

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究」

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成13年（2001年）4月

目 次

I. 総括研究報告書	
神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究 高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	1
II. 分担研究報告書	
1. 神経幹細胞の分化機構の解明 高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	3
2. 神経幹細胞の分離技術の開発 岡野 栄之 (大阪大学大学院医学系研究科)	4
3. 神経幹細胞の増殖・分化機構の解明 中福 雅人 (東京大学大学院医学系研究科)	5
4. 神経幹細胞を用いた神経再生・修復のための 基盤技術の開発 中村 俊 (国立精神・神経センター神経研究所)	6
5. 神経変性・再生モデル系における軸索・シナプスの 構造維持・修復機構の研究 和田 圭司 (国立精神・神経センター神経研究所)	7
6. 神経幹細胞の移植技術の開発に関する研究 伊達 勲 (岡山大学医学部)	9
7. ヒト胎児由来神経幹細胞に関する研究 高橋 淳 (京都大学大学院医学研究科)	10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

I . 総括研究報告書

神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究

主任研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター 代謝研究部長

研究要旨 研究初年度である本年度においては、以下のような研究成果を挙げる事ができた。1) Nestin-EGFP の発現を指標として、セルソーターを用い胎児あるいは成体脳から効率よく神経幹細胞を採取する技術を確認した。2) ラットあるいはマウス胎児脳の中のいかなる部位由来の神経幹細胞がドーパミン神経細胞に分化しやすいかにつき検討したところ、本来黒質ドーパミン神経細胞が発生する腹側中脳部位が最も適した部位であることが明らかとなった。3) 成体ラットの脊髄に損傷を与え、その周辺における神経幹細胞の挙動につき解析を加えた。その結果、成体ラット脊髄には従来提唱されていた中心管周囲ばかりでなく、外側の実質部にも多分化能を保持した神経幹細胞が多数残存していることが明らかとなった。4) ヒト胎児脳から神経幹細胞を分離培養することに成功した。

分担研究者

岡野栄之	大阪大学大学院医学系研究科 教授
中福雅人	東京大学大学院医学系研究科 助教授
中村 俊	国立精神・神経センター 部長
和田圭司	国立精神・神経センター 部長
伊達 勲	岡山大学医学部 講師
高橋 淳	京都大学大学院医学研究科 助手

する分子細胞生物学的理解を飛躍的に発展させ、神経変性疾患の中でも特にパーキンソン病への脳内移植による臨床応用へ向けた研究を展開することを目的とする。具体的には、1) 神経幹細胞の分離技術を開発・確立し、2) 神経幹細胞の増殖・分化機構を解明するとともに、3) ドーパミンニューロンへの分化誘導技術を開発する。更に、4) 神経幹細胞が形成する神経回路を検出する技術を開発し回路網の維持を図るとともに、5) 神経幹細胞の移植技術をサルを含む動物において確立することをめざす。

A. 研究目的

神経変性疾患の代表例であるパーキンソン病では、黒質ドーパミンニューロンが変性脱落することにより重篤な機能障害が生じることが知られている。このパーキンソン病の治療として胎児黒質ドーパミンニューロンの脳内移植が欧米を中心に行われているが、ドナー数の制限や倫理的問題もあり、更に治療効果にも限界があるのが現状である。

このような状況下で、ニューロンやグリア細胞の共通の前駆細胞である神経幹細胞を用いた脳内移植療法の開発が注目を集めつつある。最近の研究により、この神経幹細胞は胎児のみならず成体の脳内にも広く存在することが明らかとなった。胎児・成体より単離した幹細胞を移植することにより、パーキンソン病において失われた黒質一線条体神経回路網を再生させるという新規の治療法の開発が望まれる。しかしながら、これまでの研究では増殖、分化、特異性といった神経幹細胞そのものに関する基本的な理解がほとんどなされていないし、またモデル動物を用いた幹細胞の移植実験でも移植細胞の挙動あるいは宿主の応答等に関する十分な評価がなされない。

本研究ではこれらの点に鑑み、神経幹細胞に関

B. 研究方法

本年度の研究に関しては、主にラットおよびマウス脳由来の神経幹細胞を用い研究を進めたが、ヒト神経幹細胞を用いた研究は京都大学医学研究科における医の倫理委員会の承認によって行われた。下記に記載する個々の研究方法に関しては、添付した分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果および考察

本年度は神経幹細胞の分離技術の開発、神経幹細胞の分化機構の解明、神経幹細胞の生存維持機構の解明、さらにヒト胎児由来神経幹細胞の培養の試みなどの研究が開始され、以下のような特筆すべき成果を挙げる事ができた。

まず、胎児あるいは成体脳から効率よく神経幹細胞を採取する技術を確認した。神経幹細胞に特異的に発現するNestinのプロモーター下流にEGFPをつなぎ、トランスジェニックマウスを作製し、このマウス胎児脳の細胞を分散した後、EGFPの蛍光強度が高い細胞をセルソーターにて採取した。

この細胞を培養したところ、殆ど全ての細胞から Nestin を強く発現するニューロスフェアが形成されることが示された。このことは、Nestin-EGFP の発現を指標として、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞を同定・分離することが可能であるものと考えられた。

次に、上記分離技術を用いマウス胎児脳のいかなる部位由来の神経幹細胞がドーパミン神経細胞に分化しやすいかにつき検討したところ、本来黒質ドーパミン神経細胞が発生する腹側中脳部位から採取した神経幹細胞が最も効率よくドーパミン神経細胞に分化することが明らかとなった。本プロジェクトで最も重要な点は、神経幹細胞をいかにドーパミン神経細胞に分化させるかという点であるが、これに関しては現在転写因子や神経栄養因子による制御について検討を加えている。上記成果、すなわち本来黒質ドーパミン神経細胞が発生する腹側中脳部位由来の神経幹細胞がドーパミン神経細胞に分化しやすいという事実は、この研究課題を推進する上で大きな糸口を与えるものと考えられる。

一方、これまで成熟したラット、マウスの脊髄組織では神経幹細胞は存在するものの、その数は極めて少ないと言われてきた。このことを検証するため、成体ラットの脊髄に損傷を与え、その周辺における神経幹細胞の挙動につき解析を加えた。その結果、成体ラット脊髄には従来提唱されていた中心管周囲ばかりでなく、外側の実質部にも多分化能を保持した神経幹細胞が多数残存していることが明らかとなった。損傷脊髄組織で神経幹細胞が多数回収されるという事実は、正常組織においては神経幹細胞の分裂あるいは神経細胞への分化に対して何らかの阻害的要因が働いていることを考えさせ、今後それを克服することが一つの課題として挙げられる。さらに、今回の発見は成体の脊髄組織も神経幹細胞を採取できる組織として利用しうることを示すものである。

最後に、ヒト胎児脳由来神経幹細胞の分離培養を試みた結果、ラット由来神経幹細胞と形態学的に極めて類似した細胞が得られ、培養下で神経細胞およびグリア細胞への分化が確認された。但し、この実験は細胞のクローン解析ではない。従って、この細胞が幹細胞としての基準、すなわち多分化能と自己複製能を満たすかどうかは明らかではない。また、ドーパミン神経細胞への分化率は非常に低く、今後の課題となった。

D. 結論

ヒトパーキンソン病における神経幹細胞療法という新たな治療法を確立することを目標に研究を

開始し、本年度においては主にラット、マウスの脳を用い神経幹細胞の分離技術の確立、脊髄組織における神経幹細胞の動態、ドーパミン神経細胞へ分化しやすい神経幹細胞の脳内分布、さらにはヒト神経幹細胞の分離培養などにつき、大きな成果を挙げることに成功した。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

Machide, M., Kamitori, K. and Kohsaka, S.: Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase C γ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase, SHP-1 in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31392-31398

Roy, N.S., Wang, S., Jiang, L., Kang J., Restelli, C., Fraser, R.A.R., Couldwell, W.T., Kawaguchi, A., Okano, H. Nedergaard, M. and Goldman, S.A.: In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 6, 271-278 (2000)

Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Olig family of basic helix-loop-helix factors includes Olig1 and Olig2 implicated in oligodendrogenesis and the third paralogous gene, Olig3. *Mech. of Dev.* 99, 143-148 (2000)

Inoue Takayoshi, Nakamura Shun, and Osumi Noriko. Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Developmental Biology*, 219, 373-383, 2000

Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. and Wada, K., Modification of glial-neuronal interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron*, 26, 533-541, 2000

Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T: Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease: long-term primate study. *Cell Transplantation* 9: 705-709, 2000

Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, Koyano K, Hashimoto N. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro. *Exp Neurol.* 165:66-76 (2000).

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

II. 分担研究報告書

神経幹細胞の分化機構の解明

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経センター 代謝研究部長

研究要旨 ゼブラフィッシュのミュータント解析から、ドーパミンニューロンへの分化に関わると考えられている DSIF (p160) の哺乳動物神経系における発現を解析した。神経系では DSIF は発達とともに増加し、ドーパミンニューロンを含む様々な成熟したニューロンに高く発現していることが明らかになった。

A. 研究目的

神経幹細胞を用いたパーキンソン病に対する治療法の開発には、神経幹細胞がドーパミンニューロンへ分化する分子機構を理解することが必須である。本研究の目的は、まだ明らかになっていない神経幹細胞からドーパミンニューロンへの分化機構を明らかにすることである。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュのミュータント解析によって、ドーパミンニューロンが選択的に欠失する Foggy が報告された。このミュータントの原因分子は、哺乳動物で転写伸長反応を制御する分子の一つとして知られていた DSIF(p160)であった。神経系における DSIF の発現解析は全く報告がなく、神経幹細胞の増殖・分化における役割も全く分かっていない。我々は DSIF の中枢神経系における役割を明らかにするために、ノーザン・ブロット法、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、マウス胎児の神経発生に伴う DSIF の発現解析を行った。実験対象としてはマウスを用い、全ての実験操作は深麻酔下で施行し動物愛護に配慮した。

C. 研究結果

DSIF mRNA の発現量をノーザン・ブロット法を用いて解析したところ、DSIF は発生の初期から神経系に発現し、発生に伴って DSIF mRNA の発現量が増加することが明らかになった。更に、*in situ* ハイブリダイゼーションによる解析で DSIF は黒質ドーパミンニューロンを含む、様々な成熟したニューロンに高く発現していることが明らかになった。

D. 考察

これまで Pax や Hes 遺伝子の解析によって、神経系の分化が転写調節因子によって制御されていることが明らかにされてきた。一方、転写伸長反応は組織・細胞レベルでの特異性について、従来ほとんど解析されていなかった。転写伸長反応の調節因子として DSIF が神経系、特にニューロンに高い発現を示しているという結果は、今後、神経分化・神経生存機構に転写伸長反応が関わっている可能性を示唆するもので、きわめて興味深い。

E. 結論

ゼブラフィッシュの Foggy ミュータントの原因分子として明らかにされた、哺乳動物の転写伸長反応を調節する DSIF は、マウスの発生とともにドーパミンニューロンを含む様々なニューロンに高い発現を示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y. and Kohsaka, S.: Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell. Sci.* 113 (2000) 3073-3084

Machide, M., Kamitori, K. and Kohsaka, S.: Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase C γ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase, SHP-1 in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31392-31398

Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K. and Kohsaka, S.: Extracellular ATP or ADP induces chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* (2001) in press

2. 学会発表

今井嘉紀、大澤圭子、金澤裕子、佐々木洋、高坂新一：ミクログリアの活性化における Iba-1 の機能解析 第 73 回日本薬理学会年会シンポジウム「ミクログリアと脳機能」、横浜、3.23, 2000

神鳥和代、町出 充、富田一彦、中福雅人、高坂新一：レセプター型チロシンキナーゼ RYK の細胞種特異的発現 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会、横浜、9.5, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

神経幹細胞の分離技術の開発

分担研究者 岡野 栄之 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 Nestin 遺伝子のエンハンサーの制御下で green fluorescent protein を発現するトランスジェニックマウスを用いて神経幹細胞を生きのまま同定・分離する方法を確立した。

A. 研究目的

神経幹細胞を生きのまま同定・分離する方法を確立する。

B. 研究方法

ラット Nestin 遺伝子の第2イントロンの下流に enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA を連結した Nestin-EGFP を用いてトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの神経組織より EGFP 強陽性の細胞をセルソーターによって分離し、その性質を浮遊培養系を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本報告書の内容にはヒトを用いた研究は含まれない。マウスを用いた研究は、大阪大学動物実験指針に従って行われた。

C. 研究結果

EGFP 強陽性の細胞集団（約10%）をセルソーターを用いて分離し、EGF 及び bFGF を含む培地中で培養したところ、効率よく増殖して球状の細胞塊（neurosphere）を形成した。この neurosphere を増殖因子を含まない培地中で培養し分化を誘導した後、細胞種特異的なマーカー蛋白質の発現を調べたところ、一つの細胞に由来するクローンの中にニューロン・アストロサイト・オリゴデンドロサイトが分化したことが確認された。この neurosphere は分化能を維持したまま繰り返し継代することが可能であった。

D. 考察

上記の結果から、Nestin-EGFP の発現を指標として、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞を同定・分離することが可能であるものと考えられた。

E. 結論

Nestin-EGFP マウスは、神経幹細胞の研究において非常に有用な材料である。また、この技

術は神経変性疾患の移植治療に用いるドナー細胞の開発に役立つことが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi, A., Miyata, T., Sawamoto, K., Takashita, N., Murayama, A., Akamatsu, W., Ogawa, M., Okabe, M., Tano, Y., Goldman, S.A. and Okano, H. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 17: 259-273, 2001.

Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. and Okano, H.: The bHLH gene Hes1 as a repressor of neuronal commitment of the CNS stem cells. *J. Neurosci.* 20: 283-293, 2000.

Roy, N.S., Wang, S., Jiang, L., Kang J., Restelli, C., Fraser, R.A.R., Couldwell, W.T., Kawaguchi, A., Okano, H. Nedergaard, M. and Goldman, S.A.: In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 6: 271-278, 2000.

他 23 篇

2. 学会発表

岡野 栄之、川口 綾乃、澤本 和延、島崎 琢也、宮田 卓樹：神経幹細胞の同定法の確立と分化制御機構 第43回 神経化学会シンポジウム 2000年10月18日（金沢）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

現在出願中（3件）、出願準備中（2件）

2. 実用新案登録 特になし

神経幹細胞の増殖・分化機構の解明

分担研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：成体ラット脊髄に内在する神経幹細胞・前駆細胞について、その性質を分子レベルで詳細に解析した。その結果、成体脊髄内の神経前駆細胞が、培養下および個体内で胎児由来細胞と同様に多くの転写制御因子を特異的に発現することが明らかになった。

A. 研究目的

近年、成体神経組織内に神経幹細胞・前駆細胞が存在することが明らかとなり、再生医学の点から注目を集めている。損傷組織の再生・修復には、前駆細胞を移植する手法とともに、内在前駆細胞の活性化によって組織の再生能を高める手法が考えられる。いずれの場合も、成体幹細胞・前駆細胞の性質を明らかにすることが不可欠であるが、従来の研究では多くの点が不明のままであった。本研究では、成体ラット脊髄に内在する神経前駆細胞の性質を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

成熟ラットの脊髄より神経前駆細胞を単離し、Neurosphere法を用いて培養した。成体前駆細胞に発現する分化制御因子群について、胎児由来細胞と比較した。また、胸髄レベルで脊髄を完全切断した損傷モデルを作製し、内在性の神経前駆細胞の挙動を、種々の分子マーカーを用いた組織染色により解析した。以上の実験動物の使用にあたっては、学内実験動物取扱い規定を遵守した。

C. 研究結果

成体脊髄組織に内在する神経前駆細胞の増殖、分化を効率よく再現する初代培養系を確立した。成体前駆細胞は約8週間にわたって増殖能を維持し、またニューロン、グリアへの分化能を保持していた。また、特異抗体を用いた免疫染色により、胎児脊髄由来の前駆細胞と同様に、その増殖・分化の過程で多くのホメオドメイン型 (Pax6, Pax7, Nkx2.2, Prox1) ならびにbHLH型 (Mash1, Ngn2, NeuroD1, Olig2) の転写因子を特異的に発現することが明らかとなった。

次に、胸髄切断モデルラットを用いた個体レベルでの解析を行った。損傷脊髄内では、実質に存在する多数の前駆細胞が反応性に増殖していた。これらの細胞は、前駆細胞の特異的分子マーカーであるネスチンおよび転写因子Pax6, Pax7, Nkx2.2を一過的に発現することが明らかとなった。しかし、損傷組織内でのbHLH型転写因子の発現は検出されず、またニューロンの新生を示す所見も得られなかった。

D. 考察

成体脊髄内に内在する神経前駆細胞は、胎児由来前駆細胞と多くの共通した転写制御因子を発現していることから、その増殖、分化の制御には、発生期と同様の機構が働いていることが強く示唆された。さらに組織内では、損傷に反応して神経前駆細胞が

増殖し、また特異的な転写因子を発現することから、内在性の前駆細胞は組織の修復機構に関与することが示唆された。しかし、これら前駆細胞は培養下にはニューロンへと分化する能力を持つにも関わらず、生体内ではニューロンの新生は観察されなかった。従って、損傷組織の外界環境は神経前駆細胞のニューロン分化に対して阻害的に働いており、このことが損傷脊髄の再生能が低い要因となっていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

E. 結論

成体脊髄内の神経前駆細胞は、胎児由来細胞と同様の分子機構によって制御されていることが示唆された。今後は生体内で前駆細胞からのニューロン新生を阻害している環境要因を明らかにし、それを克服することによって、成体神経組織の再生能を高める手法の開発に繋げていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Olig family of basic helix-loop-helix factors includes Olig1 and Olig2 implicated in oligodendrogenesis and the third paralogous gene, Olig3. *Mech. of Dev.* 99, 143-148 (2000).
- 2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 3) Yamamoto S, Nagao M, Kitamura T, Nakatomi H, Sugimori M, Kosako H, Yamamoto N, Takebayashi H, Yoshida S, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. Molecular property and regenerative potential of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 4) 中福雅人 神経幹細胞-脳の再生医学への応用脳神経外科の最先端NO.2 先端医療技術研究所, 192-199 (2000).

