

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790851

研究課題名(和文)

患者 iPS 細胞より分化したドーパミンニューロンの純化と機能の解析

研究課題名(英文)

Isolation and analysis of dopamine neurons derived from patient iPS cells

研究代表者

吉崎 崇仁 (YOSHIZAKI TAKAHITO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60383775

## 研究成果の概要(和文)：

ヒト iPS 細胞から分化させたドーパミンニューロンの表面にはアンギオテンシン受容体様タンパク 1 (Agtr1) やインターロイキン 1 受容体 1 (IL1R1) が発現していることが確認された。それぞれのリガンドである Apelin やインターロイキン (IL-1 $\beta$ ) をヒト iPS 細胞からの分化系へ投与するとドーパミンニューロンが増加することがわかった。また、これらのニューロンはドーパミンニューロンの神経毒である 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) の刺激にも耐性を示した。

## 研究成果の概要(英文)：

Dopamine neurons derived from human iPS cells were investigated. We confirmed that they have Angiotensin receptor-like 1 (Agtr1) and Interleukin-1 receptor 1 (IL1R1) on the surface of dopamine neurons derived from human iPS cells. During the differentiation from human iPS cells, administration of Apelin or Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), which are the ligands of those surface markers, increased the numbers of dopaminergic neurons. Those neurons showed less vulnerability to toxic 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 総 計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：パーキンソン病、ドーパミンニューロン

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：移植・再生医学、脳神経疾患、細胞・組織、パーキンソン病、iPS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は神経内科学の領域でも罹患率の高い疾患である。パーキンソン病の主

兆候は、中脳黒質のドーパミンニューロンの変性・脱落が原因であると考えられている。この細胞群は通常では分裂・再生することが

できない。そこで 1983 年に初めてパーキンソン病患者への中絶胎児の中脳腹側部の移植が行われて 15 年以上経過しているが、今まで移植治療を受けた患者では各兆候に改善が見られ、患者によっては薬物投与が不要になった症例も存在している。しかし、中絶胎児を用いるため、実際の臨床における一般的な治療法として確立するには障害がある。

iPS 細胞はこの問題を解決できる細胞群として期待されている。つまり、未分化な細胞群であり、必要なドーパミンニューロンのソースとして可能性が考えられたからである。実際 iPS 細胞から得られたドーパミンニューロンがパーキンソン病モデルマウスに移植され機能を発揮することが確認されている。

しかし、iPS 細胞の培養系はドーパミンニューロン以外の細胞の混入が多く、実際の移植医療へ応用するには障害があると考えられた。実際に、分化させても全体の 30% 程度しかドーパミンニューロンを生成できず、収量を増やす方法の模索がなされている。一方で、なんらかの方法で不要な細胞を取り除く必要性があり、これら両方の問題を解決する戦略が重要となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞から分化させて得られるドーパミンニューロンの表面に発現している抗原を同定することを第一目標とした。

われわれは、マウスの中脳黒質および中脳被蓋野に発現している mRNA の差異を検討することとした。マイクロアレイを用いてそれぞれの細胞群の mRNA の差異を測定した。ここから、マウス中脳黒質により強く発現しているタンパクのプロファイルを作成した。これらには、表面抗原だけでなく、RNA 結合タンパクやサイクリン関連遺伝子も見られた

が、変化が強いタンパクは細胞内シグナルに関連するものが多かった。

マウス中脳黒質細胞に発現しているタンパクのプロファイルのなかから、表面抗原と考えられるタンパクについてリストアップし、これらのヒトホモログがヒト iPS 細胞から分化させたドーパミンニューロンの表面に発現しているかどうかをチェックする。

次に、これらの結果に基づいて、それぞれに対応する抗体を用いて、細胞を分取することができるかどうかチェックする。

一方で、これらの抗原の結果から表面抗原に対応するリガンドを投与することによって、必要な細胞群が増減するか検討することとした。このようにして、表面抗原—リガンドの対応関係をつかって、必要な細胞群をより効率よく生み出し、かつ収率の高い細胞分取方法を確立することにより、パーキンソン病患者への臨床応用に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

今までの研究ではマウス中脳黒質ドーパミンニューロンの表面に Agtr11 (アンギオテンシン受容体様タンパク 1) や IL1R1 (インターロイキン 1 受容体 1) などの表面抗原が発現していることを確認している。実際、中脳黒質細胞とその他の細胞群間のマイクロアレイの結果では、それぞれ 5.4 倍および 2.8 倍の差異をもって発現量がことなっていることを確認している。

そこで、ヒト iPS 細胞を、neurosphere 法を介してドーパミンニューロンへ分化させ、まず Agtr11 や IL1R1 の発現がなされているかどうか検討する。

次に得られた細胞群を Agtr11 や IL1R1 の表面抗原に対する抗体で染色し、セルソーターなどを用いて必要な細胞群のみを取り出

せるかどうか検討する。

また、ドーパミンニューロンの分化段階でそれぞれのリガンドである、Apelin や IL-1 $\beta$ を投与することにより、ドーパミンニューロン数に影響を及ぼすかどうか検討する。

さらには、神経毒である、1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)を用いてドーパミンニューロンに変性刺激を加えることにより、どの程度得られた細胞群が神経毒への耐性を獲得できているかどうかチェックすることとした。

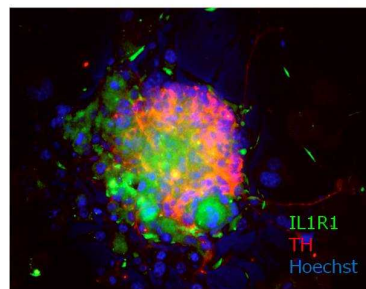
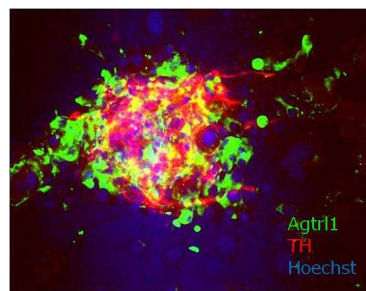
#### 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞から分化したドーパミンニューロンに Agtr11 や IL1R1 などの表面抗原が発現していることを本研究では確認した。その他数種類のタンパクについても検討したが、Agtr11 や IL1R1 ほどドーパミンニューロンの表面に発現しているものはみられなかった。

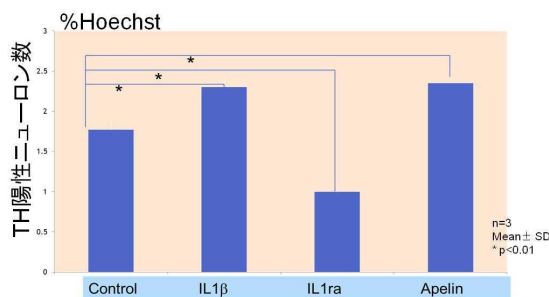
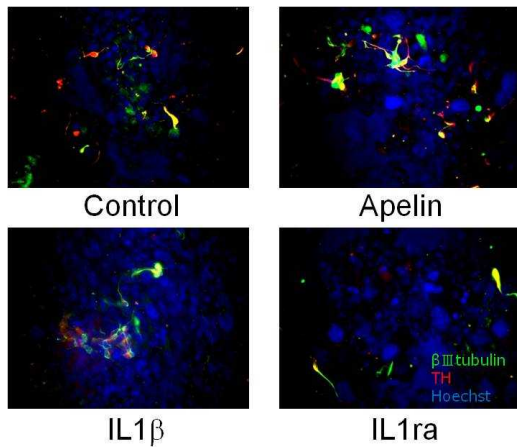
ヒト iPS 細胞群からヒト ES 細胞群からの誘導と異なり、われわれが得られたドーパミンニューロンは全細胞数のうち 3–5%程度しかなく、表面抗原を用いての分取が困難な状態であった。そのため、分化効率を上げるべく、Shh (ソニックヘッジホッグ) や Fgf (線維芽細胞成長因子) 8 などの誘導因子の添加タイミングなどを検討することとした。濃度の変更より、胚様体から神経幹細胞培養を始めるときに使用することが有効であることが分かった。それにより 7–8%程度までの上昇が見られた。細胞数で倍まで増加したが、セルソーターを用いて細胞フラクションの評価を行うまでの細胞数の上昇は得られず、表面に発現し、分取することができるかどうかの確認はできなかった。

