

201106005B

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～平成23年度 総合研究報告書

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）

（資料1）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---9
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）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----17

III. 研究成果の刊行物・別冊 -----18

I . 総合研究報告

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 細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療を実現化するために、前臨床研究を行った。特に本研究では霊長類モデルを用いた評価系（画像評価、行動評価、組織学的評価）の確立に重点を置いた。ヒト ES, 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に移植したところ、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。画像評価として、移植片サイズの経時的変化の測定には MRI、増殖細胞の同定には 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。行動評価としては、神経症状スケールを用いたスコア評価およびビデオ撮影による自動運動定量化が有用であり、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。組織学的評価では、脳切片の免疫染色を行い、移植 12 ヶ月後でも移植細胞が中脳ドーパミン神経として生着していることが確認された。さらにヒト iPS 細胞を用いた実験では、マウスフィーダー細胞を用いない浮遊培養によるドーパミン神経細胞誘導に成功。神経前駆細胞のカン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が明らかとなった。これらの成果をまとめ、2 本の論文として発表した (Kikuchi et al., J Parkinson's Disease 2011; Doi et al., Stem Cells 2012)。

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）

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。しかし、胎児細胞移植には治療に必要な細胞量を確保するのが困難であるという問題や移植後に不随意運動がみられるという問題があり、ES 細胞や iPS 細胞を利用した細胞移植療法に期待が寄せられている。しかし、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、世界に先駆けてカンクイザル 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、そのためにカン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、霊長類を用いた前臨床試験での評価系の確立を目的として以下の実験を行った。

B. 研究方法

上記の目的を達成するために、特に以下の2点に重点を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、腫瘍形成の有無を継時的に評価する。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 ^{18}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。

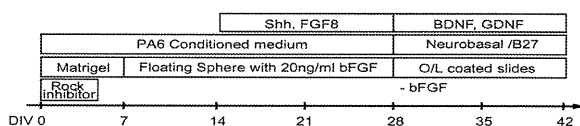
2) 細胞生着の確認と機能解析

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 (^{18}F -DOPA)、トランスポーターリガンド (^{11}C -DTBZ, ^{11}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、さらに神経症状については以下のスケールに基づくスコア評価およびビデオ解析による自動運動定量化を行った。

Neurological scores of MPTP-treated monkeys

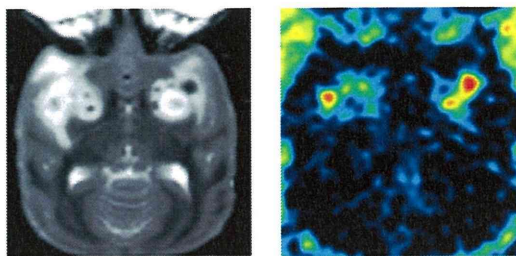
| Behavior | Scores |
|--|---|
| Alertness | Normal, 0; reduced, 1; absent, 2 |
| Head-checking movement | Present, 0; reduced, 1; absent, 2 |
| Eyes | Normal, 0; reduced blinking, 1; eyes closed, 2 |
| Posture | Normal, 0; mildly abnormal, 1; abnormal, 2; grossly abnormal, 3 |
| Balance | Normal, 0; impaired, 1; frequent falling, 2; no movement, 3 |
| Motility, at rest | Normal, 0; mild bradykinesia, 1; bradykinesia, 2; akinesia, 3 |
| Motility, reaction to external stimuli | Normal, 0; mildly reduced, 1; reduced, 2; absent, 3 |
| Walking | Normal, 0; mildly reduced, 1; reduced, 2; no walking, 3 |
| Tremor | Absent, 0; mild/not always, 1; moderate, 2; severe, 3 |

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

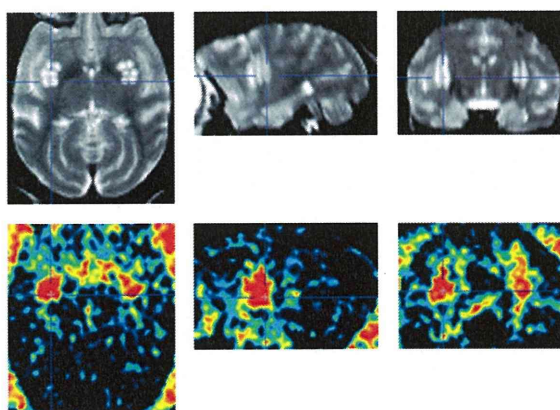
1) 分化誘導日数が短く(14日間)未分化ES細胞が残存している細胞では、免疫不全マウス脳への移植で28日分化誘導細胞と比べると移植片は有意に大きく、サル脳内では9か月にわたってその未分化細胞が増殖し続け腫瘍を形成していた(図2左)。