2. 学会発表

- 1) 中福雅人 脳神経系の幹細胞とその分化制御 第63回日本生化学会シンポジウム (2000)
- 2) 中福雅人 脳の発生から再生へー神経幹細胞の分子生物学 第43回日本神経化学会シンポジウム (2000)

H. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

「神経幹細胞を用いた神経再生・修復のための基盤技術の開発」

分担研究者 中村 俊 国立精神・神経センター 診断研究部長

研究要旨 初期胚の中脳腹側から単離した神経上皮細胞を培養条件下にドパミンニューロンに分化させる条件を検討した。さらにドパミンニューロンを効率よく単離するために蛍光性のレポーターをドパミンニューロン特異的に発現したトランスジェニックマウスの作製を開始した。

A. 研究目的

神経幹細胞を用いた神経再生医療を実現するために解決すべき技術的な課題の一つは成体の脳に移植された細胞の生存維持及び分化能を大幅に改善すること、さらに移植細胞が単なる神経伝達物質を補充するにとどまらず機能的な神経回路を再建するための効率的な方法を開発することである。我々はこの課題にこたえるためにパーキンソン病の動物モデルをもちいて基盤技術の開発を行う。

B. 研究方法

中脳腹側領域の神経幹細胞からドパミンニューロンが発生する過程を機能解剖学的に解析し、その発生系譜を制御する細胞自律的および非自律的な因子を同定する。このとき線条体ニューロンとのトロフィックな相互作用に着目して解析を行う。(倫理面への配慮)全ての動物実験は国立精神・神経センター動物倫理規定に基づいて行われた。

C. 研究成果

培養条件下に神経幹細胞からドパミンニューロンを分化させる条件について検討した。さらに移植された細胞を無侵襲的にトレースするためのレポーターの開発を進めた。

D. 考察

作製中のトランスジェニックマウスはイムノトキシンによってドパミンニューロンを除去できるようにも設計されている。これは現在

パーキンソン病モデルに用いられている 6-HDOPA による細胞損傷に比べ短時間でより完全な細胞除去が可能であるため、神経再生のより厳しい基準を設定する事が出来るものと期待される。

E. 結論

中脳腹側部から単離された細胞はbFGF, Shh, FGF-8, laminin 存在下に増殖を続けるが、一定期間の培養後に laminin 以外の因子を除去すると TH 陽性のドパミンニューロンに分化した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. Itami et al.: Brain-derived neurotrophic factor requirement for activity-dependent maturation of glutamatergic synapse in developing mouse somatosensory cortex. *Brain Research*, **857**, 141-150, 2000
2. Inoue et al.: Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Developmental Biology*, **219**, 373-383, 2000
3. Ishii et al.: Demarcation of early mammalian cortical development by differential expression of fringe genes. *Developmental Brain Research*, **119**, 307-320, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

神経変性・再生モデル系における軸索・シナプスの構造維持・修復機構の研究
分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

パーキンソン病に対する神経幹細胞を用いた移植細胞療法の技術開発に向けて神経細胞の軸索・シナプスの構造維持・修復機構解明を目指した基礎的レベルでの研究を行った。神経軸索変性モデルならびに神経再生モデル系を用いた研究からユビキチン・プロテアソーム系分子 UCH-L1 が軸索の維持・修復に重要な役割を担っており、また新規メタロプロテアーゼ分子 DINE が酸化ストレスによる抗アポトーシス活性を有すること、逆に軸索に局在する AIGP ファミリー分子はアポトーシスを促進する働きを有することが明らかとなった。一方これら研究の過程で移植神経細胞の動態とその安全性を分子レベルで評価する為の移植細胞を単一細胞レベルで解析する為の技術開発へ役立つ知見も得られた。

A. 研究目的

神経幹細胞を用いたパーキンソン病の治療のための技術開発には移植神経細胞の生着率を上昇させホストの標的神経細胞へ軸索伸長を行わせ移植ホストとの機能的な神経回路の連携を確立させることが必要となる。そのため神経ネットワークの維持・修復の分子機構を明かにしたうえでネットワーク形成を人為的に制御するための基幹技術を開発する事が重要となる。そこで神経軸索変性モデル系ならびに神経軸索切断再生モデル系を用いて神経シナプスや軸索の構造を正常に維持・修復する機構を基礎的レベルから解明する事を目的に研究を行った。また移植神経細胞の動態とその安全性を分子レベルで評価する系の樹立に関しても移植神経細胞を単一細胞レベルで遺伝子発現解析する為の技術開発を目指して研究を進めた。

