

で行うテラトーマ形成法は、国際的に認められた方法であり、動物実験以外にテラトーマの形成を確認する方法はない。

C. 研究結果

当初実験に使用を予定していたサル ES 細胞の形態および維持方法がその樹立時の形態および維持方法が異なっていることが判明した。そのため、新規に導入した二つの ES 細胞株を本研究に使用した。まず、導入初期の発現タンパク質の比較を CMK6GFP の未分化細胞および初期分化細胞間で行ったところ、Power Blot 解析した約 1000 種類のタンパク質の内、未分化細胞で 5 倍以上の発現を示したものは 9 種類、1/5 以下の発現を示したものは 15 種類であることが明らかになった。CMK6 については、それから分化させた神経幹細胞との間での発現タンパク質の比較を解析中である。また、テラトーマ形成についても、免疫不全マウスへの移植を行ったが、移植初期の個体の一部について、その形成が確認できた。その組織標本は三胚葉に由来した細胞が含まれていることを示した。残りの個体については、テラトーマ形成がまだ不十分であるため、形成が確認でき次第、組織解析を実施する。

D. 考察

本実験は、発現しているタンパク質の解析により未分化細胞では 9 種類の高発現タンパクを確認できた。これら発現タンパク質の詳細な検討のために、これらのタンパク質に対する免疫蛍光染色を実施するとともに抗体処理した未分化細胞の変化の有無およびテラトーマ形成能を調べる。さらに、これら高発現タンパク質が長期継代培養後にも同様に発現しているか否かおよびテラトーマ形成能の有無を調べることで、ES 細胞の品質管理に関わる発現タンパク質のスクリーニングを実施する。

E. 結論

CMK6GFP において、未分化細胞および初期分化胚葉体間での発現タンパク質の比較により、前者で 5 倍以上の発現量を示したものは 9 種類であり、1/5 以下の発現を示したものは 15 種類であった。これらのタンパク質を中心に今後の検討を実施する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ．研究成果の刊行物に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|--|--------------------|----|-----------|------|
| 近藤靖, 鈴木豊, 仁藤新治 | ヒト胚性幹細胞(ES細胞) | バイオインダストリー | 22 | 10-16 | 2005 |
| Sone M, Itoh H, Yamashita J, Kobayashi T-Y, Suzuki Y, Kondo Y, Nonoguchi A, Sawada N, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Nito S, Shibuya M, Nishikawa S-I, Nakao K | Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells | Circulation | 67 | 2085-2088 | 2003 |
| Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y | Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel in primary cultured mouse midbrain neural network | Cell Mol Neurobiol | 24 | 877-882 | 2004 |
| Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y | Glutamate regulates the frequency of spontaneous synchronized Ca ²⁺ spikes through group II metabotropic glutamate receptor in cultured mouse cortical networks | Cell Mol Neurobiol | 24 | 841-852 | 2004 |
| Sekiguchi S, Takatori A, Negishi T, Kwon J, Kokubo T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y | Localization of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 in cynomolgus monkey placentas | Placenta | 26 | 99-103 | 2005 |
| Sekiguchi S, Yoshikawa Y, Tanaka S, Kwon J, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Nakamura S, Takahashi K | Immuno- histochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse | Exp Anim | 52 | 365-369 | 2003 |

| | | | | | |
|---|---|--------------------------|-----|-----------|------|
| Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y | Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) fetuses | J Neurosci Methods | 131 | 133-140 | 2003 |
| Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y | Astroglial responses against A β initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey | Neurosci Res | 49 | 339-346 | 2004 |
| Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K, Hanazono Y. | Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. | Transplantation | 79 | 32-33 | 2005 |
| Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y. | Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. | Gene Therapy | 12 | 203-210 | 2005 |
| Nagata M, Takahashi M, Muramatsu S, Ueda Y, Hanazono Y, Takeuchi K, Okada K, Suzuki Y, Kondo Y, Suemori M, Ikeda U, Nakano I, Kobayashi E, Hasegawa M, Ozawa K, Nakatsuji N, Shimada K. | Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. | Journal of Gene Medicine | 5 | 921-928 | 2003 |
| Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y. | Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. | Transplantation | 76 | 1061-1067 | 2003 |

| | | | | | |
|--|---|-----------------------------------|-----|---------|------|
| Hanazono Y, Asano T, Ueda Y, Ozawa K. | Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. | Trends in Cardiovascular Medicine | 13 | 106-110 | 2003 |
| Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii K, Hasegawa M, Nakatsuji N, Ozawa K. | Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. | Molecular Therapy | 6 | 162-168 | 2002 |
| Shimozawa N, Tajima S, Azuma N, Hioki K, Kono T, Ito M. | Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelids observed in cloned fetuses. | J Reprod Dev, | 49 | 221-226 | 2003 |
| Ogawa H, Ono Y, Shimozawa N, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M, Kono T. | Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. | Reproduction | 126 | 549-557 | 2003 |
| Suemizu H, Aiba K, Yoshikawa T, Sharov AA, Shimozawa N, Tamaoki N, Ko MS | Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells | Dev Bio | 253 | 36-53 | 2003 |
| Shimozawa N, Ono Y, Kimoto S, Hioki K, Araki Y, Shinkai Y, Kono T, Ito M | Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. | genesis | 34 | 203-207 | 2002 |
| Shimozawa N, Ono Y, Muguruma K, Hioki K, Araki Y, Shinkai Y, Kono T, Ito M | Direct production of gene-targeted mice from ES cells by nuclear transfer and gene transmission to their progeny. | Exp Anim | 54 | 375-381 | 2002 |

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 全体の編集 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|--|------------|---|--------|--------------------|-----|-----|
| Asano T, Shibata H, <u>Hanazono Y.</u> | Use of SIV vectors for simian ES cells. | Turksen K. | Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols | Humana | Totowa, NJ, USA | 印刷中 | |
| Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, <u>Hanazono Y.</u> | In vivo tumor formation from primate ES cells. | Turksen K. | Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols | Humana | Totowa, NJ, USA | 印刷中 | |

IV. 研究成果の刊行物・印刷

ヒト胚性幹細胞 (ES細胞)

Human Embryonic Stem Cells

近藤 靖*¹ 鈴木 豊*² 仁藤新治*³

- *¹ 田辺製薬(株) 先端医学研究所 主任研究員
- *² 田辺製薬(株) 先端医学研究所 研究員
- *³ 田辺製薬(株) 先端医学研究所 所長

シーエムシー出版刊『月刊バイオインダストリー2005年2月号』抜刷

ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)

Human Embryonic Stem Cells

—近藤 靖*¹, 鈴木 豊*², 仁藤新治*³

2003年、京都大学再生医科学研究所で国内初のヒトES細胞が3株樹立され、国産のヒトES細胞株の分配体制も整った。今後、国内のヒトES細胞研究は一層盛んになるものと思われる。本稿では、ヒトES細胞をとりまく研究の現況や今後の課題について、特に再生医療への応用の観点から概説してみたい。

1. はじめに

ES細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) は、胚の初期段階である胚盤胞の内部細胞塊から分離される特殊な細胞であり、未分化状態を保持したまま分裂増殖して無限に自らのコピーを作り出せる能力 (自己複製能) と体を構成するあらゆる細胞に分化する能力 (多能性) とを併せもつ。

ES細胞は1981年にマウスで初めて試験管内で増殖できる細胞株として樹立されて以来^{1, 2)}, 分化・発生機構を解明するための基礎研究材料として、また遺伝子改変技術を応用した遺伝子の機能解析や疾患モデル作製のための研究ツールとして分子生物学の分野で広く利用されてきた。そして現在までに、マウス以外のさまざまな動物種でもES細胞の樹立が報告されてきている。霊長類に関しては、1995年にアカゲザルとコモンマーモセットからES細胞が樹立されたのが最初であり^{3, 4)}, その後筆者らも、カニクイザルからのES

細胞の樹立に成功している⁵⁾。

ヒトES細胞としては、1998年11月、米国ウィスコンシン州立大学のトムソンらによってその樹立がなされ、科学雑誌『Science』に掲載されたのが最初となる⁶⁾。この発表により、それまで一般の人にはあまり馴染みのなかったES細胞という言葉が一躍、“市民権”を得ることになり、以来、再生医療の切り札として関心を集め、各国の多くの施設でヒトES細胞を用いた研究が盛んに進められている。

2. ヒトES細胞

ヒトES細胞株はマウスES細胞株と比較していくつかの相違点がある。形態的には、マウスに比べてコロニー形態が扁平である (写真1)。マウスES細胞を未分化のまま培養・維持するためには、LIF (leukemia inhibitory factor) を培養液に添加しなければならないが、LIFにはヒトES細胞を維持する効果が認められていない。ま

*¹Yasushi Kondo 田辺製薬(株) 先端医学研究所 主任研究員

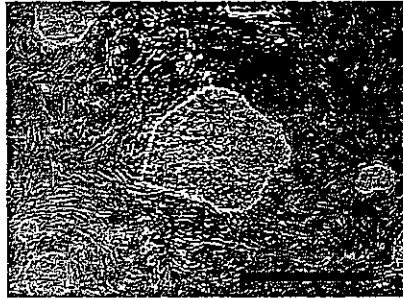
*²Yutaka Suzuki 田辺製薬(株) 先端医学研究所 研究員

*³Shinji Nito 田辺製薬(株) 先端医学研究所 所長

マウスES細胞



サルES細胞



ヒトES細胞

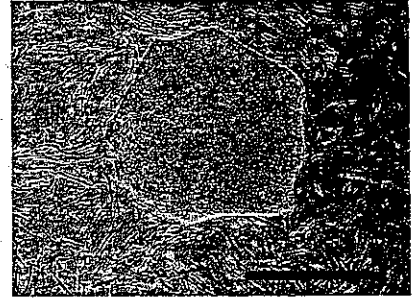


写真1 ES細胞コロニー形態の比較(カラー写真参照)
(Scale Barは1mm)

表1 ヒトES細胞株の樹立機関と所有細胞株数

| 樹立機関 | 細胞株数 |
|---|------|
| Wisconsin Alumni Research Foundation (米国ウィスコンシン州 Madison) | 5 |
| California 大学 (米国カリフォルニア州 San Francisco) | 2 |
| CyThera 社 (米国カリフォルニア州 San Diego) | 9 |
| Geron Corporation (米国カリフォルニア州 Menlo Park) | 7 |
| BresaGen 社 (豪州・米国支店はジョージア州 Athenes) | 4 |
| ES Cell International 社 (豪州 Melbourne) | 6 |
| Technion-Israel Institute of Technology (イスラエル Haifa) | 4 |
| Reliance Life Sciences (インド Mumbai) | 7 |
| Pochon CHA University (韓国 Seoul) | 2 |
| Maria Biotech 社 (韓国 Seoul) | 3 |
| Seoul National University (韓国 Seoul) | 1 |
| Cellartis 社 (スウェーデン Goteborg) | 3 |
| Karolinska Institute (スウェーデン Stockholm) | 6 |
| Goteborg 大学 (スウェーデン Goteborg) | 16 |

米国 NIH の資料より

た ES 細胞の細胞表面マーカーである SSEA (stage specific embryonic antigen) や TRA-1 (tumor rejection antigen-1) 等の発現パターンも、ヒトとマウスでは異なっている。これらの差異は、ヒトとマウスでは胚体組織や胚体外組織の構造など、胚発生の過程で異なる面があることに起因するのかもしれない。筆者らはカニクイザル ES 細胞の樹立に成功しているが⁵⁾、サルの ES 細胞は、形態、培養条件、マーカー分子の発現パターンなど、ヒト ES 細胞のものとはほぼ一致している。

ヒト ES 細胞に関する各国の考え方は、その作製を認めていないドイツのような国から、ヒトのクローン胚研究までもを認めるイギリスまでさ

まざまである。NIH (National Institutes of Health; アメリカ) が公表した資料によると、アメリカ、オーストラリア、スウェーデン、インド、イスラエル、韓国の 6 か国・14 機関の企業や大学で分離された 75 株のヒト ES 細胞がリストされている(表 1)。アメリカではヒト胚作製や、ヒト胚を破壊、廃棄し、故意に傷つけ、または死に至らしめる研究に対して連邦資金を支出することを禁じており、ヒト ES 細胞の樹立やクローン技術による胚の作製も禁止の対象に含まれている。実際にトムソンらは公的資金には頼らず、米ジェロン社が提供した民間資金を利用して ES 細胞の樹立に成功しており、これをきっかけにアメ

リカではヒト胚研究をめぐる論議が再燃した。

2001年8月9日、ジョージ・ブッシュ大統領はNIH「ヒト多能性幹細胞を使用する研究に関するNIHガイドライン (National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells)」が初めてヒトES細胞研究に助成金を提供することを発表した。ただし、対象となる研究は8月9日以前に作られた受精胚由来の細胞株を使用するものに限定された。ヒトES細胞を樹立することと、すでに樹立されているヒトES細胞を利用して研究することを区別し、樹立されているヒトES細胞の研究利用のみ連邦政府の研究助成を認めるかたちとなっている。従って、NIHにリストされているヒトES細胞株は、すべて2001年8月までに樹立されたものである。最近でもハーバード大学が民間資金により17種類のヒトES細胞を作ることに成功したという報道があり、わが国(京都大学)で樹立された3株など、それ以降に世界で樹立された細胞株を考慮に入れると、すでにかなりの数のヒトES細胞株が存在するようである。

3. わが国の状況

わが国では、2001年9月に文部科学省から「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」が

公布・施行された。この指針の策定は、内閣総理大臣の諮問機関である科学技術会議生命倫理委員会と1999年に発足した同ヒト胚小委員会によってまとめられた「ヒト胚性幹細胞を中心としたヒト胚研究に関する基本的考え方」(2000年3月)に従い、パブリック・コメントを経て指針案が作成され、総合科学技術会議およびその下に設置されている生命倫理専門調査会における検討を踏まえたものである。これによって、不妊治療の過程で余剰となったヒト初期胚(凍結胚)のうち夫婦から研究利用へ無償による提供についての同意が得られた場合に限りのみES細胞を樹立することが認められることになった。すでに樹立されているヒトES細胞を使用する研究だけでなく、樹立研究そのものを認めるという点においては、NIHガイドラインとは異なっている。

指針では、ヒトES細胞の使用に関して、研究目的は当面医療の発展等につながる基礎研究に限定し、個体産生は勿論のことES細胞から再生した組織や細胞を人体へ移植するなどの研究は認められていない。併せて、医療に用いるための医薬品の製造や、医薬品の安全性試験等に用いるためのヒトES細胞の大量供給など医療関連分野への使用も現時点では行わないこととしている。

研究の実施開始の手続きや進め方にも厳しい基

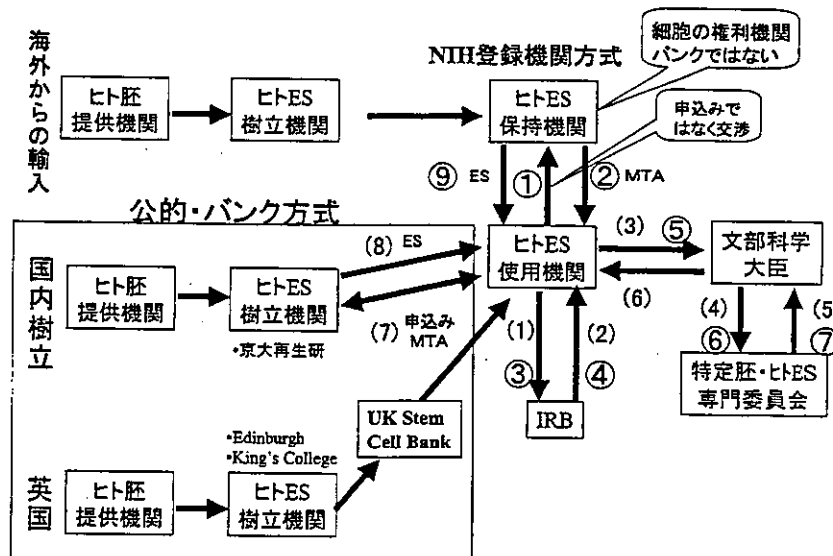


図1 ヒトES細胞使用までの手続き

表2 大臣確認されたヒト ES 細胞の使用計画

| 使用計画 | 使用機関 | 大臣確認日 | 細胞の由来 |
|------------------------------|--------|-----------|------------------|
| 血管発生・分化機構の解析と血管再生への応用 | 京都大学 | 2002年 4月 | Monash 大 |
| 血管発生・分化機構の解析と血管再生への応用 | 田辺製薬 | 2002年 6月 | Monash 大 |
| 中枢神経系の再生医学の基礎的研究 | 慶応義塾大学 | 2002年 6月 | Monash 大, WiCell |
| 造血細胞への分化誘導法の開発 | 東大医科研 | 2002年 12月 | WiCell |
| ES 細胞由来造血幹細胞による造血の再生 | 東京大学 | 2002年 12月 | WiCell |
| 維持と分化に関する研究 | 信州大学 | 2002年 12月 | WiCell |
| 血液細胞の分化誘導系の確立 | 岐阜大学 | 2003年 4月 | Monash 大 |
| 心筋細胞の再生医学の研究 | 岐阜大学 | 2004年 8月 | Monash 大 |
| パーキンソン病モデルサルにおける移植効果及び安全性評価 | 田辺製薬 | 2004年 3月 | Cellartis |
| パーキンソン病モデルサルにおける移植効果及び安全性評価 | 自治医科大学 | 2004年 3月 | Cellartis |
| 神経細胞, 感覚系細胞への分化誘導 | 理化学研究所 | 2004年 3月 | 京大再生研 |
| 脂肪細胞, 中胚葉系幹細胞への分化誘導 | 理化学研究所 | 2004年 3月 | 京大再生研 |
| ヒト ES 細胞の維持培養を可能にするシグナル因子の研究 | 理化学研究所 | 2004年 3月 | 京大再生研 |
| 安全かつ簡便な新規培養技術の開発研究 | 京大再生研 | 2004年 7月 | 京大再生研 |
| 遺伝子導入法の開発と遺伝子改変技術の確立 | 京大再生研 | 2004年 7月 | 京大再生研 |

準が設けられ、受精卵の提供や ES 細胞の作製・利用にかかわるすべての機関に倫理審査委員会の設置を義務づけ、個別の研究について研究の妥当性を綿密に作成された計画をもとに研究機関内倫理審査委員会と国の二重の審議を受けることが決められている（図 1）。研究成果は原則として公開、指針に反した場合、研究機関名や内容などが公表されることになっている。

この指針を受けて、文部科学省は 2002 年 4 月、京都大学が申請していたヒト ES 細胞の樹立計画を承認したのに続き、同大学が申請していたヒト ES 細胞から血管の内皮細胞や壁細胞に分化できる細胞を取り出し血管を再生させる使用研究を承認した。今までに文部科学大臣の確認が得られている使用計画は 15 件で、内 10 件は、アメリカ、オーストラリア、スウェーデンなどから輸入された細胞を用いるものである（表 2）。国内で唯一ヒト ES 細胞の樹立計画の政府の承認が得られている京都大学再生医科学研究所では、2003 年 3 株の樹立に成功し、2004 年 3 月より分配を始めた。すでに 5 件の国産ヒト ES 細胞を用いた研究が進められており、国産ヒト ES 細胞を用いた研究は今後一層盛んに行われるようになるものと思われる。使用計画の研究対象は、神経系に関する

ものが 4 件と一番多く、血液（3 件）、血管（3 件）、心筋（1 件）などの研究がつづいている。指針は施行から 3 年が経過し、現在、特定胚およびヒト ES 細胞研究専門委員会によって指針の見直し作業が行われている。

4. 医療への応用

受精卵では完全な条件を備えた子宮という理想的な“培養器”の中で、細胞の増殖と分化が統制されて進み、三次元的な形態形成が行われる。ES 細胞では分化増殖を試験管内で行う場合、三次元的形態形成のメカニズムが未解明な上、分化誘導に関わる諸条件が完全にはわかっていないため、細胞から直接立体的な組織を作ることはできない。また肝臓や腎臓などほとんどの臓器は複数の種類の細胞から出来上がっており、これらを再構成させることや、臓器に血管を導入することは非常に難しく、今後さまざまな検討が必要である。

臓器そのものを作ることは無理でも、ES 細胞から生体と同じ機能を持った細胞を作ったり、作った細胞を病気の治療に活用することは可能である。ヒトの体は多種類の細胞からできているが、病気の中には特定の細胞の変性や機能不全で引き起こされるものも多い。例えば、脳の一部の神経細胞

が変性脱落してしまうためにおこるパーキンソン病や、脊髄の中の神経線維が事故などで断ち切られた脊髄損傷、心臓の心筋細胞の壊死を引き起こす心筋梗塞、膵β細胞の機能低下に基づく糖尿病などである。これらの患者に正常細胞を移植することにより病気を治そうとするのが細胞移植（補充）療法である。ES細胞から作り出した神経細胞をパーキンソン病患者や脊髄損傷患者に移植したり、インシュリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島細胞を作り出して糖尿病患者の治療に利用するといったことも現実的に臨床応用を視野に入れ想定されている。

米ジェロン社は、ヒトのES細胞から作ったオリゴデンドロサイトを脊髄損傷の患者に移植して治療する臨床試験を2005年より始める計画を明らかにしている。同社ではすでに8種類の細胞をヒトES細胞から作り出すのに成功し、このうち神経細胞（パーキンソン病）、心筋細胞（心疾患）、骨細胞（骨粗鬆）、β細胞（糖尿病）、軟骨細胞（骨関節炎）、血液細胞（血液疾患）の6種類は動物実験での効果を確認中という。

5. 臨床応用への課題

ヒトES細胞を再生医療に臨床応用する場合の課題は何であろうか？

移植医療で最も重要な問題となるのは、ヒトES細胞の分化によって生じた細胞に対して起きる可能性のある免疫拒絶反応である。脳内への移植など一部の例を除いて一般的には重要な課題になる。その解決策としては、主要組織抗原複合体（MHC）遺伝子の一部を破壊したES細胞株の作製や、さまざまなMHCのタイプの受精卵からES細胞を分離して集めるES細胞バンク構想が考えられる。これらは免疫拒絶反応を完全に抑えることは不可能としても、免疫抑制剤と共用することによっての対処が可能になるであろう。

この他究極の拒絶反応回避技術として、患者の体細胞（たとえば皮膚細胞）の核を除核した受精卵に移植して、受精卵と同じように発生させたクローン胚からES細胞を作り出す方法が考えられ

ている。クローン羊ドリーを作り出した体細胞核移植技術（クローン技術）の応用である。ウシでは体細胞の核を別のウシの除核未受精卵に移植してクローン胚をつくり、それをもとに心筋細胞や腎臓の細胞などを作った後、これらを体細胞を取り出した元のウシに移植した場合、拒絶反応が起こらないことが確認されている⁷⁾。また、マウスではすでに核移植卵からES細胞の作製に成功しており、作製されたES細胞が正常発生する能力をもつことが示されている⁸⁾。

ヒトクローン胚研究は、2001年、米国アドバンス・セル・テクノロジー社が行ったのが最初の報告で、作製したクローン胚は6細胞期の段階で止まっており、ES細胞樹立のために必要な胚盤胞期胚まで発生が進まなかった。しかし彼らは、第2減数分裂を終えた未受精卵をサイトカラシンB処理とカルシウムイオノフォアを用いて単為発生させることにより、胚盤胞まで発生が進むことが明らかにしている⁹⁾。2004年2月には、韓国ソウル大学などの研究チームが、ヒトクローン胚からヒトES細胞を作製することに成功した¹⁰⁾。彼らは同意を得た16人の女性から242個の卵母細胞の提供を受け、このうち176個の卵母細胞の核を取り除いて卵母細胞と同じ人の体細胞を移植し、クローン胚を作製した。このうち30個が子宮に着床できる胚盤胞期胚と呼ばれる段階まで分裂が進み、さらにその中の20個の胚盤胞期胚から最終的に1株のES細胞を作製することに成功している。

ヒトクローン胚の作製は、韓国では2003年末にクローン人間づくりを禁止する生命倫理法が成立したものの、医療研究目的に限ってヒトクローン胚の作製が認められている。ドイツではヒトクローン胚の作製は禁止、アメリカでも政府予算を使った研究は禁止されている一方、今まで全面禁止していたフランス議会が2004年7月、ヒトクローン胚の研究を5年間の期間限定で容認する生命倫理法を採択した。わが国でもヒトクローン胚研究については、それまで「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律（2001年6月施行）

に基づく「特定胚の取り扱いに関する指針」によって禁じられていたが、2004年7月政府の総合科学技術会議は、再生医療などへの応用が期待されるヒトクローン胚について、基礎研究の解禁を決定した。イギリス政府は2004年8月に国立ニューキャッスル大学が申請していた人のクローン胚からES細胞を作る研究を承認したと発表した。イギリスは2001年に世界で初めて人のクローン胚を作成する研究を容認していたが、許可を与えたのはこれが初めてである。このようにヒトクローン研究はソウル大学の成功以降、世界的に大きく動き出した感はあるが、成功率はまだまだ低く、研究には多くのヒト卵子を必要とすることや、胚を新規に作製することの懸念等、問題点は多い。

再生医療を現実のものとするためには、免疫拒絶問題以外にも、ヒトES細胞を思い通りに目的の細胞へ導くための方法が確立されなければならない。また、目的とする特定細胞だけを確実に分離する技術も重要となる。仮にES細胞が混じっていたりすると移植後の体内で奇形腫を形成したり、思わぬ細胞を作り出してしまう恐れがあるからである。また現状では、ヒトES細胞の培養にフィーダーとしてマウス胎児由来線維芽細胞が使用されていたり、培養液としてウシ血清が使用されていたりするケースがあるが、異種タンパク質や未知ウイルスの混入等を避ける意味でも、こうした動物製剤を使用しなくても行える培養系技術の開発といったことも安全性を確保する観点から必要な課題と考えられる。

さらに、ES細胞の実際の臨床応用を考えたときには、どの段階まで分化した細胞を患者の体内のどこにどれだけ移植すれば効果があるかや、どのような副作用があるかなど、有効性や安全性を検討する前臨床的試験が不可欠となる。通常このような場合、モデル動物を利用することになるが、ES細胞やモデル動物がマウスのものであったりした場合には、実験結果がヒトを十分反映しないこともしばしば指摘されており、このような場合、ヒトに近縁なサルおよびサルES細胞を用いた前臨床的検討が有用となる。サルのES細胞株は、

Thomsonらの研究グループ以外には、オレゴン大学のWolfらが樹立したアカゲザルES細胞株¹¹⁾と筆者らの樹立したカニクイザルES細胞⁵⁾の数株が報告されているのみであり、ヒトES細胞に比べるとサルES細胞を用いた研究報告例も少ない。しかし、サルES細胞のモデルサルへの移植は、同種間移植の評価系として、ヒトES細胞の臨床応用に貴重な情報をもたらすものと思われる。

6. ヒトES細胞研究のその他の用途

ここで、ヒトES細胞の利用について再生医療以外の用途についても少しだけ言及してみたい。

(1) 発生・分化機構や疾患原因解明のための基礎的研究

いうまでもなくヒトES細胞は、発生・分化の分子機構を解明する研究において直接的な情報を提供してくれる。ヒトの発生初期の未解明の現象が原因で新生児の先天性欠損や自然流産につながる胎盤異常が起きると考えられているが、ヒトES細胞を試験管内で研究することで、このような問題を引き起こす遺伝子・分子および細胞現象を解明し、これを防止する方法を見つけ出すことができるかもしれない。また、発生初期の染色体異常が及ぼす影響の解明にも利用できる。初期小児癌の多くが胎生期に原因があるとされているが、ES細胞の研究によりこの癌の発生過程を追跡するような研究も可能である。

(2) 創薬研究への活用

ヒトES細胞の分化によって得られる各種機能細胞を創薬研究開発に活用することも極めて実現性の高い利用法と考えられる。現状の創薬研究では、臨床試験に先立って、その有効性や安全性を評価する目的で、動物に薬剤を投与することによる生体内試験や、動物細胞を使用する生体外（試験管内）試験など数多くの前臨床試験が行われている。しかし、動物やその細胞を用いた試験では、ヒトの細胞に与える影響を予測することが困難な場合もある。ヒトES細胞に由来する機能細胞は真にヒト細胞そのものであり、生体内の細胞とよく似た反応を示す可能性が高く、薬効・薬理作用

や毒性など薬剤開発の評価系として、より安全で安価なモデルを提供できるようになるものと考えられている。

(3) 遺伝子工学上の新技術の開発

マウス ES 細胞ではすでに行われてきたことではあるが、ヒト ES 細胞において試験管内で遺伝子改変や遺伝子導入（特定の遺伝子発現やタンパク質発現）を行うことができるようになれば、生命科学の進展において有益な情報を提供し、遺伝子治療法をはじめとして医療に多大な貢献をもたらすであろう。

7. おわりに

ヒト ES 細胞は再生医療への応用のみならず、疾病原因の解明、創薬開発への利用等において多大な可能性を有することは確実と考えられるが、ヒト ES 細胞の研究はまだ緒についたばかりといっても過言ではなく、現状では重要な技術的課題が多く残されている。再生医療の実現に向けては発生生物学、分子生物学以外にも、遺伝子工学、組織工学などの幅広い分野における研究が併せて進められる必要がある。

また、ヒト ES 細胞は、生命の萌芽としてのヒト初期胚に人為的操作を加えることによって初めて得られるものであることから、生命倫理という観点でも大きな課題を有している。ヒト胚ならびにヒト ES 細胞に対する考え方は個々人の生命観により様々であり、あらゆる立場の人の意見を束ねることは難しいかもしれない。しかしながら、

それを研究に使用すること自体が倫理的な観点から極めて慎重に行うべき行為であることについては論を待たないであろう。研究者は研究を推進するにあたり、常に社会の声に耳を傾けながら、どのような研究を何の目的で行っているのかを社会に情報発信し、それについて社会全体が議論を重ねることが、再生医療を実現し、その恩恵を受けるために必要なことではないだろうか。

文 献

- 1) M. J. Evans *et al.*, *Nature*, 292, 154 (1981)
- 2) G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 7634 (1981)
- 3) J. A. Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 7844 (1995)
- 4) J. A. Thomson *et al.*, *Biol. Reprod.*, 55, 254 (1996)
- 5) H. Suemori *et al.*, *Develop. Dynamics*, 222, 273 (2001)
- 6) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, 282, 1145 (1998)
- 7) R. P. Lanza *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 20, 665 (2002)
- 8) T. Wakayama *et al.*, *Science*, 292, 740 (2001)
- 9) J. B. Cibbeli *et al.*, *J. Regenerative Med.*, 2, 25 (2001)
- 10) W. S. Hwang *et al.*, *Science*, 303, 1669 (2004)
- 11) K. Y. Pau & D. P. Wolf, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2, 41 (2004)

Different Differentiation Kinetics of Vascular Progenitor Cells in Primate and Mouse Embryonic Stem Cells

Masakatsu Sone, MD; Hiroshi Itoh, MD, PhD; Jun Yamashita, MD, PhD;
Takami Yurugi-Kobayashi, MD; Yutaka Suzuki, PhD; Yasushi Kondo, PhD;
Akane Nonoguchi; Naoki Sawada, MD, PhD; Kenichi Yamahara, MD; Kazutoshi Miyashita, MD;
Kwijun Park, MD; Masabumi Shibuya, MD, PhD; Shinji Nito, PhD;
Shin-Ichi Nishikawa, MD, PhD; Kazuwa Nakao, MD, PhD

Background—We demonstrated that vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2)-positive cells derived from mouse embryonic stem (ES) cells can differentiate into both endothelial cells and mural cells to suffice as vascular progenitor cells (VPCs). Here we examined whether VPCs occur in primate ES cells and investigated the differences in VPC differentiation kinetics between primate and mouse ES cells.

Methods and Results—In contrast to mouse ES cells, undifferentiated monkey ES cells expressed VEGF-R2. By culturing these undifferentiated ES cells for 4 days on OP9 feeder layer, VEGF-R2 expression disappeared, and then reappeared after 8 days of differentiation. We then isolated these VEGF-R2-positive and vascular endothelial cadherin (VEcadherin)-negative cells by flow cytometry sorting. Additional 5-day reculture of these VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells on OP9 feeder layer resulted in the appearance of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1)-positive, VEcadherin-positive, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-positive endothelial cells. On a collagen IV-coated dish in the presence of serum, these cells differentiated into smooth muscle actin (SMA)-positive and calponin-positive mural cells (pericytes or vascular smooth muscle cells). Addition of 50ng/mL VEGF to the culture on a collagen IV-coated dish resulted in the appearance of PECAM1⁺ cells surrounded by SMA⁺ cells. In addition, these differentiated VEGF-R2⁺ cells can form tube-like structures in a 3-dimensional culture.

Conclusion—Our findings indicate that differentiation kinetics of VPCs derived from primate and mouse ES cells were different. Differentiated VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells can act as VPCs in primates. To seek the clinical potential of VPCs for vascular regeneration, investigations of primate ES cells are indispensable. (*Circulation*. 2003;107:2085-2088.)

Key Words: angiogenesis ■ cells ■ endothelium ■ muscle, smooth ■ vessels

Embryonic stem (ES) cells with pluripotency and self-renewal are now highlighted as promising cell sources for regeneration medicine. Previously we demonstrated that mouse ES cell-derived vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGF-R2)-positive cells can differentiate into both endothelial cells and mural cells (pericytes and vascular smooth muscle cells) and reproduce the vascular organization process.¹ Vascular cells derived from VEGF-R2⁺ cells can organize vessel-like structures in a 3-dimensional culture. Mouse ES cell-derived VEGF-R2⁺ cells can, thus, serve as vascular progenitor cells (VPCs). Furthermore, we have reported that implantation of mouse ES-derived vascular cells into nude mice significantly augmented blood flow in an

adult neoangiogenesis model, which suggests the usefulness of ES cell-derived VPCs for vascular regeneration medicine.²

Recently primate embryonic stem cell lines were established from blastocysts of both humans and monkeys.³⁻⁶ Primate ES cells possess a number of characteristics distinct from mouse ES cells, such as surface antigens, leukemia inhibitory factor (LIF)-independence, and long doubling times.³⁻⁷ Recent study showed that VEGF-R2 was expressed in undifferentiated human ES cells, unlike in mouse ES cells,^{8,9} and continuously expressed during differentiation in embryoid body (EB) formation. It has also been demonstrated that platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1)-positive cells can be isolated from human EBs,

Received December 31, 2002; revision received March 12, 2003; accepted March 13, 2003.

From the Department of Medicine and Clinical Science (M.S., H.I., T.Y.-K., A.N., N.S., K.Y., K.M., K.P., K.N.) and the Department of Molecular Genetics (J.Y., S.-I.N.), Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto; the Discovery Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co, Ltd, Osaka (Y.S., Y.K., S.N.); the Department of Genetics, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo (M.S.); and the Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe (S.-I.N.), Japan.

Correspondence to Hiroshi Itoh, MD, PhD, Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507 Japan. E-mail hiito@kuhp.kyoto-u.ac.jp

© 2003 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000070022.78747.1B

and they can act as endothelial cells.⁹ However, the vascular differentiation process of primate cells has not been demonstrated, and VPCs that can differentiate into both endothelial cells and mural cells have not been characterized in the primates. To elucidate the vascular differentiation process of primate cells and to seek the clinical potential of VPCs for vascular regeneration therapy with the use of an *in vitro* 2-dimensional differentiation system of ES cells that we established,^{10,11} we examined whether and how VPCs occur in primate ES cells in comparison to mouse ES cells.

Methods

Cell Culture

Cynomolgus monkey ES cell lines were established, and their pluripotency was confirmed by teratoma formation in severe combined immunodeficiency mice, as described previously.^{6,12} Undifferentiated ES cells were maintained as described.^{6,12} OP9 feeder cell lines that were established from mouse calvaria were maintained as described previously.^{11,13,14}

To induce differentiation, undifferentiated ES cells were cultured on OP9 feeder layer in differentiation medium (minimal essential medium [GIBCO] supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol).¹¹ Sorted VEGF-R2⁺ cells were re-cultured on an OP9 feeder layer or collagen IV-coated dish with differentiation medium. Three-dimensional culture was performed as described.¹

Flow Cytometry and Cell Sorting

At different time points during the differentiation process, cultured cells were harvested by cell dissociation buffer (GIBCO). Flow cytometry analysis and cell sorting were as described.^{10,11} Monoclonal antibody for VEGF-R2, which we developed,¹⁵ was labeled with Alexa-647 in our laboratory (monoclonal antibody labeling kit, molecular probes). PE-conjugated vascular endothelial cadherin (VEcadherin) antibody and fluorescein isothiocyanate-conjugated PECAM1 antibody were purchased from BD Biosciences. To test the differentiation potential of VEGF-R2⁺ cells, sorted cells were plated into a collagen IV-coated 96-well dish at the density of 2.5×10^3 cells per well, or plated on OP9 feeder layer in a 24-well dish at 1×10^4 cells per well.

Immunohistochemistry

Staining of culture cells on dishes was as described.^{11,11} Monoclonal antibody for smooth muscle actin (SMA) was purchased from Sigma, those for calponin and smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) were purchased from DAKO, and those for PECAM1, VEcadherin, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were purchased from BD Biosciences.

Results

Although undifferentiated mouse ES cells did not express VEGF-R2, most of undifferentiated monkey ES cells were positive for VEGF-R2 (data not shown). Mouse ES cells differentiated into VEGF-R2⁺ cells during a 4-day differentiation on OP9 feeder layer. These mouse VEGF-R2⁺ cells differentiated into endothelial cells during 4 days of reculturing on a collagen IV-coated dish or OP9 feeder layer.¹¹ In contrast, however, we could not induce endothelial cells from VEGF-R2⁺ undifferentiated monkey ES cells in the same condition (data not shown). Thus, we examined VEGF-R2 expression on monkey ES cells during differentiation.

Undifferentiated monkey ES cells were dissociated to single cells and plated on an OP9 feeder layer to induce

differentiation (Figure 1A). As shown in Figure 1B, VEGF-R2 was expressed in undifferentiated monkey ES cells (day 0), but disappeared during a 4-day differentiation on OP9 feeder layer, and then reappeared after 8 days of differentiation. VEcadherin⁺ cells appeared at day 10 of differentiation. Alkaline phosphatase activity, which was reported to be detected in undifferentiated ES cells^{3,5} but not in mature vascular cells, was clearly detected in undifferentiated ES cells but not in the cells that were cultured for 8 days on an OP9 feeder layer (Figure 1C and 1D), indicating that VEGF-R2⁺ cells at 8-day differentiation are apparently distinct from those observed in undifferentiated ES cells.

VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells were purified by flow cytometry sorting at day 8 (Figure 1A). Additional 5-day culturing of VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells on an OP9 feeder layer resulted in the appearance of PECAM1⁺ cells (Figure 2A), which were also positive for VEcadherin and eNOS (Figure 2B and 2C). On the other hand, on a collagen IV-coated dish with 10% FCS, more than 90% of VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells became positive for SMA (Figure 2D) and calponin (Figure 2E) after an additional 5 days of culturing. Some were positive for SMMHC (Figure 2F). In this culturing condition, PECAM1⁺ endothelial cells did not appear. In contrast, addition of 50ng/mL VEGF to culture on a collagen IV-coated dish resulted in the appearance of PECAM1⁺ cells (about 20% of total cells) that were surrounded by SMA⁺ cells (Figure 2G). VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells at day 10 also could differentiate into endothelial cells and mural cells similarly to day 8. VEGF-R2⁺ VEcadherin⁻ cells doubled themselves in about 44 hours on a collagen IV-coated dish with VEGF and FCS. Almost all of the VEGF-R2⁺ VEcadherin⁺ cells obtained by flow cytometry sorting at day 10 became positive for PECAM1 after an additional 5 days of culturing on a collagen IV-coated dish with 10% FCS.

We further examined whether VEGF-R2⁺ cells can form vascular structure *in vitro*. Aggregates of several hundred VEGF-R2⁺ cells were cultivated in collagen I-A gels with 10% FCS, 50ng/mL VEGF, 50ng/mL basic fibroblast growth factor, and 100 pM phorbol myristate acetate. The cells migrated out from the aggregates and formed cord-like structures within 3 days (Figure 2H).

Discussion

In the previous study,¹ we showed that VEGF-R2⁺ cells in 4-day differentiation of mouse ES cells can differentiate into 2 major vascular cell types (endothelial cells and mural cells) *in vitro* and *in vivo*. Unlike mouse ES cells, undifferentiated monkey ES cells were already expressing VEGF-R2, similar to human ES cells. VEGF-R2 expression on monkey ES cells disappeared during 4-day differentiation on an OP9 feeder layer, and then re-expressed after 8 days of differentiation (Figure 1C). VEGF-R2-expressing cells on day 8 were different from VEGF-R2⁺ undifferentiated monkey ES cells. First, the former did not show alkaline phosphatase activity as the latter did. Second, the former could differentiate into endothelial cells but the latter could not. Thus, the VEGF-R2⁺ cells that re-appeared at 8 days of differentiation in monkey ES cell differentiation seem to possess similar differentiation potentials to those in 4-day differentiation of mouse ES cells,

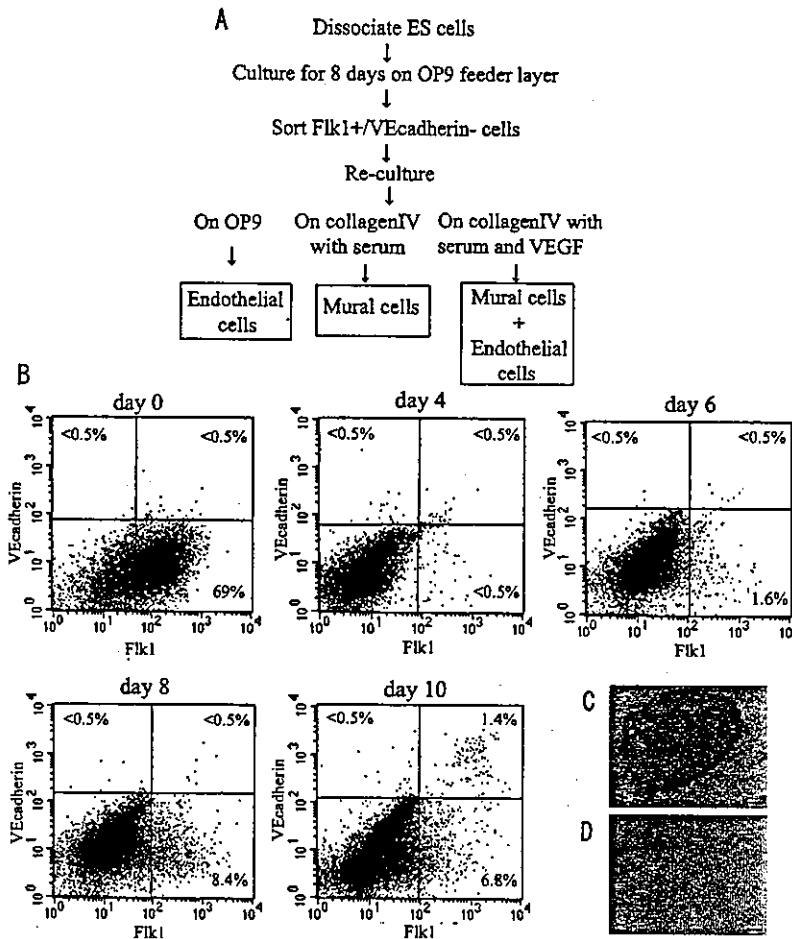


Figure 1. A, Schematic representation of the differentiation from ES cells to endothelial cells and mural cells. B, Flow cytometric analysis of the time course of differentiation of primate ES cells on an OP9 feeder layer. C, Alkaline phosphatase activity of undifferentiated ES cells on mouse embryonic fibroblast layer. D, Alkaline phosphatase activity of ES cells differentiated for 8 days on an OP9 feeder layer. Flk1 is a VEGF-R2. Scale bars: 100 μ M.

whereas VEGF-R2 expression in undifferentiated monkey ES cells should be of less functional significance in vascular differentiation.

In the present study, we demonstrated that VEGF-R2⁺ VEGcadherin⁻ cells that appeared at 8-days' differentiation in monkey ES cells give rise to both endothelial cells and

mural cells and form vascular-like structures in a 3-dimensional culture in vitro. Our findings indicate that differentiated VEGF-R2⁺ cells can act as VPCs in primates, and the differentiation kinetics of VPCs in primate and mouse ES cells were different. Thus, to seek the clinical potential of VPCs for vascular regeneration and to

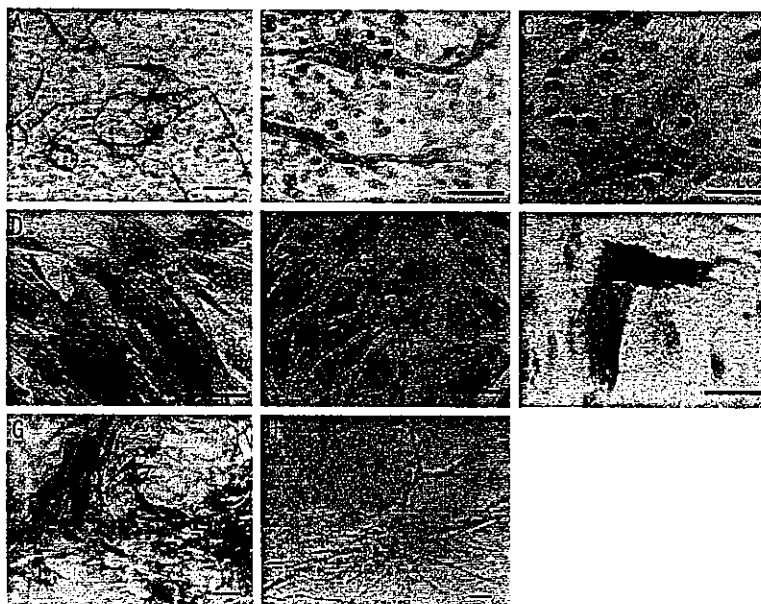


Figure 2. Immunohistochemical analysis of differentiation of primate ES cells into vascular cells (A through G). A through C, Immunostaining for endothelial cell markers: PECAM1 (A), VEGcadherin (B), and eNOS (C). D through F, Immunostaining for mural cell markers: smooth muscle actin (D), calponin (E), and smooth muscle myosin heavy chain (F). G, Double immunostaining for PECAM1 (brown) and smooth muscle actin (blue). H, Tube formation of VEGF-R2⁺ cell aggregates in 3-dimensional culture. Scale bars: B through G, 50 μ M; A and H, 100 μ M.

obtain novel insights in primate vascular development, investigations of primate ES cells are indispensable. Our novel in vitro vascular differentiation system using VPCs derived from primate ES cells is promising for dissecting the molecular and cellular mechanisms in the primate vascular development, to which the knock-out animal research approach is not available.

References

1. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000;408:92-96.
2. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, et al. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood*. 2003;101:2675-2678.
3. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7844-7848.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
5. Réubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000;18:399-404.
6. Suemori H, Tada T, Torii R, et al. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn*. 2001;222:273-279.
7. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000;227:271-278.
8. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10716-10721.
9. Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:4391-4396.
10. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 1998;125:1747-1757.
11. Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, et al. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood*. 1999;93:1253-1263.
12. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1580-1585.
13. Kodama H, Nose M, Niida S, et al. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol*. 1994;22:979-984.
14. Kodama H, Nose M, Yamaguchi Y, et al. In vitro proliferation of primitive hemopoietic stem cells supported by stromal cells: evidence for the presence of a mechanism(s) other than that involving c-kit receptor and its ligand. *J Exp Med*. 1992;176:351-361.
15. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001;97:785-791.

Dopamine Receptor 2 Regulates L-Type Voltage-Gated Calcium Channel in Primary Cultured Mouse Midbrain Neural Network

Fumie Yasumoto,^{1,3,4} Takayuki Negishi,^{1,3} Yoshiyuki Ishii,¹ Shigeru Kyuwa,¹
Yoichiro Kuroda,^{2,3} and Yasuhiro Yoshikawa^{1,3}

Received March 30, 2004; accepted April 16, 2004

SUMMARY

1. Synchronous oscillation of intracellular Ca^{2+} in the central nervous system is essential for neural development. We previously reported that endogenous dopamine was involved with synchronous Ca^{2+} oscillation of primary cultured midbrain neurons, and that regulation of dopamine in synchronous oscillation was distinctly different through dopamine receptor 1 (D1R) and 2 (D2R): the action of dopamine through D1R or D2R was facilitative or suppressive, respectively, to the Ca^{2+} influx of synchronous oscillation.

2. In the present study, we confirmed that the suppressive effects of D2R were mediated by the regulation of the L-type voltage-gated Ca^{2+} channel, not by the regulation of NMDA receptor on the Ca^{2+} influx in the midbrain neural network showing synchronous oscillation.

3. This evidence promotes better understanding of the regulation of neural activity by endogenous dopamine in networked neurons.

KEY WORDS: dopamine receptor 2; L-type voltage-gated calcium channel; NMDA receptor

INTRODUCTION

Neurons in the central nervous system (CNS) change their intracellular Ca^{2+} concentrations synchronously and periodically, accompanied by neural bursts through glutamatergic synapses, and this oscillatory phenomenon is considered to be essential for the development and differentiation of the CNS (Gray *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1992; Garaschuk *et al.*, 1998). We previously reported that primary cultured mouse midbrain neurons burst synchronously and periodically through glutamatergic

¹ Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

² Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, 2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan.

³ Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012, Japan.

⁴ To whom correspondence should be addressed at Fumie Yasumoto, Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan; e-mail: aa37169@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp.