

神経幹細胞培養用の無血清培地あるいは 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) を含む DMEM/F12 培地を用いて接着培養を続けた。

細胞の分化誘導は、Poly-L-ornithine (Sigma 社製) でコーティングしたカバーガラス上、もしくはフィブロネクチンコート済チャンバースライド (BD 社製) で実施した。B27 および 1%ウシ血清を含む DMEM/F12 培地に浮遊細胞塊を培養し、二週間後 4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。

3. てんかん患者由来線維芽細胞の樹立

皮膚組織片から皮下脂肪を十分に切除した後、リン酸緩衝液 (phosphate buffer saline ; PBS) 中で細切し、collagenase (1mg/ml; Invitrogen 社製)、dispase (1mg/ml; Invitrogen 社製)、DNaseI (0.01%) を加えた酵素溶液中で 37°C・60 分間酵素処理を行った。反応後、溶液を遠心分離して上清を除いて得た沈殿物を 10%FBS+DMEM/F12 培地に懸濁し、10cm 細胞培養ディッシュに播種し、CO₂ インキュベータにて 37 度、5%CO₂ の条件で培養をおこなった。3~4 日毎に培地交換を行い、ディッシュ底面に生着した接着細胞がコンフルエントに達した時点で、トリプシン-EDTA (0.05%) を用いて細胞を剥離・回収し、新しい培養フラスコに 2×10⁴ 細胞/ml の細胞密度で播種し、継代培養を実施した。

4. てんかん患者由来 iPS 細胞の樹立

てんかん患者由来線維芽細胞に Amphotropic 型組換えレトロウイルスを使用して山中 4 因子 (hOct3/4、hKlf4、hSox2、h-c-Myc) を遺伝子導入し、感染後 4 日目にマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として播種し、翌日よりヒト ES 細胞用培地 (DMEM/F12 + 20% KNOCKOUT SR, 1 mM 2-Mercaptoethanol; Invitrogen 社, 5 ng/ml bFGF; 和光純薬社) を使用した培養にてリプログラミングの誘導を行い、ウイルス感染後約 30 日の時点でヒト ES 細胞様の形態を呈したコロニーをクローニングした。アルカリホスファターゼ (ALP) 活性は、10% Formalin/PBS で細胞を固定した後 PBS で洗浄し、1-Step NBT/BCIP 試薬 (Pierce 社) で 30 分間染色して検出した。胚様体は、フィーダー培地 (DMEM + 10% FBS) 中で 10 日間の浮遊培養を行い形成させ

た。

5. 細胞免疫染色

分化誘導後の細胞は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4°Cにて 30 分固定した後、ブロッキングを行い、一次抗体を 4°Cにて一晩反応させた。反応終了後、洗いの操作を行い、二次抗体反応を室温にて 1 時間行った。二次抗体反応後、同様の洗いを行った後封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。使用した抗体は以下の通りである: GFAP (rabbit polyclonal IgG, Sigma G9269)、β III tubulin (mouse, monoclonal IgG, BABCO MMS-435P)。2 次抗体 goat anti-rabbit Alexa Fluor IgG 568 (Molecular Probe) および、goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (Molecular Probe)。核染色は 1mM TO-PRO-3(1:1000, Molecular Probe)を用いて行なった。

6. RT-PCR 解析

cDNA の作製は RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を使用して抽出した RNA 0.5 μg を用い、PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ社) を使用して実施した。各遺伝子のトランスクリプト解析は表 1 のプライマーを用い、PowerSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 社) で定量的 RT-PCR にて実施した。

