



東北大学

2012年12月3日  
独立行政法人医薬基盤研究所  
国立大学法人東北大学  
独立行政法人理化学研究所

## パーキンソン病治療へ光：自己の細胞を用いた新たな治療法の可能性 —サルでの前臨床研究に成功— Journal of Clinical Investigation に掲載

### 本研究成果のポイント

- 成体カニクイザルの骨髄間葉系幹細胞から、ドーパミン細胞の誘導に成功
- 自己由来ドーパミン細胞の脳内への移植により、長期にわたり腫瘍形成や副作用が無く、運動機能を改善できることを明らかにした
- 自己由来ドーパミン細胞移植による治療効果を、PET・MRI など分子イメージング手法を使ってパーキンソン病モデルカニクイザルで実証

東北大学大学院医学系研究科の出澤真理教授と理化学研究所分子イメージング科学研究センターの林拓也副チームリーダーらのグループは、骨髄間葉系幹細胞（骨髄中に存在する幹細胞）からドーパミン神経細胞の誘導に成功し、パーキンソン病<sup>\*1</sup>モデルのサルの脳内への移植により、運動障害などが改善されるとともに、長期にわたり腫瘍形成や副作用が現れないことを明らかにしました。

本研究は、霊長類動物において独自の技術を用いて自己に由来する再生細胞の機能を自己の臓器内で検証した世界で初めての成果<sup>\*2</sup>であり、将来のパーキンソン病治療法として今後の臨床応用が期待されます。この研究は医薬基盤研究所「先駆的医薬品・医療機器研究発掘支援事業」の支援を受けて行われました。

本研究成果は米国の科学雑誌『*Journal of Clinical Investigation*』（2013年1月号）の掲載に先立ち、オンライン版（2012年12月3日アメリカ東部時間正午12時：日本時間12月4日午前2時）に掲載されます。**本論文は同雑誌2013年1月号のハイライトにも選ばれました。**

※1 パーキンソン病は、ふるえ、動作緩慢、小刻み歩行などの運動障害を主症状とする進行性の神経難病で、日本には14万人近くの患者がいます。現在の治療法は薬剤投与による症状の緩和が主体で、原因である脳内ドーパミン神経の細胞死の予防や、神経細胞を再生させる根本的治療法はまだありません。

※2 骨髄間葉系幹細胞は様々な細胞に分化する能力を有し、腫瘍化の危険性が低いことから移植に適した幹細胞の一つとされています。研究グループは、成体のカニクイザルの骨髄間葉系幹細胞から、活動性を持つドーパミン細胞を効率よく分化させることに成功しました。さらに分化させたドーパミン細胞を同一個体の脳に自家移植する治療実験を行ったところ、パーキンソン病を患っていたサルの運動機能が4-8カ月後に改善し、また移植した細胞が腫瘍化せず生着し、副作用も無く正常に機能していることを、PET、MRI やその他の検査で確認しました。

## 1. 背景

パーキンソン病やアルツハイマー型認知症を含む神経変性疾患では、神経細胞がゆっくりと死に至ることで運動機能や認知機能の低下をきたします。こうした神経細胞死の原因は未だ十分な解明が進んでおらずその予防も困難で、脱落した神経細胞を補充し組織を再生させる根本的な治療法の確立が期待されています。

パーキンソン病は、脳の神経伝達を仲介するドーパミン細胞がなんらかの理由で変性する病気で、体の動きをスムーズに制御できなくなり、運動機能障害が生じます。薬剤投与による症状の緩和が主な治療法ですが、海外では1980年代ごろから中絶胎児の脳の一部を採取し、患者の脳に移植することでドーパミン細胞を新たに供給し、運動機能の改善を図る試験が行われています（図1）。

しかし中絶胎児に依存するために安定的な細胞確保が難しいこと、他人の細胞を拒絶する反応を防ぐため免疫抑制剤の服用が必要で、さらには倫理性・安全性の問題もはらみ、一般的な治療法としては普及していません。

