

＜シンポジウム (1)-4-1＞ iPS 細胞研究の現状と展望

iPS 細胞をもちいたパーキンソン病の再生医療

高橋 淳¹⁾

要旨：パーキンソン病に対しては 1980 年代の後半から胎児中脳腹側細胞の移植がおこなわれ一定の効果がみられているが、倫理的問題に加え移植細胞の量的、質的問題があり一般的な治療にはなっていない。これらの問題を解決するために幹細胞とりわけ ES, iPS 細胞をもちいた移植治療に期待が寄せられている。分化誘導技術が発達し、ヒト ES, iPS 細胞から効率的に中脳ドパミン神経細胞が誘導できるようになった。さらには選別技術も開発されつつある。ラットや霊長類モデルへの移植では行動改善が観察されており、臨床での効果も期待される。あとは安全性を厳しく検証すること、万が一腫瘍化がおこったときの対策を立てることが重要になるであろう。

(臨床神経 2013;53:1009-1012)

Key words：パーキンソン病, ドパミン神経, iPS 細胞, 細胞移植

細胞移植治療の試み

パーキンソン病に対しては薬物治療がよく奏功し、L-ドパのみならず、ドパミンアゴニストや MAO 阻害薬など多くの薬が開発されている。しかし、病気の進行とともに症状のコントロールが難しくなり、wearing off やジスキネジアなどの合併症がみられるようになる。DBS 手術がおこなわれることもあるが、根本的な問題はドパミン神経細胞の減少であり、それを補充するのが細胞移植である。

本来の黒質線条体路再構築という意味ではドパミン神経細胞を黒質に移植すべきであるが、技術的および安全上の理由から現在は線条体への移植が基本である。その目的は二つあり、一つは細胞そのものによる局所でのドパミン供給。ドパミンアゴニストは全身性に投与されるので、線条体のみならず大脳皮質や辺縁系の細胞も刺激する。細胞移植では、線条体局所でドパミンが分泌される。しかもドパミントランスポーターによるドパミン量の調整が可能である。もう一つは、L-ドパからのドパミン合成である。そもそもドパミン神経細胞がなければL-ドパを投与されてもドパミンが合成できない。ドパミン神経細胞移植によってL-ドパからのドパミン合成が増え、薬でのコントロールがしやすくなることが期待される。

胎児中脳細胞移植

パーキンソン病では患者さんに対する胎児細胞移植がすでにおこなわれその有効性が報告されている。1980 年代にスウェーデンでまずおこなわれ、その後欧米を中心にヒト中絶胎児の中脳黒質細胞をもちいた移植治療が約 400 例におこな

われてきた。一部では劇的な効果がみとめられ、移植後 10 年以上経っても移植細胞が生存し臨床効果が持続している症例も報告されている (Fig. 1)。しかし、最近の二重盲検試験では幾つかの問題が明らかとなった¹⁾²⁾。まず高齢者や重症例ではコントロール群とくらべて症状改善に有意差がなく、効果がみとめられたのは 60 歳以下の中・軽症例であった。つまり、L-ドパへの反応がみられないような重症例では、移植の効果は不十分であった。また、移植後にジスキネジアがみられた症例も報告されており、その原因としてセロトニン神経細胞の混入が考えられている。さらには胎児脳の供給不足の問題もあり、これらの課題を克服するために ES 細胞、iPS 細胞の利用に期待が寄せられている。幹細胞は自己増殖可能なので培養によって大量かつ比較的均一な細胞をえることができ、凍結保存も可能である。分化をコントロールすることができれば理論的にはその疾患に必要な細胞を大量にえることができる。

iPS 細胞をもちいた神経細胞移植

中脳ドパミン神経細胞の誘導と純化

iPS 細胞から神経細胞を誘導するには中胚葉や内胚葉の細胞になるのを抑制しなければならない。そのために BMP シグナルと Nodal/Activin シグナルを同時に抑制する方法が開発されている。さらに中脳腹側細胞を誘導する目的で FGF8 や Shh を作用させることにより、現在ではヒト iPS 細胞から効率よく中脳ドパミン神経細胞を誘導することが可能になっている³⁾⁴⁾。

ただし、この方法でもドパミン神経細胞は全体の約 50% 程度であり、有効性と安全性を考えるとドパミン神経細胞を選別する技術が必要となる。中脳から脊髄にかけて腹側で発

¹⁾ 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門 [〒 606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53]
(受付日：2013 年 5 月 29 日)

