

20030844

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成16年（2004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 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. NMDA 受容体を介した神経幹細胞の増殖分化の調節 高坂 新一（国立精神・神経センター神経研究所）	5
2. G-蛋白質共役型受容体による神経系前駆細胞の 制御機構解析 和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所）	8
3. 神経栄養因子による内在性神経幹細胞の賦活化と その応用 古川 昭栄（岐阜薬科大学分子生物学）	10
4. 神経幹細胞の新たな分化誘導法の開発 島崎 琢也（慶應義塾大学医学部生理学）	12
5. 成体霊長類の神経幹細胞の特性 久恒 辰博（東京大学大学院先端生命科学）	14
6. ES 細胞移植による中枢神経機能再生 高橋 淳（京都大学大学院医学研究科）	16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
-----------------	----

I . 総括研究報告書

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）
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・神経センター神経研究所

研究要旨：平成15年度においては、再生医療における移植細胞として有用と考えられるES細胞の分化誘導法に関する研究、内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究および霊長類を用いた神経幹細胞の研究に焦点を当てて研究を推進することとした。

ES細胞の分化誘導法に関しては、レチノイン酸が濃度依存的にES細胞を神経幹細胞へ、更には神経幹細胞からニューロンやグリアへの分化も促進することを明らかにした。また、レチノイン酸とソニックヘッジホッグ（Shh）の処理により運動ニューロンなどの特異的なニューロンへ分化させるシステムを確立することに成功した。

内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究については、まず幹細胞の増殖・分化におけるNMDA受容体の役割を解明するため、成体および妊娠ラットにNMDA受容体の阻害剤を腹腔内投与する *in vivo* の薬理実験系を確立した。この実験系を用いて、妊娠ラットにNMDA受容体の阻害剤を腹腔内投与した結果、発達中の胎児の脳室下（Subventricular zone）において神経幹細胞の分裂が亢進し、更にNotchシグナルの下流で *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が上昇することを見いだした。さらに、神経幹細胞に発現するG-蛋白質共役型受容体（GPCR）の細胞生物学的解析を進めた結果、エンドセリンB受容体、アドレナリン受容体、およびPACAP受容体が神経上皮細胞に対して、ニューロンへの分化の促進や細胞移動の制御など特異的な生理作用を有していることが明らかとなった。

霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究については、まず成体霊長類（カニクイザル）の脳内における神経幹細胞の挙動ならびにニューロン新生の程度を明らかにするために、プロモデオキシウリジン投与したサルを用いた抗体組織染色を行ったところ海馬あるいは側脳室領域で、神経幹細胞の分裂が認められ、海馬および嗅球において新生ニューロンの存在が確認された。さらに、カニクイザルのES細胞をマウス骨髄由来のフィーダー（PA6）で培養することによって、高率にドーパミン作動性ニューロンを誘導することができた。その細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの脳内に移植することによって、ドーパミン作動性ニューロンの生着と神経症状の改善を得ることに成功した。

分担研究者

和田圭司 国立精神・神経センター 部長
古川昭栄 岐阜薬科大学神経分子生物学 教授
島崎琢也 慶應義塾大学生理学 助手
久恒辰博 東京大学大学院新領域創成学 助教授
高橋淳 京都大学大学院医学研究科 講師

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。この状況に鑑み、本研究班では神経幹細胞の増殖分化機構に関する基礎的知識を深めると共に、神経幹細胞を脳内に移植するか、あるいは内在性の神経幹細胞を賦活化し、ニューロンの新生を促進することにより、神経変性疾患で傷害されている神経回路網を再構築することを最終目標としている。平成15年度においては再生医療における移植細胞として有用と考えられるES細胞の分化誘導法に関する研究、内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究および霊長類を用いた神経幹細胞の研究に焦点を当てて研究を推進することとした。

B. 研究方法

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

1. ES細胞の分化誘導法に関する研究

ES細胞の分化誘導法に関しては、マウスES細胞の研究により、レチノイン酸が濃度依存的にES細胞を神経幹細胞へ、更には神経幹細胞からニューロンやグリアへの分化も促進することを明らかにした。また、レチノイン酸とソニックヘッジホッグ (Shh) の処理により運動ニューロンなどの特異的なニューロンへ分化させるシステムを確立することに成功した。

2. 内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究

1) 幹細胞の増殖・分化における NMDA 受容体の役割を解明するため、成体および妊娠ラットに NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内投与する *in vivo* の薬理実験系を確立した。この実験系を用いて、妊娠ラットに NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内投与した結果、発達中の胎児の脳室下 (Subventricular zone) において神経幹細胞の分裂が亢進し、更に Notch シグナルの下流で *Hes1*, *Hes5* mRNA の発現が上昇することを確認した。

2) 神経幹細胞に発現する G-蛋白質共役型受容体 (GPCR) の細胞生物学的解析を進めた結果、エンドセリン B 受容体、アドレナリン受容体、および PACAP 受容体が神経上皮細胞に対して、ニューロンへの分化の促進や細胞移動の制御など特異的な生理作用を有していることが明らかとなった。

3. 霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究

1) 成体霊長類 (カニクイザル) の脳内における神経幹細胞の挙動ならびにニューロン新生の程度を明らかにするために、プロモデオキシウリジンを投与したサルを用いた抗体組織染色を行ったところ海馬あるいは側脳室領域で、神経幹細胞の分裂が認められ、海馬および嗅球において新生ニューロンの存在が確認された。

2) カニクイザルの ES 細胞をマウス骨髄由来のフィーダー (PA6) で培養することによって、高率にドーパミン作働性ニューロンを誘導することができた。その細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの脳内に移植することによって、ドーパミン作働性ニューロンの生着と神経症状の改善を得ることに成功した。

4. 脊髄損傷モデルラットを用いた研究

脊髄を完全切断した脊髄損傷ラットの患部に FGF-2 を投与すると通常起こらない運動機能の改善が観察された。切断 6 週間後には吻側

から尾側へと損傷患部を越えて再生する皮質脊髄路や中脳脊髄路の下降性線維が多数検出された。この軸索再生促進効果は、FGF-2 によって脊髄に内在する線維芽細胞が増殖し、損傷患部を埋め尽くすことによって軸索再生阻害分子の少ない、軸索再生に適した環境が形成されるためと考えられた。

D. 健康危機情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Michael W. Salter and Inoue, K.:

P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 14:424, 778-83(2003)

Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.:

Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44, 242-250 (2003)

Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S.:

Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74 676-687(2003)

Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., Inoue, K. and Nakata, Y.:

Production and release of neuroprotective TNF by P2X₇ receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24, 1-7 (2004)

Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S. and Imai, Y.:

Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 88, 844-856 (2004)

Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and Kohsaka, S.:

Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178(2004)

Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago, Y., Amano, T., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.:

Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 304, 176-183(2003)

- Osaka, H., Wang, Y. L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y. J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1945-1958 (2003)
- Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.: Proteomic Analysis of the Brain Proteins in the Gracile Axonal Dystrophy (gad) Mouse, a Syndrome That Emanates from Dysfunctional Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L-1, Reveals Oxidation of Key Proteins. *J. Neurochem.*, 88, 1540-1546 (2004)
- Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, Y. Furukawa, S.: Neurotrophins facilitate production of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase in cultured mouse neural stem cells independently on their neuronal differentiation. *Neurosci Lett.* 339, 231-234 (2003)
- Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, S.: The growth arrest of PC12 cells by nerve growth factor is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway via p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci. Res.* 72, 211-217 (2003)
- Kokuzawa, J., Yoshimura, S., Kitajima, H., Shinoda, J., Kaku, Y., Iwama, T., Morishita, R., Shimazaki, T., Okano, H., Kunisada, T., Sakai, N.: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell Neurosci.* 24, 190 -197 (2003)
- Shimazaki, T.: Biology and clinical application of neural stem cells. *Horm. Res. Suppl.* 3, 1-9 (2003)
- Koketsu, D., Mikami, A., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Non-renewal of neurons in the cerebral neocortex of adult Macaque monkeys. *J. Neurosci.*, 23, 937-942 (2003)
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 9357-9366 (2003)
- Yoshida, N., Hishiyama, S., Yamaguchi, M., Hashiguchi, M., Miyamoto, Y., Kaminogawa, S., Hisatsune, T.: Decrease in expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 287, 262-271 (2003)
- Okada, H., Miyakawa, N., Mori, H., Mishina, M., Miyamoto Y, Hisatsune, T.: NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increases in $[Ca^{2+}]_i$ in "Neuronal Domains". *Cerebral Cortex* 13, 749-757 (2003)
- Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., Hashimoto, N.: Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J. Neurosci. Res.* 75(6), 817-824 (2004)
- Toda, H., Tsuji, M., Nakano, I., Kobuke, K., Hayashi, T., Kasahara, H., Takahashi, J., Mizoguchi, A., Houtani, T., Sugimoto, T., Hashimoto, N., Palmer, T.D., Honjo, T., Tashiro, K.: Stem cell-derived neural stem/-progenitor cell supporting factor (SDNSF) is an autocrine/paracrine survival factor for neural stem/progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 278(32), 35491-35500 (2003)
- F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許出願
- 1) "A screening method of drug for treatment of neuropathic pain." ヒューマンサイエンス振興財団 TLO
 - 2) 「マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法」 ヒューマンサイエンス振興財団 TLO
 - 3) 「ユビキチンC末端水解酵素発現マウス」 国立精神・神経センター、ジェノックス創薬研究所

II. 分担研究報告書

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

NMDA 受容体を介した神経幹細胞の増殖分化の調節に関する研究

主任研究者 高坂 新一 （国立精神・神経センター神経研究所）

研究要旨：幹細胞の増殖・分化における NMDA 受容体の役割を解明するため、成体および妊娠ラットに NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内投与する *in vivo* の薬理実験系を確立した。この実験系を用いて、妊娠ラットに NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内投与した結果、発達中の胎児の脳室下帯（Subventricular zone）において神経幹細胞の分裂が亢進し、更に Notch シグナルの下流で *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が上昇することを確認した。

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に解明されていない。そこで、本研究では、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

初代細胞培養は、大脳皮質を摘出しパパインをういて細胞を分散させた後、 1.0×10^6 cells/cm² の濃度で播種し、10%血清を含む DMEM 培地中で 37℃、10% CO₂ 下一定時間培養した。切片培養は、ミクロトームを用いて厚さ約 300 μm の大脳皮質切片を作製し、15%血清を含む DMEM 培地中で 37℃、10% CO₂ 下一定時間培養した。組織染色実験においては、培養切片を 4%の PFA で固定後ショ糖置換を行い OTC で包埋し、クリオスタットを用いて作製した厚さ 14 μm の凍結切片を用いた。

個体への阻害剤投与実験は、妊娠 17 日齢のラットもしくは 7 週齢の成体ラットにおいて、PBS に溶解した MK-801 (1 mg/kg) または ketamine (50 mg/kg) を腹腔内に投与し一定時間生育後、胎児または成体ラットの脳を取り出し、*in situ* hybridization および組織染色実験に用いた。

電気穿孔実験は、胎生 17 日齢のラットの脳室内に、ガラスマイクロピペットを用いて 2 - 4 μl のプラスミド DNA (2 - 5 μg/μl) を注入後、45 v、50 mA で 5 回のパルス電流を流した。その後、上記の方法で大脳皮質から培養切片または初代培養細胞を調製し、細胞染色実験に用いた。

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

昨年、胎生 17 日齢のラット大脳皮質から調製した初代培養細胞および培養切片に、NMDA 受容体の阻害剤である D-APV (100 μM) を投与することで、胎児期の NMDA 受容体が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与することを報告した。しかし、これらの *in vitro* の実験系では、限られた部位の限られた分化ステージしか解析できない。そこで本年度、個体を対象として、胎児から成体までの神経幹細胞の分化・成熟について幅広く解析できる *in vivo* の実験系の構築を行った。

NMDA 受容体の阻害剤を腹腔内に投与するため、PBS に溶解する MK-801 と ketamine を選択し、各々の阻害剤における有効濃度を検定した。有効性の判断は、これまでの他研究グループの報告に従い、経時的な BrdU のパルスラベル後 (50 mg/kg で腹腔内投与)、阻害剤非投与のコントロールラットと比較し、脳室帯および海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数の有意な増加を指標とした。その結果、成体ラット (7 週齢) において、MK-801 は 1 mg/kg、ketamine は 50 mg/kg の腹腔内投与で有効であることが判明した。これまでの胎生 17 日齢のラット大脳皮質から調製した培養切片を用いた実験から、D-APV を投与することで脳室帯から脳表面側への幼若ニューロンの細胞移動が遅延することがわかっている。そこで、妊娠ラット (17 日齢) について、BrdU (50 mg/kg) を腹腔内に投与した 2 時間後に MK-801 (1 mg/kg) もしくは ketamine (50

mg/kg) を投与し、その後経時的に胎児を取り出し BrdU 陽性細胞の位置を解析することで、幼若ニューロンの移動を観察した。その結果、培養切片を用いた実験と同様に、阻害剤を投与したラットの胎児では幼若ニューロンの移動が遅延していた。また、生後直後の新生児 (P0) において、阻害剤非投与のラットでは nestin 陽性の放射状グリア細胞の突起が退縮しつつあるのに対して、MK-801 を投与したラットの新生児ではまだ有意に突起が残っていた。以上、阻害剤を腹腔内に投与のしたラットにおける解析結果は、これまでの培養切片を用いた *in vitro* の実験結果をよく再現することから、実験系の有効性が確認された。

