

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07112

研究課題名(和文)細胞接着分子の制御による黒質-線条体系ドパミン神経投射再生への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to regeneration of the nigrostriatal dopaminergic neural projection by regulating cell adhesion molecules

研究代表者

泉 安彦 (Izumi, Yasuhiko)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60456837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞由来ドパミン神経の移植はパーキンソン病の有望な治療戦略である。我々はドパミン神経による線条体支配に細胞接着分子インテグリン 5 1が関与することを示したので、インテグリン 5過剰発現ドパミン神経のパーキンソン病モデルマウスへの移植効果を検討した。インテグリン 5遺伝子をノックインしたマウス胚性幹細胞の作製に成功し、ドパミン神経へと分化させた。パーキンソン病モデルマウスに移植したが、生着数はごく僅かで、パーキンソン病様症状の改善には繋がらなかった。実際、インテグリン 5ノックインES細胞のドパミン神経への分化効率も低く、さらなる分化誘導方法・移植術について検討する必要があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞由来細胞の移植治療において、現在は、遺伝子変異の無い(無傷な)細胞移植が求められている。本研究のように、移植細胞の機能を高めるという考え方は、既存の概念からのパラダイムシフトを提示するものである。インテグリン 5 1の機能を高めることで黒質-線条体系ドパミン神経投射を再生することができれば、パーキンソン病に対して副作用が少なく治療効果が高い細胞移植療法に繋がる可能性がある。しかし、本研究の結果のように幹細胞は株ごとに異なる挙動を示すこともあるため、遺伝子操作した幹細胞株ごとでの分化条件の調整が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of stem cell-derived dopaminergic neurons is a promising therapeutic strategy for Parkinson's disease. Since we showed that the cell adhesion molecule integrin 5 1 is involved in striatal innervation by dopaminergic neurons, we investigated the effect of transplantation of integrin 5-overexpressing dopaminergic neurons into Parkinson's disease model mice. We succeeded in producing integrin 5 knock-in mouse embryonic stem cells, and differentiated them into dopaminergic neurons. They were transplanted to Parkinson's disease model mice, but the number of engrafts was very small, and it did not lead to improvement of the disease-like symptoms. In fact, it was found that the efficiency of differentiation of integrin 5 knock-in ES cells into dopaminergic nerves is low and that further investigations about differentiation induction methods and transplantation techniques are necessary to resolve it.

研究分野：神経薬理学

キーワード：パーキンソン病 ドパミン神経 線条体 インテグリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS (人工多能性幹) 細胞が樹立され、再生医療への応用が期待されている。中脳黒質-線条体系ドパミンニューロン変性を主徴とするパーキンソン病においても、iPS 細胞を臨床応用に利用する研究(治験)が進んでいる。現在進行中の治験では、ヒト iPS 細胞から分化させたドパミン神経前駆細胞を患者の線条体に細胞移植し、欠乏したドパミンを補充する戦略である。しかし、パーキンソン病を真に克服するためには、ドパミン神経を中脳黒質に移植し、線条体へ軸索を誘導することが必要である。

2. 研究の目的

我々はドパミン神経による線条体神経支配に細胞接着分子であるインテグリン $\alpha 5$ が関与することを明らかにした(Sci Rep. 2017;7:42111)。そこで、インテグリン $\alpha 5$ 過剰発現ドパミン神経を移植すると効率よく線条体の神経回路に組み込まれると考えられた。これまでの検討で、インテグリン $\alpha 5$ を過剰発現させた ES 細胞は神経分化効率が低下しており、細胞移植には不向きであった。そこで、ゲノム編集によりドパミントランスポーター遺伝子にインテグリン $\alpha 5$ 遺伝子をヘテロノックインした ES 細胞を作製し、神経分化誘導後にインテグリン $\alpha 5$ を発現するという戦略に変更した。本研究の目的は、インテグリン $\alpha 5$ ノックイン ES 細胞から分化させたドパミン神経をパーキンソン病モデルマウスに移植し、神経回路を再構築できるかを検証することである。

3. 研究の方法

(1) ドパミン神経への分化誘導法

マウス ES 細胞は、フィーダー細胞を用いた SDIA 法 (stromal cell-derived inducing activity 法) または微細加工したスフェロイド形成培養用低接着培養容器で無血清凝集浮遊培養法 (Serum-Free Embryonic Body quick : SFEBq 法) により神経に分化誘導した。

(2) 片側パーキンソン病モデルマウスの作製

雄性 5 週齢 C57BL6/N マウスに 0.2% アスコルビン酸含有 PBS に溶解した 6-hydroxydopamine (4 μg) を 30G の針を用いて左脳の線条体に投与した。(ブレグマを基点にして座標: AP: -2.0/ML: +0.5/DV: +3.7 mm、投与速度: 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、全量: 2.0 μl)

(3) パーキンソン病モデルマウスの行動学的解析

6-hydroxydopamine 傷害の 1、2 週間後、生理食塩液で希釈した apomorphine (1 mg/kg) を腹腔内投与した。投与直後から 30 分間に誘発される回転運動を計測した。

(4) 細胞移植

22G の針を用いて、ES 細胞由来細胞を左脳の線条体に投与した。(ブレグマを基点にして座標: AP: -2.0/ML: +0.5/DV: +3.7 mm、投与速度: 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、全量: 2.0 μl)

4. 研究成果

(1) 細胞移植の条件検討

マウス ES 細胞を SDIA 法により分化誘導した細胞をパーキンソン病モデルマウスに移植すると、増殖細胞の混入から腫瘍が発生した。抗腫瘍性抗生物質のマイトマイシン C を処置することで腫瘍化は抑制された。しかし、細胞移植時に単細胞にすると生着性は低く、細胞塊で移植すると生着性が向上することが分かった。さらなる腫瘍化の抑制のため、フィーダー細胞を用いず、細胞塊で培養を行う SFEBq 法が妥当であると判断した。

(2) SFEBq 法によるドパミン神経への分化誘導

既報に基づき、低接着 96well plate を用いて SFEBq 法を行った。ドパミン神経への分化効率を上げるため、種々の分化誘導因子を追加した。改良した SFEBq 法で分化させると増殖性細胞が減少し、腫瘍化のリスクは軽減したと考えられる。しかし、低接着 96well plate で作製した細胞塊は大きく移植針に適合せず、また移植には大量の細胞塊が必要であった。そこで、微細加工したスフェロイド形成培養用低接着培養容器を用いて SFEBq 法を適用すると、移植可能な小さく均一な細胞塊を大量に調製することができた。

(3) パーキンソン病モデルマウスへの細胞移植効果

ノックイン ES 細胞を SFEBq 法でドパミン神経に分化させ、パーキンソン病モデルマウスの線条体に移植した。しかし、生着数はごく僅かで、パーキンソン病様症状の改善には繋がらなかった。したがって、行動改善に必要なドパミン神経の数を移植できなかった可能性がある。

(4)分化誘導条件の最適化

細胞移植による効果が見られなかったことから、SFEBq 法による分化誘導法の見直しが必要となった。分化に用いた D-MEM/Ham's F-12 培地では分化細胞の生存率が悪く、G-MEM 培地に変更することで改善することが判明した。また、細胞塊のままでは、正確にドパミン神経を同定できなかったため、細胞塊から単細胞を得るのに必要な細胞の剥離条件を検討した。ヒト幹細胞での報告は汎用されている Accutase と Rho キナーゼ阻害薬の併用はマウス ES 細胞では悪影響を及ぼし、Accutase の単独使用が細胞にダメージが最も少ないことが分かった。

ノックイン ES 細胞からのドパミン神経分化効率を評価したところ、インテグリン 5 をノックインした ES 細胞では、ノックインしていないものと比べ、分化率が低かった。当初は、インテグリン 5 はドパミン神経に分化した後発現するため、分化効率には影響を与えない想定であった。しかし、インテグリン 5 ノックイン ES 細胞では、神経分化効率が低下していたことから、細胞株ごとに異なる挙動を示すこと示された。ES 細胞株ごとの不均一性を改善しなければ、インテグリン 5 遺伝子の導入の影響は判定できないことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Izumi Yasuhiko, Tatsumoto Ai, Horiuchi Naoko, Arifuku Monami, Uegomori Momoko, Kume Toshiaki, Koyama Yutaka	4. 巻 149
2. 論文標題 TPNA10168, an Nrf-2 activator, attenuates inflammatory responses independently of Nrf2 in microglial BV-2 cells: Involvement of the extracellular-signal-regulated kinase pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.02.004	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 Kato Hajime, Sato Hiroyasu, Okuda Michiaki, Wu Jun, Koyama Shingo, Izumi Yasuhiko, Waku Tomonori, Iino Mitsuyoshi, Aoki Masashi, Arawaka Shigeki, Ohta Yasuyuki, Ishizawa Kenichi, Kawasaki Kanan, Urano Yasuomi, Miyasaka Tomohiro, Noguchi Noriko, Kume Toshiaki, Akaike Akinori, Sugimoto Hachiro, Kato Takeo	4. 巻 11
2. 論文標題 Therapeutic effect of a novel curcumin derivative GT863 on a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21678421.2021.2012699	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 Matsumoto Mami, Miyamoto Moeri, Sawahata Masahito, Izumi Yasuhiko, Takada-Takatori Yuki, Kume Toshiaki	4. 巻 147
2. 論文標題 Establishing a high throughput drug screening system for cerebral ischemia using zebrafish larvae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 138~142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.06.006	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 Sawahata Masahito, Izumi Yasuhiko, Akaike Akinori, Kume Toshiaki	4. 巻 173
2. 論文標題 In vivo brain ischemia-reperfusion model induced by hypoxia-reoxygenation using zebrafish larvae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 45~52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainresbull.2021.05.003	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 Taguchi Kazuya, Izumi Yasuhiko, Takada-Takatori Yuki, Akaike Akinori, Kume Toshiaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Protective Effect of 2,3-Dihydroxy-4,6-dimethoxychalcone on Glutamate-Induced Neurotoxicity in Primary Cortical Cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 184 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00718	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 Inose Yuri, Izumi Yasuhiko, Takada-Takatori Yuki, Akaike Akinori, Koyama Yutaka, Kaneko Shuji, Kume Toshiaki	4. 巻 736
2. 論文標題 Protective effects of Nrf2/ARE activator on dopaminergic neuronal loss in Parkinson disease model mice: Possible involvement of heme oxygenase-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135268 ~ 135268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135268	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 Yamamoto K, Izumi Y, Arifuku M, Kume T, Sawada H.	4. 巻 9
2. 論文標題 -Synuclein oligomers mediate the aberrant form of spike-induced calcium release from IP3 receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52135-3.	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 Nakagawa S, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T.	4. 巻 519
2. 論文標題 Increased CCL6 expression in astrocytes and neuronal protection from neuron-astrocyte interactions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 777-782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.030.	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 Takada-Takatori Y, Takeda Y, Imai R, Izumi Y, Akaike A, Tsuchida K, Kume T.	4. 巻 141
2. 論文標題 Effects of 2'-3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone derived from green perilla on auricle thickness in chronic contact dermatitis model mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.08.004.	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 Takada-Takatori Y, Tomii Y, Takemasa S, Takeda Y, Izumi Y, Akaike A, Tsuchida K, Kume T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Protective Effects of 2',3'-Dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone Derived from Green Perilla Leaves against UV Radiation-Induced Cell Injury in Human Cultured Keratinocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1936-1941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00618.	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 Iwasaki M, Izuo N, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T.	4. 巻 42
2. 論文標題 Protective Effect of Green Perilla-Derived Chalcone Derivative DDC on Amyloid Protein-Induced Neurotoxicity in Primary Cortical Neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1942-1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00657.	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 Takada-Takatori Y, Nakagawa S, Kimata R, Nao Y, Mizukawa Y, Urushidani T, Izumi Y, Akaike A, Tsuchida K, Kume T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Donepezil modulates amyloid precursor protein endocytosis and reduction by up-regulation of SNX33 expression in primary cortical neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47462-4.	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉安彦、小林史佳、八巻耕也、久米利明、小山豊
2. 発表標題 ミクログリアにおけるNrf2活性化薬TPNA10168による抗炎症性作用の機序
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井川 紗央里、泉 安彦、久米 利明、八巻 耕也、小山 豊
2. 発表標題 神経炎症に対するNrf2活性化薬によるドパミン神経保護作用～人工知能による計数～
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野々口 茉奈、高鳥 悠記、今井 理裳、庄野 七海、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴、尾崎 恵一
2. 発表標題 慢性接触皮膚炎モデルマウスにおける新規Nrf2-ARE経路活性化物質の作用機序の解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉 安彦、上籠 桃子、小林 史佳、八巻 耕也、久米 利明、小山 豊
2. 発表標題 Nrf2活性化薬の抗炎症作用にNrf2遺伝子が関与しない可能性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野々口 茉奈、高鳥 悠記、今井 理崇、庄野 七海、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴、尾崎 恵一
2. 発表標題 慢性接触皮膚炎モデルマウスにおけるNrf2-ARE経路活性化物質の抗炎症作用機序
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪瀬 由莉、泉 安彦、片岡 春恵、小山 豊、金子 周司、久米 利明
2. 発表標題 新規Nrf2-ARE活性化物質のヘムオキシゲナーゼ-1を介した抗パーキンソン病作用
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 真実、宮本 萌里、澤幡 雅仁、小田 果奈、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明
2. 発表標題 低酸素処置によるゼブラフィッシュ脳虚血モデルの作出と薬効評価系の構築
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立本愛、泉安彦、有福萌波、堀内奈緒子、杉山峰是、井川紗央里、八巻耕也、久米利明、小山豊
2. 発表標題 ミクログリアにおけるNrf2-ARE経路活性化物質による炎症性サイトカインの抑制作用とその機序の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中未紗、高鳥悠記、木全璃子、泉安彦、赤池昭紀、久米利明、土田勝晴
2. 発表標題 ドネベジルのSorting Nexin 33発現量上昇を介したA 抑制作用
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪瀬 由莉、泉 安彦、片岡 春恵、小山 豊、金子 周司、久米 利明
2. 発表標題 新規 Nrf2-ARE 活性化物質のヘムオキシゲナーゼ-1 を介したドパミン神経保護作用
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中 未紗、高鳥 悠記、木全 璃子、泉安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴
2. 発表標題 ドネベジルは細胞内輸送分子 Sorting Nexin 33 を介して APP の非アミロイドプロセッシングを賦活 する
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立本愛、泉安彦、有福萌波、堀内奈緒子、杉山峰是、井川紗央里、八巻耕也、久米利明、小山豊
2. 発表標題 ミクログリアにおけるNrf2-ARE経路活性化物質による炎症性サイトカインの抑制作用とその機序の解析
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島小波、高島悠記、高良香葉子、野々口茉奈、庄野七海子、泉安彦、赤池昭紀、宮坂知宏、久米利明、土田勝晴
2. 発表標題 アルツハイマー病治療薬による過剰タウリン酸化抑制作用 ドネペジルのタウリン酸化 抑制
3. 学会等名 第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉安彦、立本愛、有福萌波、堀内奈緒子、杉山峰是、井川紗央里、八巻耕也、久米利明、小山豊
2. 発表標題 Nrf2活性化薬によるミクログリア活性化の抑制作用とその機序解析
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 悠記、水川 裕美子、漆谷 徹郎、泉 安彦、赤池 昭紀、土田 勝晴、久米 利明
2. 発表標題 ドネペジルは細胞内輸送制御分子sorting nexin 33の発現量を増大してアミロイド前駆タンパク質のエンドサイトーシスを減少させる
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井 理袿、高島 悠記、野々口 茉奈、庄野 七海子、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明、土田 勝晴
2. 発表標題 青ジソ由来DDCによる慢性接触皮膚炎モデルマウスの耳介肥厚抑制作用の機序
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
---------	---------