

称号及び氏名 博士(獣医学) 奥野 剛

学位授与の日付 平成22年3月31日

論文名 ES細胞によるパーキンソン病の治療に関する基礎的研究

論文審査委員 主査 稲葉 俊夫
副査 中村 洋一
副査 玉田 尋通

論文要旨

緒言

パーキンソン病は筋固縮（筋肉のこわばり）、震戦、無動および姿勢反射障害を主たる症候とし、40～70歳で発症して10年前後で寝たきりの状態となる進行性神経変性疾患である。本疾患は、線条体に投射する中脳黒質ドパミン合成ニューロンが脱落する結果、線条体のドパミンが欠乏して発症すると考えられている。

パーキンソン病の治療に対して、薬物療法や深部脳電気刺激療法などが試みられているが、いずれも満足いく治療法とはいえない。すなわち、治療の主流となる薬物療法では、長期間投与によって①効果が減弱し、②wearing-off現象（内服直後や時間が経った時に効果が突然切れる）、on-off現象（突然、薬の効果が切れて体が動かなくなる）、ジスキネジア（不随意運動）が出現し、③幻覚や妄想が現れるようになる。ドパミン受容体作動薬単剤で長期間治療するのは困難で、治療開始3年後までに約50%、5年後までに70%近くの患者はドパミン前駆体のL-dopaとの併用を要するようになる。しかも、L-dopa治療開始2年後で、律動的な震えは約50%、ジスキネジアは約30%に出現する。深部脳電気刺激療法は、L-dopaの効果がなくなった進行症例には無効であり、長期予後も良好とは言えない。そのため、新規治療法の開発が望まれている。

近年、米国においてパーキンソン病患者の両側被殻に中絶胎児の黒質ドパミン細胞を移植する二重盲検試験が実施された。しかし、治療開始1年後には、運動症状の一定の

改善が認められたものの、多くの症例でジスキネジアが出現した。本治療法では、患者 1 人あたり胎児 4～7 人分のドパミン分泌細胞が必要となる。中絶胎児組織の臨床応用に関しては、生命倫理的な問題ばかりでなく、新鮮でかつ多量のドパミン産生細胞を一時期に準備することは困難である。

一方、無限増殖能を有する胚性幹細胞（ES 細胞）は一度に多量のドパミン分泌細胞に分化誘導が可能であり、パーキンソン病に対する細胞治療においては、最も有力な細胞源になり得る。

そこで本研究では、霊長類 ES 細胞から神経細胞への分化誘導法について検討し、パーキンソン病モデル動物への細胞移植実験を行なった。

第 1 章 ES 細胞から神経細胞への分化誘導法の検討

パーキンソン病に対する細胞移植治療に供する神経細胞を安定して効率的に作製することを目的として、霊長類 ES 細胞から神経系細胞への分化誘導法について検討した。

第 1 節 ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清を用いた分化誘導

ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清 (Astrocytes Conditioned Medium; ACM) を用いて、ヒトおよびカニクイザル ES 細胞から神経系細胞への分化誘導法について検討した。

その結果、霊長類 ES 細胞から神経幹細胞を経て、神経細胞へ短期間で効率的に分化誘導できた。また得られた神経幹細胞は basic fibroblast growth factor (bFGF) および epidermal growth factor (EGF) を添加した B27 Neurobasal Medium 中で接着培養を行うことで容易に細胞増殖できた。神経幹細胞は ACM 中で接着培養することで機能的な神経細胞に、また G5 Medium 中で接着培養することでアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性の細胞へ効率的に分化誘導できた。

以上の結果から、ラット胎子由来初代培養 ACM を用いることにより、霊長類 ES 細胞から神経幹細胞を経て、神経細胞へ短期間で効率的に分化誘導できることが明らかになった。

第 2 節 ヒト ES 細胞由来アストロサイト様細胞の培養上清を用いた分化誘導

ヒトに応用する上で、動物由来成分を使わない神経細胞誘導法の確立を目的として、ヒト ES 細胞由来アストロサイト様細胞の培養上清を用いたヒト ES 細胞からの神経細胞誘導法について検討を行った。

ヒト ES 細胞のコロニーをヒト ES 細胞から分化誘導したアストロサイト様細胞の培養上清に N2 Supplement を添加した培地 (ES-ACM) を用い、第 1 節の培養法に従って神経系細胞へ分化誘導した。その結果、ヒト ES 細胞由来アストロサイト様細胞の培養上清は、従来の ACM と同等の神経分化誘導能を有していることが確認できた。

以上の結果から、ヒト ES 細胞由来 ACM を用いることにより、動物由来成分の混入を

排除した移植用神経系細胞の作製が可能となった。

第2章 マウス・ラットへの細胞移植実験

ヒト ES 細胞由来神経幹細胞を正常およびパーキンソン病モデルのラットおよびマウスの線条体に移植し、その生着および *in vivo* での細胞分化について検討を行った。

ACMを使用してGreen Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子を導入したヒトES細胞から神経幹細胞を分化誘導した。本細胞を 67 匹のラットと 8 匹のマウスの線条体に移植した。ラットにおいては、 $1\sim 30\times 10^5$ 個の細胞を移植し、4 週間後に観察したが、生着細胞数は少なく、生着したtyrosine hydroxylase (TH)陽性細胞もごく僅かであった。マウスにおいては、 $1\sim 2\times 10^5$ 個の細胞を移植した。移植 4 週後に 3 匹のマウスにおいて GFP陽性で、神経マーカーNeuNを発現する細胞が確認された。なお、本神経幹細胞を移植したラットおよびマウスにおいて、テラトーマの形成は認められなかった。

また、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 投与パーキンソン病モデルマウス、および 6-hydroxydopamine (6-OHDA)投与パーキンソン病モデルラットへヒトES細胞由来神経幹細胞を移植し、Positron Emission Tomography (PET; 陽電子放射断層撮影法)解析を行った結果、ドパミン・トランスポーターの指標である [14 C]2-carbomethoxy-3-(4-fluorophenyl) tropane (β -CFT)の取り込みの上昇が移植部位で見られた。

以上の結果から、ヒト ES 細胞由来神経幹細胞をラットおよびマウスの線条体に移植することにより、ドパミン・トランスポーターの発現上昇が得られることが示唆された。

第3章 パーキンソン病モデルサルへの細胞移植実験

運動障害をはじめパーキンソン病の症状を最もよく再現できる実験モデルとして、MPTP 投与パーキンソン病モデルサルが知られている。本モデルサルに対して、カニクイザル ES 細胞由来神経幹細胞の同種細胞移植を行い、その生着や効果について評価した。

ACMを用いる方法により、GFP遺伝子を導入したカニクイザルES細胞から神経幹細胞を分化誘導した。本細胞 $1\times 10^5\sim 2.2\times 10^7$ を 2 頭のパーキンソン病モデルサルの片側の被殻へ移植した。免疫抑制剤はFK506 を使用した。パーキンソン病様症状の解析は、PET によるL-dopaの取込みやドパミン・トランスポーターの結合能測定、および撮影したビデオを基に自発運動や症状を調べた。また、脳組織標本を作製して免疫組織化学染色を行い、生着細胞およびTH陽性細胞の有無を観察した。

その結果、PET計測において、移植側の線状体で [14 C]L-dopaと [14 C] β -CFTの増加が認められた。さらに、移植側の線条体ではアンフェタミンの静注後にドパミン受容体のリガンドである [14 C]racloprideの結合能が低下した。これらのことから、移植側の線条体ではドパミンの生成と放出が回復していることが確認された。これらモデルサルの移植 3 カ月後の脳組織切片では、移植側の被殻に移植細胞由来のGFP陽性細胞が多数観察され、TH陽性細胞も認められた。なお、ジスキネジアは認められなかった。

