

総説

多能性幹細胞の運命決定における薬学的制御と再生医療への発展

西村周泰*, 高田和幸

京都薬科大学 統合薬科学系

世界で初めてマウス胚性幹細胞が樹立されてから 40 年が経ち、一般社会の中でも多能性幹細胞の話題を耳にすることが増えてきた。多能性幹細胞といえは、今でこそ再生医療を担う細胞として広く認知されているが、胚性幹細胞が樹立された当初はもっぱら遺伝子改変動物を作製するためのツールであり、時代のニーズに合わせてその役割は大きな変化を遂げてきている。そして我々人類は、多能性幹細胞の分化能を正確に制御し、目的の細胞を高純度で得るための技術開発に長年取り組んできた。これらの技術が目覚ましく発展できた背景には、生き物の形づくりを扱う発生生物学研究と、その動的で複雑な生命現象を化合物で制御する薬学研究が大きな役割を果たしてきた。本稿では幹細胞研究の基盤となる発生生物学研究について時系列に従って整理しつつ、薬学的研究が果たしてきた役割を織り交ぜて紹介するとともに今後の発展的展望について概説する。

キーワード：多能性幹細胞, 脳発生, 神経分化, 再生医療, 薬学的介入

受付日：2022 年 2 月 1 日, 受理日 2022 年 2 月 25 日

はじめに

生物の再生能力を進化的な観点から紐解くと、原始的な生物ほど自己再生能力が旺盛であることが知られている。代表的な生物としてプラナリアやイモリが有名であるが、これらの生物は自身の幹細胞システムを巧みに利用し、失った組織を丸ごと再生できることが知られている¹⁻³⁾。一方で我々ヒトの自己再生能力は外傷後の治癒など限定的であり、失った組織を丸ごと再生できる能力は有しておらず、再生能力

が極めて乏しい生物であるといえる。この課題を克服するべく、我々人類は分化多能性をもつ幹細胞を手に入れ、さらにその分化能を自在に操る技術を手に入れようとしている。失った組織を生きた細胞を用いて補う再生医療の実現がそう遠くない将来に見えてきており、人類が進化の過程で手放してしまった自己再生能力に替わる新たな治療戦略を技術革新によって獲得しようとしている。この背景には研究手法や研究リソースの革新的な進歩が挙げられるが、これらが盤石な発展を遂げてきたのは、それまで脈々と培われてきた基礎研究の蓄積があったことを忘れてはいけない。特に生き物の形づくりを扱う発生生物学や生体分子の機能を化合物で代替する薬学は、我々が幹細胞を自在に操作す

* 連絡先：
〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町 5
京都薬科大学 統合薬科学系

るための技術や考え方の基盤となっている。現在の幹細胞研究が脚光を浴び飛躍的に発展できているのは、その土台となる基盤研究の“仕込み”があったからであり、これまで独自の視点で育まれてきた多様な学術研究領域を再生医療の実現に向けてつなぐステージに突入している。

多能性幹細胞の樹立

多能性幹細胞は、あらゆる細胞に分化する多分化能と無制限に増殖できる自己複製能を有する細胞である。世界で初めて報告された多能性幹細胞は、マウスの受精卵の内部細胞塊から樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) であり、これらの細胞を胎外で培養する技術が同時に確立された⁴⁾。ES 細胞の登場はそれまで受精卵ありきで研究が進んでいた発生生物学の分野に受精卵を用いない発生学研究分野が創成されただけでなく、その能力を活かしてさまざまな細胞への分化誘導技術の開発の礎を築いてきた。マウス ES 細胞が樹立された当初の使い道は、その高いキメラ形成能を活かした遺伝子改変マウスの作製であり、現在の遺伝子改変マウスを用いた研究手法が一般化されるために重要な役割を果たしてきた⁵⁾。また胎外で未分化細胞を用いた研究ができるようになったことは、個体発生を担うシグナル分子の発見やその作用機序の解明に大きく貢献しており、細胞が多能性を維持する仕組みや個体形成における動的で複雑な細胞の運命決定の分子機構の解析に利用されている。特に多能性の維持に重要なシグナル経路を化合物の添加によって人為的に制御する方法が確立されており、mitogen-activated protein kinase 阻害剤である PD0325901 と glycogen synthase kinase 3 β の阻害剤である CHIR99021 の 2 種類の化合物をマウス ES 細胞培養下に添加し細胞分化の進行に必要なシグナ

ルを遮断することで、血清成分や未分化維持に重要な因子である leukemia inhibitory factor の添加なしで、分化多能性の状態を基底状態に保つことができ⁶⁾、さらにはキメラマウスの作製効率の向上に繋がる研究へと発展を遂げている⁷⁾。その後、ES 細胞の樹立技術の開発は動物種を越えて霊長類に波及し、アカゲザル (*Macaca Mulatta*)⁸⁾、マーモセット (*Callithrix Jacchus*)⁹⁾ の ES 細胞が樹立され、1998 年には University of Wisconsin の Thomson らによって、不妊治療における体外人工授精の余剰胚からヒト ES 細胞が樹立された¹⁰⁾。その後、日本では 2003 年に京都大学の末盛らによってヒト ES 細胞が樹立されている¹¹⁾。しかしヒト ES 細胞は、ヒトの生命の萌芽である受精卵を滅失して樹立することから、日本では倫理的な制限が厳しく、基礎研究に用いるにも高いハードルがあった。このような時代背景のもと登場したのが人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) である。2006 年、京都大学の高橋らはマウスの線維芽細胞に 4 つの遺伝子を強制発現させることで、iPS 細胞を樹立することに成功した¹²⁾。さらに翌年にはヒト iPS 細胞が樹立され、幹細胞を用いた再生医療研究の開発に大きな弾みをつけることとなった^{13,14)}。

ヒト iPS 細胞の樹立方法の改良

ヒト iPS 細胞の樹立によって再生医療実現への機運が一気に高まりを見せたが、樹立された当初の iPS 細胞はいくつかの課題を抱えていた。まず一つ目の課題は iPS 細胞の樹立に使用する遺伝子の組み合わせである。iPS 細胞を樹立するには、体細胞に 4 つの遺伝子を強制発現させる必要があるが、樹立に用いる 4 つの遺伝子のうち 1 つが *c-Myc* という癌関連遺伝子であったということである。この点については、

Myc のファミリー遺伝子で癌原性を持たない *L-Myc* に置き換えても iPS 細胞は樹立できることが示されている¹⁵⁾。二つ目の課題として、iPS 細胞の樹立にはレトロウイルスベクターが用いられており、ゲノム DNA に外挿遺伝子が入ることからゲノム DNA の安定性への影響が懸念されていた。この点については、レトロウイルスベクターの代わりにエピソーマルベクターというゲノム DNA への遺伝子挿入を伴わないベクターを用いる方法が確立されている¹⁶⁾。また樹立に用いる源細胞として、侵襲的な皮膚生検を伴う線維芽細胞だけでなく、採血で簡単に取得できる末梢血由来単球からでも樹立することが可能であり、現在の樹立方法はこの末梢血由来単球を源細胞として、エピソーマルベクターを用いた樹立方法が一般化されている¹⁷⁾。

ヒト ES/iPS 細胞培養法の一般化に向けた技術開発

ヒト iPS 細胞の培養技術は、それまで先行して進められてきたヒト ES 細胞の培養技術と共通している部分が多く、培養操作が一般化されるまでに多段階的な改良が重ねられてきた。まずヒト ES 細胞を維持培養する際に頭を悩ませたのは、単一細胞に分散することに対して極めて脆弱であることである。このことから従来法によるヒト ES 細胞の継代の際にはコロニーを単一細胞に分散させず、ある程度の大きさの細胞塊を維持するように分散する必要がある、継代を行うたびにその分散の具合を揃えるには高い技術が要求され、安定した維持培養をするのが一苦勞であった。この課題を解決したのが Rho kinase 阻害薬である Y-27632 である。Y-27632 は細胞分散のときに生じるアポトーシスによる細胞死を劇的に抑制し、維持培養の効率を格段に向上させることに成功した¹⁸⁾。また維持培養に用いる培地は動物由来因子や未知の

成分を含んでおり、ロット差に起因する維持培養の不安定さや実験結果の不一致が課題となっていたが、現在では既知の成分および組成からなる培地が開発され、安定した細胞培養と実験結果が得られるようになってきている¹⁹⁾。また従来ヒト ES/iPS 細胞は、動物由来のフィーダー細胞上で培養していたが、現在ではラミニン 511、ラミニン 521 および E-カドヘリンなどの合成基質上で培養することが可能となった²⁰⁻²³⁾。現在ヒト ES/iPS 細胞は、全て既知の成分および組成からなる培地、基質、添加物を用いた条件で培養することが可能となり、研究結果の再現性の向上に大きく貢献している。

脳発生のプロセスと幹細胞からの神経誘導

かつて Spemann と Mangold が行ったイモリ胚の移植実験によると、イモリ胚の原口背唇部を別のイモリ胚に移植をすると、移植した原口背唇部は周辺の組織に作用し頭部を有する二次胚を形成することを見出している²⁴⁾。これは Spemann のオーガナイザー研究として大変有名であり、原口背唇部には神経を含む組織形成を誘導する物質（オーガナイザー）が含まれていることが想定された。しかし、当時の研究技術ではその分子実体を明らかにするには至らず、それらが明らかになったのは半世紀以上後であった。1992 年から 1994 年にかけて、*noggin*、*chordin* および *follistatin* が、原口背唇部に含まれる強力な神経誘導因子として同定された²⁵⁻²⁷⁾。これらの分子の作用機序を解析すると、これらの因子は直接、神経細胞を誘導するのではなく *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4) や *activin* の機能を阻害することで中胚葉および内胚葉への分化を抑制し、その結果、細胞運命系譜は神経外胚葉が誘導されるということが明らかとなった。これはイモリに限った現象ではなく脊

脊椎動物で共通してみられる発生プログラムであり、現在では ES/iPS 細胞を用いた神経誘導研究の根拠を成す考え方となっている^{28,29}。実際、ES/iPS 細胞は未分化状態を維持するために増殖因子や血清成分などの外因的な因子を多く含む培地で培養するが、外因的な刺激因子がない状態で培養すると、自発的に神経外胚葉へ分化することが知られており、ES/iPS 細胞の細胞分化のデフォルトが神経系譜であることが示されている³⁰。神経誘導法が開発された当初は、ES/iPS 細胞の予定運命が神経外胚葉であることを利用した誘導法が正統な方法であり、自律的に神経外胚葉へ分化する過程に神経栄養因子を添加する神経誘導法が一般的であった。現在では noggin, chordin および follistatin の機能は化合物に置き換えられており、BMP-4 阻害剤である dorsomorphin と lefty/activin/transforming growth factor- β 阻害剤である SB431542 の二つの化合物を誘導中に添加することで中胚葉および内胚葉への分化を強力に阻害し、強制的に神経外胚葉を誘導することが可能となっている。この方法は dual-SMAD 阻害法と呼ばれており、現在の神経誘導法の標準的な方法となっている^{31,32}。

自己組織化による脳オルガノイドの誘導

ヒト ES/iPS 細胞から神経誘導を行う場合、大きく分けて二通りの方法が挙げられる。一つは、細胞を培養皿に接着させる二次元接着培養である。これは外因的に添加するモルフォゲンや化合物を均一に処置できることから、細胞の分化過程をある程度同調させることができる。もう一つは、胚様体 (embryonic body: EB) という細胞塊を経る手法である³³。この方法は二次元接着培養とは異なり、三次元の“形”を有している構造体を作製し神経誘導を行う方法で

ある。現在のオルガノイド研究は、この EB 法を原型としており EB 内での細胞間コミュニケーションと、培養液に含まれる様々な因子のバランスのもとで半自律的に極性が形成されることで組織様構造が形成されると考えられている³⁴。

2008 年に理化学研究所の永樂らによって報告された serum-free floating culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation 法 (SFEBq 法) は、非接着性の培養ウェルに単一細胞に分散した ES/iPS 細胞を決まった細胞数だけ播種することで急速に凝集塊を形成する方法である³⁵。この方法を用いることで凝集塊を構成する細胞数を一定にでき、凝集塊の大きさの均一性が保たれ、再現性の高い誘導実験が可能となった。またこの方法で神経誘導を行うことで発生過程を模倣した自己組織化による大脳の層構造の形成も確認されている (図 1)。さらに 2013 年に Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences の Lancaster らによって報告された方法では、モルフォゲンや栄養因子を加えずに内在的な形態形成シグナルに従って形成された神経外胚葉の細胞塊を、バイオリアクターの中で攪拌培養することで栄養を行き渡らせ、より多様で複雑な高次構造の形成を可能にしている³⁶。

化合物を用いたシグナルコントロールによる領域特異的な神経誘導

ヒト ES/iPS 細胞由来神経細胞を用いた新規治療薬等のスループットスクリーニングや疾患モデルの作製研究が進められているが^{37,38}、神経細胞は存在する領域や部位によって特性が異なっており、さらには神経疾患ごとに影響を受ける神経細胞の種類も異なることが知られている。例えばパーキンソン病であれば、中脳のドパミン神経が選択的に障害を受けるし、アルツ

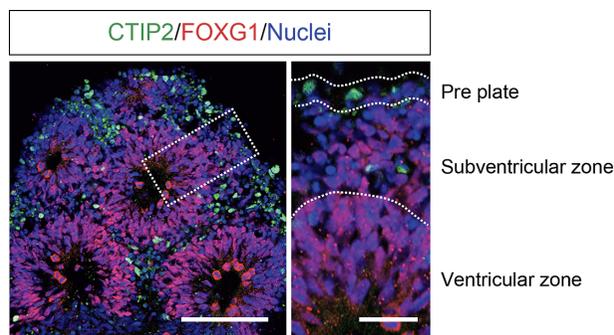


図1 SFEBq法を用いてヒトiPS細胞から作製した大脳オルガノイド(誘導20日目)。FOXG1陽性細胞(赤)によるventricular zoneおよびsubventricular zoneに相当する層とCTIP2陽性細胞(緑)によるpre plateに相当する層が分かれて形成されている。スケールバー:200 μm(左),50 μm(右)。

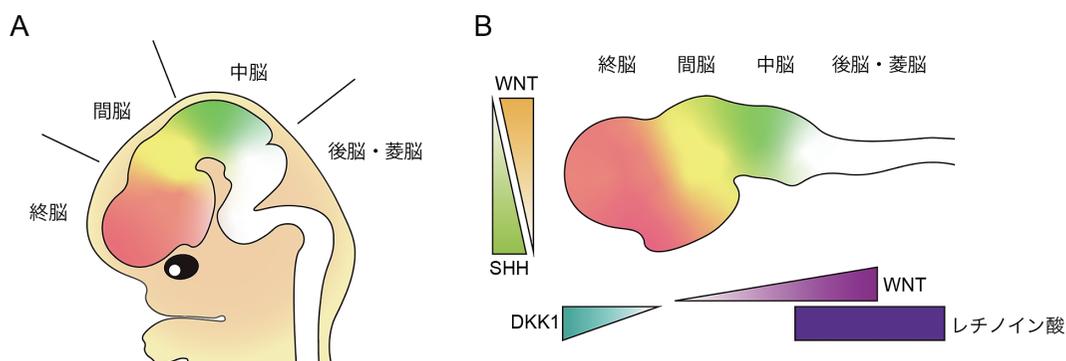


図2 発生過程におけるヒト脳の領域化に関わるシグナル分子。(A) 脳発達過程における解剖学的分類。(B) 脳発生過程における領域化とパターンニング因子。SHH: Sonic Hedgehog, DKK1: Dickkopf1。

ハイマー病であれば大脳皮質や海馬など広範な脳領域において神経細胞死が見られる。従って、iPS細胞由来神経細胞を用いた研究には、疾患ごとに対象となる部位の神経細胞を用いて行う必要がある。

脊椎動物の脳は大脳、間脳、中脳、小脳などのいくつかの領域に分類されている(図2A)。脳の発生過程において、この領域化を決定しているのはfibroblast growth factor (FGF), WNT, Sonic Hedgehog (SHH)などのモルフォゲンであり、脳を含む中枢神経系の原基である神経管は、このモルフォゲンの濃度勾配にしたがって脳の領域化が進んでいく³⁹⁾(図2B)。この脳発生における領域化の分子機構は、ヒトES/iPS細胞から神経細胞を誘導する際にも応用されて

いる。すなわち、神経誘導過程において必要なモルフォゲンを適切なタイミングで適切な濃度で処置することによって、単に神経細胞を作るだけでなく脳の各脳領域を作り分けることができる^{40,41)}。またこれらのモルフォゲンのうちいくつかは化合物によってその働きを置き換えることが可能であり、多段階的に進む神経誘導の過程を時間軸に沿って正確にコントロールすることで、脳発生の時間的・空間的な再現が可能となっている。最近では複数の化合物を組み合わせることで、ほとんどの脳領域の神経細胞を誘導することが可能となっている⁴²⁻⁶⁷⁾(表1)。我々はこの誘導コンセプトに基づき、化合物によるシグナルコントロールを厳密に行うことで、ヒトiPS細胞から二次元培養法により線条

表1 ヒト多能性幹細胞からの脳領域特異的な神経誘導法

脳領域	神経誘導に用いる因子	脳の領域化に用いる因子	参考文献
大脳皮質	SB431542	IWE1e	Kadoshima et al., 2013 ⁴²⁾
	LDN193189 + SB431542	XAV939	Qi et al., 2017 ⁴³⁾
	LDN193189 + SB431542	IWE1e, FGF8, sFGFR3	Imaizumi et al., 2018 ⁴⁴⁾
線条体	Dorsomorphine + SB431542	SHH + DKK1	Carri et al., 2013 ⁴⁵⁾
	LDN193189 + dorsomorphine + SB431542	Activin A	Arber et al., 2015 ⁴⁶⁾
	LDN193189 + A83-01	XAV939 + SAG	Wu et al., 2018 ⁴⁷⁾
海馬	LDN193189 + A83-01	XAV939 + purmorphamine	Amimoto et al., 2021 ⁴⁸⁾
	Noggin + SB431542	Cyclopamine + DKK1	Yu et al., 2014 ⁴⁹⁾
	SB431542	IWR1e + CHIR99021 + BMP4	Sakaguchi et al., 2015 ⁵⁰⁾
前脳基底部	LDN193189 + SB431542	Cyclopamine + XAV939	Pomeshchik et al., 2020 ⁵¹⁾
		SHH + BMP9	Yue et al., 2015 ⁵²⁾
		SHH + purmorphamine	Hu et al., 2016 ⁵³⁾
視床	LDN193189 + SB431542	XAV939 + purmorphamine	Krajka et al., 2021 ⁵⁴⁾
	LDN193189 + SB431542	XAV939 + purmorphamine + SAG	Merkle et al., 2015 ⁵⁵⁾
	LDN193189 + SB431542	Purmorphamine + SHH	Wang et al., 2015 ⁵⁶⁾
腹側中脳	SB431542	CHIR99021 + SAG	Denham et al., 2012 ⁵⁷⁾
	LDN193189 + A83-01	Purmorphamine + CHIR99021 + FGF8b	Doi et al., 2014 ⁵⁸⁾
	Noggin + SB431542	CHIR99021 + SHH + FGF8	Jo et al., 2016 ⁵⁹⁾
	Noggin + SB431542	SHH + CHIR99021 + FGF8b	Kirkeby et al., 2017 ⁶⁰⁾
	LDN193189 + SB431542	CHIR99021 + SHH	Kim et al., 2021 ⁶¹⁾
小脳	LDN193189 + SB431542	Purmorphamine + SAG + CHIR99021	Sarraffa et al., 2021 ⁶²⁾
	SB431542	FGF2	Muguruma et al., 2015 ⁶³⁾
	SB431542	FGF2 + insulin	Nayler et al., 2021 ⁶⁴⁾
後脳	LDN193189 + SB431542	Purmorphamine + retinoic acid	Valiulahi et al., 2021 ⁶⁵⁾
	DMH1 + SB431542	CHIR99021 + purmorphamine + retinoic acid	Du et al., 2015 ⁶⁶⁾
脊髄	SB431542	CHIR99021 + bFGF + retinoic acid + SAG	Ogura et al., 2018 ⁶⁷⁾

体神経細胞を誘導するプロトコルを確立し、さらに高次構造を有する線条体神経細胞塊の誘導にも成功している⁴⁸⁾。さらに、脳を構成する神経細胞以外の細胞であるミクログリア^{68, 69)}、アストロサイト^{70, 71)}、オリゴデンドロサイト^{72, 73)}などのグリア細胞も誘導することが可能であり、誘導した各種細胞を共培養することで、疾患再現や創薬スクリーニングを目指した脳モデルの構築する研究も進められている^{74, 75)}。

中脳ドパミン神経の誘導法の開発

中脳は中央に位置する組織であり、脳発生過程において二次オーガナイザーとして知られ中脳後脳境界部である Isthmus の前方に形成される⁷⁶⁻⁷⁹⁾。中脳の中でも腹側に位置する黒質はドパミン神経を豊富に含む領域であり、運動機能の調節や動機づけに重要な機能を果たしている⁸⁰⁾。特に黒質ドパミン神経の起源領域である腹側中脳の形成には、Isthmus やその周辺から

分泌される SHH, FGF8, WNT1, WNT5A などのモルフォゲンが重要な役割を果たしていることが知られている⁸¹⁻⁸³。これらの因子は液性因子であることからリコンビナントタンパク質を合成することが可能であり, これらを用いて多能性幹細胞からドパミン神経を誘導するプロトコルの開発が進められてきた。2000年に National Institutes of Health の Lee らによって報告された 5 step 法は, マウス ES 細胞からドパミン神経を誘導する方法であり, 浮遊培養法により EB を作製したのち接着培養に移行させて誘導を進めていく方法である。このときに先述の SHH や FGF8 などの中脳ドパミン神経発生に重要な液性因子を添加することで, ドパミン神経を誘導している⁸⁴。また同年, 理化学研究所の河崎らによって報告された stromal cell-derived inducing activity (SDIA) 法は, マウスの骨髄由来細胞である PA6 細胞をフィーダーとすることでマウス ES 細胞からドパミン神経を誘導できる方法である⁸⁵。この方法は EB を介さず, また栄養因子やサイトカインなどの添加物も不要な簡便な方法である。さらに SDIA 法で誘導したドパミン神経は, パーキンソン病マウスモデルの脳に生着することも確認されている。さらに 2005 年には, カニクイザル ES 細胞から SDIA 法を用いて誘導したドパミン神経をパーキンソン病サルモデルの脳に移植し, 14 週間の生着と運動スコアの改善が観察されている⁸⁶。

現在のヒト ES/iPS 細胞からのドパミン神経誘導法は, 先述の dual-SMAD 阻害法による神経誘導をもとに SHH と WNT シグナルを調節することで中脳腹側領域を誘導する方法が基本となっている⁸⁷⁻⁸⁹。特に後述する細胞移植治療への応用を念頭に入れた場合, 得られる細胞集団の均一性の担保が重要となるが, 細胞自律的な誘導法では誘導試行ごとに細胞の純度を揃えることは難しい。その点, 細胞表面抗原を用いたセルソーティングによりドパミン神経前駆細胞

の純化することができる。これまでに中脳発生過程においてドパミン神経前駆細胞に選択的に発現する細胞表面抗原 (CORIN, ALCAM, LRTM1, IAP, TPBG) が同定されており, ドパミン神経前駆細胞の純化に用いられている^{58, 90-93}。

細胞レベルで見た脳発生と幹細胞研究への応用

ポストゲノム時代に突入し, ヒトやマウスのゲノム情報はデータベースを検索するだけで簡単に取得できるようになった。このような背景のもと革新的技術として出てきたのが RNA-sequencing (RNA-seq) であり, 対象となるサンプルの塩基配列を網羅的かつ定量的に読み, ゲノム情報と照らし合わせることで, 遺伝子発現を定量的に解析する技術である。さらに, この技術を応用し 1 細胞ごとに RNA-seq ができるようになったことで, 個々の細胞単位での遺伝子発現の特徴を理解することができるようになった⁹⁴。この技術の進歩によって, 中脳の発生過程を組織レベルの解析から細胞レベルの解析を行うことが可能となった⁹⁵。このような背景のもと, マウスおよびヒト中脳発生過程における single-cell RNA-seq (scRNA-seq) 解析結果がリソース論文としていくつか発表されている⁹⁶⁻⁹⁸。これらの報告では, マウスの胎児期の中脳組織および成体の中脳組織における scRNA-seq 解析を行い, 中脳を構成する細胞のクラスタリング, 遺伝子発現, 予測される細胞運命の方向性等を詳細に解析している。特に Karolinska Institutet の La Manno らの報告では, ヒト中脳発生過程における scRNA-seq 解析を行い, マウスの中脳発生過程およびヒト ES 細胞由来中脳ドパミン神経との比較から, マウスとヒトにおける中脳を構成する細胞の多様性や遺伝子発現パターンの違いなどを明らかにし, 以後のヒト幹細胞研究および発生研究の理解に貢

献している⁹⁶⁾。またこれらの知見をもとに、ヒト ES/iPS 細胞からドパミン神経を誘導する方法の改善に活かすことで発生過程を忠実に再現し、より生体に近いドパミン神経の誘導が可能になると考えられる^{60, 99, 100)}。

パーキンソン病に対する 細胞移植治療の開発

パーキンソン病は、中脳黒質のドパミン神経細胞の選択的な脱落に起因する神経変性疾患であり、進行的に安静時振戦、筋固縮、無動、姿勢歩行障害を呈することが知られている^{101, 102)}。主な治療法はドパミン前駆物質である L-DOPA などの内用薬を用いた内科的治療である。初期の治療では著効を示すが、長期的に服用すると次第に症状のコントロールが難しくなる。これはドパミン神経の脱落が進行し、ある一定程度の細胞数を下回ると L-DOPA から十分量のドパミンを合成することができなくなることによるものである。さらに現行の薬物治療では、ドパミン神経の変性・脱落の進行を止めることができないことから根本的な治療法にはなり得ないのが現状である。そこで現行の治療に加えて根治的な治療法として、ドパミン神経を補充する細胞移植治療の開発が進められている。

パーキンソン病患者に対する細胞移植治療の開発は、1980年代後半からヒト胎児の中脳組織（ドパミン神経を含む）を用いて進められてきた¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。いくつかの症例では長期的な症状の改善が報告されているが、中絶した胎児の組織を用いる治療は、移植に必要な細胞数の安定的な供給が難しい上に、組織内に含まれる細胞は均一ではなく、さらに中絶胎児の組織を使用するという生命倫理的な観点から一般的な治療法には至っていない¹⁰⁶⁾。そこで胎児組織の代替ソースとしてヒト ES/iPS 細胞から誘導したドパミン神経が着目されてきた。

移植医療に用いるヒト ES/iPS 細胞は学術研究で用いる細胞よりも、厳格な品質管理基準を遵守しておく必要がある。これは臨床利用を行う上で安全性確保のために必要なことであり、世界でもその基準を満たした臨床用ヒト ES/iPS 細胞が樹立されている¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾。日本でも京都大学の川瀬らによって2018年に臨床用ヒト ES 細胞株が樹立され分配が開始されている^{110, 111)}。またヒト iPS 細胞についてもヒト白血球型抗原 (human leucocyte antigen: HLA) ホモドナーから作製した iPS 細胞ストックを作製し臨床研究への利用が開始されている^{112, 113)}。このように作製された臨床用ヒト iPS 細胞を用いて、日本では2018年に京都大学においてヒト iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞を用いた医師主導試験が開始され¹¹⁴⁾、米国でも2021年から Blue Rock Therapeutics 社によってヒト ES 細胞由来ドパミン神経前駆細胞を用いた第 I 相試験が開始されている¹¹⁵⁾。さらに、ヨーロッパでは University of Cambridge の Barker らが中心となって TRANSEURO コンソーシアムを立ち上げ、過去に行われた胎児細胞移植から得られた知見をもとに患者選定の基準、ドナー細胞の基準、移植後のフォローアップや検査項目に関する基準などを再設定し、ヒト胎児細胞を用いた大規模な臨床研究がスタートしている¹¹⁶⁾。

細胞移植治療に対する薬学領域からの発展的介入

iPS 細胞の特徴は患者本人の体細胞から iPS 細胞を作製し、そこから誘導した細胞を用いて自家移植が可能であるということであり^{117, 118)}、自家移植を選択できる場合は免疫抑制剤の投与は回避できると考えられる。一方で HLA 型が異なる他家移植の場合は移植細胞に対する免疫拒絶反応を回避する必要がある、その手段として安全性が既に確立されている医薬品を用いて

拒絶反応を抑制することは有効であると考えられる。代表的な先行例として、臓器移植治療の際の免疫抑制薬の投与が挙げられる。HLA型が適合しない臓器移植の場合、拒絶反応が惹起される恐れがあるが免疫抑制剤を投与することで拒絶反応は軽減され、移植臓器の安定的な生着と機能維持が可能となる。すなわち臓器移植治療において免疫抑制薬の投与は必須の薬学的介入であり、薬剤により移植した組織の生存を助長できる代表的な例である。

話を細胞移植治療に戻すと、移植したES/iPS細胞由来神経細胞が脳内に生着し機能するためには、拒絶反応を抑制して細胞の生着を促すだけでなく、神経成熟の促進、神経突起の伸長およびシナプスの形成を促進する必要がある。移植した神経細胞の状態に合わせて多段階的な介入が必要となると考えられる¹¹⁹⁾。これらの目的のもと薬学的介入によって細胞移植治療を向上させる研究はいくつか進められている。我々はヒトiPS細胞由来ドーパミン神経前駆細胞をモデルラットに移植する際に女性ホルモン薬であるエストラジオールを長期投与することで、移植したドーパミン神経細胞と宿主脳の線条体神経細胞のシナプスの形成が促進され、行動障害が早期に改善されることを見出している¹²⁰⁾。これはエストラジオール投与によって線条体神経に発現している細胞接着因子であるインテグリン $\alpha 5\beta 1$ の活性化を介したシナプス形成の促進によるものであると考えられている。また抗てんかん薬であるゾニサミドの長期投与は移植したドーパミン神経細胞の生着率を向上させることも見出している¹²¹⁾。これらの研究は、薬学的な介入によって細胞移植治療の効果を向上させることを示した例である。またこの2つの医薬品は、既に薬価収載され臨床で使用されている医薬品であり、既存薬の再開発の観点から将来の細胞移植治療を支える医薬品になることが期待される。

おわりに

近年の幹細胞研究の進展は目覚ましく、特に医療応用に向けた世界的な競争は激しさを増しており、産学官の有機的な連携による基盤整備が圧倒的な速さで進められている。幹細胞研究の発展にはそれまでの多くの学術研究の蓄積やそれに裏打ちされた革新的な技術開発があったからであり、改めて基礎研究の重要性が認識されている。本稿で触れた発生生物学および薬学の研究分野は、現在の幹細胞研究の発展においてなくてはならない研究分野であるが、これらの研究分野は幹細胞研究の発展を目的として作られた研究分野ではなく、長い年月をかけて独自に発展してきた研究分野あり、異分野融合的な過程を辿りながら幹細胞研究の発展に寄与してきている。特にその安定した培養法や分化誘導法の確立には化合物は必須のツールであり、薬学の知識に基づいた細胞運命の制御法の理解を深めることで、安定で再現性の高い分化誘導法の開発に貢献するとともに新たな薬学研究の領域創成にも寄与すると考えられる¹²²⁾。

このような異分野融合的な背景から、薬物治療や脳深部刺激療法などの対症療法しか選択肢がなかったパーキンソン病治療に、新たにES/iPS細胞を用いた機能再生的治療が加わろうとしている。ここで特筆すべきは、細胞移植治療は既存の薬物治療や脳深部刺激療法の代替法ではなく、既存の治療法との組み合わせた新しいアプローチを作出したほうが良質の医療を提供でき、患者へのベネフィットは大きいということである。例えば、ドーパミン前駆体であるL-DOPA製剤が効果を発揮するには、L-DOPAからドーパミンへの変換能を持った生きたドーパミン神経細胞が必要である。一方で筆者らが行った前臨床研究では、既存薬であるエストラジオールやゾニサミドは移植したヒトiPS細胞由

来ドパミン神経の生着数の改善や既存の神経回路網との機能統合を促進することが示されている^{120, 121)}。このように細胞移植治療に対する薬学的介入は、医学と薬学の新しい組み合わせ治療を提供できると考えている¹²³⁾。将来、細胞医薬品が臨床現場に出てくることを想定すると、「生きた細胞」と「化合物である薬」の特性の違いをよく理解した上で、それぞれの役割を相乗的に発揮するための新しい関係を作っていくこと大切であると考え、そのためには、こういった知識と経験を持ち合わせた人材の育成が必要であると考えている。特に薬剤師は生物、化学、物理の基盤知識をもとに薬を通じて他の医療従事者とチームを作り、そして患者と接することができる職種であるため、これらの基盤知識を活かした独自性の高い立場から介入ができる職能を有している職種である。今後、さらなる発展が望まれる再生医療分野において薬学領域からの発展的介入およびそれを担う臨床家や研究者が育成されることが期待される。

【利益相反】

本研究において利益相反はない。

【引用文献】

- 1) Kiyokazu Agata. Regeneration and gene regulation in planarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, 13(5), 492–496.
- 2) Alberto Joven, Ahmed Elewa, András Simon. Model systems for regeneration: Salamanders. *Development.* **2019**, 146(14), dev167700.
- 3) Peter W Reddien. The cellular and molecular basis for planarian regeneration. *Cell.* **2018**, 175(2), 327–345.
- 4) Martin J Evans, Matthew H Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* **1981**, 292(5819), 154–156.
- 5) Kirk R Thomas, Mario R Capecchi. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* **1987**, 51(3), 503–512.
- 6) Qi Long Ying, Jason Wray, Jennifer Nichols, Laura Battle-Morera, Bradley Doble, James Woodgett, Philip Cohen, Austin Smith. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* **2008**, 453(7194), 519–523.
- 7) Masaki Yagi, Satoshi Kishigami, Akito Tanaka, Katsunori Semi, Eiji Mizutani, Sayaka Wakayama, Teruhiko Wakayama, Takuya Yamamoto, Yasuhiro Yamada. Derivation of ground-state female ES cells maintaining gamete-derived DNA methylation. *Nature.* **2017**, 548(7666), 224–227.
- 8) James A Thomson, Jennifer Kalishman, Thaddeus G Golos, Maureen Durning, Charles P Harris, Robert A Becker, John P Hearn. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92(17), 7844–7848.
- 9) James A Thomson, Jennifer Kalishman, Thaddeus G Golos, Maureen Durning, Charles P Harris, John P Hearn. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* **1996**, 55(2), 254–259.
- 10) James A Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, Jeffrey M Jones. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* **1998**, 282(5391), 1145–1147.
- 11) Hirofumi Suemori, Kentaro Yasuchika, Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka, Norihiro Tsuneyoshi, Norio Nakatsuji. Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 345(3), 926–932.
- 12) Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **2006**, 126(4), 663–676.
- 13) Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, Shinya Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* **2007**, 131(5), 861–872.
- 14) Junying Yu, Maxim A Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I Slukvin, James A Thomson. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* **2007**, 318(5858), 1917–

- 1920.
- 15) Masato Nakagawa, Nanako Takizawa, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Shinya Yamanaka. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107(32), 14152–14157.
 - 16) Junying Yu, Kejin Hu, Kim Smuga-Otto, Shulan Tian, Ron Stewart, Igor I Slukvin, James A Thomson. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. **2009**, 324(5928), 797–801.
 - 17) Keisuke Okita, Tatsuya Yamakawa, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, Naoki Amano, Akira Watanabe, Naoki Goshima, Shinya Yamanaka. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. **2013**, 31(3), 458–466.
 - 18) Kiichi Watanabe, Morio Ueno, Daisuke Kamiya, Ayaka Nishiyama, Michiru Matsumura, Takafumi Wataya, Jun B Takahashi, Satomi Nishikawa, Shin Ichi Nishikawa, Keiko Muguruma, Yoshiki Sasai. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25(6), 681–686.
 - 19) Guokai Chen, Daniel R Gulbranson, Zhonggang Hou, Jennifer M Bolin, Victor Ruotti, Mitchell D Probasco, Kimberly Smuga-Otto, Sara E Howden, Nicole R Diol, Nicholas E Propson, Ryan Wagner, Garrett O Lee, Jessica Antosiewicz-Bourget, Joyce MC Teng, James A Thomson. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods*. **2011**, 8(5), 424–429.
 - 20) Sergey Rodin, Anna Domogatskaya, Susanne Ström, Emil M Hansson, Kenneth R Chien, José Inzunza, Outi Hovatta, Karl Tryggvason. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28(6), 611–615.
 - 21) Sergey Rodin, Liselotte Antonsson, Colin Niaudet, Oscar E Simonson, Elina Salmela, Emil M Hansson, Anna Domogatskaya, Zhijie Xiao, Pauliina Damdimopoulou, Mona Sheikhi, José Inzunza, Ann Sofie Nilsson, Duncan Baker, Raoul Kuiper, Yi Sun, Elisabeth Blennow, Magnus Nordenskjöld, Karl Henrik Grinnemo, Juha Kere, Christer Betsholtz, Outi Hovatta, Karl Tryggvason. Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 3195.
 - 22) Masato Nakagawa, Yukimasa Taniguchi, Sho Senda, Nanako Takizawa, Tomoko Ichisaka, Kanako Asano, Asuka Morizane, Daisuke Doi, Jun Takahashi, Masatoshi Nishizawa, Yoshinori Yoshida, Taro Toyoda, Kenji Osafune, Kiyotoshi Sekiguchi, Shinya Yamanaka. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 3594.
 - 23) Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa Taniguchi, Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi, Eihachiro Kawase. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1236.
 - 24) Hans Spemann, Hilde Mangold. über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. für Mikroskopische Anat. und Entwicklungsmechanik.* **1924**, 100(3–4), 599–638.
 - 25) Yoshiki Sasai, Bin Lu, Herbert Steinbeisser, Douglas Geissert, Linda K Gont, Eddy M De Robertis. *Xenopus* chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*. **1994**, 79(5), 779–790.
 - 26) Ali Hemmati-Brivanlou, Olivia G Kelly, Douglas A Melton. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell*. **1994**, 77(2), 283–295.
 - 27) William C Smith, Richard M Harland. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*. **1992**, 70(5), 829–840.
 - 28) Simon R Smukler, Susan B Runciman, Shunbin Xu, Derek Van Der Kooy. Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences. *J. Cell Biol.* **2006**, 172(1), 79–90.
 - 29) Daisuke Kamiya, Satoe Banno, Noriaki Sasai, Masatoshi Ohgushi, Hidehiko Inomata, Kiichi Watanabe, Masako Kawada, Rieko Yakura, Hiroshi Kiyonari, Kazuki Nakao, Lars Martin Jakt, Shin Ichi Nishikawa, Yoshiki Sasai. Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. *Nature*. **2011**, 470(7335), 503–510.
 - 30) Ignacio Muñoz-Sanjuán, Ali H Brivanlou. Neural induction, the default model and embryonic stem

- cells. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3(4), 271–280.
- 31) Stuart M Chambers, Christopher A Fasano, Eirini P Papapetrou, Mark Tomishima, Michel Sadelain, Lorenz Studer. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **2009**, 27(3), 275–280.
- 32) Asuka Morizane, Daisuke Doi, Tetsuhiro Kikuchi, Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi. Small-molecule inhibitors of bone morphogenic protein and activin/nodal signals promote highly efficient neural induction from human pluripotent stem cells. *J. Neurosci. Res.* **2011**, 89(2), 117–126.
- 33) Xiaofeng Xia, Su-Chun Zhang. Differentiation of neuroepithelia from human embryonic stem cells. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 549.; 2009: 51–58.
- 34) Yoshiki Sasai. Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. *Nature*. **2013**, 493(7432), 318–326.
- 35) Mototsugu Eiraku, Kiichi Watanabe, Mami Matsuo-Takasaki, Masako Kawada, Shigenobu Yonemura, Michiru Matsumura, Takafumi Wataya, Ayaka Nishiyama, Keiko Muguruma, Yoshiki Sasai. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell*. **2008**, 3(5), 519–532.
- 36) Madeline A Lancaster, Magdalena Renner, Carol Anne Martin, Daniel Wenzel, Louise S Bicknell, Matthew E Hurler, Tessa Homfray, Josef M Penninger, Andrew P Jackson, Juergen A Knoblich. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. **2013**, 501(7467), 373–379.
- 37) Koki Fujimori, Mitsuru Ishikawa, Asako Otomo, Naoki Atsuta, Ryoichi Nakamura, Tetsuya Akiyama, Shinji Hadano, Masashi Aoki, Hideyuki Saya, Gen Sobue, Hideyuki Okano. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat. Med.* **2018**, 24(10), 1579–1589.
- 38) Takayuki Kondo, Keiko Imamura, Misato Funayama, Kayoko Tsukita, Michiyo Miyake, Akira Ohta, Knut Woltjen, Masato Nakagawa, Takashi Asada, Tetsuaki Arai, Shinobu Kawakatsu, Yuishin Izumi, Ryuji Kaji, Nobuhisa Iwata, Haruhisa Inoue. iPSC-based compound screening and in vitro trials identify a synergistic anti-amyloid β combination for Alzheimer's disease. *Cell Rep.* **2017**, 21(8), 2304–2312.
- 39) Clemens Kiecker, Andrew Lumsden. The role of organizers in patterning the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **2012**, 35, 347–367.
- 40) Kent Imaizumi, Takefumi Sone, Keiji Ibata, Koki Fujimori, Michisuke Yuzaki, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano. Controlling the regional identity of hPSC-derived neurons to uncover neuronal subtype specificity of neurological disease phenotypes. *Stem Cell Reports*. **2015**, 5(6), 1010–1022.
- 41) Noel Moya, Josh Cutts, Terry Gaasterland, Karl Willert, David A Brafman. Endogenous WNT signaling regulates hPSC-derived neural progenitor cell heterogeneity and specifies their regional identity. *Stem Cell Reports*. **2014**, 3(6), 1015–1028.
- 42) Taisuke Kadoshima, Hideya Sakaguchi, Tokushige Nakano, Mika Soen, Satoshi Ando, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, 110(50), 20284–20289.
- 43) Yuchen Qi, Xin Jun Zhang, Nicolas Renier, Zhuohao Wu, Talia Atkin, Ziyi Sun, M Zeeshan Ozair, Jason Tchiew, Bastian Zimmer, Faranak Fattahi, Yosif Ganat, Ricardo Azevedo, Nadja Zeltner, Ali H Brivanlou, Maria Karayiorgou, Joseph Gogos, Mark Tomishima, Marc Tessier-Lavigne, Song Hai Shi, Lorenz Studer. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2017**, 35(2), 154–163.
- 44) Kent Imaizumi, Koki Fujimori, Seiji Ishii, Asako Otomo, Yasushi Hosoi, Hiroaki Miyajima, Hitoshi Warita, Masashi Aoki, Shinji Hadano, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano. Rostrocaudal areal patterning of human PSC-derived cortical neurons by FGF8 signaling. *eNeuro*. **2018**, 5(2), ENEURO.0368-17.2018.
- 45) Alessia Delli Carri, Marco Onorati, Mariah J Lelos, Valentina Castiglioni, Andrea Faedo, Ramesh Menon, Stefano Camnasio, Romina Vuono, Paolo Spaiardi, Francesca Talpo, Mauro Toselli, Gianvito Martino, Roger A Barker, Stephen B Dunnett, Gerardo Biella, Elena Cattaneo. Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32⁺ medium-sized spiny neurons. *Development*. **2013**, 140(2), 301–312.
- 46) Charles Arber, Sophie V. Precious, Serafí Cambray, Jessica R Risner-Janiczek, Claire Kelly, Zoe Noakes,

- Marija Fjodorova, Andreas Heuer, Mark A Ungless, Tristan A Rodríguez, Anne E Rosser, Stephen B Dunnett, Meng Li. Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Development*. **2015**, 142(7), 1375–1386.
- 47) Menghua Wu, Da Zhang, Chunying Bi, Tingwei Mi, Wenliang Zhu, Longkuo Xia, Zhaoqian Teng, Baoyang Hu, Yihui Wu. A chemical recipe for generation of clinical-grade striatal neurons from hESCs. *Stem Cell Reports*. **2018**, 11(3), 635–650.
- 48) Naoya Amimoto, Kaneyasu Nishimura, Shun Shimohama, Kazuyuki Takata. Generation of striatal neurons from human induced pluripotent stem cells by controlling extrinsic signals with small molecules. *Stem Cell Res*. **2021**, 55, 102486.
- 49) Diana Xuan Yu, Francesco Paolo Di Giorgio, Jun Yao, Maria Carolina Marchetto, Kristen Brennand, Rebecca Wright, Arianna Mei, Lauren McHenry, David Lisuk, Jaeson Michael Grasmick, Pedro Silberman, Giovanna Silberman, Roberto Jappelli, Fred H Gage. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. **2014**, 2(3), 295–310.
- 50) Hideya Sakaguchi, Taisuke Kadoshima, Mika Soen, Nobuhiro Narii, Yoshihito Ishida, Masatoshi Ohgushi, Jun Takahashi, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat. Commun*. **2015**, 6, 8896.
- 51) Yuriy Pomeschchik, Oxana Klementieva, Jeovanis Gil, Isak Martinsson, Marita Grønning Hansen, Tessa de Vries, Anna Sancho-Balsells, Kaspar Russ, Ekaterina Savchenko, Anna Collin, Ana Rita Vaz, Silvia Bagnoli, Benedetta Nacmias, Claire Rampon, Sandro Sorbi, Dora Brites, György Marko-Varga, Zaal Kokaia, Melinda Rezeli, Gunnar K Gouras, Laurent Roybon. Human iPSC-derived hippocampal spheroids: an innovative tool for stratifying Alzheimer disease patient-specific cellular phenotypes and developing therapies. *Stem Cell Reports*. **2020**, 15(1), 256–273.
- 52) Wei Yue, Yuanyuan Li, Ting Zhang, Man Jiang, Yun Qian, Min Zhang, Nengyin Sheng, Su Feng, Ke Tang, Xiang Yu, Yousheng Shu, Chunmei Yue, Naihe Jing. ESC-derived basal forebrain cholinergic neurons ameliorate the cognitive symptoms associated with Alzheimer's disease in mouse models. *Stem Cell Reports*. **2015**, 5(5), 776–790.
- 53) Yao Hu, Zhuang yin Qu, Shi ying Cao, Qi Li, Lixiang Ma, Robert Krencik, Min Xu, Yan Liu. Directed differentiation of basal forebrain cholinergic neurons from human pluripotent stem cells. *J. Neurosci. Methods*. **2016**, 266, 42–49.
- 54) Victor Krajka, Maximilian Naujock, Martje G Pauly, Felix Stengel, Britta Meier, Nancy Stanslowsky, Christine Klein, Philip Seibler, Florian Wegner, Philipp Capetian. Ventral telencephalic patterning protocols for induced pluripotent stem cells. *Front. Cell Dev. Biol*. **2021**, 9, 716249.
- 55) Florian T Merkle, Asif Maroof, Takafumi Wataya, Yoshiki Sasai, Lorenz Studer, Kevin Eggan, Alexander F Schier. Generation of neuropeptidergic hypothalamic neurons from human pluripotent stem cells. *Development*. **2015**, 142(4), 633–643.
- 56) Liheng Wang, Kana Meece, Damian J Williams, Kinyui Alice Lo, Matthew Zimmer, Garrett Heinrich, Jayne Martin Carli, Charles A Leduc, Lei Sun, Lori M Zeltser, Matthew Freeby, Robin Goland, Stephen H Tsang, Sharon L Wardlaw, Dieter Egli, Rudolph L Leibel. Differentiation of hypothalamic-like neurons from human pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest*. **2015**, 125(2), 796–808.
- 57) Mark Denham, Chris Bye, Jessie Leung, Brock J Conley, Lachlan H Thompson, Mirella Dottori. Glycogen synthase kinase 3 β and activin/nodal inhibition in human embryonic stem cells induces a pre-neuroepithelial state that is required for specification to a floor plate cell lineage. *Stem Cells*. **2012**, 30(11), 2400–2411.
- 58) Daisuke Doi, Bumpei Samata, Mitsuko Katsukawa, Tetsuhiro Kikuchi, Asuka Morizane, Yuichi Ono, Kiyotoshi Sekiguchi, Masato Nakagawa, Malin Parmar, Jun Takahashi. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*. **2014**, 2(3), 337–350.
- 59) Junghyun Jo, Yixin Xiao, Alfred Xuyang Sun, Engin Cukuroglu, Hoang Dai Tran, Jonathan Göke, Zi Ying Tan, Tzuen Yih Saw, Cheng Peow Tan, Hidayat Lokman, Younghwan Lee, Donghoon Kim, Han Seok Ko, Seong Oh Kim, Jae Hyeon Park, Nam Joon Cho, Thomas M Hyde, Joel E Kleinman, Joo Heon Shin, Daniel R Weinberger, Eng King Tan, Hyunsoo Shawn

- Je, Huck Hui Ng. Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell*. **2016**, 19(2), 248–257.
- 60) Agnete Kirkeby, Sara Nolbrant, Katarina Tiklova, Andreas Heuer, Nigel Kee, Tiago Cardoso, Daniella Rylander Ottosson, Mariah J Lelos, Pedro Rifes, Stephen B Dunnett, Shane Grealish, Thomas Perlmann, Malin Parmar. Predictive markers guide differentiation to improve graft outcome in clinical translation of hESC-based therapy for Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*. **2017**, 20(1), 135–148.
- 61) Tae Wan Kim, Jinghua Piao, So Yeon Koo, Sonja Kriks, Sun Young Chung, Doron Betel, Nicholas D Socci, Se Joon Choi, Susan Zabierowski, Brittany N Dubose, Ellen J Hill, Eugene V. Mosharov, Stefan Irion, Mark J Tomishima, Viviane Tabar, Lorenz Studer. Biphasic activation of WNT signaling facilitates the derivation of midbrain dopamine neurons from hESCs for translational use. *Cell Stem Cell*. **2021**, 28(2), 343–355.
- 62) Lily Sarrafha, Gustavo M Parfitt, Ricardo Reyes, Camille Goldman, Elena Coccia, Tatyana Kareva, Tim Ahfeldt. High-throughput generation of mid-brain dopaminergic neuron organoids from reporter human pluripotent stem cells. *STAR Protoc*. **2021**, 2(2), 100463.
- 63) Keiko Muguruma, Ayaka Nishiyama, Hideshi Kawakami, Kouichi Hashimoto, Yoshiki Sasai. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep*. **2015**, 10(4), 537–550.
- 64) Samuel Nayler, Devika Agarwal, Fabiola Curion, Rory Bowden, Esther BE Becker. High-resolution transcriptional landscape of xeno-free human induced pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids. *Sci. Rep.* **2021**, 11(1), 12959.
- 65) Parvin Valiulahi, Vincencius Vidyawan, Lesly Puspita, Youjin Oh, Virginia Blessy Juwono, Panida Sittipo, Gilgi Friedlander, Dayana Yahalomi, Jong Woo Sohn, Yun Kyung Lee, Jeong Kyo Yoon, Jae won Shim. Generation of caudal-type serotonin neurons and hindbrain-fate organoids from hPSCs. *Stem Cell Reports*. **2021**, 16(8), 1938–1952.
- 66) Zhong Wei Du, Hong Chen, Huisheng Liu, Jianfeng Lu, Kun Qian, Cindy Tzu Ling Huang, Xiaofen Zhong, Frank Fan, Su Chun Zhang. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat. Commun*. **2015**, 6, 6626.
- 68) Julien Muffat, Yun Li, Bingbing Yuan, Maisam Mitalipova, Attya Omer, Sean Corcoran, Grisilda Bakiasi, Li Huei Tsai, Patrick Aubourg, Richard M Ransohoff, Rudolf Jaenisch. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med*. **2016**, 22(11), 1358–1367.
- 69) Kazuyuki Takata, Tatsuya Kozaki, Christopher Zhe Wei Lee, Morgane Sonia Thion, Masayuki Otsuka, Shawn Lim, Kagistia Hana Utami, Kerem Fidan, Dong Shin Park, Benoit Malleret, Svetoslav Chakarov, Peter See, Donovan Low, Gillian Low, Marta Garcia-Miralles, Ruizhu Zeng, Jinqiu Zhang, Chi Ching Goh, Ahmet Gul, Sandra Hubert, Bennett Lee, Jinmiao Chen, Ivy Low, Nurhidaya Binte Shadan, Josephine Lum, Tay Seok Wei, Esther Mok, Shohei Kawanishi, Yoshihisa Kitamura, Anis Larbi, Michael Poidinger, Laurent Renia, Lai Guan Ng, Yochai Wolf, Steffen Jung, Tamer Önder, Evan Newell, Tara Huber, Eishi Ashihara, Sonia Garel, Mahmoud A Pouladi, Florent Ginhoux. Induced-pluripotent-stem-cell-derived primitive macrophages provide a platform for modeling tissue-resident macrophage differentiation and function. *Immunity*. **2017**, 47(1), 183–198. e6.
- 70) Robert Krencik, Jason P Weick, Yan Liu, Zhi-Jian Zhang, Su-Chun Zhang. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol*. **2011**, 29(6), 528–534.
- 71) Anne Hedegaard, Jimena Monzón-Sandoval, Sarah E Newey, Emma S Whiteley, Caleb Webber, Colin J Akerman. Pro-maturational effects of human iPSC-derived cortical astrocytes upon iPSC-derived cortical neurons. *Stem Cell Reports*. **2020**, 15(1), 38–51.
- 72) Su Wang, Janna Bates, Xiaojie Li, Steven Schanz, Devin Chandler-Militello, Corri Levine, Nimet Maherali, Lorenz Studer, Konrad Hochedlinger, Martha Windrem, Steven A Goldman. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*. **2013**, 12(2), 252–264.
- 73) Soya Kawabata, Morito Takano, Yuko Numasawa-Kuroiwa, Go Itakura, Yoshiomi Kobayashi, Yuichiro

- Nishiyama, Keiko Sugai, Soraya Nishimura, Hiroki Iwai, Miho Isoda, Shinsuke Shibata, Jun Kohyama, Akio Iwanami, Yoshiaki Toyama, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano. Grafted human iPSC cell-derived oligodendrocyte precursor cells contribute to robust remyelination of demyelinated axons after spinal cord injury. *Stem Cell Reports*. **2016**, 6(1), 1–8.
- 74) Joseph Park, Isaac Wetzel, Ian Marriott, Didier Dréau, Carla D'Avanzo, Doo Yeon Kim, Rudolph E Tanzi, Hansang Cho. A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **2018**, 21(7), 941–951.
- 75) Reina Bassil, Kenneth Shields, Kevin Granger, Ivan Zein, Shirley Ng, Ben Chih. Improved modeling of human AD with an automated culturing platform for iPSC neurons, astrocytes and microglia. *Nat. Commun.* **2021**, 12(1), 5220.
- 76) Wolfgang Wurst, Laure Bally-Cuif, Laure Bally-Cuif. Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2(2), 99–108.
- 77) J Peter H Burbach, Marten P Smidt. Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Trends Neurosci.* **2006**, 29(11), 601–603.
- 78) Ernest Arenas, Mark Denham, J Carlos Villaescusa. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*. **2015**, 142(11), 1918–1936.
- 79) Shane V. Hegarty, Aideen M Sullivan, Gerard W O'Keefe. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* **2013**, 379(2), 123–138.
- 80) Charles R Gerfen, D James Surmeier. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, 34, 441–466.
- 81) Mary Hynes, Jeffery A Porter, Chin Chiang, David Chang, Marc Tessier-Lavigne, Philip A Beachy, Arnon Rosenthal. Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron*. **1995**, 15(1), 35–44.
- 82) Philip H Crossley, Salvador Martinez, Gail R Martin. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*. **1996**, 380(6569), 66–68.
- 83) Gonçalo Castelo-Branco, Joseph Wagner, Francisco J Rodriguez, Julianna Kele, Kyle Sousa, Nina Rawal, Hilda Amalia Pasolli, Elaine Fuchs, Jan Kitajewski, Ernest Arenas. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100(22), 12747–12752.
- 84) Sang-hun Lee, Nadya Lumelsky, Lorenz Studer, Jonathan M Auerbach, Ron D McKay. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18(6), 675–679.
- 85) Hiroshi Kawasaki, Kenji Mizuseki, Satomi Nishikawa, Satoshi Kaneko, Yoshihisa Kuwana, Shigetada Nakanishi, Shin Ichi Nishikawa, Yoshiki Sasai. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. **2000**, 28(1), 31–40.
- 86) Yasushi Takagi, Jun Takahashi, Hidemoto Saiki, Asuka Morizane, Takuya Hayashi, Yo Kishi, Hitoshi Fukuda, Yo Okamoto, Masaomi Koyanagi, Makoto Ideguchi, Hideki Hayashi, Takayuki Imazato, Hiroshi Kawasaki, Hirofumi Suemori, Shigeki Omachi, Hidehiko Iida, Nobuyuki Itoh, Norio Nakatsuji, Yoshiki Sasai, Nobuo Hashimoto. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115(1), 102–109.
- 87) Christopher A Fasano, Stuart M Chambers, Gabsang Lee, Mark J Tomishima, Lorenz Studer. Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. **2010**, 6(4), 336–347.
- 88) Sonja Kriks, Jae Won Shim, Jinghua Piao, Yosif M Ganat, Dustin R Wakeman, Zhong Xie, Luis Carrillo-Reid, Gordon Auyeung, Chris Antonacci, Amanda Buch, Lichuan Yang, M Flint Beal, D James Surmeier, Jeffrey H Kordower, Viviane Tabar, Lorenz Studer. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. **2011**, 480(7378), 547–551.
- 89) Agnete Kirkeby, Shane Grealish, Daniel A Wolf, Jenny Nelander, James Wood, Martin Lundblad, Olle Lindvall, Malin Parmar. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep.* **2012**, 1(6), 703–714.
- 90) Jeong Eun Yoo, Dongjin R Lee, Sanghyun Park, Hye Rim Shin, Kun Gu Lee, Dae Sung Kim, Mi Young Jo,

- Jang Hyeon Eom, Myung Soo Cho, Dong Youn Hwang, Dong Wook Kim. Trophoblast glycoprotein is a marker for efficient sorting of ventral mesencephalic dopaminergic precursors derived from human pluripotent stem cells. *npj Parkinson. Dis.* **2021**, 7(1), 61.
- 91) Daniela Lehnen, Serena Barral, Tiago Cardoso, Shane Grealish, Andreas Heuer, Andrej Smiyakin, Agnete Kirkeby, Jutta Kollet, Harold Cremer, Malin Parmar, Andreas Bosio, Sebastian Knöbel. IAP-based cell sorting results in homogeneous transplantable dopaminergic precursor cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* **2017**, 9(4), 1207–1220.
- 92) Bumpei Samata, Daisuke Doi, Kaneyasu Nishimura, Tetsuhiro Kikuchi, Akira Watanabe, Yoshimasa Sakamoto, Jungo Kakuta, Yuichi Ono, Jun Takahashi. Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 13097.
- 93) Chris R Bye, Marie E Jönsson, Anders Björklund, Clare L Parish, Lachlan H Thompson. Transcriptome analysis reveals transmembrane targets on transplantable midbrain dopamine progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112(15), E1946–E1955.
- 94) Zhiqiang Xue, Kevin Huang, Chaochao Cai, Lingbo Cai, Chun Yan Jiang, Yun Feng, Zhenshan Liu, Qiao Zeng, Liming Cheng, Yi E Sun, Jia Yin Liu, Steve Horvath, Guoping Fan. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature.* **2013**, 500(7464), 593–597.
- 95) Jean Francois Poulin, Zachary Gaertner, Oscar Andrés Moreno-Ramos, Rajeshwar Awatramani. Classification of midbrain dopamine neurons using single-cell gene expression profiling approaches. *Trends Neurosci.* **2020**, 43(3), 155–169.
- 96) Gioele La Manno, Daniel Gyllborg, Simone Codeluppi, Kaneyasu Nishimura, Carmen Salto, Amit Zeisel, Lars E Borm, Simon RW Stott, Enrique M Toledo, J Carlos Villasecusa, Peter Lönnerberg, Jesper Ryge, Roger A Barker, Ernest Arenas, Sten Linnarsson. Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem Cells. *Cell.* **2016**, 167(2), 566–580.e19.
- 97) Fredrik Nilsson, Petter Storm, Edoardo Sozzi, David Hidalgo Gil, Marcella Birtele, Yogita Sharma, Malin Parmar, Alessandro Fiorenzano. Single-cell profiling of coding and noncoding genes in human dopamine neuron differentiation. *Cells.* **2021**, 10(1), 137.
- 98) Katarína Tiklová, Åsa K Björklund, Laura Lahti, Alessandro Fiorenzano, Sara Nolbrant, Linda Gillberg, Nikolaos Volakakis, Chika Yokota, Markus M Hilscher, Thomas Hauling, Fredrik Holmström, Eliza Joodmardi, Mats Nilsson, Malin Parmar, Thomas Perlmann. Single-cell RNA sequencing reveals midbrain dopamine neuron diversity emerging during mouse brain development. *Nat. Commun.* **2019**, 10(1), 581.
- 99) Nigel Kee, Nikolaos Volakakis, Agnete Kirkeby, Lina Dahl, Helena Storvall, Sara Nolbrant, Laura Lahti, Åsa K Björklund, Linda Gillberg, Eliza Joodmardi, Rickard Sandberg, Malin Parmar, Thomas Perlmann. Single-cell analysis reveals a close relationship between differentiating dopamine and subthalamic nucleus neuronal lineages. *Cell Stem Cell.* **2017**, 20(1), 29–40.
- 100) Alessandro Fiorenzano, Edoardo Sozzi, Marcella Birtele, Janko Kajtez, Jessica Giacomoni, Fredrik Nilsson, Andreas Bruzelius, Yogita Sharma, Yu Zhang, Bengt Mattsson, Jenny Emnéus, Daniella Rylander Ottosson, Petter Storm, Malin Parmar. Single-cell transcriptomics captures features of human midbrain development and dopamine neuron diversity in brain organoids. *Nat. Commun.* **2021**, 12(1), 7302.
- 101) Anthony E Lang, Andres M Lozano. Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339(15), 1044–1053.
- 102) Anthony E Lang, Andres M Lozano. Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339(16), 1130–1143.
- 103) Olle Lindvall, Patrik Brundin, Håkan Widner, Stig Rehncrona, Björn Gustavii, Richard Frackowiak, Klaus L Leenders, Guy Sawle, John C Rothwell, C David Marsden, Anders Björklund. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* **1990**, 247(4942), 574–577.
- 104) C Warren Olanow, Christopher G Goetz, Jeffrey H Kordower, A Jon Stoessl, Vesna Sossi, Mitchell F Brin, Kathleen M Shannon, G Michael Nauert, Daniel P Perl, James Godbold, Thomas B Freeman. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **2003**, 54(3), 403–414.
- 105) Curt R Freed, Paul E Greene, Robert E Breeze,

