

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659649

研究課題名(和文)細胞移植治療法におけるグリア細胞の役割

研究課題名(英文)Role of glial cells in cell transplantation therapy

研究代表者

元野 誠 (Motono, Makoto)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：30619622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の薬物療法に代わる新たな治療法として、失われた神経細胞を補う細胞移植療法の開発を研究してきた。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞から神経細胞を誘導する際に、これまでに開発された分化誘導法に神経細胞を保護する役割を持つと考えられているグリア細胞から分泌される因子を加えることで、分化誘導された神経細胞はこれまで誘導されていた神経細胞よりも治療効果の高い細胞に分化させることができた。

研究成果の概要(英文)：As a new treatment alternative to pharmaceutical therapy for Parkinson's disease, we have been studying the development of cell transplantation therapy to compensate for the neurons lost by the disease. When the neurons were differentiated from embryonic or induced pluripotent stem cells, a factor, which is secreted from glial cells, was added to the differentiation medium that had been developed to date. In the result, the induced neurons were higher quality cells as ones in transplantation therapy than those induced in the previous method.

研究分野：脳神経外科学神経再生分野

キーワード：分化誘導 トランスフォーミング増殖因子 ドパミン神経 細胞移植

### 1. 研究開始当初の背景

難病に指定されているパーキンソン病は中脳黒質のドーパミン神経細胞が減少することにより発症し、その治療法は薬物療法や脳深部刺激療法が主に行われている。しかし、これらの治療法は運動症状の改善等、一定の治療効果は得られているが、失われたドーパミン神経細胞を補充する治療法ではないため、根本的な治療法の開発が望まれている。そこで、ドーパミン神経細胞を補うために、ドーパミン神経細胞が発生してくる中脳腹側領域を中絶胎仔から採取し、パーキンソン病患者の脳内に移植することにより、症状を改善させることができることが報告されている(文献1)。倫理的な観点から中絶胎仔ではなく幹細胞からドーパミン神経細胞を誘導し、脳内に移植することにより、失われたドーパミン神経細胞を補充する細胞移植療法が研究されてきた。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞から誘導したドーパミン神経細胞をパーキンソン病モデル動物に移植したところ、症状を改善させることができることが報告されている(文献2-4)。しかし、生着したドーパミン神経細胞の割合が低いことが課題となっている。そこで、分化誘導法を改良することにより、現在の方法で誘導される細胞よりも移植細胞として治療効果の高い細胞に分化させることができると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究はパーキンソン病の細胞移植治療法において、グリア細胞の役割を明らかにすることを目的とする。これまでの研究でパーキンソン病の細胞移植治療法に有効であるドーパミン神経細胞を脳内に移植すると、モデル動物の症状が改善することは観察されているが、生着するドーパミン神経細胞の数が少ないことが問題となっている。そこで、神経細胞の機能を補助する役割を持つと考えられているグリア細胞に着目し、細胞移植治療用のドーパミン神経細胞におけるグリア細胞の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス胎仔(E11.5)の中脳腹側領域を採取し、10%の胎仔ウシ血清を含んだDMEM(Wako)で培養することにより、グリア細胞、特にアストロサイトを誘導した(文献5)。アストロサイトが誘導できているかを確認するためにグリア線維性酸性タンパク(GFAP, DAKO)で免疫染色を行った。また、誘導したアストロサイトを利用して条件培地(conditioned medium, CM)を作製した。

(2) 細胞移植に使用する細胞は本研究室で開発されたドーパミン神経前駆細胞を使用した(文献6)。分化誘導初日にiPS細胞をラミンでコーティングした6wellの培養プレートに500万細胞を播種し、500nMのA-83-01(TGFβシグナルの阻害剤、Wako)、100nMの

LDN193189(BMPシグナルの阻害剤、Stemgent)、さらに、細胞のアポトーシスを抑制するために10μMのY-27632(Wako)を加えて培養した。翌日に中脳の腹側領域を誘導するために100ng/mlのFGF8(Wako)と2μMのPurmorphamine(Wako)を培地に加えた。分化誘導3日目にドーパミン神経細胞の誘導効率を上げるためにWNTシグナルを活性する3μMのCHIR99021(Stemgent)を加えた。分化誘導12日目にドーパミン神経前駆細胞に発現している表面抗原のCorinを利用してセルソーターで分離し、2万細胞を96wellの丸底プレートに播種した。Neurobasal(Invitrogen)の培地にB27 supplement(Invitrogen)、2mMのL-Glutamine(Invitrogen)、20ng/mlの脳由来神経栄養因子(Wako)、10ng/mlのグリア細胞株由来神経栄養因子(Wako)、200μMのアスコルビン酸(Sigma)、400μMのサイクリックAMP(Sigma)を加えて培地として使用した。細胞を播種するときに、マウス胎仔の中脳腹側領域から誘導したアストロサイトとCorinで分離した細胞を混合して培養する条件、(1)で作製したCMで培養する条件、トランスフォーミング増殖因子(TGF、R&D)を加える条件と加えない条件で培養した。

(3) Corinで分離後14日間培養した細胞の性質を確認するために、細胞を固定し、免疫染色を行った。NURR1(Kan研究所より譲渡)、Tyrosine hydroxylase(TH, Millipore)、FOXA2(R&D)、Ki67(NCL)の抗体を使用して解析した。

(4) 酸化ストレスに対する反応性を調べるために、分離後16日間培養した細胞に1mMの過酸化水素水を反応させて、3日後に細胞をCleaved-caspase3(Cell signaling)で解析した。

(5) 移植細胞として有効であるかを確認するために、分離後16日間培養した細胞を免疫不全マウス(NOD SCID mouse)の線条体に20万細胞を移植し、15-16週後に脳を回収した。移植片をTH、human Nuclei(Millipore)で免疫染色し、解析した。

### 4. 研究成果

(1) E11.5のマウス胎仔の中脳腹側領域からアストロサイトが分化誘導できているかを確認するためにアストロサイトのマーカーのGFAPで免疫染色をしたところ、染色された細胞が検出された(図1)。

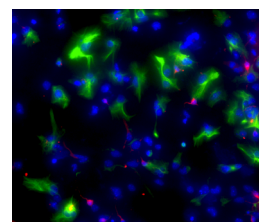


図1 マウス胎仔中脳腹側領域から分化誘導したアストロサイト。緑：アストロサイト (GFAP)、赤：神経マーカーTUJ1

(2) このように分化誘導したアストロサイトと本研究室で開発されたドパミン神経前駆細胞 (Corin で分離した細胞) とを混合して培養したところ、アストロサイトと混合しないで培養した細胞と比較するとドパミン神経前駆細胞のマーカーの NURR1 の発現が減少してしまった。そこで、アストロサイトが分泌する因子がドパミン神経前駆細胞の分化に関わっているかを調べるためにアストロサイトの条件培地 CM を作製し、Corin で分離したドパミン神経前駆細胞を培養したところ、NURR1 の発現が上昇した。また、この条件培地に TGFβ の阻害剤である A-83-01 を加えると、NURR1 の発現が減少した。したがって、CM に含まれる TGFβ が NURR1 の発現に関わっていることが示唆された。そこで、Corin で分離したドパミン神経前駆細胞を培養する際に TGFβ を加えて分化させたところ、NURR1 の発現が上昇した (図2)。また、ドパミン神経細胞のマーカーの TH の発現も上昇することが確認できた。

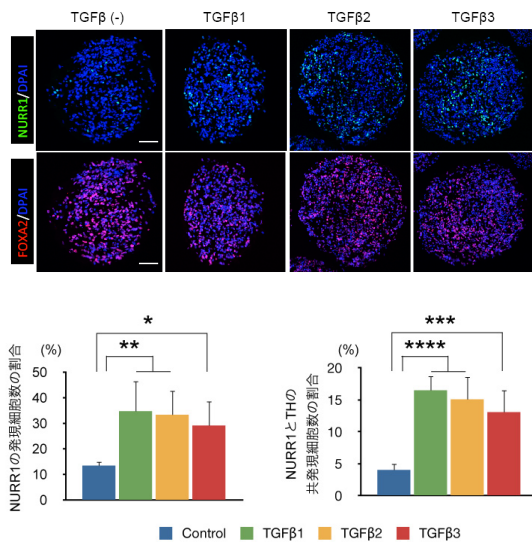


図2 TGFβ の効果

iPS 細胞 836B1 株を使って、分化誘導の際に TGFβ を加えることで、NURR1 の発現 (下左グラフ) や、NURR1 と TH が共発現している細胞数が増加した (下右グラフ)。FOXA2 の発現細胞数は変わらなかった。上図、緑：NURR1、赤：FOXA2、青：DAPI。バー：50 μm。統計解析は Dunnett 法により行った。( \* : p < 0.05、\*\* : p < 0.01、\*\*\* : p < 0.001、\*\*\*\* : p < 0.0001、n=5)

(3) パーキンソン病が引き起こされる原因として、ミトコンドリア機能異常や酸化ストレスなどが挙げられる。また、NURR1 の発現が上昇することにより、酸化ストレスによる細胞死に抵抗性を示すことが報告されて

いる (文献7)。そこで、過酸化水素水により、分化誘導した細胞に酸化ストレスを与えて、細胞死に対して抵抗性を示すかを確認したところ、TGFβ を加えて分化誘導した細胞は酸化ストレスにより引き起こされる細胞死を抑えることがわかった (図3)。

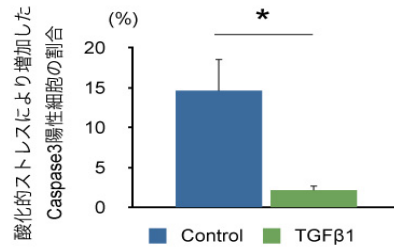


図3 酸化ストレスによる細胞死の抵抗性 誘導した細胞を 1mM の過酸化水素水で反応させたところ、TGFβ を加えて誘導した細胞は酸化ストレスにより引き起こされる細胞死を抑制した。統計解析は un-paired t 検定により行った。( \* : p < 0.05、n=3)

(4) 次に、分化誘導した細胞を免疫不全マウスの線条体に移植し、移植片の中に発現しているドパミン神経細胞のマーカーの TH の発現を調べた。その結果、TGFβ を加えて分化誘導した細胞では移植片に生着した TH 陽性細胞の割合は TGFβ を加えないで分化誘導した細胞の移植片に比べて、わずかではあるが、有意に上昇していることが確認できた。

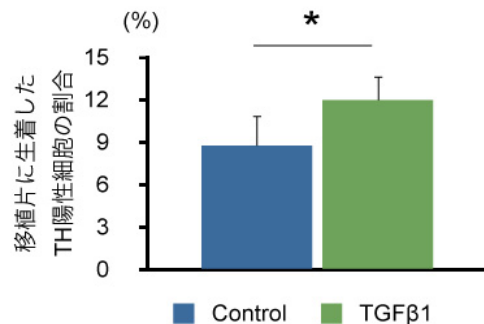
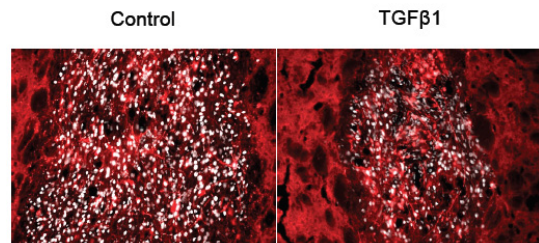


図4 分化誘導した細胞を免疫不全マウスに移植したときの結果

上図：左図、TGFβ を加えないで分化誘導した細胞を移植した移植片。右図、TGFβ 加えて分化誘導した細胞を移植した移植片。赤：TH、白：human Nuclei (ヒト細胞核に特異的に反応する抗体)。下グラフ：移植片に生着した TH 陽性細胞数の割合。統計解析は

un-paired t 検定により行った。( \* : p < 0.05, n=8)

以上のことから、パーキンソン病に対する細胞移植治療法の臨床試験に向けて本研究室で開発された分化誘導法にグリア細胞から分泌されている TGF $\beta$ を加えることで、酸化ストレスに対して抵抗性のある細胞を誘導し、TH の発現細胞数を増加させることができた (図 2)。さらに分化誘導した細胞を実験動物の脳内に移植したところ、生着した TH 陽性細胞数を上げることができた。したがって、グリア細胞から分泌されている TGF $\beta$  がドパミン神経細胞への分化の促進と酸化ストレスに対する抵抗性をもつ細胞へと分化させる働きがあることが示唆された。今回の結果を今後臨床試験に向けて応用していくためには菌体やウイルスを使って作製されている組換えタンパク質を使わずに分化誘導することが必要になる。今回の結果を受けて、TGF $\beta$  を活性化させる小分子化合物を見つけることができれば、これまで分化誘導されてきた神経細胞よりも治療効果の高い移植細胞が準備できると考えられる。

#### <引用文献>

- ① Barker et al. , Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson' s disease、Lancet Neurol.、12、2013、84-91
- ② Kirkeby et al. , Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions、Cell Reports、1、2014、703-714
- ③ Sundberg et al.、Improved cell therapy protocols for Parkinson' s disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, HiPSC-, and nonhuman primate iPSC-derived dopaminergic neurons、Stem Cells、31、2013、1548-1562
- ④ Doi et al.、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、30、2012、935-945
- ⑤ Liu et al.、Primary Rat Mesencephalic Neuron-Glia, Neuron-Enriched, Microglia-Enriched, and Astroglia-Enriched cultures、Methods in molecular medicine、79、2003、387-396
- ⑥ Doi et al.、Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation、Stem Cell Reports、2、2014、337-350

⑦ Sousa KM et al., Microarray analyses support a role for Nurr1 in resistance to oxidative stress and neuronal differentiation in neural stem cells, Stem Cells, 25, 2007, 511-519

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

① 元野誠、Nurr1 induction and functional analysis in dopaminergic progenitor cells、The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience、2015 年 1 月 15-17 日、武田薬品研修所 (大阪府・吹田市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

元野 誠 (Moto, Makoto)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号 : 30619622