B. 研究方法

神経軸索変性モデルである gad マウス (gracile axonal dystrophy mouse) を用いて初代神経細胞培養ならびに後根神経節組織のコラーゲンゲル三次元培養系による軸索伸長の解析をおこなった。またコラーゲンゲル三次元培養系の後根神経節組織における軸索伸長関連分子群の遺伝子発現解析ならびにクラスター解析は 96 穴型定量的蛍光 PCR 装置によって SYBR Green 蛍光色素を用いたハイスループットスクリーニング系でおこなった。一方、神経再生関連

遺伝子のスクリーニングは Wister ラットを用いて舌下神経の片側切断術を行い differential display PCR 法により行った。新規神経再生関連分子の機能解析は PC12 細胞株や COS7 細胞株を実験系として遺伝子導入法やリコンビナント分子を用いておこなった。(倫理面への配慮)

本研究における動物実験はすべて米国の NIH(National Institutes of Health)の実験動物利用に関するガイドラインに従いに実験動物に対する動物愛護に配慮した上で行った。

C. 研究結果

神経軸索の維持・修復に異常を有する gad マウスは逆行性軸索変性モデルマウスでもありユビキチン・プロテアソーム系分子 UCH-L1 の欠失がその遺伝的要因である。gad マウスの初代神経細胞培養系を用い軸索伸長、各種ストレス応答性ならびに神経栄養因子応答性を解析したが正常マウスから得た神経細胞に比較して有為な差違は認められなかった。しかし、さらに後根神経節組織のコラーゲンゲル三次元培養系において検討を行ったところ、gad マウス由来の後根神経節組織からの軸索再伸長能の低下が見いだされた。さらに gad マウスの後根神経節組織における分子マーカーの発現解析を行ったところ複数の神経再生関連遺伝子の発現低下が見いだされた。

一方、神経軸索切断再生実験系を用いて研究を進めた結果、軸索切断後に発現誘導される分子として

新規メタロプロテアーゼ DINE を同定した。DINE は SOD (superoxide dismutase) 酵素群を誘導し酸化ストレスに対する抗アポトーシス活性を有することが明かとなった。また軸索に局在する新規膜蛋白質 AIGP ファミリーがアポトーシスのシグナル伝達系において中心的な役割を担うカスパーゼの軸索におけるターゲット分子であることが明かとなった。

これらの研究にと並行して移植神経細胞の動態とその安全性を分子レベルで評価する為の移植細胞の遺伝子発現解析系確立に向けて、96 穴型定量的蛍光 PCR 装置によって Sybr Green 蛍光色素を用いることでハイスループットでマーカー分子の動態解析を行う評価系を作成した。

D. 考察

gad マウスの解析から UCH-L1 が軸索の伸長・維持に重要な役割を担っており神経再生関連遺伝子の正常な発現を制御するメカニズムへ関与する可能性が示唆された。最近ヒト UCH-L1 はドイツの家族性パーキンソン病の原因遺伝子であることを示唆する報告がなされており、本研究課題で取り扱うドーパミン産生神経細胞の軸索伸長や維持においても UCH-L1 は重要な役割を担っていることが考えられる。今後は UCH-L1 とドーパミン産生神経細胞の分化や軸索伸長における生理的役割に関しても検討を加えることでパーキンソン病に対する神経幹細胞を用いた移植細胞療法の技術開発に貢献することも可能であると考えている。一方、神経再生実験系から同定されてくる分子群はいずれも神経の生存維持や軸索の伸長ならびに回路形成の過程で重要な役割を担った分子群であり、移植神経細胞の生着率を上昇させホストの標的神経細胞へ軸索伸長を行わせ機能的な神経回路網を確立させることに役立つことが期待されるとともに、移植神経細胞の動態とその安全性を分子レベルで評価する為の分子マーカーとしても利用出来ると考えられる。

E. 結論

本研究課題で行った軸索・シナプスの構造維持・修復機構解明を目指した基礎的レベルでの研究は、今後神経幹細胞から分化誘導することで供給される神経細胞の移植後の生存維持や軸索の伸長ならびに回路形成において役立つと考えられる。さらに本研究からは移植神経細胞の動態とその安全性を分子レベルで評価する為の技術開発へ繋がる知見も得られた。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K. and Kiyama, H., Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metalloproteinase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 97, 4345-4350, 2000.

Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. and Wada, K., Modification of glial-neuronal interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. Neuron, 26, 533-541, 2000.

Wang, Y.L., Saigoh, K., Osaka, H., Yamanishi, T., Suh, J.G., Kiyosawa, H., Sakai, Y., Wakana, S. and Wada, K., A YAC/BAC-based physical and transcript mapping around the gracile axonal dystrophy (*gad*) locus identifies *Uchl1*, *Pmx2b*, *Atp3a2*, and *Hip2* genes. Genomics, 66, 333-336, 2000.

2. 学会発表

和田圭司、ユビキチンシステムと神経変性、文部省特定領域研究「神経細胞死制御」夏のワークショップ、軽井沢、6.28, 2000

Wada K, Wang, YL, Saigoh K, Aoki S, Osawa Y, Li H, Takizawa S, Sakurai M, Hara Y, Osaka H, Kikuchi T, THE *gad* MOUSE: A USEFUL MODEL FOR INVESTIGATING NEURO-DEGENERATION AND REGENERATION、第 4 回日独共同ワークショップ、箱根、9.27, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

分担研究報告書

神経幹細胞の移植技術の開発に関する研究

分担研究者 伊達 勲 岡山大学医学部脳神経外科講師

研究要旨 細胞の脳内移植に際して、高分子半透膜製のカプセルに封入して移植することにより、宿主による免疫学的拒絶反応を抑制し、移植細胞の腫瘍化を制御できることが明らかとなった。

A. 研究目的

細胞を脳内に移植するにあたって、ドナーとなる細胞に対する宿主の免疫学的拒絶反応を抑制し、さらに移植細胞の腫瘍化を制御することが必要である。高分子半透膜製のカプセルに細胞を封入して脳内移植を行なう方法の有用性を検討する。

B. 研究方法

高分子半透膜は人工透析に用いられているポリスルホン製の中空糸を使用し、内径1.1mm、長さ7-12mmのカプセルを作成した。移植ドナー細胞株には、ドパミン産生細胞株(PC12細胞)、GDNF産生細胞株(BHK細胞に遺伝子導入して作成)を用い、上記カプセルに細胞株を封入後、宿主線条体に移植を行なった。宿主はラットで、一側の黒質線条体ドパミン系を6-hydroxydopamineで破壊したパーキンソン病モデルを用いた。実験に際しては、実験動物に対する十分な動物愛護上の配慮をした。

C. 研究結果

移植されたカプセルからはドパミン、GDNFとも安定して産生され、組織学的にも良好なドナー細胞の生着が確認された。宿主のパーキンソン病症状は改善され、その効果は6カ月ないし1年の長期にわたって観察された。宿主脳内に免疫学的拒絶反応や、移植細胞の腫瘍化などは観察されなかった。

D. 考察

分子生物学的手法の発達により、種々の神経伝達物質や神経栄養因子を産生する細胞株を作成することが可能になっている。これらの細胞を脳内移植のドナーとして用いるために、新しい方法として、細胞を高分子半透膜

製のカプセルに封入した後に脳内移植する方法を試みた。この方法では、免疫抑制剤の投与なしに異系移植あるいは異種移植が可能となり、ドナー細胞の選択の範囲が大いに広がることが期待される。

E. 結論

カプセル化神経伝達物質・神経栄養因子産生細胞脳内移植は、パーキンソン病モデル動物の治療法として有用であり、安全性も備えていることから将来の臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Date I, et al. : Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease. *Cell Transplantation* 9: 705-709, 2000.

Aoi M, Date I, et al. : The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Res* 36: 319-325, 2000.

Aoi M, Date I, et al. : GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Acta Neurochir* 142: 805-810, 2000.

2. 学会発表

伊達 勲ら：第8回細胞療法研究会、2000年4月、京都

伊達 勲ら：第1回日本分子脳神経外科研究会、2000年9月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

ヒト胎児由来神経幹細胞に関する研究

分担研究者 高橋 淳 京都大学大学院医学研究科 脳神経外科

研究要旨：ヒト胎児脳から神経幹細胞が分離・培養可能であり、ニューロン、グリアへの分化が *in vitro* でみられること、ラット脳への移植後の生着がみられることが明らかになった。

A. 研究目的

神経幹細胞を用いた移植治療の臨床応用に向け、ヒト胎児からの神経幹細胞分離の可否を確認すること、その分化能、移植後の生着・分化を確認することを目的として、以下の実験をおこなった。

B. 研究方法

自然流産あるいは法的に認められた理由での人工妊娠中絶術で得られた胎児（8～12週齢未満）の脳組織を酵素処理したのち機械的に分散し、通常の培養皿で培養した。培地はbFGFとEGFを含む無血清培地を用いた。分化実験では、培地からbFGFとEGFを除去した。約2週間後、免疫染色でニューロンやグリアへの分化を検討した。また、移植実験では免疫抑制剤を投与したラット脳（線条体）にGFPラベルした神経幹細胞を移植し、1、2週後に脳切片の免疫染色をおこなった。

（倫理面への配慮）

京都大学医学研究科医の倫理委員会から人工妊娠中絶で得られる胎児の脳を培養・移植研究に用いることの承認を得た。そして、十分なインフォームドコンセントによって患者さんの了承を得た後に実験を行った。

C. 研究結果

ヒト胎児脳からはラット由来と形態的に類似した神経幹細胞が得られ、*in vitro* ではニューロン、アストロサイトへの分化が確認された。ニューロンのタイプではGABA陽性、Glutamate陽性、TH陽性の細胞が確認されている。ラット脳への移植では、すくなくと

も2週目までは良好な生着や神経突起様の形態変化がみられたが、明らかなニューロンやアストロサイトへの分化は認められなかった。

D. 考察

ヒト胎児脳からも神経幹細胞様の細胞が得られた。ただし、この実験は細胞のクローン解析ではない。したがって、この細胞が幹細胞としての基準、すなわち、多分化能と自己複製能を満たすかどうかは明らかではない。また、TH陽性ニューロンへの分化率は非常に低い。ドーパミン作動性ニューロンへの分化制御が重要な課題となる。

E. 結論

まだ解明すべき点は多々あるが、胎児脳由来の細胞が長期にわたって増殖する能力を持ち、その中にニューロンやグリアに分化する細胞が含まれていることは、この細胞が移植治療に利用できる可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

ヒト神経幹細胞における転写因子、神経伝達物質発現の検討（神経組織の成長・再生・移植研究会第15会学術集会、2000年6月10日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 高坂 新一

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
内田耕一 高坂新一	神経移植の基本概念	三木直正 野村靖幸	廣川ニューロサイエンス 3巻、新しい神経伝達研究法II	(株)廣川書店	東京	2000	22-28

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fernando L.-Redondo et al.	Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy.	Mol. Brain Res.	76	429-435	2000
Ohsawa, K. et al.	Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia.	J. Cell. Sci.	113	3073-3084	2000
Machide, M. et al.	Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase C γ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase, SHP-1 in astrocytes.	J. Biol. Chem.	113	31392-31398	2000

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 大阪大学大学院医学系研究科

氏名 岡野 栄之

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Okano, H. et al.	Isolation and self-renewal of neural stem cells.	Sakuragawa, N.	Proceeding of Ineternational workshop: Stem cell Biology and Molecular Treatment	National Center of Neurology and Psychiatry	Tokyo	2000	55-68
Okano, H. et al.	Regulatory mechanisms for the differentiation of neural stem cells.	Ikada, Y. and Oshima, Y.	5th International Symposium on Tissue Engineering for Therapeutic Use	Elsevier Science B.V.	Amsterdam		in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura, Y. et al.	The bHLH gene Hes1 as a repressor of neuronal commitment of the CNS stem cells.	J. Neurosci.	20	283-293	2000
Roy, N.S. et al.	In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus.	Nature Medicine	6	271-278	2000
Kawaguchi, A. et al.	Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells.	Mol. Cell. Neurosci.	17	256-273	2001

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 東京大学大学院医学系研究科

氏 名 中福 雅人

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中福雅人	神経幹細胞— 脳の再生医学 への応用	高倉公明	脳神経外科の 最先端 No. 2	先端医療 技術研究所	東京	2000	192-199

雑誌

発表者氏名	論 文 タ イ ト ル 名	発表誌名	巻 号	ペ ー ジ	出版年
Takebayashi H. et al.	Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3.	Mech. of Dev.	99	143-148	2000

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏 名 中村 俊

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itami C. et al.	Brain-derived neurotrophic factor requirement for activity-dependent maturation of glutamatergic synapse in developing mouse somatosensory cortex.	Brain Res.	857	141-150	2000
Inoue T. et al.	Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate.	Dev. Biol.	219	373-383	2000
Ishii Y. et al.	Demarcation of early mammalian cortical development by differential expression of fringe genes.	Dev. Brain Res.	119	307-320	2000

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経センター

氏名 和田 圭司

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kiryu-Seo, S. et al.	Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers.	Proc. Natl. Aca. Sci. USA	97	4345-4350	2000
Harada, T. et al.	Modification of glial-neuronal interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration	Neuron	26	533-541	2000
Wang, Y.L. et al.	YAC/BAC-based physical and transcript mapping around the gracile axonal dystrophy (<i>gad</i>) locus identifies <i>Uchl1</i> , <i>Pmx2b</i> , <i>Atp3a2</i> , and <i>Hip2</i> genes.	Genomics	66	333-336	2000