以上の結果から、パーキンソン病モデルサルへの同種細胞移植では、治療効果が得られることが示唆された。

総括

霊長類 ES 細胞から神経細胞への分化誘導法およびパーキンソン病モデル動物への細胞移植について検討し、以下のことを明らかにした。

1. ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清を用い、霊長類 ES 細胞から神経系細胞への効率的な分化誘導法を開発した。
2. ヒト ES 細胞由来アストロサイト様細胞の培養上清を用い、細胞治療を指向した異種因子を必要としないヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導法を開発した。
3. ヒト ES 細胞由来神経系細胞はげっ歯類の脳内で生着・分化することを明らかにした。
4. パーキンソン病モデルサルに対する移植実験により、同種移植系では細胞治療の効果が得られることが示唆された。

以上、本研究の結果から、霊長類 ES 細胞を神経系細胞へ効率的に分化誘導でき、本誘導細胞を用いたパーキンソン病モデル動物への移植は有効な治療法となり得ることが示唆された。今後、これらの技術がヒトにおける臨床試験へ応用できるものと期待される。

審査結果の要旨

パーキンソン病は筋固縮、震戦、無動および姿勢反射障害を主たる症候とし、40～70歳で発症して10年前後で寝たきりの状態となる進行性神経変性疾患である。本疾患は、線条体に投射する中脳黒質のドーパミン産生神経細胞が変性脱落する結果、線条体のドーパミンが欠乏して発症すると考えられている。パーキンソン病の治療に対して、薬物療法や深部脳電気刺激療法などが試みられているが、いずれも満足のいく治療法とはいえ、新規治療法の開発が望まれている。

近年、米国においてパーキンソン病患者の両側の線条体被殻に中絶胎児の黒質から調製したドーパミン産生細胞を移植する二重盲検試験が実施され、治療開始1年後には、運動症状の一定の改善が認められた。本治療法では、患者1人あたり胎児4～7人分のドーパミン産生細胞が必要となる。中絶胎児組織の臨床応用に関しては、生命倫理的問題があるばかりでなく、新鮮でかつ多量のドーパミン産生細胞を一時期に準備することは実

用化に無理がある。

一方、無限増殖能を有する胚性幹細胞（ES 細胞）は一度に多量のドーパミン産生細胞に分化誘導できる可能性があり、パーキンソン病に対する細胞移植治療においては、最も有力な細胞源になり得るものと考えられる。

そこで本研究では、霊長類 ES 細胞から神経細胞への分化誘導法およびパーキンソン病モデル動物への細胞移植について検討し、以下の成果を得た。

1. ラット胎子由来初代培養アストロサイトの培養上清を用いることにより、ヒトおよびカニクイザル ES 細胞から神経幹細胞を経て、神経系細胞へ短時間で効率的に分化誘導できることが明らかになった。
2. 動物由来成分の混入を排除するために、ヒト ES 細胞から分化誘導したアストロサイト様細胞の培養上清を用いたところ、ヒト ES 細胞から神経幹細胞を経て、神経系細胞へ分化誘導できることが明らかになった。
3. ヒト ES 細胞由来神経幹細胞を正常およびパーキンソン病モデルのマウスおよびラットの線条体に移植したところ、移植細胞はマウスおよびラットの脳内で生着し、神経細胞へ分化することが明らかになった。
4. カニクイザル ES 細胞由来の神経幹細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの線条体被殻に同種細胞移植を行ったところ、移植細胞は *in vivo* で生着し、ドーパミンを産生する神経細胞へ分化することが明らかになった。

以上のように本研究では、動物由来成分を用いずに霊長類 ES 細胞から神経系細胞へ分化誘導する方法を確立するとともに、パーキンソン病モデル動物への本誘導細胞の移植試験の結果、本法が有効な治療法となり得ることを実証した。本研究の成果に基づく ES 細胞を用いた細胞治療法の開発は、獣医学の発展のみならず、ヒトの臨床応用にもつながるものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。