京都大学	博士（医学）	氏　名	菊　地　哲　広
論文題目	Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease (ヒト人工多能性幹細胞由来中脳ドーパミン神経の霊長類パーキンソン病モデル脳への生着)		

（論文内容の要旨）

パーキンソン病（PD)に対する細胞移植治療の細胞源として、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）が注目されている。過去に、マウスやヒトの iPSC から分化した神経細胞を PD モデルラットに移植した報告はあるが、霊長類での報告はなかった。

本研究では、フィーダー細胞を用いることなくヒト iPSC を浮遊培養し、培養 14 日目以降に Sonic hedgehog（Shh）及び FGF-8 を加えてさらに 2 週間培養、28 日目からは脳由来神経栄養因子（BDNF）及びグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）を加えてドーパミン（DA）神経前駆細胞へと分化させた。また、カニクイザルに薬剤を投与して PD モデルを作製し、上記方法でヒト iPSC から分化させた神経前駆細胞を移植した。移植細胞は、培養期間 28 日または 42 日、Shh 及び FGF-8 の有無の 4 条件を準備し、MRI、PET、免疫組織学染色で解析を行って最適な移植細胞についての検討を行った。

まず、未分化ヒト iPSC を single cell の状態にし、浮遊培養を行うことにより、分化 14 日目の時点で大部分の細胞が神経系のマーカーである Pax6、Nestin 陽性となった。この時点で未分化 iPSC のマーカーである Oct4 陽性細胞は認めなかった。14 日目以降、中脳 DA 神経を誘導すると報告されている Shh 及び FGF-8 を添加して培養を継続することにより、28 日目の時点で DA 合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）陽性細胞は 3.14±1.38%となった。さらにその後 BDNF 及び GDNF を加え培養することにより、42 日目には TH 陽性細胞は 85.46 ± 3.13%となった。この神経分化させた細胞を培養皿に接着させ、神経突起の伸長及び DA 分泌を確認した。これらの結果により、本研究で確立した方法で、ヒト iPSC から DA 神経細胞を誘導できることが示された。サルへの移植では、MRI を用いた解析で、移植後 6 ヶ月の時点で移植細胞が生着していることを確認した。28 日間培養した細胞の移植片は、Shh 及び FGF-8 ありの群で 172.25 ± 3.07 mm^3、なしの群で 39.21 ± 6.18 mm^3 であり、42 日間培養した群（Shh 及び FGF-8 ありの群となしの群でそれぞれ 19.36 ± 8.28 mm^3 及び 22.79 ± 9.72 mm^3）と比較して、移植片が大きかった。また、PET を用いた解析では、小胞モノアミントランスポーターのリガンドである[^{11}C]DTBZ 及びドーパミントランスポーターのリガンドである[^{11}C]PE2I の取り込みは、42 日間培養し Shh 及び FGF8 を添加した細胞の移植片で上昇しており、同移植片が DA 神経細胞として機能していることが示唆された。免疫組織学染色でも、同条件の移植片が他条件の移植片よりも多くの DA 神経を含んでいることが確認された。 42 日間培養した細胞を移植した移植片中の TH 陽性細胞数は、1.26 × 10^5 個であった。また、ビデオ撮影及びサル PD 症状のスコア判定を用いた行動解析を行ったが、今回の移植実験では著明な行動改善は認められなかった。

以上、本研究では、ヒト iPSC から、浮遊培養法によって DA 神経細胞を誘導することに成功し、それらの細胞が 6 ヶ月の間、霊長類の脳内で生存することを確認した。培養期間が 28 日間の細胞と、42 日間培養した細胞を移植し比較したところ、後者の条件で、移植片はより小さかった。また Shh 及び FGF-8 を添加して 42 日間培養した条件で、より多くの DA 神経細胞が生着していた。移植した細胞の評価に、MRI や PET、免疫組織学染色、ビデオやスコア評価による行動解析が有用であった。これらは、ヒト iPSC 由来神経細胞の移植の効果と安全性を確かめる前臨床試験に役立つ成果である。

（論文審査の結果の要旨）

人工多能性幹細胞（iPSC）を臨床応用する前段階として、ヒト iPSC 由来神経の生着及び機能を霊長類で評価することが重要である。過去にマウスやヒトの iPSC 由来神経細胞をパーキンソン病（PD）モデルラットに移植した報告はあるが、霊長類での報告はなかった。また、過去の報告では、マウス由来のフィーダー細胞やマトリクスを用いて神経誘導していたため、臨床応用が不可能であった。本研究では、それらの動物由来因子を使用せず、ヒト iPSC を浮遊培養し、さらに Sonic hedgehog、線維芽細胞成長因子 8、脳由来神経栄養因子、グリア細胞由来神経成長因子を添加してドパミン(DA）神経前駆細胞へと分化させた。この細胞を、1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）投与により作成したカニクイザル PD モデル脳に移植し、1、3、6 ヶ月後の MRI で細胞の生着を確認した。また、[^{11}C]DTBZ 及び[^{11}C]PE2I-PET により、移植片が生体内で DA 神経として機能していることを確認した。移植 6 ヶ月後の免疫組織学染色で、移植細胞は Nurr1、Dat、Girk2 といった中脳 DA マーカーで染色され、中脳 DA 神経として生着していることが確認できた。

以上の研究はヒト iPSC 由来神経細胞の霊長類脳内での動態の解明に貢献し、ヒト iPSC を用いた細胞移植治療への応用に寄与するところが多い。

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、平成 24 年 6 月 26 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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降