NMDA 受容体が神経幹細胞の増殖を制御する分子機構の解析にあたり、昨年、D-APV 投与により脳室帯の *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が亢進することを見出し、Notch シグナル系の関与の可能性について報告した。そこで、本年度は、上記の *in vivo* の実験系を用いてその再現性を確認するとともに、さらなる解析を進めた。*in situ* hybridization 実験から、*Hes1*、*Hes5*、*Notch1* mRNA は、胎生 17 日齢で脳室帯に局限した発現が観察され、その後、脳の発達に従い発現が低下してくることを確認した。そこで、17 日齢の妊娠ラットにおいて、MK-801 (1 mg/kg) を腹腔内に投与後経時的に胎児を取り出し、*in situ* hybridization 法にて *Hes1*、*Hes5*、*Notch1* mRNA の発現を解析した。その結果、胎生 18 日齢では、阻害剤投与および非投与両者の胎児において、*Hes1*、*Hes5* mRNA の発現に差は観察されなかったが、胎生 20 日齢および生後 1 日齢では、MK-801 を投与したラットで有意な *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現亢進が確認された。一方、*Notch1* mRNA については、観察した全ての発達ステージで有意な差は検出されなかった。そこで、*Hes1*、*Hes5* mRNA 発現細胞のさらなる解析を行うため、*Hes1*、*Hes5* プロモーターの下流に Green Fluorescent Proteins (GFP) を挿入したベクター (各々 *Hes1*-GFP、*Hes5*-GFP) を電気穿孔法を用いて脳室帯の細胞に導入後、培養切片および初代培養細胞を調製し、*Hes* 発現細胞の局在および細胞種の解析を行った。コントロールとしてサイトメガロウイルス

ルのプロモーター下流に GFP を持つプラスミドを導入した場合、導入 1 日後で既に脳表面側に移動中の GFP 陽性細胞が観察されたが、*Hes1*-GFP、*Hes5*-GFP を導入した場合、GFP 陽性細胞のほとんどは脳室帯に観察された。この結果は、*in situ* hybridization 法を用いた *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現解析結果と一致している。さらに *Hes5*-GFP を導入した胎児の脳から初代培養細胞を調製し、GFP 陽性細胞の細胞種をマーカー抗体を用いて同定したところ nestin 陽性細胞であったことから、*Hes5* 発現細胞は神経幹細胞もしくは前駆細胞であると考えられる。現在、MK-801 を投与したラットについて解析するとともに、*Hes* の発現亢進が Notch シグナル系の活性化によるものかどうかを検討中である。

D. 考察

本研究の知見を今後の再生医療に応用するにあたり、胎児のみならず成体での解析技術を確認することが必須となる。昨年までの研究は、胎児の培養切片および初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験であるため、本年度、個体に阻害剤を投与する *in vivo* の実験系を確立した。この実験系の確立により、発達ステージおよび解析部位についての制限を減らすことができ、成体での解析も可能となった。

昨年、NMDA 受容体の阻害剤を投与することで、神経幹細胞の分裂能が維持もしくは増加することを報告した。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いるため、阻害剤がもたらすこの作用は、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ると推測された。さらに、阻害剤の投与により、脳室帯における *Hes1*、*Hes5* mRNA の発現が亢進することを見出した。本年度、*Hes5*-GFP を電気穿孔法を用いて脳室帯の細胞に導入することにより、*Hes* 発現細胞を可視化し、その局在と細胞種の同定を行ったところ、*Hes* 発現細胞は脳室帯に局在する nestin 陽性細胞であることが判明した。近年、この領域にある nestin 陽性細胞は、活性型 Notch1

発現細胞と Mash1 発現細胞に二別され、前者が主に放射状グリア細胞、後者が神経前駆細胞であることがわかってきた。現在、MK-801 を投与したラットにおいて Hes5-GFP を導入し、その発現が亢進している細胞の局在とキャラクターゼーションを進めることで、Notch シグナル系の関与について解析している。

Hes1-GFP、Hes5-GFP は影山龍一郎教授（京都大）に供与いただいた。

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

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Michael W. Salter and Inoue, K.:

P2X₄ receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 14;424, 778-83(2003)

Sasaki, Y., Hoshi, M., Akazawa, C., Nakamura, Y., Tsuzuki, H., Inoue, K. and Kohsaka, S.:

Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44, 242-250 (2003)

Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S. and Uchino, S.:

Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74, 676-687(2003)

Suzuki, T., Hide, I., Ido, K., Kohsaka, S., and Inoue, K., Nakata Y.:

Production and release of neuroprotective TNF by P2X₇ receptor-activated microglia. *J. Neurosci.* 24, 1-7(2004)

Ohsawa, K., Sasaki, Y., Kohsaka, S and Imai, Y.:

Macrophage/Microglia-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its action-bundling activity. *J. Neurochem.* 88, 844-856(2004)

Akazawa, C., Nakamura, Y., Sango, K., Horie, H. and

Kohsaka, S.:

Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system; its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neurosci.* 125, 171-178(2004)

2. 学会発表

高坂新一 :

パーキンソン病の治療に向けた神経再生医療の現状 第3回千葉パーキンソン病フォーラム、千葉、7.3, 2003

大澤圭子、高坂新一 :

ATP のミクログリアへの多彩な作用 第46回日本神経化学学会大会シンポジウム「神経系における細胞外 ATP 機能の多様性」、新潟、9.24, 2003

高坂新一 :

ラット顔面神経切断により発現上昇する4回膜貫通型蛋白質の解析 第46回日本神経化学学会大会ミニシンポジウム「神経再生」、新潟、9.24, 2003

高坂新一 :

ニューロン機能を制御するミクログリア 第76回日本生化学学会大会 大会教育セミナー、横浜、10.16, 2003

Kohsaka, S., Ohsawa, K., Sasaki, Y., Honda, S., Imai, Y. and Inoue, K.:

Activation of Microglia by Extracellular ATP through Gi/o-coupled P2Y₁₂ receptor. The 6th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Hong Kong, 2.4-7, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) "A screening method of drug for treatment of neuropathic pain."

ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

2) 「マクロファージ系細胞の活性化抑制物質のスクリーニング方法」

ヒューマンサイエンス振興財団 TLO

G-蛋白質共役型受容体による神経系前駆細胞の制御機構解析

分担研究者 和田圭司 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第四部 部長

研究要旨：神経系前駆細胞に発現する G-蛋白質共役型受容体(GPCR)の細胞生物学的解析を進めた結果、エンドセリン B 受容体、アドレナリン受容体、および PACAP 受容体が神経上皮細胞に対して特異的な生理作用を有していることが明らかとなった。また、GPCR 作用薬剤を検定できる新しいパーキンソン病モデルマウスを開発できた。

A. 研究目的

パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患をはじめとする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が、神経系前駆細胞の増殖や分化を外的に投与した薬剤で制御する事が出来れば、多くの難治性神経疾患の治療への道が開けると考えられる。これまで神経系前駆細胞の新しい制御系を確立するために、神経上皮細胞に発現する G-蛋白質共役型受容体(GPCR)の網羅的解析を行ってきた。今回特異的なリガンドを用いて神経系前駆細胞に発現する GPCR の機能解析と GPCR 作用薬剤の *in vivo* での効果を検討するパーキンソン病モデルマウスの作製を目的とした。

B. 研究方法

胎生 14 日マウスの終脳から細胞を分離して basic FGF 存在下で初代培養後、basic FGF 存在下で継代培養することで大半の細胞が神経系前駆細胞マーカーである nestin 陽性の神経上皮細胞を得た。この神経上皮細胞は basic FGF 非存在下で培養することでニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化できることを確認している。この様な多分化能を持つ神経上皮細胞を細胞生物学的に解析した。また、細胞内シグナル伝達を検討するために種々のシグナル伝達阻害剤を使用した。トランスジェニックマウス作製は通常法で試みた。

C. 研究結果

神経系前駆細胞を含む神経上皮細胞に発現して

いる GPCR の機能解析するために、遺伝子発現量の高かった endothelin B, PAC1, adrenoreceptor- α -1 について特異的なリガンドを用いて細胞生物学的に解析した。

endothelin B (ET_B) の内在性リガンドである endothelin を神経上皮細胞に作用させたところ細胞間接着や運動性が促進された。 ET_B による細胞間接着の作用機序を検討した結果、G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットの下流で働く phosphoinositide-3-kinase (PI3K) や protein kinase B (PKB/AKT) を介してカドヘリンを活性化し、細胞間接着を誘導していることが示唆された。そして、細胞間接着や運動性を制御することで細胞移植時の細胞生着率向上や傷害部位への細胞移動に利用できることが考えられたので、現在マウスに投与してその効果を検討中である。次に、発現の認められた PACAP 受容体の一つである PAC1 の機能について特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いて検討したところ basic FGF や EGF といった増殖因子に依存して細胞増殖を促進することを見出した。そして、PACAP を増殖因子と併用して内因性神経前駆細胞を駆動すれば、脳梗塞などの傷害を効率的治療できると考えられた。さらに、同様の方法で発現の認められた adrenoreceptor- α 1 の神経上皮細胞におよぼす影響を検討した結果、栄養因子枯渇や ER ストレス等様々なストレスによる細胞死を有意に抑制した。細胞死抑制機序を検討するために propidium iodide (PI) や annexinV 染色して解析した結果、adrenoreceptor- α 1 のシグナルが PI 陽性の壊死性細胞死を抑制することが示唆された。

これらのことから、adrenoreceptor- $\alpha 1$ 作用薬を細胞移植時に使用すれば細胞生着率を向上できると考えられた。以上の結果から発現している GPCR のシグナルにより神経系前駆細胞を制御できることが明らかになった。

次に、GPCR 作用薬の効果をアッセイするために家族性パーキンソン病の病因遺伝子である I93M 変異型 UCH-L1 のトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。この Tg マウスを解析したところ、運動障害が観察されて新しいパーキンソン病モデルマウスとなることが明らかになった。また、DNA マイクロアレイにより解析を行ったところ、多くの発現変動遺伝子を同定することが出来た。現在、発現変動遺伝子の詳細な解析を進めている。

D. 考察

GPCR により神経系前駆細胞を制御できるとともに、その作用薬剤は神経系前駆細胞の制御技術開発へ利用できる可能性が考えられた。また、今回見出した薬剤をカクテルして使用することにより特異的で効率的治療ができると考えられた。

一方、GPCR 作用薬剤の *in vivo* での効果を検討するパーキンソン病などの神経変性疾患モデルを作製できた。パーキンソン病発症過程の遺伝子発現動態を知るとは、将来の幹細胞移植療法や薬剤投与療法の開発を行う上で役立つと考えられた。

E. 結論

神経系前駆細胞を制御できる薬剤を見出した。また、パーキンソン病モデルマウスを開発できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago, Y., Amano, T., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.:

Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 304, 176-183, (2003)

Osaka, H., Wang, Y.L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y.J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S. and Wada, K.:

Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neurons. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 1945-1958 (2003)

Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J., Lynn, B., Wang, Y.L., Osaka, H., Wada, K. and Butterfield, D.A.:

Proteomic Analysis of the Brain Proteins in the Gracile Axonal Dystrophy (gad) Mouse, a Syndrome That Emanates from Dysfunctional Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L-1, Reveals Oxidation of Key Proteins. *J. Neurochem.*, 88, 1540-1546 (2004)

2. 学会発表

Y. Hara, M. Nishimoto, H. Ohashi, K. Ayukawa, Y. Kudo, T. Abe, S. Aoki, and K. Wada:

ANALYSIS OF EXPRESSION PROFILE OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR GENES IN NEURAL STEM CELLS. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, LA, 11.8. 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

「ユビキチンC末端水解酵素発現マウス」

国立精神・神経センター、ジェノックス創薬研究所

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

神経栄養因子による内在性神経幹細胞の賦活化とその応用

—FGF-2 による脊髄損傷修復効果とその作用機構—

分担研究者 古川昭栄 岐阜薬科大学分子生物学 教授

研究要旨：脊髄を完全切断した脊髄損傷ラットの患部に FGF-2 を投与すると通常起こらない運動機能の改善が観察された。切断 6 週後には吻側から尾側へと損傷患部を越えて再生する皮質脊髄路や中脳脊髄路の下降性線維が多数検出された。この軸索再生促進効果は、FGF-2 によって脊髄に内在する線維芽細胞が増殖し、損傷患部を埋め尽くすことによって軸索再生阻害分子の少ない、軸索再生に適した環境が形成されるためと考えられた。

A. 研究目的

本研究は、成熟した中枢神経系に内在する神経幹細胞を賦活化することにより機能的なニューロンの回復、軸索の再生を達成することを目的としている。

脊髄が損傷を受けると神経伝導路が途絶し、損傷部より下位の身体的機能が失われる。しかしヒトを含めた哺乳動物の脊髄は軸索再生能が低くいったん受傷すると機能再建はきわめて困難となる。抜本的治療法の確立が望まれている。

本年度は、FGF-2 による脊髄損傷の修復作用とその作用機構を解析した。

B. 研究方法

FGF-2 は発現ベクターを組み込んだ大腸菌体抽出液からヘパリンカラムを用いて精製した。

7 週齢の雌性 Wistar 系ラットをペントバルビタール麻酔下、脊柱を露出、第 9 胸椎の椎弓を切除し、鋭利に第 10 胸髄 (T10) を完全切断した。直後に phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した FGF-2 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を切断部位前後 2 mm の範囲に 1 μl ずつ 5 点投与した。背筋、皮膚を縫合した後、両後肢麻痺を確認した。脊髄完全切断により自力排尿ができなくなるので 1 日 2 回、膀胱を刺激して排尿させた。

運動機能は、BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) 運動機能評価にて毎日評価した。

4 % パラホルムアルデヒド液で経心的に灌流固定し、組織を凍結包埋した。25 μm の薄切片に

ついてヘマトキシリン染色、免疫染色、TUNEL 染色等を実施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

軸索再生の有無の評価は、損傷 6 週後、損傷部位から 5 mm 尾側に 4 % fluorogold (FG) を 5 μl 投与し、3 日後に灌流固定し、脳薄切片を蛍光観察した。

RT-PCR 法の逆転写反応は 42 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間で、PCR 反応は変性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、60 秒、アニーリング温度で 60 秒、鎖伸長を 68 $^{\circ}\text{C}$ 、45 秒で行った。

線維芽細胞は 10 % 仔牛胎仔血清を含む DMEM で培養した。胎生 17 日由来大脳皮質ニューロンは無血清で培養した。

C. D. 研究結果と考察

ラット脊髄を完全切断すると後肢運動機能が完全に失われる。しかし、損傷と同時に損傷近傍の組織内に FGF-2 を注入すると、以後明瞭に運動機能の回復が観察された。BBB スケールでは 1 週後から回復がみられ、6 週までより顕著となった。対照群（損傷 PBS 投与群）では全く運動機能の回復は見られず 6 週までに約半数の個体が死亡した。傾斜板上で身体を支えることができる最大角度からも FGF-2 投与群は良好な回復を示した。

下降性神経路の軸索再生は、損傷部尾側に FG を注入しその 3 日後に大脳皮質の蛍光を観察することによって評価した。脊髄非損傷群での蛍光陽性ニューロン数を 100 % とすると、対照群（PBS 投与群）では陽性ニューロンは 0 % であったが、FGF-2 投与群では約 20 % ものニューロンが陽性

となった。FGF-2 投与群では大脳皮質-脊髄路や中脳赤核-脊髄路のかかなりの数の下向性線維が切断部を越えて吻側から尾側へ伸長したことを示している。

損傷組織では FGF-2 による著しい細胞増殖が観察された。内在性神経幹細胞に対する FGF-2 の増殖刺激作用によるものと推定されたが、もともと損傷脊髄内にネスチン陽性細胞は非常に少なく、FGF-2 投与後でもこの傾向は変わらなかった。FGF-2 投与後の損傷組織内で増殖する細胞は、ネスチン陰性で、フィブロネクチン陽性かつ BrdU 取りこみ陽性細胞であり、いわゆる線維芽細胞に近い細胞であると考えられた。そこで、FGF-2 誘導性線維芽細胞 (FGF-2-induced fibroblasts: FIF) と名付け、その特性を調べた。

損傷部位の FIF 細胞集団中には多数の軸索走行が観察された。そこで FIF の性質と起源を明らかにするための検討を行った。通常の脊髄損傷部位では髄膜由来線維芽細胞 (MDF 細胞) が移動、増殖するものの軸索再生は全く起こらない。理由として MDF 細胞には神経突起を忌避、反駁するプロテオグリカン NG2 やセマフォリンが発現しているためと考えられている。しかし FIF は軸索再生を促進する性質をもつと考えられ、実際に NG2 の発現は低レベルであった。そこで FIF と MDF を培養して検討したところ、FIF では NG2 の発現が低く、大脳皮質ニューロンをその上で共培養すると FIF 上では MDF に比べて有意に長い軸索が形成された。以上の結果は、FIF が中枢ニューロンの神経突起の足場として優れた性質を持つことが判明した。健常脊髄内では FIF 細胞の数は決して多くないが、血管に沿った非血管組織に分布する。髄膜由来線維芽細胞が胎生期に実質内へ移動して特化したものか、神経系細胞以外の体性幹細胞由来である可能性も考えられた。今後、この特性をさらに詳細に解析し、軸索再生の促進、脊髄損傷修復に生かしたいと考えている。

E. 結論

本研究により、FGF-2 は軸索再生の促進を伴う優れた脊髄損傷修復効果を示すことが判明した。

この作用には損傷部で増殖する線維芽細胞 FIF が重要な役割を演じていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, Y., Furukawa, S.:

Neurotrophins facilitate production of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase in cultured mouse neural stem cells independently on their neuronal differentiation. *Neurosci Lett*, 339, 231-234 (2003)

Ito, H., Nomoto, H., Furukawa, S.:

The growth arrest of PC12 cells by nerve growth factor is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt pathway via p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci Res*, 72, 211-217 (2003)

2. 学会発表

Jikou, T., Fukumitsu, H., Furukawa, S.:

Administration of FGF-2 into the transected spinal cord enhances axonal regeneration and improves locomotion activity in adult rats. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Niigata, 9, 24-26, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

神経幹細胞の新たな分化誘導法の開発

分担研究者：島崎琢也 慶應義塾大学医学部 生理学 助手

研究要旨： ES 細胞よりレチノイン酸を用いて様々な領域特異性を持った神経幹細胞を自在に分化誘導できるシステムを開発した。

A. 研究目的

ES 細胞は、その多能性と無限増殖能が故に、神経再生を目指した研究および医療技術開発に重要なツールになりつつある。我々、この ES 細胞から、哺乳動物中枢神経系の発生を再現することによって、様々なタイプの神経細胞を自在に分化誘導するシステムの開発を目的として、本研究を行っている。

B. 研究方法

レチノイン酸 (RA) は、脊椎動物の中枢神経系発生において胚の前後軸に沿った領域特異性の獲得、および神経幹細胞の分化に関与していることが知られている。また ES 細胞からの神経細胞の分化誘導を促進することも知られている。そこで、我々の開発したマウス ES 細胞より神経幹細胞を分化させ、選択的に分離培養するシステムにおける、RA の濃度依的な効果を検証した。

マウス ES 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む GMEM 培地中で維持し、分化実験を行った。まず、分散した ES 細胞より浮遊培養系 (10% FBS/a-MEM) によってクローナルに胚様体 (EB) を形成させ、その際に様々な濃度の RA を添加し、6 日までに分散接着培養を行い最終分化を、あるいは、無血清の分散浮遊培養系により、neurosphere の形成を観察した。また、RT-PCR 法、ウェスタンブロット、および免疫細胞化学染色によって各種細胞系譜マーカーあるいは中枢神経系の各領域に特異的な遺伝子の発現を解析した。

C. 研究結果

まず、RA の EB の三胚葉の分化に対する影響を各種マーカーの発現量の変化を指標にして解析してみたところ、RA の濃度依的に、ES 細胞の未分化マーカーである oct-3/4 や内・中胚葉系のマーカーである pdx1, gata4, brachyry そして nkx2.5 の発現が時間とともに低下した。また、上皮のマーカーである ck-17 や神経系前駆細胞

(NPC) のマーカーである Sox1 は低濃度 (10^{-9} – 10^{-7} M) の RA で発現がピークに達し、それ以上の濃度ではそれぞれ発現が低下した。そして、neurosphere 形成によって確認される NPC の出現頻度も同様に低下した。一方、神経前駆細胞に特異的に発現する *ngn2* や、分化したニューロンマーカーである *bIII tubulin* およびアストロサイトのマーカーである GFAP の発現とそれらを発現する細胞の数は RA の濃度依的に上昇した。

次に、EB 中の神経系細胞の領域特異性が、RA によってどのように制御されるのかを知るために、まず、前後軸について、胚の前脳から脊髄に至るまでのそれぞれの領域に特異的な発現を示す、様々なホメオボックス型転写因子群の、様々な RA 濃度における発現パターンを解析した。その結果、RA 非存在下では、前脳から中脳にかけてのマーカーが主に発現していたのが、RA 濃度を上げるにしたがって、菱脳から脊髄のマーカーの発現が上昇し、前脳・中脳のそれらは消失していった。またこれらの EB を分化させ、体性運動ニューロンのマーカーである HB9 と菱脳に特異的な内臓性運動ニューロンのマーカーである Phox2B の免疫染色を行ったところ、Phox2B 陽性ニューロンは低濃度 (10^{-9} – 10^{-7} M) の RA 存在下で形成された EB のみから分化し、HB9 陽性ニューロンは、逆に高濃度 ($>10^{-6}$ M) の RA 存在下で形成された EB から分化したニューロンに多く出現した。次に、背腹軸について、特に胚の菱脳から脊髄にかけて背腹軸に沿った特異的な発現を示す転写因子群の発現パターンを同様に解析した。その結果、低濃度 (10^{-9} – 10^{-8} M) の RA では、腹側、特に *sonic hedgehog* (*shh*) によって発現が上昇する classII 遺伝子群 (*nkx6.1*, *nkx6.2*, *olig2*, *nkx2.2*) の発現が強く、RA 濃度を上げていくにしたがって、それらの発現は著しく低下していき、逆にそれらよりも背側に発現し、*shh* に反応性が無いか、もしくは発現が低下する classI 遺伝子群 (*Pax7*, *dbx1*, *dbx2*, *irx3*) の発現が上昇した。そこで、RA によって *shh* の発現が制御

されているのではないかと考え、shh 遺伝子とタンパク質の発現を解析した結果、驚いたことに、shh 遺伝子とその全長タンパク質の発現は RA 濃度依存的に上昇したものの、その活性型タンパク質である shh-N(自己分解で生成される N 末端側 24-197aa)は低濃度(10^{-9} – 10^{-8} M)の RA 存在下のみで検出された。そこで、この RA による背腹軸の領域下の制御を、shh シグナルの修正によって変化させられるかどうかを、外因性の shh-N および shh シグナルの阻害剤である cyclopamine の添加実験によって確かめた。その結果、高濃度($>10^{-7}$ M)の RA 存在下でも、shh-N の添加によって classII 遺伝子群の発現は上昇し、逆に、低濃度(10^{-9} – 10^{-8} M)の RA 存在下であっても、cyclopamine の添加によってそれらの発現は著しく低下した。

D. 考察

これまで、RA を用いた ES 細胞の神経系細胞への分化誘導はいくつか報告されているが、いずれにおいても、神経系前駆細胞の分化程度や領域特異性の決定についての詳細は解析されていなかった。本研究は、これらの詳細が、自在に必要なタイプのニューロンを得るためには重要であるという考えのもとに進められ、その結果、以下の事が明らかになった。

1) RA は濃度依存的に ES 細胞の神経系への分化を促進するが、同時に幹細胞を含めた神経系前駆細胞のニューロンやグリアへの分化も促進する。2) ES 細胞から EB を形成する際に、RA は濃度依存的に神経系の前後軸を菱脳から脊髓領域に後方化させる。3) RA は、EB の前後軸だけでなく、shh 依存性の背腹軸の決定にも、shh および shh-N の発現を制御することによって関与する。これらの知見は、RA と shh-N を用いることによって、ES 細胞から菱脳から脊髓にかけての前後軸および背腹軸の決定をコントロールしつつ幹細胞を含む様々な神経系細胞を分化誘導できることを示している。

E. 結論

本来、発生期の菱脳から脊髓において領域特異的に分化してくる運動ニューロンなどの特異的なニューロンおよびそれらの前駆細胞を、RA と shh-N を利用して、マウス ES 細胞より効率的に分化させるシステムを確立した。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kokuzawa, J., Yoshimura, S., Kitajima, H., Shinoda, J., Kaku, Y., Iwama, T., Morishita, R., Shimazaki, T., Okano, H., Kunisada, T., Sakai, N.:

Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell Neurosci.* 24, 190-197 (2003)

Shimazaki, T.:

Biology and clinical application of neural stem cells. *Horm. Res.* 60, Suppl 3, 1-9 (2003)

2. 学会発表

Shimazaki, T., Hayakawa, Y., Nishida, K., Hirano, T., Okano, H.:

Roles of Gab1 in the self-renewal and differentiation of neural stem cells. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, July 14, 2003, Prague, Czech Republic

島崎琢也, 岡野栄之:

ES 細胞由来神経幹細胞からの様々なタイプのニューロンの分化 第26回神経科学大会、名古屋、7.24, 2003

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.:

Generation of motor neuron progenitors from mouse embryonic stem cells, Keystone Symposia, Stem Cells (B2), January, 2004, Colorado, USA

他多数

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。

成体霊長類の神経幹細胞の特性

分担研究者 久恒辰博 東京大学大学院先端生命科学 助教授

研究要旨：サル類においても、成体脳内に神経幹細胞が存在し、この細胞から海馬あるいは嗅球において、ニューロンが新しく生み出されていることを立証した。また、海馬におけるニューロン新生の過程を再現するマウスモデル系を確立した。

A. 研究目的

大人の脳内においても、新たにニューロンが生み出されている現象（成体脳のニューロン新生）が見出されて久しい。高齢社会が一段と進行するわが国において、この現象を利用した再生医療工学に人々の期待は高まっている。パーキンソン病や脳梗塞などの脳疾患に対する再生医療においては、疾病により傷害された特定ニューロンを、内在性神経幹細胞を利用して補えばよいのである。具体的に再生医療への展開を考えた場合、脳内のあらゆる箇所、とくに黒質、線条体、大脳皮質などにおいても「脳障害時に、ニューロン再生を誘導しうる治療処置条件を特定」することが強く求められている。本研究では、成体脳内に広く存在するネスチン陽性分裂細胞（成体神経幹細胞の候補）に焦点をあて、霊長類モデルなども用いて、この細胞からニューロンを分化誘導させる条件の特定を目指した。

B. 研究方法

本研究では、成体脳内で、ネスチン陽性細胞を特定するために、ネスチン遺伝子の制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウス（東大院医、山口正洋博士より供与）を使用した。成体海馬でのネスチン陽性細胞の生理膜特性を解析するために GFP-ガイドパッチクランプ法を開発した（慈恵医大、加藤総夫博士との共同研究）。成体大脳皮質に存在するネスチン陽性細胞の分化特性を解析するために、ネスチン陽性細胞の *in vitro* 培養系を開発した。

霊長類における神経幹細胞の挙動を解析するために、3-5 才のニホンザルおよびカニクイザルを使用した（京大・霊長研、三上章允教授との共同研究）。分裂細胞を標識するために核酸アナログであるプロモデオキシウリジンをサルに投与し、この 4 週間後に還流固定の後サルから脳を取り出し、抗体組織染色によりサル脳内におけるニュー

ロン新生を評価した。

C. 研究結果

成体脳内で、神経幹細胞から新しいニューロンが生まれる過程を調査した。成体海馬の歯状回においては、ラジアルグリア様の神経幹細胞より、自然誘発的に PSA-NCAM 陽性のニューロン前駆細胞が生み出され、その後機能的なニューロンへと分化成熟していくことが見出された。我々は、世界に先駆けて、成体海馬における、段階的なニューロン新生機構を発見した。

我々は、成体大脳新皮質部位においても、極めて驚くことに、ネスチンを発現する分裂細胞が相当な頻度で存在していることが見出した。この細胞は、海馬の場合とは異なり、ラジアルグリア様というよりはむしろオリゴデンドロサイト前駆細胞としての性質を併せ持っていた。このネスチン陽性細胞を *in vitro* 系で培養することにより、GABA 陽性ニューロンが自然誘発的に分化誘導されることを認めた。さらに、この分化誘導はニューラル bHLH 転写因子の遺伝子導入により、顕著に促進されることが見出した。

成体霊長類（カニクイザル）の脳内における神経幹細胞の挙動ならびにニューロン新生の程度を明らかにするために、プロモデオキシウリジンを投与したサルを用いた抗体組織染色を行った。健康状態のサル脳内において、海馬あるいは側脳室領域で、神経幹細胞の分裂が認められ、海馬および嗅球において新生ニューロンの存在が確認された。大脳新皮質部位においても分裂細胞は多く認められたが、ニューロン新生を示す証拠は得られなかった。

D. 考察

本研究において、非ヒト霊長類モデルであるマカクザル（カニクイザルやニホンザルなど）においても、成体脳内で神経幹細胞が分裂し、ニューロンを生み出していることが立証された。今後、

病態モデルを用いた研究が必要となるが、内在性神経幹細胞を利用した変性脳疾患の治療が近い将来現実化することは想像に難くない。

E. 結論

サルの脳内においても、ニューロンが新生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

Koketsu, D., Mikami, A., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.:

Non-renewal of neurons in the cerebral neocortex of adult Macaque monkeys" J. Neurosci. 23, 937-942 (2003)

Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.:

Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus" J. Neurosci. 23, 9357-9366 (2003)

Yoshida, N., Hishiyama, S., Yamaguchi, M., Hashiguchi, M., Miyamoto, Y., Kaminogawa, S., Hisatsune, T.:

Decrease in expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells" Exp. Cell Res. 287, 262-271(2003)

Okada, H., Miyakawa, N., Mori, H., Mishina, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.:

NMDA receptors in cortical development are essential for the generation of coordinated increases in $[Ca^{2+}]_i$ in "Neuronal Domains" Cerebral Cortex 13, 749-757 (2003)

2. 学会発表

松村直人、大田綾、村松大、宮本有正、久恒辰博 :

Lineage potential of cycling cells from adult cerebral cortex" 第26回日本神経科学大会、名古屋、7.23-25, 2003.

大田綾、瀬瀬大輔、松村直人、宮本有正、久恒辰博 :

Nestin-positive progenitor cells proliferate in the adult mouse cerebral neocortex" 第26回日本神経科学大会、名古屋、7.23-25, 2003.

