

京都大学	博士（医学）	氏名	足立 拓優
論文題目	Pretreatment with perlecan-conjugated laminin-E8 fragment enhances maturation of grafted dopaminergic progenitors in Parkinson's disease model （パールカン結合型ラミニン E8 フラグメントはパーキンソン病モデルへ移植されたドパミン神経前駆細胞の成熟を促進する）		
（論文内容の要旨） パーキンソン病は中脳腹側の黒質に存在するドパミン神経細胞の脱落によって生じる進行性の神経変性疾患であり、無動、筋強剛、振戦、姿勢反射障害といった運動障害を中心とした症状を呈する。病初期には薬物治療が効果的だが、ドパミン神経細胞の脱落が進むにつれ、効果は減少し、症状のコントロールが難しくなる。より根本的な治療法として細胞移植治療が期待されており、既に臨床応用に向けてヒト iPS 細胞から分化誘導したドパミン神経前駆細胞の移植治療の治験が開始されている。しかし、これまでの動物実験の報告では、移植されたドパミン神経前駆細胞のうち、機能的に成熟したドパミン神経細胞としての脳内への生着率は 10%以下であり、霊長類への移植実験では 2.7%とされている。そこで、移植後のドパミン神経前駆細胞の生存率や機能的成熟を向上させることが課題となっている。 細胞外基質であるラミニン (LM) は細胞膜表面のインテグリンと結合し、神経細胞の生存、発達に関わる細胞内シグナル経路を調節している。特にサブユニット $\alpha 5$ 鎖を有する LM511 や LM521 はドパミン神経細胞の分化や生存やネットワーク形成に重要である。一方、ヘパラン硫酸鎖 (HS 鎖) はパールカンなどのプロテオグリカンとして存在しており、様々な神経栄養因子と緩徐に結合し、細胞表面の濃度勾配を調節している。ドパミン神経細胞の成熟に必要なグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) とともに結合し、それらの細胞内シグナル経路を調節しているとされる。 パールカン結合型ラミニン 511 / 521-E8 フラグメント (p511 / p521) は、インテグリン結合部位を含む LM511 / LM521 の機能的最小構造である E8 フラグメントと HS 鎖を含むパールカンのドメイン I を結合させたキメラ蛋白として開発された。 本研究では p511 / p521 によりドパミン神経前駆細胞の移植前処理を行い、ドパミン神経細胞の生着率について検討した。 まず <i>in vitro</i> において p511 / p521 の効果を検証した。p511 / p521 コーティング処理した培養プレート上でドパミン神経前駆細胞 (分化 28 日目) を培養すると、42 日目の時点でパールカン非結合型ラミニン 511 / 521-E8 フラグメント (LM511E8 / LM521E8) に比べ、成熟ドパミン神経細胞のマーカーである tyrosine hydroxylase (TH) の発現が有意に増加していた。これは GDNF、BDNF を含む神経栄養因子を高濃度で添加した場合に顕著であり、heparinase III による HS 鎖の切断で効果が消失したことから HS 鎖がこれらの神経栄養因子の作用を増強しているものと考えられた。 次に <i>in vivo</i> で p511 / p521 の効果を検証した。無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) を用いて分化誘導したヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞 (分化 28 日目) を p511 / p521 により前処理 (GDNF、BDNF を含む培地に添加、37°C、1 時間以上反応) した後、SCID マウスおよびパーキンソン病モデルラットの線条体へ移植し、それぞれ 12 週、20 週後に評価した。全生着細胞に占める TH 陽性の成熟ドパミン細胞の割合			

(TH / hNuclei) は非処理群、LM511E8 / LM521E8 群と比べ、p511 / p521 群で有意に高く、生着ドパミン神経細胞由来軸索の有意な伸長も認められた。一方、移植したドナー細胞の生着細胞数には各群での差は認められなかったため、p511 / p521 はドパミン神経前駆細胞の成熟、軸索伸長を促進していると考えられた。さらにこの効果の機序として GDNF や BDNF の下流の細胞内シグナル経路である RAS-ERK1/2 経路の活性化が示唆された。

本研究では p511 / p521 に含まれる HS 鎖がドパミン神経細胞の成熟に関する GDNF や BDNF を捕捉し、RAS-ERK1/2 経路を活性化することで、ドパミン神経前駆細胞の機能的成熟を促進しているものと考えられた。移植後の成熟ドパミン神経細胞の割合が増加することにより、細胞移植治療の効率化が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

ヒト iPS 細胞を使用した細胞移植治療はパーキンソン病に対する新たな治療法として期待され、既に治験が進行中であるが、細胞移植治療の問題点の 1 つに移植細胞の生着率の低さが挙げられる。

本研究では、無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq 法) を用いて分化誘導したヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞をパールカン結合型ラミニン 511 / 521-E8 フラグメント (p511 / p521) により移植前処理することで、移植後の成熟ドパミン神経細胞の割合が増加し、軸索伸展も亢進することを明らかにした。移植後の生着細胞数には差がなかったことから、ドパミン神経前駆細胞の機能的成熟が促進されているものと考えられた。さらにドパミン神経細胞の機能的成熟に重要な神経栄養因子であるグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) の下流の細胞内シグナル経路である RAS-ERK1/2 経路の活性化も認められた。

p511 / p521 に含まれるヘパラン硫酸鎖に GDNF や BDNF が結合、細胞周囲に捕捉されることで、それらの成長因子受容体からの入力が増強し、機能的成熟促進効果が得られたものと推測された。

以上の研究は、移植後のドパミン神経前駆細胞の成熟率を高め、パーキンソン病に対する細胞移植の治療効果向上に寄与することが期待できる。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 4 年 12 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。