

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591837

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞を用いた脳内細胞移植における安全性の検討

研究課題名（英文） Improving safety in neural cell transplantation with human induced pluripotent stem cells (iPSCs).

研究代表者

森実 飛鳥 (Morizane Asuka)

京都大学 iPS 細胞研究所 特定研究員

研究者番号：10528730

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞から効率よく安全な神経を分化させるために BMP 系, Activin 系をそれぞれ低分子化合物で阻害する事、分化誘導期間を長くする事、移植前に Notch という因子を阻害する事が有効であることを発見した。これらの方法により分化誘導した iPS 細胞由来の神経前駆細胞をサルパーキンソン病モデルに移植して生着を確認した。さらにゲノムへの外来遺伝子の挿入がなく、安全性の高い iPS 細胞でも、既存の iPS 細胞や ES 細胞と同等にドーパミン神経が誘導されることを示した。

研究成果の概要（英文）：We found and reported several strategies for improving safety for iPSC-derived neurons as donor cells: the usage of two small molecules for inhibiting BMP and Activin cascade, prolonged culture for differentiation and inhibition of Notch signals in vitro before transplantation. After differentiation of the donor cells with these methods, a good graft survival of iPSC-derived dopaminergic neurons was observed in the brain of a primate model of Parkinson's disease. We demonstrated that the human iPSCs established with episomal vectors having no genomic insertion of transgenes could generate dopaminergic neurons as well as original retrovirally established iPSCs or embryonic stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：iPS 細胞、パーキンソン病、腫瘍化、神経、多能性幹細胞、ソーティング、ドーパミン、移植

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞が樹立され **embryonic stem cell (ES 細胞)** と同等の多分化能が報告された。実用化の期待が高まる反面、その効果や安全性については未解決な部分が多かった。神経細胞移植についてはドナー細胞中の未分化細胞の残存と分化成熟度が腫瘍化と関連するということが判りつつあった。

### 2. 研究の目的

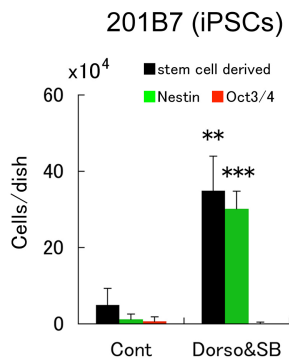
ヒト induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を利用した細胞移植治療の安全性についての検討。特に iPS 細胞から神経細胞への分化を行い、将来はパーキンソン病に対する細胞移植治療という新たな治療法の確立が目標。

### 3. 研究の方法

(1) iPS 細胞からの神経分化の際に **BMP, Activin** の阻害剤である **Dorsomorphin, SB431542** を加え、神経分化誘導効率を調べた。(2) iPS 細胞からの神経分化誘導の期間を 28 日、42 日の 2 種類で用意し、それぞれの細胞を同一サル脳の脳に移植した。(3) より安全性の高いと考えられる **Episomal vector** 法で樹立された iPS 細胞からドーパミン神経分化誘導を試した。(4) 神経分化の際に **Notch** の阻害剤である **DAPT, Compound E** を加え、マウスの脳に移植後その効果を検討した。

### 4. 研究成果

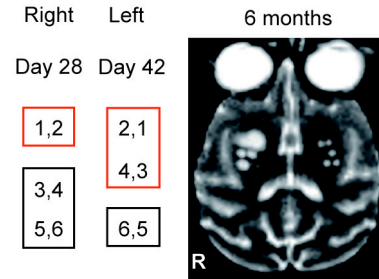
(1) ヒト iPS 細胞、ES 細胞の神経分化誘導において、**BMP 系、Activin 系** 2 つの阻害剤 (低分子化合物) を用いる事で相乗的に神経分化の増進および未分化多能性幹細胞の残存を減らす事ができることを発見した。2 つの系を阻害する方法は今や神経分化のスタンダードとなりつつある。さらに低分子化合物の使用はコスト面、安定性などの点でリコンビナント蛋白よりも臨床応用の面で優れている。



BMP 系の阻害剤 **Dorsomorphin (Dorso)** と **Activin 系** の阻害剤 **SB431542 (SB)** の効果。

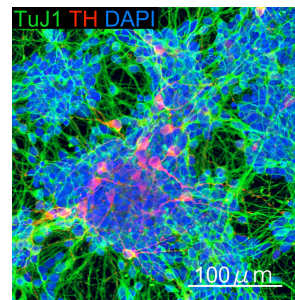
神経系細胞 (Nestin 陽性) への分化が促進され未分化細胞 (Oct3/4 陽性) の残存が減る。(論文④より)

(2) 42 日間の分化誘導したドナー細胞は 28 日のもとに比べ移植片の増大が抑えられ、ドーパミン神経の生着も良好であった。神経分化誘導の期間が移植後の腫瘍化を防ぐのには重要であるという事を示した。



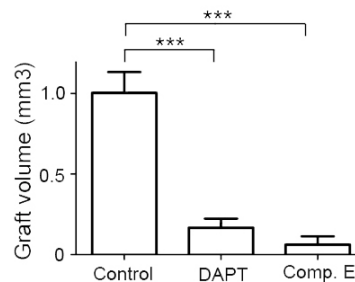
サル脳の脳に移植したヒト iPS 由来の神経細胞。移植 6 ヶ月後の MRI 像。(論文②より)

(3) **Episomal vector** により樹立された iPS 細胞でも既存の方法で樹立された iPS 細胞、ES 細胞と同様にドーパミン神経への分化誘導が可能であった。



42 日間の分化誘導でのドーパミン神経の免疫染色像 (TuJ1 と Tyrosin Hydroxylase; TH が共陽性)。(論文③より)

(4) 神経分化の際、分化 18 日目から 4 日間 **Notch** の阻害剤を使用することで、コントロール群でできる移植片の過成長が抑制できることを免疫不全マウスの系で示した。



**Notch** 阻害剤 (**DAPT, Compound E**) を使用したドナーを移植。2 ヶ月後移植片の体積比較。

(1), (2), (3)については論文発表済みであり、(4)については論文投稿中である。

#### 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 9 件)

① 森実飛鳥、高橋淳、パーキンソン病に対する iPS 細胞技術の挑戦、BRAIN and NERVE、査読無、64 巻、2012、29-37、URL: <http://ej.islib.jp/ejournal/1416101097.html>?

② Kikuchi T, Morizane A, Doi D, et al. Survival of human induced pluripotent stem cell-Derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate Model of Parkinson's disease. Journal of Parkinson's Disease, 査読有, Vol.1, 2011, 395-412, DOI: 10.3233/JPD-2011-11070

③ Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. (5 番目)、A more efficient method to generate integration-free human iPS cells, Nat Methods, 査読有, Vol.8, 2011, 409-412, DOI: 10.1038/nmeth.1591

④ Morizane A, Doi D, Kikuchi T et al. Small molecule inhibitors of BMP and Activin/Nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. J Neurosci Res, 査読有, Vol.89, 2011, 117-126, DOI: 10.1002/jnr.22547

⑤ Morizane A, Darsalia V, Guloglu MO et al. A simple method for large-scale generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. J Neurosci Res, 査

読有, Vol.88 2010, 3467-3478, DOI: 10.1002/jnr.22515

⑥ Anisimov SV, Morizane A and Correia AS. Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation, Stem Cell Rev, 査読有, Vol.6, 2010, 411-24 DOI: 10.1007/s12015-010-9134-5

⑦ 森実飛鳥、高橋淳、ES 細胞、iPS 細胞を用いた細胞移植治療の臨床応用、月刊バイオインダストリー、査読無、28 巻、2010、102-107、URL: [http://www.cmbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=3393](http://www.cmbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=3393)

⑧ 森実飛鳥、高橋淳、パーキンソン病の再生医療～ES 細胞、iPS 細胞を用いた細胞移植治療の展望～、総合臨床、査読無、58 巻、2009、50-55、URL: <http://www.nagaishoten.co.jp/search/sogo/A200901.html>

⑨ 森実飛鳥、高橋淳、パーキンソン病に対する細胞移植治療～現在の到達点と今後の課題～、実験医学 増刊号、査読無、26 巻、2009、34-39、URL: <http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103046/>

[学会発表] (計 11 件)

① Morizane A, One-year observation of dopaminergic neurons derived from human embryonic stem cells in primate models of Parkinson's disease, ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 9th annual meeting, 2011.06.16, Tronto, Canada

② Morizane A, Research for stem cell therapy with primate Parkinsonian model, 第6回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2011.06.09、東京

③ 森実飛鳥、カニクイザルパーキンソン病モデルへのヒト ES 細胞由来ドーパミン神経細胞の移植、第70回日本脳神経外科学会総会、2011.10.12、横浜

④ 森実飛鳥、ヒト ES 細胞を用いたカニクイザルパーキンソン病モデルへの細胞移植、第10回日本再生医療学会総会、2011.3.1、東京

⑤ Morizane A, Differences in neural differentiation propensity among cell lines of human pluripotent stem cells, Neuroscience 2010, 2010.11.14, San Diego, California

⑥ Morizane A, Optimization of the protocol and cell line selection are important for generation of dopamine neurons from human induced pluripotent stem (iPS) cells. NeuroStemcell Workshop 2010.9.23, Mallorca, Spain

⑦ 森実飛鳥、低分子化合物を用いたヒト多能性幹細胞からの神経誘導、第9回日本再生医療学会総会、2010.3.18、広島

⑧ 森実飛鳥、ヒト多能性幹細胞からの神経誘導における Nodal/BMP 抑制の役割、第68回日本脳神経外科学会総会、2009.10.14、東京

⑨ 森実飛鳥 基礎研究から臨床応用へ：ES

細胞、iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療の将来展望 第14回静岡健康、長寿フォーラム 2009.10.2、静岡

⑩ Morizane A, Small molecule promote neural differentiation from human pluripotent stem cells in the stromal (PA6) cell co-culture condition, Neuroscience 2009, 2009.10.18, Chicago, USA

⑪ Morizane A, Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells and iPS cells, AXREGEN, NCoE and NeuroFortis Workshop, 2009.9.18, Lund, Sweden

[図書] (計1件)

Henning Ulrich (Editor) Springer Perspectives of Stem Cells -From Tools for Studying Mechanisms of Neuronal Differentiation towards Therapy-, 2010, 245-254

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化誘導法

発明者：高橋 淳、森実飛鳥

権利者：京都大学

種類：

番号：61/282,970

出願年月日：2010.4.30

国内外の別：外国(米国)

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：京都大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2010/063953

出願年月日：2010.8.12

国内外の別：外国(PCT)

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca01/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森実 飛鳥 (Morizane Asuka)  
京都大学 iPS 細胞研究所 特定研究員  
研究者番号：10528730

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

高橋 淳 (Takahashi Jun)  
京都大学再生医科学研究所、iPS 細胞研究所  
准教授  
研究者番号：10270779