

2004-00086A

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高坂 新一

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究	1
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	
II. 分担研究報告書	
1. NMDA 受容体を介した神経幹細胞の増殖分化の調節	5
高坂 新一 (国立精神・神経センター神経研究所)	
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	7
和田 圭司 (国立精神・神経センター神経研究所)	
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	9
古川 昭栄 (岐阜薬科大学分子生物学)	
4. 神経幹細胞の新たな分化誘導法の開発	11
島崎 琢也 (慶應義塾大学医学部生理学)	
5. 成体霊長類の神経幹細胞の特性	13
久恒 辰博 (東京大学大学院先端生命科学)	
6. ES 細胞移植による中枢神経機能再生	15
高橋 淳 (京都大学大学院医学研究科脳神経外科)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

I . 総括研究報告書

神経幹細胞を用いた神経変性疾患の治療に関する研究

主任研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨： 昨年に引き続き、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に関する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、マウスES細胞において、in vitro での中枢神経系の発生再現系を利用した DNA マイクロアレイ解析によって、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御に、細胞分裂・DNA 複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群が関与している可能性を見出した。また、Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択することで、移植後の腫瘍の形成確率を低下させることに成功した。

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、NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞の増殖亢進作用に、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes* 遺伝子の発現が深く関与していることを明らかにした。さらに、マウス成体脳内の特定の領域からピンポイントで神経系前駆細胞を単離し G-蛋白質共役型受容体 (GPCR) の発現プロファイルを決定した結果、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している7種類の GPCR を同定した。

霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究については、成体霊長類(カニクイザル)の中大脳動脈閉塞モデルにおいて、プロモデオキシウリジンをを用いて分裂細胞を標識した結果、閉塞後海馬および側脳室領域での細胞分裂が有意に高まることがわかった。また、海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進も確認できた。

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科学科助教授
高橋淳 京都大学大学院医学研究科神経外科講師

ともに、神経幹細胞を脳内に移植する、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、神経変性疾患で損傷された神経回路網を再構築させることを最終目標とする。昨年に引き続き、1) 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、2) 内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究、3) 霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究、に焦点を当てて研究を推進することとした。

A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患では、脳内の特定の部位における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。現在、神経変性疾患の治療としては、主に薬剤を中心とした対象療法が行われているが、治療効果には限界があるのが現状である。このような状況下、多分化能を有する神経幹細胞を脳内に移植し、特定のニューロンや神経回路網を再構築させる再生療法が注目を集めている。さらに、最近、神経幹細胞は胎児のみならず成体の脳内にも存在していることが判明した。そこで、本研究班は、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

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

1) マウス ES 細胞による、in vitro での中枢神経系の発生再現系を利用した DNA マイクロアレイ解析によって、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御に、細胞分裂・DNA 複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群が関与している可

能性が示唆された。霊長類 ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様な神経誘導・神経幹細胞培養系が確立された。

2) マウス ES 細胞から神経系細胞を誘導しマウス脳に移植したところ、約半数の例で腫瘍形成がみられ、その原因は未分化 ES 細胞の混入であった。そこで、Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択してマウス脳内に移植したところ、これらの細胞は脳内でニューロンに分化し、腫瘍形成は認められなかった。ヒト ES 細胞においても、神経幹細胞は Sox1 を発現し、未分化 ES 細胞は Sox1 を発現していないことが報告されているため、この方法は臨床にも応用できる可能性があると考えられる。

2. 内在性神経幹細胞の賦活化に関する研究

1) NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞の増殖亢進作用に、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes* 遺伝子の発現が深く関与していることが判明した。また、タイムラプス解析の結果、大脳皮質形成期に見られた NMDA 受容体阻害剤の投与による幼弱ニューロンの細胞移動の遅延が、主に脳室帯から中間帯への移動の遅延および中間帯における異常な迷走によるものであることがわかった。

2) マウス成体脳内の特定の領域からピンポイントで神経系前駆細胞を単離し G-蛋白質共役型受容体 (GPCR) の発現プロファイルを決定した。その結果、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している7種類の GPCR を同定する事が出来た。これら GPCR は成体神経幹細胞の人為的な制御法を開発する上で今後応用できると考えられた。

3. 霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究

サル類(カニクイザル)の中大脳動脈閉塞モデルにおいて、プロモデオキシウリジンをを用いて分裂細胞を標識した結果、閉塞後海馬および側脳室領域での細胞分裂が有意に高まることがわかった。また、海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進も確認できた。しかしながら、虚血巣に近接した線条体および大脳皮質においてはニューロンの新生を確認できなかった。

4. 脊髄損傷モデルラットを用いた研究

脊髄を完全に切断したラットの患部に FGF-2 を投与することで、通常では見られない運動機能の改善が確認できた。FGF-2 の薬理作用として、脊髄損傷後に起こるアポトーシスを抑制するとともに、軸索の伸展を促進する分子を発現することが示唆されているフィブロネクチン陽性細胞を増殖させることがわかった。また、脊髄半切断モデルにおける 4-メチルカタコールの運動機能回復効果にも、FGF-2 が関与していることが示唆された。

D. 結論

ES 細胞の分化誘導法については、マウスおよび霊

長類の ES 細胞の培養法を確立した。さらに、Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択する技術を確立し、移植後の腫瘍形成を高率で抑制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、NMDA 受容体が神経幹細胞の分化・成熟過程に関与していることが判明した。また、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している GPCR を同定した。霊長類を用いた神経幹細胞に関する研究については、カニクイザルの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、閉塞後海馬および側脳室領域における細胞分裂および海馬や嗅球におけるニューロン新生の亢進が確認できた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., Sasaki Y., Ohsaki, K., Nakamura, S. Arakawa, Y. and Kohsaka, S.: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J. Neurosci.* 24, 7923-7930, 2004

Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R., Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 164, 59-64, 2004

Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. *Am. J. Pathol.* 164, 1367-1374, 2004

Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J. Neurosci. Res.* 79, 476-487, 2005

Kinukawa, H., Jikou, T., Nitta, A., Furukawa, Y.,

Hashimoto, M., Fukumitsu, H., Nomoto, H. and Furukawa, S.: cAMP/protein Kinase A signal attenuates Ca²⁺-induced fibroblast growth factor-1 synthesis in rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 77, 487-497, 2004

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 275, 124-142, 2004

Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Shizuko, I., Shimazaki, T., Onodera, M., Okano, H., Mizusawa, H.: Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J. Neurosci. Res.* 78, 215-223, 2004

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of ES cell-derived neural cells. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, October, 2004

Imura, T., Kanatani, S., Fukuda, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cerebral Cortex* 15, 332-340, 2005

Sato, Y., Koketsu, D., Ageyama, N., Ono, F., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Successful retrograde transport of fluorescent latex nanospheres in the cerebral cortex of the Macaque Monkey. *Experimental Animal* 53, 383-386, 2004

Kishi, Y., Takahashi, J., Koyanagi, M., Morizane, A., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S., Hashimoto, N.: Estrogen promotes the differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 279-286, 2005

Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102-109, 2005

2. 学会発表

高坂新一: 神経の再生修復をめざして. 神経組織の成長・再生・移植研究会、第 19 回学術集会、岐阜、6.19.2004

高坂新一: 神経再生の分子機構の解明をめざして. 第26回日本生物学的精神医学界、第34回日本神経精神薬理学会合同年会、教育講演、横浜、7.23, 2004

Nishimoto, M., Ohashi, H., Hara, Y., Ayukawa, K., Kudo, K., Abe, T., Aoki, S., Wada, K.: Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors. 34rd Annual Meeting, San Diego, USA, Oct. 8, 2004

Hisatsune, T.: Adult neurogenesis in intact and injured primate brains. 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug. 22-27, S63-5, 2004

高橋 淳ら: ES細胞からのドパミン神経誘導と移植条件の至適化. 第63回脳神経外科学会総会、名古屋、10.8, 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得

【名称】 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

【出願人】(財)ヒューマンサイエンス振興財団

【出願日】2005. 2. 21

II. 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

分担研究者 高坂新一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨:NMDA 受容体阻害剤がもたらす神経幹細胞の増殖亢進作用には、神経幹細胞の維持に重要な働きを担っている *Hes1*, *Hes5* 遺伝子の発現が深く関与していることが判明した。また、タイムラプス解析の結果、大脳皮質形成期に見られた NMDA 受容体阻害剤の投与による幼弱ニューロンの細胞移動の遅延が、主に脳室帯から中間帯への移動の遅延および中間帯における異常な迷走によるものであることがわかった。

A. 研究目的

NMDA 受容体は、中枢神経系における主要な興奮性情報伝達を担うイオンチャネル型受容体であり、その発現は脳の発生過程のかなり早い時期から既に観察されるものの、機能については未だ十分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

個体への阻害剤投与実験は、妊娠 15 日齢のマウスにおいて、PBS に溶解した CNS-1102 (3 mg/kg) を腹腔内に投与し一定時間生育後、胎児脳を取り出し組織染色実験に用いた。

子宮内電気穿孔実験は、ジエチルエーテルによる麻酔下、妊娠 15 日齢のマウスから子宮を取り出し、ガラスマイクロピペットを用いて 2 μ l のプラスミド DNA (5 μ g/ μ l) を子宮の上から胎児の脳室内に注入後、34 mV、70-80 mA で 4 回のパルス電流を流し、脳室帯の細胞にプラスミド DNA を導入した。その後、子宮を母親マウスの腹腔内に戻し、一定期間飼育後、遺伝子を導入した胎児または新生児より脳を取り出し、組織染色およびタイムラプス解析を行った。

タイムラプス解析は、子宮内電気穿孔法により遺伝子を導入した胎児の脳を摘出し、ミクロームを用いて約 200 μ m の大脳皮質切片を作製後、37°C で 10%CO₂ に調製したチャンパー内に脳切片を固定し、タイムラプス用共焦点顕微鏡下で経時的に蛍光シグナルを検出した。

全ての実験は国立精神神経センター実験動物委員会の定める規定に従った。

C. 研究結果

これまで、脳発達期に NMDA 受容体阻害剤を投与することで脳室帯の神経幹細胞の増殖が亢進することを見出した。さらに、その分子機構として、神経幹細胞の維持に重要な役割を担っている *Hes1*, *Hes5* の発現が亢進することから、Notch シグナル系関連分子について解析してきた。本年度、さらに、詳細に *Hes* 発現細胞の局在を解

析するため、*Hes* プロモーターの下流に EGFP を挿入したベクター (*Hes*-EGFP) を用いて、*Hes* 発現細胞の可視化を試みた。15 日齢のマウス胎児の脳室帯の細胞に、子宮内電気穿孔法を用いて *Hes5*-EGFP ベクターを導入後、経時的に胎児の脳を摘出し、EGFP の蛍光シグナルを指標に *Hes5* 発現細胞の局在を解析した。その結果、NMDA 受容体阻害剤を投与したマウスにおいて、胎生 19 日齢で脳室帯に顕著な EGFP の蛍光シグナルが観察された。これらの細胞の多くは nestin 陽性細胞であったものの、一部 nestin 陰性細胞においても発現シグナルが観察された。現在、*Hes5* 発現細胞のさらなる細胞種の同定、および NMDA 受容体の活性化と *Hes5* の発現との関連性を検討中である。

妊娠 17 日齢のラットに NMDA 受容体阻害剤を投与することで、胎児の大脳皮質における幼弱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、細胞移動の詳細な解析を行うため、移動中の幼弱ニューロンを EGFP で可視化し、タイムラプス解析を行った。胎生 15 日齢のマウスの脳室帯の細胞に子宮内電気穿孔法を用いて EGFP 発現ベクターを導入し、2 日後に胎児の脳から大脳皮質切片を作製し EGFP の蛍光シグナルを経時的に観察した。その結果、阻害剤非投与コントロールの大脳皮質切片では、EGFP 発現細胞が脳室帯から中間帯、さらには皮質板の表層へとすみやかに移動するのに対して、EGFP 発現ベクター導入の 2 時間前に母親に阻害剤を投与した場合、脳室帯から中間帯への移動の遅延、さらには中間帯で迷走している多くの EGFP 発現細胞が観察された。一方、中間帯から皮質板表層への移動速度に関しては、阻害剤を投与したマウスにおいてもコントロールと有意な差は観察されなかった。

D. 考察

大脳皮質形成時、NMDA 受容体阻害剤を投与することで幼弱ニューロンの細胞移動が遅延することは報告されているものの、その分子機構は全くわかっていない。Beharらは、表層側から放出

されるグルタミン酸が NMDA 受容体を介して幼弱ニューロンに対して”chemoattractant”として働くため、NMDA 受容体の機能が阻害されると幼弱ニューロンの移動速度が遅くなると推測しているが、本研究の結果からは、遅延の主な原因は移動速度の遅延よりもむしろ脳室帯および中間帯における細胞移動の初期過程にあると推測される。細胞移動の一つの機構として、幼弱ニューロンが放射状グリアの突起に沿って表層に移動する“locomotion 機構”が知られている。抗 nestin 抗体を用いて放射状グリアの形態を検討した結果、NMDA 受容体阻害剤を投与したマウスにおいても、コントロールとほぼ同等の突起を有していたことから、異常な迷走の原因は、放射状グリアの形態の異常ではなく、幼弱ニューロンと放射状グリアとの接着や脱接着の異常ではないかと推測される。近年、幼弱ニューロンと放射状グリアとの接着等に関与する分子として、微小管関連分子である Lis1 や doublecortin、また、アクチン制御分子である Filamin A 等、様々な分子が同定されており、これらの分子に変異が起こることで細胞移動の初期過程に異常が生じることがわかってきた。今後、これらの分子との関連性を検討することで、NMDA 受容体を介した細胞移動の分子機構が明らかにされることと思われる。

Hes1-EGFP、Hes5-EGFP は影山龍一郎教授(京都大)に供与いただいた。タイムラプス解析は仲嶋一範教授(慶応大)の指導のもと行った。

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

Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Uchino, S. and Kohsaka, S.: Visualization of microglia in living tissues by using Iba-1EGFP transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 2005, in press

Azuma, N., Tadokoro, K., Asaka, A., Yamada, M., Yamaguchi, H., Handa, H., Matsushima, S., Watanabe, T., Kohsaka, S. Kida, Y., Shiraishi, T., Ogura, T., Shimamura, K. and Nakafuku, M.: The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum. Mol. Genet.* 14, 735-745, 2005

Kamitori, K., Tanaka, M. and Kohsaka, S.: Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *BBRC* 330, 439-445, 2005

Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T. and

Kohsaka, S.: Axotomy-dependent urokinase induction in the rat facial nucleus: possible stimulation of microglia by neurons. *Neurochem Int.* 46, 107-116, 2005

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

Akazawa, C., Tsuzuki, H., Nakamura, Y., Sasaki Y., Ohsaki, K., Nakamura, S. Arakawa, Y. and Kohsaka, S.: The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J. Neurosci.* 24, 7923-7930, 2004

2. 学会発表

星雅人、佐々木洋、赤澤智宏、高坂新一: ラット顔面神経軸索損傷後における SH3 binding domain glutamic acid rich protein like 3 (SH3BGRL3) の発現上昇. 第 19 回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会、岐阜 6.19, 2004

平澤孝枝、大澤圭子、今井嘉紀、内野茂夫、高坂新一: Iba1-EGFP トランスジェニックマウスの作製; ミクログリアの可視化技術の開発. 第 27 回日本神経科学・第 47 回日本神経化学合同大会、大阪、9.21, 2004

高坂新一: 神経の再生修復をめざして. 神経組織の成長・再生・移植研究会、第 19 回学術集会、岐阜、6.19.2004

高坂新一: 神経再生の分子機構の解明をめざして. 第 26 回日本生物学的精神医学界、第 34 回日本神経精神薬理学会合同年会、教育講演、横浜、7.23, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得

(名称) 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

(出願人) (財) ヒューマンサイエンス振興財団

(出願日) 2005. 2. 21

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

研究要旨:成熟個体脳のスライスから領域別にピンポイントで神経系前駆細胞を切取り培養する実験系を用い G-蛋白質共役型受容体(GPCR)の網羅的発現解析を行った。成体神経系前駆細胞において特異的に高発現している GPCR を複数見出し、GPCR 作用薬による前駆細胞制御に応用出来る候補分子を同定した。

A. 研究目的

G 蛋白質共役型受容体(GPCR)はヒトゲノムにコードされた最大の受容体ファミリーであり、医療に用いられる治療薬剤の半分以上が GPCR を標的としていることから効果薬剤を同定する上で重要なターゲット分子群である。昨年度までに GPCR の大量遺伝子発現解析系を確立し、胎児神経系前駆細胞において発現する GPCR 遺伝子の発現プロファイルを決定した。さらに、それら GPCR に対する特異的リガンドの中から神経系前駆細胞制御に利用可能な薬剤の同定を行った。本年度は、脳内の神経幹細胞・前駆細胞の賦活化に利用できる GPCR をスクリーニングする目的で成体脳由来の神経幹細胞・前駆細胞における GPCR 遺伝子発現プロファイルの決定を目指した。

B. 研究方法

6週齢 C57/BL6J マウスから厚さ 500 μm の脳スライスをビブラトームにより作製しスライス上から顕微鏡下で成体神経幹細胞を含む微細領域を単離しニューロスフェア培養を行った。ニューロスフェア培養には DMEM/F12 培地に B27 サプリメント、EGF と bFGF を添加して用いた。培養ニューロスフェアならびに脳スライスから切取した、幹細胞を含む側脳室部位ならびに側脳室由来のニューロスフェアからそれぞれ定法により RNA を抽出し GPCR の遺伝子発現レベルを SYBR グリーン蛍光試薬を用いた RT-PCR 法によって定量することで 300 種類からなる GPCR 遺伝子の発現レベルを解析した。

(倫理的配慮)

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

C. 研究結果

脳内の様々な領域(皮質、海馬、線条体、白質)から形成されるニューロスフェアの数を解析した結果、側脳室前方部位(aLV 領域)から最も数多くのニューロスフェアが形成され、海馬、線条体、白質からもニューロスフェアが形成された。本実験において aLV 領域から得られたニューロスフェアは 8 世代以上(50 日間以上)の継代培養が可能でかつ神経系前駆細胞のマーカーである nestin 陽性であった。さらに分化条件下においてはニューロン(tuj-1 陽性)とグリア細胞(GFAP 陽性)へ分化する能力を有している事が確認された。そこで、幹細胞を含む側脳室部位ならびに aLV 領域由来のニューロスフェアのそれぞれにおいて 300 種類の GPCR 遺伝子発現プロファイルを決定した。その結果、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルかつ特異的に発現している GPCR として 7 種類を同定する事が出来た。さらに昨年度までに GPCR 発現プロファイル決定を終えていた胎児脳由来神経系前駆細胞における GPCR 発現データと比較する事で胎生期と成体脳の神経系前駆細胞におい

て特異的に発現する GPCR それぞれ8種類ずつが同定できた。

D. 考察

脳内の神経幹細胞・前駆細胞を賦活化し難治性神経疾患に対する治療へ応用する為には、その生理的な特性を知ることが必須である。本研究から成体脳由来の神経系前駆細胞が発現している受容体を同定する事ができ、どのような薬剤に応答する能力を有しているかが示唆された。これら GPCR 発現プロファイルデータは成体神経幹細胞の人為的な制御を考える上で今後重要な基礎データとなると考えられた。また、本研究から得られた知見は GPCR を細胞膜表面マーカーとして用いた幹細胞精製法等にも応用が可能であると考えられた。さらに、胎生期脳ならびに成体脳における神経系前駆細胞の GPCR 遺伝子発現の違いを明らかにすることができた。成体脳において特異的に発現する GPCR は脳内幹細胞の未分化性維持や増殖制御等に関与する可能性も示唆された。

E. 結論

マウス成体脳内の特定の領域からピンポイントで神経系前駆細胞を単離し GPCR の発現プロファイルを決定した。その結果、成熟脳由来神経系前駆細胞において高レベルで特異的に発現している7種類の GPCR を同定する事が出来た。これら GPCR は成体神経幹細胞の人為的な制御法を開発する上で今後応用できると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Harada, T., Harada, C., Wang, Y.L., Osaka, H., Amanai, K., Tanaka, K., Takizawa, K., Setsuie, R.,

Sakurai, M., Sato, Y., Noda, M. and Wada, K.: Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury *in vivo*. Am. J. Pathol.164, 59-64, 2004

Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y. and Wada, K.: Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testes. Am. J. Pathol. 164,1367-1374, 2004

2. 学会発表

Nishimoto, M., Ohashi, H., Hara, Y., Ayukawa, K., Kudo, K., Abe, T., Aoki, S., Wada, K.: Identification of novel regulatory mechanisms of neural progenitor cells via G-protein coupled receptors. 34rd Annual Meeting, San Diego, USA, Oct. 8, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

研究要旨:昨年度脊髄を完全切断したラット患部に FGF-2 を投与すると患部を越えて皮質や中脳脊髄路の下降性線維が多数再生し運動機能が改善されることを報告した。内在性線維芽細胞が FGF-2 刺激で増殖し再生に都合の良い環境をもたらしたと考えられる。本年度は、昨年度に引き続きこの FGF-2 誘導性線維芽細胞の特性を解析するとともに、4-メチルカテコールによる FGF-2 の産生誘導、脊髄損傷修復作用を調べた。

A. 研究目的

本研究は、中枢神経系に内在する神経幹細胞を賦活化して機能的なニューロンの回復、軸索を再生し、脊髄損傷の修復を助けることを目標としている。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切に望まれている。

昨年度の研究により、ラット第 10 胸髄を鋭利に完全切断しその後 FGF-2 を切断部近傍に投与すると 1 週間から運動機能が有意に回復することを見出した。逆行性軸索トレーサー法で調べると、大脳皮質や赤核からの下向性線維が切断部を越えて多数伸長していた。そのほか、1) 損傷部では FGF-2 によって増殖が刺激されたフィブロネクチン陽性細胞 (FIF 細胞) が、軸索再生を阻害する組織の空洞やギャップを埋めつくしていること、2) FIF 細胞は脊髄の血管周辺組織由来であり髄膜の線維芽細胞 (MDF 細胞) とは異なること、3) FIF 細胞には軸索の伸展を促進する分子が、MDF 細胞にはこれを阻害する分子が発現する、などが示唆されている。

本年度は、引き続き FIF 細胞の特性を解析するとともに、将来 FGF-2 との併用を視野に入れ、神経栄養因子様の活性を示す低分子量物質 4-メチルカテコール (4MC) による FGF-2 の産生誘導、脊髄損傷修復作用を調べた。

B. 研究方法

脊髄の全切断と FGF-2 の投与:7 週齢の雌性 Wistar 系ラットを麻酔下、鋭利に第 10 胸髄を完全切断した。直後に

FGF-2 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を切断部前後 2 mm の範囲に 1 μl ずつ 5 点投与した。術後、後肢麻痺を確認した。脊髄の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。

脊髄の半球切断と 4MC の投与:前項同様に麻酔ラットの第 10 胸髄の左側半球を鋭利な刃物で切断した。皮膚を縫合し、後肢片側麻痺を確認し、その直後からラット腹腔内に 4MC (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与した。

運動機能の評価:BBB 運動機能評価スケール (Basso et al., 1995) を用いて、脊髄全切断の動物は両後肢の運動機能を、左半分切断の個体は左後肢の運動機能を評価した。

組織化学的解析:4 % パラホルムアルデヒド液で経心的にラットを灌流固定した。常法で処理後 25 μm の凍結薄片化し、ヘマトキシリン染色、免疫染色を実施した。脱水封入して共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Zeiss, Model LSM510) で観察した。

RT-PCR 法:逆転写反応は 42 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、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。

C.D. 研究結果と考察

FIF 細胞の増殖特性:軸索再生の成否を決定する FIF 細胞と MDF 細胞の特性比較は非常に重要であると考えられる。そこで増殖に及ぼす FGF-2 と血清の効果とを両細胞で比較した。その結果、MDF 細胞の増殖性は血清存在下で高いが FGF-2 の影響

はそれほどではなく、IF 細胞の増殖性は血清による効果が弱く、FGF-2 による効果は著明に大きかった。血清による細胞増殖効果は血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF) などの作用と考えられるので、増殖因子に対する応答性はかなり異なることがわかる。すなわち、FIF は特別に FGF-2 に対する応答性の高い細胞であり、MDF とはこの点で大きく違っている。FGF 受容体の発現レベルの差と推定される。

FGF-2 による脊髄内細胞死の抑制: FGF-2 はもともと神経細胞の生存維持作用をもつ神経栄養因子である。そこで細胞死抑制効果の点から FGF-2 による脊髄損傷修復効果を検討した。その結果 FGF-2 は、損傷後の脊髄内でアポトーシスに陥った TUNEL 陽性細胞を有意に減少させ、神経細胞数の減少を食い止めた。すなわち FGF-2 による神経栄養因子としての細胞保護作用も脊髄損傷修復作用に寄与していることがわかる。

4-メチルカテコール(4MC)の脊髄損傷修復効果: 4MC は代表的な神経栄養因子であるニューロトロフィン (NGF、BDNF) の産生促進作用や培養神経細胞の MAP キナーゼの活性化など、神経栄養作用をもつ低分子物質であるため、組織に浸透して内在性神経幹細胞を活性化する可能性をもつ。神経細胞の生存維持活性を持つことはすでに報告している。

FGF-2 が効果を示した脊髄全切断モデルの腹腔に 4MC を投与したが、全く効果が認められなかった。そこでもう少しマイルドな実験条件が必要と考え、脊髄の半分を切断したラットを作成し、これに 4MC を投与して障害側の後肢の運動機能の改善効果を調べた。その結果、4MC 投与群は PBS 投与群に比べて明らかに運動機能の回復を高めた。

この作用機構として、BDNF 遺伝子ばかりでなく、本研究で強い軸索再生促進効果が判明した FGF-2 についてもその遺伝子発現を一過性に促進する活性を持つことが明らかとなった。しかし誘導された FGF-2 は十分な量ではないため全切断モデルの運動機能を回復させることはできなかったと考えている。

今後は作用機構の異なる神経栄養因子やその類似物質を組み合わせることにより、高い運動機能の回復効果を引き出すように検討する必要がある。

E. 結論

1. FGF-2 誘導性線維芽細胞 (FIF) は髄膜由来線維芽細胞に比べ FGF-2 依存性の増殖性を保有していた。
2. FGF-2 は脊髄損傷後におこる細胞のアポトーシスを抑

制する。

3. 4-メチルカテコール (4MC) は脊髄半切断モデルラットに対して有意に運動機能回復を促進する作用を持つ。このとき FGF-2 の発現誘導を伴っていた。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *NeuroReport*, 2005, in press

Hashimoto, M., Nitta, A., Fukumitsu, H., Nomoto, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J. Neurosci. Res.* 79, 476-487, 2005

Nitta, A., Nishioka, H., Fukumitsu, H., Furukawa, Y., Sugiura, H., Shen, L. and Furukawa, S.: Hydrophobic dipeptide, Leu-Ile, protects against neuronal death by inducing BDNF and GDNF synthesis. *J. Neurosci. Res.* 78, 250-258, 2004

Kinukawa, H., Jikou, T., Nitta, A., Furukawa, Y., Hashimoto, M., Fukumitsu, H., Nomoto, H. and Furukawa, S.: cAMP/protein Kinase A signal attenuates Ca^{2+} -induced fibroblast growth factor-1 synthesis in rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 77, 487-497, 2004

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

研究要旨: ES 細胞由来神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御する遺伝子群の同定と、
霊長類 ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導法の確立を行った。

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

神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御するメカニズムを解明するために、DNA マイクロアレイ解析(2 万2千遺伝子)による時系列特異的な遺伝子発現プロファイリングを行った。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、BMP2/4 のマスキング因子である Noggin タンパク質存在下で、クローナルに胚様体(EB)を形成させ、6日後に無血清の分散浮遊培養系に移行、1次 neurosphere を形成させ、さらにそれらを継代培養し、2次 neurosphere を得た。そして、それぞれより mRNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を行った。また、それらの結果を、実際のマウス神経発生における、神経幹細胞の時系列特異的な変化と比較するために、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞からも mRNA を抽出し、同様にマイクロアレイ解析を行った。

ヒトを含めた霊長類 ES 細胞の分化系においても、これまでマウス ES 細胞で確立した、in vitro における中枢神経系発生の再現を可能たらしめるために、マウス ES 細胞のそれと同様な、神経幹細胞の分化誘導系の開発を試みた。具体的には、カニクイザルおよびヒト ES 細胞を、FGF-2 および 20%KSR(Knockout Serum Replacement)を含む DMEM/F12 培地中で、マウス胎仔繊維芽細胞のフィーダー上で維持し、Noggin を含む 20%KSR/DMEM/F12 培地中で、様々な期間 EB 形成を行い、神経幹細胞の分化誘導を試みた。

C. 研究結果

1) ES 細胞由来神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御する遺伝子群の同定

我々は、本研究の中で、EB 由来1次 neurosphere がほとんどニューロンに分化し、それを継代した 2 次

neurosphere がニューロンとグリアの両方に分化することを発見した。このような、神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化は、実際の中枢神経系発生でも起こっており、我々の開発した ES 細胞からの神経幹細胞分化誘導システムが、in vivo に近いものであることを示唆している。そこで、このような神経幹細胞の時系列特異的な分化能の変化を制御するメカニズムを解明するために、DNA マイクロアレイ解析による時系列特異的な遺伝子発現プロファイリングを行った。EB 由来1次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を617個、2次 neurosphere で有意に発現の高い遺伝子を838個同定した。そして、それらの内訳は以下の通りであった。まず、それぞれで最も多かったグループは、機能未知の遺伝子群で、51%および47%であった。1次 neurosphere と2次 neurosphere の間で最も大きな違いを示した既知遺伝子群のグループは、細胞分裂、DNA 複製に関連した遺伝子群やクロマチン再構成因子など、遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群であり、これらは1次 neurosphere で発現が高いものの13%を占めていたのに対し、2次 neurosphere ではほとんど見られなかった。一方、分泌因子、膜レセプター・リガンドおよび細胞内情報伝達因子等のシグナル伝達関連因子などの占める割合は、2次 neurosphere で発現が高い遺伝子群で高かった。また、これらの傾向は、マウス胎仔11日目と新生仔の側脳室周囲細胞を比較した場合も同様であり、それぞれの比較で同様な発現変化を示した遺伝子は、発生初期と後期でそれぞれ199個および244個であった。

2) 霊長類 ES 細胞からの神経幹細胞の分化誘導法の確立

まず、カニクイザル ES 細胞から、EB 形成を6-36日間行い分化させ、神経幹細胞の分化誘導時期を、そのニューロンやグリアへの分化能を指標に解析したところ、EB 形成6日目よりニューロン分化能が検出され、12日目以降より GFAP 陽性のラジアルグリア様細胞の分化が見られた。そして、neurosphere 法によって、神経幹細胞の分化誘導時期を確認したところ、EB 形成12-18日目がそのピークであった。また、ヒト ES 細胞の分化誘導系においても同様の結果が得られた。しかしながら、このようにして形成された1次 neurosphere は、マウス ES 細胞—EB からのそれと違って、GFAP 陽性のラジアルグリア様細胞への分化が見られた。

D. 考察

哺乳類の神経発生において、これまでに、発生初期にはニューロン発生のみが起こり、続いてグリアの発生が始まること、そして、ニューロン発生そのものについても、時系列特異的にそのサブタイプが変化することが知られてきたが、これらのメカニズムに関してはほとんど何も分かっていない。本研究の、ES細胞を利用した中枢神経系の *in vitro* 再現系を使って得られた、遺伝子発現プロファイリングデータは、これらのメカニズムの解明の出発点となるものであると考えられる。特に、細胞分裂・DNA複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群の発現が、初期神経幹細胞で特に高いという事実の発見は、それらのコンポーネントに共通した因子が存在するという、これまでの知見から見て、非常に興味深いものであり、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御機構の解明と応用に向けて、新たな第一歩であると考えられる。

霊長類 ES細胞で、培養条件の詳細に違いが見られたものの、マウス ES細胞と同様の神経誘導および神経幹細胞の選択的培養が可能になったことは、今後、ヒト中枢神経系の発生の研究およびその応用に向けた新たな展開を期待させるものである。

E. 結論

マウス ES細胞による、*in vitro* での中枢神経系の発生再現系を利用した DNA マイクロアレイ解析によって、神経幹細胞の発生ポテンシャルの時系列的変化の制御に、細胞分裂・DNA複製や遺伝子発現の epigenetic 制御に関わる遺伝子群が関与している可能性が示唆された。

霊長類 ES細胞においても、マウス ES細胞と同様な神経誘導・神経幹細胞培養系が確立された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Uemura, O., Okada, Y., Ando, H., Guedj, M., Higashijima, S., Shimazaki, T., Chino, N., Okano, H., Okamoto, H.: Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev. Biol.* 278, 587-606, 2005

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 275, 124-142, 2004

Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Shizuko, I., Shimazaki, T., Onodera,

M., Okano, H., Mizusawa, H.: Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J. Neurosci. Res.* 78, 215-223, 2004

Yoshizaki, T., Inaji, M., Kouike, H., Shimazaki, T., Sawamoto, K., Ando, K., Date, I., Kobayashi, K., Sahara, T., Uchiyama, Y., Okano, H.: Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.* 363, 33-37, 2004

2. 学会発表

Hayakawa, Y., Nishida, K., Hirano, T., Shimazaki, T., Okano, H.: *Gab1* mediates EGF signal inducing selective proliferation of *Olig2*-expressing neural progenitor cells in the developing spinal cord. Keystone Symposia, Stem Cells (B3), Banff, Alberta, Canada, February 2005

Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., Okano, H.: Generation of motor neurons from mouse embryonic stem cells: analysis of ES cell-derived neural cells. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, October, 2004

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に関する研究

分担研究者 久恒辰博 (東京大院・先端生命科学)

研究要旨:サル類(カニクイザル)の中大脳動脈閉塞モデルにおいて、ニューロンの再生へと至る過程が顕著に誘導されていることが見出された。

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まれている現象(成体脳ニューロン新生)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え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、カニクイザルにおける脳梗塞モデル(中大脳動脈閉塞モデル)を導入し、脳虚血後に誘導される神経幹細胞の分裂促進、ならびにニューロン新生の程度を定量的に解析することで、内在性神経幹細胞を利用した再生医療への布石となる基礎データの収集を進めた。

B. 研究方法

病態時におけるニューロン新生の状態を解析するために、中大脳動脈を閉塞するサル脳梗塞モデルを使用した(藤沢薬品工業との共同研究)。分裂細胞を標識するために核酸アナログであるブ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、脳梗塞後のサル脳内におけるニューロン新生の程度を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物試験は、所属施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

中大脳動脈を閉塞した後のサル脳内において、海馬あるいは側脳室領域での細胞分裂が通常4倍以上となり、また新生するニューロンの数も海馬においては4倍、嗅球においては20倍になった。また、本モデルにおいて、障害部周辺の脳室周囲領域に、未熟ニューロンの出現が観察され、脳障害により霊長類においてもニューロン新生がある程度誘導されていることが示唆されたが、脳虚血巣に近接した線条体および大脳皮質において、ニューロンの新生は認められなかった。

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、ニューロンを生ま出していることが立証された。病態モデルを用いた研究の結果から、脳障害時には成体脳内に存在する神経幹細胞が活性化されニューロン新生の程度が飛躍的に上昇することが見出された。そして、通常ニューロン新生が認められる海馬と嗅球に加え、脳虚血巣の周囲においても、ニューロン新生へといったプロセスが誘導されている証拠が得られた。そのため、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。

しかしながら、本モデルにおいて、ニューロンの再生を示す所見は得られていない。今後は、げっ歯類モデルなどから得られた基盤データを活用し、脳障害を補填するニューロンの再生をさらに促す技術の開発に期待が寄せられる。例えば、ニューロン分化を誘導促進する低分子薬剤の同定が進んでいけば、内在性神経幹細胞を利用した変性脳疾患の治療法の開発にいつそ道が開けることが大いに期待される。

E. 結論

サル病態モデル(中大脳動脈閉塞モデル)において、ニューロン再生の過程が誘導され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

- (1) Muramatsu, D., Sato, Y., Hishiyama, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Exp. Neurol.* 2005, in press.
- (2) Imura, T., Kanatani, S., Fukuda, S., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cerebral Cortex* 15, 332-340, 2005
- (3) Sato, Y., Koketsu, D., Ageyama, N., Ono, F., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Successful retrograde transport of fluorescent latex nanospheres in the cerebral cortex of the Macaque Monkey. *Experimental Animal* 53, 383-386, 2004
- (4) Yoshida, M., Fukuda, S., Tozuka, Y., Miyamoto, Y., Hisatsune, T.: Developmental shift in bidirectional functions of taurine-sensitive

chloride channels during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *J. Neurobiol.* 60, 166-175, 2004

2. 学会発表

- (1) 久恒辰博: 成体脳のニューロン新生における初期分化過程の解析. 第27回日本神経科学大会、大阪、SY17-04, 2004
- (2) Hisatsune, T.: Adult neurogenesis in intact and injured primate brains. 16th International Congress of the IFAA, Kyoto, Aug. 22-27, S63-5, 2004

他多数

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

研究要旨:マウス ES 細胞から神経系細胞を誘導しマウス脳に移植したところ、約半数の例で腫瘍形成がみられ、その原因は未分化 ES 細胞の混入であった。そこで、Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて、神経分化誘導後に神経系細胞のみを選択してマウス脳内に移植したところ、これらの細胞は脳内でニューロンに分化し、腫瘍形成は認められなかった。

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、カニクイザル由来の ES 細胞を用いて、カニクイザルパーキンソン病モデル脳に ES 細胞由来ドーパミン産生神経を移植することによって、神経症状改善をもたらすことを報告した。しかし、細胞移植には腫瘍形成や免疫反応など解決すべき問題も多い。今回我々は、マウス ES 細胞を用いて、腫瘍形成抑制条件の検討を目的として以下の実験を行った。

B. 研究方法

マウス ES 細胞を PA6 細胞という骨髄由来のフィーダー上で培養するとドーパミン産生神経が分化誘導される (SDIA 法)。これまでの実験で、PA6 細胞上で長期間培養し十分分化させたニューロンよりも、やや未分化な神経前駆細胞の移植の方が、脳内での生着が良いことが分かった。ところが、分化日数の少ない ES 細胞移植では腫瘍形成が起こる。PA6 上では ES 細胞それぞれの分化段階は不均一であり、まだ未分化な ES 細胞が残っていることがその原因ではないかと考えられた。

ある性質を持った細胞群を選別する方法として FACS (fluorescence-activated cell sorting) という方法がある。我々は、その方法を用いて初期の神経系細胞を選別し (逆に言えば、未分化 ES 細胞を取り除き)、腫瘍形成が抑制できるかどうかを検討した。

C. 研究結果

PA6 細胞上で4日、6日、8日培養した ES 細胞をマウス

脳内に移植すると、その一部は脳内で TH 陽性のドーパミン産生神経に分化し、その数は4日培養した場合が最も多かった。しかし、いずれの条件でも約半数の例において腫瘍形成がみられた。その腫瘍の免疫染色では、腫瘍内の分裂細胞は未分化 ES 細胞マーカーを発現していることが分かった。つまり、未分化 ES 細胞が移植細胞の中に混じり、それが脳内で増殖し続けていると考えられる。

未分化 ES 細胞と神経幹細胞を区別するために神経幹細胞マーカー Sox1、Sox2、Nestin の発現を RT-PCR でみたところ、後2者は未分化 ES 細胞でも SDIA4日後の ES 細胞でも発現がみられたのに対し、Sox1 は SDIA4日後 ES 細胞でのみ発現がみられた。そこで、Sox1 を手がかりにして神経幹細胞を選別するために Sox1-GFP knock-in ES 細胞を用いて FACS を用いた。GFP 陰性 (Sox1 陰性) 細胞では、RT-PCR で Oct4 や Nanog などの未分化 ES 細胞マーカーの発現が認められた。これに対し、GFP 陽性 (Sox1 陽性) 細胞ではこれら ES 細胞マーカーの発現は認められず、中脳マーカーである En1 の発現が認められた。さらにこの Sox1 陽性細胞を PA6 細胞上で再び培養すると 10 日後には Tuj1 陽性のニューロンへと分化し、その 22% は TH 陽性であった。次に Sox1(-)細胞をマウス脳内に移植し8週後に観察したところ、29 匹中 10 匹で細胞が生着し、そのうち 9 匹で腫瘍形成がみられた。これらの腫瘍は組織学的に teratoma であると考えられた。Sox1(+)細胞の移植では 39 匹中 23 匹で細胞が生着したが、腫瘍形成は認められなかった。生着した細胞の 90% 以上は Tuj1 陽性で、TH 陽性細胞の平均値は 14.5 個であった。免疫不全 (SCID) マウスの

皮下に移植した実験において、Sox1(-)細胞の移植では6匹中3匹で teratoma の形成が見られたのに対し、Sox1(+)細胞の移植では腫瘍形成は認められなかった。

D. 考察

過去のES細胞あるいはES細胞由来神経系細胞移植実験では、免疫反応の強い異種移植でも腫瘍形成が起こることが報告されている。未分化ES細胞移植の同種移植では400個の移植でも腫瘍形成が観察されている。我々の方法では、Sox1(+)細胞はSCIDマウスへの移植でも腫瘍を作らず、腫瘍形成抑制には有効であると考えられた。

ただ、FACSを行うと細胞に対するダメージが強く、細胞の生着率が下がる。また、Sox1(+)細胞は単に神経系細胞だというだけなので、これらをドーパミン産生神経に分化させるためにはShh, FGF8あるいはBDNFなどのサイトカインを添加する必要があると思われる。

E. 結論

上記の結果から、ES細胞(あるいは、それから誘導した神経系細胞)の移植における腫瘍形成の原因は未分化ES細胞の混入であり、神経幹細胞のみを選別して移植することにより腫瘍形成が防げることが明らかとなった。ヒトES細胞においても、神経幹細胞はSox1を発現し、未分化ES細胞はSox1を発現していないことが報告されているので、この方法は臨床にも応用できる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

S., Hashimoto, N.: Estrogen promotes the differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 279-286, 2005

Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102-109, 2005

2. 学会発表

高橋 淳ら:

ES細胞からのドーパミン神経誘導と移植条件の最適化。第63回脳神経外科学会総会、名古屋、10.8, 2004

Fukuda, H., Takahashi, J., et al.:

FACS selection of neural precursor cells from embryonic stem cell-derived heterogeneous graft attenuates tumor formation in the mouse brain. 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA, Oct.23, 2004

他多数

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表