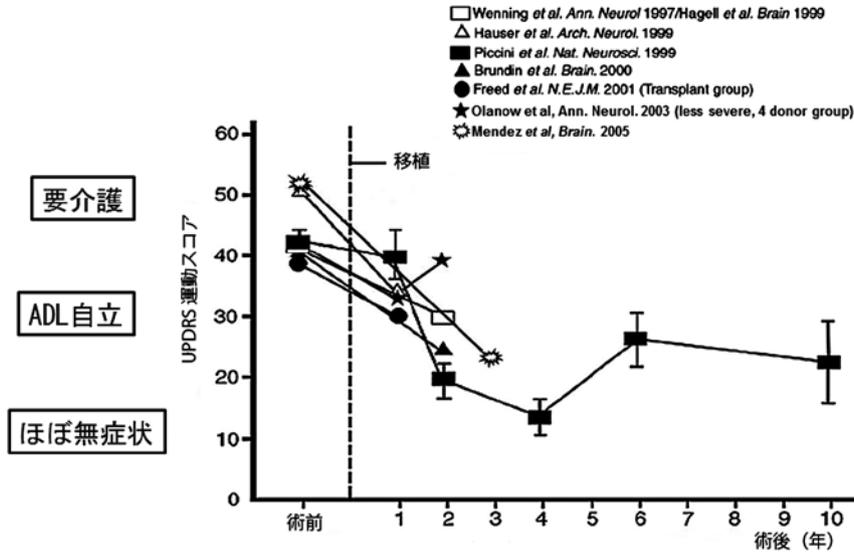


Fig. 1 パーキンソン病患者に対する胎児黒質細胞移植の結果。縦軸は神経症状 (UPDRS 運動スコア) で、上にいくほど重症。(Isacson O, et al. *Nat Neurosci* 2001;4:553 を改変)

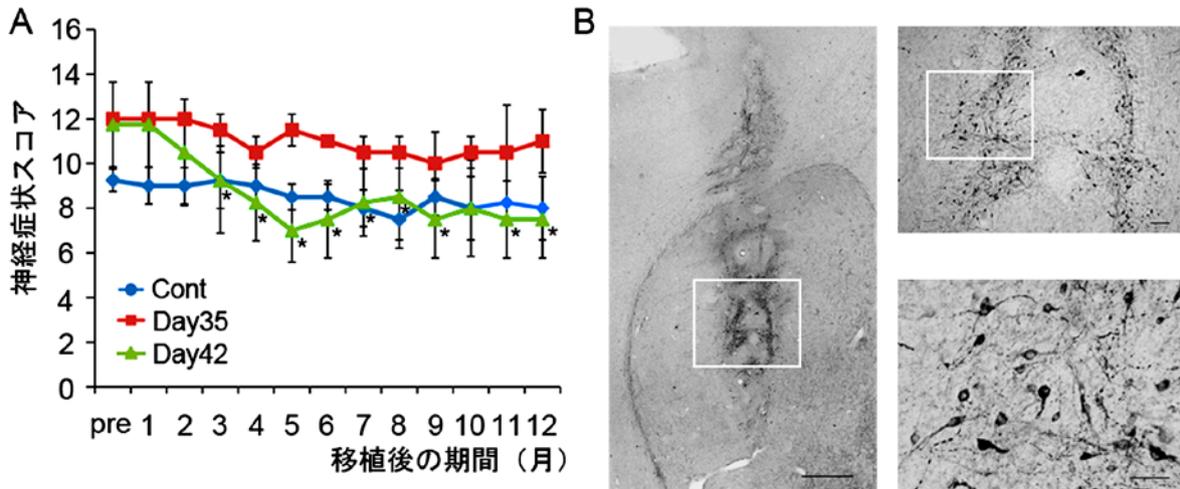


Fig. 2 ヒト ES 細胞由来ドパミン神経細胞移植によるカンクイザルパーキンソン病モデルの症状改善。A) 縦軸は上にいくほど重症。コントロールは培地のみ注入。分化日数が 35 日の細胞と 42 日の細胞を移植したところ、後者で症状改善がみられた。B) 移植 12 ヶ月後の脳切片の免疫染色。ドパミン神経細胞 (TH 陽性) の生着が確認された。(文献 8 より)

現する表面タンパクとしてセリンプロテアーゼである Corin が報告されているが⁵⁾、Chung らは中脳から吻側に発現する Otx-2 と Corin の両方を発現している細胞を、中脳腹側細胞として純化した。この細胞をラットモデルの線条体に移植すると、多くのドパミン神経細胞が生着し、回転運動が改善した⁶⁾。ドパミン神経細胞の特異的表面タンパクが同定されればそれを利用したソーティングが可能になるが、現時点では実現にいたっていない。

細胞の生着と機能

ヒト ES 細胞から誘導したドパミン神経細胞をパーキンソ

ン病モデルラットの線条体に移植した実験では、移植後 4 週間でモデルラットの行動改善がみられ、12 週間後の移植片内に 1 万個以上の TH 陽性細胞が生着していた⁷⁾。われわれはヒト ES 細胞から誘導したドパミン神経細胞をカンクイザルモデルに移植し 12 ヶ月間の経過観察をおこなった。神経分化誘導 42 日目の未分化 ES 細胞をふくまない細胞の移植では、3 ヶ月後から有意な症状の改善がみとめられ 12 ヶ月後まで持続した。また、PET における ¹⁸F-dopa の取り込み上昇もみとめられ、移植細胞がドパミン神経細胞として機能していることが確認された⁸⁾ (Fig. 2)。同様に、ヒト iPS 細

胞由来のドパミン神経細胞がカニクイザルモデル脳に6ヵ月間生着することも確認されている⁹⁾。これらの結果はES、iPS細胞をもちいたパーキンソン病治療が可能であることを示唆する。

腫瘍形成

ES、iPS細胞をもちいた移植治療における問題の一つは腫瘍形成であり、実際ES細胞をもちいた動物実験では、マウスES細胞の同種移植のみならずヒト・ラット間の異種移植においても未分化ES細胞の残留による腫瘍形成が報告されている。神経分化誘導を効率よくおこなうことによって未分化ES、iPS細胞の残存を防ぐことができるが、確実に腫瘍形成を防ぐにはソーティングなどの方法で必要な細胞だけを選別することが望ましい。これまでCD133、CD15、CD24やCD29といった表面マーカーの組み合わせによるソーティングで神経細胞のみを純化する方法が報告されている。

iPS細胞のばあいは、未分化細胞の混入以外にiPS細胞作成法に起因する問題がある。しかし、現在は遺伝子導入がなくc-mycももちいない樹立法が開発されており¹⁰⁾、安全なヒトiPS細胞作製に向けた技術は日々改良されている。

臨床応用に向けて

過去の胎児細胞移植の臨床例から学べることは5～10×10⁴個のドパミン神経細胞をその神経突起が均一に線条体をカバーするように生着させる必要があるということであり、ES、iPS細胞の出現によりそれが現実に近づきつつある。といっても長期効果や安全性を、霊長類モデルをもちいて検証する必要があるし、培地や使用する機器類なども臨床応用可能なものに置き換えなければならない。二重盲検試験で明らかになったように重症例では胎児細胞移植は効果がなく、UPDRSスコアやL-ドーパテストに対する反応性などによって適応患者を縛り込むことも重要であろう。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Eng J Med* 2001;344:710-719.
- 2) Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:403-414.
- 3) Kriks S, Shim JW, Piao J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011;480:547-551.
- 4) Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, et al. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep* 2012; 1:703-714.
- 5) Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, et al. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 2007;134:3213-3225.
- 6) Chung S, Moon JI, Leung A, et al. ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:9703-9708.
- 7) Cho MS, Lee YE, Kim JY, et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3392-3397.
- 8) Doi D, Morizanea A, Kikuchia T, et al. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2012;30:935-945.
- 9) 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. *J Parkinson's Disease* 2011;1:395-412.
- 10) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; 8:409-412.

Abstract**Cell replacement therapy for Parkinson's disease using iPS cells**Jun Takahashi, M.D., Ph.D.¹⁾¹⁾Department of Clinical Application, Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application

The aim of stem cell therapy for Parkinson's disease (PD) is to reconstruct local synapse formation and/or induce the release of dopamine and cytokines from grafted cells in the putamen. Fetal ventral-midbrain cells are reported to relieve the neurological symptoms of PD patients. However, not only embryonic stem cells (ESCs), but also induced pluripotent stem cells (iPSCs) are expected to provide an alternative donor cell population because of their capacity for self-renewal and pluripotency. A protocol to generate dopaminergic (DA) neurons from ESCs and iPSCs has been developed, and human ESCs were proven to function in the brain of rat and monkey PD models. The next step will be the isolation of DA neurons as a donor cell population for a safe and efficient transplantation.

(Clin Neurol 2013;53:1009–1012)

Key words: Parkinson's disease, dopaminergic neurons, induced pluripotent stem cells, cell transplantation
