

厚生科学研究費補助金脳科学研究事業研究報告書

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

国立精神・神経センター神経研究所
服部成介

別添1 研究報告書概要版

- (1) 研究費の名称=厚生科学研究費補助金
- (2) 研究事業名=脳科学研究事業
- (3) 研究課題名=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
- (4) 国庫補助金精算所要額 (円) =19,000,000
- (5) 研究期間 (西暦) =1997-1999
- (6) 研究年度=1999
- (7) 主任研究者名 (所属施設名) =服部成介 (国立精神・神経センター神経研究所)
- (8) 分担研究者名 (所属施設名) =伊達勲 (岡山大学医学部), 松田 潤一郎 (国立感染症研究所), 中福雅人 (東京大学大学院医学系研究科)

(9) 研究目的=パーキンソン病の特徴は神経細胞変性が長期にわたり緩やかに進行することであるが、その特徴を再現するモデル動物系の開発は治療法の確立に必須である。パーキンソン病の素因は多因子であるとされるがその原因は明らかではなく、従来の神経毒性薬物とは異なる機構で発症を誘起することは発症機構の理解の上で大きな意義を持つ。さらにこのモデル動物を利用して神経栄養因子産生細胞の移植による残存神経細胞の維持方法の検討、細胞移植による組織修復、および治療のタイミングに関して重要な知見を得ることができる。実験動物作成と並行して、神経栄養因子産生細胞の脳内細胞移植による治療法、神経幹細胞の単離・培養系の確立を行ない、ヒト症例への治療法の研究に資する。

(10) 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。このため、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) にテトラサイクリン制御プロモーター活性化因子を連結したもの、およびテトラサイクリン制御プロモーターに細胞障害性因子として細胞内シグナル伝達因子であるRasの抑制性因子Gap1m遺伝子を連結したものを有するマウスを作成し、これらのマウスの掛け合わせにおいて黒質細胞特異的なGap1m遺伝子の発現を調べた。またこれまでの研究から、ラット及びサルを用いた実験動物モデルにおいて神経栄養因子産生細胞の脳内移植が、パーキンソンニズムの改善に効果があることを示した。今年度はさらに黒質神経細胞の栄養因子であるGDNFを産生する細胞株を作成し、脳内細胞移植の効果を検討した。ラット片側パーキンソンモデルに対しポリマーカプセルに封入したGDNF産生細胞脳内に移植を行ない、ドーパミン神経細胞の生存維持と行動学的評価を行った。また変性が進行した組織の修復を図るため、ラットおよびマウスの胎児および成体脳より神経幹細胞を単離し、安定に培養する条件を検討し、さらに効率よく分化させる条件について検討した。

(11) 結果と考察=ドーパミンニューロン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。実際にPC12細胞をNGFより神経細胞に分化させた際にさらにRas抑制因子を発現すると細胞死が誘導される。そこで前年度に引き続き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 (TAK) を連結した遺伝子 (TH-TAK)、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-0-Gap1m)を、それぞれ2500個および1200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7ラインの、Tet-0-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。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、現在もマウスを作成している。

カプセル化GDNF産生細胞線条体内移植による脳内ドパミン系の保護効果を検討するため、GDNF産生細胞株を確立した。遺伝子導入を行っていないBHK細胞をカプセル化したBHK-controlカプセルと、GDNF産生細胞株を封入したBHK-GDNFカプセルの2種類のカプセルを作製し、これらのカプセルをSprague-Dawley(SD)ラットの右線条体内に移植し、その7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。6カ月後に屠殺し、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のドパミンニューロンに対する保護作用を長期に検討した。その結果、移植6カ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、10-20ng/day/capsuleのレベルでGDNFの産生が観察された。BHK-GDNFカプセルを6-OHDAのlesion前に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ドパミン線維および黒質のドパミンニューロンに対する保護効果が観察された。またカプセル化GDNF産生細胞線条体内移植による脳内ドパミン系の長期再生効果を検討するため、まず6-OHDAを宿主ラットの右線条体に投与し、その2週間後にカプセルを同部位に移植した。6-OHDAのlesion後BHK-GDNFカプセルを移植されたラットではアポモルフィン誘発回転運動は30-40%減少し、組織学的にも線条体内のドパミン線維およびドパミンニューロンの有意な再生効果が観察された。

これまでに、ラット胎児より神経幹細胞を未分化な状態で単離・増殖維持可能なことを示してきた。今年度はラットをモデルとして、胎児および成熟個体の神経組織の初代培養系を用いて、神経幹細胞の増殖を試験管内において効率よく再現する培養条件を確立した。種々の増殖因子の効果を検討し、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子が神経幹細胞の自己複製能を強く促進することを見出した。また、培養幹細胞を増殖因子非存在下に分化誘導し、ニューロン、グリアへと20-50%の高い効率で分化させることが出来た。胎生11.5あるいは13.5日ラット胚由来の幹細胞は、培養開始後3週間程度までは高い増殖能を示し、その後増殖能は低下するものの、3カ月以上にわたって試験管内での維持が可能であった。これに対して、成体脳組織由来の幹細胞は、同一条件下でその増殖能は極端に低く、1カ月以上の維持は困難であった。成体幹細胞の長期維持のためには、さらに培養条件の工夫が必要と考えられた。

(12) 結論=平成11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作成し、マウス受精卵に導入することによりトランスジェニックマウスを作成し、目的遺伝子の発現を認めた。2. ラットパーキンソン病動物モデルに対して、カプセル化GDNF産生細胞の脳内移植が著効を示すことを明らかにした。3. 神経幹細胞樹立の条件を確立し、さらに効率よく分化を誘導する条件を見いだした。