### 従来検討されてきた細胞移植による パーキンソン病の根本治療

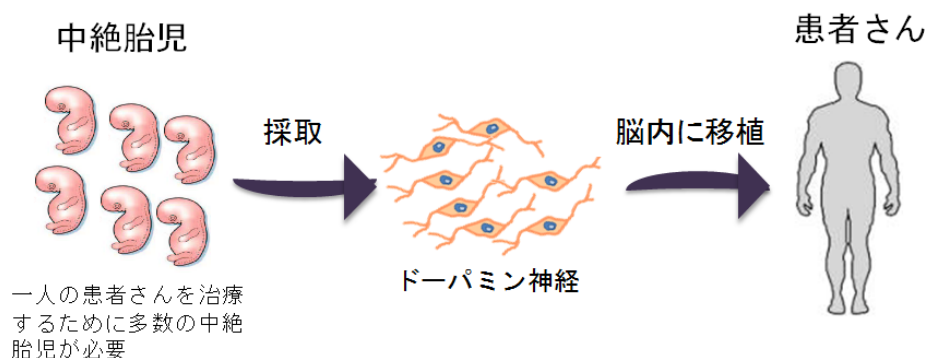


図1. 従来のパーキンソン病細胞移植治療

細胞移植は神経変性疾患の夢の治療として1980年代からパーキンソン病を対象とした臨床試験が複数行われてきた。特に中絶胎児脳組織を用いた治療がスウェーデン、米国などで多く試験されてきたが未だ十分な有効性は確立しておらず、2010年にヨーロッパ連合(EU)で新しい臨床試験が開始されている。

これらの問題を解決する一つの方法として患者自身の細胞を用いる自己細胞の移植治療の可能性があります。成体幹細胞の一つである間葉系幹細胞は、骨髄に多く存在し自己増殖能や多分化能をもつ幹細胞として1990年代後半から注目されてきました。患者自身の骨髄などから採取できるため治療応用のハードルも低く、腫瘍化の危険も非常に低いため移植再生医療の細胞源として候補にあがり、2010年にはパーキンソン病を対象に、成体から採取しただけの分化させていない間葉系幹細胞を移植する臨床試験が海外で始まっています。しかし現状ではわずかな治療効果しか示されておらず、病気の神経組織で必要となる特定の神経機能を再生し、個体の行動機能を回復させるためには不十分で、間葉系幹細胞を高度な機能を有するドーパミン神経に分化誘導させる技術開発が必要とされています。間葉系幹細胞以外にも、自己の細胞から誘導した人工多能性幹細胞(iPS細胞)の移植利用も検討が進んでいますがまだ臨床試験には至っていない状況です。

東北大学の出澤、若尾らは間葉系幹細胞の機能を解明し、特定の神経細胞を分化

させる培養方法の開発を行ってきました。また、理化学研究所の林、尾上らは、PETやMRIなどの分子イメージング技術により、神経変性疾患の病態や移植治療の効果について動物を生きたまま非侵襲的に調べる研究を行ってきました。

今回の共同研究では、間葉系幹細胞から特定のドーパミン細胞を誘導し、霊長類パーキンソンモデル動物での自己細胞移植の有効性を検証しました（図2）。

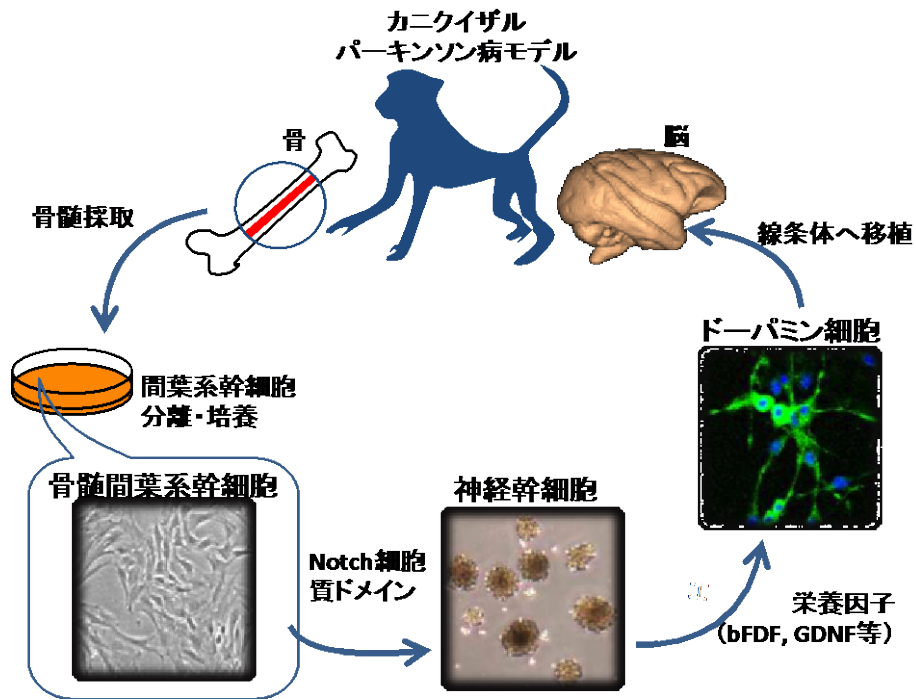
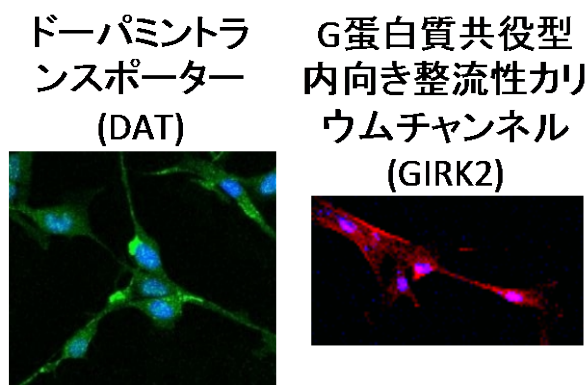


