

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム国際共同研究枠 事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) パーキンソン病細胞移植治療でのヒト多能性幹細胞からのドーパミン神経分化誘導時における非侵襲モニタリングシステムの構築
(英語) Non-invasive monitoring of human pluripotent stem cell differentiation into midbrain dopaminergic neural cells

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 森實 飛鳥
(英語) Asuka Morizane

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立医療センター中央市民病院・臨床研究推進センター
再生医療研究部・部長
(英語) Director, Department of Regenerative Medicine, Center for Clinical Research and Innovation, Kobe City Medical Center General Hospital

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

目的

パーキンソン病に対する再生医療では多能性幹細胞からドナー細胞を分化誘導する。本研究では、ドナー細胞分化誘導中に培地中に分泌されるバイオマーカーに注目し、リアルタイムに分化状態をモニタリングする技術を開発した。本技術により分化状態の良し悪しを迅速に判断することで、無駄な細胞培養が減り、細胞製造のコストを大幅に下げる効果が期待される。また、検査のために細胞を消費する必要がなく、頻回なモニタリング検査が可能となり、再生医療の安全性の向上につながる。

背景

再生医療の臨床応用が各分野で実現しつつある。特にパーキンソン病に対する再生医療については京都大学が世界に先駆けて医師主導治験を開始した。この治療では多能性幹細胞から分化誘導した中脳型ドパミン神経 (mDA) 前駆細胞をドナー細胞として用いる。一般に、多能性幹細胞の分化誘導では同一細胞株、同一プロトコルを用いてもロット間での質がばらつく事が多く、ドナー細胞のクオリティーコントロールが移植治療成功の鍵とも言える。再生医療の臨床応用は始まったばかりである。すでに治験や臨床研究が行われているものでも、さらなる効果、安全性の向上が期待されており、ドナー細胞製品の改良、製造技術の躍進が必要である。

本研究は日本(神戸市立医療センター中央市民病院, 京都大学 iPS 細胞研究所)と英国(エジンバラ大学, カーディフ大学)の国際共同研究である。パーキンソン病に対する細胞移植治療を研究してきた2国間の国際共同研究という枠組を活かし、より頑強で汎用性の高いデータを取得することを目指した。

成果の概要

細胞株各種からの分化誘導サンプルの調整

日本および英国のそれぞれの細胞株、mDA 分化誘導プロトコル、解析手法を組み合わせることで汎用性が確保できる実験をデザインした。ヒト多能性幹細胞としては人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 2 株、胎性幹細胞 (ES 細胞) 2 株を用いた。mDA 神経分化誘導プロトコルはいずれも臨床試験が行われている水準のものであり、詳細な情報の交換、技術移転により双方の分化誘導技術レベルが向上した。日本の細胞株を用いて英国の分化誘導プロトコルを試すと、そのままではうまく行かず、播種細胞密度の至適化、新たな化合物の添加などのプロトコルの調整を要した。これらのサンプルを用いて、培地上清への分泌タンパク質の細胞株による違い、プロトコルによる違いが明確になった。これらの中でも共通して培地上清検体中に認められるタンパク質をマーカー候補と考えることにした。また、培地上清検体としては目的とする mDA 細胞だけでなく対照群となる未分化幹細胞、非至適化 mDA 誘導細胞、皮質型神経前駆細胞、線条体型神経前駆細胞の培地上清も準備し、差分をみることにより mDA 特異的な分泌タンパク質を同定することができた。

質量分析を用いた unbiased 定量プロテオミクスによる新規分泌マーカーの同定

培地上清への分泌タンパク質の中で、分化誘導をモニターできる候補因子を同定するために、2つの手法を用いた。1つは既存の遺伝子データベースや論文報告から予想したものについて個々に解析を行っていく方法 (candidate approach)。2つめは培地上清の液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) を用いた網羅的解析による同定法 (unbiased screening) である。質量分析で用いたサンプルには細胞株、プロトコル、採取時期について複数の組み合わせで、多種類の培地上清を日英双方で準備した。分析手法を検討した結果、データ独立収集体質量分析 (DIA-MS) 法を採用し、S/N 比の高い解析が可能になった。2施設から集めたすべてのサンプルについて京都大学にて解析を行い、多能性幹細胞から mDA 神経前駆細胞分化誘導における経時的な培地上清への分泌タンパ

ク質の膨大なリストが得られた。アルゴリズムを作り、そのリストの絞り込みを行った。最終的に mDA 神経分化について約 20 種類の特異性の高いマーカータンパク質が候補として挙げられた。その候補マーカーには既存の遺伝子データベースや論文報告からも合理的と考えられるものが多く含まれていた。

シングルセル RNA-seq 解析

タンパク質解析と同様に、複数の細胞株、プロトコル、採取時期の組み合わせで、多種多量の分化細胞サンプルを日英双方で準備した。2 施設から集めたサンプルについてエジンバラ大学で scRNA-seq 解析を行った。各細胞株による違い、各分化誘導プロトコルの特徴、分化時期による経時的な変化などが、遺伝子レベルで明らかとなった。また、質量分析による網羅的解析で得られたデータと scRNA-seq データを比較検討することにより、汎用性の高い分泌マーカー候補が同定できた。

分泌タンパク質候補マーカーの特性解析

複数の候補マーカーについては、EILSA および multiplex assay (Luminex assay) でも培地上清タンパク質として特異的に検出されることを確認した。また、それら培地上清中の分泌マーカーと細胞の分化状態（既存の代表的な転写因子 LMX1A, FOXA2, OTX2 を免疫染色および qPCR で評価）の相関性も確認された。各候補マーカーの経時的発現、発生学的な細胞特異性などの特性について、ヒト胎児脳サンプル（カーディフ大学）および多能性幹細胞由来分化誘導サンプル（日英）を用いて免疫染色、qPCR を用いて解析した。また、ELISA キットの入手可能な候補マーカーについては培地上清へ分泌された後の安定性（培地交換の頻度、培地量等による再現性）についても確認し、細胞製造時のモニタリング項目としての実用性も検証できた。各分泌マーカータンパク質の機能や生理学的意義については機能が未解明なものも多く含まれているが、鋭意検索や実験を進めている。一部のものは細胞表面膜タンパク質であることが分かっており、細胞膜から培養上清中に放出されていると考えられる。ドパミン神経特異的なものについては膜タンパク質への抗体を用いることでソーティングによる細胞純化にも使える可能性が示唆された。

今後の展開

同定された候補タンパク質の培地上清中への発現と動物での移植実験結果との相関を調べ、再生医療における細胞製造過程でのモニタリングマーカーとしての有用性の proof of concept を示す実験を現在行っている。また得られた候補因子については、分化誘導モニタリングにおける有用性は示せたものの、ドパミン神経誘導過程および発生学的な機能的役割について未解明なものも多く、これらを明らかにすることで、候補因子と疾患との関連が解明される可能性がある。

本研究成果の意義

本研究では、日本および英国それぞれですでに確立されたドパミン神経誘導プロトコル、および汎用的に用いられ、実績のあるヒト ES 細胞および iPS 細胞の細胞株を用いて実験を行った。そこで明らかになったのは、多能性幹細胞の株とプロトコルの関係の重要性である。つまり、細胞株ごとにプロトコルへの反応性が異なり、それぞれにプロトコルの調整や至適化が必要であるということである。これはパーキンソン病の再生医療に限ったことではなく、多能性幹細胞を用いた再生医療全般にあてはまる。今後の再生医療を考えると、自家移植や、免疫適合を考えて使用細胞株を選択するというオーダーメイドの再生医療が期待されている。その場合、細胞株毎にプロトコルの調整や至適化は必須となる。本研究で開発した培地上清による分化誘導モニタリング法は、日々の細胞製造におけるクオリティコントロールだけではなく、分化プロトコルの調整や至適化の過程でも重宝されると考えられる。また、本研究の培地上清による分化誘導モニタリングのコンセプトはパーキンソン病での再生医療だけではなく、他の分野での再生医療にも応用できると考えられる。

Background

Clinical applications of stem cell therapy are being realized in various fields. In particular, Kyoto University was the first in the world to initiate an investigator-initiated clinical trial for allogeneic pluripotent stem cell (PSC)-based cell therapy for Parkinson's disease. In this therapy, mesencephalic dopaminergic (mDA) neural progenitors are differentiated from PSCs and used as donor cells. The quality control of donor cells is the key to success in cell therapy, as the cell quality often varies from lot to lot even when the same cell line and protocol are used.

Objectives

This study focused on biomarkers secreted into the culture medium during the production of donor cells to be used in cell replacement therapy for Parkinson's disease. It developed a technology to non-invasively monitor the differentiation status of donor cells in real-time. This technology is expected to increase production efficiency as well as to improve safety since the cell status can be frequently examined without sacrificing the cells.

Outline and result of the research project

Taking advantage of the international collaboration framework, we aimed to obtain more robust and versatile data. The cell lines, the differentiation protocols of mDA neural progenitors from pluripotent stem cells, and the analysis methods were brought together both from Japan and U.K. Two strategies were used to identify candidate secreted protein markers: first, the candidates were predicted from existing gene databases and publications, and second, an unbiased screening analysis using mass spectrometry of the culture medium supernatant.

Samples used for mass spectrometry included not only the target mDA cells but also medium supernatants from undifferentiated stem cells, non-optimized mDA cells, cortical neural progenitors, and striatal neural progenitors as control groups to identify mDA-specific secreted proteins. A large number of culture medium supernatant samples were prepared in both U.K. and Japan with various combinations of cell lines, protocols, and collection timings, and then sent at Kyoto University to perform quantitative mass spectrometry. By the analysis, we got a large list of peptides secreted into the culture medium supernatant over time during mDA differentiation culture. By establishing an algorithm to narrow down the list, we finally identified about 20 highly specific marker peptides for differentiating mDA neural progenitors. The candidate markers included those that could be expected from existing gene databases and published reports.

Several candidate markers were confirmed to be specifically detected in conditioned medium by ELISA and multiplex assay, and correlated with the cell profiles (estimated by the expression of representative mDA transcription factors such as LMX1A, FOXA2, OTX2). Single-cell RNA-seq analysis also demonstrated the specificity of these candidate markers. In the future, we need to investigate candidate markers for which little information is available so far.

Now we are conducting an in vivo experiment to correlate the expression of these candidate proteins with the results of mDA progenitor cell transplantation to demonstrate their usefulness as monitoring markers in the cell manufacturing process. In addition, many of the candidate factors obtained have yet to be elucidated the functional roles in the cell differentiation culture process or brain development. Further functional analysis of the candidate proteins may lead to the link to Parkinson's disease.