

20020470

厚生労働科学研究費補助金  
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成15年（2003年）3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	1
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	
II . 分担研究報告書	
1. 神経幹細胞の分化機構の解明	3
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	
2. 神経幹細胞の分離技術の開発	4
岡野 栄之 (慶應義塾大学医学系研究科)	
3. 神経幹細胞の増殖・分化機構の解明	5
中福 雅人 (東京大学大学院医学系研究科)	
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	6
中村 俊 (国立精神・神経センター神経研究所)	
5. G蛋白質共役型受容体を利用した新しい 神経幹細胞の増殖・分化制御系の開発を目指した研究	7
和田 圭司 (国立精神・神経センター神経研究所)	
6. 神経幹細胞の移植技術の開発に関する研究	8
伊達 勲 (岡山大学医学部)	
7. ヒト胎児由来神経幹細胞に関する研究	9
高橋 淳 (京都大学大学院医学研究科)	
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、神経幹細胞の分離培養に関しては、1) ES細胞より神経幹細胞を効率的に分化誘導するシステムを開発し、ドーパミンニューロンやコリン作動性ニューロンを得ることに成功した。2) 発生期の脊髄における神経幹細胞からニューロンとグリアが分化する過程につき、各種ホメオドメイン型 HLH 型転写因子に焦点を当て解析を行った。その結果、発生期の脊髄腹側においては、Olig2, Nkx2.2, Pax6, Ngn1/2/3, Mash1 が、それぞれ特異的な組み合わせで時期・部位特異的に発現し、その組み合わせで神経幹細胞からのニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの発生が制御されていることが明らかとなった。3) ヒト由来神経幹細胞の性質を検討する研究においては、胎児脳を前脳、間脳、中脳、後脳に分けてニューロスフェアとして培養を行い、ドーパミンニューロンへの分化を検討した結果、特に間脳、中脳から2～3%の割合でドーパミンニューロンが認められた。またエストロジェンを加えることによりドーパミンニューロンが増加することも明らかになった。内在性神経幹細胞の分化増殖に関する研究に関しては以下の成果が得られた。1) 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、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わかった。2) マウス胎児の神経上皮培養細胞を用い G 蛋白質共役型受容体(GPCR) 遺伝子の発現を網羅的に解析したところ、神経幹細胞で発現する GPCR を同定できた。さらに GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮の培養系に添加して生理作用を解析したところ増殖抑制ならびに分化を誘導する GPCR リガンドを同定することが出来た。神経幹細胞が形成する神経回路網の維持を図るための基礎研究として、マウス胎児脳初代培養細胞あるいはスライス培養を用い、黒質一線条体間の相互作用について解析を行った。その結果、黒質から分泌されるドーパミンは線条体および大脳皮質抑制性神経細胞の分化と移動の制御に関わることが示唆された。

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

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。

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。

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。また 6) 過去2年間における研究を通じ重要性が認識されてきた内在性神経幹細胞の分化増殖機構も検討する。

## 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。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、神経幹細胞の分離培養に関しては、1)ES細胞より神経幹細胞を効率的に分化誘導するシステムを開発し、そこから様々なタイプの機能ニューロン、すなわちドーパミンニューロンやコリン作動性ニューロンを *in vitro* および *in vivo* で得ることに成功した。2)発生期の脊髄神経管における神経幹細胞からニューロンとグリアが分化する過程につき、各種ホメオドメイン型 HLH 型転写因子に焦点を当て解析を行った。その結果、発生期の脊髄腹側においては、*Olig2*, *Nkx2.2*, *Pax6*, *Ng2*, *Sox10*, *Mash1* が、それぞれ特異的な組み合わせで時期・部位特異的に発現し、その組み合わせで規定される遺伝子の活性に従って、神経幹細胞からのニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの発生が制御されていることが明らかとなった。3)ヒト由来神経幹細胞の性質を検討する研究においては、胎児脳を前脳、間脳、中脳、後脳に分けてニューロスフェアとして培養を行い、ドーパミンニューロンへの分化を検討した結果、特に間脳、中脳から 2~3% の割合でドーパミンニューロンが認められた。またエストロジェンを加えることによりドーパミンニューロンが増加することも明らかになった。

