

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19498

研究課題名(和文) 光遺伝学とiPS細胞技術を応用したパーキンソン病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research on treatment of Parkinson's disease utilizing optogenetics and iPS cell

研究代表者

大山 彦光(OYAMA, GENKO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00407256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病における中絶胎児由来ドパミン細胞移植は、オフ・ジスキネジアや腫瘍化の問題のため、一般的な治療法となっていない。本研究では、これらの問題を解決するために、制御可能なiPS細胞由来ドパミン神経移植療法を開発することを目的とした。光反応性蛋白を発現したiPS細胞由来ドパミン神経を作成し、ジスキネジアモデルマウスに移植し、細胞の生着および症状の改善を確認した。

研究成果の概要(英文)：Fetal cell transplantation for Parkinson's disease did not become a general treatment due to off dyskinesia or tumor formation. Although it is expected to solve the problem by transplanting cells derived from induced pluripotent stem (iPS) cells, its safety and effect are uncertain. In this study, to overcome these problems, we aimed to develop a controllable iPS cell induced dopamine neuron transplantation therapy. Channelrhodopsin 2 was transfected in to iPS cell derived dopamine neuron with Lenti virus. The controllable dopamine neuron was transplanted into striatum of 6-hydroxydopamine dyskinesia model mouse. We confirmed the transplanted cells engrafted without tumorigenesis in the mouse brain and differentiated into dopamine neurons.

研究分野：神経内科

キーワード：iPS dopamine controllable optogenetics

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は中脳黒質のドーパミン神経細胞の進行性の脱落によって線条体におけるドーパミン欠乏が生じることで、基底核回路に異常をきたし、動作緩慢、筋強剛、姿勢反射障害、振戦などの運動障害を来す神経変性疾患である。内服や貼付剤によるドーパミン補充療法が治療のゴールドスタンダードであるが、長期経過すると治療薬の有効域が狭くなり、ウェアリングオフやジスキネジアといった運動合併症が問題となる。運動合併症に対するニューロモジュレーション法として視床下核または淡蒼球内節を電気刺激する脳深部刺激療法(DBS)があり、非常に有効な治療効果が認められている(Okun MS, N Engl J Med, 2014;371(15):1369-73.)。

DBSの治療効果は明らかであるが、従来の電気刺激では選択性の高い刺激ができず、刺激強度によって刺激範囲が広がってしまい、目的神経核以外に刺激がおよぶことによる副作用が近年問題となっている(Okun MS, Rodriguez RL, et al. Clin Neuropsychol 2007;21:162-189)。

この問題を解決すべく、光遺伝学(optogenetics)に注目し、選択性の高いニューロモジュレーション法を考案した。光遺伝学は、光活性化イオンチャネル蛋白を特定のニューロンに遺伝子工学的手法を用いて発現させ、特定ニューロンに特定の波長の光を照射することによってニューロン特異的に興奮または抑制することができ、in vivoで秒単位の時間的精度で制御ができる新しい技術である(Deisseroth K. Optogenetics. Nat Methods 2011;8:26-29.)。従来の電気刺激では周囲まで刺激が波及してしまうのに対して、この技術では、特定細胞群の発火そのものを興奮または抑制し、制御することができる。しかし、光刺激によるニューロモジュレーションでも、ドーパミン神経脱落の進行を止めることはできない点が問題となる。

進行性のドーパミン神経細胞脱落に対して、胎児やブタの黒質細胞を用いた神経細胞移植療法が1980年代に行われた。近年、山中らが体細胞に数種類の遺伝子を導入することによって、分化万能性と自己複製能を持ったinduced pluripotent stem cell(iPS細胞)を樹立した(Takahashi K, Yamanaka S. Cell. 2006;126:663-676.)。体細胞からドーパミン神経細胞を誘導できることから倫理的問題が少なく、現在本邦においてパーキンソン病患者に対するiPS細胞由来ドーパミン神経細胞移植の臨床研究が計画されている。しかし、従来の細胞移植療法では、ドーパミン放出がコントロールできず、オフ時でも出現するオフ・ジスキネジア(runaway dyskinesia)が問題となったことから(Hagell P, Piccini P,

et al. Nat Neurosci. 2002;5:627-628.)、iPS細胞由来神経細胞移植においても、移植細胞のドーパミン放出をコントロールしない限り、ジスキネジアの問題は解決しないことが予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光活性化イオンチャネル蛋白をiPS細胞由来ドーパミン神経細胞に発現させた「光反応性ドーパミン細胞」を移植することによって、ドーパミン放出を光ファイバーを介して外部から自由にコントロール可能にした、調節可能神経細胞移植療法(Controllable Neural Transplantation; CNT)によるPDに対する新規ニューロモジュレーション法の開発である(図1)。

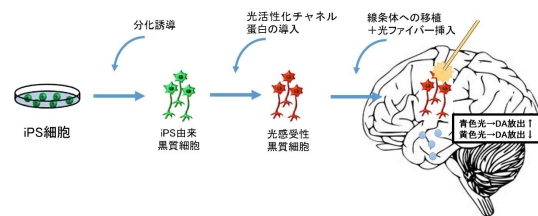


図1 調整可能神経細胞移植療法

本研究によって、確立した光刺激によるドーパミン放出制御機構を用いることで、将来は人における「光反応性ドーパミン神経細胞」移植療法の実現につながる可能性がある。さらに、将来的には、本研究によって確立した調整可能ドーパミン神経細胞移植と、in vivo voltammetry法によるドーパミンセンシング技術を組み合わせることで、クローズドループかつオンデマンドで自動調整可能なニューロモジュレーションが可能となる。

3. 研究の方法

ステップ1: in vitroにおける「光反応性ドーパミン細胞」のドーパミン放出能の検証

正常ヒトiPS細胞を96-well dish内でドーパミン神経に分化させる。Channelrhodopsinと、archaerhodopsinをエンコードしたadeno-associated virus(AAV)またはlentivirusを用いてiPS由来ドーパミン神経細胞に発現させ、光反応性ドーパミン細胞を作成する。各well内にカーボンファイバーファイバー電極を挿入し、ドーパミン放出を測定し、青色光でドーパミン放出が促進し、黄色光で抑制されることを実証する。iPS由来ドーパミン細胞にドーパミン放出能があることを確認する。HPLCを用いた測定によって、in vivo fast scan cyclic voltammetry測定法の妥当性や

既知の結果との整合性を確認する。リアルタイムで細胞を傷つけず well 内でドパミン放出能を測定する系を確立することにより、細胞移植前に移植細胞のドパミン放出能を調べ、品質を管理することができる。これにより、ステップ2では、品質保証をした上で細胞移植を効率よく行うことができるため、高い治療効果が期待できる。

ステップ2：生体内における「光反応性ドパミン細胞」光刺激応答の検討

免疫不全マウス (NOD-SCID) への移植：頭蓋骨を持続麻酔下に、ドリルで穿孔し、マニピュレーターを用いて光反応性ドパミン細胞を線条体内に注入し移植する。同時に光刺激用ファイバーを挿入する。さらに、2台のマニピュレーターを用いて線条体に Voltammetry 用カーボンファイバー記録電極、硬膜上に参照電極と Aux 電極を設置し固定する。これらの電極はヘッドセットに固定し実験時にコードを介して測定機器に接続できるようにする (Oyama G, Yoshimi K, et al. 2010; Natori S, Yoshimi K et al. 2009) (図2)。細胞移植時 (0 週) に適切な光刺激条件を検討し、ドパミン放出調整能が確認された場合、1 週、4 週、8 週、12 週、16 週後に光刺激実験を行い、ドパミン放出調整能の経時的变化を調べる。また、光刺激実験後は、免疫組織学的に細胞生着を確認し、方法の妥当性や適切な生着条件を決定する。ステップ2で検討した条件を用いて、ステップ3でモデルマウスで本治療法の効果を実証する。

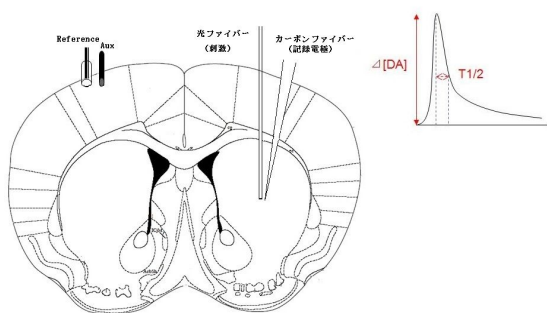


図2 in vivo 光刺激実験

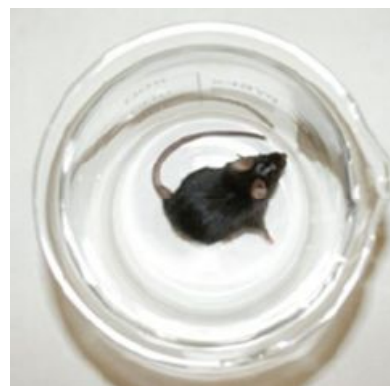
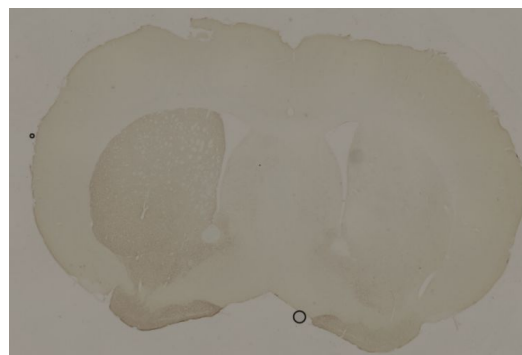
ステップ3：パーキンソン病モデルおよびジスキネジアモデルマウスにおける治療効果の検討

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) による黒質破壊 PD モデルマウスにおける検討：MPTP マウスにおいて、「光反応性ドパミン細胞」移植および光刺激を行い、ステップ2で検討した、生体内でのドパミン調整のための適切な光刺激条件を用いて、ドパミン放出とともに運動症状が改善す

ることをフリームービング下に観察し、証明する。また、ロタロッドテストおよびポールテストでも運動症状の改善を実証する。

6-hydroxydopamine (6-OHDA) による線条体破壊および levodopa 長期投与によるジスキネジアモデルマウスにおける検討：ジスキネジアモデルマウスの作成し (図3) 「光反応性ドパミン細胞」移植および光刺激を行い、ジスキネジアモデルにおける最適なニューロモジュレーション法を完成させる。

図3 ジスキネジアモデルマウスの作成



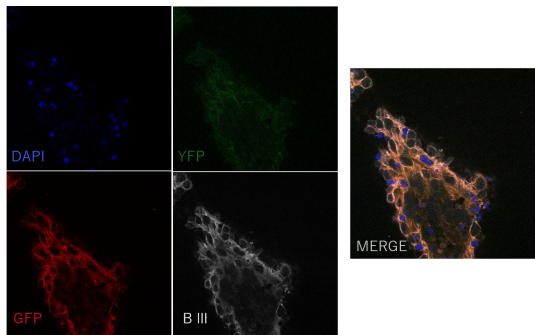
4. 研究成果

まず最初に、in vitro において光反応性蛋白の発現条件の検討を行い、iPS 細胞に Channelrhodopsin をエンコードしたレンチウイルス (EF1a-ChR2-EYFP lentivirus) を用いて導入した上でドパミン神経細胞させ光反応性ドパミン細胞を作成した (図4)。

次に、iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の KCl によるドパミン放出能を fast scan cyclic voltammetry および HPLC を用いて測定し、ドパミンが放出されることを確認した。

さらに、6-OHDA による線条体破壊およびアポモルフィン投与によるジスキネジアモデルマウスの作成を行い、回旋行動について評価を行った。

図4 光反応性ドパミン細胞の作製



ジスキネジアモデルマウスに対して iPS 細胞由来ドパミン神経細胞移植を行い、移植に成功し、半年後も腫瘍化せずに生着していることを確認できた。

現在、このジスキネジアモデルマウスに対して、iPS 細胞由来ドパミン神経細胞移植による症状改善を回旋行動試験を行ってしつつ、光刺激によるドパミン放出、運動症状の改善効果の検討を行っている。

今後は、「光反応性ドパミン細胞」移植による調節可能神経細胞移植療法 (Controllable Neural Transplantation; CNT)」の有効性を証明していく。さらに、将来的には人での応用、および、Local field potential 等の電気生理学的手法と組み合わせることで、クローズドループかつオンデマンドで自動調整可能なニューロモジュレーションの実現を目指す。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. Ryota Nakamura, Genko Oyama, Takayuki Jo, Kei-ichi Ishikawa, Risa Nonaka, Yasushi Shimo, Wado Akamatsu, Nobutaka Hattori. Transplantation therapy of human iPS cell-derived dopamine neural progenitor cells for Parkinson's disease. International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 2018.10, Hong Kong (予定)
2. Takayuki Jo, Kenji Yoshimi, Toshimitsu Takahashi, Genko Oyama, Nobutaka Hattori. Differentiation of

norepinephrine from dopamine using a carbon fiber microelectrode: dual use of rectangular and triangular waveforms in voltammetry. The XXIII World Congress of Neurology. 2017.9, Kyoto

3. Takayuki Jo, Genko Oyama, Kenji Yoshimi, Shigeto Sato, Teruko Danjo, Atsushi Uemura, Yasushi Shimo, Nobutaka Hattori. Optogenetic neuromodulation of dopamine release in mice. OptDBS. 2017.6, Geneva
4. Genko Oyama, Jo Takashi, Yasushi Shimo, Nobutaka Hattori. Optogenetic Neuromodulation. The 2nd MDS AOS Basic Scientist Summer School, 2015.8, Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 彦光 (OYAMA, Genko)
 順天堂大学・医学部・准教授
 研究者番号: 1 0 2 3 4 5 6 7