

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02912
研究課題名(和文) In vitro analysis of the effect of HLA-matching on neural cell transplantation using iPS cell-based culture system
研究課題名(英文) In vitro analysis of the effect of HLA-matching on neural cell transplantation using iPS cell-based culture system
研究代表者
森實 飛鳥 (Morizane, Asuka)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師
研究者番号：10528730
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病に対する多能性幹細胞を用いた細胞治療が臨床応用されている。本研究では幹細胞由来のドナー細胞が移植先の脳でシナプス結合形成する際に、自分由来(自家)および他人由来(他家)の細胞で違いがあるかを培養系で調べる事を目的とした。複数のiPS細胞株を準備し、ドナー細胞およびそれらがシナプス結合をする先のタイプの神経を誘導し、共培養することで細胞移植の試験管モデルを構築することができ、免疫染色や電気的活動を調べることができた。今回の研究では自家、他家で差は認めなかったが、今後はさらに長期の培養を行うことで、より詳細な移植モデルとすることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は難治疾患であり、病気の進行とともに内服治療での治療が難しくなる。将来、細胞移植が治療選択肢の一つとなることに期待されている。動物実験を用いた細胞移植の研究では移植片が生着し、疾患モデル動物の機能改善が報告されている。しかし、実験動物を用いた系ではドナー-ホスト間の神経シナプス結合がヒト神経-動物神経となるため、実際のヒト脳での移植を想定した詳細な検討が出来ない。ヒト-ヒト神経の結合をみるためには本研究のようにホスト側の神経もヒト幹細胞から誘導する必要がある。本研究はヒト脳への細胞移植を試験管内で再現する実験モデル系を開発したところに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Cell therapy using pluripotent stem cells for Parkinson's disease has been applied to clinics. The purpose of this study was to establish in vitro model system and to examine the detail of cell transplantation especially on the difference of autologous and allogeneic ones. The cells derived from multiple cell lines were induced to the cell type of donor dopamine neurons and recipient neurons, co-cultured as in vitro model of cell therapy and then analyzed. They were analyzed by immunostaining and qPCR. Their electrical activities were monitored over time. The characteristics of donor and recipient cell type were reproduced. No difference has been detected for synaptic connection nor maturations between the autologous and the allogeneic combinations. A longer period of culture experiment would provide more detailed information in future.

研究分野：再生医療

キーワード：パーキンソン病 再生医療 中枢神経 多能性幹細胞 細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2018年より本邦にてパーキンソン病に対する細胞移植治療の治験が行われている。動物実験等による基礎研究での成功に基づいて行われている臨床試験であり、良好な結果が期待される。ただしこれまでの薬剤開発や他の治療法開発においては、動物実験での治療研究と臨床試験での結果の乖離が見られ、期待した結果とならないことがしばしば経験されてきた。また、移植治療については免疫反応が問題になるが、ヒト細胞をモデル動物に移植する実験系では移植後免疫反応の探求には限界がある。これらの問題を踏まえ、パーキンソン病に対する細胞移植についてヒト細胞による *in vitro* 細胞モデルを構築する必要があると考えた。

2. 研究の目的

細胞移植にはドナー細胞とホスト環境の組み合わせにより、自家移植、HLA 適合移植、他家 (HLA 不適合) 移植がある。免疫反応の研究、および移植の効果の解析のため、パーキンソン病に対する細胞移植について *in vitro* での細胞移植モデルを構築することを第1の目的とした。さらに臨床で使用しているヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞を用いて、ドナー・ホスト間の組み合わせによる、移植後のドナー・ホスト間の神経シナプス結合形成への影響について調べることを第2の目的とした。

3. 研究の方法

パーキンソン病に対する細胞移植治療では、ドナー細胞を移植する先は線条体である。ドナー細胞であるドパミン神経は線条体の中型有棘細胞 (medium spiny neurons; MSNs) とシナプス結合を形成し、局所の神経回路の再構築を行うことにより効果を発揮する。本研究ではすでに移植治療の研究で開発されているプロトコルに基づき、ドパミン神経前駆細胞を誘導した。さらにいくつか報告されている MSNs の誘導プロトコルを検討し、使用する iPS 細胞でのプロトコルを最適化を行った。複数の細胞株を用いて、それぞれドパミン神経と MSNs を誘導する。ドパミン神経と MSNs を *in vitro* で共培養し、神経突起伸展、シナプス結合、電気的活動について解析した。

4. 研究成果

(1) 各 iPS 細胞株からの中型有棘神経 (MSNs) の誘導法および評価法の確立

MSNs の誘導法にはいくつかのプロトコルが報告されている。まずは各プロトコルを検討し、予備実験を行った。その結果、Arber C ら, Development 2015 の方法を採用することになった (参考文献)。この方法では単層培養で SMAD 阻害による神経分化誘導を行った後、9日目より Activin を加えるというプロトコルである。ヒト iPS 細胞を報告通りのプロトコルで誘導すると、viability が実験回毎に異なり、不安定であった。そこで、0日目から9日目まで浮遊培養による分化誘導とし、SMAD 阻害のための低分子化合物も2種追加した。9日目に細胞塊を酵素処理し、ラミニンフラグメントで coat したプレートに単層培養として播種し、Activin を加え培養を続けた。このようにプロトコルを最適化することで、ヒト iPS 細胞からの分化誘導効率が向上した。経時的に線条体の発生プロセスの代表的なマーカー (DLX2, GSX2, MASH1, CTIP2, NOLZ1, FoxP2, Nkx2.1, DARPP32, MEIS2) の発現が qPCR (図1, 2) および免疫染色 (図3) にて確認できた。

< 参考文献 >

Arber C, Precious SV, Cambray S, Risner-Janiczek JR, Kelly C, Noakes Z, Fjodorova M, Heuer A, Ungless MA, Rodríguez TA, Rosser AE, Dunnett SB, Li M (2015) Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. Development 142, 1375-1386.

図1 細胞株による分化効率の違い

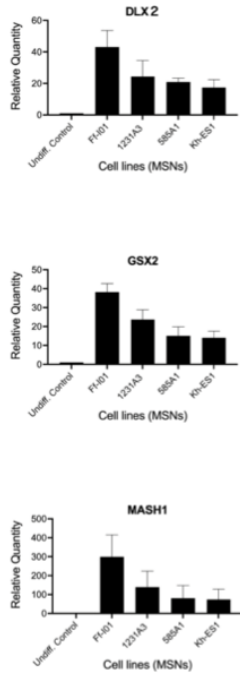


図2 線状体型神経の主要転写因子の経時的発現

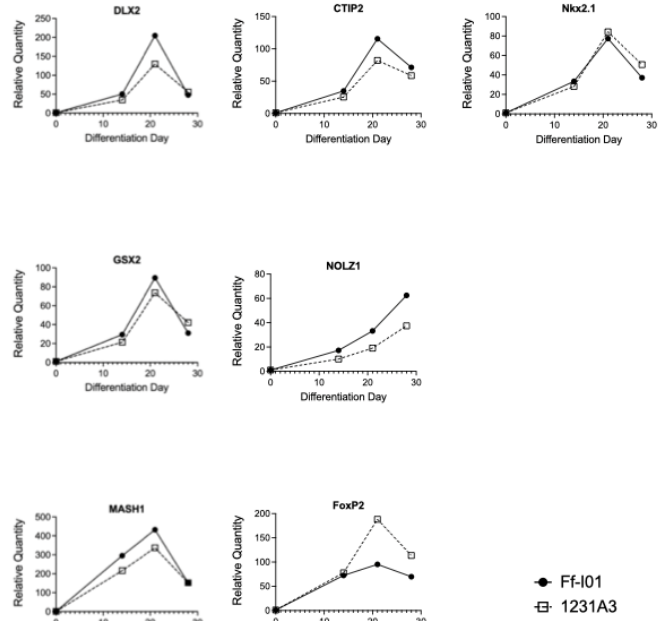
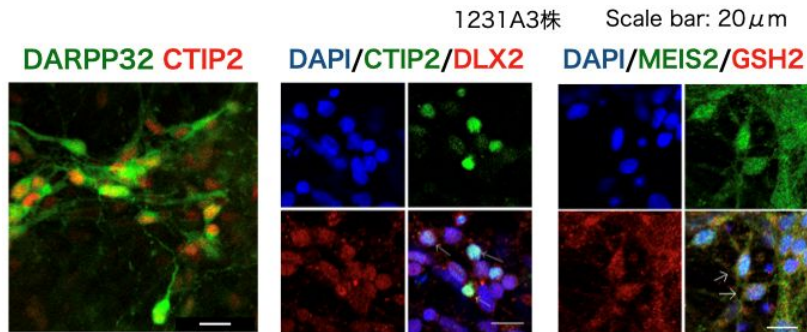


図3 iPS細胞由来中型有棘神経(分化28日)免疫染色像

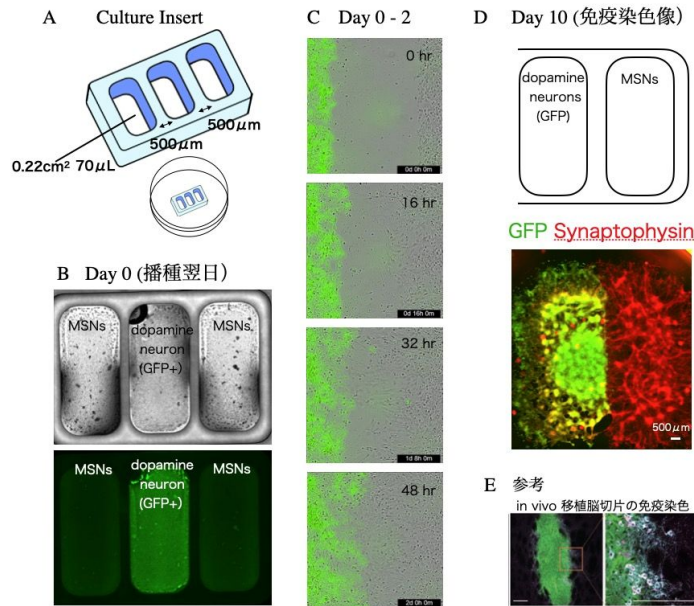


(2) 培養デバイスを用いた供培養系の確立

iPS細胞から誘導したドパミン

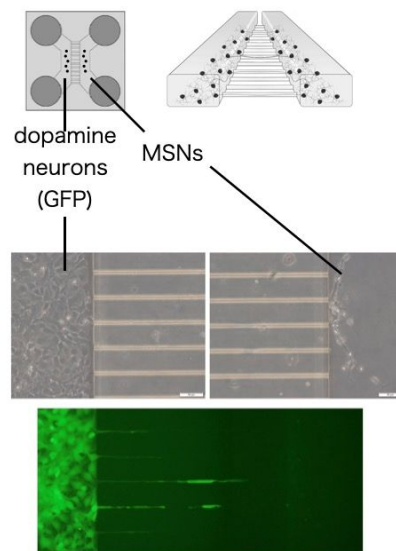
神経とそのシナプス結合のターゲットである MSNs をそれぞれ誘導し、約1ヶ月間共培養し、移植のモデルとした。播種の領域を分けて開始し、経時変化を観察した。まず、Culture Insert (ibidi社製) を使用して移植片を2次元に再現した *in vitro* 細胞モデル系を作成した(図4)。Culture Insert はシリコン製のチャンバー(図4A)で、ラミニンフラグメントでコーティングした培養器に設置後、細胞を播種する。翌日、細胞が接着していることを確認し、Culture Insert を外す(図4B)。以上の手順にて各群の細胞を500 μmの隙間を開けて領域を分けて高密度に培養を開始することができた。経時的に観察すると2日後には細胞群が移動し、隙間を埋めた(図4C)。そのまま10日培養し固定、免疫染色を行うと(図4D)、あたかも移植脳の切片(図4E)のような像が得られた。*in vitro* モデルでは神経軸索の観察などを詳細に行うことができた。

図4 Culture Insert を用いた供培養系細胞移植 *in vitro* モデル



次に神経間のシナプス結合を観察するために、xona microfluidics デバイスを用いて、ヒト多能性幹細胞由来ドパミン神経と MSNs 神経の共培養を行った。デバイスのスリットに沿って、軸索が両方向から伸展していく様子が観察できた (図 5)。

図5 xona microfluidics デバイスを用いた供培養系細胞移植 *in vitro* モデル



(3) Micro Electrode Array (MEA)によるシナプス解析

Maxwell 社の MEA デバイスを用いて、ドパミン神経、MSNs、ドパミン神経+MSNs、のそれぞれの培養の電気活動を経時的に観察した (図 6)。各細胞のデバイスへの接着具合を検討しコーティング剤および播種細胞密度の至適化を行った。結果、Ornithine + iMatrix のコーティング、チャンバーあたり 20 万細胞の播種により安定した培養が可能となった。分化 1 ヶ月程度の細胞を播種し、2 週間後より電気活動の検知が可能となった (図 6B)。アレー上の顕微鏡観察による細胞の部位パターンと電気活動のパターンがほぼ一致していることが確認された。個々の細胞の電気活動を反映する Active area, Mean Firing rate, Mean Spike Amplitude などは有意なパターンが検知されたが (図 6C)、同期発火などのシンクロナイゼーションを示

す Burst Frequency, Mean Spike per Burst, Mean Burst Duration などについては有意なパターンは得られなかった。ただしこれらは播種後最長 28 日までの観察であったため、今後はさらに長期の培養を行うことで、より詳細な移植モデルとすることが期待できる。そのためにはコンタミネーションのリスクを含め、長期に細胞が健康な状態で維持できる環境を整える検討が必要と考えられた。ドパミン神経と MSNs それぞれにつき自家、他家の様々な組み合わせを試したが、今回の検討では明らかな差は認められなかった(図 6C)。

図 6 Microelectrode array を用いた電気生理学的解析

A microelectrode array デバイス

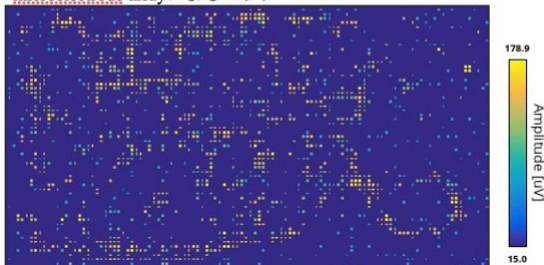


B 播種後2週間

光学顕微鏡観察像



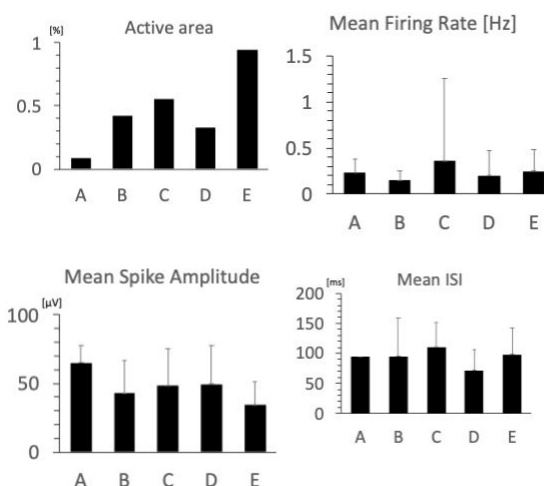
microelectrode array によるマップ



C 播種後28日 (分化誘導 計56日)での電気活動

誘導神経の種類とオリジナル細胞株の組み合わせ

	ドパミン神経	中型有棘神経
A	1231A3	1231A3
B	1231A3	404C2
C	1231A3	-
D	-	1231A3
E	-	404C2



実験動物を用いた系ではドナー-宿主間の神経シナプス結合がヒト神経-動物神経となるため、実際のヒト脳での移植を想定した詳細な検討が出来ない。ヒト-ヒト神経の結合をみるためには本研究のように宿主側の神経もヒト幹細胞から誘導する必要がある。本研究はヒト脳への細胞移植を試験管内で再現する *in vitro* 細胞移植モデルを開発したところに意義があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 森実飛鳥、高橋 淳	4. 巻 49
2. 論文標題 パーキンソン病に対する再生医療とリハビリテーション	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 総合リハビリテーション	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1552202127	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitahara Takehiro, Hideya Sakaguchi, Asuka Morizane, Tetsuhiro Kikuchi, Susumu Miyamoto and Jun Takahashi.	4. 巻 15
2. 論文標題 Axonal Extensions along Corticospinal Tracts from Transplanted Human Cerebral Organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 167-481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Yoshitake, Tomonori Nakamura, I Okamoto, Sayuri Gyobu-Motani, Hiroshi Ohta, Yukihiro Yabuta, Tomoyuki Tsukiyama, Chiduru Iwatani, Hideaki Tsuchiya, Masatsugu Ema, Asuka Morizane, Jun Takahashi, Takuya Yamamoto and Mitinori Saitou	4. 巻 102
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 620-638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Doi Daisuke, Hiroaki Magotani, Tetsuhiro Kikuchi, Megumi Ikeda, Satoe Hiramatsu, Kenji Yoshida, Naoki Amano, Masaki Nomura, Masafumi Umekage, Asuka Morizane and Jun Takahashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 3369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17165-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano-Kobayashi A, A Fukumoto, A Morizane, DT Nguyen, TM Le, K Hashida, T Hosoya, R Takahashi, J Takahashi, O Hori and M Hagiwara	4. 巻 6
2. 論文標題 Therapeutics potentiating microglial p21-Nrf2 axis can rescue neurodegeneration caused by neuroinflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eabc1428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abc1428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥、高橋 淳 iPS細胞を用いたパーキンソン病の細胞移植治療	4. 巻 23
2. 論文標題 iPS細胞を用いたパーキンソン病の細胞移植治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 再生医療と糖鎖 Glycoforum	6. 最初と最後の頁 A10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32285/glycoforum.23A10J	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥、高橋 淳	4. 巻 237
2. 論文標題 iPS細胞を用いたパーキンソン病に対する再生医療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 607-612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥、高橋 淳	4. 巻 37
2. 論文標題 パーキンソン病に対する細胞移植治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34449/J0001.37.04_0053-0057	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥	4. 巻 34
2. 論文標題 中枢神経疾患領域におけるiPS細胞を用いた細胞療法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 1296-1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Torikoshi S, Morizane A, Shimogawa T, Samata B, Miyamoto S, Takahashi J	4. 巻 10
2. 論文標題 Exercise Promotes Neurite Extensions from Grafted Dopaminergic Neurons in the Direction of the Dorsolateral Striatum in Parkinson's Disease Model Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 511-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JPD-191755.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sunohara Tadashi, Morizane Asuka, Matsuura Satoshi, Miyamoto Susumu, Saito Hirohide, Takahashi Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 MicroRNA-Based Separation of Cortico-Fugal Projection Neuron-Like Cells Derived From Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.01141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥	4. 巻 59
2. 論文標題 パーキンソン病に対する多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の現状	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床神経学	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneuroi.cn-001235	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 森実飛鳥、高橋 淳	4. 巻 76
2. 論文標題 パーキンソン病に対するiPS細胞を用いた細胞移植	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 544-549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 13件)

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 CELL THERAPY FOR PARKINSON ' S DISEASE WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS
3. 学会等名 15th International Conference on Alzheimer ' s and Parkinson ' s Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 CELL THERAPY FOR PARKINSON ' S DISEASE WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS
3. 学会等名 Innovations in Regenerative Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森実飛鳥、高橋 淳
2. 発表標題 iPS細胞を用いた神経疾患の再生治療
3. 学会等名 第41回 日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asuka Morizane, Tetsuhiro Kikuchi, Daisuke Doi, Jun Takahashi
2. 発表標題 DETECTION OF IMMUNE REACTION AFTER IPSC-DERIVED DOPAMINE NEURAL TRANSPLANTATION IN BRAIN
3. 学会等名 ISSCR 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森美 飛鳥, 土井 大輔, 菊地 哲広, 高橋 淳
2. 発表標題 脳でのiPS細胞移植治療における免疫反応検出法
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asuka Morizane, Tetsuhiro Kikuchi, Daisuke Doi, Jun Takahashi
2. 発表標題 CONTROL OF IMMUNE RESPONSE IN THE CELL THERAPY FOR PARKINSON ' S DISEASE
3. 学会等名 ISSCR2019 LA Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Translating a stem cell-derived dopamine cell to a clinical drafting trial for PD
3. 学会等名 5th World Parkinson Congress, Kyoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森実飛鳥
2. 発表標題 神経疾患に対するiPS細胞を用いた細胞移植治療の臨床応用
3. 学会等名 R&Dカンファレンス 九州大学脳神経外科(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Clinical application of iPS cell therapy for Parkinson's disease
3. 学会等名 Cell Therapy world asia 2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森実 飛鳥, 土井 大輔, 菊地 哲広, 高橋 淳
2. 発表標題 人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来神経前駆細胞を用いた 細胞移植治療と移植免疫
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Morizane, Jun Takahashi
2. 発表標題 Clinical Application of iPS Cell Therapy For Parkinson's Disease
3. 学会等名 Cell & Therapy world asia 2019 SelectBI0(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 East Asia Neurology Forum 2018 "Recent Advances in Clinical & Translational Research in Neurology" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Morizane, Tetsuhiro Kikuchi, Takuya Hayashi, Hiroshi Mizuma, Sayuki Takara, Takashi Shiina, Hirohito Ishigaki, Yasushi Itoh, Keisuke Okita, Emi Yamasaki, Daisuke Doi, Hiroataka Onoe, Kazumasa Ogasawara, Shinya Yamanaka, Jun Takahashi
2. 発表標題 MHC MATCHING IMPROVES ENGRAFTMENT OF IPSC-DERIVED NEURONS IN NON-HUMAN PRIMATES
3. 学会等名 ISSCR 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 THE ASIA-PACIFIC ASSOCIATION FOR NEURAL TRANSPLANTATION AND REPAIR: INAUGURAL MEETING (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 Changing the Face of Modern Medicine: Stem Cell and Gene Therapy Organized Jointly by ESGCT, ISSCR and SFTCG (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 Cell therapy for Parkinson's disease with iPSCs: from bench to bed
3. 学会等名 1st NIFDS-PMDA Joint Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Morizane
2. 発表標題 HLA-matched grafting in primates with induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 28th Annual Meeting of the Network for European CNS Transplantation & Restoration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 神経前駆細胞の選別方法	発明者 高橋淳, 森実飛鳥, 春原匡, 齊藤博英, パーキャラム, 余越萌	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/029999	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 METHOD FOR INDUCING DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS INTO NEURAL PRECURSOR CELLS	発明者 高橋淳, 森実飛鳥,	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、16/141,548	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

英国	エジンバラ大学	カーディフ大学		
----	---------	---------	--	--