- Wei-Yann Tsai, William DuMouchel, Richard Kao, Sandra Dillon, Howard Winfield, Sharon Culver, John Q Trojanowski, David Eidelberg, Stanley Fahn. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344(10), 710-719.
- 106) Olle Lindvall, Zaal Kokaia. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, 30(5), 260-267.
- 107) PA De Sousa, BJ Tye, K Bruce, P Dand, G Russell, DM Collins, A Greenshields, K McDonald, H Bradburn, D Allan, A Laurie, T Kunath, MA Canham, JM Downie, M Bateman, A Courtney. Derivation of the clinical grade human embryonic stem cell line RCe021-A (RC-17). *Stem Cell Res.* **2016**, 17(1), 1-5.
- 108) Qi Gu, Juan Wang, Lei Wang, Zheng Xin Liu, Wan Wan Zhu, Yuan Qing Tan, Wei Fang Han, Jun Wu, Chun Jing Feng, Jin Hui Fang, Lei Liu, Liu Wang, Wei Li, Xiao Yang Zhao, Bao Yang Hu, Jie Hao, Qi Zhou. Accreditation of biosafe clinical-grade human embryonic stem cells according to Chinese regulations. *Stem Cell Reports.* **2017**, 9(1), 366-380.
- 109) Jinpei Ye, Nicola Bates, Despina Soteriou, Lisa Grady, Clare Edmond, Alex Ross, Alan Kerby, Philip A Lewis, Tope Adeniyi, Ronnie Wright, Kay V. Poulton, Marcus Lowe, Susan J Kimber, Daniel R Brisson. High quality clinical grade human embryonic stem cell lines derived from fresh discarded embryos. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, 8(1), 128.
- 110) Eihachiro Kawase, Kei Takada, Hirofumi Suemori. Kyoto hESC cell resource for regenerative medicine. *Stem Cell Res.* **2020**, 49, 102020.
- 111) Eihachiro Kawase, Kei Takada, Ryoko Nakatani, Shizuka Yamazaki, Hirofumi Suemori. Generation of clinical-grade human embryonic stem cell line KthES11 according to Japanese regulations. *Stem Cell Res.* **2021**, 54, 102383.
- 112) Tadaaki Hanatani, Naoko Takasu. CiRA iPSC seed stocks (CiRA's iPSC Stock Project). *Stem Cell Res.* **2021**, 50, 102033.
- 113) Masafumi Umekage, Yoshiko Sato, Naoko Takasu. Overview: an iPSC cell stock at CiRA. *Inflamm. Regen.* **2019**, 39(1), 17.
- 114) Daisuke Doi, Hiroaki Magotani, Tetsuhiro Kikuchi, Megumi Ikeda, Satoe Hiramatsu, Kenji Yoshida, Naoki Amano, Masaki Nomura, Masafumi Umekage, Asuka Morizane, Jun Takahashi. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 3369.
- 115) Jinghua Piao, Susan Zabierowski, Brittany N Dubose, Ellen J Hill, Monalisa Navare, Nidia Claros, Siera Rosen, Kiran Ramnarine, Callie Horn, Craig Fredrickson, Karen Wong, Brent Safford, Sonja Kriks, Abderrahman El Maarouf, Urs Rutishauser, Claire Henchcliffe, Yongzeng Wang, Isabelle Riviere, Shannon Mann, Vladimir Bermudez, Stefan Irion, Lorenz Studer, Mark Tomishima, Viviane Tabar. Pre-clinical efficacy and safety of a human embryonic stem cell-derived midbrain dopamine progenitor product, MSK-DA01. *Cell Stem Cell.* **2021**, 28(2), 217-229.
- 116) Roger A Barker, Krista Farrell, Natalie Valle Guzman, Xiaoling He, Stanley E Lazic, Sarah Moore, Robert Morris, Pamela Tyers, Ruwani Wijeyekoon, Danielle Daft, Sam Hewitt, Viswas Dayal, Thomas Foltynie, Zinovia Kefalopoulou, Philipp Mahlknecht, Nick P Lao-Kaim, Paola Piccini, Hjalmar Bjartmarz, Anders Björklund, Olle Lindvall, Jenny Nelander-Wahlestedt, Malin Parmar, Gesine Paul, Hakan Widner, Alistair Church, Stephen Dunnett, Kathryn Peall, Anne Rosser, Jean Marc Gurruchaga, Stéphane Palfi, Tobias Piroth, Christian Winkler. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease. *Nat. Med.* **2019**, 25(7), 1045-1053.
- 117) Jeffrey S Schweitzer, Bin Song, Todd M Herrington, Tae-Yoon Park, Nayeon Lee, Sanghyeok Ko, Jeha Jeon, Young Cha, Kyungsang Kim, Quanzheng Li, Claire Henchcliffe, Michael Kaplitt, Carolyn Neff, Otto Rapalino, Hyemyung Seo, In-Hee Lee, Jisun Kim, Taewoo Kim, Gregory A Petsko, Jerome Ritz, Bruce M Cohen, Sek-Won Kong, Pierre Leblanc, Bob S Carter, Kwang-Soo Kim. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **2020**, 382(20), 1926-1932.
- 118) Bin Song, Young Cha, Sanghyeok Ko, Jeha Jeon, Nayeon Lee, Hyemyung Seo, Kyung-joon Park, In-hee Lee, Claudia Lopes, Melissa Feitosa, Maria José Luna, Jin Hyuk Jung, Jisun Kim, Dabin Hwang, Bruce M Cohen, Martin H Teicher, Pierre Leblanc, Bob S Carter, Jeffrey H Kordower, Vadim Y Bolshakov, Sek Won Kong, Jeffrey S Schweitzer,

- Kwang-soo Kim. Human autologous iPSC-derived dopaminergic progenitors restore motor function in Parkinson's disease models. *J. Clin. Invest.* **2020**, 130(2), 904–920.
- 119) Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi. Drug discovery toward successful cell transplantation therapy for Parkinson's disease using human pluripotent stem cells. *Adv. Regen. Biol.* **2016**, 3(1), 31772.
- 120) Kaneyasu Nishimura, Daisuke Doi, Bumpei Samata, Shigeo Murayama, Tsuyoshi Tahara, Hirota Onoe, Jun Takahashi. Estradiol facilitates functional integration of iPSC-derived dopaminergic neurons into striatal neuronal circuits via activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Stem Cell Reports.* **2016**, 6(4), 511–524.
- 121) Yoshifumi Miyawaki, Bumpei Samata, Tetsuhiro Kikuchi, Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi. Zonisamide promotes survival of human-induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons in the striatum of female rats. *J. Neurosci. Res.* **2020**, 98(8), 1575–1587.
- 122) Shuibing Chen. Screening-based chemical approaches to unravel stem cell biology. *Stem Cell Reports.* **2018**, 11(6), 1312–1323.
- 123) Kaneyasu Nishimura, Kazuyuki Takata. Combination of drugs and cell transplantation: More beneficial stem cell-based regenerative therapies targeting neurological disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(16), 9047.

Pharmaceutical approaches in controlling cell fate determination of pluripotent stem cells toward future innovation of regenerative medicine

Kaneyasu Nishimura, Kazuyuki Takata

Division of Integrated Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University

Pluripotent stem cells (PSCs) including embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells are promising source for cell transplantation therapy and disease modeling, since PSCs give rise to specific cell types at necessary quantities and scalabilities as we want. Recent advantage of stem cell technology is supporting to precisely control the cell fate into specific cell types from PSCs. This outstanding progress are innovated by interdisciplinary fusion of stem cell biology with the fundamental knowledge of developmental biology and pharmaceutical sciences. The knowledge of the molecular and cellular mechanisms of brain development might help to consider how to control the cell fate into specific cell types from PSCs *in vitro*. Additionally, small compounds are useful for mimicking the function of morphogens worked in morphogenesis with high specificity and quality. These research fields strongly contribute to obtain the amenable and reproducible outcomes for generation of specific cell types in stem cell research field. In this review, we focus on recent progress of stem cell research towards the establishment of regenerative therapies by understating molecular and cellular mechanisms of brain development. Furthermore, we also describe the significant role of small compounds as a pharmacological approach for controlling the cell fate of PSCs and discuss future prospects of combination strategies of regenerative medicine and pharmacotherapy for neurodegenerative disorders.

Keywords: pluripotent stem cells, brain development, neuronal differentiation, regenerative medicine, pharmacological approach