(図2:左はMRIのT2強調画像。右はFLT-PET画像。

赤い部分が高い取り込みのみられる部分。)

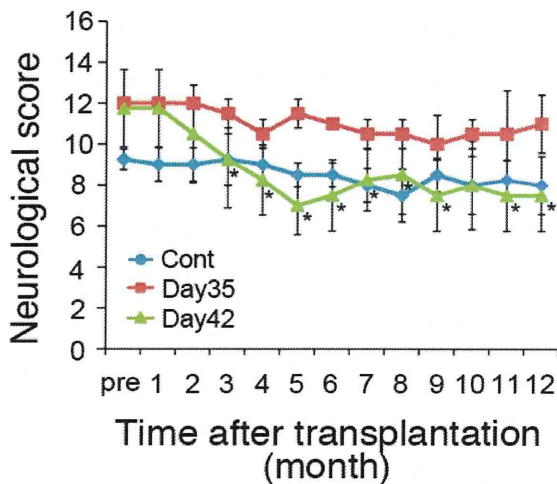
ただし、未分化細胞の集積は一部に認められるものの大半は神経前駆細胞の増殖であり、核の異型性などの悪性所見はみられず、境界は鮮明で周囲脳への浸潤所見も認められなかった。未分化ES細胞が増殖している部分ではFLT-PETにおいてFLTの高い取り込みが観察され(図2右)、脳切片の免疫染色ではOct3/4陽性細胞の集積が認められた。28日分化誘導細胞でもサル脳内の移植片サイズはより小さく、未分化ES細胞は認められなかった。サイトカインを加え35、42日間分化誘導した細胞では未分化ES細胞は残存しておらず最終分裂を終えたドーパミン神経細胞も10-30%混じっている。これらの細胞の移植では腫瘍形成はみられず特に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3上)。



(図3: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。下はFDOPA-PET画像。)

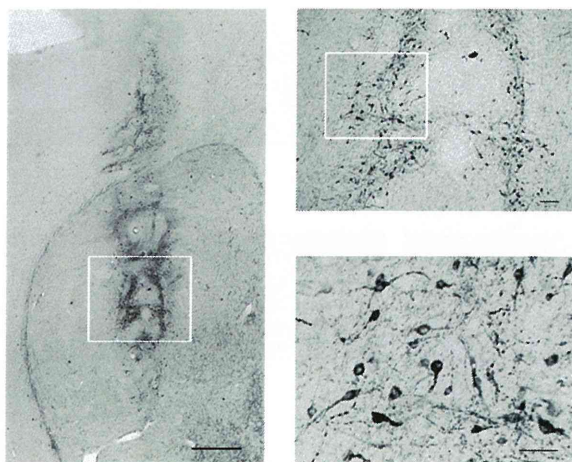
これらのサルでは FDOPA-PET では移植片における FDOPA 取り込みの上昇が確認され (図 3 下)、その取り込み上昇率は行動改善率と相関関係がみられた。

また、神経症状のスコア評価を行うと、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、手術前と比べて有意な行動改善が認められた (図 4)。



(図 4 : 移植前後の神経スコア。正常は 0 点で上に行くほど重症。)

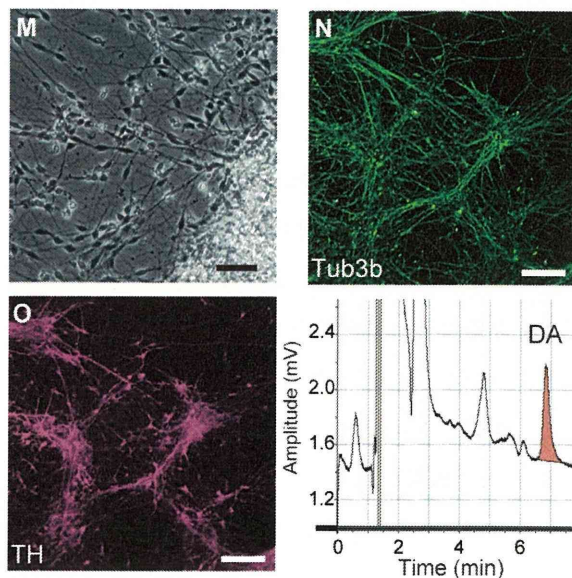
12 ヶ月後の脳切片の免疫染色ではドーパミン神経細胞 (TH 陽性細胞) が豊富に生着していることが確認された (図 5)。



(図 5 : 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。)

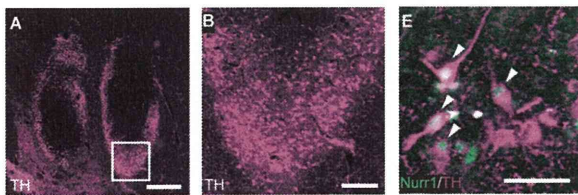
2) まず無血清培地を用いた浮遊細胞系で BMP および TGF β , Activin 阻害剤を加えたところ、神経誘導効率と神経前駆細胞の生存が有意に向上した。浮遊培養系でこれら作用させると神経系細胞マーカーである PSA-NCAM の陽性細胞が 2 週間で 99.8% になった。さらにこの細胞をラミニン/ポリオルニチン上で接着培養するとドーパミン神経細胞のマーカー (TH) 陽性細胞が多数出現し、HPLC でドーパミンの産生も確認することができた。つまり、フィーダー細胞を用いずに機能的なドーパミン神経細胞に分化しうる神経前駆細胞を効率良く誘導することに成功した (図 5)。



(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 ヶ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た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が ¹⁸F-DOPA)、¹¹C-DTBZ、¹¹C-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

一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}F -DOPA のみならず ^{11}C -DTBZ、 ^{11}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重要である。

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。

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., 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。
- 土井大輔、菊地哲広、森実飛鳥、斎木英資、高橋淳：霊長類パーキンソン病モデルに対するヒトES細胞由来移植片の腫瘍源性。第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18日-19日、広島
- Takahashi J：ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease. NeuroStemcell Workshop September 2010 2010.10.26 Mallorca, Spain
- Takahashi, J：ES/iPS Cell Treatment for Parkinson's disease. 10th biennial meeting of APSN symposium 2010.10.17-19 Phuket, Thai
- 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年10月8日、京都
- 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年3月1日、東京
- 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 9th 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 9th 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 9th 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 9th 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
 - 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
 - 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, iPS 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
- 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

(資料 1)

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・有効性を経時的かつ効率的に評価することは、臨床応用を目指す上で重要な課題である。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、移植細胞の生着、分化、炎症、腫瘍化を、ドパミン生合成などの神経伝達、マイクログリアの活性化、チミジンの取り込みなどに特異的な分子プローブを用いた PET イメージングによる画像解析を行ない、非侵襲的な機能評価イメージング法を確立した。

A. 研究目的

人と同じ霊長類に属するマカク属のサルであるカニクイザルのパーキンソン病モデルを用い、細胞移植の生着・機能の評価、安全性の早期診断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ことで研究効率を飛躍的に向上させる。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞を用いた検討の基礎実験として、まず分化過程の異なるヒト 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。さらに、ヒト 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。PET 撮像に用いた分子プローブとしては、移植細胞の生着、ドパミン神経細胞へ

の分化を評価するために、ドパミンの合成能の指標として $[^{18}\text{F}]$ fluorodopa ($[^{18}\text{F}]$ DOPA)、ドパミンの貯蔵能の指標として $[^{11}\text{C}]$ dihydropyridazinone ($[^{11}\text{C}]$ DTBZ)、ドパミン再取り込み能の指標として N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2 β -carbo $[^{11}\text{C}]$ methoxy-3 β -(4-methylphenyl)nortropine ($[^{11}\text{C}]$ PE2I) を用いた。 $[^{18}\text{F}]$ DOPA-PET では、末梢での $[^{18}\text{F}]$ 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。腫瘍化の評価には、細胞増殖の指標としてチミジン誘導体である 3'-deoxy-3' $[^{18}\text{F}]$ fluorothymidine ($[^{18}\text{F}]$ FLT)を用いた。炎症の評価には、活性化グリア細胞の指標として、Translocator protein (TSPO) を特異的に認識する $[^{11}\text{C}]$ PK11195、炎症因子である Prostaglandin 生合成の律速酵素である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 $[^{11}\text{C}]$ ketoprofen-methyl ($[^{11}\text{C}]$ KTP-Me)を用いた。PET 撮像はサルをプロポフォール麻酔下に、イヤバ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。

[¹⁸F]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集積比を算出した。[¹⁸F]DOPA の解析は小脳を参照領域とし、Patlak Reference Tissue 法を用いた解析を行い、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。[¹¹C]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、[¹¹C]PE2I のドパミントランスポーターへの結合能についての解析も、同じく小脳を参照領域として、Simplified Reference Tissue Model (SRTM)法を用いて BP を算出した。関心領域 (ROI, region of interest) 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、および T2 強調画像を用いて行なった。また、経時的な MRI 画像から移植片の体積を算出した。さらに、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

分化過程の異なるヒト ES 細胞として、培養条件の異なる 4 種類 (培養日数 14、28、35、42 日間) の細胞の移植実験を行った。移植細胞の生着と増殖速度を測定するため、MRI の T2 強調画像から移植片の体積と倍加時間を測定した結果、培養条件下で 14 日間分化誘導した ES 細胞移植サルでは、28 日間分化誘導した ES 細胞移植サルよりも移植片の体積が大きいことが確認された (図 1)。

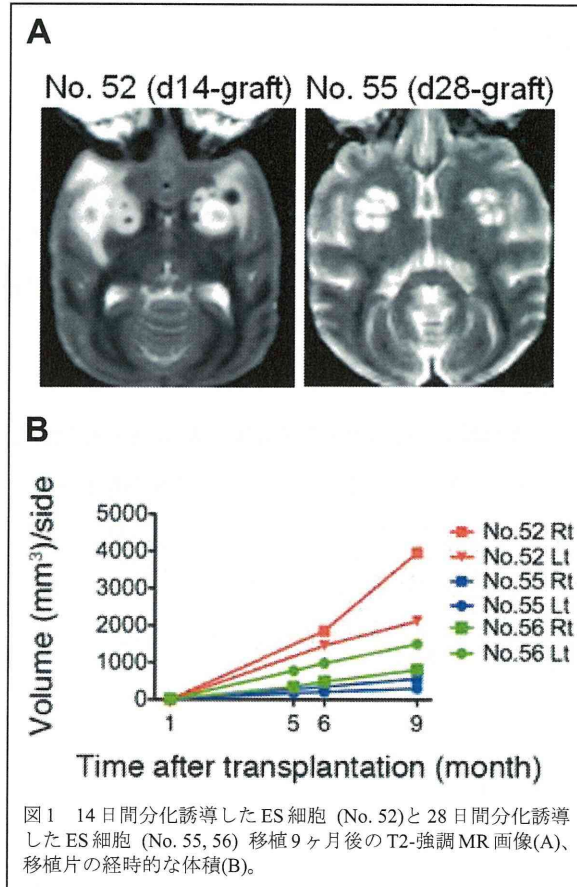


図1 14日間分化誘導したES細胞 (No. 52)と28日間分化誘導したES細胞 (No. 55, 56) 移植9ヶ月後のT2-強調MR画像(A)、移植片の経時的な体積(B)。

また、35日間分化誘導したES細胞においては、12ヶ月まで体積が増大していたが、42日間分化誘導したES細胞においては4頭中3頭が6ヶ月以降で体積の変化がほとんど起こらなかった (図2)。

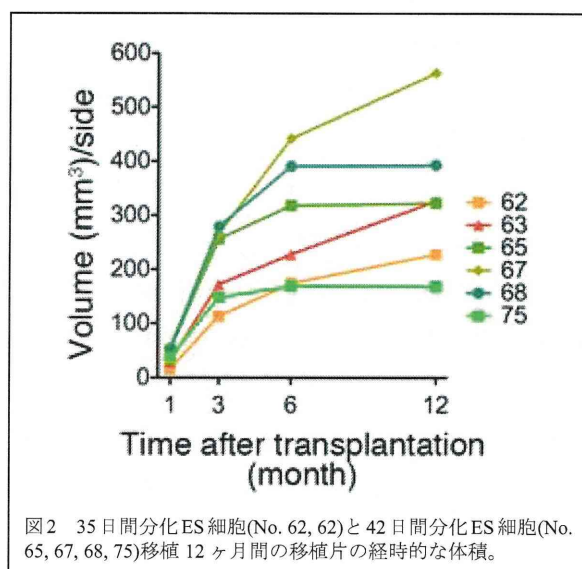


図2 35日間分化ES細胞(No. 62, 62)と42日間分化ES細胞(No. 65, 67, 68, 75)移植12ヶ月間の移植片の経時的な体積。

移植細胞の移植後の体積の増加が腫瘍形成によるか否かを評価するために $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ を用いてPETイメージングを行った。14日間分化誘導をしたES細胞を移植したサルNo. 52の細胞移植9ヶ月後において、細胞移植部位の数か所で顕著に $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 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の取り込みの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、この個体の剖検を行った結果、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細胞を移植したサルNo. 55, 56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 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ の取り込み増加が認められたが、その程度は、最も高い部位でも小脳比で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細胞を移植したサル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 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 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 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 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3)。

細胞移植の有効性を確保する上で、宿主側の免疫活性による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頭においてES細胞移植後に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ず、ドパミン産生能も観察されなかったことから移植細胞が完全に消失していること

が確認された。また、この個体において、細胞移植後1.5ヶ月に行った $[^{11}\text{C}]\text{KTP-Me}$ 、および $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ のPET画像では、移植部位の周辺で高い集積が認められ、拒絶過程で強いマイクログリアの活性化を伴う炎症反応が起こっていたことが確認された(図4)。

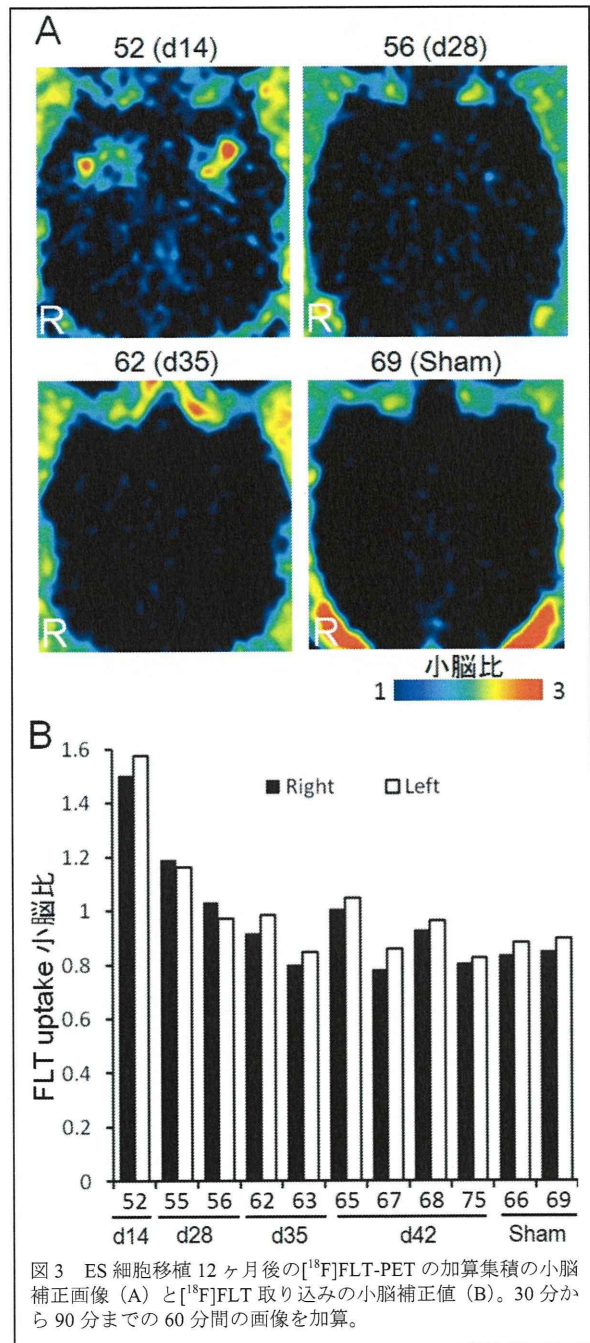
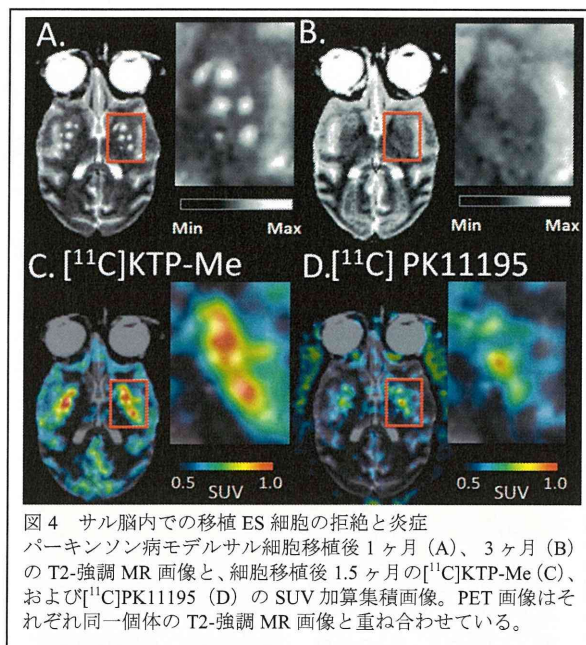
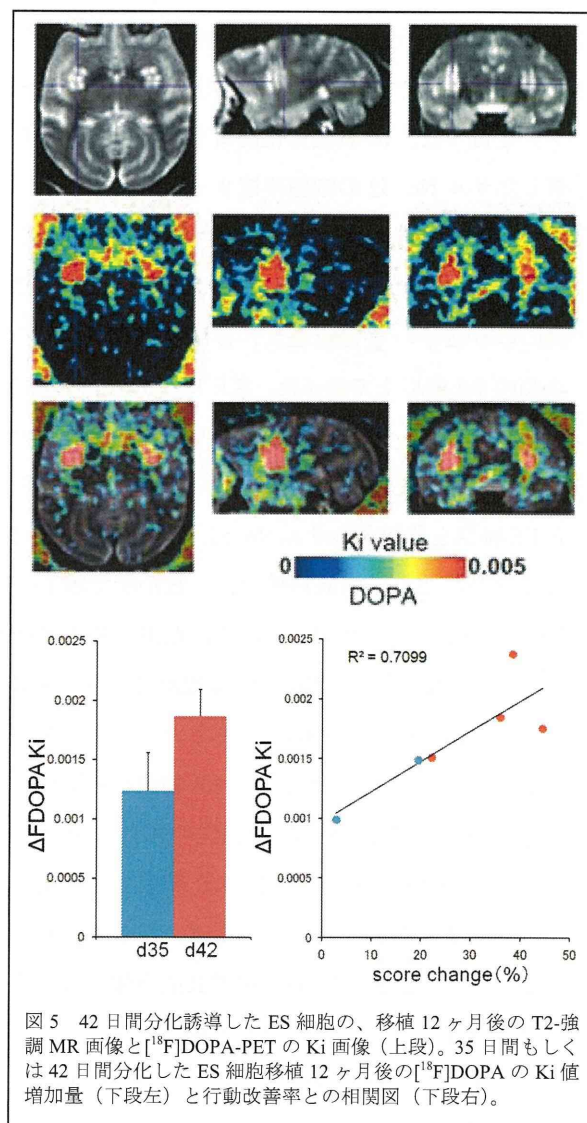


図3 ES細胞移植12ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PETの加算集積の小脳補正画像(A)と $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ 取り込みの小脳補正值(B)。30分から90分までの60分間の画像を加算。



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 $[^{18}\text{F}]$ DOPAのPETイメージングで、症状の改善の程度を行動観察により評価した。42日間分化誘導した細胞の移植サルでは移植細胞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(Δ 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 Δ Ki値の間には有意な正の相関が認められた(図5)。

次にヒトiPS細胞を用いて、ES細胞同様の実験を行った。この実験では、iPS細胞を4種類の異なる条件(Shh/FGF8(+),またはShh/FGF8(-)の各条件で28、42日間分化誘導)で分化誘導させたものを、一個体のパーキンソンモデルサルの線状体のそれぞれ異なるトラックに別々に移植した(図6の左上参照)。移植後6ヶ月間の観察において、移植細胞の生着と移植片の体積の増加は、28日間分化誘導させた移植部位では生着しなかったR-6を除き、42日間分化誘導させた移植片よりも大きいことが確認された。



その中で、28日間Shh/FGF8(+条件)で分化誘導させた移植片が最も体積が大きくなっていったが、その部位でも $[^{18}\text{F}]$ FLTの取り込み増加は認められなかった(図6)。次に、iPS細胞由来ドパミン神経細胞の生着・分化について、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 $[^{18}\text{F}]$ DOPA、シナプス小胞に発現するVMAT2は $[^{11}\text{C}]$ DTBZ、前シナプス発現するDATは $[^{11}\text{C}]$ 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。 $[^{18}\text{F}]$ 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 7)。