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 講師
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

神経細胞が進行性的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、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(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。

さらに将来の細胞移植の供給源として神経幹細胞

に着目し、胎児および生体組織からの神経幹細胞の単離方法の確立を行なう。また長期にわたる培養の影響、ニューロン・グリアへの分化誘導条件について検討を加える。

なお動物を使用する実験においては、各研究者が所属する施設の実験動物取り扱い規定を遵守して行なった。

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。黒質神経細胞で発現する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-0-Gap1m)を、それぞれ2500個および1200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7ラインの、Tet-0-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4ライン、小脳特異的プロモーターによるL7-tTAKを9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-0-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る。マウス作成に用いたプラスミドを培養細胞系に導入した場合に遺伝子発現が誘起されることから、プラスミドの構築には問題がないと考えられる。個体内において発現レベルが低い原因として、プラスミドが組み込まれた染色体の位置がその発現に大きく影響することが知られており、例数を多くすれば克服できる問題と考え、現在もマウスを作成している。

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、GDNF産生細胞株を確立した。遺伝子導入を行っていないBHK細胞をカプセル化したBHK-controlカプセルと、GDNF産生細胞株を封入したBHK-GDNFカプセルの2種類のカプセルを作製し、これらのカプセルをSprague-Dawley(SD)ラットの右線条体内に移植し、その7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。6カ月後に屠殺し、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のドーパミンニューロンに対する保護作用を長期に検討した。その結果、移植6カ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、10-20ng/day/capsuleのレベルでGDNFの産生が観察された。BHK-GDNFカプセルを6-OHDAのlesion前に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ドーパミン線維および黒質のドーパミンニューロンに対する保護効果が観察された。またカプセル化GDNF産生細胞線条体内移植による脳内ドーパミン系の長期再生効果を検討するため、まず6-OHDAを宿主ラットの右線条体に投与し、その2週間後にカプセルを同部位に移植した。6-OHDAのlesion後BHK-GDNFカプセルを移植されたラットではアポモルフィン誘発回転運動は30-40%減少し、組織学的にも線条体内のドーパミン線維およびドーパミンニューロンの有意な再生効果が観察された。これまでに、ラット胎児より神経幹細胞を未分化な状態で単離・増殖維持可能なことを示してきた。今年度はラットをモデルとして、胎児および成熟個体の神経組織の初代培養系を用いて、神経幹細胞の増殖を試験管内において効率よく再現する培養条件を確立した。種々の増殖因子の効果を検討し、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子が神経幹細胞の自己複製能を強く促進することを見出した。また、培養幹細胞を増殖因子非存在下に分化誘導し、ニューロン、グリアへと20-50%の高い効率で分化させることが出来た。胎生11.5あるいは13.5日ラット胚由来の幹細胞は、培養開始後3週間程度までは高い増殖能を示し、その後増殖能は低下するものの、3カ月以上にわたって試験管内での維持が可能であった。

これに対して、成体脳組織由来の幹細胞は、同一条件下でその増殖能は極端に低く、1カ月以上の維持は困難であった。成体幹細胞の長期維持のためには、さらに培養条件の工夫が必要と考えられた。

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、ウェスタンブロット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6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11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、さらに効率よく分化誘導する条件を確立した。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. Sakakibara A, Hattori S Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 275: 6404-6410, 2000
2. Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y, Miyazaki N, Fujioka S, Sugimoto H, Amasaki M, Hattori S, Matsuya T, Inagaki S. Mouse semaphorin H induces PC12 cell neurite outgrowth activating Ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca(2+) influx. *J Biol Chem* 274: 29666-29671, 1999
3. Date I, Ohmoto T: Neural transplantation for Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol* 19: 67-78, 1999.
4. 伊達 勲: パーキンソン病に対する新しい移植療法. *内科* 83: 500-503, 1999.
5. 伊達 勲: パーキンソン病に対する神経移植療法. *ブレインナーシング* 15: 1094-1099, 1999.
6. 伊達 勲: パーキンソン病に対する神経細胞移植. *カレントセラピー* 17:1240-1243, 1999.
7. 伊達 勲: パーキンソン病の最新治療情報: 細胞脳内移植による治療法. *難病と在宅ケア* 5: 8-11, 1999.
8. 伊達 勲, 吉田秀行, 新郷哲郎, 藤原賢次郎, 小林和樹, 大本堯史: パーキンソン病モデル動物に対するカプセル化ドーパミン産生細胞脳内移植 - 霊長類での検討 -. *Prog Med* 19: 2619-2625, 1999.
9. 伊達 勲, 大本堯史: 松果体部腫瘍へのアプローチ: infratentorial supracerebellar approach. *脳神経外科速報* 9: 303-310, 1999.
10. Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T, Ohmoto T: Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells. *Cell Transplant* 8: 427-430, 1999.
11. 新郷哲郎, 伊達 勲, 青井瑞穂, 吉田秀行, 藤原賢次郎, 大本堯史: 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. *Prog Med* 19: 589-595, 1999.
12. Date I, Ono S, Takahashi K, Nakajima M, Onoda