Yusuke, Tozuka, Satoshi, Fukuda, Mika, Yoshida,

Yusei, Miyamoto, Tatsuhiko, Hisatsune.:

Earliest electrical connections between proliferating

neuronal progenitors and mature circuit through GABAergic system in adult dentate gyrus" 33rd annual meeting of society for neuroscience, New Orleans, Nov. 8-12, 2003.

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

ES 細胞移植による中枢神経機能再生

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講師

研究要旨：カニクイザル ES 細胞を PA6 というマウス骨髄由来のフィーダーで培養することによって高率にドーパミン産生ニューロンを誘導した。その細胞をパーキンソン病モデルカニクイザルの脳に移植することによって、ドーパミン産生ニューロンの生着と神経症状の改善を得ることに成功した。

A. 研究目的

神経難病に対する細胞移植療法において神経幹細胞や ES 細胞に対する期待がよせられている。我々は、特にカニクイザル由来の ES 細胞を用いて、神経分化誘導条件の至適化と細胞移植後の効果と安全性の評価を目的として以下の実験を行った。

B. 研究方法

対象疾患は、すでに胎児神経組織移植で一定の成果が得られており、しかも動物モデルが確立しているパーキンソン病を選んだ。パーキンソン病は黒質から線条体に投射するドーパミン神経が脱落するために固縮や無動、振戦などが起こる病気である。

そこで、まず ES 細胞からのドーパミン神経誘導を試みた。すでに PA6 というマウス骨髄由来のフィーダー上で培養することによってマウス、サル ES 細胞からドーパミン神経が誘導されることは報告されていたが、我々はさらに FGF2 と FGF20 を作

用させた。
つづいて、MPTP というドーパミン神経に特異的な神経毒を投与することによって、カニクイザルのパーキンソン病モデルを作成した。そして、上記方法でドーパミン神経へと誘導した細胞をモデルサルの脳（線条体）に移植し、神経症状と F-dopa の取り込み、移植細胞の生着と分化を評価した。

動物実験は、医学研究科の動物実験委員会の承認を得たのち、その指針に準拠して行った。

C. 研究結果

カニクイザル ES 細胞を PA6 の上で約 2 週間培養すると、多くの細胞が神経系細胞のマーカーである Musashi や NCAM を発現するようになった。この時点で、細胞を PA から剥がして FGF2 や N2 supplement を含む無血清培地で培養すると、細胞は sphere 状態で増殖した。

この sphere を 1 週間培養したのちにポリオルニチン/ラミニンでコートした培養皿にまき直し、FGF2 を除去した培地で培養すると、細胞は分化し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが出現した。さらに、TH（チロシン水酸化酵素）陽性のドーパミン神経のみならず、ChAT 陽性のコリン神経、GABA 陽性の GABA 神経なども出現した。

この際、ドーパミン神経は全神経の約 8% であるが、sphere 培養の時期に FGF2 に加えて FGF20 も添加することによって、ドーパミン神経の割合は約 24% にまで増加した。この効果は FGF20 単独ではみられず、FGF2 と FGF20 の両方が必要であった。

カニクイザルのパーキンソン病モデルは MPTP を 0.4mg/kg ずつ繰り返し静脈注射することによって作成した。カニクイザルの姿勢、運動量、振戦などをスコア化し、スコアが悪化しはじめた時点で投与を中止してスコアが 3 か月以上安定したサルを実験に用いた。各サル毎に MRI を撮影して線条体の位置を確認し、両側に PA6 および FGF2/FGF20 で処理した ES 細胞を移植した (N=6)。コントロール群 (N=4) は培養液のみを注入した。移植には関

わからなかった研究者が、移植群かコントロール群かを知らされずに各サル症状のスコア化を行い、それらを経時的に比較検討した。すると、移植群においては徐々にスコアの改善がみられるようになり、移植後 10 週目に有意な改善が認められた。14 週後まで観察したが、この改善は維持された。

その後、F-dopa の取り込みを PET にて評価した。コントロール群においては F-dopa の取り込みが低下しているのに対し、移植群においては有意な上昇がみられ、移植細胞がドーパミン神経として機能していることが確認された。

PET study 後にカニクイザルの灌流固定を行い、脳切片の染色を行った。移植に先立ち細胞を BrdU でラベルしたが、移植群の線条体において BrdU 陽性細胞の生着がみとめられた。さらに TH 陽性細胞や DAT (ドーパミントランスポーター) 陽性細胞も確認された。これらの多くは BrdU と共陽性であり、移植された ES 細胞由来のドーパミン神経であると考えられた。また、少なくとも 14 週間後の観察においては分裂細胞 (Ki67 陽性細胞) や腫瘍形成は認められなかった。

D. 考察

移植の前に ES 細胞をフィーダーから剥がして sphere で培養することは、PA6 や非神経系細胞の混入を減らすことに有用である。また、FGF2/FGF20 によるドーパミン神経誘導法も有用であると思われる。

今回の移植では片側につき約 2100 個の TH 陽性細胞が生着していた。これは、大きさからの類推では、ヒトの患者さんへの胎児神経移植で効果の見られていた最低ラインの数字であった。が、スコア上では症状の改善がみられ、胎児神経移植と同等の効果は期待できると思われる。しかし、生着率は約 2% と低く、この改善が必要である。また、今回の実験では見られなかったが、腫瘍形成能を免疫不全動物への移植で確認する必要がある。

E. 結論

カニクイザル由来 ES 細胞からドーパミン神経を誘導して線条体に移植する方法は、パーキンソン病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

Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., Hashimoto, N.:

Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J. Neurosci. Res.* 75 :6, 817-824 (2004)

Toda, H., Tsuji, M., Nakano, I., Kobuke, K., Hayashi, T., Kasahara, H., Takahashi, J., Mizoguchi, A., Houtani, T., Sugimoto, T., Hashimoto, N., Palmer, TD., Honjo, T., Tashiro, K.:

Stem cell-derived neural stem/progenitor cell supporting factor (SDNSF) is an autocrine/paracrine survival factor for neural stem/progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 278:32, 35491-35500 (2003)

2. 学会発表

高木康志、高橋 淳ら:

霊長類 ES 細胞由来ドーパミン産生神経細胞の
霊長類パーキンソン病モデルへの移植 (第 62 回脳神経外科学会総会、2003. 10. 3、仙台)

Takagi Y, Takahashi J., et al.:

Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cell-derived neural progenitors survive and function in a primate model of Parkinson's disease (33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov. 9. 2003, New Orleans)

他多数

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし