

200/048/

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成14年（2002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（慶應義塾大学医学系研究科）	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. 新しい神経幹細胞の増殖・分化制御系の 開発を目指した研究 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）	8
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）	9

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 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)チロシン水酸化酵素 (TH) のプロモータ下に EGFP をつないだ遺伝子によるトランスジェニックマウスを作製し、その脳よりセルソーターを用いTH陽性のドーパミン神経細胞の分離に成功した。2)TH-EGFP のプラスミドをマウス ES 細胞に導入し、SDIA 法により神経細胞およびドーパミン神経細胞への分化、分離に成功した。3)脊髄損傷ラット実質内で *ngn2* を強制発現させることにより、内在性の神経幹細胞を賦活化させるとともに神経細胞へ分化させることに成功した。4)ラット初代培養系、およびスライスカルチャー系を用い神経幹細胞の分裂増殖ならびに分化にNDA受容体が機能していることを明らかにした。5)ヒト胎児脳由来神経幹細胞を培養し、その分化を検討した結果約20%が神経細胞に、さらにその内の1%がドーパミン神経細胞に分化することを明らかにした。6)神経幹細胞に発現するG蛋白質共役型受容体スクリーニングを試みたところ新しいG蛋白質共役型受容体を同定することに成功した。7)発生期のドーパミン神経細胞に関する形態学的解析を行った結果、DA 神経細胞はまず、淡蒼球の原基である medial ganglionic eminence(MGE) に投射すること、そこでのトロフィックな相互作用により、線条体神経細胞が分化することが示された。

分担研究者

岡野栄之	慶應義塾大学医学部 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

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。

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、さらにヒト胎児由来神経幹細胞の培養などのテーマにつき以下のような成

果を挙げることができた。

まず、神経幹細胞の分離に関しては、1) チロシン水酸化酵素 (TH) のプロモーター下に EGFP をつないだ遺伝子のトランスジェニックマウスを用い、昨年度報告したセルソーターを用いた細胞分離法により、TH 陽性のドーパミン神経細胞を効率よく採取することが可能となった。さらに、2) 前述の TH-EGFP のプラスミドをマウス ES 細胞に導入した後、基質細胞の培養上清を添加することにより神経細胞へ分化させ、セルソーターを用いて TH 陽性のドーパミン神経細胞を単離することにも成功した。

内在性の神経幹細胞の分化機構の解明に関しては、1) 成体のラット脊髄に損傷を加えた場合、内在性の神経幹細胞が賦活化され分裂増殖するものの神経細胞への分化は抑制されることを昨年度報告し、この現象には Notch のシグナル下に細胞内の神経細胞への分化に重要なニューロジェニン (ngn) 2 の発現が抑制されている可能性を示唆した。本年度は脊髄損傷ラット実質内に ngn2 発現ウイルスベクターを注入し神経幹細胞から神経細胞への産生を検討した。この結果、ngn2 を強制発現した脊髄においては分裂する内在性の神経幹細胞から神経細胞の新生が起こることを明らかにした。さらに 2) 神経幹細胞の分化増殖における NMDA 受容体の役割についても検討を加える目的で、ラット初代培養神経幹細胞を NMDA 受容体のアンタゴニストである APV 存在下で培養した。APV 存在下では神経幹細胞の分裂が著明に亢進し、ネスチン陽性細胞の数が増加した。一方、胎児期ラット脳のスライス標本の培養においても同様の実験を行い、APV 存在下では内在性の神経幹細胞の分裂が促進されていることを明らかにした。これらのことは神経幹細胞の分裂増殖に NMDA 受容体が機能していることを意味する。

一方、神経幹細胞の分化に重要な役割を担う G 蛋白共役型受容体の同定を目指し、Laser Capture Microdissection 法を用い、成熟マウス脳内の神経幹細胞由来の特異的 cDNA プールを作製することに成功した。現在のところ、このプールから新たな G 蛋白共役型受容体の同定に成功している。さらにこれら受容体のリガンドを検索するため分子モデリングとコンピュータシミュレーションによる非ペプチド性のリガンドのスクリーニング系の開発をおこなった。

ヒト由来神経幹細胞の性質を検討するため、京都大学医学部の倫理委員会の承諾を得、胎児脳の培養を行い neurosphere を得た。50 日後に分化誘導を行ったところ、約 20% が MAP2 陽性のニューロンに、また約 7% が GFAP 陽性のアストロサイ

トに分化することが明らかとなった。このニューロンの多くは GABA 陽性であったが、1% 程度がドーパミンニューロンに分化することが示された。これらの細胞移植による機能再生が期待される。

#### D. 健康危険情報

特になし。

#### E. 研究発表

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  $G_{i/o}$ -coupled P2Y receptors. *J. Neurosci* 21:1975-1982 (2000)

Sawamoto, K. Nakao, N. Kobayashi, K. Matsushita, N. Takahashi, H. Kakishita, K. Yamamoto, A. Yoshizawa T. Terashima, T. Murakami, F. Itakura, T. and Okano, H.

Visualization direct isolation and transplantation of midbrain dopaminergic neurons GFP. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6423-6428 (2001)

Yamamoto, S. Nagao, M. Sugimori, M. Kosako, H. Nakatomi, H. Yamamoto, N. Takebayashi, H. Nabeshima, Y. Kitamura, T. Weinmaster, G. Nakamura, K. and Nakafuku, M.

Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21:9814-9823 (2001)

Inoue, T. Tanaka, T. Takeichi, M. Chisaka, O. Nakamura, S. and Osumi, N.

Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development. *Development* 128:561-569 (2001)

Kurihara, L.J. Kikuchi, T. Wada, K. and Tilghman, S.M.

Loss of Uchl1 and Uchl3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum. Mol. Genet.* 10:1963-1970 (2001)

Date, I. Shingo, T. Yoshida, H. Fujiwara, K. Kobayashi, K.

Takeuchi, A. and Ohmoto, T.

Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats *Cell Transplant* 10(4):397-401 (2001)

Wu S. Suzuki, Y. Kitada, M. Kitaura, M. Kataoka, K. Takahashi, J. Ide, C. Nishimura, Y.

Migration, integration, and differentiation of hippocampus-derived neurosphere cells after transplantation into injured rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 312(3) 173-176 (2001)

#### F. 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 ラット胎児の初代培養細胞およびスライス培養を用い、神経幹細胞の分化・成熟過程における NMDA 受容体の機能を検討した結果、胎児期の NMDA 受容体は、神経幹細胞の増殖制御、もしくは、細胞の移動を含む分化速度の制御に関わることが示唆された。

A. 研究目的

NMDA 受容体は、中枢神経系における主要な興奮性情報伝達を担うイオンチャネル型受容体であり、その発現は脳の発生過程のかなり早い時期から既に観察されるものの、機能については未だ解明されていない。そこで、本研究は、神経幹細胞の分化・成熟期における NMDA 受容体の機能解明を目的とする。

B. 研究方法

ラット E17 の大脳皮質より調製した初代培養細胞および培養スライスにおいて、NMDA 受容体のアンタゴニストである D-AP5 を 100  $\mu$ M 添加し、無添加のコントロールと増殖・分化の違いを検討した。初代培養細胞は、1.0  $\times 10^6$  cells / cm<sup>2</sup> にて 10% 血清を含む DMEM 培地中で培養した。スライス培養は、厚さ約 300  $\mu$ m の切片を作成し、15% 血清を含む D/F12 培地中で培養した。

全ての実験は国立精神神経センター実験動物委員会の定める規定に従った。

C. 研究結果

初代培養細胞において、D-AP5 存在下での培養の方がコントロールの培養よりも nestin 陽性細胞、および GLAST 陽性細胞数が多く観察された。さらに、BrdU 取り込み実験においても、D-AP5 存在下の方が陽性細胞が多く見られた。一方、TuJ-1 および GFAP 陽性細胞数には変化が認められなかった。

培養スライスにおいては、コントロールのスライスでは3日間の培養で放射状の nestin 陽性細胞が徐々に消滅するのに対し、D-AP5 存在下では放射状の nestin 陽性細胞が消滅せず、強いシグナルが認められた。また、BrdU 取込み後6日間の培養で、コントロールのスライスではそのシグナルは cortical plate に集積するのに対し、D-AP5 存在下ではスライス全般に観察された。

以上の結果は、神経幹細胞の増殖・分化に NMDA 受容体に関与している可能性を示唆している。このメカニズムの解明の一つとして、カルシウムイメージング法を用いて NMDA に対する応答性を調べたところ、nestin 陽性細胞では確認できず、MAP-2 陽性細胞のみで観察された。

D. 考察

以上の結果から、胎児期の NMDA 受容体は、神経幹細胞の増殖制御、もしくは細胞の移動を含む分化速度の制御に関わることが推測される。さらに、

カルシウムイメージングの実験から、この NMDA の作用は神経細胞に発現している NMDA 受容体を介して神経幹細胞に働きかける間接的なものであり、そこに何らかの NMDA 依存的な分化・成熟に関わる二次的なメカニズムが存在する可能性が考えられる。現在詳細を検討中である。

E. 結論

神経幹細胞の分化・成熟過程に NMDA 受容体に関与している可能性が示唆された。

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  $\gamma$  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。

研究要旨 TH 遺伝子のプロモータの制御下で green fluorescent protein を発現する胚性幹細胞を用いて分化誘導させ、ドーパミン作動性ニューロンを生きたまま同定分離する方法を確立した。

#### A. 研究目的

ドーパミン作動性ニューロンを生きたまま同定・分離する方法を確立する。

#### B. 研究方法

ラット TH 遺伝子のプロモータ領域に enhanced green fluorescent protein(EGFP) cDNA を連結した TH-EGFP プラスミドをマウス ES 細胞にトランスフェクトする。このトランスジェニック ES 細胞を、ドーパミン作動性ニューロンを効率よく誘導する Stromal cell-inducing activity(SDIA)法で培養し、セルソーターによって分離する。

#### (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。また、マウス ES 細胞は理科学研究所チームリーダー丹羽仁史氏より供与を受けた細胞株である。

#### C. 研究結果

TH-EGFP 遺伝子を導入した ES 細胞をストローマ細胞の PA6 と無血清培地で共培養する(SDIA 法)と4日目から EGFP 陽性細胞集団が出現した。この EGFP 陽性細胞のうち 70%は TH 陽性であった。また、この共培養システムから得られた細胞群をセルソーターを用いて分離すると 30%が EGFP 陽性細胞集団であった。

#### D. 考察

上記の結果から TH-EGFP の発現を指標としてドーパミン作動性ニューロンを ES 細胞から効率よく誘導・分離することが可能であると考えられた。

#### E. 結論

SDIA 法で分化誘導させた TH-EGFP 遺伝子導入 ES 細胞はドーパミン作動性ニューロン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

Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, Matsushita N, Takahashi H, Kakishita K, Yamamoto A, Yoshizaki T, Terashima T, Murakami F, Itakura T & Okano H: Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 6423-6428, 2001

Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H: Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 21: 3895-3903, 2001  
Kyoung H.M, Roy N.S, Benraiss A, Louissaint A Jr, Suzuki A, Hashimoto K, Rashbaum WK, Okano H, Goldman S A: Prospective identification, selection and extraction of two distinct pools of neural stem cells from fetal human brain. *Nature Biotech* 19: 843-850, 2001

他 21 編

##### 2. 学会発表

吉崎崇仁、島崎琢也、澤本和延、岡野栄之 : Transplantation of FACS-sorted neural stem cells and dopaminergic neurons into a rat model of Parkinson's disease. 第 16 回 神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 2001 年 6 月 9 日

他 多数

#### H.知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

現在出願中 (2 件)

##### 2. 実用新案登録 特になし

##### 3. その他 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：神経幹細胞から特異的なニューロンが生み出される過程を制御する機構を解析した。その結果、bHLH 型転写因子 Olig2 と Ngn2 が、発生期脊髄における運動ニューロン分化のマスター遺伝子として機能することを明らかにした。また、成体脊髄に残存する神経幹細胞・前駆細胞について解析し、その制御が発生期と同様のメカニズムによることを明らかにした。

### 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、外来細胞の移植法とともに、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、幹細胞・前駆細胞の制御機構を分子レベルで明らかにすることが不可欠である。本年度は特に、発生期並びに成体脊髄における神経前駆細胞の制御機構を解析した。

### B. 研究方法

発生期ラット及びニワトリ胚を用いて、bHLH 型転写因子 Olig2 と Ngn2 およびその他の分子の発現を特異抗体を用いた免疫染色により詳細に解析した。また、ニワトリ胚への遺伝子導入法を用いて、個体レベルで異所発現実験をおこなった。

一方、成体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解析した。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、学内実験動物取扱規定を遵守した。

### C. 研究結果

まず、発生期ラット及びニワトリ胚脊髄神経管において、Olig2 と Ngn2 が運動ニューロンの前駆細胞に特異的に共発現することを見出した。異所発現実験により、この2つの転写因子が協調的に働くことで、運動ニューロンの時期・部位特異的な分化を制御していることを明らかにした。両者の異所発現により脊髄のみならず前脳・中脳・後脳などの様々な神経管領域、さらには表皮などの一部の非神経組織においても運動ニューロンの誘導が可能であった。このことから、Olig2 と Ngn2 は運動ニューロン分化のマスター遺伝子として機能すると考えられた。また、成体脊髄組織に内在する神経前駆細胞について、その分子レベルでの性質と組織内分布、更に損傷に対する応答を解析した。まず Neurosphere 法を用いた培養により、成体脊髄には中心管周囲組織を含む内側部のみならず、実質部外側部にも広範に前駆細胞が存在していることを明らかにした。また、成体由来の前駆細胞が、胎児由来の細胞と同様に多くのホメオドメイン型ならびに bHLH 型転写因子を特異的に発現することを見出した。さらに、胸髄切断モデルラットを用いた解析の結果、損傷脊髄内では前駆細胞が反応性に増殖することが明らかになった。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。この組織内での制限機構に Notch 受容体を介するシグナル伝達系が関与することを明らかにした。

### D. 考察

神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のためには、その制御法の確立が不可欠である。本研究により、発生期において幹細胞から運動ニューロンが生み出される過程を制御するマスター遺伝子が同定された。また、成体脊髄を用いた解析から、神経幹細胞・前駆細胞が従来予想されてきたよりも広範に多数存在し、また損傷に応答して増殖しうることが見出されたことは、再生誘導を目指す上で重要な知見である。しかし、成体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い。この損傷脊髄の再生能制限機構に Notch シグナル系が関与することを明らかにした。

### E. 健康危険情報

特になし

### F. 結論

今後は上記の知見を元に、損傷脊髄内でニューロン新生を促す手法の開発を目指していく予定である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M. (2001) Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.
- 2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115-127.
- 3) Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21, 9814-9823.

## 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 発生期のドーパミンニューロンに関する形態学的解析から、DA ニューロンはまず、淡蒼球の原基である medial ganglionic eminence (MGE) に投射すること、そこでの、トロフィックな相互作用により、線条体ニューロンが分化することが示された。

### A. 研究目的

神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療法を開発するためには、ドーパミン(DA)ニューロンの分化過程および線条体ニューロンとの特異的な神経回路形成機構を解明することが必須である。大脳基底核には A9DA ニューロンによって制御される間接路と直接路があるが、パーキンソン病では主として間接路が侵される。我々は発生時期からみても A9 ニューロンにはサブタイプが存在すると考え、その発生系譜を明らかにすることを目的の一つとして A9 ニューロンの分化機構を解析している。さらに、DA ニューロンと線条体ニューロンとの相互作用により線条体ニューロンが分化し、DA ニューロンとシナプスを形成する過程を解析する。

### B. 研究方法

線条体への DA ニューロンの投射の発達過程をチロシン水酸化酵素 (TH) に対する抗体を用いて形態学的に検討した。(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

中脳において、マウス 10 日胚 (E10) から TH 陽性細胞が観察された。E18 には成熟期に見られる A9 の特徴的な構造が観察された。一方、線条体への TH 繊維の投射は E12 から起こり、淡蒼球の原基である medial ganglionic eminence (MGE) に最初に投射することが明かとなった。E14 から LGE への TH 繊維の投射が密になり、E18 の線条体において TH のパッチが観察され

た。

### D. 考察

これらの結果から、DA ニューロンと MGE 間の相互作用が、黒質-線条体経路の形成に重要であると考えられ、この相互作用を司る因子について培養系を用いて解析している。

### E. 結論

DA ニューロンは発達しながら MGE に投射し、そこで線条体ニューロンとトロフィックな相互作用をおこすものと考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. Inoue T, Tanaka T, Takeichi M, Chisaka O, Nakamura S, Osumi N., Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development, Development 128, 581-569 (2001).
2. Itami C, Samejima, K, Nakamura, S., Improved data processing for optical imaging of developing neuronal connectivity in the neonatal mouse barrel cortex. Brain Res. Protocols, 7 (2001) 103-114.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 新しい神経幹細胞の増殖・分化制御系の開発を目指した研究

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター 疾病研究第四部部長

研究要旨 神経幹細胞に発現する G 蛋白質共役型受容体スクリーニングを試みたところ新しい G 蛋白質共役型受容体を同定することができた。さらにそれら受容体のリガンドを同定する目的で分子モデリングとコンピュータシミュレーションによる非ペプチド性のリガンドのスクリーニング系の開発をおこなった。

### A. 研究目的

パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患などの難治性神経疾患は現在でもその治療法が確立されていない。最近になって成体の脳においても幹細胞が存在することが明らかになり、神経幹細胞を利用した治療法の確立が期待されている。G 蛋白質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) はヒトゲノムにコードされている遺伝子数万個のなかで約千個にコードされる最も数の多い受容体ファミリー分子群であり、近年これら GPCR が細胞の増殖や分化のみならず神経機能制御においても重要な役割を担っている事が示されている。そこで GPCR に標的を絞り神経幹細胞における GPCR のスクリーニングとバイオインフォマティクス技術を利用した人工的な非ペプチド性リガンドの同定を目指した研究を行った。

### B. 研究方法

マウス成熟個体の脳より凍結切片を作製し神経幹細胞が濃縮されていると考えられている脳室の内壁の細胞層を Laser Capture Microdissection (LCM) 法によりレーザー光で切取り cDNA プールを作製した。GenBank データベースより G 蛋白質共役型受容体の塩基配列データを抽出しそれらの特異的プライマーを設計して、SYBR-Green を用いた定量的 PCR 法により遺伝子発現レベルを定量し、神経幹細胞層に特異的に発現する G 蛋白質共役型受容体のスクリーニングを行った。脳室の内壁で発現の高い G 蛋白質共役型受容体遺伝子を同定しコンピュータ立体構造モデリングや化学化合物スクリーニングを試みた。

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

### C. 研究結果

マウス大脳の側脳室内壁の細胞層を三層に分けて LCM 法により切取り、それぞれの細胞層ならびに全脳における GPCR の発現レベルを定量した。その結果、神経幹細胞が存在していると考えられる Nestin 陽性の細胞層で全脳に対して 40~100 倍のレベルで濃縮されている GPCR を同定する事が出来た。さらにこれら GPCR の MSI 社 Modeler プログラムによる立体構造モデリングならびに MSI 社 Ludi プログラムによる Available Chemical Directory から抽出した化合物ライブラリーとの

結合シミュレーションによる結合化合物スクリーニングの系の確立を進めた。

### D. 考察

本研究から神経幹細胞層で高レベルで発現している GPCR が同定できた。今後これら受容体とその非ペプチド性のリガンドを利用して生体内の神経幹細胞を人為的に制御する技術開発を進めることで、難治性の神経疾患とくにパーキンソン病に対する新しい治療法の開発に役立ててゆくことが可能であると考えられる。

### E. 結論

LCM 法によって脳内の神経幹細胞層由来の特異的 cDNA プールを作製することに成功した。またそこから新しい G 蛋白質共役型受容体を同定することができた。さらにそれら受容体の分子モデリングとコンピュータシミュレーションによる非ペプチド性のリガンドを同定するための新しいスクリーニング系の開発をおこなった。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

- Kurihara, L.J., Kikuchi, T., Wada, K. and Tilghman, S.M., Loss of Uch-L1 and Uch-L3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 1963-1970, 2001
- Aida, R., Moriya, T., Araki, M., Akiyama, M., Wada, K., Wada, E. and Shibata, S. Gastrin-releasing peptide (GRP) mediates photic entrainable signals to the dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of period gene in mice. *Mol. Pharmacol.*, 61, 26-34, 2002
- Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Wada, E. and Wada, K., NMB-R-deficient mouse in the elevated plus maze. *Mol. Psychiat.*, 7, 6, 2002
- Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Wada, E. and Wada, K., Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behaviour by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice. *Mol. Psychiat.*, 7, 113-117, 2002

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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 岡山大学医学部附属病院脳神経外科講師

研究要旨 神経栄養因子産生細胞株を遺伝子操作によって作成し、高分子半透膜製のカプセルに封入後脳内移植することによって、パーキンソン病や脳虚血モデル動物の改善効果が得られた。

A. 研究目的

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遺伝子操作によって作成することが可能になった。これらの細胞株を高分子半透膜製のカプセルに封入後、脳内移植して、パーキンソン病や脳虚血モデル動物での効果を検討する。

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7mmのカプセルを作成した。遺伝子操作によってbaby hamster kidney (BHK)細胞にGDNF遺伝子、bFGF遺伝子を組み込み、GDNFおよびbFGF産生細胞株を作製した。宿主はラットで、一側のパーキンソン病モデルと一側の中大脳動脈閉塞モデルを用いた。モデル動物作成後、カプセルを同側線条体に移植した。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GDNF、bFGF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、脳虚血の大きさは30%減少した。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。これらを脳内移植のドナー細胞として用いて、パーキンソン病や脳虚血モデル動物の改善が得られたことから、神経疾患への新しい神経栄養因子供給の方法

として注目される。また、今後改良することによって、神経伝達物質と神経栄養因子を同時に供給するカプセルの作製も可能となる。

E. 結論

カプセル化神経栄養因子産生細胞の脳内移植は、パーキンソン病や脳虚血の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 genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. *Cell Transplantation* 10: 397-401, 2001.

Date I, et al.: Neurotrophic factor delivery by encapsulated cell grafting technique, in K. Abe (eds): *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 2001, pp. 289-296.

Fujiwara K, Date I, et al.: Neurotrophic factor-secreting cell grafting for cerebral ischemia: preliminary report. *Cell Transplant* 10: 419-422, 2001.

2. 学会発表

伊達 勲ら：第9回細胞療法研究会、2001年4月、松本

伊達 勲ら：第21回日本脳神経外科コンgres、2001年5月、山形

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究要旨：ヒト胎児脳由来神経幹細胞からチロシン水酸化酵素（TH）陽性ニューロンが分化誘導される。TH 陽性ニューロンへの分化について脳の部位によって違いがみられた。

#### A. 研究目的

ヒト胎児由来神経幹細胞からドーパミン作動性ニューロンへの分化能について *in vitro* での解析を行った。

（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。

#### B. 研究方法

人工妊娠中絶術で得られた胎児（胎生 9 週）の脳を前脳、間脳、中脳、後脳に分割し、それぞれの組織を neurosphere 法によって培養した。得られた神経幹細胞（前駆細胞）を Neurosphere として培養 2 日後、50 日後、150 日後に分化誘導を開始しその 2 週間後に MAP2ab、GFAP および GABA、TH に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

#### C. 研究結果

脳のどの部位からも神経幹細胞（前駆細胞）が得られたが、増殖速度は遅く、かつ、部位によって増殖速度に違いがみられた。MAP2ab 陽性ニューロンは全体の約 20% を占めた。GFAP 陽性のアストロサイトは 2 日間培養の neurosphere からほとんど分化しなかったが、150 日間培養したものでは全体の約 50% を占めた。ニューロンの多くは GABA 陽性細胞が占めたが、少数ながら TH 陽性ニューロンもみられた。ただし、TH 陽性ニューロンへの分化においては部位による

差がみられ、また、培養日数が増につれて TH 陽性ニューロンの分化効率が低下した。

#### D. 考察

ヒト胎児由来神経幹細胞（前駆細胞）から TH 陽性ニューロンへの分化がみられたことは、パーキンソン病治療への可能性を示唆する。ただし、増殖速度が遅いこと、部位特異性がみられること、分化効率が低下することについては、今後の検討を要する。

#### E. 結論

ヒト胎児由来神経幹細胞（前駆細胞）から TH 陽性ニューロンが分化誘導されるが、臨床応用までにはまだ検討の余地がある。

#### 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発現の検討（神経組織の成長・再生・移植研究会第 16 回会学術集会、2001 年 6 月、大阪）

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（第 60 回日本脳神経外科学会総会、2001 年 10 月、岡山）

Neural stem cells derived from different regions of human embryo have the different abilities to give rise to neurons. (31<sup>st</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov. 2001, San Diego)

#### 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
Nakajima, K. and Kobasaka, S.	Neuroprotective roles of microglia in the central nervous system.	Streit W.J.	Microglia	Springer	New York	2001	188-208

## 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
Ohsawa, I. et al.	Fibulin-1 binds the amino-terminal head of $\beta$ -amyloid precursor protein and modulates its physiological function.	J. Neurochem.	76	1411-1420	2001
Honda, S. et al.	Extracellular ATP or ADP induces chemotaxis of cultured microglia through $G_{i/o}$ -coupled P2Y receptors.	J. Neurosci.	21	1975-0982	2001
Kamitori, K. et al.	Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat.	Mol. Brain Res.			2002 in press

# 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.	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	2001	11-19
Sawamoto, K et al.	Direct isolation of mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons.	Calne, DB and Mizuno, Y	Recent Research Development In Molecular And Cellular	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
Sawamoto K. et.al.	Visualization and direct isolation of midbrain dopaminergic neurons expressing GFP.	Proc Natl Acad Sci USA	98	6423-6428	2001
Sawamoto K. et.al.	Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene.	J Neurosci.	21	3895-3903	2001
Keyoung HM et.al.	Prospective identification, selection and extraction of two distinct pools of neural stem cells from fetal human brain.	Nature Biotech	19	843-850	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

## 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
Mizuguchi R. et al	Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons.	Neuron	31	757-771	2001
Yamamoto S. et al.	Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord.	Exp. Neurol.	172	115-127	2001
Yamamoto S. et al.	Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord.	J. Neurosci.	21	9814-9823	2001

# 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.	Improved data processing for optical imaging of developing neuronal connectivity in the neonatal mouse barrel cortex.	Brain Research Protocols	7	103-114	2001
Inoue T. et al.	Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development.	Development	128	561-569	2001
Iida N. et al.	Requirement of Ras for the activation of mitogen-activated protein kinase by calcium influx, cAMP, and neurotrophin in hippocampal neurons.	J. Neuroscience	21	6459-6466	2001

# 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

## 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

## 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
Kurihara, L.J., et al.	Loss of Uch-L1 and Uch-L3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia.	Hum. Mol. Genet.	10	1963-1970	2001
Aida, R., et al.	Gastrin-releasing peptide (GRP) mediates photic entrainable signals to the dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of period gene in mice.	Mol. Pharmacol.	61	26-34	2002
Yamada, K., et al.	NMB-R-deficient mouse in the elevated plus maze.	Mol. Psychiat.	7	6	2002
Yamada, K., et al.	Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behaviour by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice.	Mol. Psychiat.	7	113-117	2002

# 研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 岡山大学医学部

氏 名 伊達 勲

## 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
Date, I. et al.	Neurotrophic factor delivery by encapsulated cell grafting technique	Abe, K.	Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis	Elsevier Science B.V.	Amsterdam	2001	289-296
伊達 勲 大本堯史	細胞移植療法の現況と展望	杉田秀夫	神経・筋疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2001	136-142

## 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
Date, I. et al.	Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats	Cell Transplant	10(4)	397-401	2001
Fujiwara, K. Date, I. et al.	Neurotrophic factor-secreting cell grafting for cerebral ischemia: preliminary report	Cell Transplant	10(4)	419-422	2001