

令和元年5月18日現在

機関番号：34512
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K08267
研究課題名(和文) パーキンソン病に対する細胞移植治療における遺伝学的・薬理的介入の可能性の検討

研究課題名(英文) Study of the potential of genetic and pharmacological intervention in cell transplantation treatment for Parkinson's disease

研究代表者
泉 安彦 (Izumi, Yasuhiko)
神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60456837
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はドパミンニューロンによる線条体神経支配に細胞接着因子であるインテグリン 5¹が関与することを明らかにしたことから、インテグリン 5過剰発現ドパミンニューロンをパーキンソン病患者の線条体に移植すると治療効果の向上が期待される。そこで、インテグリン 5遺伝子をドパミントランスポーター遺伝子にノックインしたマウス胚性幹(ES)細胞を作製した。このノックイン細胞をドパミンニューロンへ分化誘導したところ、インテグリン 5遺伝子の発現が確認できた。また、パーキンソン病モデルマウスにES細胞由来細胞を移植する際に、マイトマイシンC処理した細胞塊として移植すると、腫瘍化は抑制され、生着も確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在の幹細胞由来の細胞移植治療では、安全第一のため外来性遺伝子を排除する方向で進んでいる。しかし、本研究では、移植する細胞の機能を亢進させるための遺伝子導入法を検討した。成果として、細胞移植実験に適したノックインES細胞の作製および分化・移植方法の確立ができたと考える。今後、通常の細胞よりも高機能化した遺伝子導入細胞を移植することの有用性を示せば、パーキンソン病への細胞移植にとどまらず、将来の細胞移植治療の選択肢を広げることになると予想される。

研究成果の概要(英文)：We have previously clarified that the cell adhesion factor, integrin 5¹, is involved in dopaminergic innervation of striatal neurons. Therefore, transplantation of integrin 5-overexpressing dopamine neurons into the striatum of patients with Parkinson's disease is expected to improve the therapeutic effect. In this study, we prepared mouse embryonic stem (ES) cells in which the integrin 5 gene was knocked in to the dopamine transporter gene. When the knock-in cells were differentiated into dopamine neurons, the expression of the integrin 5 gene was observed. In addition, the ES cell-derived cells were transplanted into Parkinson's disease model mice. When mitomycin C-treated cells were transplanted as cell aggregation, tumorigenesis was suppressed and engraftment was achieved.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ノックイン ゲノム編集 細胞移植 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS (人工多能性幹) 細胞が樹立され、再生医療への応用が期待されている。黒質-線条体系ドパミンニューロン変性を主徴とするパーキンソン病においても、iPS 細胞を用いた臨床応用に向けた研究が進んでいる。ヒト iPS 細胞から分化させたドパミン神経前駆細胞を患者の線条体に細胞移植し、ドパミン欠乏を補充するストラテジーである。現状、安全第一のため外来性遺伝子を排除した細胞移植が試みられており、安全性や品質管理に関する課題が克服されつつある。しかし、がん化リスクや患者への負担の軽減のため、より少数の細胞を移植することが望ましいと考えられる。少ない移植細胞数でも高い治療効果が上げるために、通常の細胞よりも高機能化した細胞を移植することが次世代型治療に向けたステップアップとして求められる。

これまでに我々は、ドパミンニューロンによる線条体神経支配に細胞接着因子であるインテグリン 5 1 が関与することを報告した (Sci Rep. 2017;7:42111)。したがって、インテグリン

5 を過剰発現したドパミンニューロンを移植する治療効果が向上すると考えられる。そこで、インテグリン 5 過剰発現ドパミンニューロンを作製するため、恒常発現型プロモーターを用いたインテグリン 5 過剰発現 ES 細胞をドパミンニューロンに分化させたところ、ニューロンへの分化効率の低下が見られた。これはインテグリンシグナルが ES 細胞を中胚葉への分化を促進すること (Development, 2013) に由来すると考えられる。

2. 研究の目的

インテグリン 5 を過剰発現したドパミンニューロンを効率よく作製するために、ES 細胞からの分化誘導初期にインテグリンシグナルを働かせないことが重要であると考えられる。本研究では、ドパミンニューロンに分化後にインテグリン 5 を発現するマウス ES 細胞を作製することを目的とした。加えて、細胞移植実験に向けた分化方法および移植方法の最適化を行った。