内在性神経幹細胞の分化増殖に関する研究に関しては、以下の成果が得られた。1) 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するため、NMDA 受容体の阻害剤である APV の影響を調べた。その結果胎児期の 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わかった。さらに、この D-APV の作用はニューロンに発現している 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 受容体依存的な分化・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た。ventricular zone における *Hes1*, *Hes5* mRNA の発現が亢進していることから、その候補の一つとして Notch シグナル系の関与が示唆された。2) マウス胎児の神経上皮培養細胞を用い G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 遺伝子の発現を網羅的に解析したところ、神経幹細胞で発現する GPCR を同定できた。さらに GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮の培養系に添加して生

理作用を解析したところ増殖抑制ならびに分化を誘導する GPCR リガンドを同定することが出来た。

神経幹細胞が形成する神経回路網の維持を図るための基礎研究として、マウス胎児脳初代培養細胞あるいはスライス培養を用い、黒質一線条体間の相互作用について解析を行った。その結果、黒質から分泌されるドーパミンは線条体および大脳皮質抑制性神経細胞の分化と移動の制御に関わることが示唆された。

## D. 健康危険情報 特になし。

## E. 研究発表

Kamitori, K., Machide, M., Tomita, K., Nakafuku, M. and Kohsaka, S.:

Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Mol. Brain Res.* 104 (2002) 255-266

Sakakibara, S., Nakamura, Y., Koike, M., Takano, H., Uchiyama, Y., Noda, T. and Okano, H.:

RNA-Binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 15194-15199 (2002)

Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M.:

Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441 (2002)

M.Hoshino, S.Nakamura,:

The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation, *B. B. R. C.* 295 (2002) 651-656

Aoki, S., Su, Q., Li, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Wada, K.:

Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J Neurosci.* 22 (2002) 10751-10760

Shingo T, Date I, et al.:

Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 69: 946-954, (2002)

Morizane A, Takahashi J, Takagi Y, Sasai Y, Hashimoto N:

Optimal Conditions for *in Vivo* Induction of Dopaminergic Neurons from ES Cells through Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *J Neurosci Res.* 69-(3) 934-939 (2002)

## 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

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、および細胞の移動を含む分化速度の制御に関わることがわかった。

### 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十分解明されていない。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

ラット胎生 17 日齢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 (100  $\mu$ M) を培地に添加し、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> の濃度でプレーティングし 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 DMEM 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

ラット胎児(胎生 16-17 日齢)の大脳皮質では、神経幹細胞から分化した幼弱ニューロンが ventricular zone から cortical plate へと移動し、層構造を構築し始める。そこで、まず D-APV を培地に添加した際の幼弱ニューロンの移動に対する影響を検討した。ラット胎生 17 日齢の大脳皮質よりスライスを作製し、2 時間後に BrdU (10  $\mu$ M) にてパルスラベルを行った。その後、D-APV 存在、非存在(コントロール)下で 3 日間培養し、BrdU 陽性細胞の分布を検討した。その結果、BrdU 陽性細胞はコントロール培養では cortical plate に多く見られるのに対し、D-APV 存在下で培養したスライスでは intermediate zone に多く見られた。さらに、intermediate zone の BrdU 陽性細胞は、幼弱ニューロンのマーカーである TUJ1 を発現していた。この事は、D-APV 投与により幼弱ニューロンの移動が遅れたことを示している。次いで、培養 3 日後に BrdU のパルスラベルを行ったところ、コントロール培養では BrdU を取り込んだ細胞はほとんど観察されなかったが、D-APV 存在下で培養したスライスでは ventricular zone に未だ多くの BrdU 陽性細胞が観察された。これらの細胞種を抗体染色法で同定したところ、nestin 陽性細胞であった。初代培養細胞を用いたカルシウムイメージングの結果から、NMDA 受容体はニューロンで発現しており神

経幹細胞では発現していないことが示唆されてた。従って、D-APV がもたらす神経幹細胞の分裂能の維持もしくは増加は、ニューロンに発現している NMDA 受容体を介したものと考えられる。また、このニューロンに発現している NMDA 受容体は D-APV 添加により NR2A/NR2B 比が低下しており、ニューロンの成熟の遅れが示唆された。そこで、この分子メカニズムの解明のため、まず RT-PCR 法を用いて ventricular zone における Hes1, Hes5 mRNA の発現を解析した。その結果、D-APV 存在下で培養したスライスでは、コントロールスライスよりもこれらの mRNA の発現が亢進していることがわかった。

### 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わかった。さらに、この D-APV の作用はニューロンに発現している 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 受容体依存的な分化・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た。ventricular zone における Hes1, Hes5 mRNA の発現が亢進していることから、その候補の一つとして Notch シグナル系の関与が示唆された。

### E. 結論

神経幹細胞の分化・成熟過程に NMDA 受容体が関与していることが判明した。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kamitori, K., Machide, M., Tomita, K., Nakafuku, M. and Kohsaka, S.:

Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Mol. Brain Res.* 104 (2002) 255-266

#### 2. 学会発表

平澤孝枝、内野茂夫、本田静世、高坂新一：  
脳発達期の NMDA 受容体の機能解析  
第 25 回日本神経科学大会、東京、7.7, 2002  
他多数

### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（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 慶應義塾大学医学部 教授

研究要旨 ES 細胞より神経幹細胞を効率的に分化誘導するシステムを開発し、そこから様々なタイプの機能ニューロンを in vitro および in vivo で得ることに成功した。

A. 研究目的

ES 細胞から機能ニューロン得るシステムの確立。

B. 研究方法

様々な分泌タンパク質および化学物質を使って、様々な領域特異性を示す神経幹細胞を分化誘導するシステムを開発し、in vitro および in vivo における分化能を解析した。

C. 研究結果

まず、ES 細胞より、ドーパミンニューロンおよび運動ニューロンを含むコリン作動性ニューロンを従来より効率的に産生できる神経幹細胞を分化誘導するシステムを開発した。次に、FACS によって分離したドーパミンニューロンを産生する能力のある ES 細胞由来神経前駆細胞を 6-OHDA を用いて作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植し、治療効果を行動的に解析した。しかしながら、期待された十分な治療効果は得られなかった。そして、その原因を調べるために、移植細胞の宿主脳内における増殖・分化等について組織学的解析をしたところ、移植した前駆細胞の分化が不十分で、治療に必要な量のドーパミンニューロンが得られていなかったことが分かった。しかしながら、コリン作動性ニューロンを産生する能力のある ES 細胞由来神経前駆細胞を、イボテン酸を用いて作製した記憶障害モデルマウスの海馬へ移植し、治療効果を行動的に解析したところ、移植細胞は海馬でコリン作動性ニューロンに分化・機能し、一定の治療効果が得られた。

D. 考察

上記の結果から、ES 細胞より様々な機能ニューロンを産生することのできる神経幹細胞を分化誘導することが可能であることが明らかになった。

E. 結論

このマウス ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導系をヒト ES 細胞の分化系に応用することができれば、様々な正常ヒト神経系細胞を安定的に得ることが可能になり、薬剤スクリーニングや神経変性疾患の細胞移植治療などに役立つことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuno, K., Ito, M., Hori, K., Miyashita, F., Suzuki, S., Kishi, N., Artravanis-Tsakonas, S. and Okano, H.: Involvement of a proline-rich motif and a RING-H2 finger in a function of Deltex as a regulator of Notch signaling. *Development* 129, 1049-1059 (2002)

Sakakibara, S., Nakamura, Y., Koike, M., Takano, H., Uchiyama, Y., Noda, T. and Okano, H.: RNA-Binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 15194-15199 (2002)

Okano, H., Imai, T., Okabe, M.: Musashi: a translational regulator of cell fates. *J Cell Sci.* 115, 1355-1359 (2002)

他 20 編

2. 学会発表

岡野栄之：パーキンソン病、ALS、脊髄損傷などへの展望 第 43 日本神経学会総会（札幌）2002 年 5 月 30 日

岡野栄之：ES 細胞のコリン作動性ニューロン及び運動ニューロンの誘導 第 25 回日本神経科学会（東京）2002 年 7 月 7 日

Okano, H.: Strategies toward their potential therapeutic application in to spinal cord injury model 第 45 回日本神経化学会大会（札幌市）2002 年 7 月 17 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（1 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：発生期の脊髄において神経幹細胞からニューロン・グリアが分化する過程を制御する機構を解析した。その結果、各種のホメオドメイン型およびHLH型転写因子が組み合わせコードとなって未分化神経幹細胞に発現し、特定の時期・部位に特定のニューロン、あるいはオリゴデンドロサイト、アストロサイトが生み出されることが明らかになった。

研究目的

神経幹細胞を用いて損傷組織の再生・修復の為の手法を開発していくためには、その制御機構を明らかにすることが不可欠である。本研究では、発生期並脊髄において神経幹細胞からニューロン・グリアが分化する過程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

発生期ラット脊髄神経管における各種のホメオドメイン型およびHLH型転写因子の発現を、特異抗体を用いた免疫染色法により解析した。また、神経幹細胞の培養系において、組み換え型レトロウイルスを用いて各種遺伝子を発現させ、その効果を解析した。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

発生期脊髄では、背腹軸に沿った特定の領域で特定のニューロンが生み出される。また、ニューロン分化に引き続いて、腹側のOlig2, Nkx2.2発現ドメインからは異なる系譜のオリゴデンドロサイト前駆細胞が生み出され、より後期にはアストロサイトが分化する。このような空間的・時間的な細胞分化のパターンを制御する候補遺伝子群として、各種のホメオドメイン型およびbHLH型転写因子の発現を解析した。その結果、Olig2, Nkx2.2発現ドメインにおいては、ニューロンからオリゴデンドロサイトへの分化スイッチの時期に一致して、Mash1が特異的に発現していた。また、これに先立つニューロン分化の時期には、Ngn1, Ngn2, Ngn3がOlig2, Nkx2.2発現ドメインおよびその背側のPax6陽性ドメインに発現していた。一方、発生後期のアストロサイト分化の時期にはこれらの遺伝子の発現は全て消失し、未分化細胞には抑制性HLH因子であるId1が特異的に発現していた。

そこで、組み換え型レトロウイルスを用いて、これらの遺伝子を単独あるいは組み合わせで培養神経幹細胞に発現させ、その効果を検討した。その結果、Pax6は、単独あるいはNgn あるいはMash1と組み合わせた場合ニューロン分化を促進し、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの分化を抑制した。一方、Olig2, Nkx2.2は、Mash1と組み合わせた場合にオリゴデンドロサイトの分化を特異的に促進し、ニューロンとアストロサイトの分化を抑制した。逆にId1は、アストロサイトの分化を促進する活性を示した。

D. 考察

以上の結果から、発生期の脊髄腹側においては、Olig2, Nkx2.2, Pax6, Ngn1/2/3, Mash1が、それぞれ特異的な組み合わせで時期・部位特異的に発現し、その組み合わせで規定される遺伝子の活性に従って、神経幹細胞からのニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの発生が制御されていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

E. 結論

本研究で明らかになった転写因子の組み合わせコードは、神経幹細胞から特定の種類の細胞を誘導する操作法の開発のための、重要な基盤となると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441 (2002).
- 2) Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* 5, 308-315 (2002).
- 3) Kamitori K, Machide M, Tomita K, Nakafuku M, Kohsaka S. Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104, 255 (2002).
- 4) Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M. Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129, 681-693 (2002).
- 5) Kobayashi D, Kobayashi M, Matsumoto K, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K. Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93 (2002).

2. 学会発表

- 1) 中福雅人 虚血脳損傷後の海馬ニューロンの再生と脳機能回復。日本脳卒中学会シンポジウム 2002 (仙台)
- 2) 中福雅人 虚血脳損傷後の海馬ニューロンの再生と脳機能回復。日本神経化学学会シンポジウム 2002 (札幌)
- 3) Nakafuku M. Generation of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult nervous system: Mechanisms and implications. In: The Laudat Conference on: Neural Stem Cells: From Development to the Clinic. 2002 (organized by INSERM; Aix-Les-Bains, France)
- 4) Nakafuku M. Adult neural progenitors and their latent regenerative potential in the spinal cord. In: Motor Neuron Development and Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2002 (organized by the ALS Association; Boston, USA)
- 5) Nakafuku M. Regenerative capacity of stem cells in the adult brain. Neuroscience Program Lectureship in University of Cincinnati Graduate School of Medicine. 2002 (Cincinnati, OH, USA) (invited)

H. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨：マウス胎児の初代培養細胞およびスライス培養を用い、黒質－線条体間の相互作用について解析を行った結果、黒質から分泌されるドーパミンは、線条体および大脳皮質抑制性神経細胞の分化と移動の制御に関わることが示唆された。

#### A. 研究目的

移植した神経幹細胞を長期間機能させる上で、移植先との相互作用を知ることは必須である。そこで、本研究では、黒質－線条体間の相互作用が回路発達に与える影響について解析することを目的とした。

#### B. 研究方法

マウス E11 の線条体より調整した初代培養細胞において、ドーパミン、または黒質と共培養し、線条体神経細胞 (SN) と大脳皮質抑制性神経細胞 (CIN) の分化について解析した。さらに E14 の脳切片を用い、細胞移動の解析を行った。ついで、生体内における SN 細胞の分化と移動の解析を目的に、ドーパミン細胞毒である 6 OHDA を投与した妊娠マウスと BDNF ノックアウトマウスを用い、免疫組織染色を行った。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、ドーパミン存在下、あるいは黒質と共培養で CIN 細胞の分化率が有意に増大することを見出した。また、ドーパミン受容体 1 型 (D1R) アンタゴニストの投与によって、分化率はコントロールと同程度になった。D2R アンタゴニストの投与は分化率には影響がなかった。脳切片培養においては、ドーパミン、または BDNF 投与により、CIN 細胞の移動が促進された。D1R アンタゴニストは、移動に

は効果がなかったが、D2R アンタゴニストは、移動を阻害した。さらに、D2R 依存的な BDNF の発現制御を明らかにした。6 OHDA を投与した妊娠マウスと BDNF ノックアウトマウスにおける大脳皮質抑制性神経細胞 (calbindine 陽性細胞) は、コントロール群に比較して減少していた。

#### D. 考察

以上のことより、黒質から分泌されるドーパミンは、D1R を介して SN 細胞と CIN 細胞の分化に関与していることが示唆された。また、D2R が BDNF 発現を介して細胞移動の制御に関与することが示唆された。

#### E. 結論

発生期における黒質から分泌されるドーパミンは、線条体や大脳皮質抑制性神経細胞の分化、移動に重要な役割を担っていることが示唆される。

#### F. 健康危険情報 特記事項なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 M.Hoshino, S.Nakamura, The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation, B. B. R. C. 295 (2002) 651-656
2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

分担研究報告書

G 蛋白質共役型受容体を利用した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・神経センター神経研究所

研究要旨 マウス胎児の神経上皮培養細胞を用い G 蛋白質共役型受容体(GPCR) 遺伝子の発現を網羅的に解析したところ、神経幹細胞で発現する GPCR を同定できた。さらに GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮の培養系に添加して生理作用を解析したところ増殖抑制ならびに分化を誘導する GPCR リガンドを同定することが出来た。

A. 研究目的

GPCR はゲノム上に数千個コードされる最大のファミリー分子群であり、創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分子群であると考えられている。市販薬の約 60%がこれら GPCR ファミリー分子群のいずれかに作用することでその薬理効果を発揮していることが知られており、GPCR は薬理学上最も重要かつ創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分子群であると考えられている。近年、GPCR から MAP キナーゼ・PI3 キナーゼへいたるシグナル伝達系が神経幹細胞の増殖を促進しうることが発見された。これらの知見から、損傷を受けた中枢神経系を GPCR 作用薬により修復を目指す新しい治療方法開発の可能性が考えられた。これまで、神経幹細胞における GPCR ファミリー分子群の発現を網羅的に解析した研究は無かった。そこで神経幹細胞に発現する GPCR ファミリー分子群を明らかにするため遺伝子発現プロファイリングを行った。

B. 研究方法

胎生 14 日マウスの終脳から神経上皮細胞を得て培養を行った。これらの神経上皮細胞培養系における GPCR 遺伝子の発現レベルを SYBR green を用いた定量的 PCR 法にて解析した。また GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮細胞の培養系へ添加することで増殖ならびに分化への影響を特異的分子マーカーを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

データベースに登録されている GPCR の中から臭受容体を除くその他すべてのマウス GPCR 遺伝子 598 個に関してそれぞれ特異的な定量的 PCR 系を確立し神経幹細胞培養系での GPCR ファミリー分子群の発現を解析した。その結果、神経幹細胞で発現する GPCR ファミリーとして、リガンドが既知のもの 30 個、リガンド不明のもの 6 個の GPCR を同定した。さらに GPCR に対する特異的リガンドを神経上皮の培養系に添加して生理作用を解析したところ増殖抑制ならびに分化を誘導する GPCR リガンドを同定することが出来た。

D. 考察

これまで、神経幹細胞の増殖促進に働く GPCR ファミリーはいくつか報告されていたが、増殖抑制・分化促進作用を有している GPCR はこれが初めてのケースであった。

E. 結論

G 蛋白質共役型受容体を利用した神経幹細胞の増殖・分化制御による新しい治療法を開発することが可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 研究発表

Aoki, S., Su, Q., Li, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Wada, K. : Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J Neurosci.* 22 (2002) 10751-10760

Harada, T. Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L. F., Wada, K. : Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci.* 22 (2002) 9228-9236

2. 学会発表

Fukazawa, N., Li, H., Aoki, S., Ayukawa, K., Maeno, H., Kudo, Y., Kiyama, H. and Wada, K. : AIGP3, a novel oligodendrocyte membrane protein. SFN 32nd annual meeting, Orlando, Florida, U.S.A. 11.7 2002

Setsuie, R., Osaka, H., Wang, Y-L., Nishikawa K., Satoh, Y., Sakurai, M., Aoki, S., Takada, K., Noda, M., Wada, K. : Ubiquitin carboxy terminal hydrolase L1 (UCHL1) mediates ubiquitin stability and function in neurons. SFN 32nd annual meeting, Orlando, Florida, U.S.A. 11.5 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 カプセル化細胞移植の新しい試みとして、神経伝達物質と神経栄養因子を同時に脳内供給する方法、vascular endothelial growth factor (VEGF)産生細胞株を脳虚血モデル動物に移植する方法を検討した。

A. 研究目的

カプセル化細胞移植によって、神経伝達物質と神経栄養因子を同時に脳内に供給することができるか、そして、血管新生作用に加えて神経保護作用を持つ VEGF を産生する細胞株の脳内移植は脳虚血に効果を発揮するかを検討する。

B. 研究方法

ドパミン産生細胞株である PC12 細胞に GDNF 遺伝子を導入し、PC12-GDNF 細胞株を樹立、これをカプセルに封入後パーキンソン病モデルラットの線条体に移植した。

VEGF 産生細胞株を遺伝子操作で作製し、脳虚血モデル動物の線条体に移植した。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

PC12-GDNF 細胞を移植した群では、組織学的、生化学的、行動学的にパーキンソン病の改善が見られた。VEGF 産生細胞移植群では、コントロール群に比べて脳梗塞巣の大きさが40%減少した。

D. 考察

これまでのカプセル化細胞脳内移植では、神経伝達物質あるいは神経栄養因子を単独でしか脳内に供給することができなかったが、今回の新しい方法の試みで、両者を同時に供給することに初めて成功した。

VEGF 産生細胞株の脳内移植は、血管新生作用だけでなく、神経保護作用も持つことが明らかとなり、脳虚血に対する新しい治療法としての期待がもたれる。

これらいずれの方法も現時点では、移植後の細胞からの産生物質のコントロールができないが、今後、封入される細胞に Tet-off シ

ステムを組み込む等の方法で、移植後も外部から産生量をコントロールできるようにすることがのぞまれる。

E. 結論

カプセル化細胞脳内移植は、神経伝達物質と神経栄養因子を同時に脳内に供給したり、新しい血管新生作用をもつ因子を脳内に供給したりすることを可能にする点で、種々の神経疾患への治療に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shingo T, Date I, et al.: Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 69: 946-954, 2002.

伊達 勲ら：神経栄養因子産生細胞の移植：神経疾患の治療を目指して、*神経進歩* 46: 782-789, 2002.

Yoshida H, Date I, et al.: Stereotactic transplantation of a dopamine-producing capsule into the striatum would be a safe and effective treatment modality for Parkinson's disease: preclinical primate study. *J Neurosurg*, in press

2. 学会発表

伊達 勲：第23回日本炎症・再生医学会、2002年6月、東京

伊達 勲：第3回日本分子脳神経外科学会、2002年8月、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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。エストロジェンを加えることによってこのTH陽性ニューロンが増加した。

A. 研究目的

ヒト胎児由来神経幹細胞からのドーパミン作動性ニューロン分化誘導におけるエストロジェンの影響を検討した。

（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）の脳を分散し FGF-2, EGF, LIF を含んだ無血清培地で培養することによってヒト胎児由来神経幹細胞を得た。Neurosphere をポリオルニチン・ラミニンでコートした dish に移し培地から mitogen を抜くことによって分化誘導を行い、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

胎児脳を前脳、間脳、中脳、後脳に分けて実験を行ったが、どの部位からも神経幹細胞が得られた。Sphere としての培養が 50 日の場合は間脳、中脳からは 2-3% の TH 陽性ニューロンがみられたが、培養 150 日になるとどの部位からも 0.2-0.3% の TH 陽性ニューロンしかみられなくなった。分化誘導中に  $10^{-8}$ M のエストロジェンを加えると、これらが 2-3% に上昇した。神経幹細胞はエストロジェン  $\beta$  受容体を発現しており、この阻害剤を加えることにより TH 陽性ニューロンの増加が抑えられる

ので、この効果は  $\beta$  受容体を解するものと考えられる。また、このエストロジェンの作用は GABA 陽性ニューロンに対してはみられなかった。

D. 考察

ヒト胎児由来神経幹細胞から 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。エストロジェンを移植前に作用させたり、移植後患者に投与したりすることによって移植効率の上昇が期待される。

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、エストロジェンの作用でその割合が上昇する。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

学会発表

ヒト神経幹細胞の TH 陽性細胞への分化における 17- $\beta$ -estradiol の効果（神経組織の成長・再生・移植研究会第 16 回会学術集会、2002 年 6 月、東京）

Effects of estrogen on human neural stem cells in vitro. (32<sup>nd</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov. 2001, Orlando)

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
今井嘉紀、高坂新一	グリア細胞の神経生化学	御子柴克彦、清水孝雄 (日本生化学会編集)	脳の発生・分化・可塑性	共立出版(株)	東京	2002	105-111

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
Kamitori, K., Machide, M., Tomita, K., Nakafuku, M. and Kohsaka, S.	Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat.	Mol. Brain Res.	104	255-266	2002
Kanazawa, H., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. and Imai, Y.	Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and rac Activation via phospholipase C-γ-dependent pathway.	J. Biol. Chem.	277	20026-20036	2002
Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., et al	Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration.	J. Neurosci.	22(21)	9228-9236	2002
神鳥和代、高坂新一	神経幹細胞を用いた神経再生医療	Medicina	39-3	506-508	2002

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 慶應義塾大学医学部

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
Sawamoto K and Okano H	Direct isolation of mesencephalic precursor cells And opaminergic neurons.	Calne, DB and Mizuno, Y	Recent Res. Devel. Mol. Cell Biol.	Research Signpost	India	2002	243-253

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
Matsuno K, et al	Involvement of a proline-rich motif and a RING-H2 finger in a function of Deltex as a regulator of Notch signaling.	Developmen	129	1049-1059	2002
Sakakibara S, et al	RNA-Binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation.	Proc.Natl.Acad.Sci.USA	99	15194-15199	2002
Okano H, et al	Musashi: a translational regulator of cell fates.	J. Cell Sci.	115	1355-1359	2002



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
Nakatomi H. et al.	Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors.	Cell	110	429-441	2002
Heins N. et al.	Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6.	Nat. Neurosci.	5	308-315	2002
Kamitori K. et al.	Cell-type-specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat.	Brain Res. Mol. Brain Res	104	255	2002
Fu H. et al.	Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation.	Development	129	681-693	2002
Kobayashi D. et al.	Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals.	Development	129	83-93	2002

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
Ohsaki, K., Osumi, N., Nakamura, S.	Altered whisker patterns induced by ectopic expression of Shh are topographically represented by barrels.	Dev. Brain. Res.	137	159-170	2002
Mitsunobu, Hoshino. and Shun, Nakamura.	The Ras-like small GTP-binding protein Rin is activated by growth factor stimulation.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	295	651-656	2002

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
Aoki, S., et al.	Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIG P1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress.	Journal of Neuroscience	22	10751-15760	2002
Harada, T., et al.	Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during lightinduced retinal degeneration.	Journal of Neuroscience.	22	9228-9236	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
伊達 勲、 新郷哲郎、 大本堯史	パーキンソン病に対する移植・再生療法	大本堯史、堀智勝、田中達也、吉峰俊樹、片山容一	機能的脳神経外科の最先端	先端医療技術研究所	東京	2002	12-22

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
Shingo, T., Date, I., et al.	Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease.	J Neurosci Res	69(6)	946-954	2002
伊達 勲、 新郷哲郎、 大本堯史	神経栄養因子産生細胞の移植：神経疾患の治療を目指して	神経進歩	46(6)	782-789	2002