

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861146

研究課題名(和文) 接着因子を利用した多能性幹細胞由来神経細胞移植における神経機能再生促進法の開発

研究課題名(英文) Facilitation of functional synaptic formation between grafted-iPSC-derived dopaminergic neurons and host brain neurons via cell-adhesion molecule

研究代表者

西村 周泰 (Nishimura, Kaneyasu)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：90527889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病に対するヒト多能性幹細胞を用いた細胞移植治療において、移植したドパミン神経細胞が有効性を発揮するには、脳内の神経細胞と機能的なシナプスを形成する必要があります。今回の研究において、iPS細胞由来ドパミン神経細胞移植において、エストラジオール誘導体が、線条体神経に選択的に発現するインテグリン 5の活性化を介して、移植したドパミン神経とのシナプス形成を促進し、運動機能の早期改善に寄与することが示されました。また同時に、既存薬が細胞移植治療の質的向上に寄与することを示しており、本研究をモデルケースとして、細胞移植治療の効果向上を目的とした創薬研究が進展することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Cell transplantation therapy using human pluripotent stem cell (PSC)-derived midbrain dopaminergic (mDA) neurons is expected to soon reach Parkinson's disease (PD) patients. Especially, neuronal innervation and functional synaptic formation between grafted-DA neurons and host striatal neurons is crucial for restoring the lost neuronal function of PD patients. We found that systemic administration of an estradiol derivative, estradiol-2-benzoate (E2B), promotes the activation of integrin 5 and facilitates the behavioral recovery of parkinsonian model rats via the synaptic formation between grafted iPSC-derived DA neurons and host striatal neurons. These findings suggested that systemic administration of E2B provides a microenvironmental cue for synaptic formation via activation of integrin 5 in host striatal neurons, thus potentially providing pharmacotherapeutic benefit in humans.

研究分野：神経薬理学

キーワード：iPS細胞 ドパミン神経 パーキンソン病 細胞移植治療 シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、進行性の神経変性疾患であり、中脳黒質のドパミン神経の選択的な脱落によって引き起こされる。主な症状としては、振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などが知られている。日本での有病率は、人口 10 万人あたり 100-150 人程度であり、ほとんどが孤発性である。現行の治療法は、L-dopa やドパミン受容体刺激薬を用いた薬物治療が一般的であるが、長期服用により、on-off 現象や wearing-off 現象などの副作用が生じるため、新たな治療オプションの開発が進められている。

パーキンソン病に対する細胞移植治療は、1980 年代から、中絶胎児中の脳組織を用いて臨床研究が行われてきたが、倫理的な理由およびドナー細胞の安定供給が難しいことから一般的な治療法になっていない。近年、胎児中脳組織の代替ツールとして、ヒト多能性幹細胞から誘導したドパミン神経が、細胞移植治療の有力なツールになることが期待されている。ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から誘導したドパミン神経を移植し、より優れた治療効果を得るためには、移植する細胞に品質向上が重要であるが、さらに有効性を期待するには、移植後、脳内において生着細胞数の向上、神経成熟の促進、神経突起伸長およびシナプス形成を促進させる必要がある。特に、パーキンソン病患者に見られる運動症状を改善するためには、移植したドパミン神経と脳内の神経細胞が機能的なシナプスを形成する必要があるが、移植したドパミン神経がシナプスを形成すべき脳内の神経細胞の特性やシナプス形成を促進させる方法、またシナプス形成が運動機能改善にどの程度寄与するのか、などはまだ明らかになっていない。この点を明らかにすることは、神経細胞移植の治療効果向上および普及促進に有益であると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、目下開発中であるパーキンソン病患者に対する iPS 細胞由来ドパミン神経細胞移植において、移植される側の脳環境の特性を詳細に解析し、基本データを得ることで、脳の微小環境を薬剂的に調節する方法を開発し、その有効性発揮に寄与することを目的として、主に下記の 2 点に取り組んだ。

(1) 現状において細胞移植治療の移植部位として、線条体 (特に被殻) が想定されている。本研究では、まず黒質ドパミン神経の支配を受けている線条体神経の特性を、組織学的解析および遺伝子発現解析により明らかにする。また、その神経細胞に選択的に発現する細胞接着因子の同定を試みる。

(2) ヒト iPS 細胞から誘導したドパミン神経をパーキンソン病ラットモデルの脳に移植し、移植したドパミン神経と宿主脳神経細胞とのシナプス形成の促進法の開発を目指す。この目的を達成するために、トランスシナプストレーサーである wheat germ agglutinin (WGA) を恒常的に発現する iPS 細胞を樹立し、移植したドパミン細胞と宿主神経細胞のシナプス形成を定量的に解析できる実験系を確立する。また移植後の評価としては、移植後の細胞生着数およびメタンフェタミン投与で誘発される旋回運動の改善などを経時的に解析することで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 黒質ドパミン神経の支配を受けている線条体神経の特性解析

成体マウス中脳黒質に WGA を微量注入し、中脳ドパミン神経の神経支配を受ける線条体神経とそうでない神経の特性を、免疫染色法を用いて組織学に解析を行った。さらに fluorescence activated cell sorting (FACS) を用いて両者を分取し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析も行い、両者の違いを明らかにし、中脳ドパミン神経の神経支配を受ける線条体神経に選択的に発現する細胞接着因子の同定を試みた。

(2) 上記の神経細胞に選択的に発現する細胞接着因子の活性化と移植ドパミン神経とのシナプス形成および行動改善の解析

パーキンソン病モデルラットにエストラジオール誘導体を全身持続投与し、ヒト iPS 細胞由来ドパミン前駆細胞を移植することで、移植したドパミン神経細胞と脳内の神経細胞のシナプス形成が促進について行動評価および組織学的評価を用いて検討した。

また得られた接着因子がシナプス形成に関与するかを確認するため、標的分子を HEK293 細胞に強制発現させ、iPS 細胞由来ドパミン神経と共培養することで、シナプス関連分子の惹起の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) 正常マウスの中脳黒質にトランスシナプストレーサーである WGA をマイクロインジェクションすることで、中脳ドパミン神経の支配を受ける線条体神経 (移植したドパミン神経がシナプスを形成すべき神経細胞) の可視化に成功した。まず WGA は、線条体神経のうち約 50% が標識された。さらに WGA は、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトには輸送されなかった。さらに、これらの神経は約 85% が DARPP32 陽性神経であり、約 6% がアセ

チルコリン神経であった。また、これらの神経はドパミン受容体D1もしくはD2を発現しており、中脳ドパミン神経からの神経支配を受けていることが分かった。さらにWGA陽性神経とWGA陰性神経をFACSを用いて分取し、マイクロアレイを用いて、網羅的な遺伝子解析を行ったところ、約20個の細胞接着因子がWGA陽性神経に選択的に発現していることが明らかとなった。このうちインテグリン $\alpha 5$ は、マウス脳の部位別の解析により、正常マウスの線条体において優位に発現していることを見出した。さらに、ヒト剖検脳を用いた解析において、パーキンソン病患者脳(被殻)のインテグリン $\alpha 5$ の発現レベルは、正常高齢者のそれを比較して、変化がなかった。また、マウス発生過程および新生期における線条体のインテグリン $\alpha 5$ の発現を解析したところ、新生児期において、強い発現が確認された。これらの結果は、インテグリン $\alpha 5$ が、新生児期において細胞間の相互作用において機能していること、またパーキンソン病患者脳においてもシナプス形成促進のターゲット分子として想定できることを示唆している。

(2) エストラジオール安息香酸エステル(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、皮下投与;1日1回)を7日間、雌性成体ラットに全身持続投与することにより、線条体神経に発現するインテグリン $\alpha 5$ が活性化することを見出した。またインテグリン $\alpha 5$ と二量体を形成するインテグリン $\beta 1$ 分子も活性化していることも明らかとなった。また、このラットの線条体組織をサンプリングし、単細胞に分離したのち、フィブロネクチンコートdishに対する接着を解析したところ、エストラジオール誘導体投与群では、有意に接着細胞数が亢進することを明らかにした。またこの効果は、抗インテグリン $\alpha 5$ 抗体によって阻害された。さらにエストラジオール誘導体とともに、エストロゲン受容体阻害薬であるICI182.780(1 mg/kg 、皮下投与;1日1回)を投与した群では、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 活性化は確認できなかった。また、フィブロネクチン以外の基質(ラミニン、オルニチン、ポリL-リジン)への接着は亢進しなかった。またこのときの血清中エストラジオール濃度は、おおよそ50 pg/mL であった。

(3) 上記で同定した接着因子インテグリン $\alpha 5$ が、シナプス形成に関与するかを検討した。まずヒトインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を強制発現させたHEK293を樹立し、iPS細胞由来ドパミン神経と共培養をすることで、形態的シナプス形成の検討を行った。その結果、ヒトインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を強制発現させたHEK293細胞とiPS細胞由来ドパミン神経と共培養することで、HEK293細胞とiPS細胞由来ドパミン神経が接する部分で

synapsinやPSD95などのシナプス分子の発現が惹起された。またこれらの分子の発現は、mockのHEK293細胞とiPS細胞由来ドパミン神経と共培養では、弱い発現を示すのみであった。また、iPS細胞由来ドパミン神経の軸索およびgrowth coneには、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のリガンドであるフィブロネクチンを発現していることも確認できた。これらの結果は、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ とフィブロネクチンによる細胞接着は、形態的なシナプス形成に寄与することを示している。

(4) ドパミン神経毒6-hydroxydopamineを用いて、片側性パーキンソン病モデルラットを作成し、ヒトiPS細胞由来ドパミン神経前駆細胞を移植し、エストラジオール安息香酸エステルを全身持続投与することで、運動機能改善と移植した細胞と宿主脳神経細胞とのシナプス形成の促進について検討した。また対象実験として、エストラジオール安息香酸エステル(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、皮下投与;1日1回)とICI182.780(1 mg/kg 、皮下投与;1日1回)を併用した群を置いた。

移植ドパミン神経と宿主線条体神経のシナプス形成を組織学的に評価するためにpiggybacベクターを用いてWGAを恒常的に強制発現させたヒトiPS細胞を樹立し、移植実験に用いた。移植に用いたヒトiPS細胞(1039A1)は、T細胞からエピソーマルベクターを用いて、feeder-free、xeno-free環境下で樹立された株を用いた。WGAの発現が、移植後も保たれていることも確認した。また、ヒトiPS細胞由来ドパミン神経前駆細胞は、2014年に当研究室から報告された臨床応用グレードの誘導法を用いており、当研究室で設定した条件を満たしたものを用いた。分化誘導は、合成ラミニン511-E8上で行い、誘導12日目においてFACSを用いてCORIN陽性細胞のみを純化した(陽性率10%以上かつ再解析率90%以上)。その誘導26日目においてFOXA2陽性細胞が85%以上、NURR1陽性細胞が10%以上の細胞を移植実験に用いた。またこの細胞を56日まで延長培養したところ、成熟ドパミン神経のマーカーであるtyrosine hydroxylase (TH)陽性の神経細胞に分化することを確認した。

移植実験には、京都大学で確立されたX-SCIDラット(免疫不全ラット)を用い、移植後の免疫抑制剤の投与は行わなかった。細胞移植は、麻酔下で脳固定器を用いて、パーキンソン病モデルラットの片側の線条体に約40万個移植した。移植後2週間ごとに16週間、メタンフェタミン誘発旋回運動を評価したところ、エストラジオール安息香酸エステル(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、皮下投与;1日1回)を投与している群では、コントロール群と比較して、早期(移植10週間後)から

行動改善が観察された。また、この時の組織学評価において、ホスト脳神経へのWGAの輸送が有意に増加していることが明らかとなった。またこの効果は、ICI182.780 (1 mg/kg、皮下投与; 1日1回)併用群においては有意に抑制されていた。また、生着している中脳ドパミン神経細胞の割合は、群間において有意な差は見られなかった。また、線条体神経細胞の周囲にヒトシナプトフィジン抗体で染色される移植細胞由来のシナプスも多数観察された。またこのときの血清中エストラジオール濃度は、おおよそ270 pg/mLであった。

次にエストラジオール安息香酸エステルが、iPS細胞由来ドパミン神経前駆細胞に直接及ぼす影響について解析を行った。移植に用いた誘導28日目の細胞に、エストラジオール安息香酸エステルを1, 10, 100 nMで7日間処置し、各種シナプス関連マーカー (*DREBRIN*, *SYNAPSIN*) および中脳ドパミン神経マーカー (*TH*, *NURRI*, *FOXA2*, *DAT*, *VMAT2*)の発現を解析した。その結果、エストラジオール安息香酸エステルは、これらの遺伝子発現には変化を与えないことが明らかとなった。すなわち、エストラジオール安息香酸エステル投与によるシナプス形成促進作用は、エストラジオール安息香酸エステルは移植後の細胞に直接作用した結果ではなく、脳環境を二次的に調節した結果であると推察できる。

本研究において、まず細胞移植時に、iPS細胞由来ドパミン神経細胞がシナプスを形成すべき線条体神経の特性を明らかにし、その神経細胞にインテグリン $\alpha 5$ が選択的に発現していることを明らかにした。さらに今回得られたインテグリン $\alpha 5\beta 1$ は、マウス線条体と同様にヒト被殻でも発現しており、その発現レベルは、正常高齢者とパーキンソン病患者で異差は、確認できなかった。これらの結果は、今回、マウスを用いた結果がヒトに応用できる可能性を示唆している。また、iPS細胞由来ドパミン神経細胞移植において、エストラジオール安息香酸エステルが、線条体神経に選択的に発現するインテグリン $\alpha 5$ の活性化を介して、移植したドパミン神経とホスト線条体神経とのシナプス形成が促進され、パーキンソン病モデルラットの運動機能の早期改善に寄与することが示された。

本効果のメカニズムとして、線条体に発現するリーリン分子の活性化を介したインテグリン $\alpha 5$ の活性化を想定している。線条体神経細胞自体、エストロゲン受容体 (*ESR1*, *ESR2*)を発現していることを確認しており、リーリン関連分子も線条体神経細胞に発現していることも確認できた。

また本研究で用いたドナー細胞は、臨床応用を想定したプロトコルを用いて行い、

一定の基準を満たした細胞を用いていることから、ヒトへの応用を想定した実践的な基礎研究と位置づけることができる。また同時に既存の医薬品が、ホスト脳環境を二次的に調整することで、細胞移植治療の質的向上に寄与することを示しており、本研究をモデルケースとして、細胞移植治療の効果向上を目的とした創薬研究が進展することが期待される。

一方で、本薬剤の効果は、雌性ラットでのみ確認され、雄性ラットでは確認することができなかった。実際に、エストラジオール誘導体は女性特有の疾患にのみ適用されており、男性への投与は想定できない医薬品である。ヒトへの応用を考慮したときに、適切な投与量や投与期間は、今後、より詳細に検討する必要がある。また今回、エストラジオール安息香酸エステルを用いて得られた効果を代替できる化合物または医薬品の探索も次の課題であると考えている。

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1件)

① Kaneyasu Nishimura, Daisuke Doi, Bumpei Samata, Shigeo Murayama, Tsuyoshi Tahara, Hirotaka Onoe and Jun Takahashi. Estradiol facilitates functional integration of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons into striatal neuronal circuits via activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Stem Cell Reports*, 6 (4), 511-524 (2016). 査読有.
doi:10.1016/j.stemcr.2016.02.008

[学会発表] (計3件)

① ○ Kaneyasu Nishimura and Jun Takahashi. Towards the facilitation of the functional synaptic formation between grafted-iPSC-derived dopaminergic neurons and host striatal neurons. **The 4th CiRA Retreat**, Otsu, Japan, May 2015

② ○ 西村周泰、高橋淳. iPS細胞由来ドパミン神経細胞の脳移植後の生着を助ける新規液性因子の同定. **第14回日本再生医療学会総会**、横浜、2015年3月.

③ ○ 西村周泰、高橋淳. トランスシナプストレーサーを用いた中脳ドパミン神経支配を受ける線条体神経の組織学的特性解析.

第 37 回日本神経科学学会、横浜、2014 年 9 月.

〔図書〕 (計 2 件)

① 西村周泰、高橋淳.
「パーキンソン病の再生医療の現状と展望」. 北隆館 **BIO Clinica**, 第 30 巻, 第 5 号, pp 32-36 (434-438) (2015)

② 西村周泰、高橋淳.
「iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療」. 日本プランニングセンター **難病と在宅ケア**, 第 20 巻, 第 8 号, pp 49-52 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

本研究成果は、京都大学 iPS 細胞研究所のホームページでも紹介されました (2016 年 3 月 18 日)。

日本語

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/160318-100000.html>

英語

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/newslist/news/160318-100000.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 周泰 (NISHIMURA, Kaneyasu)
京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員
研究者番号 : 9 0 5 2 7 8 8 9

(2) 研究分担者
なし。

(3) 連携研究者
なし。