

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07509

研究課題名(和文) 光操作とiPS細胞を用いたパーキンソン病に対する自律調節性神経細胞移植療法の開発

研究課題名(英文) Development of the optogenetic autoregulated cell transplantation for Parkinson's disease

研究代表者

大山 彦光 (Oyama, Genko)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00407256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトInduced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)に光反応性蛋白であるChannelrhodopsinを発現させ、ドパミン神経細胞へ分化・誘導した。光反応性ドパミン神経細胞の青色光による神経活動促進を確認し、ドパミン神経細胞の発火が最適化する光刺激条件をみいだすことに成功した。この光反応性ドパミン神経を調整するための入力としてLocal field potential (LFP)に着目し、LFPを電気生理学的バイオマーカーとしてセンシングし、それに応じた適切な光刺激を自動アウトプットする「自律調整性ドパミン神経細胞移植療法」の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病患者に対するiPSC由来ドパミン神経細胞移植では、移植片のドパミン放出を制御可能にしない限り、ジスキネジアの問題は解決しないことが予想される。本研究の結果から自律調整性ドパミン神経細胞移植療法がヒトで応用可能になれば、細胞移植療法後に予想されるジスキネジアの問題が解決することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we expressed Channelrhodopsin in Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) and differentiated it into dopamine neurons. We confirmed that the neuronal activities of photoreactive dopamine neurons were increased by the blue light and succeeded in finding the adequate condition for phot-stimulation. We studied the potential of Local field potential (LFP) as a biomarker to modulate dopamine neurons. Our result may lead to the development of "the self-regulate dopamine neuron transplantation."

研究分野：神経内科学

キーワード：transplantation iPSC cell Parkinson's disease optogenetics

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、ドパミン神経細胞が進行性に脱落し、線条体におけるドパミン欠乏が生じる結果、基底核回路機能に異常をきたし、動作緩慢、筋強剛、振戦、姿勢反射障害などの運動障害を中心とした、様々な症状を呈する神経変性疾患である。内服や貼付剤によるドパミン補充療法が治療のゴールデン・スタンダードであるが、長期経過とともに有効治療域が狭くなり、薬効が早く切れるウェアリングオフ現象やジスキネジアという不随意運動などの運動合併症が問題となる。運動合併症に対するデバイス補助治療として、持続的にゲル状のレボドパ製剤を経腸注入する LCIG と、電気刺激によって基底核回路異常を調整するニューロモジュレーション法である DBS があり、良好な治療効果が認められている (Wirdefeldt K. CNS drugs, 2016)。しかし、LCIG では胃瘻設置やデバイスの重さが問題となり、DBS においては、従来の電気刺激では選択性の高い刺激ができないため、目的神経核以外に刺激範囲が及び、錐体路症状などの様々な刺激副作用が生じることが問題となる。

内服の治療域を拓げる究極の治療がドパミン神経細胞移植療法であり、海外では 1980 年代からドパミン神経細胞の移植療法が試みられてきた。ドパミン神経細胞の供給源として、中絶胎児やブタの黒質細胞、受精卵から作成した万能細胞である ES 細胞由来のドパミン神経細胞なども試みられたが、従来の細胞移植療法では移植細胞の癌化が問題となったのみならず、移植片からのドパミン放出が制御できず、薬効オフ時でも出現するオフ・ジスキネジアが問題となった (Hagell P. Nat Neurosci. 2002)。

近年、山中らが体細胞に数種類の遺伝子を導入して、分化万能性と自己複製能を持った Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) を樹立した (Takahashi K. Cell. 2006)。体細胞から誘導できることから倫理的問題が少なく、本邦において PD 患者に対する iPSC 由来ドパミン神経細胞移植の臨床治験が計画されているが、iPSC 由来神経細胞移植においても、移植片のドパミン放出を制御可能にしない限り、ジスキネジアの問題は解決しないことが容易に予想される。

2. 研究の目的

本課題では前述のジスキネジアの問題を解決すべく、光遺伝学を応用した、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、特定の神経細胞に、特定波長の光を照射することによって神経細胞特異的に興奮または抑制することができる。in vivo で秒単位の時間的精度で制御ができる技術である (図 1; Deisseroth K. Nat Methods, 2011)。iPSC に光反応性蛋白を発現させた上で移植することで、移植片からのドパミン放出を光操作によって制御できるようになる。

さらに、PD 患者の基底核で測定した LFP では、帯域 (18-30Hz) の信号が亢進する。この信号はレボドパ治療および DBS 治療により消失し、ジスキネジアが生じると帯域 (30-80Hz) の信号が増強することが知られている (図 2; Aonso-Frech F, Bain 2006)。この LFP 信号変化を電気生理学的バイオマーカーとし、光刺激を変化させることで、症状に応じたドパミン放出の自律調整が可能になると考案した。

本研究は、PD の症状に応じて変化する LFP 信号を電気生理学的バイオマーカーとして測定し、LFP 信号に応じて光刺激を調節し、移植した iPSC 由来ドパミン神経細胞からのドパミン放出を自律的にコントロールする「自律調節性神経細胞移植療法」を開発し、PD に対する新たな再生治療法の確立を目的とする (図 3)。

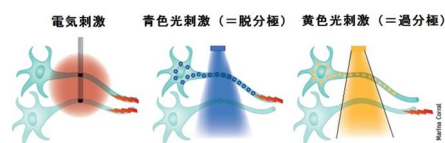


図 1 光刺激と電気刺激の違い

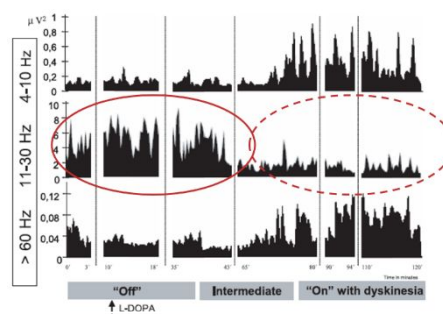


図 2 治療による LFP の変化

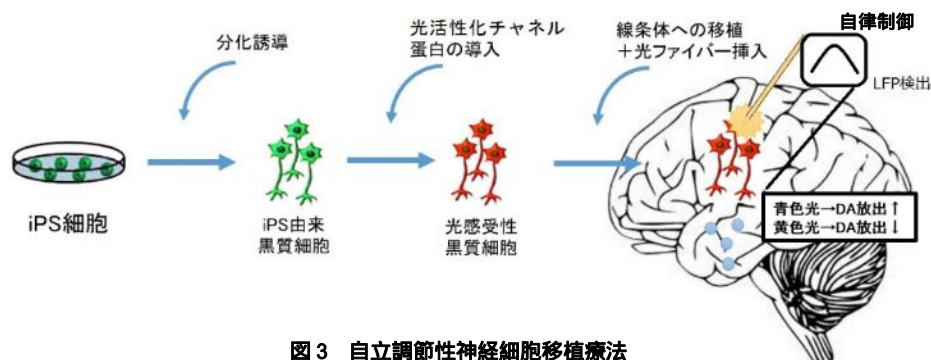


図 3 自律調節性神経細胞移植療法

3. 研究の方法

(1) 光反応性ドパミン神経細胞の樹立および in vitro でのドパミン放出能の評価

フィーダーフリー条件で培養されたヒト iPSC をドパミン神経細胞へ誘導する技術を用いてドパミン神経細胞へ分化させる。そこに、青色光で脱分極させる Channelrhodopsin と、黄色光で過分極させる archaerhodopsin を、アデノウイルスベクターを用いて発現させ、光反応性ドパミン神経細胞を樹立する。光反応性ドパミン神経細胞の活動性について、microelectrode array (MEA) を用いた電気化学的手法により、青色光でドパミン放出が促進し、黄色光で抑制されることを確認し、光反応性ドパミン神経細胞の品質を管理する。

(2) 生体内における光反応性ドパミン神経の光刺激応答および症状改善効果の検討

PD・ジスキネジアモデルマウスにおける光反応性 iPSC 由来ドパミン神経細胞移植の in vivo でのドパミン放出の評価と、行動評価を行う。

PD・ジスキネジアモデルマウス作成および光反応性ドパミン神経細胞移植

免疫不全マウス (NOD-SCID) の線条体に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を定位的注入して破壊し、PD モデルマウス作成する。これに、光反応性ドパミン神経細胞の移植を定位的に行い、光刺激による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評価し、ロタロッドおよびコリダータスクでも運動症状の改善を実証する。また、ジスキネジアモデルマウスではレボドパ注入するとジスキネジア様の回旋行動を起こすため、光抑制によるドパミン放出抑制によって回旋行動が抑制できることを立証する。さらに、光刺激または光抑制の症状改善効果を定量的に評価し、光操作による症状の制御条件を検討する。

(3) 電気生理学的バイオマーカー (LFP) センシングによるドパミン放出制御の検討

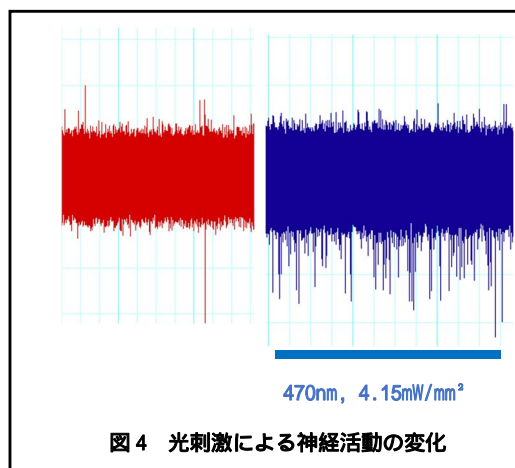
PD・ジスキネジアモデルマウスの基底核 (視床下核および淡蒼球) に記録電極を挿入し LFP の変化を測定し、オフの指標である バンドおよびジスキネジアの指標である バンドの強さと、運動症状の相関を調べ、それを基に、ステップ 2 で得られた運動症状改善に必要な光制御を行うための光刺激強度と LFP 信号の関係を検討する。

上記各ステップで得られた知見を総合し、LFP を電気生理学的バイオマーカーとしてセンシングし、外部コンピュータにインプットし、それに応じた適切な光刺激を自動アウトプットするプログラムを作成し、自律的に光刺激強度を調整できる「自律調整性ドパミン神経細胞移植療法」を開発する。

4. 研究成果

(1) フィーダーフリー条件で培養されたヒト iPSC に、Channelrhodopsin を発現させ、ドパミン神経細胞へ分化・誘導させることに成功した。光反応性ドパミン神経細胞の活動性について、MEA を用い、青色光で神経活動が促進することを確認した (図 4)。さらにドパミン神経細胞の発火が最適化する光刺激条件を検討し、最適な光刺激条件を得ることができた。

(2) NOD-SCID マウスの線条体に 6-OHDA を定位的注入して破壊し、PD モデルマウス作成し、レボドパ注入によるジスキネジアモデルマウスを作成した。ドパミン神経細胞の移植を態的に行い、生着条件を確認することができた。



(3) マウス脳内に記録電極を挿入し LFP を測定した。ノイズ除去の必要があり、測定環境について検討を行い、測定環境を改善した。

本研究の結果から、光反応性ドパミン神経細胞が安定して作成できるようになり、最適な神経細胞発火を起こす光刺激条件を見出すことに成功した。LFP の測定により、LFP を電気生理学的バイオマーカーとしてセンシングし、それに応じた適切な光刺激を自動アウトプットするプログラムが作成できれば、「自律調整性ドパミン神経細胞移植療法」の開発につながる事が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oyama Genko, Hattori Nobutaka	4. 巻 128
2. 論文標題 New modalities and directions for dystonia care	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 559 ~ 565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02278-9	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryota Nakamura, Genko Oyama, Takayuki Jo, Kei-ichi Ishikawa, Risa Nonaka, Yasushi Shimo, Wado Akamatsu, Nobutaka Hattori.
2. 発表標題 Transplantation of human iPS cell-derived dopamine neural progenitor cells for Parkinson's disease
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genko Oyama, Taku Hatano, Atsushi Umemurua, Nobutaka Hattori.
2. 発表標題 Deep Brain Stimulation in Movement and Psychiatric Disorders.
3. 学会等名 "Takamatsu" International Symposium for PD & MD. (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------