3. 研究の方法

細胞培養: マウス ES 細胞は 129/Ola マウス由来 EB5 細胞株を用いた。未分化状態は GMEM (1 mM NEAA、1 mM pyruvate、0.1 mM 2-mercaptoethanol、5% KSR、1% FBS、20 μ g/ml blasticidin、2x10³ unit/ml LIF) 中で維持した。

遺伝子導入ベクターの作製: PCR 法で増幅した DNA 断片を In-Fusion® 反応で結合させることでプラスミドベクターを作製した。

遺伝子導入: 制限酵素処理し直鎖状にしたベクターを 2x10⁶ cells の EB5 細胞にエレクトロポレーションすることで遺伝子導入した。抗生物質による選別を行い、生存したコロニーを単離することでクローンを作製した。

SDIA 法による分化誘導: ES 細胞からドパミンニューロンへの分化には stromal cell-derived inducing activity (SDIA) 法を用いた。マウス骨髄由来細胞である PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、GMEM (1 mM NEAA、1 mM pyruvate、0.1 mM 2-mercaptoethanol、10% KSR) 中で 14 日間維持した。

SFEBq 法による分化誘導: ES 細胞からドパミンニューロンへの分化には無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) を用いた。低吸着 96well プレート中で、分化用培地を用いて 14 日間維持した。

分化誘導後 ES 細胞の再播種: 分化誘導の細胞をディスペルゼ処理により単細胞化した。それらをラット胎仔由来初代培養線条体細胞上に再播種した。

4. 研究成果

まず始めに、ドパミンニューロン分化後に発現する tyrosine hydroxylase (TH) プロモーターを用い、誘導型インテグリン 5 過剰発現 ES 細胞の作製を試みた。TH プロモーターの下流にインテグリン 5 遺伝子を組込んだベクターを ES 細胞に導入し、SDIA 法により分化誘導した。導入直後は遺伝子の発現が確認されたが、その後維持を続けるうちに再度分化誘導を行っても遺伝子の発現は見られなくなった。これらの結果から、TH プロモーターを用いたベクターの ES 細胞へのランダムインテグレートでは、ES 細胞の強い発現抑制機構の働きにより導入遺伝子のサイレンシングが起こったことが示唆される。

そこで次に、ランダムインテグレートではなく、目的位置に遺伝子導入できるゲノム編集技術を用いた。Dopamine transporter (DAT) 遺伝子にインテグリン 5 遺伝子をノックインできるベクターを作製し、CRISPER/Cas9 とともに ES 細胞に遺伝子導入することにした。また、DAT の機能を損なわないためにヘテロノックイン細胞の作製を試みた。6.5 kbp の挿入配列とホモロジーアームを含むドナーベクターを CRISPER/Cas9 遺伝子とともにマウス胚性幹 (ES) 細胞にエレクトロポレーション法により導入した。約 0.8 kbp のホモロジーアームではノックイン細胞が得られず、ホモロジーアームを約 2 kbp にすることでヘテロノックイン細胞を得た。ヘテロノックインされた ES 細胞のゲノムの塩基配列を解析したところ、wild type アレルに変異が見られた。この結果は二個の対立遺伝子とも Cas9 により切断された後、片方はドナーベクターにより相同組み換えが起こったが、残る対立遺伝子は非相同性末端結合により修復されたことを示唆している。そこで CRISPER/Cas9 遺伝子ベクターの導入量を減少させ、wild type 配列を含むドナーベクターを追加してエレクトロポレーションすることで、wild type アレルに変異

のないヘテロノックインした ES 細胞の作製に成功した。このヘテロノックイン ES 細胞を SDIA 法により神経分化させることでドパミンニューロンにおいて導入遺伝子の発現が確認された。

細胞移植には、フィーダー細胞を必要としない分化方法が適している。ドパミンニューロンへの分化方法を、細胞塊を形成する SFEBq 法に変更し、さらに SFEBq 法を改変することで、ノックインにより導入した遺伝子発現を確認することができた。インテグリン 5 遺伝子を恒常的に発現させた ES 細胞では神経分化効率が低下したのに対し、DAT 遺伝子へのノックイン ES 細胞を SFEBq 法で分化させても神経分化効率に影響を与えなかった。