図2. 本研究の概略

カニクイザルから骨髄を採取し、骨髄間葉系幹細胞を分離したあと、Notch(ノッチ)細胞質ドメインや複数の栄養因子で処理したとドーパミン細胞が誘導できた。誘導したドーパミン細胞をパーキンソン病モデルのカニクイザル脳の前線状野に移植することで自己由来の誘導ドーパミン神経移植後の運動機能やドーパミン発現について時間を追って観察、移植の有効性や安全性を検証した。

## 2. 研究手法と成果

研究グループは、成体カニクイザルの骨髄から採取した骨髄間葉系幹細胞を培養し、ドーパミン細胞に分化させました<sup>\*1</sup>。ドーパミン神経細胞はさらにいくつかのサブタイプがありますが、パーキンソン病では特に A9 型ドーパミン神経とよばれるものが変性・脱落していることが知られています。今回作製した細胞を免疫細胞化学法<sup>\*2</sup>により染色したところ、全てのドーパミン細胞に特異的なタンパク質であるドーパミントランスポーターに加えて、A9 型ドーパミン細胞の特徴である GIRK2 (G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムチャンネル) が強く発現していることが確認できました(図 3)。同時に、他の型のドーパミン細胞 (A8 や A10) がもつタンパク質 (カルビンディン) には陰性であったことから、この細胞が A9 型ドーパミン細胞に近い性質をもつことがわかりました。同様の結果は、逆転写ポリメラーゼ反応という手法により細胞内の遺伝子産物 (mRNA) を調べる手法によっても確認できました。



**図 3. 骨髄間葉系幹細胞から誘導した細胞**

免疫細胞化学法により、ドーパミントランスポーター (DAT)、G 蛋白質共役型内向き整流性カリウムチャンネル (GIRK2) に陽性の染色パターンを示した。この染色パターンは、パーキンソン病で障害されやすい A9 型ドーパミン細胞と類似している。

次に、パーキンソン病モデルカニクイザル<sup>\*3</sup>を用いて移植実験を行い、移植細胞の有効性と安全性について評価しました。10 頭のパーキンソン病モデルのうち、5 頭のサルに骨髄間葉系幹細胞から分化したドーパミン神経細胞を移植し、対照として他の 5 頭には細胞調整液のみを注入することで、運動機能の回復と、PET<sup>\*4</sup>および MRI<sup>\*5</sup>による移植細胞の評価を行いました。障害側である左前肢で餌をつかむ際、速度やふるえの改善状況を観察したところ、運動機能は移植 4-8 か月後に回復しました (図 4A)。脳内で機能しているドーパミン神経は神経伝達物質であるドーパミンを放出しますが、放出するとすぐに細胞内に取り込んで再び次なる活動に備える機能を有します。この機能は細胞表面にあるドーパミントランスポーターによってもたらされます。そこで脳内の移植細胞の機能をドーパミントランスポーターに対する PET プローブ (<sup>11</sup>C-CFT) <sup>\*6</sup>を用いた PET で観察したところ、ドーパミントランスポーターの発現が移植直後に顕著に上昇し (図 4B)、その後徐々に減少はするものの、7 ヶ月後においても移植前より高い値を安定的に維持していることがわかりました (図 4C)。これらの結果は、移植 9 ヶ月後に行った脳組織の顕微鏡観察か

らも確認できました(図5)。さらに、MRI や  $^{18}\text{F}$ -FDG<sup>\*7</sup> を用いた PET 検査や免疫組織化学法から、移植片が腫瘍化せず、全身状態や血液検査でも副作用が無いことが示されました(図6)。

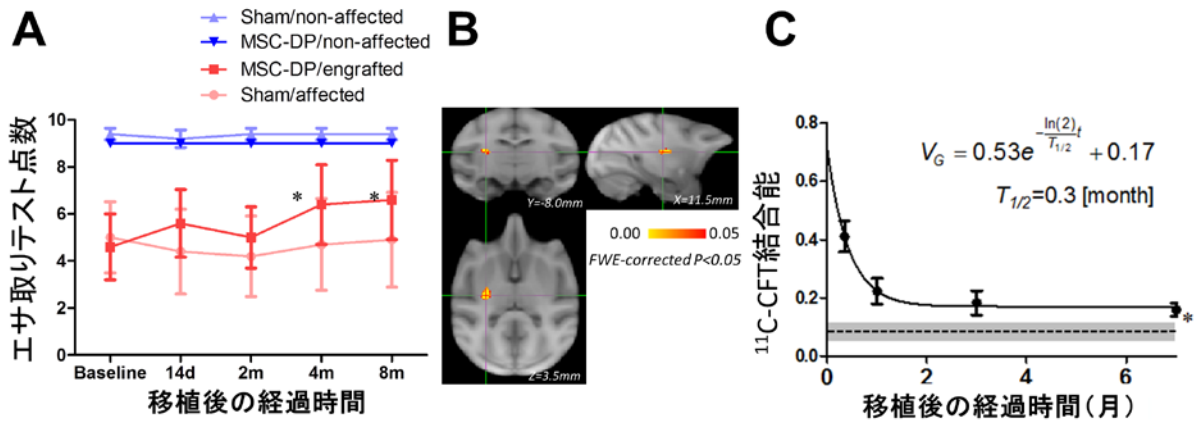


図4. パーキンソン病モデル動物への自己由来の誘導ドーパミン神経移植後の経過

- A) エサ取りテストによる運動機能の時系列変化。濃い赤線は誘導細胞を移植したサルの障害側の運動機能、薄い赤線は、コントロール手術のみ行ったサルの障害側の運動機能、青線は誘導細胞を移植したサルの非障害側の運動機能、薄い青線はコントロール手術のみ行ったサルの非障害側の運動機能。誘導細胞を移植したサルの障害側の運動機能は4か月後、8か月後に軽度の改善を呈した。
- B) 誘導細胞を移植した群において、 $^{11}\text{C}$ -CFT-PETによるドーパミントランスポーターへの結合能が時間的に変化した部位を赤—黄色にて示す。細胞移植した部位(線条体後部)に一致して変化が見られた。
- C) Bにより変化を示した部位における移植後時間による $^{11}\text{C}$ -CFT結合の時間的変化。結合能は移植直後に高値を示しその後徐々に減少したが、動態解析により7か月以後も結合能が移植前よりも高値を示した。

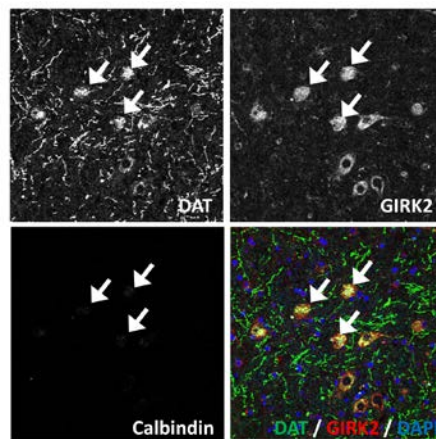
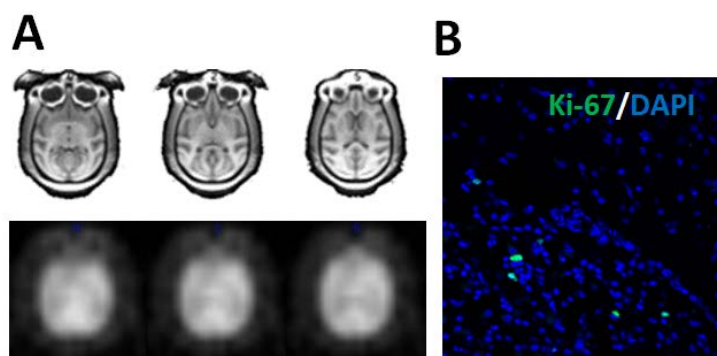


図5. 移植9か月後に行った脳切片の免疫組織化学法による染色結果

誘導細胞を移植した部位(線条体後部)においてDAT、GIRK2に陽性で、カルビンディン(Calbindin)には陰性の細胞が多数観察された。

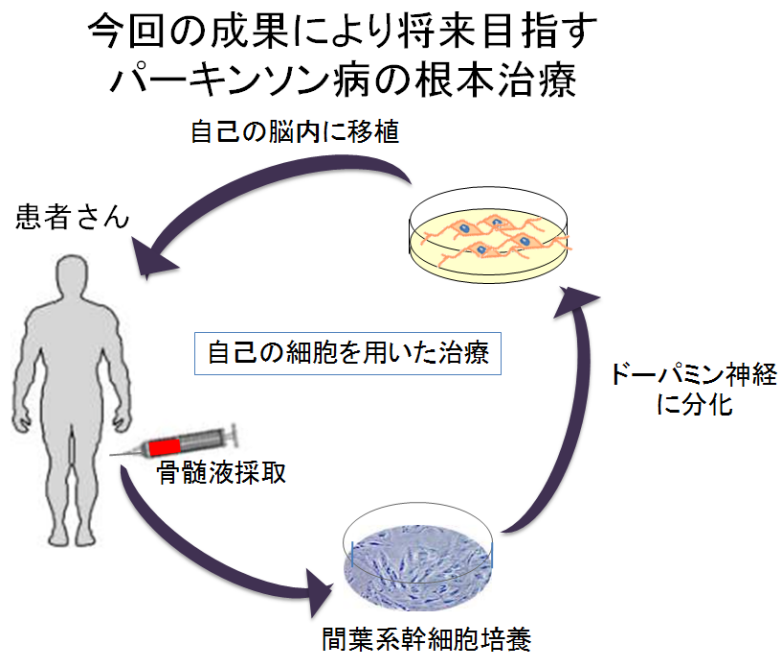


**図 6. 移植片の腫瘍化有無の検証結果**  
 A)  $^{18}\text{F}$ -FDG を用いた PET 検査でも脳内の異常集積は見られず、B) 移植部位の脳切片の組織染色でも腫瘍化を疑う変化は見られなかった。移植後 9 カ月での所見。

以上の結果から、骨髄間葉系幹細胞から誘導したドーパミン細胞が移植後長期間にわたって生着・機能し続けることで、パーキンソン病の運動機能障害が徐々に回復に向かったと結論しました。

### 3. 今後の期待

今回の実験で、骨髄間葉系幹細胞を用いたパーキンソン病での自己細胞移植治療の有効性・安全性の可能性を示すことができました。自己の細胞であれば免疫拒絶、感染症などの問題が回避でき、中絶胎児などを使わないので倫理問題も絡みません。骨髄の間葉系幹細胞は安定的に増える細胞ですので、比較的少量の骨髄液を取れば細胞治療に必要なとされる細胞数確保が可能です。何よりも、腫瘍化の危険が非常に低いという安全面での利点は大きく医療に適した幹細胞として注目されてきましたが、今回の分化した細胞でも腫瘍化しなかった結果は臨床応用において重要な点だと思われまます。これは、自己の細胞を用いて失われた組織の細胞を再生し、移植することで組織本来の機能回復が可能であることを霊長類動物（パーキンソン病モデルマカク）で証明した世界で初めての成果です。今後、移植細胞の長期生存能や機能再生をさらに向上させる技術を開発し、パーキンソン病を含めた神経変性疾患の自己細胞による治療法の確立をめざします（図7）。



**図7. 本研究成果から将来目指すパーキンソン病の根本治療**

本研究による前臨床試験の結果から、将来、パーキンソン病の患者さんの自己の骨髄液から間葉系幹細胞を培養、分化し、自己の脳内に移植するシステムを確立することで、パーキンソン病の安全かつ有効な治療法を行える可能性が開けると考えられる。

原論文情報：

Takuya Hayashi, Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Takayuki Ose, Hiroshi Watabe, Yasumasa Kuroda, Kanae Mitsunaga, Dai Matsuse, Taeko Shigemoto, Akihito Ito, Hironobu Ikeda, Hidenao Fukuyama, Hirotaka Onoe, Yasuhiko Tabata, Mari Dezawa. "Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques." *Journal of Clinical Investigation*, 2012, doi: 10.1172/JCI62516

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人医薬基盤研究所

研究振興部

研究推進課長 江野英夫 (えの ひでお)

TEL 072-641-9803 FAX 072-641-9831

(記者会見出席者)

東北大学大学院医学系研究科

細胞組織学分野・人体構造学分野

教授 出澤真理 (でざわ まり)

助教 若尾昌平 (わかおしょうへい)

TEL : 022-717-8025 FAX : 022-717-8030

独立行政法人理化学研究所

分子イメージング科学研究センター

分子プローブ機能評価研究チーム

副チームリーダー 林 拓也 (はやし たくや)

チームリーダー 尾上浩隆 (おのえひろたか)

TEL : 078-304-7121 FAX : 078-304-7123

(各機関の報道担当)

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室

長神風二 (ながみ ふうじ)

TEL : 022-717-7908 FAX : 022-717-8187

独立行政法人理化学研究所

分子イメージング科学研究センター

山岸 敦 (やまぎしあつし)

TEL : 078-304-7138 FAX : 078-304-7112

広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715



## <補足説明>

### ※1 ドーパミン細胞の分化法

これまで出澤らが独自に開発してきた手法で、間葉系幹細胞に Notch (ノッチ) とよばれる膜タンパク質の一部分である細胞質部分の遺伝子を発現させ、4 種類の栄養因子 (フォロスコリン、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)) を添加、処理することでドーパミン細胞類似の細胞が誘導される。詳細は Nagane らの論文 (Tissue Engineering Part A. 15 (7): p1655-1665, 2009) を参照。

### ※2 免疫細胞化学法・免疫組織化学法

抗体を用いて、培養細胞や組織標本中の抗原を検出する組織学的手法のこと。抗体の特異性を利用して組織を染め、抗原の存在および局在を顕微鏡下で観察できるので、特定遺伝子の発現や、各種の「マーカータンパク質」の発現を観察できる。抗体に蛍光色素を標識しておけば、抗原抗体反応の後で励起波長を当てて蛍光発色させ蛍光顕微鏡で観察できる。一般病院でも癌の病理組織の診断にもよく使われる。

### ※3 パーキンソン病モデルカニクイザル

神経毒である 1-メチル-4-フェニル 1-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン (MPTP と略す) を右内頸動脈から投与すると、左前後肢に、ふるえ、動作緩慢などのパーキンソン病特有の運動障害を呈する。これを片側パーキンソン病モデルとした。

### ※4 PET

陽電子放出断層画像法 (PET, Positron Emission Tomography) による画像診断。陽電子を放出する放射性同位体を薬などの分子に組み込んで個体に投与し、体内で崩壊して放出される  $\gamma$  線を測定して分子の体内分布を見る方法。陽電子放出核種である  $^{11}\text{C}$  や  $^{18}\text{F}$  などで標識された薬剤を PET プローブという。大学病院や専門病院でも癌診断や認知症の診断検査法として使用されている。

### ※5 MRI

高い磁場とラジオ波を用いて生体内部を画像化する手法 (MRI, Magnetic resonance imaging, 磁気共鳴画像法)。大学病院や専門病院だけでなく一般病院でも導入されている。脳卒中や神経疾患、癌、心、肝臓、肺、関節疾患など多くの疾患診断に使用されている。

### ※6 $^{11}\text{C}$ -CFT

ドーパミントランスポーターに対する PET プローブ

### ※7 $^{18}\text{F}$ -FDG

ブドウ糖に対する PET プローブ。癌の診断にも使用されている。