

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07854

研究課題名(和文) 中脳神経回路網の機能再生を目指した新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Towards the establishment of new regenerative strategy of midbrain neuronal networks

研究代表者

西村 周泰 (Nishimura, Kaneyasu)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90527889

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)：本研究課題の目的は、薬剤、多能性幹細胞およびダイレクトコンバージョン法を有機的に融合させた発想・手法をもとに、失われた中脳ドパミン神経回路網の機能的な再生および形態的な再生を促す新規治療法の開発となる基盤を構築することである。この目的のもと、これまでにヒトiPS細胞から、低分子化合物を用いた方法により、特定の脳領域(線条体および腹側中脳)の神経細胞を誘導する技術を確立し、安定したプロトコルの作製に成功している。さらにはダイレクトコンバージョン法によるドパミン神経誘導法の確立も成功し、研究基盤を確立した。さらには実験動物への移植手技および移植後の評価方法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、多能性幹細胞およびダイレクトコンバージョンを用いた神経誘導技術をそれぞれ確立することができた。今後、これらの異なる細胞運命の決定様式を解き明かすための研究が必要になると考えられる。また本研究で対象とした神経細胞は、成体において一度失われると再生できないことが知られており、これらを産み出す方法の作製は、近年注目されている再生医療へ通じる基盤研究であり、本研究課題によりその研究基盤を構築できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to establish the development of novel therapeutic strategies that promote functional and morphological regeneration of lost midbrain dopaminergic neural networks, based on ideas and methods that combine drugs, pluripotent stem cells, and direct conversion methods. Here we have established a technique for inducing neurons in specific brain regions (striatum and ventral midbrain) from human iPS cells by a method using small compounds and have succeeded in generation of a stable protocol. We have also succeeded in establishing a dopaminergic neuron induction method using the direct conversion method. Furthermore, we have established transplantation techniques for animals and evaluation methods after transplantation.

研究分野：神経再生

キーワード：パーキンソン病 ドパミン神経 多能性幹細胞 ダイレクトコンバージョン 神経再生 細胞運命決定 細胞移植

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、中脳ドパミン神経回路網の選択的な脱落・変性によって引き起こされる神経変性疾患であり、日本での患者数は約16万人である(平成26年、厚生労働省統計)。現行の医療制度では、薬物治療や脳深部刺激療法などの対処療法が主流であるが、幹細胞移植治療や遺伝子治療などの新しい治療法の開発が進んでいる。これらの新しい治療法の開発を促進するために我々は、「①発生生物学と幹細胞研究の融合」および「②幹細胞研究と創薬研究の融合」という視点からこれらの課題に取り組むことを目指した。まず「①発生生物学と幹細胞研究の融合」については、ヒトの発生原理を基盤として、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からの器官形成のロジックを組み立てることが、再生医療分野の研究において新たな視点でヒントを与える基盤となると考え、研究計画を立案した。「②幹細胞研究と創薬研究の融合」については、幹細胞を用いた神経再生研究を後押しするには、外因的な刺激によりこれらを正しい方向に修飾する手法の開発が必要であると考え、その点において低分子化合物や薬は有用なツールであると位置付け、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究課題では、パーキンソン病の治療に焦点をあて、薬、多能性幹細胞および*in vivo direct reprogramming*を有機的に融合させた発想・手法をもとに、失われた中脳ドパミン神経回路網の機能的な再生および形態的な再生を促す新規治療法の開発となる基盤研究を進める。さらには将来の臨床応用へ向けた根拠となる基盤の創成を目指す。この目的のもと、本研究課題では以下の2点を目標として設定した。

- 1) 発生生物学と幹細胞生物学を融合させることにより、*in vitro*における細胞運命の詳細な制御を目指す。
- 2) 神経薬理学および幹細胞生物学を融合させた創薬研究基盤を確立し、成体脳における神経回路機能を再生させる医療の開発を目指す。