最後に、細胞移植に向けた移植方法について検討した。パーキンソン病モデルマウスに ES 細胞由来ドパミン神経細胞を単細胞にして移植すると、パーキンソン病様症状は改善したが、移植細胞の腫瘍化が見られた。移植細胞を抗腫瘍薬のマイトマイシン C を処理することで腫瘍化は抑制されたが、移植 8 週目での移植細胞の生存はほぼ確認できなかった。一方、マイトマイシン C 処理した ES 細胞由来ドパミン神経細胞を細胞塊として移植すると、腫瘍化は抑制され、移植 8 週目での移植細胞の生存も確認できた。

以上の結果より、細胞移植実験に使用可能なノックイン ES 細胞の作製、分化方法および移植方法を確立できたと考えられる。今後、インテグリン 5 を過剰発現したドパミンニューロンを移植すると治療効果が向上するかを検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

Izumi Y, Wakita S, Kanbara C, Nakai T, Akaike A, Kume T. Integrin $\alpha 5\beta 1$ expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Sci Rep*. 2017;7:42111. doi: 10.1038/srep42111. 査読有

[雑誌論文](計 10 件)

Ikeguchi S, Izumi Y, Kitamura N, Kishino S, Ogawa J, Akaike A, Kume T. Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation. *J Pharmacol Sci*. 2018;138:9-15. doi: 10.1016/j.jphs.2018.06.015. 査読有

Izumi Y, Kataoka H, Inose Y, Akaike A, Koyama Y, Kume T. Neuroprotective effect of an Nrf2-ARE activator identified from a chemical library on dopaminergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 2018;818:470-479. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.11.023. 査読有

Okuda M, Fujita Y, Hijikuro I, Wada M, Uemura T, Kobayashi Y, Waku T, Tanaka N, Nishimoto T, Izumi Y, Kume T, Akaike A, Takahashi T, Sugimoto H. PE859, A Novel Curcumin Derivative, Inhibits Amyloid- β and Tau Aggregation, and Ameliorates Cognitive Dysfunction in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8. *J Alzheimers Dis*. 2017;59:313-328. doi: 10.3233/JAD-161017. 査読有

Makitani K, Nakagawa S, Izumi Y, Akaike A, Kume T. Inhibitory effect of donepezil on bradykinin-induced increase in the intracellular calcium concentration in cultured cortical astrocytes. *J Pharmacol Sci*. 2017;134:37-44. doi: 10.1016/j.jphs.2017.03.008.

Kawahata I, Lai Y, Morita J, Kato S, Ohtaku S, Tomioka Y, Tabuchi A, Tsuda M, Sumi-Ichinose C, Kondo K, Izumi Y, Kume T, Akaike A, Ohashi K, Mizuno K, Hasegawa K, Ichinose H, Kobayashi K, Yamakuni T. V-1/CP complex formation is required for genetic co-regulation of adult nigrostriatal dopaminergic function via the RHO/MAL/SRF pathway in vitro and in vivo. *J Neurol Sci*. 2017;381:359-360. doi: 10.1016/j.jns.2017.08.1021 査読有

Masaki Y, Izumi Y, Matsumura A, Akaike A, Kume T. Protective effect of Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease model. *Eur J Pharmacol*. 2017;798:26-34. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.005. 査読有

Izumi Y, Wakita S, Kanbara C, Nakai T, Akaike A, Kume T. Integrin $\alpha 5\beta 1$ expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Sci Rep*. 2017;7:42111. doi: 10.1038/srep42111. 査読有

Izumi Y, Kondo N, Takahashi R, Akaike A, Kume T. Reduction of Immunoreactivity Against the C-Terminal Region of the Intracellular α -Synuclein by Exogenous α -Synuclein Aggregates: Possibility of Conformational Changes. *J Parkinsons Dis*. 2016;6:569-579. doi: 10.3233/JPD-160835. 査読有

Kume T, Suenaga A, Izumi Y, Akaike A. Protective Effect of Dimethyl Fumarate on an Oxidative Stress Model Induced by Sodium Nitroprusside in Mice. *Biol Pharm Bull*. 2016;39:1055-1059. doi: 10.1248/bpb.b16-00134. 査読有

Furumoto H, Nanthirudjanar T, Kume T, Izumi Y, Park SB, Kitamura N, Kishino S, Ogawa J, Hirata T, Sugawara T. 10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by a gut lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* is cytoprotective against oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;296:1-9. doi: 10.1016/j.taap.2016.02.012. 査読有