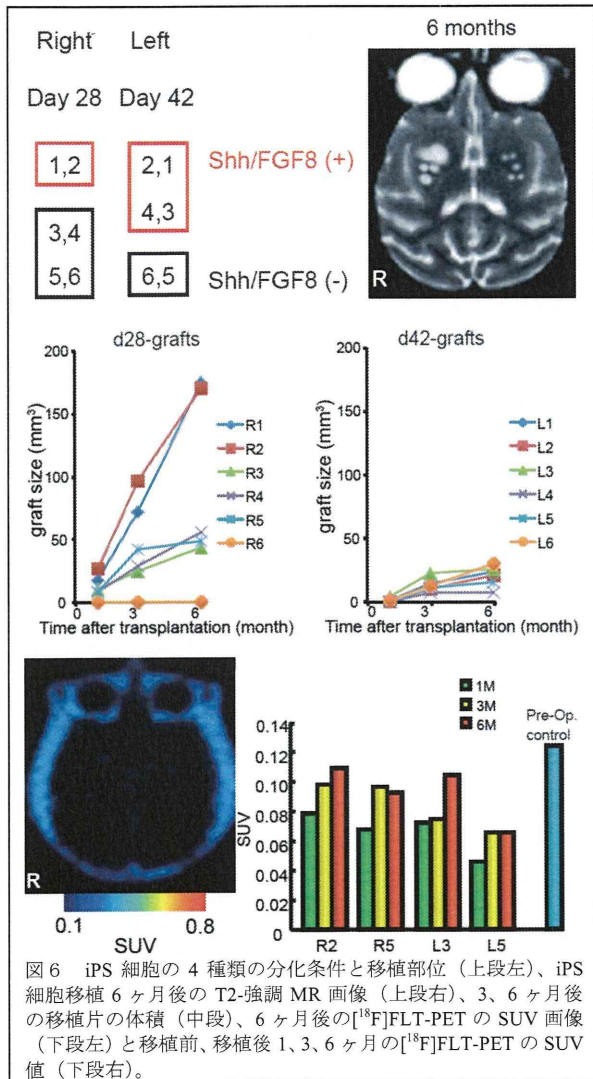


図 6 iPS 細胞の 4 種類分化条件と移植部位 (上段左)、iPS 細胞移植 6 ヶ月後の T2-強調 MR 画像 (上段右)、3、6 ヶ月後の移植片の体積 (中段)、6 ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET の SUV 画像 (下段左) と移植前、移植後 1、3、6 ヶ月の $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET の SUV 値 (下段右)。

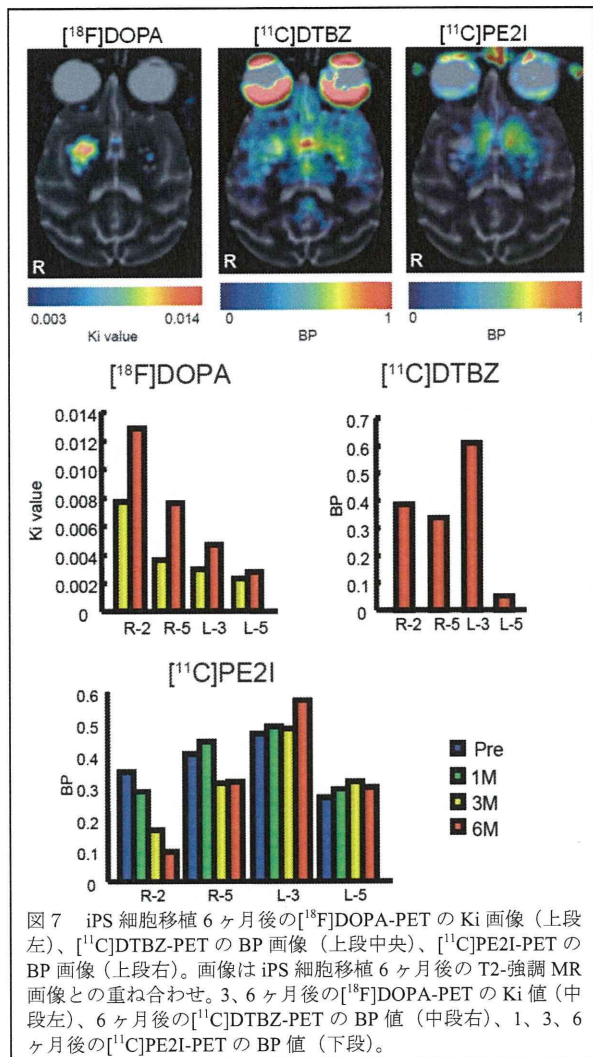


図 7 iPS 細胞移植 6 ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PET の Ki 画像 (上段左)、 $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ -PET の BP 画像 (上段中央)、 $[^{11}\text{C}]\text{PE2I}$ -PET の BP 画像 (上段右)。画像は iPS 細胞移植 6 ヶ月後の T2-強調 MR 画像との重ね合わせ。3、6 ヶ月後の $[^{18}\text{F}]\text{DOPA}$ -PET の Ki 値 (中段左)、6 ヶ月後の $[^{11}\text{C}]\text{DTBZ}$ -PET 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

本研究において、移植細胞の分化誘導期間の違いが移植直後の増殖や生着に対する影響を MR 画像で描出される移植片の体積から算出した結果、分化誘導期間が 14 日間の移植部位では移植片の急激な体積増加が確認された。しかし、これは分化誘導期間を延長し、特に 42 日間分化誘導させた移植部位では、6 ヶ月以降で、ほぼ体積が増加せず一定の体積を保つ事が確認された。したがって、十分に分化誘導することで、移植細胞の移植後の体積増加を制御し、正常な脳組織の損傷を拡大させない移植が可能であると考えられた。 $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET から 14 日間分化誘導した ES 細胞を移植したサル No. 52 の移植後 12 ヶ月

の画像で ^{18}F FLT の取り込みが小脳比で 3 以上と非常に高い値を認めた。しかし、28 日間以上分化誘導した ES 細胞の移植部位では、 ^{18}F FLT の取り込み増加は認められなかった。 ^{18}F FLT 取り込みが著しく高い部位では、その場所に一致して病理学的にも腫瘍化が認められ、 ^{18}F 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。しかし、 ^{18}F FLT 取り込み量がどの範囲以上であれば腫瘍化となるのか、厳密な値については不明であり、今後、病理組織と比較しながら閾値を確定し、より確実で安全な判断基準を作成する必要がある。

細胞移植において腫瘍化の次に問題となってくるのが免疫拒絶であり、本研究でも 1 例ではあるが、移植した細胞が拒絶され、消失した症例が認められた。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}C PK11195 と COX を評価する ^{11}C KTP-Me の集積の増加が認められ、免疫拒絶が起こる過程における強い炎症反応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、免疫抑制剤や抗炎症薬の使用とその量の設定について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。この免疫拒絶は移植後に腫瘍化した 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 細胞の移植を行う場合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}F DOPA の ΔKi 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}F DOPA の ΔKi 値は

有意な強い相関を示したことから、PET イメージングは移植の有効性を判定する指標として、客観的で有用であることが示された。iPS 細胞移植サルにおいても ^{18}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、移植細胞が順調に生着・分化していることが示唆された。しかし、分化誘導期間が 28 日間の細胞の移植部位において、42 日間の細胞と比較して顕著な Ki 値の増加が認められたにもかかわらず、解剖脳での TH 陽性細胞数は 42 日間分化誘導した移植片の方が多く、Ki 値と TH 陽性細胞数との間に矛盾が存在した。このことは、28 日間分化誘導した細胞の一部が、高い DOPA の代謝酵素である芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (aromatic amino acid decarboxylase, AADC) 活性を持つ細胞、または、 ^{18}F DOPA はドパミン神経細胞以外にも、増殖性の強い細胞においても取り込まれることが知られていることから、DOPA に対し高い取り込み能をもつ増殖性細胞に分化した可能性を示しているのかもしれない。本検討では、 ^{18}F FLT-PET や病理所見での移植細胞の腫瘍化は認められなかったが、 ^{18}F DOPA-PET がドパミン合成能以外にも活発な細胞増殖を評価している可能性も考えられる。したがって、移植後のドパミン合成能に関する評価は、 ^{18}F DOPA-PET だけでは不十分な点もあることは否めない。一方、ドパミン貯蔵能の指標である ^{11}C DTBZ や、ドパミン再取り込み能の指標である ^{11}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、複数の PET 分子イメージングを駆使することによって、移植した細胞の機能や安全性を多角的に評価することが移植の条件を的確に評価し、非臨床試験の研究効率を飛躍的に向上させる上で重要であると考えられる。

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、腫瘍化を複数の PET プローブで解析することにより、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 プローブのさらなる改良や、新たな標的分子に対する PET プローブを取り入れることで、移植治療実現のための非臨床試験の研究効率を飛躍的に向上させるとともに、その後の臨床応用にも極めて重要である。

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)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.
- 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*. 2012. in press
- 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、遺伝子医学 MOOK18 創薬研究への分子イメージング応用、206-213 頁、株式会社メディカル ドゥ、2010 年 12 月 25 日
- 川崎俊之、尾上浩隆：分子イメージングと再生医療、先端医療シリーズ 41、臨床医とコメディカルのための最新クリニカル PET、292-296 頁、先端医療技術研究所、2010 年 11 月 30 日
- 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

- 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
- 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、横浜、2011年10月12日
- 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, Toronto, Canada, Jun 16, 2011.

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表