

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

パーキンソン病モデル動物の作成と脳内細胞移植による治療法の確立に関する研究

主任研究者 服部成介 国立精神・神経センター神経研究所診断研究部 室長

研究要旨 本研究は黒質ドーパミン産生細胞の選択的変性死を人工的に誘起し得る新たな実験動物を創出し、脳内細胞移植による治療法の開発を目指す。今年度においてはモデル動物作成のための遺伝子発現系を作成し、これをマウス受精卵に導入することにより複数のトランスジェニックマウスのラインを樹立した。さらに得られたラインを掛け合わせて、目的遺伝子が神経細胞特異的に発現することを認めた。またラット片側パーキンソンモデルに対し高分子ポリマーカプセルに封入したGDNF産生細胞の脳内細胞移植が顕著な機能改善効果を示すことを示した。脳内移植細胞の供給源として神経幹細胞に着目し、ラット胎児および成体脳より神経幹細胞を樹立し継代する方法を確立し、その性質を調べた。さらに神経幹細胞にレトロウイルスまたはリポソーム法により効率よく遺伝子導入が行えることが明らかとなった。

分担研究者

伊達勲 岡山大学医学部脳神経外科 助手
松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学研究部
主任研究官
中福雅人 東京大学大学院医学系研究科・医学部
脳神経医学専攻基礎神経医学大講座神経生物学
分野主任 助教授

A. 研究目的

本研究はパーキンソン病の特徴である進行性の神経細胞死を再現する実験モデル動物系の作成を行ない、神経細胞移植によるその治療法の確立を目的とする。従来のモデル動物は神経毒性を有する薬物の投与により一過性の神経細胞死を誘発するものであったが、本研究で作成するモデル動物はその病変が進行性であるという特徴を有し、今後のパーキンソン病の治療法を研究する上で非常に有用なモデル系となることが期待される。またあわせて移植神経細胞の生着効率を高めるための条件検討を種々の角度から検討しており、得られた研究成果はヒトに対する治療法に応用が可能である。多分化能を有したまま増殖可能な神経幹細胞を樹立し、治療に有効な遺伝子発現系を賦与した上で脳内に移植することは、変性神経組織の修復に対する究極の治療法と考えられる。この点に関してもマウス、ラットおよびサルをモデル系として研究を進める。

B. 研究方法

パーキンソン病はドーパミン産生細胞である黒

質神経細胞が進行性の変性により細胞死を起こすことにより発症する。進行性の神経変性を再現するため、黒質ドーパミン産生細胞において細胞障害性因子を発現し、動物モデルを作成する。細胞障害性因子として、神経栄養因子の細胞内シグナル伝達に必須な低分子量GTP結合タンパク質Rasの抑制性因子Gap1mを用いる。この動物モデルに対しNGF、GDNFを含む種々の神経栄養因子産生細胞の移植を行なう。また変性が進行した組織の修復を図るため、神経幹細胞のドーパミン産生細胞への分化条件を検討し、変性神経細胞の置換による組織修復法を確立する。

動物モデル作成のため、ドーパミン産生細胞特異的な転写開始プロモーター（tyrosine hydroxylase promoter: TH）にテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTAK)を連結したものの、およびテトラサイクリン制御プロモーターにGap1m遺伝子を連結したものの(Tet-O--Gap1m)をマウスゲノムに組み込む。このマウスにおいてはドーパミン産生細胞のみにおいてGap1mが発現するが、給水中にテトラサイクリンを添加するとtTAKによる転写活性化が阻害されGap1mの発現は濃度依存的に阻害される。

ラットおよびサルの実験動物モデルにおいて副腎髄質細胞およびNGF産生細胞の脳内共移植が、移植組織の生着を促しパーキンソンニズムの改善に効果があることを示してきたが、黒質神経細胞の栄養因子とされるGDNFについても産生細胞を作成し、その効果を判定する。

さらに産生細胞として神経幹細胞を用いた場合の効果を検討する。現在までに樹立した神経幹細胞

胞について、中枢神経系の種々の部位に細胞を移植しどのようなタイプの細胞に分化するか、また宿主側の加齢が移植神経幹細胞の分化にどのような影響を示すかを調べる。長期にわたり造腫瘍性の有無についても検討する。

C. 研究結果

1. トランスジェニックマウスの作成

ドーパミン産生神経細胞の生存維持因子としてGDNF、BDNF、EGF、FGF、PDGF等が知られているが、これらの因子からのシグナルはいずれも低分子量GTP結合タンパク質Rasを経由する。したがって細胞障害性因子として、Rasの抑制性因子Gap1mを用いることにより、細胞変性を進行させ得る。

昨年度に引き続きtyrosine hydroxylase(TH)プロモーターにテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTAK)を連結した遺伝子(TH-tTAK)、およびテトラサイクリン制御プロモーターにRasの活性抑制因子を連結した遺伝子(Tet-O-Gap1m)を、それぞれ1801個および955個の受精卵に導入して偽妊娠マウスに戻した。DNAを抽出しサザンブロッティングを行なった結果、TH-tTAKは3ラインの、Tet-O-Gap1mについては5ラインのトランスジェニックマウスを得ることができた。また神経細胞全般に発現するプロモーターを用いたNSE-tTAKを3ライン、小脳特異的プロモーターによるL7-tTAKを8ライン、それぞれ作成した。得られたTH-tTAK、L7-tTAK、L7-tTAKマウスすべてとTet-O-Gap1mを掛け合わせ、両遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成し、マウス組織における遺伝子発現を調べたところ、複数のラインで神経細胞特異的なGap1m遺伝子発現が認められた。しかし、その発現は低レベルであり、今後例数を多くして発現レベルの高いラインの作成が必要と考えられた。

2. ラットパーキンソンモデルに対するカプセル化GDNF産生細胞脳内移植の効果

パーキンソン病などの神経変性疾患に対する神経移植療法はもっとも新しい治療法の一つである。本研究では、ドナーとして用いる細胞の供給源をより広げるため、細胞を免疫学的に租界としての高分子半透膜性カプセルに封入して移植する方法を検討した。

カプセル化GDNF産生細胞線条体内移植による脳内ドーパミン系の保護効果を検討するため、ヒトGDNF cDNAを含むpcDL81-hGDNF plasmidを作製し、baby hamster kidney(BHK)細胞に導入し、GDNF産生細胞株を確立した。この細胞を高分子半透膜製の

カプセルに封入した(BHK-GDNF)。また、遺伝子導入を行っていないBHK細胞も同様にカプセル化した(BHK-control)。これらのカプセルをそれぞれSprague-Dawley(SD)ラットの右線条体内に移植し、その6日後に同側の線条体内に6-hydroxydopamine(6-OHDA)を注入した。6-OHDA投与2ヶ月後に、カプセルからのGDNF産生量、アポモルフィン誘発回転運動、および組織学的変化などを調べ、GDNFのDAニューロンに対する神経保護作用を検討した。

カプセル内には良好なBHK細胞の生存を認め、7-8ng/day/capsuleのレベルでGDNFの産生を認めた。BHK-GDNFカプセルを移植されたラットではBHK-controlカプセルを移植されたラットに比べて、アポモルフィン誘発回転運動が80-90%減少し、組織学的にも線条体内のDA線維および黒質のDAニューロンの良好な生存を認めた。したがってラットパーキンソンモデルにおいてはGDNF産生細胞の脳内移植が極めて有効と考えられた。

3. 神経幹細胞の樹立とその解析

ラットをモデルとして、胎児および成体脳由来の神経幹細胞を培養する条件を検討した。また神経幹細胞由来の不死化細胞株を樹立し、その増殖・分化の制御機構を解析するとともに、脳内に移植してその挙動を追跡した。

胎児、成体由来の幹細胞はともに、未分化な状態で増殖するためにはbFGF、EGF等の増殖因子の存在のみでは不十分であり、接着を介した細胞間相互作用が極めて重要であることを見出した。この知見をもとに、幹細胞の自己複製と分化の運命選択の過程を制御する分子機構について解析した。その結果、1) 幹細胞の分化の最も初期過程では2種類の転写因子Mash-1、Prox-1が重要であること、2) 未分化状態の維持に働く細胞間相互作用は細胞膜受容体であるNotchを介した情報伝達によって担われていることを明らかにした。また、神経幹細胞に対する遺伝子操作をおこない、リボソーム法およびレトロウイルス法により遺伝子導入する方法を確立した。

さらに、幹細胞の脳内への移植実験を開始し、移植細胞の生体脳組織への再構成を観察した。この際、遺伝子発現パターンの異なる細胞を移植すると、脳内に取り込まれた際の挙動が異なることを見出した。これは将来の臨床応用において、特定の脳組織への移植の為に用いる幹細胞の性質を十分に検討することが極めて重要であることを示唆している。

D. 考察

本研究で作成するパーキンソン病実験動物モデルは従来の神経薬物投与による一過性の神経細胞変性を誘起するものとは異なり、黒質ドーパミン産生神経細胞内における神経栄養因子の細胞内シグナル伝達系を可逆的に阻害することにより、神経細胞死を誘導するものである。

組織特異的プロモーターにtTAKをつないだ遺伝子を有するマウスでは、tTAKの発現が神経特異的にみられた。またGap1m遺伝子の発現も認められたが、その発現はRT-PCR法では確認できたが、ウェスタンブロッティングでは確認できず、今後その発現量を高める必要がある。

ラット脳内に移植したカプセル化GDNF産生細胞は2ヶ月間持続的にGDNFを脳内に安定供給すること、DAニューロンに対して神経保護作用を示すことが明らかになった。個体内に直接注入する場合、10-100 μ g程度のGDNFが保護作用に必要とされているが、カプセル化GDNF産生細胞移植による持続的分泌を行った場合は、10-30ng/dayのGDNF産生量で十分な効果を発揮した。これは、カプセル化細胞移植という方法により持続的にGDNFが供給されたためと考えられる。このことからカプセル化GDNF産生細胞の脳内移植はパーキンソン病の治療法の一つとなりうる期待がもたれる。

また脳内細胞移植によるヒトパーキンソン病の治療を考慮する際に、移植細胞の供給源も重要である。本研究によって、神経幹細胞の試験管内培養と遺伝子操作に関する基礎的な技術はほぼ確立されつつある。成体からも幹細胞が樹立し得た点は将来の自家細胞移植の可能性も含めて重要な点である。今後は、培養幹細胞を実際に脳内に移植しその増殖、分化、組織再構築の挙動を解析し、治療に用いる際に克服すべき問題点を明らかにしなければならない。我々を含めた国内外の知見から考えて、神経幹細胞の脳内移植は益々その可能性が広がってきており、将来の臨床応用に向けて着実な研究の積み重ねが重要と考えている。

E. 結論

平成10年度の研究において、1. 新たな原理に基づくパーキンソンモデル動物作成のための遺伝子発現系を有する、マトランスジェニックマウスを作成し、その遺伝子発現を検討した。2. ラットを用いたパーキンソン病動物モデルに対して、カプセル化GDNF産生細胞の脳内細胞移植が著効を

示すことを明らかにした。3. 胎児および成体脳より神経幹細胞樹立の条件を確立し、さらに遺伝子導入が可能なことを示した。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. Jiang, Y., Ma, W., Wan, Y., Kozasa, T., Hattori, S., Huang, X. Y. (1998) The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* 395, 808-813.
2. Noto, S., Maeda, T., Hattori, S., Inazawa, J., Imamura, M., Asaka, M., Hatakeyama, M. (1998) A novel human RasGAP-like gene that maps within the prostate cancer susceptibility locus at chromosome 1q25. *FEBS Lett* 441, 127-131.
3. Matsumura, I., Nakajima, K., Wakao, H., Hattori, S., Hashimoto, K., Sugahara, H., Kato, T., Miyazaki, H., Hirano, T., Kanakura, Y. (1998) Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4282-4290.
4. Shirai, T., Tanaka, K., Terada, Y., Sawada, T., Shirai, R., Hashimoto, Y., Nagata, S., Iwamatsu, A., Okawa, K., Li, S., Hattori, S., Mano, H., Fukui, Y. (1998) Specific detection of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate binding proteins by the PIP3 analogue beads: an application for rapid purification of the PIP3 binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1402, 292-302.
5. Kato, M., Mizuguchi, M., Hattori, S., Nakamura, S., Takashima, S. (1998) Loss of neurofibromin in the leptomeningeal astroglial heterotopia of NF-1. *Pediatr. Neurol.* 18, 227-230
6. Hattori, S. (1998) Molecular Biology of Neurofibromatosis 1. in Miura, M., Otsuka, F., Hino, O. Eds. *Monograph of Cancer Research* No. 46. Japanese Scientific Societies Press, Tokyo
7. Date I, Aoi M, Tomita S, Collins F, Ohmoto T: GDNF administration induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system both in young and aged parkinsonian mice. *Neuroreport* 9: 2365-2369, 1998.
8. Date I, Asari S, Ohmoto T: Cerebral aneurysms causing visual symptoms: their features and surgical outcome. *Clin Neurol Neurosurg* 100: 259-267, 1998.

- 9 Date I, Asari S, Ohmoto T: Tips for preventing CSF rhinorrhea after acoustic neurinoma surgery: technical note. *Skull Base Surg* 8: 181-183, 1998.
10. Date I, Ohmoto T: Long-term outcome of surgical treatment of intracranial giant aneurysms. *Neurol Med Chir* 38 (Suppl): 62-69, 1998.
11. Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Nagatsu T: Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex. *Hum Gene Ther* 9: 1093-1102, 1998.
12. Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Yasuda T, Tsuda M: In vivo gene transfer into the adult mammalian central nervous system by continuous injection of plasmid DNA-cationic liposome complex. *Brain Res* 780: 119-128, 1998.
13. Ono S, Date I, Onoda K, Shiota T, Ohmoto T, Ninomiya Y, Asari S, Morishita R: Decoy administration of NF- κ B into the subarachnoid space for cerebral angiopathy. *Hum Gene Ther* 9: 1003-1011, 1998.
14. 伊達 勲: カプセル化ドーパミン産生細胞の脳内移植 - パーキンソン病の治療を目指して - . *Prog Med* 18: 1406-1413, 1998.
15. 伊達 勲, 新郷哲郎, 大本堯史: パーキンソン病に対する神経移植・再生療法の新しいアプローチ. *脳* 21 1: 57-64, 1998.
16. 伊達 勲, 大本堯史: Parkinson病の神経移植療法: 現況と新展開. *Clinical Neuroscience* 16: 556-558, 1998.
17. 伊達 勲, 大本堯史: 神経移植・再生療法の現状と展望: 細胞工学、分子生物学的手法の応用. *脳神経外科* 26: 860-872, 1998.
18. 伊達 勲, 大本堯史: 組織工学を用いたパーキンソン病の治療. *組織培養工学* 24: 147-151, 1998.
19. Ogura A, Inoue K and Matsuda J, Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Hum Reprod*, in press.
20. Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A and Matsuda J, Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. *Theriogenology*, 51: 171, 1999. (1999年1月)
21. Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O and Ogura A, Birth of pups by transfer of *Mastomys* (*Praomys coucha*) embryos cryopreserved by vitrification. *Biol Reprod*, 51 Suppl 1:180-181,1998. (1998年8月)
22. Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y and Matsuda J, Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5611-5615, 1998. (1998年5月)
23. 松田潤一郎、ノックアウト動物。高橋迪雄監修: 哺乳類の生殖生物学。東京、学窓社、1999年3月、pp.248-256.
24. Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126, 443-456 (1999)
25. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152 (1999)
26. Yamamoto N, Yamamoto S, Matsunaga E, Torii M, Kawaichi M, N Kishi, Matsuno K, Okano H, Nakafuku, M. Deltex as a nuclear signal transducer downstream of the Notch receptor. submitted to publication.
27. 中福雅人、加藤真樹 神経系の腹側化誘導因子 Sonic hedgehogの生理作用に関わる転写制御因子. *実験医学* 17, 183-191 (1999)

②学会発表

1. 榊原明、片桐拓也、中村俊、服部成介. 新規 p130CAS結合性因子M45の機能解析. 第21回日本分子生物学会年会. 横浜 12.19, 1998
2. カプセル化及び非カプセル化PC12細胞の脳内移植 - 霊長類での経時的検討 - 吉田秀行、伊達勲、藤原賢次郎、新郷哲郎、三好康之、古田知久、大本堯史(1998/04 第6回細胞療法研究会 大阪)
3. パーキンソン病モデル動物に対するカプセル化GDNF産生細胞脳内移植の効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、青井瑞穂、藤原賢次郎、三好康之、古田知久、大本堯史(1998/04第6回カテコールアミンと神経疾患研究会 東京)
4. カプセル化細胞移植による神経伝達物質および神経栄養因子の脳内への運搬 (シンポジウム) 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、Emerich DF, 大本堯史 (第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)

5. 霊長類を用いたカプセル化及び非カプセル化PC12細胞の脳内移植における経時的検討（ワークショップ）吉田秀行、伊達勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
6. ヒトtyrosine hydroxylase遺伝子導入により作製したステロイド調節可能なL-DOPAおよびドパミン産生PC12細胞の確立 藤原賢次郎、伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
7. パーキンソン病モデルラットに対するGDNFの効果 青井瑞穂、伊達勲、富田 享、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
8. カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるパーキンソン病モデル動物に対する保護効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
9. カプセル化細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療：神経伝達物質および神経栄養因子の脳内への運搬 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史(1998/09 第6回脳腫瘍遺伝子療法懇話会 京都)
10. パーキンソン病に対するカプセル化ドパミン産生細胞脳内移植：定位脳手術との併用 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、青井瑞穂、松井利浩、富田 享、大本堯史(1998/10 第57回日本脳神経外科学会総会 札幌)
11. GDNF遺伝子導入による脳内ドパミン系の保護作用および再生効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史(1998/10 第57回日本脳神経外科学会総会 札幌)
12. 松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之：GM1-ガングリオシドマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
13. 小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木治、種村健太郎、野口洋子、山本美江、持田慶司、野口章、高野薫、中山一栄、関口富士男、小林洋四郎：マウス一次精母細胞を用いた顕微受精による産子の作出、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
14. 山本美江、種村健太郎、鈴木治、松田潤一郎、持田慶司、野口章、中山一栄、野口洋子、高野薫、小倉淳郎：ネフローゼ発症モデルマウス腎のDD/RT-PCR法による遺伝子発現パターンの解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
15. 持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、高野薫、黒沢重利、小倉淳郎：マストミス胚の移植とガラス化法による凍結保存、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
16. 野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、鈴木治、小倉淳郎、松田潤一郎、大山雄二、浜本敏郎、辻崇一： α 2,3シアル酸転移酵素(ST3Gal II)遺伝子導入マウスの作出と解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
17. 小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、種村健太郎、野口章、高野薫、松田潤一郎：一次精母細胞と受精した第一減数分裂中期卵子からの正常産子の発生、第91回日本繁殖生物学会、1998年8月、札幌。
18. 滝本一広、松田潤一郎、鈴木 治、大島章弘、小倉淳郎、高野 薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之：GM1 ガングリオシドマウスの病態解析—蓄積物質の加齢変化—、第15回日本疾患モデル学会総会、1998年11月、東京。
19. 中福雅人、加藤真樹、深見伸一、佐々木洋、Chi-chung Hui 分泌性シグナル因子Sonic Hedgehog及びBMPの細胞内シグナル伝達機構 第21回日本神経科学会・第41回日本神経化学会合同大会ミニシンポジウム 1998.
20. 中福雅人 Molecular control of specification and differentiation of neural stem cells. In: International Workshop on Neuronal precursor cell biology and application for treatment of inborn error of metabolism (Tokyo) 1999. (invited)
21. 中福雅人 神経幹細胞から眺めた脳の初期発生 京都大学ウイルス研究所コロキウム「発生研究の最前線」1999.
22. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学とその臨床応用に向けた展望 国立循環器病センターCOEシンポジウム「生体内情報伝達とその制御」1999.
23. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学 日本学会会議50周年記念シンポジウム「第34回脳のシンポジウム」1999.

厚生省科学研究費脳科学研究事業
分担研究報告書

脳内細胞移植によるパーキンソン病治療法の開発に関する研究

分担研究者 伊達 勲 岡山大学医学部附属病院脳神経外科助手

研究要旨 サルのパーキンソン病モデルにおいてカプセル封入ドーパミン産生培養細胞の、ラットモデルにおいて自家副腎髄質細胞とカプセル封入NGF産生細胞の脳内細胞移植が、それぞれ移植細胞の高い生着効率を示し、行動学的な機能改善をもたらすことを明らかにした。

A. 研究目的

神経伝達物質や神経栄養因子産生能を持つ細胞をカプセル化して脳内に移植する方法は、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する治療法の一つとして期待がもたれている。glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)は脳内ドーパミン系に対して最も強い栄養作用を持つ神経栄養因子の一つであり、脳に投与することにより宿主内因性ドーパミン系の活性化を促進することが可能である。今回、我々は遺伝子操作を用いてGDNF産生細胞を作成し、これをカプセル化してパーキンソン病モデル動物の線条体内に移植することにより脳内ドーパミン系の保護効果があるかどうかを検討した。

B. 研究方法

カプセル化GDNF産生細胞線条体内移植による脳内ドーパミン系の保護効果

human GDNF cDNAを含むpcDL81-hGDNF plasmidを作製し、baby hamster kidney(BHK)細胞にカチオニックリポソームを用いて遺伝子導入し、GDNF産生細胞株を確立した。この細胞を高分子半透膜製の内径1.1mm、長さ7mmのカプセルに封入した(BHK-GDNF)。また、遺伝子導入を行っていないBHK細胞も同様にカプセル化した(BHK-control)。これらのカプセルをそれぞれSprague-Dawley(SD)ラットの右線条体内に移植し、その6日後に同側の線条体内のカプセルと0.5mm離れた所に6-hydroxydopamine(6-OHDA)を注入した。宿主は6-OHDA投与2ヶ月後に屠殺し、カプセルからのGDNF産生量、アポモルフィン誘発回転運動、および組織学的変化などを調べ、GDNFのDAニューロンに対する神経保護作用を検討した。

C. 研究結果

移植2ヶ月後に取り出したカプセル内には良好なBHK細胞の生存を認め、7-8ng/day/capsuleのレベル

でGDNFの産生を認めた。BHK-GDNFカプセルを移植されたラットではBHK-controlカプセルを移植されたラットに比べて、アポモルフィン誘発回転運動が80-90%減少し、組織学的にも線条体内のDA線維および黒質のDAニューロンの良好な生存を認めた。

D. 考察および結論

この研究により、カプセル化GDNF産生細胞は2ヶ月間持続的にGDNFを脳内に安定供給すること、DAニューロンに対して神経保護作用を示すことが明らかになった。文献的にはin vivoで直接注入する場合、10-100 μ g程度のGDNFがDAニューロンの保護作用に必要とされているが、カプセル化GDNF産生細胞移植による持続的分泌を行った場合は、10-30ng/dayのGDNF産生量で十分な効果を発揮した。これは、カプセル化細胞移植という方法により線条体内全体に持続的にGDNFが供給されたためと考えられる。このことからカプセル化GDNF産生細胞の脳内移植はパーキンソン病の治療法の一つとなりうる期待がもたれる。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. Date I, Aoi M, Tomita S, Collins F, Ohmoto T: GDNF administration induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system both in young and aged parkinsonian mice. Neuroreport 9: 2365-2369, 1998.
2. Date I, Asari S, Ohmoto T: Cerebral aneurysms causing visual symptoms: their features and surgical outcome. Clin Neurol Neurosurg 100: 259-267, 1998.
3. Date I, Asari S, Ohmoto T: Tips for preventing CSF rhinorrhea after acoustic neurinoma surgery: technical note. Skull Base Surg 8: 181-183, 1998.

4. Date I, Ohmoto T: Long-term outcome of surgical treatment of intracavernous giant aneurysms. *Neurol Med Chir* 38 (Suppl): 62-69, 1998.
5. Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Nagatsu T: Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex. *Hum Gene Ther* 9: 1093-1102, 1998.
6. Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Yasuda T, Tsuda M: In vivo gene transfer into the adult mammalian central nervous system by continuous injection of plasmid DNA-cationic liposome complex. *Brain Res* 780: 119-128, 1998.
7. Ono S, Date I, Onoda K, Shiota T, Ohmoto T, Ninomiya Y, Asari S, Morishita R: Decoy administration of NF- κ B into the subarachnoid space for cerebral angiopathy. *Hum Gene Ther* 9: 1003-1011, 1998.
8. 伊達 勲: カプセル化ドーパミン産生細胞の脳内移植 - パーキンソン病の治療を目指して - . *Prog Med* 18: 1406-1413, 1998.
9. 伊達 勲, 新郷哲郎, 大本堯史: パーキンソン病に対する神経移植・再生療法の新しいアプローチ. *脳* 21 1: 57-64, 1998.
10. 伊達 勲, 大本堯史: Parkinson病の神経移植療法: 現況と新展開. *Clinical Neuroscience* 16: 556-558, 1998.
11. 伊達 勲, 大本堯史: 神経移植・再生療法の現状と展望: 細胞工学、分子生物学的手法の応用. *脳神経外科* 26: 860-872, 1998.
12. 伊達 勲, 大本堯史: 組織工学を用いたパーキンソン病の治療. *組織培養工学* 24: 147-151, 1998.

②学会発表

1. カプセル化及び非カプセル化PC12細胞の脳内移植 - 霊長類での経時的検討 - 吉田秀行、伊達勲、藤原賢次郎、新郷哲郎、三好康之、古田知久、大本堯史(1998/04 第6回細胞療法研究会 大阪)
2. パーキンソン病モデル動物に対するカプセル化GDNF産生細胞脳内移植の効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、青井瑞穂、藤原賢次郎、三好康之、古田知久、大本堯史(1998/04第6回カテコールアミンと神経疾患研究会 東京)
3. カプセル化細胞移植による神経伝達物質および神経栄養因子の脳内への運搬 (シンポジウム) 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、Emerich DF, 大本堯史 (第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
4. 霊長類を用いたカプセル化及び非カプセル化PC12細胞の脳内移植における経時的検討 (ワークショップ) 吉田秀行、伊達勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
5. ヒト tyrosine hydroxylase 遺伝子導入により作製したステロイド調節可能なL-DOPAおよびドーパミン産生PC12細胞の確立 藤原賢次郎、伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、大本堯史(1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
6. パーキンソン病モデルラットに対するGDNFの効果 青井瑞穂、伊達勲、富田 享、大本堯史 (1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
7. カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるパーキンソン病モデル動物に対する保護効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史 (1998/06 第13回神経組織の成長・再生・移植研究会 東京)
8. カプセル化細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療: 神経伝達物質および神経栄養因子の脳内への運搬 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史(1998/09 第6回脳腫瘍遺伝子療法懇話会 京都)
9. パーキンソン病に対するカプセル化ドーパミン産生細胞脳内移植: 定位脳手術との併用 伊達勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、青井瑞穂、松井利浩、富田 享、大本堯史(1998/10 第57回日本脳神経外科学会総会 札幌)
10. GDNF遺伝子導入による脳内ドーパミン系の保護作用および再生効果 新郷哲郎、伊達勲、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史(1998/10 第57回日本脳神経外科学会総会 札幌)

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

パーキンソン病モデル動物の作成に関する研究

分担研究者 松田潤一郎 国立感染症研究所獣医科学部主任研究官

研究要旨 研究要旨 神経変性の進行速度や程度をコントロールできるようなパーキンソン病モデル動物の作成を目指し、ドーパミン産生細胞特異的なプロモーター（Tyrosine Hydroxylase Promoter, TH）の下流にテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTA)遺伝子を結合させた融合遺伝子（TH-tTA）、およびテトラサイクリン制御プロモーターにGap1mを結合させた融合遺伝子(tet-O-Gap)を導入したTGマウスを、それぞれ3系統および5系統作出した。これらのTGマウスの発現解析、ダブルTGマウスの作成を開始した。

A.研究目的

パーキンソン病の動物モデル系として、従来は薬物投与による一過性の神経変性誘起法が用いられてきた。しかしながら、パーキンソン病の特徴は神経変性が長期にわたり緩やかに進行することであり、その特徴を備えたモデル動物系の開発が必要である。そこで本研究では、黒質ドーパミン産生細胞変性の緩やかな進行を人工的に誘起し得るトランスジェニックモデル動物を作出することを目的とした。具体的には、シグナル伝達系の抑制因子としてのGap1m 遺伝子をドーパミン産生細胞特異的に発現させ、さらにその遺伝子発現量を人為的に調節することのできるようなトランスジェニック(TG)マウスの作出を目指した。神経変性の進行速度や程度をコントロールできるような疾患モデル動物が出来れば、様々な変性進行段階において、神経幹細胞、副腎髄質、神経栄養因子産生細胞などの脳内移植を行い、その治療効果を判定するなど、種々の治療法の開発研究が進むものと期待される。

B.研究方法

昨年度に引き続き、神経細胞の選択的で制御可能な変性をきたすTG動物モデルとして、飲水中のテトラサイクリン濃度に依存してGap1mの発現を制御できるTG系の開発をめざした。すなわち、ドーパミン産生細胞特異的なプロモーター（Tyrosine Hydroxylase Promoter, TH）の下流にテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTA)遺伝子を結合させた融合遺伝子（TH-tTAと略記）、およびテトラサイクリン制御プロモーター(tet-O promoter)にGap1mを結合させた融合遺伝子(tet-O-Gap)をそれぞ

れもつTGマウスを、常法に従いC57BL/6マウス受精卵の前核に顕微注入して得た。

C.研究結果

上記のTGマウスについて順次作出し、離乳に至ったTG候補マウスについて尻尾の一部を採取し、DNAを抽出した。PCR法およびジェノミックサン法によってトランスジェニックマウスを判定し、現在までに、TH-tTA遺伝子を持つTGファウンダーマウスを3匹、tet-O-Gap遺伝子については5匹のTGファウンダーマウスが得られた。TH-tTAのTGマウスについてはさらに作出中である。これらのTGファウンダーマウスについては、C57BL/6マウスとの交配により、次世代へのトランスジェニックの伝達を確認しており、発現解析を進めている。さらにこれら2種類のTGマウスの交配により、両トランスジェニックを持ちパーキンソンモデルとなるTGマウス（ダブルTGマウス）の作出を開始した。

D.考察

パーキンソン病モデル動物の作成をめざし、神経変性の進行速度や程度をコントロールできるようにテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTA)を利用したTGマウスの作出を試みた。パーキンソン病モデルとなることが予想されるドーパミン産生細胞特異的なプロモーター（TH）以外にも、神経細胞特異的なエノラーゼプロモーター(NSE)および主として小脳プルキンエ細胞特異的なL7プロモーター(L7)を用い、それぞれの部位特異的にtTAを発現させるTGマウスを作成しており、それらの発現をRT-PCR法にて確認している。TH-tTAのTGマウスに関しては3ラインを作成しており、

その発現解析を進めているが、各々のTGマウスラインは導入遺伝子のコピー数、染色体上の挿入部位などが異なり、遺伝子の発現様式も異なることが予想され、有用なラインを選択していく必要がある。今後、目的とする神経細胞特異的な発現を示すTGマウスラインを確認することが出来れば、tet-O-GapのTGマウスとのダブルTGマウスを作出することによって、パーキンソン病モデル動物となることが期待される。

E. 結論

神経変性の進行速度や程度をコントロールできるようなパーキンソン病モデル動物の作成を目指し、ドーパミン産生細胞特異的なプロモーター (Tyrosine Hydroxylase Promoter, TH) の下流にテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子(tTA) 遺伝子を結合させた融合遺伝子 (TH-tTA)、およびテトラサイクリン制御プロモーターにGap1mを結合させた融合遺伝子(tet-O-Gap)を導入したTGマウスを作出し、それぞれ3匹および5匹のTGファウンダーマウスを得た。今後、遺伝子発現の解析を進め、TH-tTAをもつTGマウスとtet-O-GapをもつTGマウスとのダブルTGマウスを作出することによりパーキンソン病モデル動物となることが期待される。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. Ogura A, Inoue K and Matsuda J, Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. Hum Reprod, in press.
2. Mochida K, Wakayama T, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Ogura A and Matsuda J, Successful cryopreservation of Mongolian gerbil embryos by vitrification. Theriogenology, 51: 171, 1999. (1999年1月)
3. Mochida K, Matsuda J, Noguchi Y, Yamamoto Y, Nakayama K, Takano K, Suzuki O and Ogura A, Birth of pups by transfer of Mastomys (Praomys coucha) embryos cryopreserved by vitrification. Biol Reprod, 51 Suppl 1:180-181,1998. (1998年8月)
4. Ogura A, Suzuki O, Tanemura K, Mochida K, Kobayashi Y and Matsuda J, Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5611-5615, 1998. (1998年5月)

5. 松田潤一郎、ノックアウト動物。高橋迪雄監修: 哺乳類の生殖生物学. 東京、学窓社、1999年3月、pp.248-256.

②. 学会発表

1. 松田潤一郎、大島章弘、鈴木治、小倉淳郎、野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、野口洋子、中山一栄、滝本一広、北村義浩、神田忠仁、伊藤雅之、高嶋幸男、鈴木義之: GM1-ガングリオシドーシスマウスのアデノウイルスベクターによる遺伝子治療の試み、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
2. 小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木治、種村健太郎、野口洋子、山本美江、持田慶司、野口章、高野薫、中山一栄、関口富士男、小林洋四郎: マウス一次精母細胞を用いた顕微受精による産子の作出、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
3. 山本美江、種村健太郎、鈴木治、松田潤一郎、持田慶司、野口章、中山一栄、野口洋子、高野薫、小倉淳郎: ネフローゼ発症モデルマウス腎のDD/RT-PCR法による遺伝子発現パターンの解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
4. 持田慶司、松田潤一郎、山本美江、野口洋子、高野薫、黒沢重利、小倉淳郎: マストミス胚の移植とガラス化法による凍結保存、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
5. 野口章、持田慶司、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、鈴木治、小倉淳郎、松田潤一郎、大山雄二、浜本敏郎、辻崇一: $\alpha 2,3$ シアル酸転移酵素(ST3Gal II)遺伝子導入マウスの作出と解析、第45回日本実験動物学会総会、1998年5月、松本。
5. 小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、種村健太郎、野口章、高野薫、松田潤一郎: 一次精母細胞と受精した第一減数分裂中期卵子からの正常産子の発生、第91回日本繁殖生物学会、1998年8月、札幌。
6. 滝本一広、松田潤一郎、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、高野薫、伊藤雅之、高嶋幸男、浅野敏彦、鈴木義之: GM1ガングリオシドーシスマウスの病態解析—蓄積物質の加齢変化—、第15回日本疾患モデル学会総会、1998年11月、東京。

G. 知的所有権の取得状況

該当無し。

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
総括研究報告書

神経幹細胞の樹立と遺伝子導入法に関する研究

分担研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科・医学部脳神経医学専攻 基礎神経医学大講座
神経生物学分野主任 助教授

研究要旨 脳内細胞移植に神経幹細胞を用いるための基礎的技術として、胎児および成体脳組織より幹細胞を選択的に単離し、試験管内で培養する技術を確立した。さらに両者の性質の差について検討を加えた。また神経幹細胞の移植によって組織を再構成する可能性を検討するための実験系を構築し、知見を集積しつつある。

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患に対する脳内細胞移植法は、極めて有効な治療法として今後の更なる発展、新規技術の開発が期待されている。この中で本研究では、発生期および成体脳に存在するニューロン・グリアの共通の前駆細胞である神経幹細胞を脳内移植に用いる新しい可能性を追及している。本年度は前年度に引き続き、神経幹細胞を単離・同定し試験管内において増殖、分化させる技術、ならびに幹細胞の脳内移植技術を開発することを目的とした。特に、これまでの知見から、胎児期の幹細胞が爆発的に増殖しながらニューロン・グリアへと分化する能力を発揮するにもかかわらず、成体脳に残存する幹細胞はその増殖・分化ともに著しい制限が起きていると考えられる。この両者の相違は何に由来するかを分子レベルで明らかにし、移植に用いる幹細胞を試験管内で未分化のまま増殖させる条件を検討した。

B. 研究方法

パーキンソン病のモデル動物としてこれまで最も良く用いられているラットをモデルとして、胎児および成体脳由来の神経幹細胞を培養する条件を検討した。またモデル系として神経幹細胞由来の不死化細胞株を樹立し、その増殖・分化の制御機構を解析するとともに、脳内に移植してその挙動を追跡した。

C. 研究結果

胎児神経組織の初代培養系の条件を応用して、成体脳内に残存する神経幹細胞の試験管内培養を

行った。この過程で、胎児、成体由来の幹細胞はともに、未分化な状態で増殖するためにはbFGF, EGF等の増殖因子の存在のみでは不十分であり、接着を介した細胞間相互作用が極めて重要であることを見出した。この知見を元に、幹細胞の自己複製と分化の運命選択の過程を制御する分子機構について解析した。その結果、1) 幹細胞の分化の最も初期過程では2種類の転写後因子Mash-1, Prox-1が重要であること、2) 未分化状態の維持に働く細胞間相互作用は細胞膜受容体であるNotchを介した情報伝達によって担われていること、等を明らかにした。また、神経幹細胞に対する遺伝子操作をおこない、リポソーム法およびレトロウイルス法により遺伝子導入する方法を確立した。

さらに、幹細胞の脳内への移植実験を開始し、移植細胞の生体脳組織への再構成を観察した。この際、遺伝子発現パターンの異なる細胞を移植すると、脳内に取り込まれた際の挙動が異なることを見出した。これは将来の臨床応用において、特定の脳組織への移植の為に用いる幹細胞の性質を十分に検討することが極めて重要であることを示唆している。今後、この幹細胞の持つ特異性の背景にある分子機構を明らかにし、幹細胞移植法の確立に向けた基盤となる知見を得たいと考えている。

D. 考察

本研究によって、神経幹細胞の試験管内培養と遺伝子操作に関する基礎的な技術はほぼ確立されつつある。今後は、培養幹細胞を実際に脳内に移植しその増殖、分化、組織再構築の挙動を更に詳細に解析し、その潜在能力と治療に用いる際に克

服すべき問題点を明らかにしなければならない。
現時点での我々を含めた国内外の知見から考えて、
神経幹細胞の脳内移植は益々その可能性が広がっ
てきており、将来の臨床応用に向けて着実な研究
の積み重ねが重要と考えている。

E. 結論

脳内細胞移植に神経幹細胞を用いるための基礎
的技術として、胎児および成体脳組織より幹細胞
を選択的に単離し、試験管内で培養する技術を確
立した。また神経幹細胞の移植によって組織を再
構成する可能性を検討するための実験系を構築し、
知見を集積しつつある。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126, 443-456 (1999)
2. Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152 (1999)
3. Yamamoto N, Yamamoto S, Matsunaga E, Torii M, Kawaichi M, N Kishi, Matsuno K, Okano H, Nakafuku, M. Deltex as a nuclear signal transducer downstream of the Notch receptor. submitted to publication.
4. 中福雅人、加藤真樹 神経系の腹側化誘導因子 Sonic hedgehogの生理作用に関わる転写制御因子. *実験医学* 17, 183-191 (1999)

②. 学会発表

1. 中福雅人、加藤真樹、深見伸一、佐々木洋、Chi-chung Hui 分泌性シグナル因子Sonic Hedgehog及びBMPの細胞内シグナル伝達機構 第21回日本神経科学会・第41回日本神経化学会合同大会ミニシンポジウム 1998.
2. 中福雅人 Molecular control of specification and differentiation of neural stem cells. In: International Workshop on Neuronal precursor cell biology and application for treatment of inborn error of metabolism (Tokyo) 1999. (invited)
3. 中福雅人 神経幹細胞から眺めた脳の初期発生 京都大学ウイルス研究所コロキウム「発生研究の

最前線」1999.

4. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学とその臨床応用に向けた展望 国立循環器病センターCOEシンポジウム「生体内情報伝達とその制御」1999.
5. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学 日本学術会議50周年記念シンポジウム「第34回脳のシンポジウム」1999.