〔学会発表〕(計 34 件)

1. 八巻 耕也, 井上 聖太, 寺師 匡人, 小椋 詩織, 稲垣 佑亮, 中 成利, 中垣 友子, 江藤 忠洋, 金 容必, 泉 安彦, 小山 豊 Src family kinase 阻害薬 saracatinib の抗アレルギー作用 日本薬学会第 139 年会 2019 年
2. 高良 香葉子, 高鳥 悠記, 高鳥 小波, 中西 涼介, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 宮坂 知宏, 久米 利明, 土田 勝晴 低温負荷による脳内タウの過剰リン酸化に対するドネペジルの作用 日本薬学会第 139 年会 2019 年
3. 三羽 伸明, 村上 一馬, 入江 一浩, 泉 安彦, 久米 利明 生体内でのルテオリン代謝物の抽出と A の凝集および神経毒性への作用解析 日本薬学会第 139 年会 2019 年
4. 泉 安彦, 木下 慎一, 福澤 萌香, 西さこ 和馬, 一村 涼夏, 八巻 耕也, 久米 利明, 小山 豊 CRISPR/Cas9 システムを用いた DAT 遺伝子へのインテグリン 5 遺伝子ヘテロノックインマウス ES 細胞の作製 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年
5. 亀井 優一, 泉 安彦, 丹羽 健太, 小山 豊, 金子 周司, 久米 利明 炎症性ミクログリア誘発ドパミン神経細胞死に対するニコチン性アセチルコリン受容体リガンドの異なる保護作用機序 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年
6. 中西 涼介, 高鳥 悠記, 高良 香葉子, 高鳥 小波, 土田 勝晴, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 宮坂 知宏, 久米 利明 ドネペジルはインビゴおよびインビトロにおいて低温処置によりタウのリン酸化を減少する 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年
7. 川地 隆太, 三原 憲一, 徳田 英昭, 泉 安彦, 久米 利明 高麗人参に含まれる Nrf2 - ARE 経路活性化物質の抽出 第 92 回日本薬理学会年会 2019 年
8. 有福 萌波, 泉 安彦, 猪瀬 由莉, 堀内 奈緒子, 立本 愛, 小山 豊, 金子 周司, 久米 利明 ミクログリアにおける Nrf2-ARE 経路活性化物質 TPNA10168 の抗炎症作用 第 134 回日本薬理学会近畿部会 2018 年
9. 富井 祐里, 高鳥 悠記, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 久米 利明, 土田 勝晴 培養ヒト表皮細胞への UVA 傷害に対する DDC の作用 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2018 2018 年
10. 木下 慎一, 泉 安彦, 福澤 萌香, 西畔 和馬, 一村 涼夏, 小山 豊, 金子 周司, 久米 利明 CRISPR/Cas9 システムを用いた DAT 遺伝子へのインテグリン 5 遺伝子ヘテロノックインマウス ES 細胞の作製 第 41 回日本神経科学大会 2018 年
11. Inose Y, Izumi Y, Kataoka H, Akaike A, Koyama Y, Kume T. Protective effect of an Nrf2-ARE activator identified from a chemical library on 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) 2018
12. Takeda Y, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A, Kume T, Tsuchida K. Effects of an Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on ear swelling in a mouse contact hypersensitivity model. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) 2018
13. Matsumoto M, Sawahata M, Oda K, Miyamoto M, Izumi Y, Kume T. Study on pharmacological validity of brain ischemia-reperfusion model using zebrafish. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) Jul 5, 2018 (Kyoto)
14. Izumi Y. (招待) Establishment of a novel evaluation system for dopaminergic axonal outgrowth and its regulatory factor. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) 2018
15. Ikeguchi S, Izumi Y, Kishino S, Ogawa J, Akaike A, Kume T. Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites on BV-2 microglial cell activation. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) Jul 2, 2018 (Kyoto)
16. 松本 真実, 澤幡 雅仁, 小田 果奈, 宮本 萌里, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 久米 利明 ゼブラフィッシュへの低酸素負荷による新規脳虚血モデルの作出 第 133 回日本薬理学会近畿部会 2018 年
17. 高鳥 悠記, 中川 翔太, 木全 璃子, 名尾 洋亮, 泉 安彦, 土田 勝晴, 赤池 昭紀, 久米 利明 ドネペジルは細胞内輸送制御分子 SNX33 の発現量を増大して A 産生を抑制する 日本薬学会第 138 年会 2018 年
18. 丹羽 健太, 泉 安彦, 有福 萌波, 亀井 優一, 八巻 耕也, 小山 豊, 赤池 昭紀, 久米 利明 7 ニコチン性アセチルコリン受容体の陽性アロステリック修飾薬によるミクログリア活性化抑制を介したドパミン神経保護作用 日本薬学会第 138 年会 2018 年
19. 八巻 耕也, 井上 聖太, 寺師 匡人, 泉 安彦, 江藤 忠洋, 金 容必, 小山 豊 皮膚への免疫複合体の斑点状の分布を指標とした IgG 依存性アレルギーモデル (G-ASDIS) の確立とそれを利用した抗アレルギー物質の探索 日本薬学会第 138 年会 2018 年
20. 中川 翔太, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 久米 利明 アストロサイト由来 CCL6 による培養大脳皮質ニューロンの保護作用 第 132 回日本薬理学会近畿部会 2017 年
21. 泉 安彦, 片岡 春恵, 赤池 昭紀, 久米 利明 チョロギからの Nrf2-ARE 経路活性化物

- 質の単離・同定 生体機能と創薬シンポジウム 2017 2017 年
22. 竹田 結花、高鳥 悠記、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴 慢性接触皮膚炎モデルマウスにおける耳介の肥厚に対するシソ由来カルコン DDC の作用 生体機能と創薬シンポジウム 2017 2017 年
 23. 泉 安彦、片岡 春恵、赤池 昭紀、久米 利明 チョロギからの Nrf2-ARE 経路活性化物質の単離・同定 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 2017 年
 24. 竹田 結花、高鳥 悠記、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴 青シソ由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質のマウスにおける耳介の肥厚への作用 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 2017 年
 25. 池口 詩織、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明 腸内細菌により産生される脂肪酸のミクログリア活性化に対する抑制作用 第 131 回日本薬理学会近畿部会 2017 年
 26. 泉 安彦、赤池昭紀、久米利明 パーキンソン病における移植治療効果向上を目指したドパミン神経突起伸長の試み 日本薬学会第 137 年会 2017 年
 27. 久米利明、泉 安彦、赤池昭紀 ゼブラフィッシュを用いた脳疾患発症機能の解析 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年
 28. 泉 安彦、赤池昭紀、久米利明 食品からの Nrf2-ARE 経路活性化物質の探索およびその神経保護作用 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年
 29. 正木 雄太、泉 安彦、松村 敦子、赤池 昭紀、久米 利明 6-Hydroxydopamine 毒性に対するシソ由来カルコンの中脳ドパミン神経保護作用における heme oxygenase-1 の関与 第 130 回日本薬理学会近畿部会 2016 年
 30. 澤幡 雅仁、小田 果奈、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明 ゼブラフィッシュ脳梗塞モデルにおける中枢神経系細胞の薬効評価系の構築 第 2 回ゼブラフィッシュ創薬研究会 2016 年
 31. 中川 翔太、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明 培養大脳皮質アストロサイト由来 CCL6 によるニューロン保護作用 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016 2016 年
 32. Kume T, Sawahata M, Miyamoto M, Kawamoto T, Izumi Y, Akaike A. Zebrafish brain ischemia-reperfusion model induces neuronal death and glial activation. 第 22 回小型魚類研究会 2016 年
 33. Izumi Y, Niwa K, Akaike A, Kume T. Positive allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor suppress microglial activation. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年
 34. 泉 安彦、片岡 春恵、猪瀬 由莉、赤池 昭紀、久米 利明 化合物ライブラリーから見出した Nrf2-ARE 経路活性化物質の細胞保護作用機序の解明 第 129 回日本薬理学会近畿部会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

https://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/research_activities/introduction/004357.html

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/170208_2.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木下 慎一、福澤 萌香、猪瀬 由莉、山本 彩加、一村 涼夏、西畔 和馬

ローマ字氏名：Shinichi Kinoshita, Moeka Fukuzawa, Yuri Inose, Ayaka Yamamoto, Suzuka Ichimura, Kazuma Nishisako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。