、新しいトレーサーの開発を行い、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

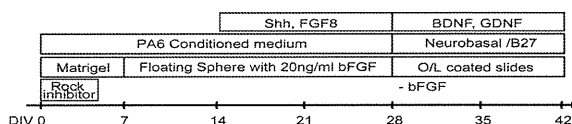
細胞移植の効果を最大限にするには移植細胞の質量、移植部位や神経投射に関する詳細な検討が必要であるが、霊長類を用いた評価法は確立されていない。本研究ではサルモデルへの移植後のPETやMRIの結果と行動解析や脳切片の免疫染色結果とを併せて検討することにより、より効果的な細胞移植を行うための諸条件の至適化を行う。

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(図1)。



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

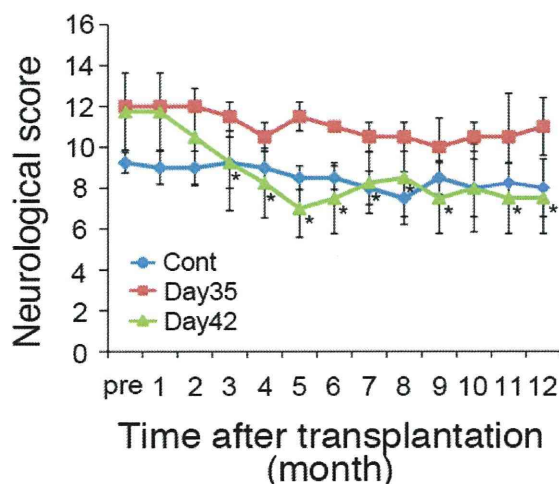
1) 分化誘導日数が短く(14日間)未分化ES細胞が残存している細胞では、免疫不全マウス脳への移植で28日分化誘導細胞と比べると移植片は有意に大きく、サル脳内では9か月にわたってその未分化細胞が増殖し続け腫瘍を形成していた。ただし、未分化細胞の集積は一部に認められるものの大半は神経前駆細胞の増殖であり、核の異型性などの悪性所見はみられず、境界は鮮明で周囲脳への浸潤所見も認められなかった。未分化ES細胞が増殖している部分ではFLT-PETにおいてFLTの高い取り込みが観察され、脳切片の免疫染色ではOct3/4陽性細胞の集積が認められた。28日分化誘導細胞でもサル脳内の移植片サイズはより小さく、未分化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2)。



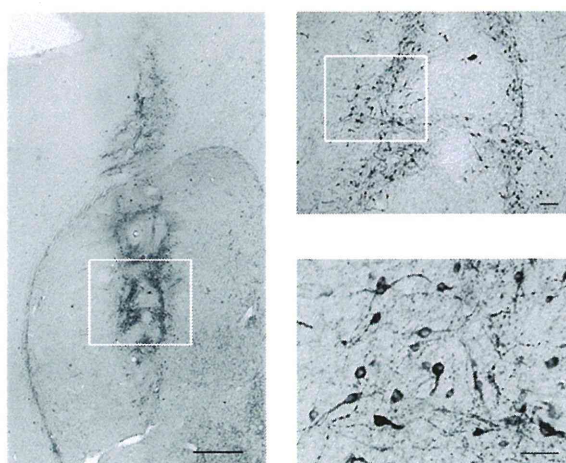
(図2: 移植12ヶ月後の頭部MRI。白く見えているのが生着した移植片。)

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3)。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。1年後の脳切片の免疫染色

ではドーパミン神経細胞(TH陽性細胞)が豊富に生着していることが確認された(図4)。



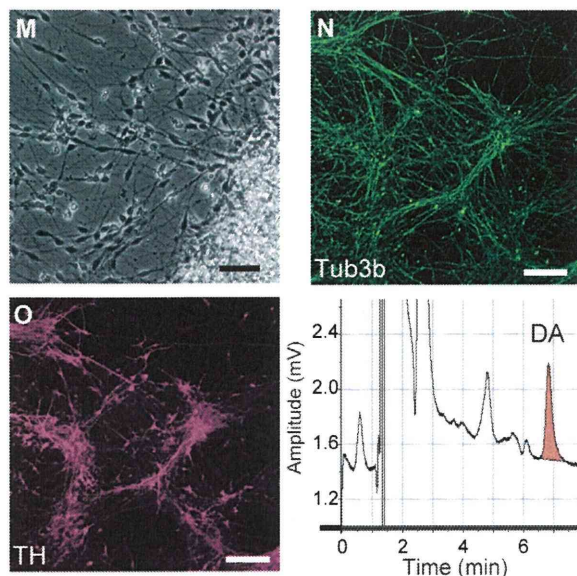
(図3: 移植前後の神経スコア。正常は0点で行くほど重症。)



(図4: 抗TH抗体を用いた脳切片のDAB染色。左図の囲み内を拡大したのが右上図。その中の囲み内を拡大したのが右下図。)

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

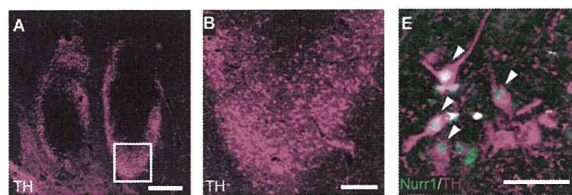
接着培養するとドーパミン神経細胞のマーカー(TH)陽性細胞が多数出現し、HPLCでドーパミンの産生も確認することができた。つまり、フィーダー細胞を用いずに機能的なドーパミン神経細胞に分化しうる神経前駆細胞を効率良く誘導することに成功した(図5)。



(図5: 位相差顕微鏡写真と免疫染色。Tub3bは一般的な神経細胞マーカー。右下はHPLCの結果。)

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にて確認しえた。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(図6)。



(図6: 移植6ヶ月後のサル脳切片の免疫染色。Aの囲み内の拡大がB。Eはさらに拡大した写真。Nurr1(緑色)は中脳ドーパミン神経細胞のマーカー)

#### 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と意義は大きい。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より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<sup>18</sup>F-DOPAのみならず<sup>11</sup>C-DTBZ、<sup>11</sup>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する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、より効果的かつ安全な移植を行うためには、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. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Miyamoto S, Takahashi J : Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J Parkinson's Disease* 2011;1: 395-412 (添付)
- Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Mohamed R, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J : Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2012: in press

### 2. 学会発表

- Morizane A, Takahashi J : Research for stem cell therapy with primate Parkinsonian model ; 第 6 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2011 年 6 月 9 日, 東京
- 高橋 淳 : Challenges towards ES cell therapy for Parkinson's disease ; 第 6 回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2011 年 6 月 10 日, 東京
- Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Yoshikawa T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Sasai Y, Suemori H, Takahashi J.: One-year observation of dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells in primate models of Parkinson's disease. The ISSCR 9<sup>th</sup> annual meeting, June 14-18, 2011. Toronto, Canada

- Doi D, Kikuchi T, Morizane A, Takahashi J.: Sorting and transplantation of dopaminergic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. The ISSCR 9<sup>th</sup> annual meeting, June 14-18, 2011. Toronto, Canada
- Kikuchi T, Morizane A, Okita K, Inoue H, Takahashi J.: Induced pluripotent stem cells derived from Parkinson's disease patient differentiated into midbrain dopaminergic neurons. The ISSCR 9<sup>th</sup> annual meeting, June 14-18, 2011. Toronto, Canada
- Ogura A, Morizane A, Nakajima Y, Miyamoto S, Takahashi J.: Inhibition of Notch Signaling Prevents Human induced Pluripotent Stem Cell-derived Neuronal Progenitors From Undergoing Overgrowth *in vivo*. The ISSCR 9<sup>th</sup> annual meeting, June 14-18, 2011. Toronto, Canada
- 高橋 淳 : パーキンソン病に対する ES, iPS 細胞移植治療の開発 ; 第 26 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会, 2011 年 6 月 25 日, 東京
- 西村周泰、高橋 淳 : iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞移植におけるホスト脳環境の影響 ; 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜
- 森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、吉川達也、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳 : カニクイザルパーキンソン病モデルへのヒト ES 細胞由来ドーパミン神経細胞の移植 ; 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 2011 年 10 月 12-14 日, 横浜
- 土井大輔、森実飛鳥、菊地哲広、吉川達也、宮本享、高橋 淳 : 表面抗原を用いたヒト多能性幹細胞由来のドーパミン神経細胞純化方法の検討 ; 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 2011 年 10 月 12-14 日, 横浜
- 高橋 淳 : ES, iPS 細胞を用いた神経再生医療 ; 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 2011 年 10 月 12-14 日, 横浜

- 高橋 淳：霊長類モデルを用いたパーキンソン病に対する幹細胞移植治療の前臨床研究；第7回霊長類医学フォーラム，2011年11月18日，つくば 該当なし
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植治療；堺市難病支援ネットワーク医療講演会，2011年11月19日，堺 3. その他  
該当なし
- Nishimura K, Takahashi J.: Acute alteration in host brain environment accelerates the maturation and differentiation of grafted iPSC-derived dopaminergic neurons. The 21st CDB Meeting The 1st CDB-Regeneration Biology Study Group meeting “from Regeneration Biology to Regenerative Medicine (I)”. November 24-25, 2011. Kobe, Japan
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する多能性幹細胞移植治療の開発研究ヒト ES/iPS 細胞；産業応用最前線セミナー～細胞治療と創薬スクリーニング～，2011年12月12日，東京
- 高橋 淳：ES, iPSC 細胞を用いた神経再生医療；第3回先進医療フォーラム大阪 2012年1月21日，大阪
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する多能性幹細胞移植研究；第2回神経再生医療研究会 in Sapporo, 2012年2月8日，札幌
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植；医工学フォーラム-2011年度特別学術講演会，2012年2月22日，京都
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞治療のための開発研究；再生医療の実用化に関するニーズ発表会，2012年2月24日，神戸

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

## 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、細胞移植時に起こる免疫拒絶の過程を、炎症を評価する PET プローブを用いることで非侵襲的に捉えることにも成功した。

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。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も移植 1 ヶ月前および移植後 1、3、6 ヶ月に PET 撮像を行った。炎症の評価には、活性化グリア細胞の指標として  $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ 、シクロオキシゲナーゼ（COX）の指標として、我々が独自に開発した  $[^{11}\text{C}]\text{ketoprofen-methyl}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ )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  $[^{18}\text{F}]\text{fluorodopa}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ )、ドパミンの貯蔵能の指標として  $[^{11}\text{C}]\text{dihydrotrabenazine}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ )、ドパミン再取り込み能の指標として  $\text{N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2}\beta\text{-carbo}[^{11}\text{C}]\text{methoxy-3}\beta\text{-(4-methylphenyl)nortropane}$  ( $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ )を用いた。 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA-PET}$  では、末梢での  $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  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にイヤーパーで頭部を固定した後、小動物 PET 装置(microPET Focus220; Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA)で 90 分間撮像した。 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  の解析は小脳を参照領域とし、Patlak Reference Tissue 法を用いた解析により、ドパミンの合成能・貯蔵能の指標である取り込み定数  $K_i$  を算出した。 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$  の解析は小脳を参照領域とし、Ichise の Multilinear Reference Tissue Model (MRTM)法を用いて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、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$  の解析は小脳を参照領域とし、Simplified Reference Tissue Model (SRTM)法

を用いてドパミントランスポーターへの BP を算出した。関心領域の設定は移植前後で 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、同じ時間経過で行動試験も行なった。

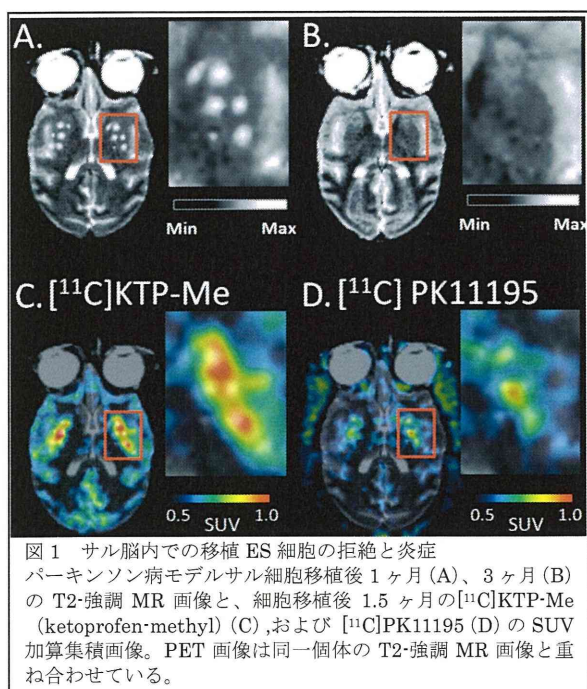
本研究は、理化学研究所神戸研究所の動物実験審査委員会の承認の下、動物実験実施規定に従い倫理的に行なった。

### C. 研究結果

細胞移植の有効性を確保する上で、免疫拒絶反応は重要な課題であり、その過程を評価する目的で  $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$  の PET イメージングを行った。これまで ES 細胞移植を行ったパーキンソン病モデルサル 12 頭の内、1 頭で ES 細胞移植後の拒絶による移植細胞の消失が確認された。この個体では、細胞移植後 1 ヶ月では、T2-強調 MR 画像により ES 細胞が被殻に生着していることが確認されていたが、3 ヶ月後には移植した細胞が検出されなかった。

また、細胞移植後 1.5 ヶ月に行った  $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$  の PET 画像では、移植部位の周辺で高い集積が認められ、拒絶過程で強い炎症反応が起っていたことが確認された (図 1)。

次に、移植後の *in vivo* でのドパミン合成能と症状の改善率との関係性を検討するために、ドパミン合成能を  $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$  の PET イメージングで、症状の改善の程度は行動観察により評価した。培養条件下で 42 日間分化誘導した細胞の移植サルでは移植細胞の生着部位に一致して Ki 値の顕著な増加が観察され、35 日間分化誘導した細胞群よりも Ki 値の増加量 ( $\Delta$  Ki 値) が大きかった。行動スコアの改善率についても ES 細胞を 42 日間分化誘導した群において、35 日間の分化誘導群に比較して高い改善が認められ、行動スコアの改善率と  $\Delta$  Ki 値の間には有意な正の相関が認められた (図 2)。



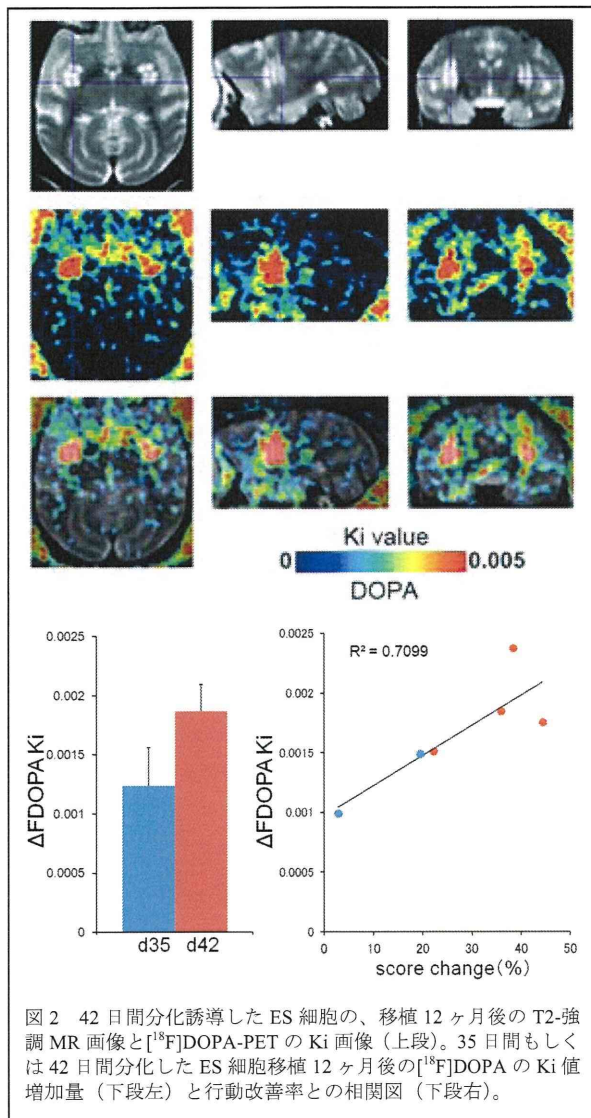


図2 42日間分化誘導したES細胞の、移植12ヶ月後のT2-強調MR画像と $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETのKi画像(上段)。35日間もしくは42日間分化したES細胞移植12ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ のKi値増加量(下段左)と行動改善率との相関図(下段右)。

iPS細胞の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、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 による撮像を行い、4種類の異なる条件で分化させた細胞の移植部位から、それぞれ1ヶ所の関心領域を設定し定量解析を行った。 $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PET の Ki 値の増加は28日間分化誘導させた移植部位 (R-2, R-5) の方が、42日間分化誘導させた移植部位 (L-3, L-5) より顕著であり、同じ分化誘導期間の細胞同士では、Shh/FGF8(+)群 (R-2,

L-3) の方が Shh/FGF8(-)群 (R-5, L-5) より Ki 値が高い傾向にあった。また、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$  の BP 値は L-3 で最も高く、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$  の BP 値も L-3 では移植前よりも増加していることが認められた(図3)。

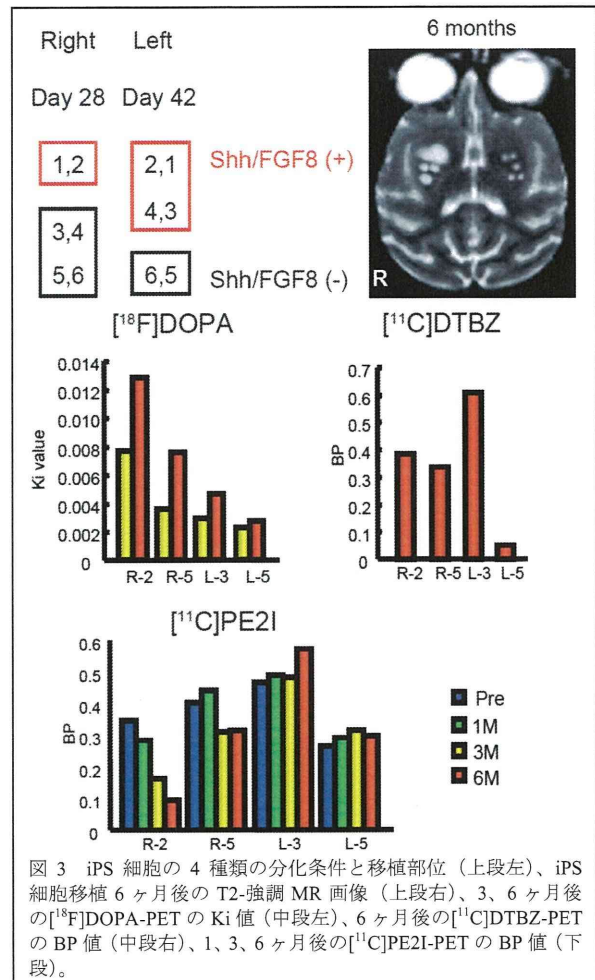


図3 iPS細胞の4種類の分化条件と移植部位(上段左)、iPS細胞移植6ヶ月後のT2-強調MR画像(上段右)、3、6ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PETのKi値(中段左)、6ヶ月後の $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ -PETのBP値(中段右)、1、3、6ヶ月後の $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ -PETのBP値(下段)。

#### D. 考察

本研究でES細胞移植サルの一例において、免疫拒絶反応を起こしたために、移植した細胞が拒絶される症例が認められた。また、その過程において移植部位周辺で活性化グリア細胞における Translocator protein (TSPO) を評価する $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$  と COX を評価する $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$  の集積の増加が認められ、免疫拒絶が起こる状況を非侵襲的に捉えることができた。これにより、免疫拒絶の可能性を逸早く察知でき、免疫抑制剤の使用などの対応が可能となる。免疫拒絶の問題は自己の細胞から樹立が可能な iPS 細胞の

移植により解決できることが期待される。しかし、最近マウスにおいて、自己の iPS 細胞においても免疫拒絶が起こる可能性が報告されている。この免疫拒絶は腫瘍化した iPS 細胞が拒絶された可能性もあるが、現時点で原因が不明であることから、iPS 細胞の移植においても免疫拒絶については注意深く観察していく必要がある。

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 $^{18}\text{F}$ DOPA の  $\Delta\text{Ki}$  値が 35 日間の群よりも高いことが認められた。また、各個体の行動スコアの改善率と $^{18}\text{F}$ 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 $^{18}\text{F}$ DOPA の Ki 値は 3 ヶ月後よりも 6 ヶ月後で増加しており経時的にドパミン合成能が増加していることが確認された。一方、分化誘導期間が 28 日間の細胞の移植部位において、42 日間と比較して顕著な Ki 値の増加が認められているが、腫瘍などの増殖性の強い細胞においても $^{18}\text{F}$ DOPA は取り込まれることもあることから、ドパミン合成能よりも細胞増殖を評価している可能性も考えられる。実際、解剖脳での TH 陽性細胞数は 42 日間分化誘導した移植片で多いことから移植細胞のドパミン産生能に関しての評価は、 $^{18}\text{F}$ DOPA-PET だけでは不十分な点もある。一方、ドパミン貯蔵能の指標である $^{11}\text{C}$ DTBZ やドパミン再取り込み能の指標である $^{11}\text{C}$ PE2I は、42 日間 Shh/FGF8(+)の条件で分化誘導させた細胞の移植部位において最も高く、機能的にもドパミン神経として生体内で働いていることが強く示唆された。これらのことより、PET イメージングを駆使して移植した細胞の機能や安全性を多角的に評価することで移植の条件を的確に評価でき、非臨床試験の研究効率を飛躍的に向上させることができると考えられる。

## E. 結論

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、炎症を、複数の PET プローブで解析を行なうことにより、細胞移植の有効性・安全性を評価する方法を確立した。今後、本評価系に用いた PET プローブの改良や新たな標的分子に対する PET プローブを取り入れることが PET イメージング解析を進展させ、その技術がそのまま臨床で活用できるものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Mohamed R, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J: Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human ESC-Derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells*. 2012. *in press*
- Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Saiki H, Miyamoto S, Takahashi J: Dopaminergic neurons generated from human induced pluripotent stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* 1(4), 395-412: 2011.
- 高橋 淳、尾上浩隆: 再生医療における分子イメージング、*JSMI Report* 5(1), 3-5, 2012.

### 2. 学会発表

- 森実飛鳥、土井大輔、菊地哲広、吉川達也、尾上浩隆、林 拓也、川崎俊之、高橋 淳: カニクイザルパーキンソン病モデルへの ヒト ES 細胞由来ドーパミン神経細胞の移植、第 70 回日本脳神経外科学会総会 (2011.10.12 横浜)

- Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Yoshikawa T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Sasai Y, Suemori H, Takahashi J.: One-year observation of dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells in primate models of Parkinson' s disease., The ISSCR 9th annual meeting (2011.6.16 Toronto, Canada).

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  
(平成23年度)

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
Kikuchi T., Morizane A., Doi D., Onoe H., Hayashi T., Kawasaki T., Saiki H., Miyamoto S., Takahashi J.	Dopaminergic neurons generated from human induced pluripotent stem cells in a primate model of Parkinson's disease.	Journal of Parkinson's Disease	1(4)	395-412	2011
Doi D., Morizane A., Kikuchi T., Onoe H., Hayashi T., Kawasaki T., Motono M., Sasai Y., Saiki H., Gomi M., Yoshikawa T., Hayashi H., Shinoyama M., Mohamed R., Suemori H., Miyamoto S., Takahashi J.	Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human ESC-Derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease.	Stem Cells		<i>in press</i>	2012
高橋 淳、尾上 浩隆	再生医療における分子イメージング	JSMI Report	5(1)	3-5	2012

# Survival of Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Midbrain Dopaminergic Neurons in the Brain of a Primate Model of Parkinson's Disease

Tetsuhiro Kikuchi<sup>a,b,c</sup>, Asuka Morizane<sup>a,b</sup>, Daisuke Doi<sup>a,b,c</sup>, Hiroataka Onoe<sup>d</sup>, Takuya Hayashi<sup>b,d</sup>, Toshiyuki Kawasaki<sup>d</sup>, Hidemoto Saiki<sup>e</sup>, Susumu Miyamoto<sup>c</sup> and Jun Takahashi<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biological Repair, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan*

<sup>b</sup>*Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto, Japan*

<sup>c</sup>*Department of Neurosurgery, Clinical Neuroscience, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan*

<sup>d</sup>*Functional Probe Research Laboratory, RIKEN Center for Molecular Imaging Science, Kobe, Japan*

<sup>e</sup>*Department of Neurology, Kitano Hospital, Osaka, Japan*

**Abstract.** Before induced pluripotent stem cells (iPSCs) can be used to treat neurologic diseases, human iPSC-derived neural cells must be analyzed in the primate brain. In fact, although mouse and human iPSCs have been used to generate dopaminergic (DA) neurons that are beneficial in rat models of Parkinson's disease (PD), human iPSC-derived neural progenitor cells (NPCs) have not been examined in primate brains. Here, we generated NPCs at different stages of predifferentiation using a feeder-free culture method, and grafted them into the brains of a monkey PD model and NOD-SCID mice. Magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), immunocytochemistry, and behavioral analyses revealed that NPCs pretreated with Sonic hedgehog and fibroblast growth factor-8 followed by glial cell–derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, ascorbic acid, and dibutyl cyclic AMP resulted in smaller grafts than those without these treatments, and survived as DA neurons in a monkey brain as long as six months. Thus, for the first time, we describe a feeder-free neural differentiation method from human iPSCs and an evaluation system that can be used to assess monkey PD models.

**Keywords:** Induced pluripotent stem cells, Parkinson's disease, transplantation, dopaminergic neurons, positron emission tomography

## INTRODUCTION

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a promising avenue for cell replacement therapy in neurologic diseases. For instance, mouse and human iPSCs have

been used to generate dopaminergic (DA) neurons that improve symptoms in rat Parkinson's disease (PD) models [1, 2]. For these cells to be used clinically, however, the growth, differentiation, and function of human iPSC-derived neural cells must be evaluated in a primate model. Transplantation of embryonic neural tissues has been shown to relieve parkinsonian symptoms both in animal models and human patients [3–5]. In addition, we and others have transplanted monkey embryonic stem cell–derived neural progenitor cells

\*Correspondence to: Jun Takahashi, M.D., Ph.D., Department of Biological Repair, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Shogoin kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Tel.: 81 75 751 4840; Fax: 81 75 751 4840; E-mail: jbtaka@frontier.kyoto-u.ac.jp.

(NPCs) [6, 7] or human NPCs [8] into the brains of monkey PD models. Human iPSC-derived NPCs have yet to be characterized in a primate brain, however. Furthermore, neuronal differentiation and transplantation methods need to be optimized. In this study, we developed a series of methods to induce human iPSCs to become NPCs using a feeder-free culture method, and grafted NPCs at different stages of predifferentiation into the brain of a monkey PD model. We then examined the growth and DA activity of the grafts using magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), immunocytochemistry, and behavioral analyses.

## MATERIALS AND METHODS

### *Human iPSC culture*

Human iPSCs (253G4) were maintained as previously described [9]. For passage, feeder cells were detached using CTK dissociation solution (0.25% trypsin, 0.1% collagenase IV, 20% KSR, and 1 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS). The detached iPSC clumps were broken into smaller pieces (20–30 cells) by gentle pipetting, and split at 1:3. The cells were used in experiments between passage 20 and 50.

### *Induction of NPCs from human iPSCs*

Human iPSCs were dissociated into single cells using Accumax (Innovative Cell Technologies) and quickly reaggregated in differentiation medium (9000 cells/150 ml/well) in 96-well low cell-adhesion plates (Lipidure-Coat U96 w; Nunc). Differentiation medium contained DMEM/F12 supplemented with 5% KSR, 2 mM glutamine, 0.1 mM nonessential amino acids, and 0.1 mM 2-mercaptoethanol. For the first three days, 50 μM Y-27632 (Wako) [10, 11], 2 μM dorsomorphin, and 10 μM SB-431542 [12] were added to the culture medium. On day 14, iPSC-derived spheres were replated on 6-cm Petri dishes containing neurobasal medium (Gibco) supplemented with B-27 and 2 mM L-glutamine. For the indicated samples, 200 mg/ml Sonic hedgehog (Shh) and 100 mg/ml fibroblast growth factor (FGF)-8 were added on days 14–28. After day 28, the medium was replaced with neurobasal medium supplemented with B-27, 2 mM L-glutamine, 2 ng/ml glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), 10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 1 mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP), and 200 nM ascorbic acid.

### *Quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCRs)*

Total RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen), and reverse transcribed using the Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Quantitative PCRs were carried out with SYBR Green mix (ABI) and the ABI StepOne Plus RT-PCR system. Data was assessed using a standard curve and normalized based on β-actin expression. Primer sequences are shown in supplementary Table 1.

### *Immunocytochemistry*

*In vitro* immunohistochemical analyses were carried out after samples were permeabilized and blocked with 0.3% Triton X-100 and 2.5% donkey serum. Spheres were fixed with 4% paraformaldehyde, frozen, and cut with a cryostat (Leica) at 10-μm thickness. Primary antibodies are shown in supplementary Table 2. Appropriate donkey secondary antibodies conjugated with Alexa 488 or Alexa 594 were used. For nuclear staining, 200 ng/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole was added to the final wash. Immunoreactive cells were visualized using a fluorescence microscope (BZ-9000, Keyence) and a confocal laser-scanning microscope (Fluoview FV1000D, Olympus). For quantification, cells in more than three randomly selected 40× fields were counted from at least three independent cultures. In *in vivo* studies, animals were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. The excised brain was frozen, cut with a microtome at 40-μm thickness, and stained as free-floating sections. In mice, tyrosine hydroxylase (TH)<sup>+</sup> cells and Ki67<sup>+</sup> cells were counted among 3.0 × 10<sup>3</sup> cells in at least five 40× fields for each graft. In the monkey, TH<sup>+</sup> cells were counted in every ninth section throughout the graft using BZ Analyzer II (Keyence), whereas Ki67<sup>+</sup> cells were counted in at least three 40× fields for one tract and 3.0 × 10<sup>4</sup> cells were examined in each graft. Hematoxylin–eosin (H–E) staining was performed according to standard procedures.

### *Animals and cell transplantation*

An adult male cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*; 3 years old) weighing 2.63 kg was obtained from Shin Nippon Biomedical Laboratories (Kagoshima, Japan). The monkey and mice were cared for and handled according to the Guidelines for Animal Experiments of Kyoto University and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute