

20030838

厚生労働科学研究費補助金

（難治性疾患克服研究事業）

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究

平成15年度 研報告書

主任研究者 桜川宣男

平成16年(2004)3月

目次

I. 総括研究報告	
ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究	1
桜川宣男	
II. 分担研究報告	
1. ヒト羊膜間葉細胞由来幹細胞の同定、分離・培養と神経細胞への分化誘導	8
桜川宣男	
2. 脳神経系の発生・分化に関わる遺伝子とその発現	11
御子柴克彦	
3. 試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究	14
浅島 誠	
4. DNA マイクロアレーを用いた成人型、乳幼児型 Krabbe 病培養線維芽細胞発現遺伝子解析	17
古谷博和	
5. 重症心身障害児病棟・施設におけるライソゾーム病患者に関するアンケート調査	19
青木継稔	
III. 研究成果の薄幸に関する一覧表	22
IV. 平成15年度研究班会議抄録集	26
(1) ライソゾーム病の脳病変に対するヒト羊膜細胞由来幹細胞による移植法の開発研究	29
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座	桜川宣男
(2) ヒト羊膜細胞 (SP) 細胞における神再生研究	30
順天堂大学医学部脳神経外科	阿部祐介、屋田 修、新井 一
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座	桜川宣男
(3) 試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究	31
東京大学大学院総合分化研究科	福井彰雅、浅島 誠
(4) 小脳におけるニューロン形成と縦溝状の区画化	32
東京大学医化学研究所、理化学研究所	御子柴克彦
理化学研究所	橋本光弘
(5) 酵母で産生した α -ガラクトシダーゼのファブリ病モデルマウスへの投与効果	33
東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 臨床遺伝学	桜庭 均
(6) DNA マイクロアレーを用いた成人型、乳幼児型 Krabbe 病培養線維芽細胞発現遺伝子解析	34
九州大学大学院医学研究科脳神経病研究施設神経内科	古谷博和、新納信江、吉良潤一
(7) 神経幹細胞を用いたムコ多糖症VII型マウスの中脳神経病変に対する細胞治療	35
国立成育医療センター遺伝診療科	奥山虎之
(8) ヒト組換え β -ヘキササミニダーゼと Sandhoff 病モデル系を用いた新規酵素補充療法の開発	36
徳島大学薬学部付属医薬資源教育研究センター 環境生物工学分野	伊藤孝司
(9) 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの原因遺伝子と分子病態	37
国立精神・神経センター	西野一三、野口 悟、埜中征哉

(10) ムコ多糖症の新生児スクリーニングに関する研究	-----	38
岐阜大学医学部		磯貝光治、下沢伸幸、折居忠夫
セントルイス大学		戸松俊治
生化学工業		加藤 俊、宮浦俊一、岡村和夫
国立成育医療センター		奥山虎之、松尾宣武
(11) 重症心身障害児病棟・施設におけるライソゾーム病患者に関するアンケート調査	-----	39
東邦大学医学部		清水教一、青木継稔
東京小児療育センター		松田光展、桜川宣男
東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座		桜川宣男
(12) ライソゾーム病の「包括的遺伝診療サポートシステム」の構築	-----	40
(株) エスアールエル学術部、医化学分析センター		横山安伸、田部美穂
(13) 遺伝子導入ヒト羊膜細胞による Sandhoff 病モデルマウスの治療研究	-----	41
北里大学医学部 微生物学		北里英郎

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総括研究報告）

ライソゾーム病の病態の解明及び治療法の開発に関する研究

（主任研究者） 桜川宜男 東邦大学医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 客員教授

研究要旨

ライソゾーム病の中枢神経障害に対する新しい治療法の開発研究を行った。ヒト羊膜由来幹細胞（SP 細胞）の分離・培養に成功し、種々の幹細胞の特徴について検討した。モデル動物の脳内にその細胞を移植して有効性を証明した。この SP 細胞は複数のライソゾーム酵素を豊富に含有することが判明したことより、幹細胞の脳移植法はライソゾーム病の脳病変に有効であることが示唆された。基礎研究として、神経発生に関する遺伝子の解析、シグナル伝達系の解明および細胞発生時期のマーキングに大きな進歩がみられた。幹細胞の細胞分子学的研究に大きな情報となる。そして試験管（in vitro 系）の中でマウス ES 細胞を用いて、様々な器官形成や組織形成の独自の系を開発し、新規の遺伝子の解析に大きな進歩をみた。ライソゾーム病の患者さんの QOL に関するアンケート調査を、全国の重症心身障害児施設を対象にして行った。47 名（大島分類 1）が存在し、社会資源の活用、開発がおこなわれていることが判明した。ライソゾーム病の診断技術を大学研究施設より民間検査会社に技術移転を行った。その結果、17 種類の酵素診断について全国の医療施設からの注文に応じることが可能となった。

〔主任研究者〕

桜川宜男 東邦大学医学部 教授

〔分担研究者〕

御子柴克彦 東大医科学研究所 教授

浅島 誠 東大院総合文化研究科 教授

青木 継稔 東邦大学 学長

古谷 博和 九大脳神経病研究施設 講師

〔協力研究者〕

奥山 虎之 国立成育医療センター 医長

桜庭 均 東京都臨床医学研究科 部長

磯貝 光治 岐阜大学医学部 講師

横山 安伸 (株) エスアールエル 部長

西野 一三 国立精神神経センター 部長

伊藤 考司 徳島大学薬学部 教授

北里 英郎 北里大学医学部 講師

新井 一 順天堂大学医学部 教授

A. 研究目的

ライソゾーム病は、水酸化酵素の先天的欠損による遺伝子代謝病である。最近ではライソゾーム膜の先天異常に関する概念も含まれるようになってきている。最近の酵素診断、遺伝子診断技術の進歩により、若年～成人発症する症例が知られるようになった。治療面では酵素補充療法により腹部型の Gaucher 病などは緩解するようになり、患者さんの生活の質（QOL）の向上が問題となってきている。しかし中枢神経症状を呈する疾患群については、今だ根治療法は確立していない。そこで本研究班は、（1）治療法開発の研究。（2）病態解

明、（3）臨床研究の三グループの構成とした。そしてライソゾーム病の病態を解明し、新しい治療法を開発することにより患者さんの QOL の改善に資することを目的とする。

B. 研究方法

つぎの 3 グループによる研究を施行した。

（1）治療法開発の基礎研究グループ：

桜川は、予定帝王切開分娩のときに提供される胎盤より羊膜を機械的に剥離した。羊膜を 2 段階酵素処理法により、羊膜上皮細胞と羊膜間葉細胞に分離・培養した。細胞分離装置により、幹細胞である side population (SP) 細

胞の分離・培養に成功した。これらの細胞を用いて、神経細胞および骨細胞への分化誘導実験を行った。そして免疫染色および遺伝子解析を行った。SP 細胞の各種ライソゾーム酵素活性を測定し、ラット脳内への移植実験を行った。協力研究者とは、モデル動物（パーキンソンモデルラット、ムコ多糖Ⅶ型マウスなど）への脳移植の治療実験を行った。

御子柴は、3) 小脳プルキンエ細胞の運命決定：アデノウイルスベクターを用いて胎生期マウス小脳の各ステージでアデノウイルスベクターに組み込んだマーカーを利用して解析を進めた。

浅島は、両性類胚のアニマルキャップは、未分化細胞の塊であり、そこから試験管内で様々な臓器や組織をつくり出すことを独自に開発してきた。本研究ではアクチビン処理細胞から単離した新規遺伝子の機能解析に器官形成のメカニズムの解明に成功した。誘導のシグナル伝達の重要な TGF- β 系と Wnt 系に関わる新規遺伝子の単離と解析に成功した。またマウスの ES 細胞を用いて、試験管内でいくつかの組織を作り出すことに成功した。

青木は、全国重症心身障害児病棟と公法人立重症心身障害児施設（計 180 施設）に対して、「ライソゾーム病の QOL に関するアンケート調査」を行った。入所・入院か在宅か、入所・入院期間、罹病期間、治療状況、種々の手帳の取得状況、在宅診療の状況等についてアンケートを作成した。これを患者への説明書、調査の同意書と一緒に配付した。さらに全国の大学病院および小児医療総合施設を対象にして、同様の調査を行っている。

古谷は Krabbe 病について、乳児型と成人型の発現遺伝子の差異を DNA マイクロアレーを用いて検討した。また臨床型と遺伝子型との相違についても酵素診断方法の検討を行った。

協力研究者においては、「ライソゾーム病の包括的遺伝診断サポートシステムの構築」を行った。具体的には、ムコ多糖症の尿スクリーニングと酵素活性測定体制を構築し、民間検査会社に技術移転して全国の依頼に対応できるようにした。さらに Krabbe 病についても、ガラクトセレブロシダーゼの酵素活性測定検査体制を構築し、依頼検査を始めた。治療法の開発研究については、ムコ多糖症Ⅶ型に対する細胞療法、Fabry 病と Sandhoff 病に対する酵素補充療法について研究を行った。そして Danon 病、Fabry 病についての分子病態解

明を行った。

研究班の3年間のまとめとして、ライソゾーム病 30 種類についての診断フローチャートを完成し、ライソゾーム病診断ガイドラインを作成中である。

（倫理面への配慮）

ヒト羊膜に関する研究は、東邦大学医学部倫理委員会の承認をえて行われている。分娩後の胎盤を使用するにあたり、帝王切開分娩が予定されている妊婦さんにインフォームドコンセントを施行する。そして「ヘルシンキ宣言」の趣旨にそって、胎盤提供者の不利益にならないように配慮し、胎盤を目的以外には使用しないことを確約している。モデル動物の実験には動物愛護上を配慮し、組み換え DNA 実験と同様に各研究施設の施設内倫理委員会（IRB）における承認を得て、研究を進めている。QOL のアンケート調査は、東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果及び考察

桜川は、羊膜間葉細胞は BrdU+/vimentin+/nestin+/ Musashi1+ の特徴を持ち、nestin と Musashi1 の遺伝子が発現していることを証明した。神経細胞への分化誘導実験により、nestin, Musashi1 に陽性に染色される複数の長い突起をもつ細胞が、neurofilament M, NeuD に陽性であることが判明した。また羊膜間葉細胞から細胞分離装置を用いて SP 細胞を分離・培養した。この細胞は幹細胞の類似の増殖曲線を示し、CK19+/vimentin+/nestin+ の特徴を呈した。また Oct 4, Rex 1, nestin, Musashi1 の遺伝子を発現している幹細胞の特長を証明した。SP 細胞は 17 種類のライソゾーム酵素活性を持ち、とくに β -glucosidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase, heparan-N-sulfatase の活性が対象の 400~800% の高値を示していた。SP 細胞をラットの脳内に移植すると、反対側に広く移植細胞が遊走している像を観察した。以上より、羊膜間葉細胞には神経幹細胞が存在し、分離した幹細胞である SP 細胞にはライソゾーム酵素を豊富に含有していることが証明された。ムコ多糖症のモデルマウスへの移植実験やラット脳内への移植実験により、ライソゾーム病の中樞神経症状の治療目的で、ヒト羊膜由来の幹細胞の脳移植が有望であることが証明された。

御子柴は、脳を構成する神経細胞は、脳室面に沿って存在する神経幹細胞より発生・分

化してくる。神経幹細胞より発生した神経細胞は、いつ神経幹細胞より発生したか（神経細胞の誕生日）によって、その神経細胞がどのような性質を持ち、脳内においてどの構造体を形成するかという三次元的な位置情報が決定される。そこでアデノウイルスベクターを用いることにより、トリチウム・チミジンや BrdU 同様、神経細胞の誕生日特異的に、神経細胞へ遺伝子を導入することができることを明らかにした。アデノウイルスベクターで遺伝子が導入された神経細胞は、正常に発生・分化し、その誕生日に従って脳組織を構築する。この技術を用いれば、同一の誕生日を有する神経細胞群へ、個別に遺伝子を導入することができる。また、この技術は、今まで解析不可能であった、誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構を詳細に解析することを可能にした。

浅島は、マウスの未分化細胞（ES 細胞）を用いて、試験管内の器官形成についても試みた。マウスの ES 細胞を用いて、RA（レチノイン酸）のアンタゴニストを用いて拍動する心臓や骨格筋をつくることにも成功した。この時、非常に高い効率で分化誘導された。そして、心筋特異的抗体でも染色が可能であることが明らかとなった。また、内分泌や外分泌細胞などを含めた隣細胞の形成がはじめて確認された。次に、新規の遺伝子の更なる解析を行った。ゲノム解析のために、2 倍体のゲノムをもつ *Xenopus tropicalis* 初期発生の分子生物学的解析も行った。初期発生の最も早い時期に発現する *Nodal-5* と *6* (*Xnr-5*, *Xnr-6*) の他に、これらの遺伝子ファミリーに属すると考えられる *Xnr-3* がクローニングされた。そして、*Xnr-3* の解析を進めるために *morpholino oligo* や *cleavage mutant* を使って調べた結果、*Xnr-3* の分泌される時に切り離される *pro-region* の部分が、他の TGF- β 遺伝子の活性を制御していることが確認された。また、私たちは生殖細胞に局在する遺伝子 *Xtdl* を単離して、その局在や発現を制御するゲノムの上流解析を行った。

Wnt 系の細胞内情報伝達系はいままで多くの人によって研究されているが、広大・菊池教授らとの共同研究によって、*Idax*、*Axam*、*Casein Kinase 1 ϵ* 、*Protein Phosphatase 2A* (PR61 subunit)、*duplin* など新しくクローニングしてその機能解析を行った。新規の ELL 遺伝子と 29B 遺伝子のクローニングと解析がなされた。これらは *Axam* と結合しており、ELL 遺

伝子は正の制御を、29B 遺伝子は負の制御をしていることを示したこのことによって、胚発生において大きな役割を担っていると思われる Wnt 系の働きについて一部明らかにした。そして、TGF- β や Notch シグナル系とのクロストークの関連性の実験もなされた。

青木は、全国の重症心身障害児病棟および公法人立重症心身障害児施設（180 施設）を対象として、ライソゾーム病患者の生活の質（QOL）に関するアンケート調査を施行した。アンケートの回答率は 51%、患者数は 47 例であった。サンフィリッポ症候群（11 例）、セロイドリポフスチノーシス（11 例）、ハンター症候群（7 例）が多く、特定疾患対策事業の対象患者は 28 例（59.6%）であった。在宅機能訓練を受けている症例は 57.1%と多いが、在宅診療、通園事業、支援費制度を利用している患者の割合が少なかった。手帳では、特定疾患の登録済みは 3 例（10.7%）と少なかった。ライソゾーム病の QOL の改善には、特定疾患対策事業の啓蒙や、在宅患者への社会資源に関する情報提供、および資源の活用が重要であると考えられた。

古谷は、DNA マイクロアレーを用いて、培養線維芽細胞における遺伝子発現実験を行った。乳児型と成人型の間で発現量に差の認められた数種類の遺伝子を見出した。臨床型と遺伝子型との相関を調べるうえで重要な研究である。また人工基質による酵素診断法の有用性について検討し、民間検査会社に技術移転を行った。

協力研究者の業績：ムコ多糖症の酵素診断と尿中ムコ多糖の測定を、民間の検査会社に技術移転し、全国レベルでの需要に応じる体制を構築した。また *Krabbe* 病の酵素診断も同様に可能となった。この結果、大学レベルでサービスとして行っていた 17 種類のライソゾーム病の酵素診断について、一ヶ所の検査会社において信頼のある検査結果が得られるシステムが樹立された。血液ろ紙を用いるムコ多糖症の新生児マススクリーニングの検査法を、ケラタン硫酸を用いる方法が有効であることを証明した。今後の実用化に期待が持てる。ファブリ病の治療薬として、酵母で産生した α -ガラクトシダーゼがファブリ病モデルマウスへの酵素補充療法として有効であることを証明した。3 種類のライソゾーム性筋疾患の分子病態解明に関する研究を行った。LAMP-2 欠損の *Danon* 病には遺伝学的に異なる複数の病型を発見した。

D. 結論

ライソゾーム病の中樞神経障害に対する新しい治療法の開発研究として、ヒト羊膜由来幹細胞の分離・培養に成功し、モデル動物実験により、脳内へのその細胞移植法の有効性を証明した。サルの脳内移植実験を予定しており、近い将来の臨床応用にむけて大きな成果となった。基礎研究として、神経発生に関する遺伝子の解析、シグナル伝達系の解明および細胞発生時期のマーキングに大きな進歩がみられた。幹細胞の細胞分子学的研究に大きな情報となる。そして試験管 (in vitro 系) の中で胞胚期のアニマルキャップ (未分化細胞塊で多能性をもっている) を用いて、そこから様々な器官形成や組織形成の独自の系を開発した。この技術を応用して、ヒト羊膜由来幹細胞を用いた人工臓器の作出を検討しているが、大きな期待が持てる。ライソゾーム病の患者さんの QOL に関するアンケート調査を、全国の重症心身障害児施設を対象に行なった。診断フローチャートとともに、ライソゾーム病ハンドブックの作成に取りかかっている。またライソゾーム病の診断技術を大学研究施設より民間検査会社に技術移転を行なった。その結果、17種類の酵素診断について全国の医療施設からの注文に応じることが可能となった。遺伝子診断についても、技術移転を検討中である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horikoshi T, Fujii T, Kawashima K, Sakuragawa N: Acetylcholine increase in amniotic fluid of experimental rats for intrauterine growth retardation. *Life Sci* 72: 2145-2149, 2003.
- 2) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 342: 61-64, 2003.
- 3) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 344(3) 157-160, 2003
- 4) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N: Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* 341: 1-4, 2003
- 5) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in human placenta amniotic epithelial cell. *Placenta* 24(6): 658-663, 2003
- 6) Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T: Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 980: 48-56, 2003
- 7) Pipo JR, Feng J-H, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K: New GAA mutations in Japanese patients with GSD II (Pompe disease). *Ped Neurol* 29: 284-287, 2003
- 8) Ogawa A, Terada S, Sakuragawa N, Masuda S, Nagao M, Miki M: Progesterone, but not 17 β -estradiol up-regulates erythropoietin (EPO) production in human amniotic epithelial cells. *J Biosci Bioeng* 96: 448-453, 2003.
- 9) Zhang, S., Mizutani, A., Hisatsune, C., Higo, T., Bannai, H., Nakayama, T., Hattori, M. & Mikoshiba, K.: Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 to the basolateral membrane domain in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 278(6), 4048-4056 (2003)
- 10) Ando, H., Mizutani, A., Matsuura, T. & Mikoshiba, K.: IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J Biol Chem* 278 10602-10612 (2003)
- 11) Yasuda, H., Higashi, H., Kudo, Y., Inoue, T., Hata, Y., Mikoshiba, K. & Tsumoto, T.: Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience* 17 287-297 (2003)
- 12) Saneyoshi, T., Kume, S., & Mikoshiba, K.: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 499-507 (2003)
- 13) Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamoto, T. & Akagawa, K.: Expression of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is enhanced by phorbol-ester stimulation in astrogloma: participation of the PKC signaling pathway. *FEBS Letters* 536 209-214

- (2003)
- 14) Park, T.-J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K. & Nukina, N.: Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 671-678 (2003)
 - 15) Shiraishi, Y., Mizutani, A., Mikoshiba, K. & Furuichi, T.: Coincidence in dendritic clustering and synaptic targeting of homer proteins and NMDA receptor complex proteins NR2B and PSD95 during development of cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neuro.* 22 188-201 (2003)
 - 16) Aruga, J. & Mikoshiba, K.: Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neuro.* (in press) (2003)
 - 17) Nagase, T., Ito, K.-I., Kato, K., Kaneko, K., Kohda, K., Matsumoto, M., Hoshino, A., Inoue, T., Fujii, S., Kato, H., & Mikoshiba, K.: Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP₃ type 1 receptor. *Neuroscience* 117 821-830 (2003)
 - 18) Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurosawa, M., Rafael A.F., Yoshida, N., Mikoshiba, K. & Takenawa, T.: Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biology* 161 79-88 (2003)
 - 19) Yamamoto, T., Sakakibara, S., Mikoshiba, K. & Terashima, T.: Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of yotari and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 461 61-75 (2003)
 - 20) Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K.: Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 278(19) 16551-16560 (2003)
 - 21) Hirota, J., Ando, H., Hamada, K. & Mikoshiba, K.: Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *Biochem. J.* 372 435-441 (2003)
 - 22) Sandona D., Scolari, A., Mikoshiba, K. & Volpe, P.: Subcellular distribution of Homer 1b/c in relation to endoplasmic reticulum and plasma membrane proteins in Purkinje neurons. *Neurochem Res.* 28(8) 1151-1158 (2003)
 - 23) Fujii, S., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Taufiq, M. A. & Kato, H.: Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Res.* 46 509-521 (2003)
 - 24) Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S. & Mason, C.A.: Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114 545-557 (2003)
 - 25) Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R.: Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 62-69, 2003
 - 26) Anizumi T. and Asashima, M.: From field to gel blot: teaching a holistic view of developmental phenomena to undergraduate biology students at the University of Tokyo. *Int. J. Dev. Biol.*, 47, 93-97, 2003
 - 27) Yabe, S., Tanegashima, K., Haramoto, Y., Takahashi, S., Fujii, T., Kozuma, S., Taketani, Y. and Asashima, M.: FRL-1, a member of the EGF-CFC family, is essential for neural differentiation in *Xenopus* early development. *Development*, 130, 2071-2081, 2003
 - 28) Yokota, C., M. Kofron, M. Zuck, D. W. Houston, H. Isaacs, Asashima, M., C. C. Wylie and J. Heasman: A novel role for a nodal-related protein; Xnr3 regulates convergent extension movements via the FGF receptor. *Development*, 130, 2199-2212, 2003
 - 29) Fukui, A., Komazaki S., Miyoshi, O. and Asashima, M.: Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes. *Develop. Growth Differ.*, 45, 113-119, 2003.
 - 30) Sogame, A., Hayata, T. and Asashima, M.: Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes. *Develop. Growth Differ.*, 45, 113-119, 2003
 - 31) Hino, S., Michiue, T., Asashima, M. and Kikuchi, A.: Casein kinase I ϵ enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 278(16), 14066-14073, 2003
 - 32) Kaneko, T., Chan, T., Satow, R., Fujita, T., and Asashima, M.: The isolation and characterization

- of XC3H-3b: a CCCH zinc-finger protein required for pronephros development. *B. B. R. C.*, 308, 566-572, 2003
- 33) Kyuno, J.-I., Fukui, A., Michiue, T., and Asashima, M.: Identification and characterization of *Xenopus* NDRG1B. *B. B. R. C.*, 309, 52-57, 2003
- 34) Okabayashi, K. and Asashima, M.: Tissue generation from amphibian animal caps. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13, 1-6, 2003
- 35) Tanaka, M., Asashima, M., and Atomi, Y.: Proliferation and differentiation of *Xenopus* A6 cells under hypergravity as revealed by time-lapse imaging. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 39, 71-79, 2003
- 36) Asashima, M., and Okabayashi, K.: Current state of and outlook for organogenesis from undifferentiated cells. *CORNEA*, 22(7), 2-12, 2003
- 37) Emura, T., Hashizume, K., and Asashima, M.: Experimental study of the embryogenesis of gastrointestinal duplication and enteric cyst. *Pediatr. Surg. Int.*, 19(3):147-151, 2003
- 38) Anizumi, T., Kinoshita, M., Yokota, C., Takano, K., Fukuda, K., Moriyama, N., Malacinski, G. M., and Asashima, M.: Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int. J. Dev. Biol.*, 47, 405-410, 2003
- 39) Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakamura, Y., Yokota, T., Asashima, M., and Koide, H.: Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313(3), 475-481, 2004
- 40) Sedohara, A., Komazaki, S., and Asashima, M.: In vitro induction and transplantation of eye during early *Xenopus* development. *Develop. Growth Differ.*, 45(5/6), 463-471, 2003
- 41) Fukui, Y., Furue, M., Myoishi, Y., Sato, J., Denry, Okamoto, T., and Asashima M.: Long-term culture of *Xenopus* presumptive ectoderm in a nutrient-supplemented culture medium. *Develop. Growth Differ.*, 45(5/6), 499-506, 2003
2. 学会発表
- 1) 斎藤美雪, 中園宏紀, 竹下由紀子, 山口之利, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病における家族内検索の意義とその方法に関する検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2003 年 4 月
- 2) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 岡田光正, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病の遺伝子診断, 日本人症例における変異の特徴に基づく方略の検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2003 年 4 月
- 3) 清水教一, 竹下由紀子, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔: Wilson 病マスキングにて発見された症例の診断確定までの方略に関する検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2003 年 4 月
- 4) 渡辺温子, 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 四宮範明, 青木継稔: Menkes 病の早期診断法としての ATP7A 遺伝子解析の有用性に関する検討. 第 106 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2003 年 4 月
- 5) 山口之利, 藤井秀樹, 渡辺温子, 竹下由紀子, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔, 玉井浩, 有馬正高: ウイルソン病友の会, 活動の現状. 第 106 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2003 年 4 月
- 6) 藤井秀樹, 水口浩一, 渡辺温子, 山口之利, 清水教一, 青木継稔: 経過中に汎血球減少を呈した Wilson 病の一例. 第 7 回ウイルソン病研究会, 東京, 2003 年 5 月
- 7) 竹下由紀子, 渡辺温子, 山口之利, 清水教一, 青木継稔: 精神症状にて発症した Wilson 病の一例. 第 7 回ウイルソン病研究会, 東京, 2003 年 5 月
- 8) 足立玲, 二瓶浩一, 山口之利, 竹下由紀子, 清水教一, 加藤尚之, 青木継稔: 血清セルロプラスミン値が正常値を示したため診断確定に苦慮した Wilson 病の幼児例. 第 7 回ウイルソン病研究会, 東京, 2003 年 5 月
- 9) 植村泰子, 大石悟, 竹下由紀子, 山口之利, 清水教一, 青木継稔, 中島敏雄: 神経症状発症から数年後に Kayser-Fleischer 角膜輪発見を契機に診断された肝神経型 Wilson 病の一例. 第 7 回ウイルソン病研究会, 東京, 2003 年 5 月
- 10) 渡辺温子, 竹下由紀子, 清水教一, 青木継稔, 逸見仁道, 嶋武博之: Menkes 病の遺伝子解析および遺伝子診断に関する研究. 第 7 回ウイルソン病研究会, 東京, 2003 年 5 月
- 11) 清水教一, 四宮範明, 青木継稔: ビリルビン透析療法および肝移植にてビリルビン脳症が改善した Crigler-Najjar 症候群 type I の 1 例. 第 45 回日本小児神経学会総会, 福岡, 2003 年 5 月
- 12) 竹下由紀子, 清水教一, 山口之利, 四宮範明, 青木継稔: 精神症状にて発症し日本人に希な ATP7B 遺伝子変異を有する Wilson 病症例. 第 45 回日本小児神経学会総会, 福岡, 2003 年 5 月
- 13) 足立玲, 二瓶浩一, 竹下由紀子, 山口之利, 清水教一, 加藤尚之, 青木継稔: 血清セルロプラスミン値が正常を示した Wilson 病の幼児例. 第 14 回日

本微量元素学会, 大阪, 2003年7月

14) 竹下由紀子, 清水教一, 逸見仁道, 嶋武博之, 青木継稔: 遺伝子診断が有用であった Wilson 病の 2 家系. 第 14 回日本微量元素学会, 大阪, 2003年7月

15) 清水教一, 青木継稔: 神経症状を呈した Wilson 病症例に対する銅キレート薬治療に関する研究. 第 30 回日本小児臨床薬理学会, 大阪, 2003年9月

16) 清水教一, 山口之利, 中山憲司, 市原侃, 田村正秀, 福土勝, 藤田晃三, 高橋勉, 高田五郎, 鈴木健, 北川照男, 青木継稔: Wilson 病マススクリーニングの意義と有効性に関する検討. 第 50 回日本小児保健学会, 鹿児島, 2003年11月

17) 足立玲, 渡辺温子, 竹下由紀子, 山口之利, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔: 幼若児 Wilson 病早期発見のための遺伝子解析等による家族内検索の有用性について. 第 50 回日本小児保健学会, 鹿児島, 2003年11月

18) 竹下由紀子, 清水教一, 四宮範明, 青木継稔: 長期投与が必要である慢性疾患の服薬指導に関する検討, Wilson 病症例を中心として. 第 50 回日本小児保健学会, 鹿児島, 2003年11月

19) 山口之利, 清水教一, 竹下由紀子, 四宮範明, 玉井浩, 有馬正高, 青木継稔: ウイルソン病友の会, 活動の現況. 第 50 回日本小児保健学会, 鹿児島, 2003年11月

20) 清水教一, 藤井秀樹, 道海秀則, 井澤雅子, 下田牧子, 宇野拓, 竹下由紀子, 四宮範明, 中村道子, 青木継稔: 忘薬の結果精神症状が出現した発症前型 Wilson 病の 1 例. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 松江, 2003年11月

21) 竹下由紀子, 清水教一, 渡辺温子, 足立玲, 四宮範明, 青木継稔: ATP7B 遺伝子解析が診断と家族内検索に有用であった Wilson 病の 4 家系. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 松江, 2003年11月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究要旨

ヒト羊膜間葉細胞に神経プロゲニター細胞の存在を確認した。BrdU+/vimentin+/nestin+/Musashi1+の特徴を示し、Oct 4, nestin, Musashi 1 遺伝子が発現していた。神経細胞分化誘導実験により、Neurofilament-M, Tuj 1 陽性細胞が出現した。つぎに細胞分離装置により、幹細胞である side population (SP 細胞)の分離・培養に成功した。SP 細胞は幹細胞の特徴を持ち、神経細胞への分化誘導が可能であった。17種類のライソソーム酵素活性を測定したところ、βグルコシダーゼ、βガラクトシダーゼ、βヘキソサミニダーゼ、ヘパラン-N-スルファターゼの酵素活性は豊富に含有していることが判明した。同種移植可能な羊膜細胞由来の幹細胞はライソソーム病の脳内移植治療の細胞ベクターとして有望である。

A. 研究目的

我々はヒト羊膜上皮細胞 (AECs) にドパミン産生細胞が存在し、パーキンソン病モデルラットの脳内細胞移植の有効性を報告した。本年度は羊膜間葉細胞 (AMCs) を解析して神経細胞への分化誘導に成功したので報告する。また羊膜間葉細胞由来の幹細胞である side population cells (SP 細胞)を分離、培養して性質を検討した。同種移植可能な羊膜細胞由来の幹細胞を細胞ベクターとして、ライソソーム病患者の脳内への細胞移植法という新規の治療法の開発を目的としている。

B. 研究方法

免疫染色は、CK19, vimentin, nestin, Musashi1, Neurofilament M, Neu D, Tuj 1 抗体を使用した。遺伝子は、未分化細胞維持に重要な役割を果たす Oct 4 とその下流遺伝子である Rex 1 などについて RT-PCR で解析した。分化誘導実験は Woodbury らの方法に従い、DMSO, heparin, valproic acid, bFGF, PDGF-BB などの含有する誘導剤を使用した。実験開始後 24 時間の細胞の形態を観察し、免疫染色及び遺伝子解析した。また nestin enhancer の調整制御をうける EGFP 導入アデノウイルス (AdE/nestin-EGFP)の感染実験を行った。次に細胞分離装置により、幹細胞である SP 細胞の分離・培養に成功した。SP 細胞について免疫染色、RT-PCR を施行し、分化誘導実験を行った。またライソソーム病の細胞移植治療法をめざ

して、17種類の酵素活性を測定した。

C. 研究結果

AMCs は CK19 (上皮細胞マーカー) 陽性細胞は 6.0%, vimentin (間葉細胞マーカー) 陽性細胞は 97.5%, CK19/vimentin 共陽性細胞は 3.6%であった。であり CK19+/vimentin+細胞が約 10% 存在している。誘導前は BrdU+/vimentin+/nestin+/Musashi1+の幹細胞の特長を示した。誘導後の細胞形態は複数の長い突起をもち、nestin, Musashi1, NF-M, NeuD, Tuj 1 に陽性であった。Oct 4, Nestin, Musashi1 の遺伝子発現が認められ、AdE/nestin-EGFP 陽性細胞が存在していた。

次に SP 細胞の増殖曲線を検討したが、最近報告された骨髄由来の幹細胞 (MAPCs) と類似であった。遺伝子解析では未分化細胞に発現している Oct 4, Rex 1 などの遺伝子発現が判明した。そして分化誘導実験でも神経細胞への分化が証明された。興味深いことは、CK19 と vimentin に共陽性細胞が大半を占めていることが判明した。このことは、epithelial-mesenchymal transition の存在を強く示唆する所見である。つぎに17種類のライソソーム酵素活性を測定したところ、βグルコシダーゼ (コントロール値の 875%) とβガラクトシダーゼ (728%)、βヘキソサミニダーゼ (494%)、ヘパラン-N-スルファターゼ (382%)、α-フィコシダーゼ (349%) が高い酵素活性を含有していた。

D. 考察

分離・培養した AMCs は神経幹細胞の特徴を示し、そして神経細胞に分化誘導が可能であったことより、AMCs には神経幹細胞の存在が大きく示唆された。そして、細胞分離培養装置を用いて、羊膜間葉細胞由来の幹細胞 (SP 細胞) を分取し、培養に成功した。この細胞は上皮細胞及び間葉細胞マーカーの共発現細胞であり、epithelial mesenchymal transition (AMT) の存在が示唆された。さらに興味深いことには、18種類のライソゾーム酵素のうち8種類の酵素が高い活性値を保有していることが判明したことである。このことより、高いライソゾーム酵素活性を保有する羊膜由来の幹細胞は、その欠損している疾患に対する脳内細胞移植法の細胞ベクターをして有望であることを示唆する。

E. 結論

倫理的にも供給面でも問題少なく、同種移植可能なヒト羊膜細胞由来の幹細胞は、ライソゾーム酵素を多量に含有していることより、ライソゾーム病患者への脳内細胞移植にも有望である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horikoshi T, Fujii T, Kawashima K, Sakuragawa N: Acetylcholine increase in amniotic fluid of experimental rats for intrauterine growth retardation. *Life Sci* 72: 2145-2149, 2003.
- 2) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of the dopamine transporter gene expression and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 342: 61-64, 2003.
- 3) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Evidence of dopamine D1 receptor mRNA and binding sites in cultured human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 344(3) 157-160, 2003

- 4) Uchida S, Suzuki Y, Araie M, Kashiwagi K, Otori Y, Sakuragawa N: Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. *Neurosci Lett* 341: 1-4, 2003
- 5) Elwan MA, Ishii T, Sakuragawa N: Characterization of dopamine D2 receptor gene expression and binding sites in human placenta amniotic epithelial cell. *Placenta* 24(6): 658-663, 2003
- 6) Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T: Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* 980: 48-56, 2003
- 7) Pipo JR, Feng J-H, Yamamoto T, Ohsaki Y, Nanba E, Tsujino S, Sakuragawa N, Martiniuk F, Ninomiya H, Oka A, Ohno K: New GAA mutations in Japanese patients with GSD II (Pompe disease). *Ped Neurol* 29: 284-287, 2003
- 8) Ogawa A, Terada S, Sakuragawa N, Masuda S, Nagao M, Miki M: Progesterone, but not 17 β -estradiol up-regulates erythropoietin (EPO) production in human amniotic epithelial cells. *J Biosci bioeng* 96: 448-453, 2003.
- 9) Sakuragawa N, Kakinuma K, Hatada S, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Yokoyama Y: Human amnion mesenchyme cells express phenotype of neuronal progenitor cells. *J Neurosci Res*. Accepted.

7. 学会発表

- 1) 桜川宣男、畑田成吾、加茂 功、菊池愛子、柿沼健一、横山安伸：ヒト羊膜細胞由来の SP 細胞の分離・培養と phenotype の検討。第 2 回日本再生医療学会。神戸。平成 15 年 3 月。
- 2) 軍司 健、柿沼健一、横山安伸、菊池愛子、加茂 功、桜川宣男：ヒト羊膜由来細胞の骨芽細胞への分化能。日本先天代謝異常学会。松江、島根。平成 15 年 11 月 20 日。
- 3) 松田光展、佐々木征行、熊田聡子、桜川宣男：重症心身障害児施設におけるライソソ

ーム病患者の QOL についてのアンケート調査。日本先天代謝異常学会。松江、島根。平成15年11月21日。

4) 柿沼 健一、横山 安伸、荻野 郁子、安部 裕介、屋田 修、新井 一、加茂 功、桜川 宣男：ヒト羊膜由来細胞の発現酵素解析および移植。日本先天代謝異常学会。松江、島根。平成15年11月21日。

5) 柿沼 健一、野崎 杏子、横山 安伸、菊池 愛子、岡野 栄之、加茂 功、桜川 宣男：ヒト羊膜間葉細胞からの神経細胞の分化誘導。第3回日本再生医療学会。幕張、千葉。平成16年3月25日。

6) 小林 護、蔵野 さやか、加茂 功、佐藤 嘉兵、桜川 宣男：成体マウス組織からの side population (SP) 細胞の分離。第3回日本再生医療学会。幕張、千葉。平成16年3月24日。

7) 軍司 健、柿沼健一、横山安伸、菊池愛子、加茂 功、桜川宣男：ヒト羊膜由来細胞の骨芽細胞への分化・誘導。第3回日本再生医療学会。幕張、千葉。平成16年3月24日。

8) 加茂 功、軍司 健、小坂真一郎、小林 護、佐々木裕子、桜川宣男、菊池愛子：胸腺由来多分化能細胞の研究。第3回日本再生医療学会。幕張、千葉。平成16年3月25日。

9) 阿部祐介、屋田 修、新井 一、桜川宣男：ヒト羊膜細胞を用いた神経再生研究。第3回日本再生医療学会。幕張、千葉。平成16年3月24日。

10) Sakuragawa N, Kakinuma K, Kamo I, Kikukchi A, Okano H, Yokoyama Y: Phenotype expression of neural progenitor cells in human amnion mesenchymal cells. *Cell Biology of the Neuron*. New Orleans, USA, 2003. 11.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
出願あり。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

脳神経系の発生・分化に関わる遺伝子とその発現
分担研究者：東京大学医科学研究所 御子柴克彦

研究要旨

リーラーマウス（リーリン/CR-50 抗原の欠損）、ヨタリマウス（disabled-1 欠損）及び Cdk5/p35 欠損マウスを交配等により解析し、Cdk5/p35 は、リーリンシグナルとは共同的に働き、脳神経系の神経細胞の位置決定に関わることが明らかとなった。またカルシウム制御に関わる IP₃ レセプターは脳の発生分化において大変重要であるが、セカンドメッセンジャーである IP₃ 量を制御する為の技術開発に成功した。またアデノウィルスベクターを利用して、神経細胞の誕生日特異的に遺伝子を導入して操作する技術を確認した。

1. 研究目的

脳神経系の発生・分化機構の分子的基盤を明らかにするためには、どのような過程を経て形態形成がなされるのかについての理解が不可欠である。そこで神経細胞の位置決定に関わるリーリン/CR-50 抗原、disabled-1、Cdk5/p35 の分子相互の関連や授精時や背腹軸決定に関わる IP₃ レセプターの構造・機能相関を明らかにすることをまず目的とした。次に細胞構築が明確な小脳皮質におけるプルキンエ細胞の運命決定のメカニズムの解明を目的とした。

2. 研究方法

1) 神経細胞の位置決定に関わるリーリン、disabled-1、Cdk5/p35 の分子生物学的解析：各種の遺伝子や抗体を用いて解析を進めた。また、これら遺伝子を欠損する突然変異マウスやノックアウトマウスを利用して解析した。

2) IP₃ レセプターの構造・機能相関の解析：分子生物学的手法並びに生化学的手法を用いた。

3) 小脳プルキンエ細胞の運命決定：アデノウィルスベクターを用いて胎生期マウス小脳の各ステージでアデノウィルスベクターに組み込んだマーカースを利用して解析を進めた。

（倫理面への配慮）

我々の研究は臨床研究ではなく、主にマウス、ウサギを使用している。ヒト遺伝子は使用しておらず、倫理面では全く問題ない。

3. 研究結果及び考察

1) 脳内神経細胞の位置決定に関わる分子の相関の解明

脳内の神経細胞の位置決定に重要な役割を担う各種分子の解析を種種の変異マウスを利用して行うとともに、各種分子の構造生物学的な解析を行なった。変異マウスはリーリン/CR-50 抗原を欠損したリーラーとリーリンシグナルを受ける側の細胞内分子 disabled-1(Dab1)変異マウスで我々の研究室で単離されたヨタリマウスに加え、Cdk5/p35 キナーゼ欠損マウスを主に用いて検討を行なった。リーリンのレセプターが明らかになっているが、Dab1 以降のシグナル伝達の

機構は不明であり、また Cdk5/p35 の欠損による機能障害の機序もこれまでに明らかにされていない。

p35 とリーリンあるいは Dab1 の両者の欠損したミュータントマウスを作製し解析した。この結果 Cdk5/p35 はリーリンシグナルの下流としては機能しないが、両者は共同的に神経細胞の位置決定に機能していることが明らかとなった。

2) IP₃ レセプターの構造・機能相関の解析

天然の IP₃ 結合領域のなかに IP₃ レセプターより約 1,000 倍 IP₃ 結合活性の高い配列（IP₃ 結合コア）が含まれていることを発見した。この配列は細胞内へ導入すると IP₃ をトラップして IP₃ レセプター/Ca²⁺シグナル系を阻害することを明らかにした。この配列の利点は3タイプの IP₃ レセプターとは無関係に全ての IP₃ レセプターの機能を阻害しうるため、脳の発生・分化研究に利用することが出来る。

3) 小脳プルキンエ細胞の運命決定解析

脳を構成する神経細胞は、脳室面に沿って存在する神経幹細胞より発生・分化してくる。神経幹細胞より発生した神経細胞は、いつ神経幹細胞より発生したか（神経細胞の誕生日）によって、その神経細胞がどのような性質を持ち、脳内においてどの構造体を形成するかという三次元的な位置情報が決定される。我々は、アデノウィルスベクターを用いることにより、トリチウム・チミンや BrdU 同様、神経細胞の誕生日特異的に、神経細胞へ遺伝子を導入することができることを明らかにした。アデノウィルスベクターで遺伝子が導入された神経細胞は、正常に発生・分化し、その誕生日に従って脳組織を構築する。この技術を用いれば、同一の誕生日を有する神経細胞群へ、個別に遺伝子を導入することができる。また、この技術は、今まで解析不可能であった、誕生日に依存した神経細胞の運命決定における分子機構を詳細に解析することを可能にした。

4. 評価

1) 達成度について

1) 脳内神経細胞の位置決定に関わる分子の相関の解明、2) IP₃ レセプターの構造・機能相関の解析、3) 小脳プルキンエ細胞の運命決定解析について予想以上に大きな成果を得ることが出来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義に

ついて

既に研究成果及び考察で述べたように、神経細胞の位置決定は重要な問題であり、新しく Cdk5 を含む分子の役割が明らかになりつつあることは大きな成果と考えられる。また IP₃ レセプターの研究より発見した IP₃ 結合の高親和性配列は国際的に高く評価されており、初期発生時の細胞機能の制御に重要であると考えられる。また小脳プルキンエ細胞などで、細胞の運命決定がその細胞が誕生した日程に依存することは大変に重要であり、脳研究、特に小脳の発生研究に重要である。この基本的考え方はライソゾーム病などの発症機序についても大きな示唆を与えるものと考えられる。

3) 今後の展望について

神経細胞の位置決定に関わる分子は、細胞の突起伸展にも深く関わっていることが明らかになっており、ある意味で細胞分化とも深い関係にあるので更に両者の関連の研究が重要である。また、IP₃ レセプターから高親和性部位の発見による IP₃ スポンジの作製は、今後初期発生のカルシウム制御による発生・分化制御の研究と深く関わり、今後益々重要となる。また、今回アデノウィルスベクターを用いて細胞のマーキングに成功したことは、本法を初期発生研究に応用しうるので大変有効な手法となる。

4) 研究内容の効率性について

研究を効率の良い研究と悪い研究とに分けること自体は考えられるべきでない。本研究は効率悪い中から研究者個人のユニークな発想の中から生まれてきた成功例であり、効率性のみを考えていたならば、このような重要な成果 (IP₃ スポンジの発見、誕生日特異的な神経細胞のマーキングと特徴の決定) は出なかったと考える。

5. 結論

脳神経系の発生分化の中心的課題である神経細胞の位置決定に関して重要な発見をすることが出来た。また、細胞内カルシウム動態と細胞の分化等は深く関わりあっており、それに対する大変有力な手段としての IP₃ スポンジを開発することが出来た。また、神経細胞の各々の特徴はこれまで外界の環境によって知られていたが、小脳のプルキンエ細胞で神経細胞が産生される時期に依存して、決定されていることが明かとなった。

6. 研究発表

2003

- 03-01) ○ Zhang,S., Mizutani,A., Hisatsune,C., Higo,T., Bannai,H., Nakayama,T., Hattori,M. & Mikoshiba,K.: Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 to the basolateral membrane domain in polarized madin-darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 278(6), 4048-4056 (2003)
- 03-02) ○ Ando,H., Mizutani,A., Matsu-ura, T. & Mikoshiba,K.: IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor binding

protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J.Biol. Chem.* 278 10602-10612 (2003)

- 03-03) Yasuda,H., Higashi,H., Kudo,Y., Inoue,T., Hata,Y., Mikoshiba,K. & Tsumoto, T.: Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience* 17 287-297 (2003)
- 03-04) Saneyoshi,T.,Kume,S.,&Mikoshiba,K.: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1 in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 499-507 (2003)
- 03-05) Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamoto, T. & Akagawa, K.: Expression of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is enhanced by phorbol-ester stimulation in astrogloma: participation of the PKC signaling pathway. *FEBS Letters* 536 209-214 (2003)
- 03-06) Park, T.-J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K. & Nukina, N.: Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 671-678 (2003)
- 03-07) Shiraishi, Y., Mizutani, A., Mikoshiba, K. & Furuichi, T.: Coincidence in dendritic clustering and synaptic targeting of homer proteins and NMDA receptor complex proteins NR2B and PSD95 during development of cultured hippocampal neurons. *Mol.Cell. Neuro.* 22 188-201 (2003)
- 03-08) Aruga, J. & Mikoshiba, K.: Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol.Cell.Neuro.* 24 117-129 (2003)
- 03-09) Nagase, T., Ito, K.-I., Kato, K., Kaneko, K., Kohda, K., Matsumoto, M., Hoshino, A., Inoue, T., Fujii, S., Kato, H., & Mikoshiba, K.: Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP₃ type 1 receptor. *Neuroscience* 117 821-830 (2003)
- 03-10) ○ Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurosawa, M., Rafael A.F., Yoshida, N., Mikoshiba, K. & Takenawa, T.: Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J.Cell Biology* 161 79-88 (2003)
- 03-11) Yamamoto, T., Sakakibara, S., Mikoshiba, K. & Terashima, T.: Ectopic corticospinal tract and corticothalamic tract neurons in the cerebral cortex of *yotari* and *reeler* mice. *J.Comp.Neurol.* 461 61-75 (2003)
- 03-12) ○ Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K.: Critical regions for activation gating of the inositol

- 1,4,5-Trisphosphate receptor. J.Biol. Chem. 278(19) 16551-16560 (2003)
- 03-13) ○Hirota, J., Ando, H., Hamada, K. & Mikoshiba, K.: Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. Biochem. J. 372 435-441 (2003)
- 03-14) Sandona D., Scolari, A., Mikoshiba, K. & Volpe, P.: Subcellular distribution of Homer 1b/c in relation to endoplasmic reticulum and plasma membrane proteins in Purkinje neurons. Neurochem Res. 28(8) 1151-1158 (2003)
- 03-15) Fujii, S., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Taufiq, M. A. & Kato, H.: Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. Neurosci. Res. 46 509-521 (2003)
- 03-16) ○Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S. & Mason, C.A.: Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. Cell 114 545-557 (2003)

7. 知的財産所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（分担）研究報告書
試験管内での未分化細胞からの臓器形成とその応用に関する研究
（分担）研究者 浅島 誠 東京大学大学院総合文化研究科

要旨

- (1) 腎形成に関与する新規の遺伝子(XTRAP-XC3H-3 β)の発現が前腎細管の最終分化や誘導に必要であることがわかった。また、NDRG-1は前腎形成に重要なものである。
- (2) 膵臓をほぼ完全につくる系の解析により、インスリンやグルカゴンのみだけでなく、カルボキシラーゼ、DNase1、リパーゼなどの遺伝子の発現も確認された。
- (3) 未分化細胞において、細胞の増殖と分化において、アクチビンと Notch シグナルのクロストークを初めて明らかにした。特に Notch を加えることによって、より未分化状態が長く維持されることを示した。
- (4) カエルの未分化細胞を解離し、アクチビン(100ng/ml)処理することによって、心臓をつくることができるが、その時、心臓原基を除去して、そこに試験管内でつくった心臓を埋め込めば、きちんと心臓としての機能することを明らかにした。
- (5) マウスの ES 細胞について、胚葉体(Embryo body)をつくり、そこから心筋、平滑筋、脂肪細胞、腸管などをつくることに成功した。これらは各臓器特異的遺伝子を発現しており、カエルと比較しても全く同じ遺伝子をつかっていることが明らかになった。

A. 研究目的

初期発生における腎臓や膵臓、心臓、神経系などの器官や組織がどのようにして出来てくるかを遺伝子の発現のカスケードとしてとらえる。特に各器官形成に特異的なキーとなる遺伝子の探索を行うことによって、器官形成と発現のダイナミクスを明らかにしていく。また、ES細胞を用いて器官形成についても、試験管内の臓器形成が確認された。

B. 研究方法

両生類胚のアニマルキャップ (St.9) は未分化細胞の塊であり、そこから試験管内で様々な臓器や組織をつくり出すことを私たちが独自に開発してきた。その中で今回はアクチビン処理細胞から単離した新規遺伝子の機能解析に器官形成のメカニズムの解明に成功した。誘導のシグナル伝達の重要な TGF- β 系と Wnt 系に関わる新規遺伝子の単離と解析に成功した。また、我々はマウスの ES 細胞を用いて、試験管内でいくつかの組織を作り出すことに成功した。

C. 研究成果

腎形成に関与する新規の遺伝子探索

腎形成に関与する新規の遺伝子として、XC3H-3

β と XTRAP- γ の2つをクローニングし解析を行った。XTRAP- γ は153のアミノ酸から構成され4つの膜貫通領域を持ち未受精卵の中に存在するが遺伝子であり、前腎細管の最終分化に必要であることがわかった。また、XC3H-3 β は zinc フィンガーマチーフを持つ364のアミノ酸から構成される遺伝子であり、前腎周辺の間充織組織に局在が見られた。この遺伝子の発現が前腎細管の誘導に必要であることがわかった。また、私たちは重力の変化に応答する遺伝子、NDRG-1を単離し、機能解析を行った。その結果、NDRG-1は前腎形成に重要であることが確認された。

膵臓形成と遺伝子発現

アクチビンとレチノイン酸を時間差処理することによって膵臓をほぼ完全に作る系を開発したが、これをつかっただけの解析がなされた。その結果、膵臓に特異的なホルモンであるインスリンやグルカゴンの遺伝子発現や蛋白質の存在のみならず、膵臓にあると思われるカルボキシラーゼ、DNase1、リパーゼなど、ほとんどの膵臓特異的に合成される遺伝子の発現も確認された。そのことによって、私たちがアニマルキャップからつくった膵臓が正常胚の膵臓と形態学的にも遺伝子発現などの分子レベルにおいてもほぼ同じものであることが確認

された。

未分化細胞からの心臓形成

ツメガエルのアニマルキャップからの心臓形成についても試みられた。その結果、ほぼ100%の確率でもって拍動する心臓が形成された。これらの心臓は拍動するだけでなく、電顕像では介在板 (ID) をもっており、かつ、心臓特異的のマーカ一遺伝子であるトロポニン I や XNK-2.5 など発現していることが示された。また、これらの in vitro 系でつくられた心臓を生体内 (in vivo) への移植も試みられた。

ES 細胞からの器官形成

私たちはマウスの未分化細胞 (ES 細胞) を用いて、試験管内の器官形成についても試みた。マウスの ES 細胞をレチノイン酸などで処理すると、心筋細胞の高率な形成が確認された。また、内分泌や外分泌細胞などを含めた膵臓細胞の形成がはじめて確認された。

新規の遺伝子の更なる解析について

1. 私たちの研究室でゲノム解析のために、2 倍体のゲノムをもつ *Xenopus tropicalis* 初期発生の子生物学的解析も行った。初期発生の最も早い時期に発現する Nodal-5 と 6 (Xnr-5, Xnr-6) の他に、これらの遺伝子ファミリーに属すると考えられる Xtnr-3 がクローニングされた。そして、Xtnr-3 の解析を進めるために morpholino oligo や cleavage mutant を使って調べた結果、Xtnr-3 の分泌される時に切り離される pro-region の部分が、他の TGF- β 遺伝子の活性を制御していることが確認された。また、私たちは生殖細胞に局在する遺伝子 *Xtdzl* を単離して、その局在や発現を制御するゲノムの上流解析を行った。

2. Wnt 系の細胞内情報伝達系はいままで多くの人によって研究されているが、広大・菊池教授らとの共同研究によって、Idax などを新しくクローニングしてその機能解析を行った。このことによって、胚発生において大きな役割を担っていると思われる Wnt 系の働きについて一部明らかにした。

そして、TGF- β や Notch シグナル系とのクロストークの関連性の実験もなされた。

D. 考察

未分化細胞の器官形成において、分子のメカニズムの解明は、試験管内の器官形成を行う上に重要なことである。私たちの結果によって今後、試験管内で効率的に組織や器官をつくる系の開発に非常に重要である。また、試験管内でマウスの ES 細胞を用いて内分泌や外分泌などを含む膵臓組織をつくることに成功したことは、試験管内での膵臓の器官形成の開発に初めて成功したといえる。

E. 結論

1. 今回は未分化細胞のアニマルキャップから単離した新規遺伝子の機能解析に成功し、これらの遺伝子が腎臓や膵臓、生殖細胞などの器官や組織の形成に重要であることがわかった。
2. 私たちはマウスの ES 細胞を用いて、試験管内の器官形成を行い、高率な心筋細胞の形成に成功した。また、内胚葉性そしきや内分泌、外分泌細胞を含む膵臓組織の形成に成功した。
3. 誘導現象に重要な TGF- β 系と Wnt 系に関わる新規遺伝子の単離と解析に成功した。

F. 健康危険情報

今のところ、カエル胚やマウスの未分化細胞を用いるので、計画、方法、倫理面についても特に問題はない

G. 発表論文

1. Sato, A., Matsumoto, Y., Koide, U., Kataoka, Y., Yoshida, N., Yokota, T., Asashima, M. and Nishinakamura, R.
Zinc finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development
Molecular and Cellular Biology, 23(1), 62-69, 2003
2. Ariizumi T. and Asashima, M.
From field to gel blot: teaching a holistic view of developmental phenomena to undergraduate biology students at the University of Tokyo
Int. J. Dev. Biol., 47, 93-97, 2003

3. Yabe, S., Tanegashima, K., Haramoto, Y., Takahashi, S., Fujii, T., Kozuma, S., Taketani, Y. and Asashima, M.
FRL-1, a member of the EGF-CFC family, is essential for neural differentiation in *Xenopus* early development
Development, 130, 2071-2081, 2003
 4. Yokota, C., M. Kofron, M. Zuck, D. W. Houston, H. Isaacs, Asashima, M., C. C. Wylie and J. Heasman.
A novel role for a nodal-related protein; *Xnr3* regulates convergent extension movements via the FGF receptor
Development, 130, 2199-2212, 2003
 5. Fukui, A., Komazaki S., Miyoshi, O. and Asashima, M.
Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes
Develop. Growth Differ., 45, 113-119, 2003.
 6. Sogame, A., Hayata, T. and Asashima, M.
Immunocytochemical study of activin type IB receptor (XALK4) in *Xenopus* oocytes
Develop. Growth Differ., 45, 113-119, 2003
 7. Hino, S., Michiue, T., Asashima, M. and Kikuchi, A.
Casein kinase I ϵ enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin
J. Biol. Chem., 278(16), 14066-14073, 2003
 8. Kaneko, T., Chan, T., Satow, R., Fujita, T., and Asashima, M.
The isolation and characterization of *XC3H-3b*: a CCCH zinc-finger protein required for pronephros development
B. B. R. C., 308, 566-572, 2003
 9. Kyuno, J.-I., Fukui, A., Michiue, T., and Asashima, M.
Identification and characterization of *Xenopus* NDRG1B. *B. R. C.*, 309, 52-57, 2003
 10. Okabayashi, K. and Asashima, M.
Tissue generation from amphibian animal caps
Current Opinion in Genetics & Development, 13, 1-6, 2003
 11. Tanaka, M, Asashima, M., and Atomi, Y.
Proliferation and differentiation of *Xenopus* A6 cells under hypergravity as revealed by time-lapse imaging
In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal, 39, 71-79, 2003
 12. Asashima, M., and Okabayashi, K.
Current state of and outlook for organogenesis from undifferentiated cells
CORNEA, 22(7), 2-12, 2003
 13. Emura, T., Hashizume, K., and Asashima, M.
Experimental study of the embryogenesis of gastrointestinal duplication and enteric cyst
Pediatr. Surg. Int., 19(3):147-151, 2003
 14. Ariizumi, T., Kinoshita, M., Yokota, C., Takano, K., Fukuda, K., Moriyama, N., Malacinski, G. M., and Asashima, M.
Amphibian *in vitro* heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development
Int. J. Dev. Biol., 47, 405-410, 2003
 15. Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakamura, Y., Yokota, T., Asashima, M., and Koide, H.
Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 313(3), 475-481, 2004
 16. Sedohara, A., Komazaki, S., and Asashima, M.
In vitro induction and transplantation of eye during early *Xenopus* development
Develop. Growth Differ., 45(5/6), 463-471, 2003
 17. Fukui, Y., Furue, M., Myoishi, Y., Sato, J. Denry, Okamoto, T., and Asashima M.
Long-term culture of *Xenopus* presumptive ectoderm in a nutrient-supplemented culture medium
Develop. Growth Differ., 45(5/6), 499-506, 2003
- H.知的財産権の出願、登録状況
特になし

研究要旨

Krabbe 病(globoid cell leukodystrophy (GLD))は発症年齢により乳幼児型と小児型(JI-GLD)、成人型などに分けられているが、galactosylceramidase(GALC)遺伝子上の変異の部位と臨床症状が密接に関連するという特徴を有している。これらの病態の違いを解明するために、それぞれの線維芽細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレー法で発現遺伝子を比較した。また、二次元蛋白泳動法を用いて双方の細胞で翻訳されている蛋白の比較も行った。その結果、二次元蛋白泳動では移動度に変化の認められるスポットが数個認められ、DNA マイクロアレーでも転写量に変化の認められる遺伝子がいくつか認められた。今後これらの遺伝子の発現を調べる事で、JI- および AO-GLD の病態機序の違いやまだ未知部分の多い GALC 機能解明のための手掛かりが得られると考えられた。

A. 研究目的

Krabbe 病(globoid cell leukodystrophy, GLD)は、galactosylceramidase(GALC)遺伝子の異常により起こる常染色体劣性の遺伝疾患であるが、GALC のアミノ酸変異や欠損の位置によって完全に臨床型が決定するという特徴がある。

これまで私どもは、日本に多い GALC 活性を解析し、乳幼児型、成人型の変異を組み込んだ GALC 遺伝子を一過性に発現することで、その活性の差を検出しようとしてきたが、単純な GALC 活性の測定ではこれらの臨床症状の違いを説明することは出来なかった。

そこで、DNA マイクロアレー法と二次元蛋白泳動法を用いて、成人型と乳幼児型 GLD で発現遺伝子の差異を検討した。

B. 研究方法

測定するサンプルとしては、JI-GLD(HF189)および AO-GLD(HF308)の患者さんより研究承諾をえて培養した線維芽細胞と、正常コントロール線維芽細胞(HF251)を用いた。

4.0 μ g total RNA を鋳型として in vitro Transcription (IVT) ラベルにより、Cy3, Cy5-UTP を取り込ませた。internal control としては、 λ polyA RNA を等量ずつ添加した。

Cy3標識ターゲットとCy5標識ターゲットを混合して、約16,000種類の遺伝子をスポットしている Human Expression CHIP(IntelliGene HS)上で70℃、14時間ハイブリダイゼーションさせた。

この後、6 \times SSC, 0.2% SDS溶液で3回洗浄し、スキヤニングとデータ解析はBioDiscovery ImaGene (Ver. 4.2)で行った。遺伝子の発現比率は、global lowess normalization法で評価補正し、変動が2倍以上の、高い信頼性で発現変動している遺伝子のみをリストした。

それとは別に、JI-GLDとAO-GLD患者培養線維芽細胞および正常者培養線維芽細胞を破碎後、抽出蛋白を二次元蛋白電気泳動にかけて移動度の異なるスポットを検出した。

（倫理面での配慮）

この実験では、研究承諾をえて培養した患者および正常コントロールの線維芽細胞を用いており、特に問題点はないと考えられる。

C. 研究結果

JI-GLD で特異的に発現が増加した遺伝子として、

protocadherin 10 (PCDH10) 4.52

matrix Gla Protein (MGP) 3.90

retinoic acid receptor resp. 2.63

特異的に減少した遺伝子として、

RGC32 protein (RGC32) -2.61

chitinase 3-like 1 -2.46

PDZ and LIM domain(elfin) -2.30

などがあった。（数値はコントロール細胞との発現量の比を対数値で示している。）

AO-GLD で特異的に発現が増加した遺伝子として、

LR8 protein (LR8) 3.69

CYP7B1 2.98

cathepsin H (CTSH) 2.71

特異的に減少した遺伝子として、

cholinergic receptor, muscarinic 3 -2.34

chemokine (C-X-C motif) ligand12 -1.92

bradykinin receptor B2 -1.91

などがあった。

また、コントロールに比較してJI-GLD, AO-GLD の両方で有意に発現増加が認められた遺伝子として、

osteoblast specific factor 2

α disintegrin & metalloproteinase domain 12(ADAM12)