そこで、得られた細胞群に Agtr11 や IL1R1 がどのように発現しているか免疫組織学的

に検討を加えた。



上図のように、Agtr11, IL1R1 のいずれにおいてもドーパミンニューロンの表面に発現していることが確認された。そこで細胞培養途中で、Agtr11 や IL1R1 のリガンドである Apelin や IL-1 $\beta$ を投与した。タイミング的に、Shh や Fgf8 と同様、胚様体から神経幹細胞培養 (Neurosphere 法) に移るときに添加を開始すると、ドーパミンニューロンの増加が強くなり、以下の図のように IL-1 $\beta$  や Apelin を投与した群では、ドーパミンニューロンの有意な増加がみられた。



一方で、得られたドーパミンニューロンの機能について検討した。神経毒である MPP<sup>+</sup>の添加によりドーパミンニューロンが減少するのだが、Agtr11 や IL1R1 のリガンドである Apelin や IL-1β を投与したドーパミンニューロンは、この MPP<sup>+</sup>の刺激による減少が抑制されることが確認できた。

以上、ヒト iPS 細胞から分化させたドーパミンニューロンには Agtr11 や IL1R1 が発現していることが確認され、それぞれのリガンドである Apelin や IL-1β の投与によりドーパミンニューロンが増加することがわかった。また、これらのニューロンはドーパミンニューロンの神経毒である MPP<sup>+</sup>の刺激にも耐性を示した。

また、パーキンソン病患者から得られた iPS 細胞群にも同様の分化をおこなった。すると、Agtr11 や IL1R1 の発現に有意な変化は

見られなかった。

以上より、ドーパミンニューロンの分化に関して疾患群も健常群の間で差異はみられず、実際の臨床応用には、問題が少ない可能性が示唆された。

本研究では、このことより Agtr11 や IL1R1 を用いた細胞の純化について研究を行う予定ではあったが、与えられた2年間では残念ながら実験を遂行することができなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

① 吉崎崇仁、パーキンソン病患者はジスキネジアで困っているか、Frontiers in Parkinson Disease、査読なし、Vol.4、2011、69-73

② 吉崎崇仁、Ole Isacson、井上治久、神経再生研究からの最新知見、パーキンソン病に対する細胞移植治療の可能性、Frontiers in Parkinson Disease、査読なし、Vol.3、2010、133-139

〔学会発表〕(計5件)

① 吉崎崇仁、黒質緻密部型ドーパミンニューロン作製に向けて～ヒト iPS 細胞による試み～、第3回 PD エキスパートミーティング 東京、2010年12月3日 京王プラザホテル

④ 吉崎崇仁、Alexandra Blak, Kai-Christian Sonntag、岡田洋平、赤松和土、岡野栄之、鈴木則宏、未分化ドーパミンニューロンにおける Agtr11 および IL1R1 を介したドーパミンニューロンの分化増幅、慶應ニューロセミナー、2010年5月29日、慶應義塾大学病院

- ③ 吉崎崇仁、Alexandra Blak, Kai-C Sonntag, 岡野栄之、鈴木則宏、マウス胎児中脳ドーパミンニューロンの Agtr11 受容体による神経毒への耐性の獲得、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 23 日、東京国際フォーラム
- ④ 吉崎崇仁、パーキンソン病の再生医療、ベーリンガーパーキンソン病勉強会、2010 年 2 月 23 日、ベーリンガーインゲルハイム東京支社
- ⑤ 吉崎崇仁、岡野栄之、鈴木則宏、新規因子によるヒト iPS 細胞からのドーパミンニューロン分化増幅、第一回慶應パーキンソン病研究会、2010 年 1 月 23 日、慶應義塾大学医学部

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/medicine/neurology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吉崎 崇仁 (YOSHIZAKI TAKAHITO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：60383775

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし