

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	土 井 大 輔
論文題目	Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. (培養期間を延長して成熟させたヒト胚性幹細胞由来の神経細胞は、霊長類パーキンソン病モデル脳において腫瘍を形成せずドーパミン神経として機能する)		
(論文内容の要旨)			
中絶ヒト胎児中脳細胞を用いた細胞移植治療は一部のパーキンソン病患者の運動症状を改善するが、ドナー細胞の供給不足が問題となる。ヒト胚性幹細胞（ES細胞）は多分化能を有し無限に増殖することから、胎児細胞の代わりとなるドナー細胞の候補の一つであるが、齧歯類への脳内移植でヒト ES 細胞の腫瘍形成能が報告されている。本研究では、ヒト ES 細胞由来の移植片が、1）霊長類の脳内で腫瘍を形成するか、2）腫瘍形成を抑える方法があるか、3）霊長類モデル脳内でドーパミン神経として機能するかについて、核磁気共鳴法（MRI）やポジトロン断層法（PET）、免疫組織化学、及び運動機能評価により検討した。 ヒト ES 細胞（KhES-1, KhES-2 の 2 株）から、ラミニンを主成分とする基質上で、間質細胞の馴らし培地で 7 日間培養した後に、FGF2, Shh, FGF8 存在下で 3 週間浮遊培養を行った。その後再度接着培養の系に戻し、神経栄養因子を加え 2 週間培養した。この培養方法では従来の方法よりも神経分化効率やドーパミン神経細胞の割合が向上し、免疫染色で中脳ドーパミン神経のマーカー（TH, AADC, Nurr1, Pitx3, Girk2）が陽性となった。また高カリウム刺激によるドーパミン放出が確認され、ヒト ES 細胞から機能的な中脳ドーパミン神経が誘導されることが示された。 生体内での細胞増殖能を検討するため、霊長類パーキンソン病モデルの線条体に、未分化 ES 細胞が残存する培養 14 日目の細胞と培養 28 日目の細胞を移植したところ、6 ヶ月後の MRI で 14 日目の移植片では周囲に浮腫を伴う腫瘍を認め、PET で糖代謝の増加や細胞増殖を認めた。28 日目の移植片ではこれらの所見を認めなかった。移植後 9 ヶ月での組織像は、14 日目の移植片は境界明瞭な良性腫瘍であり、一部に未分化な細胞の集簇が見られたが大部分は均一で細胞密度の低い神経系細胞であった。また未分化細胞による分裂能の高い部分は PET で検出可能であった。28 日目の移植片には未分化細胞は認めず、細胞密度の低い神経系細胞であった。14 日目の移植片には未分化 ES 細胞が残存し、脳内で腫瘍化したと考えられた。移植片内のドーパミン神経は両者とも少なく、運動症状の改善は認められなかった。 次に、培養期間を延長して成熟させた移植片の腫瘍形成能やドーパミン神経の機能を調べるため、35 日間、42 日間培養した細胞を霊長類モデルに移植した。35 日群の移植片は 12 ヶ月間徐々に増大したが、42 日群の移植片は 6 ヶ月以降増大しなかった。移植片内に未分化 ES 細胞は認めず、分裂細胞含有率（Ki67 陽性率）は 0.2-2.3%と低く腫瘍形成能は低いと考えられた。 42 日群の免疫染色では移植片内のドーパミン神経（TH 陽性細胞）が周囲脳組織に神経突起を伸ばしており、移植片-宿主間での神経回路の構築が示唆された。			

移植片のうち約 40%が神経細胞であり、神経細胞中の TH 陽性細胞は約 10%であった。また、TH 陽性細胞は他の中脳ドーパミン神経のマーカー（VMAT2, AADC, Pitx3）を共発現していた。また 42 日群では PET でドーパミン合成の増加を認め、運動症状のスコアでは移植後 3 ヶ月から 12 ヶ月後まで改善し、ビデオによる自発運動解析でも改善が認められた。PET の結果と運動症状のスコアは相関しており、移植片によるドーパミン合成の増加が運動症状の改善に寄与したものと考えられた。 以上より、ヒト ES 細胞由来の神経細胞は培養期間を延長して適切に成熟させれば、腫瘍形成せずに霊長類の脳内でドーパミン神経として機能することが示された。 （論文審査の結果の要旨） 中絶ヒト胎児中脳細胞を用いた細胞移植治療はパーキンソン病患者の運動症状を改善するが、ドナー細胞の供給不足が問題となっている。ヒト胚性幹（ES）細胞はこの問題を解決できる可能性があるが、その安全性や有効性が明らかにされていない。ヒト ES 細胞を用いた細胞移植治療を臨床応用するためには、ヒト ES 細胞由来神経細胞の霊長類脳内での腫瘍形成能や機能を評価することが重要である。 本研究では、世界に先駆けて、ヒト ES 細胞由来の分化程度の異なる神経細胞を霊長類パーキンソン病モデルに移植し腫瘍形成能やドーパミン神経の機能を評価した。未分化 ES 細胞が残存する 14 日群の移植片は脳内で腫瘍を形成したが神経系の良性腫瘍であった。これに対して、培養期間が長く、より分化程度の高い 42 日群の移植片は、6 ヶ月目以降は増大せずに多くのドーパミン神経が生着し、移植後 12 ヶ月の間、霊長類モデルの運動機能改善をもたらした。 以上より、ヒト ES 細胞由来の神経細胞は適切に分化させると腫瘍を形成せずに霊長類脳内でドーパミン神経細胞として機能することが示された。 以上の研究は、ヒト胚性幹細胞由来神経細胞の霊長類脳内での腫瘍形成能や機能の解明に貢献し、今後のヒト多能性幹細胞を用いたパーキンソン病に対する細胞移植治療に寄与するところが大い。
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 2 4 年 4 月 3 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