

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、脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植による機能再生治療法の開発 (英語) Cell-based therapy for Parkinson's disease and stroke

研究開発実施期間: 平成25年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高橋 淳
(英語) Jun Takahashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所・教授
(英語) Kyoto University; Center for iPS Cell Research and Application; Professor

II 研究開発の概要

研究開発項目2: パーキンソン病に対する同種他家移植の治験開始

1) 病態進行に対する移植細胞の作用

本課題では iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞移植によるパーキンソン病治療を目指した研究を行っている。その成果によって2018年に治験を開始し、現在その経過観察中である。この治療法の直接の作用機序は移植細胞から放出されるドパミンが被殻の medium spiny neuron に作用することであるが、それ以外の可能性として移植細胞が脳の病態そのものに影響を及ぼす可能性が考えられる。これを明らかにするために、我々は α シヌクレイントランスジェニックマウスの線条体に iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞を移植し、 α シヌクレインの発現や中脳ドパミン神経細胞数を評価した。

このトランスジェニックマウスではヒト α シヌクレインが脳内で発現しており、18ヶ月齢において正常マウスと比較して約30%の黒質ドパミン神経の減少がみられる (Taguchi et al. brain, 2019)。そこで細胞移植は6ヶ月齢で行い、移植後12ヶ月の観察を行うこととした。合計3つのヒト iPS 細胞株から誘導したドパミン神経前駆細胞を25体に移植し、すでに観察期間を終えて現在組織学的解析を行っている。

研究開発項目3: 脳血管障害に対する同種他家移植の臨床研究開始

1) 薬事対応

ヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞移植による脳梗塞治療を目指して、PMDA と移植細胞の非臨床安全性試験に関する RS 戦略相談を行い、その方針について合意に至った。(具体的な内容については非公開)

2) 目的外細胞の同定

入手可能な 9 種類の臨床用ヒト iPS 細胞を用いて大脳皮質オルガノイド誘導を行い、分化誘導効率を比較検討した。もっとも分化誘導効率が悪かった細胞株について、その際に現れる目的外細胞の解析を行った。特にオルガノイドの形態に着目し、特異的な構造物についてそれぞれ遺伝子解析を行ったところ、特異的な構造それぞれがある細胞成分によって構成されていることが明らかとなった。さらに、それぞれの目的外細胞を同定するマーカーを明らかにし、移植細胞における有効成分の純度を高めるための品質評価法を確立した。(現在論文投稿準備中)

3) 大脳皮質神経細胞オルガノイドの選別

上記の目的外細胞の出現結果に基づいて分化誘導法を調整し、細胞選別を含めた細胞製造法を暫定的に確立した。具体的には、純粋に大脳皮質神経細胞のみからなるオルガノイドと目的外細胞が混じるオルガノイドは外観が異なるので、分化誘導 35 日目に顕微鏡下に選別を行うこととした。また、この方法によって再現性をもって目的外細胞を取り除くことができることを確認した。

4) マウス脳梗塞モデルでの有効性確認

ローズベンガルを免疫不全マウスの腹腔内に投与し、脳表から LED を照射することによって大脳皮質脳梗塞モデルを作製した。ローズベンガルは赤色の着色料であり、光照射によって活性酸素が生成され、血管内皮障害による血栓形成を惹起し、光を照射した部位に脳梗塞を引き起こす。大脳運動野に脳梗塞を起こすことによって対側前肢後肢の麻痺が観察された。この脳梗塞モデルマウスにヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞を移植し、3 カ月間の行動解析を行った。金網格子の上を歩かせて四肢が金網を掴む成功率を非移植群と比較検討したところ、移植群において有意な成功率の改善がみられた。マウスの脳切片の組織学的解析を行ったところ、移植細胞からの軸索が皮質脊髄路に沿って脊髄まで伸びていることが明らかとなった。(現在論文投稿準備中)

5) カニクイザル脳梗塞モデルへの細胞移植

予備実験として、4 頭のカニクイザルに対し直達手術で中大脳動脈(本幹あるいは穿通枝)を焼灼して脳梗塞モデルを作製した。モデル作製後、1 or 2 か月後にヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞移植を行い、3 or 4 か月後に組織学的解析を行ったところ、移植細胞の生着と皮質脊髄路に沿った軸索伸長が認められた。ただし、軸索が認められるのは中脳レベルまでで、脊髄レベルまで到達させるには時間を含めたさらなる工夫が必要である。

6) 移植細胞の生着促進因子

これまでの研究で、脳損傷後直後に細胞移植した場合よりも 1 週間後に移植した場合のほうが細胞生着や軸索伸長が良いことが明らかとなった。そこで損傷直後と 1 週間後の脳内における遺伝子発現を比較検討することにより、細胞生着や軸索伸長を促進する候補タンパクを複数同定した。in vitro 実験においてこれらの候補タンパクを加えて iPS 細胞由来大脳神経細胞を培養したところ、2 種類の候補タンパクで細胞生存や軸索伸長が促進された。続いて、マウス脳内への神経細胞移植と同時に候補タンパクを投与し、3 か月後に細胞生着と軸索伸長を評価したところ、あるタンパクがこれらを促進することが明らかとなった。(現在論文投稿準備中)

R&D Item 2: Start of Clinical Trial of Allogeneic Transplantation for Parkinson's Disease

(1) Effects of transplanted cells on disease progression

We transplanted iPS cell-derived dopaminergic progenitor cells into the striatum of α -synuclein transgenic mice and evaluated α -synuclein expression and the number of midbrain dopaminergic neurons. At 18 months of age, there is an approximately 30% decrease in substantia nigra dopaminergic neurons compared to normal mice (Taguchi et al. *brain*, 2019). Now, the observation period 12 months post-transplantation has already been completed, and histological analysis is currently underway.

R&D Item 3: Start of Clinical Research on Allogeneic Transplantation for Cerebrovascular Disease

(1) Regulatory affairs

To treat cerebral infarction by transplantation of human iPS cell-derived cerebral cortical neurons, we consulted with PMDA on RS strategy regarding non-clinical safety testing of donor cells and agreed on the policy.

(2) Identification of non-target cells

For this purpose, we focused on the morphology of organoids. We performed a genetic analysis of each specific structure and found that each specific structure was composed of a particular cellular component. Furthermore, we clarified the maker that identified each non-target cell.

(3) Sorting of cortical neuron organoids

As described above, since organoids consisting of cortical neurons and organoids mixed with non-target cells have different appearances, we decided to perform sorting under a microscope on the 35th day of differentiation. We also confirmed that this method could reproducibly remove non-target cells.

(4) Confirmation of efficacy in a mouse cerebral infarction model

A cerebral infarction model was created by administering Rose Bengal intraperitoneally to immunocompromised mice and irradiating LEDs from the brain surface. The mice were transplanted with human iPS cell-derived cortical neurons, and their behavior was analyzed for three months. The paralyzed limbs were significantly improved in the transplanted group. Histological analysis of mouse brain sections revealed that axons from the transplanted cells extended along the corticospinal tract to the spinal cord. (Paper currently in preparation for submission)

(5) Cell transplantation into a monkey cerebral infarction model

We created a cerebral infarction model as a preliminary experiment by cauterizing the middle cerebral artery (main trunk or perforating branch) in four macaque monkeys. We observed the survival of the grafted cells and axonal growth along the corticospinal tract.

(6) Factors promoting cell survival and neurite extension

In previous studies, we identified several candidate proteins that promote cell survival and neurite extension by comparing gene expression in the brain immediately or one week after injury. The candidate proteins were then administered simultaneously with the transplantation of neurons into the mouse brain, and cell survival and neurite extension were evaluated three months later. We found that a protein promoted these processes.