3. 研究の方法

理化学研究所バイオリソースセンタ実験に用いたヒトiPS細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターから取得した。ヒトiPS細胞からドパミン神経誘導法については、独自に作製したものをを用いた(西村ら、未発表)。誘導過程における細胞の特性評価は、定量的PCRおよび免疫染色によって実施した。実験に使用した免疫不全ラット(F344-*Il2rg^{em1/exas}*)は、大阪大学から購入し、脳移植実験は麻酔下において苦痛の軽減を最大限行いながら実施した。脳サンプルの取得には深麻酔下において、灌流固定を行い、脳摘出を行った。その後、切片サンプルを作製し免疫染色による評価を行った。ヒトiPS細胞から線条体神経誘導法の確立は、発生過程において線条体の形成を担うシグナル分子の機能を低分子化合物に置き換えることで実施した。誘導した細胞の評価は、定量的PCR及び免疫染色によって実施した。ダイレクトコンバージョン法の確立については、PiggyBacベクターを用いて*ASCL1*と*LMX1A*遺伝子をヒトiPS細胞に導入した。両遺伝子の発現はドキシサイクリンの添加依存的に誘導できるシステムを採用した。このヒトiPS細胞にドキシサイクリンを添加し、時間経過とともに遺伝子発現解析および免疫染色による特性評価を行い、機能的解析には多電極アレイを用いた。

4. 研究成果

(1)ヒトiPS細胞からドパミン神経誘導法の至適化

取得したヒトiPS細胞について拡大培養を行い、本研究室で研究を進めるにあたり十分数のストック細胞を作製した。本細胞株を用いて、これまでに独自に確立した誘導プロトコルを用いて、ドパミン神経前駆細胞への分化誘導法の標準化を行った。誘導効率等の確認には、細胞移植実験に用いることを想定している誘導17日目の細胞を用いて、免疫染色による各種マーカーの陽性率の評価を行った。まず、誘導した細胞における神経誘導のステージを確認するために、神経前駆細胞マーカーである*SOX2*および幼若神経マーカーである*doublecortin (DCX)*の陽性率の確認を行ったところ、それぞれ約87%と13%であり、誘導した細胞が効率よく神経前駆細胞の状態を保っていることが確認された。さらに中脳ドパミン神経前駆細胞のマーカーである*LMX1A*、*FOXA2*、*OTX2*はいずれも90%以上の陽性率であり、安定して中脳ドパミン神経前駆細胞を誘導できることが確認された。また、この方法で誘導したドパミン神経前駆細胞の細胞分裂能を確認するため、細胞周期マーカーである*Ki67*およびM期マーカーであるリン酸化ヒストンH3(pH3)で免疫染色を行ったところ、陽性率はそれぞれ約60%と2%であり、分裂能を有していることが確認できた。次にヒト中脳発生過程におけるsingle-cell RNA-seqのデータベースから、中脳ドパミン神経に特異的に発現している遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子について、転写因子、受容体、酵素などの機能ごとに分類を行った。このうち受容体(未発表)については外因的なりガンドを介したシグナル伝達が、ドパミン神経への誘導に影響する可能性があったため、ヒトiPS細胞からドパミン神経誘導する過程において、本受容体のリガンド(未発表)を

処置することでドパミン神経の誘導効率の検討を行った。本リガンドを神経誘導の神経成熟期に処置したところ、中脳ドパミン神経に発現する転写因子である *LMO3* の発現上昇が確認された。現在、この他のドパミン神経関連遺伝子の発現変動を解析している段階であり、薬理的な受容体刺激がドパミン神経誘導を促進する可能性が示唆される結果を得ることができた。

(2) ヒト iPS 細胞由来ドパミン前駆細胞の移植法の至適化と評価方法の至適化

移植実験を実施するにあたり、免疫不全ラットを導入した (*F344-II2rg^{em1/exas}*)。このラットは、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の脳移植においても免疫拒絶が惹起されないことが実証されており、今後の異種細胞移植実験に有用であると考えている。前項において誘導したヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の移植条件の検討を行った。まずラット脳への移植実験に必要な細胞数を取得するために本誘導法における scalability の検討を行った。その結果、17 日間の誘導において 12 穴プレート 2 穴から、約 500 万個 (約 8 匹分) のドパミン神経前駆細胞を取得できることを確認した。これにより移植実験を行うための実験スケールを確定することができた。ヒト iPS 細胞からドパミン神経前駆細胞を誘導し、ラットの片側の線条体に約 80 万個の細胞を移植した。ドナー細胞の特性については、移植実験と並行して組織学的評価を行い、神経前駆細胞のマーカーである *SOX2* が 85%以上であることを確認している。また移植をする際は、イソフルランを用いて麻酔を行い苦痛の軽減に努めた。移植片におけるヒト iPS 細胞由来ドパミン神経の生着率の評価を行った。移植 2 週間後と 8 週間後において、抗ヒト核抗体で染色される細胞のうち、ドパミン神経マーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) を発現する細胞の割合を定量的に評価したところ、移植 2 週間後では $2.8 \pm 0.1\%$ であり、移植 8 週間後では $7.5 \pm 0.4\%$ であった。このことから、移植後 2 週間後から 8 週間後にかけてドパミン神経前駆細胞は、ドパミン神経細胞へと分化・成熟していることが確認できた (図 1)。

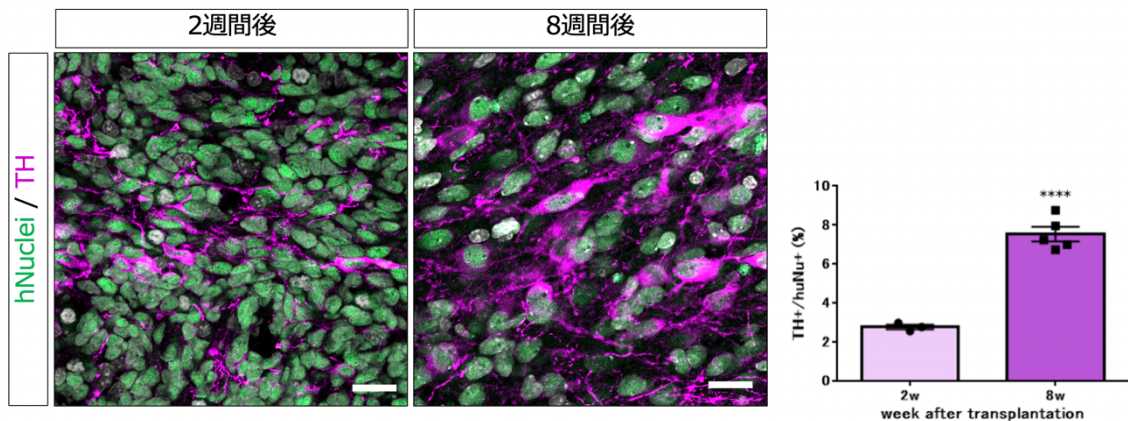


図 1 ヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞移植後の移植片におけるドパミン神経生着の評価。(左) 移植後 2 週間および 8 週間における抗 TH 抗体および抗ヒト核抗体を用いた免疫染色画像。スケールバー：20 μm 。(右) TH 陽性細胞率の定量的評価。値は平均値 \pm 標準誤差。**** $p < 0.001$ 。

(3) 低分子化合物を用いたヒト iPS 細胞から線条体神経誘導法の開発 (引用文献①)

線条体は随意運動の調節に関与し、線条体神経の大部分は γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性神経であり、脳発生において外側基底核原基から生み出される。パーキンソン病では線条体へのドパミン神経入力 of 喪失が病態の特徴である。したがってヒト iPS 細胞を用いて、線条体組織を簡便に解析可能な *in vitro* モデルの有用性は高い。本研究では、低分子化合物を用いてヒト iPS 細胞から線条体ニューロスフィアを作製するための簡便かつ安定なプロトコルの作製に取り組んだ。Purmorphamine による SHH シグナル活性化、XAV939 による WNT シグナル阻害、LDN193189 と A83-01 による SMAD シグナル阻害といったシグナル制御を三次元培養に適用したところ、神経前駆細胞期において外側基底核原基の細胞層構造 (脳室帯や脳室下帯) が確認され、成熟神経期には、DARPP32 陽性 GABA 神経を含む線条体ニューロスフィアの作製に成功した (図 2)。

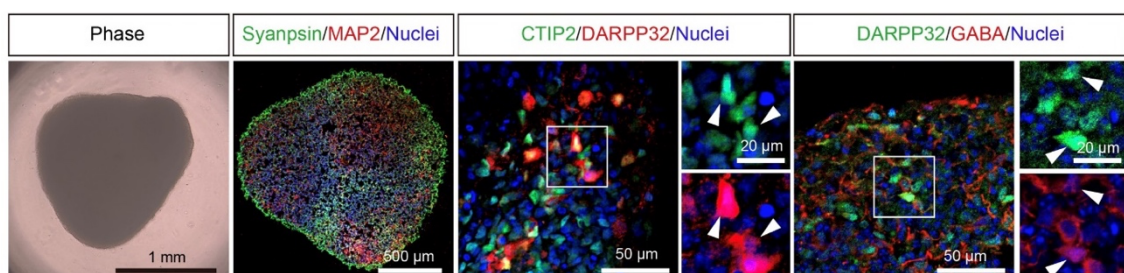


図2 誘導56日目におけるヒトiPS細胞からの線条体ニューロスフィアの評価。Synapsin: 神経シナプスマーカー、MAP2: 樹状突起マーカー、CTIP2: 大脳神経マーカー、DARPP32: 線条体中棘神経細胞マーカー、GABA: γ -アミノ酪酸、Nuclei (核) はHoechst33342で蛍光染色した。

(4)ダイレクトコンバージョンによるヒトiPS細胞からドパミン神経作製法の開発(引用文献②)

Piggybacベクターを用いて、ヒトiPS細胞にASCL1およびLMX1A遺伝子をドキシサイクリン処置のタイミング依存的に強制発現できるカセットを導入することで、ヒトiPS細胞から直接ドパミン神経へ変換が可能な誘導性ヒトiPS細胞株の作製を行った。ASCL1とLMX1Aの遺伝子発現はドキシサイクリン処置により誘導した。ドキシサイクリン処置後7日目において神経マーカーであるNGN2、TUBB3、MAP2の発現が誘導されていることが確認された。さらに誘導14日目においては、ドパミン神経細胞のマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) や腹側中脳マーカーであるFOXA2の発現が確認され、形態的にも神経細胞の形態ととることが確認された。さらに28日まで延長培養を行ったところ、シナプスマーカーであるSynapsinの発現が確認され、多電極アレイ (MEA) で記録される電気生理学的特徴を示したことから、機能的な神経細胞が誘導されていることが確認できた(図3)。従来のドパミン神経への分化誘導法では、多段階的な誘導条件の移行を伴い60日以上の日数がかかるのが一般的であったが、本方法は基本的に単一段階であり、誘導日数も28日と、大幅に短縮することができた。

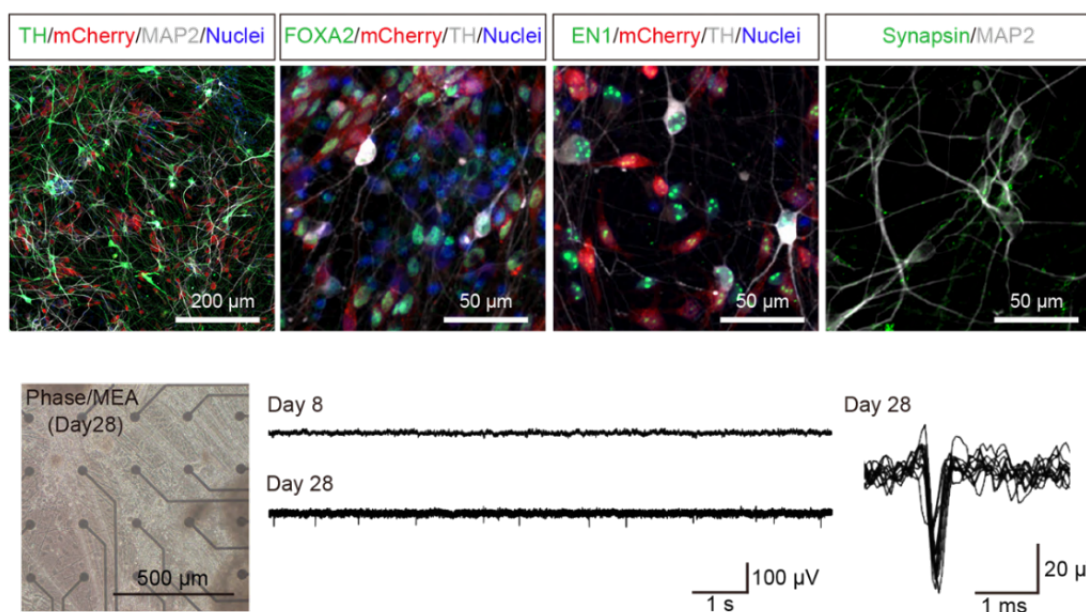


図3 ヒトiPS細胞からのダイレクトリプログラミングによるドパミン神経の作製。ドキシサイクリン処置によるASCL1とLMX1Aの過剰発現hiPSC株を樹立し、ドパミン神経への分化誘導を解析した。TH: チロシン水酸化酵素 (ドパミン神経マーカー)、MAP2: 樹状突起マーカー、FOXA2およびEN1: 中脳腹側マーカー、Synapsin: 神経シナプスマーカー、mCherry: ASCL1およびLMX1A遺伝子導入hiPSC細胞株マーカー、Nuclei (核) はHoechst33342で蛍光染色した。MEA: 多電極アレイ。

<引用文献>

- ① Amimoto*, and Nishimura* *et al.*, Generation of striatal neurons from human induced pluripotent stem cells by controlling extrinsic signals with small molecules. *Stem Cell Res.*, **55**, 102486 (2021)
*共筆頭著者
- ② Nishimura *et al.*. Rapid conversion of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons by inducible expression of two transcription factors. *Stem Cells Dev.*, **31** (11-12), 269-277 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishimura Kaneyasu, Nitta Tatsumi, Doi Keisuke, Takata Kazuyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Rapid conversion of human induced pluripotent stem cells into dopaminergic neurons by inducible expression of two transcription factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2021.0363	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 Takata Kazuyuki, Kimura Hiroyuki, Yanagisawa Daijiro, Harada Koki, Nishimura Kaneyasu, Kitamura Yoshihisa, Shimohama Shun, Tooyama Ikuo	4. 巻 27
2. 論文標題 Nicotinic Acetylcholine Receptors and Microglia as Therapeutic and Imaging Targets in Alzheimer's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2780 ~ 2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27092780	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 Nishimura Kaneyasu, Takata Kazuyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Combination of Drugs and Cell Transplantation: More Beneficial Stem Cell-Based Regenerative Therapies Targeting Neurological Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9047 ~ 9047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22169047	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 Amimoto Naoya, Nishimura Kaneyasu, Shimohama Shun, Takata Kazuyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Generation of striatal neurons from human induced pluripotent stem cells by controlling extrinsic signals with small molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102486 ~ 102486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102486	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 西村周泰、高田和幸	4. 巻 36
2. 論文標題 中脳ドーパミン神経の機能再生治療法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 87-89
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 西村周泰、高田和幸	4. 巻 46
2. 論文標題 中脳ドーパミン神経回路網の機能再生・修復を目指した新規治療戦略	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 36-38
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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西村周泰、網本直弥、加藤丈使、平尾真大、高田和幸
2. 発表標題 低分子化合物を用いたシグナルコントロールによるヒト多能性幹細胞から黒質・線条体神経細胞の作製
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 西村周泰、高田和幸
2. 発表標題 幹細胞技術を基盤とした神経変性疾患に対する再生創薬研究
3. 学会等名 第14回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村周泰、網本直弥、加藤丈使、高田真優子、福田愛菜、平尾真大、高田和幸
2. 発表標題 低分子化合物を用いたヒトiPS細胞から脳領域特異的神経細胞の誘導制御と応用法の提案
3. 学会等名 第10回 4大学連携研究フォーラム
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
---------	---------