- K, Ogihara K, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N: Quantitative and qualitative analysis of hemolysate-induced cerebral vasospasm in rats using corrosion cast technique, in N. Dorsch (eds): Cerebral Vasospasm VI. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 36-39.
13. Date I, Sugi K, Ohmoto T: A Giant thrombosed aneurysm of the petrous carotid artery presenting with cavernous sinus syndrome: Case report. *Skull Base Surg* 9: 65-70, 1999.
14. 福田 淳, 伊達 勲. "脳移植の最前線." 1999 中外医学社. 東京.
15. Ono S, Date I, Takahashi K, Nakajima M, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N: In vivo analysis of transcription factors in rat basilar artery with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage, in N. Dorsch (eds): Cerebral Vasospasm VI. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 86-88.
16. 大本堯史, 小野成紀, 伊達 勲: 脳血管攣縮に対する遺伝子治療. *Molecular Medicine* 36: 662-671, 1999.
17. 中島正明, 伊達 勲, 高橋賢治, 佐藤元美, 二宮善文, 浅利正二, 大本堯史: 脳血管攣縮におけるspontaneous nitric oxide donor(FK409)の効果, 浅野孝雄, 太田富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 308-312.
18. 高橋賢治, 伊達 勲, 中島正明, 佐藤元美, 大本堯史, 二宮善文, 浅利正二, 濱田洋文: 血液存在下での血管平滑筋細胞、内皮細胞へのadenovirusによる遺伝子導入, 浅野孝雄、太田富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 126-131.
19. Ogura A, Inoue K and Matsuda J. Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes. *Human Reprod*, 14: 1294-1298, 1999.
20. Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M and Kusanagi M: Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cell. *Exp Anim*, 48: 213-216, 1999.
21. Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J and Ogura A: Survival and subsequent in vitro development of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions. *J Assist Reprod Genet*, in press.
22. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F and Matsuda J: Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, in press.
23. Shi F, Mochida K, Ogura A, Matsuda J, Suzuki O, Watanabe G, Hutz RJ, Tsonis CG, Suzuki AK and Taya K: Follicle selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin a-subunit. *Life Science*, in press.
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. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-3924 (1999).
27. Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-C. Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Shh signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.* 9, 1119-1122 (1999).
28. 神経幹細胞の分子生物学. 中福雅人 神経研究の進歩 43巻, 863-870 (1999).
29. 神経幹細胞の増殖と分化の分子機構. 中福雅人 実験医学 17巻, 2074-2081 (1999).

②学会発表

1. Sakakibara A, Hattori S Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways. Keystone Symposium on Cell Adhesion, Keystone, Colorado, Mar. 25-30, 20000
2. 伊達 勲 パーキンソン病に対する神経移植 1999/03 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」
3. 伊達 勲、大本堯史 カプセル化細胞の脳内移植 1999/04 第25回日本医学会総会シンポジウム
4. 伊達 勲、徳永浩司、小野恭裕、富田 享、中

- 嶋裕之、河内正光、田宮 隆、松本健五、大本堯史
 内頸動脈上下垂体動脈分岐部(IC-SHA)動脈瘤の外科治療 1999/04 第28回日本脳卒中の外科学会
5. 中島正明、伊達 勲、高橋健治、佐藤元美、大本堯史、二宮善文、浅利正二 脳血管攣縮に対する自発的NO donorの効果 1999/04 第24回日本脳卒中学会総会
6. 高橋健治、伊達 勲、中島正明、佐藤元美、大本堯史、二宮善文、浅利正二、濱田洋文 血液溶解産物暴露培養血管細胞へのadenovirusを用いた遺伝子導入 1999/04 第24回日本脳卒中学会総会
7. Takahashi K, Date I, Nakajima M, Satoh M, Ohmoto T, Ninomiya Y, Asari S, Hamada H. Evaluation of gene transfer to cultured vascular cells exposed to oxyhemoglobin using replication-deficient adenovirus 1999/04 International Stroke Society, The 1st Regional Meeting
8. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史 カプセル化ドパミン産生細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療：霊長類での長期効果 1999/04 第7回細胞療法研究会
9. 吉田秀行、伊達 勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、大本堯史 カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるドパミンニューロンの保護効果 1999/04 第7回細胞療法研究会
10. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史 パーキンソン病モデルに対するカプセル化ドパミン産生細胞脳内移植：霊長類での検討 1999/04 第7回カテコールアミンと神経疾患研究会
 Date I, Ohmoto T Cerebral aneurysms causing visual symptoms: their features and surgical outcome. 1999/05 The 5th Japanese and Korean Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke.
11. Date I, Tokunaga K, Ono Y, Tomita S, Nakashima H, Kawauchi M, Tamiya T, Matsumoto K, Ohmoto T. Surgical treatment of internal carotid (IC)-superior hypophyseal artery (SHA) aneurysms. 1999/05 The 5th Japanese and Korean Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke.
12. 伊達 勲、大本堯史 カプセル化ドパミン産生細胞を用いたパーキンソン病の治療 1999/05 第6回日本臓器保存生物医学学会総会
13. 伊達 勲 中枢神経系の移植・再生と遺伝子治療 1999/05 第19回日本脳神経外科コンgres
14. 吉田秀行、伊達 勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 パーキンソン病モデルラットに対するGDNF遺伝子直接脳内導入法の神経保護・再生効果についての検討 1999/06 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会
15. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるドパミン神経に対する保護・再生効果ーパーキンソン病モデルを用いた長期の検討ー 1999/06 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会
16. 荻原浩太郎、Zubkov AY, Zhang JH, Parent AD, 17. 伊達 勲、大本堯史 オキシヘモグロビンによる細胞死についてー培養内皮細胞のアポトーシス誘導と培養平滑筋細胞のネクローシス誘導ー 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
 佐藤元美、伊達 勲、中島正明、高橋健治、伊勢田恵一、大本堯史、二宮善文、浅利正二 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)抑制による脳血管攣縮に対する効果の検討 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
18. 高橋健治、伊達 勲、中島正明、佐藤元美、伊勢田恵一、大本堯史、浅利正二、二宮善文、濱田洋文 ラットくも膜下出血モデルを用いたアデノウイルスによる遺伝子導入ー肉眼的、組織学的検討ー 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
19. 伊達 勲 神経組織の脳内移植 1999/08 第26回岡山大学脳研究セミナー
20. Kobayashi K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Ohmoto T. Encapsulated GDNF-producing cells show regenerative and protective effects on dopaminergic neurons of hemiparkinsonian rats. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
21. Fujiwara K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Kobayashi K, Ohmoto T. A glucocorticoid-inducible l-dopa and dopamine-producing PC12 cell line established by liposome-mediated transfection of human tyrosine hydroxylase gene: possible donor source for Parkinson's disease. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
22. Shingo T, Date I, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T. The transduction of GDNF gene by continuous injection of plasmid DNA-liposome complex prevents 6-OHDA-induced degeneration. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
23. Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T. Fate of grafted PC12 cells in the primate brain. 1999/08 7th International Meeting on

Neural Transplantation and Repair.

24. 伊達 勲、小野田恵介、小野成紀、高橋健治、大本堯史 脳血管攣縮に対する遺伝子治療 1999/09 第9回脳血管シンポジウム
25. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 カプセル化遺伝子導入細胞の脳内移植によるパーキンソン病の治療 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
26. 伊達 勲、徳永浩司、小野恭裕、富田 享、中嶋裕之、河内正光、田宮 隆、松本健五、大本堯史 内頸動脈上下垂体動脈分岐部(IC-SHA)動脈瘤に対する外科治療 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
27. 荻原浩太郎、Bermanke DH, Zubkov AY, Zhang JH, Parent AD, 伊達 勲、大本堯史 Fibroblast-populated collagen latticeに対するエンドセリン受容体拮抗薬の効果について 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
28. 河内正光、徳永浩司、小野恭裕、富田 享、伊達 勲、中嶋裕之、田宮 隆、松本健五、大本堯史 斜台部脊索腫に対する治療法の選択 999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
29. 高橋健治、伊達 勲、中島正明、佐藤元美、伊勢田恵一、大本堯史、浅利正二、二宮善文、濱田洋文 ラットくも膜下出血モデル脳血管へのアデノウイルスによる遺伝子導入ー肉眼的、組織学的検討ー 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
30. 伊達 勲 パーキンソン病に対する神経移植再生療法 1999/11 千里ライフサイエンスシンポジウム「脳の幹細胞」
31. 伊達 勲、大本堯史 カプセル化細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療 1999/11 第21回日本バイオマテリアル学会大会
32. 持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎：スナネズミ初期胚の移植方法の検討とガラス化保存の影響。 第46回日本実験動物学会総会 1999年5月20-22日、市川。
33. 小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、黒沢重利、高野薫、野口章、中山一栄、松田潤一郎：マストミス(*Praomys coucha*)の精子細胞を用いた顕微受精と受精卵の胚盤胞への発生 第46回日本実験動物学会総会1999年5月20-22日、市川。
34. 野口章、持田慶司、小倉淳郎、大島章弘、長瀬裕美、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、松田潤一郎： ヒト β -ガラクトシダーゼ高発現トランスジェニックマウスの作成。 第46回日本実験動物学会総会1999年5月20-22日、市川。
35. 長瀬裕美、持田慶司、中平美穂、野口章、山本美江、高野薫、野口洋子、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木義之： ヒト変異型 β -ガラクトシダーゼ遺伝子導入による β -ガラクトシダーゼ高発現マウス作成の試み。 第16回日本疾患モデル学会総会1999年11月26,27日、大阪。
36. Suzuki O, Kurosawa S, Noguchi Y, Yamamoto Y, Mochida K, Matsuda J, Ogura A and Asano T. Superovulation and embryo transfer in the guinea pig. 26th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, January 8-12, 2000, Maastricht, The Netherlands.
37. 中福雅人 脳の発生から再生へ：神経幹細胞の分子生物学 第22回日本分子生物学会ワークショップ(1999)。
38. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会ワークショップ(1999)。
39. 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)
40. 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。
41. 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。
42. 中福雅人 神経幹細胞の分子生物学 日本学会50周年記念シンポジウム「第34回脳のシンポジウム」1999。

G. 知的所有権の取得状況

なし

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講師

研究要旨 ラットの片側パーキンソン病モデルにおいてカプセル封入GDNF産生培養細胞の脳内細胞移植が高い生着効率を示し、長期にわたりGDNFを産生し続けること、線状体および黒質ドーパミン系ニューロンの生存維持・再生に著効を示し、その結果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

神経栄養因子を脳内に供給し、パーキンソン病などの神経変性疾患に対する治療を試みる報告がなされている。分子生物学的手法の発達により、これらの神経栄養因子の遺伝子を細胞株に導入し、神経栄養因子産生細胞株を作製、これを高分子半透膜製のカプセルに封入した後に脳内移植することが可能となった。我々は脳内ドーパミン神経系に対して最も強力な作用を有する神経栄養因子の一つである glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)に注目し、GDNF産生細胞株を作製後カプセル化してパーキンソン病モデル動物の線条体に移植し、脳内ドーパミン系に対する保護効果について検討してきた。本年度はこのカプセルのドーパミン系に対する保護効果に加え、再生効果を検討し、その効果が長期にみられるかどうかを観察した。

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長期保護効果＞

human GDNF cDNAを含むvector 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。遺伝子導入を行っていないBHK細胞をカプセル化したBHK-controlカプセルと、GDNF産生細胞株を封入したBHK-GDNFカプセルの2種類のカプセルを作製し、これらのカプセルをSprague-Dawley(SD)ラットの右線条体内に移植し、その7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6カ月後に屠殺し、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のドーパミンニューロンに対する保護作用を長期に検討した。

＜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長期再生効果＞

上記と同様、2種類のカプセルを作製した。再生効果をみる実験では、まず6-OHDAを宿主ラットの右線条体に投与し、その2週間後にカプセルを同部位に移植した。宿主は移植6カ月後に屠殺し、保護効果をみるときと同様の検討を行い、GDNFのドーパミンニューロンに対する再生効果を長期に検討した。

実験動物の使用に際しては実験動物取り扱い規定を遵守した。

C. 結果

＜長期保護効果をみる実験＞

移植6カ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、10-20ng/day/capsuleのレベルでGDNFの産生が観察された。BHK-GDNFカプセルを6-OHDAのlesion前に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ドーパミン線維および黒質のドーパミンニューロンに対する保護効果が観察された。

＜長期再生効果をみる実験＞

カプセル内のBHK細胞の生存、GDNFの産生に関しては長期保護効果と同様の結果が得られた。6-OHDAのlesion後BHK-GDNFカプセルを移植されたラットではアポモルフィン誘発回転運動は30-40%減少し、組織学的にも線条体内のドーパミン線維およびドーパミンニューロンの有意な再生効果が観察された。

D. 考察および結論

本研究により、カプセル化GDNF産生細胞は6カ月間持続的にGDNFを脳内に供給すること、宿主ドパミンニューロンに対して保護作用および再生作用を示すことが明らかとなった。分子生物学的手法の発達により種々の神経栄養因子産生細胞株を作製することが可能となっており、これをカプセル化して脳内に移植する方法は種々の神経疾患に対する治療法としての応用が期待される。

F. 研究発表

①. 論文発表

1. 中島正明, 伊達 勲, 高橋賢治, 佐藤元美, 二宮善文, 浅利正二, 大本堯史: 脳血管攣縮における spontaneous nitric oxide donor(FK409)の効果, 浅野孝雄, 太田富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 308-312.
2. 高橋賢治, 伊達 勲, 中島正明, 佐藤元美, 大本堯史, 二宮善文, 浅利正二, 濱田洋文: 血液存在下での血管平滑筋細胞、内皮細胞へのadenovirusによる遺伝子導入, 浅野孝雄, 太田富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 126-131.
3. Date I, Ohmoto T: Neural transplantation for Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol* 19: 67-78, 1999.
4. 伊達 勲: パーキンソン病に対する新しい移植療法. *内科* 83: 500-503, 1999.
5. 伊達 勲: パーキンソン病に対する神経移植療法. *ブレインナーシング* 15: 1094-1099, 1999.
6. 伊達 勲: パーキンソン病に対する神経細胞移植. *カレントセラピー* 17:1240-1243, 1999.
7. 伊達 勲: パーキンソン病の最新治療情報: 細胞脳内移植による治療法. *難病と在宅ケア* 5: 8-11, 1999.
8. 伊達 勲, 吉田秀行, 新郷哲郎, 藤原賢次郎, 小林和樹, 大本堯史: パーキンソン病モデル動物に対するカプセル化ドパミン産生細胞脳内移植 - 霊長類での検討-. *Prog Med* 19: 2619-2625, 1999.
9. 伊達 勲, 大本堯史: 松果体部腫瘍へのアプローチ: infratentorial supracerebellar approach. *脳神経外科速報* 9: 303-310, 1999.
10. Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T, Ohmoto T: Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells. *Cell Transplant* 8: 427-430, 1999.
11. 新郷哲郎, 伊達 勲, 青井瑞穂, 吉田秀行, 藤原賢次郎, 大本堯史: 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. *Prog Med* 19: 589-595, 1999.
12. Date I, Ono S, Takahashi K, Nakajima M, Onoda K, Ogihara K, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N: Quantitative and qualitative analysis of hemolysate-induced cerebral vasospasm in rats using corrosion cast technique, in N. Dorsch (eds): *Cerebral Vasospasm VI*. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 36-39.
13. Date I, Sugiu K, Ohmoto T: A Giant thrombosed aneurysm of the petrous carotid artery presenting with cavernous sinus syndrome: Case report. *Skull Base Surg* 9: 65-70, 1999.
14. 福田 淳, 伊達 勲. "脳移植の最前線." 1999 中外医学社. 東京.
15. Ono S, Date I, Takahashi K, Nakajima M, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N: In vivo analysis of transcription factors in rat basilar artery with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage, in N. Dorsch (eds): *Cerebral Vasospasm VI*. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 86-88.
16. 大本堯史, 小野成紀, 伊達 勲: 脳血管攣縮に対する遺伝子治療. *Molecular Medicine* 36: 662-671, 1999.

②学会発表

1. 伊達 勲, 大本堯史 カプセル化細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療 1999/11 第21回日本バイオマテリアル学会大会
2. 伊達 勲 パーキンソン病に対する神経移植 1999/03 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」
3. 伊達 勲, 大本堯史 カプセル化細胞の脳内移植 1999/04 第25回日本医学会総会シンポジウム
4. 伊達 勲, 徳永浩司, 小野恭裕, 富田 享, 中嶋裕之, 河内正光, 田宮 隆, 松本健五, 大本堯史 内頸動脈上下垂体動脈分岐部(IC-SHA)動脈瘤の外科治療 1999/04 第28回日本脳卒中の外科学会
5. 中島正明, 伊達 勲, 高橋健治, 佐藤元美, 大本堯史, 二宮善文, 浅利正二 脳血管攣縮に対する自発的NO donorの効果 1999/04 第24回日本脳卒中学会総会
6. 高橋健治, 伊達 勲, 中島正明, 佐藤元美, 大本堯史, 二宮善文, 浅利正二, 濱田洋文 血液溶

- 解産物暴露培養血管細胞へのadenovirusを用いた遺伝子導入 1999/04 第24回日本脳卒中学会総会
7. Takahashi K, Date I, Nakajima M, Satoh M, Ohmoto T, Ninomiya Y, Asari S, Hamada H. Evaluation of gene transfer to cultured vascular cells exposed to oxyhemoglobin using replication-deficient adenovirus 1999/04 International Stroke Society, The 1st Regional Meeting
8. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史 カプセル化ドパミン産生細胞脳内移植によるパーキンソン病の治療：霊長類での長期効果 1999/04 第7回細胞療法研究会
9. 吉田秀行、伊達 勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、大本堯史 カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるドパミンニューロンの保護効果 1999/04 第7回細胞療法研究会
10. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、大本堯史 パーキンソン病モデルに対するカプセル化ドパミン産生細胞脳内移植：霊長類での検討 1999/04 第7回カテコールアミンと神経疾患研究会
- Date I, Ohmoto T Cerebral aneurysms causing visual symptoms: their features and surgical outcome. 1999/05 The 5th Japanese and Korean Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke.
11. Date I, Tokunaga K, Ono Y, Tomita S, Nakashima H, Kawauchi M, Tamiya T, Matsumoto K, Ohmoto T. Surgical treatment of internal carotid (IC)-superior hypophyseal artery (SHA) aneurysms. 1999/05 The 5th Japanese and Korean Friendship Conference on Surgery for Cerebral Stroke.
12. 伊達 勲、大本堯史 カプセル化ドパミン産生細胞を用いたパーキンソン病の治療 1999/05 第6回日本臓器保存生物医学会総会
13. 伊達 勲 中枢神経系の移植・再生と遺伝子治療 1999/05 第19回日本脳神経外科コンgres
14. 吉田秀行、伊達 勲、新郷哲郎、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 パーキンソン病モデルラットに対するGDNF遺伝子直接脳内導入法の神経保護・再生効果についての検討 1999/06 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会
15. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 カプセル化GDNF産生細胞脳内移植によるドパミン神経に対する保護・再生効果 -パーキンソン病モデルを用いた長期の検討- 1999/06 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会
16. 荻原浩太郎、Zubkov AY, Zhang JH, Parent AD,
17. 伊達 勲、大本堯史 オキシヘモグロビンによる細胞死について -培養内皮細胞のアポトーシス誘導と培養平滑筋細胞のネクローシス誘導- 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
- 佐藤元美、伊達 勲、中島正明、高橋健治、伊勢田恵一、大本堯史、二宮善文、浅利正二 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)抑制による脳血管攣縮に対する効果の検討 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
18. 高橋健治、伊達 勲、中島正明、佐藤元美、伊勢田恵一、大本堯史、浅利正二、二宮善文、濱田洋文 ラットくも膜下出血モデルを用いたアデノウィルスによる遺伝子導入 -肉眼的、組織学的検討- 1999/07 第15回スパズム・シンポジウム
19. 伊達 勲 神経組織の脳内移植 1999/08 第26回岡山大学脳研究セミナー
20. Kobayashi K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Ohmoto T. Encapsulated GDNF-producing cells show regenerative and protective effects on dopaminergic neurons of hemiparkinsonian rats. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
21. Fujiwara K, Date I, Shingo T, Yoshida H, Kobayashi K, Ohmoto T. A glucocorticoid-inducible l-dopa and dopamine-producing PC12 cell line established by liposome-mediated transfection of human tyrosine hydroxylase gene: possible donor source for Parkinson's disease. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
22. Shingo T, Date I, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T. The transduction of GDNF gene by continuous injection of plasmid DNA-liposome complex prevents 6-OHDA-induced degeneration. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
23. Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T. Fate of grafted PC12 cells in the primate brain. 1999/08 7th International Meeting on Neural Transplantation and Repair.
24. 伊達 勲、小野田恵介、小野成紀、高橋健治、大本堯史 脳血管攣縮に対する遺伝子治療 1999/09 第9回脳血管シンポジウム
25. 伊達 勲、新郷哲郎、吉田秀行、藤原賢次郎、小林和樹、大本堯史 カプセル化遺伝子導入細胞の脳内移植によるパーキンソン病の治療 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会

26. 伊達 勲、徳永浩司、小野恭裕、富田 享、中嶋裕之、河内正光、田宮 隆、松本健五、大本堯史 内頸動脈上下垂体動脈分岐部(IC-SHA)動脈瘤に対する外科治療 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
27. 荻原浩太郎、Bermanke DH, Zubkov AY, Zhang JH, Parent AD, 伊達 勲、大本堯史 Fibroblast-populated collagen latticeに対するエンドセリン受容体拮抗薬の効果について 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
28. 河内正光、徳永浩司、小野恭裕、富田 享、伊達 勲、中嶋裕之、田宮 隆、松本健五、大本堯史 斜台部脊索腫に対する治療法の選択 999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
29. 高橋健治、伊達 勲、中島正明、佐藤元美、伊勢田恵一、大本堯史、浅利正二、二宮善文、濱田洋文 ラットくも膜下出血モデル脳血管へのアデノウイルスによる遺伝子導入ー肉眼的、組織学的検討ー 1999/10 第58回日本脳神経外科学会総会
30. 伊達 勲 パーキンソン病に対する神経移植再生療法 1999/11 千里ライフサイエンスシンポジウム「脳の幹細胞」

G. 知的所有権の取得状況

なし

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)を導入したトランスジェニックマウスを、それぞれ7系統および5系統作出した。これらのマウスおよびダブルトランスジェニックマウスにおける遺伝子発現解析行なった。

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ザ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7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。現在さらに系統数をふやすべく継続して実験を行なっている。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ーン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、両トランスジーン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）の作出をおこなった。実験動物の使用に際しては実験動物取り扱い規定を遵守した。

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. *Human Reprod*, 14: 1294-1298, 1999.
20. Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M and Kusanagi M: Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cell. *Exp Anim*, 48: 213-216, 1999.
2. Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J and Ogura A: Survival and subsequent in vitro development of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions. *J Assist Reprod Genet*, in press.
3. Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F and Matsuda J: Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, in

press.

4. Shi F, Mochida K, Ogura A, Matsuda J, Suzuki O, Watanabe G, Hutz RJ, Tsonis CG, Suzuki AK and Taya K: Follicle selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin a-subunit. *Life Science*, in press.

②. 学会発表

1. 持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎：スナネズミ初期胚の移植方法の検討とガラス化保存の影響。第46回日本実験動物学会総会1999年5月20-22日、市川。
2. 小倉淳郎、持田慶司、山本美江、野口洋子、黒沢重利、高野薫、野口章、中山一栄、松田潤一郎：マストミス(*Praomys coucha*)の精子細胞を用いた顕微受精と受精卵の胚盤胞への発生。第46回日本実験動物学会総会1999年5月20-22日、市川。
3. 野口章、持田慶司、小倉淳郎、大島章弘、長瀬裕美、山本美江、高野薫、種村健太郎、野口洋子、中山一栄、松田潤一郎：ヒトβ-ガラクトシダーゼ高発現トランスジェニックマウスの作成。第46回日本実験動物学会総会1999年5月20-22日、市川。
4. 長瀬裕美、持田慶司、中平美穂、野口章、山本美江、高野薫、野口洋子、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木義之：ヒト変異型β-ガラクトシダーゼ遺伝子導入によるβ-ガラクトシドーシスモデルマウス作成の試み。第16回日本疾患モデル学会総会1999年11月26,27日、大阪。
5. Suzuki O, Kurosawa S, Noguchi Y, Yamamoto Y, Mochida K, Matsuda J, Ogura A and Asano T. Superovulation and embryo transfer in the guinea pig. 26th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, January 8-12, 2000, Maastricht, The Netherlands.

G. 知的所有権の取得状況

該当無し。

分担研究報告書

多能性神経幹細胞の脳内移植法への応用に関する研究

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 齧歯類胎児および成熟個体神経組織より脳内細胞移植法の材料となる神経幹細胞を単離し、試験管内で増殖、分化させる技術を確認した。また、胎児および成熟個体由来の幹細胞の増殖能を、詳細に比較した。

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治療法として脳内細胞移植法は極めて有効な手法として期待されており、欧米を中心に精力的な研究が進められている。しかしながら、従来移植に用いられてきた胎児由来神経細胞、脳腫瘍由来細胞、非神経系の線維芽細胞などの細胞種は、充分な量の移植細胞が得られない、移植後の脳内生存率が低いなど、様々な問題点が指摘されている。本研究ではこの問題を解決するため、ニューロンおよびグリアの共通の前駆細胞である神経幹細胞を用いる可能性を追及している。本年度は、移植療法への応用の基盤として必須である、神経幹細胞を長期にわたり継代維持し、分化させる技術を開発することを目的とした。特に、移植ソースとしての可能性を探るため、胎児および成熟個体内の幹細胞の挙動について詳細に比較した。

B. 研究方法

神経変性疾患や脳虚血疾患のモデル動物として最も良く用いられているラットを用いた。胎児および成熟個体より神経幹細胞を分離・同定し、既に当研究室で確立したNeurosphere法を用いて試験管内培養した。この際、種々のペプチド因子の効果を検討した。また神経幹細胞の性質をより詳細に解析するために、神経幹細胞に由来した不死化細胞株を多数樹立した。以上の研究における実験動物の使用にあたっては、全て学内実験動物取扱規定を遵守して行った。

C/D. 研究結果と考察

胎児および成熟個体の神経組織の初代培養系を用いて、神経幹細胞の増殖を試験管内において効

率よく再現する培養条件を確認した。種々の増殖因子の効果を検討し、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子が神経幹細胞の自己複製能を強く促進することを見出した。この成果により、試験管内において神経幹細胞を継代・維持することが可能となった。また、培養幹細胞を増殖因子非存在下に分化誘導し、ニューロン、グリアへと分化させることが出来た。従来文献的に報告されている条件では、成熟個体由来の幹細胞の分化効率は数%と低かったのに対して、今回確立した培養条件では、長期培養した幹細胞よりニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを、それぞれ20-50%の高い効率で分化させることが可能となった。

細胞移植のソースとしての神経幹細胞を考えた場合、胎児および成熟個体由来細胞の挙動を比較する必要がある。今回確立した培養条件を用いて、この点を解析した。胎生11.5あるいは13.5日ラット胚由来の幹細胞は、培養開始後3週間程度までは高い増殖能を示し、その後増殖能は低下するものの、3カ月以上にわたって試験管内での維持が可能であった。これに対して、成体脳組織由来の幹細胞は、同一条件下でその増殖能は極端に低く、1カ月以上の維持は困難であった。成体幹細胞の長期維持のためには、さらに培養条件の工夫が必要と考えられた。

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、神経組織より幹細胞を選択的に単離し、試験管内で培養・維持する技術を確認した。今後さらに、成体幹細胞の長期維持のための培養条件の検討をおこない、移植ソースとして使用可

能とする技術開発が必要である。

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) Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-3924 (1999).

4) Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-C. Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Shh signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr. Biol.* 9, 1119-1122 (1999).

5) 神経幹細胞の分子生物学. 中福 雅人 神経研究の進歩 43巻, 863-870 (1999).

2. 学会発表

1) 脳の発生から再生へ：神経幹細胞の分子生物学

第22回日本分子生物学会ワークショップ(1999).

2) 神経幹細胞の分子生物学 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会ワークショップ(1999).

G. 知的所有権の取得状況

なし

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数）、刊行年月日	論文名	執筆者氏名
J Biol Chem 2000 Mar 3; 275 (9): 6404-6410	Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways.	Sakakibara A, Hattori S
J Biol Chem 1999 Oct 15; 274 (42): 29666-29671	Mouse semaphorin H induces PC12 cell neurite outgrowth activating Ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca(2+) influx.	Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y, Miyazaki N, Fujioka S, Sugimoto H, Amasaki M, Hattori S, Matsuya T, Inagaki S
Cell Mol Neurobiol 19: 67-78, 1999.	Neural transplantation for Parkinson's disease.	Date I, Ohmoto T
内科 83: 500-503, 1999.	パーキンソン病に対する新しい移植療法.	伊達 勲
ブレインナーシング 15: 1094-1099, 1999.	パーキンソン病に対する神経移植療法.	伊達 勲
カレントセラピー 17:1240-1243, 1999.	パーキンソン病に対する神経細胞移植.	伊達 勲
難病と在宅ケア 5: 8-11, 1999	パーキンソン病の最新治療情報：細胞脳内移植による治療法.	伊達 勲
Prog Med 19: 2619-2625, 1999.	パーキンソン病モデル動物に対するカプセル化ドパミン産生細胞脳内移植 ー霊長類での検討ー.	伊達 勲, 吉田秀行, 新郷哲郎, 藤原賢次郎, 小林和樹, 大本堯史
脳神経外科速報 9: 303-310, 1999	松果体部腫瘍へのアプローチ：infratentorial supracerebellar approach.	伊達 勲, 大本堯史
Prog Med 19: 589-595, 1999	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, 青井瑞穂, 吉田秀行, 藤原賢次郎, 大本堯史
in N. Dorsch (eds): Cerebral Vasospasm VI. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 36-39.	Quantitative and qualitative analysis of hemolysate-induced cerebral vasospasm in rats using corrosion cast technique,	Date I, Ono S, Takahashi K, Nakajima M, Onoda K, Ogihara K, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N
Cell Transplant 8: 427-430, 1999.	Evaluation of reaction of primate brain to grafted PC12 cells.	Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Miyoshi Y, Furuta T, Ohmoto T:

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数）、刊行年月日	論文名	執筆者氏名
Skull Base Surg 9: 65-70, 1999	A Giant thrombosed aneurysm of the petrous carotid artery presenting with cavernous sinus syndrome: Case report.	Date I, Sugiu K, Ohmoto T
中外医学社. 東京. 1999	"脳移植の最前線."	福田 淳, 伊達 勲
Molecular Medicine 36: 662-671, 1999	脳血管攣縮に対する遺伝子治療.	大本堯史, 小野成紀, 伊達 勲
in N. Dorsch (eds): Cerebral Vasospasm VI. Leichhardt, Australia, Oslington Consulting PTY LTD, 1999, pp. 86-88.	In vivo analysis of transcription factors in rat basilar artery with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage.	Ono S, Date I, Takahashi K, Nakajima M, Shiota T, Asari S, Ohmoto T, Ninomiya Y, Yabuno N
浅野孝雄, 太田 富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 308-312.	脳血管攣縮におけるspontaneous nitric oxide donor(FK409)の効果	中島正明, 伊達 勲, 高橋賢治, 佐藤元美, 二宮善文, 浅利正二, 大本堯史
浅野孝雄, 太田 富雄編集: 脳血管攣縮 Vol 14. 東京, 中外医学社, 1999, pp. 126-131.	血液存在下での血管平滑筋細胞、内皮細胞へのadenovirusによる遺伝子導入.	高橋賢治, 伊達 勲, 中島正明, 佐藤元美, 大本堯史, 二宮善文, 浅利正二, 濱田洋文
Human Reprod, 14:1294-1298, 1999.	Spermatid nuclei can support full term development after premature chromosome condensation within mature oocytes.	Ogura A, Inoue K and Matsuda J
Exp Anim, 48: 213-216, 1999.	Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cell.	Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M and Kusanagi M
J Assist Reprod Genet, in press.	Survival and subsequent in vitro development of hamster embryos after exposure to cryoprotectant solutions.	Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J and Ogura A
Biol Reprod, in press.	Production of male clone mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells.	Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi A, Takano K, Nagano R, Suzuki O, Lee J, Ishino F and Matsuda J

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数）、刊行年月日	論文名	執筆者氏名
Life Science, in press.	Follicle selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin α -subunit.	Shi F, Mochida K, Ogura A, Matsuda J, Suzuki O, Watanabe G, Hutz RJ, Tsonis CG, Suzuki AK and Taya K
Development 126, 443-456 (1999)	Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system.	Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M
J. Biol. Chem. 274, 8143-8152 (1999).	Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3.	Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S.
Development 126, 3915-3924 (1999).	Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.	Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C-C, Nakafuku M, Kondoh H.
Curr. Biol. 9, 1119-1122 (1999).	Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Shh signaling and alters the subcellular distribution of Gli1.	Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C-C.
神経研究の進歩 43巻, 863-870 (1999).	神経幹細胞の分子生物学.	中福雅人
実験医学 17巻, 2074-2081 (1999).	神経幹細胞の増殖と分化の分子機構.	中福雅人