表 1 RT-PCR 解析に使用した遺伝子とプライマー配列

Gene	Sense primer (5' to 3')	Antisense primer (5' to 3')
hES marker		
OCT3/4	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC
SOX2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
MYC	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGGGGAGGCTG
KLF4	ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC	TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC
NANOG	GCAGAAGGCCTCAGCACCTA	GGTTCCAGTCGGGTTTCC
TERT	CTCCATCCTGAAAGCCAAGAA	CGAGTCAGCTTGAGCAGGAA
CYP26A1	TGTGTTATTAAGGAGACCCTTCGAC	TTCCAGCCCTTGGGAATCT
FOXD3	CGGCATCTGCGAGTTCAT	GTCGTTGAGTGAGAGGTTGTGG
GDF3	CGGGAATGTAICTTCGCTTTCTC	TTTCTTTGATGGCAGACAGGTT
ZFP42/REX1	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
DNMT3B	TGCTGCTCACAGGGCCCCGATACTTC	TCCTTTGAGCTCAGTGCACCACAAAAC
TDGF1	CTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTGC	GCCACGAGGTGCTCATCCATCACAAGG
Endoderm marker		
FOXA2	TGCTGGTCGTTTGTGTGG	CATGTTGCTCACGGAGGAGTAG
SOX17	CCCATAGTTGGATTGTCAAAACC	CACACCCAGGACAACATTTCTTT
AFP	TTGAGAAACCCACTGGAGATGA	GTTATGTCTTCCCTCTTCACTTTGG
ALB	GTTGCATGAGAAAACGCCAGTA	AGCATGGTCGCCTGTTTCC
Mesoderm marker		
GATA4	CTCTTCAGGCAGTGAGAGCC	GGTCCGTGCAGGAATTTGAGG
Brachyury	TGGAATGCCTGCCCATC	CCGTTGCTCACAGACCACA
NKX2.5	CCCCTGGATTTTGCATTAC	CGTGCGCAAGAACAAACG
MSX1	CAGAAAGATGCGCTCGTCAAA	CGGCTTACGGTTCGTCTTG
Neural marker		
NEUROG2	ATGCCTATTGTCTCTGCTTCTCT	TGACTTCTAACCTGCCCTCTAAC
SOX1	AGCAGTTGTTTCTGGAAGAGTCTGT	AGGCCCTTATCCCGACTAA
PAX6	ACCTGGCTAGCGAAAAGCAA	CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA
Epidermis		
KRT17	AGGAGATTGCCACCTACCG	CTTGCCATCCTGGACCTCTT
Control		
GAPDH	CCACTTTGTCAAGCTCATTTCT	TCTCTTCTCTTGTGCTCTTGCT

C. 研究成果

1. てんかん患者由来試料の収集

2011年3月末までの時点で合計20症例(男8名、女12名、平均年齢29.9±10.7歳)の患者から試料提供の同意が得られ、細胞樹立が実施された(表2)。その内訳は内側側頭葉硬化症患者18例、皮質形成異常症2例である

2. てんかん患者神経組織由来細胞の樹立

神経幹細胞培養培地を用いた無血清培養の結果、合計11株のneurosphere形成細胞を樹立することに成功し、7株の細胞の樹立実施中である。これらneurosphere形成細胞は分化誘導アッセイにおいて、接着性の神経細胞(β III tubulin 陽性細胞)およびグリア細胞(GFAP 陽性細胞)に各々分化することが確認された(図1)。しかし樹立に成功した全症例のneurosphereの増殖力は不良であり、大量培養ならびに長期維持培養は極めて困難であった。

神経幹細胞培養用の無血清培地でも接着傾向を示す細胞が分離され、FBS含有培地を用いた培養に移行することでアストロサイト様の形態を取る接着性の神経上皮系細胞が合計13株樹立され、さらに2株が樹立の可能性があり培養が継続されている。

3. てんかん患者由来iPS細胞の樹立

皮膚組織からは全症例において線維芽細胞の樹立に成功した。2症例の線維芽細胞を用いてiPS細胞作成を試み、ヒトES細胞様形態を呈しALP活性を有するコロニーを2症例合計で8クローン分離することに成功した(図2)。これら細胞はヒトES細胞マーカー遺伝子を高発現し、iPS細胞としての特性を有する細胞であることが確認された(図3)。また、胚様体形成による分化誘導アッセイにおいて、多分化能を有することが確認された(図3)。

表2 症例リスト一覧

症例番号	年齢	性別	てんかん診断	病理診断	側方性	術式	線維芽細胞	アストロサイト様細胞	神経幹細胞	iPS細胞
1	38	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
2	19	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
3	31	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
4	41	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○		
5	26	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	○
6	18	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
7	45	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
8	26	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	○
9	28	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
10	37	男	後頭葉てんかん	皮質形成異常	左	左後頭葉切除	○	○	○	
11	37	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
12	28	女	前頭葉てんかん	皮質形成異常	右	右前頭葉切除	○			
13	14	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○	○	
14	45	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○			樹立実施中
15	14	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	○		樹立実施中
16	43	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○	樹立実施中		樹立実施中
17	14	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○	樹立実施中		樹立実施中
18	29	男	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○			樹立実施中
19	42	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	左	選択的扁桃体海馬切除	○			樹立実施中
20	22	女	側頭葉てんかん	内側側頭葉硬化	右	選択的扁桃体海馬切除	○			樹立実施中

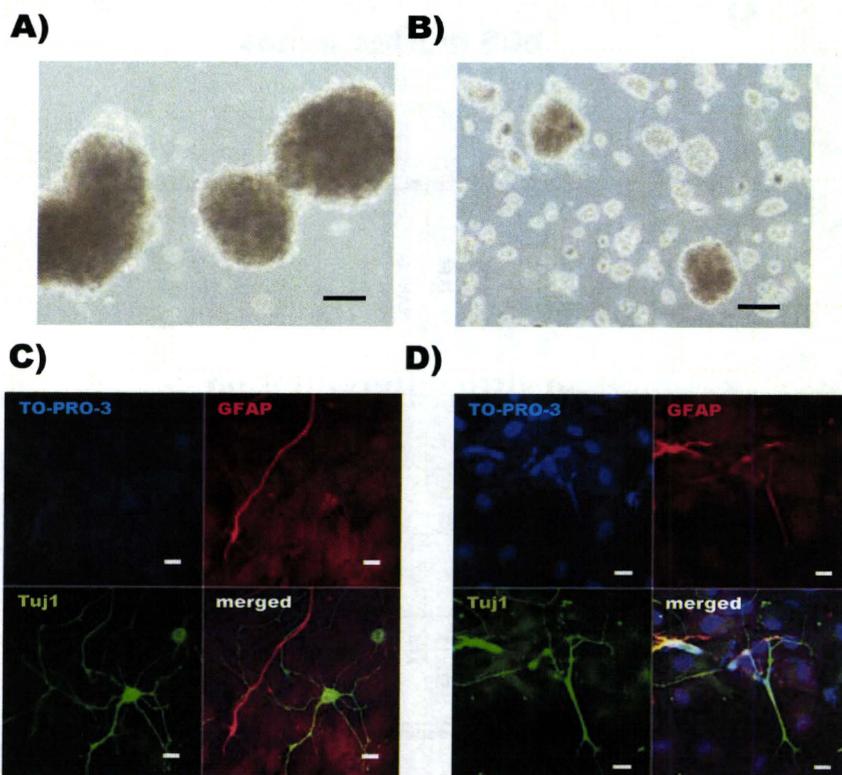


図1 てんかん患者神経組織由来神経幹細胞

症例8 海馬組織由来神経幹細胞 (A,C) および症例10 皮質組織由来神経幹細胞 (B,D)

A,B : 位相差像, scale bar=100 μm B,D : 蛍光免疫染色像, scale bar=20 μm

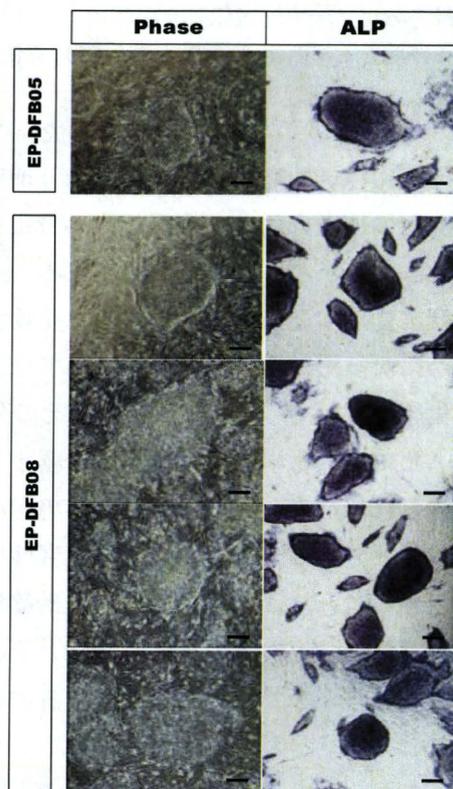


図2 てんかん患者由来線維芽細胞から作成した iPS 細胞

ALP : アルカリホスファターゼ活性、scale bar=200 μm

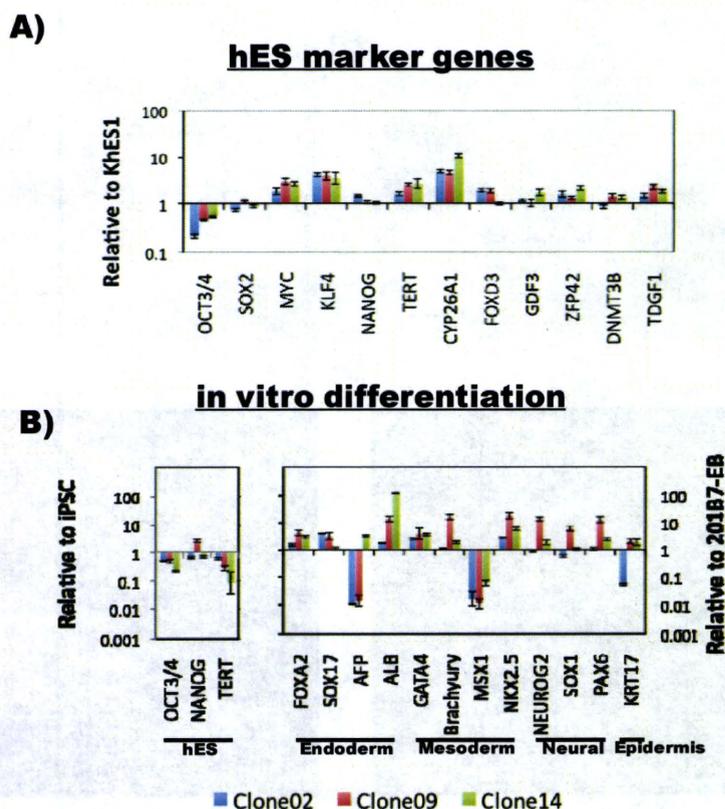


図3 てんかん患者由来 iPS 細胞 (症例 8 由来) における遺伝子発現解析

- A) 未分化状態における ES 細胞マーカー遺伝子発現解析
 コントロールとしてヒト ES 細胞 (KhES1) 由来 mRNA 使用
 (慶応義塾大学医学部・岡野栄之先生、岡田洋平先生から分与)
- B) 胚葉体形成後の分化マーカー遺伝子発現解析
 コントロール細胞としてヒト iPS 細胞 (201B7) を使用

D. 考察

研究 2 年目の 22 年度は、複数のてんかん患者神経組織由来神経幹細胞の樹立に成功し、その神経分化能を確認することに成功した。しかし、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞の増殖力は不良で、大量培養は極めて困難であることが明らかになった。神経組織由来神経幹細胞およびその分化細胞は、てんかん病態再現に使用するモデル細胞としては生物学的には最も理想的な細胞であると考えられるが、今年度の研究の結果から本細胞をてんかんモデル細胞として生物資源化して創薬研究に使用することは、必要細胞数確保の観点から大きな困難があり、現状の細胞培養技術においては非現実的なアプローチであることが判明した。

一方、線維芽細胞は増殖能に優れ、てんかん患者全例から樹立が可能であった。またこの線維芽細胞から iPS 細胞を樹立することも可能であることが明

らかとなった。iPS 細胞は神経組織由来神経幹細胞と大きく異なり増殖力が良好であり、大量培養後に神経系細胞へ分化誘導して使用することが可能であると考えられる。今年度の成果から、てんかんモデル細胞として生物資源化して創薬研究に使用する細胞ソースとしては、増殖力に優れるてんかん患者由来 iPS 細胞とその分化細胞を応用するアプローチの優位性を再確認することができた。

てんかん患者由来 iPS 細胞とその分化細胞のてんかん病態再現性に関しては未だ十分な検討は成されていない。最終年度は、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞とその分化細胞を対照細胞として上手く活用し、両者の特性比較を行うことで、特に同一患者に由来する 2 つの細胞の特性の比較検討を行い、てんかん患者由来 iPS 細胞のてんかんモデル細胞としての妥当性を検証する予定である。

E. 結論

2010年度までの合計として神経幹細胞（11株）、アストロサイト様神経上皮細胞（13株）、線維芽細胞（20株）をそれぞれ樹立に成功した。線維芽細胞を使用してiPS細胞の樹立を試み、2症例から合計8クローンのiPS細胞の樹立に成功した。神経組織由来神経幹細胞の増殖力は不良であり、線維芽細胞由来iPS細胞から分化誘導して神経系細胞を作成するアプローチの優位性が確認された。今後、てんかん患者神経組織由来神経幹細胞と線維芽細胞由来iPS細胞由来神経系細胞の特性比較を行い、てんかん患者由来iPS細胞のてんかんモデル細胞としての妥当性を検証する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamane J, Nakamura M, Iwanami A, Sakaguchi M, Katoh H, Yamada M, Momoshima S, Miyao S, Ishii K, Tamaoki N, Nomura T, Okano HJ, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H: Transplantation of Galectin-1-Expressing Human Neural Stem Cells Into the Injured Spinal Cord of Adult Common Marmosets. *J Neurosci Res*, 88(7):1394-1405, 2010
- 2) Kanemura Y: Development of cell-processing systems for human stem cells (neural stem cells, mesenchymal stem cells, and iPS cells) for regenerative medicine. *Keio J Med* 59(2):35-45, 2010
- 3) Sakai Y, Yoshida S, Yoshiura Y, Mori R, Tamura T, Yahiro K, Mori H, Kanemura Y, Yamasaki M, Nakazawa K: Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells. *J Biosci Bioeng* 110(2):223-229, 2010
- 4) 金村米博, 森 英樹, 八尋寛司, 中澤浩二: 細胞凝集塊形成プロセス制御による幹細胞の培養・分化制御. *再生医療* 9(3):47-52, 2010
- 5) 金村米博: 中枢神経疾患に対する細胞移植療法を用いた再生治療. *脳神経外科* 39(1):5-23, 2011

2. 学会発表

- 1) Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Fukusumi H, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue-K M, Kohara A, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: Generation of human induced pluripotent stem cells from decidua-derived mesenchymal cells. ISSCR 8th Annual Meeting. 2010.6.16-17; San Francisco, CA, USA
- 2) 金村米博: 神経幹細胞と iPS 細胞の基礎. International Symposium on Fetal Neurology, 2010.10.22; 大阪
- 3) Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Fukusumi H, Suemizu H, Nakamura M, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: International Symposium on Fetal Neurology, 2010.10.22-24, Osaka, Japan
- 4) Kanemura Y: Stem cell research of congenital central nervous system malformations in pediatric neurosurgery. International Symposium on Fetal Neurology, 2010.10.24, Osaka, Japan
- 5) 金村米博, 正礼智子, 岡田洋平, 岡野栄之, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞の細胞特性解析とその品質管理指標. 社団法人日本脳神経外科学会第 69 回学術集会, 2010.10.28; 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

てんかん患者由来分化細胞の作成とその特性解析 てんかんモデル神経細胞としての有用性評価と生物資源化

研究分担者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長

研究協力者 小山隆太

東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室 助教

研究要旨

抗てんかん薬開発への応用、新規創薬評価系開発をめざし、てんかん患者由来アストロサイト様細胞およびてんかん患者 iPS 由来 neurosphere のコントロール細胞として健常人 iPS 由来 neurosphere について特性解析を行った。てんかん患者由来アストロサイト様細胞はてんかん病態を反映するアストロサイトである可能性が示された。健常人 iPS 由来 neurosphere から興奮性グルタミン酸神経および抑制性 GABA 神経の分化に成功し、薬理的解析が可能であることが示された。

A. 研究目的

本研究班は難治性てんかん患者由来 iPS 細胞/神経幹細胞から分化誘導した神経細胞の特性解析を行い、てんかんモデル細胞としての有用性を検証することで、抗てんかん薬開発に利用可能な新規生物資源の確立と新規創薬評価系の開発を目指している。今年度はてんかん患者由来アストロサイト様細胞およびてんかん患者 iPS 由来 neurosphere のコントロール細胞として健常人 iPS 由来 neurosphere が大阪医療センターより供与された。これらの細胞の特性解析を行い、抗てんかん薬開発への応用性、新規創薬評価系開発の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. てんかん患者由来アストロサイト様細胞の特性解析

1-0. 細胞培養

大阪医療センターより 3 種のサンプルが供与された(てんかん-1, 海馬接着細胞 [passage 2] 42DIV; てんかん-2, 海馬接着細胞 [passage 2] 45DIV; てんかん-3, 海馬接着細胞 [passage 2] 29DIV)。いずれも常

法に従い増幅し、passage 4 を下記実験に使用した。

1-1. 免疫組織化学的解析

Passage 4 のアストロサイト様細胞について、GFAP, Glutamine synthetase (GS), α smooth muscle actin (α SMA), TIE2, A2B5, nestin, EAAT1, EAAT2 と S100 β とを免疫組織化学的に 2 重染色し、TOTO-3 を用いて核を可視化した。

1-2. 細胞外グルタミン酸濃度の検出

アストロサイト様細胞の培養上清中グルタミン酸 (L-glu) 濃度を比色定量法によって定量した。また必要に応じて細胞を DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (TBOA) 処理した。

2. 健常人 iPS 由来 neurosphere の特性解析

2-0. 細胞培養

大阪医療センターより健常人 fibroblast 由来 iPS 由来 neurosphere (passage 9) が供与された。neurosphere は大阪医療センターより直接持ち帰った。持ち帰り日には neurosphere は大きく一つに凝集していたが、翌日には個々の neurosphere に分離していた。6 日後、neurosphere は single cell にして直ちにポリオルニチ

ン/フィブロネクチンコートしたスライドチャンバーにまき直す方法 (single cell 法) と、single cell を 4 日間 sphere 形成条件で培養してから上記コートしたスライドチャンバーにまき直す方法 (sphere 法) の二種の方法により播種し B27 supplement を含む分化誘導培地に切り替えた。

2-1. 免疫組織化学的解析

上記分化誘導条件で 20-30 日間培養後、Tuj1, GFAP, Nestin, MAP2, PSD95 の発現を免疫組織化学的に検出した。

2-2. 細胞内カルシウム変動測定

上記分化誘導条件で 20-30 日間培養後、細胞内カルシウム濃度の変動を fura2-AM 法を用いて AQUACOSMOS/RATIO システムで測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。なお、本実験におけるヒト iPS 細胞の使用に関しては国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会において「ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築と創薬研究」として平成 21 年 12 月 25 日に承認を受けた。本細胞の個人情報に関しては(独) 国立病院機構 大阪医療センターにおいて連結不可能匿名化した後、さらなる匿名化(連結不可能匿名化の上 2 重匿名化)を行った上で提供されているため国立医薬品食品衛生研究所には個人情報はない。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレーブし廃棄した。

C. 研究結果

1. てんかん患者由来アストロサイト様細胞の特性解析

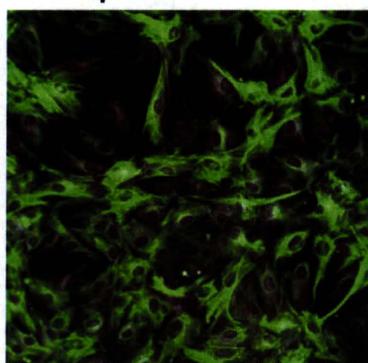
1-1. 免疫組織化学的解析

サンプル 1-3 とともに同様の蛋白質発現パターンを示した。アストロサイトマーカーとして汎用されている S100 β と同じくアストロサイトマーカーである GFAP, GS とを免疫組織化学的に 2 重染色したところ、GFAP の発現は弱く 60-70% の細胞が S100 β 陽性だった。GS の発現はほとんど見られなかった。S100 β 陽性細胞の内、一部で平滑筋マーカーである α SMA の発現が見受けられた。血管内皮細胞マーカーである TIE2 の発現はほとんど見られなかった。グリア前駆細胞マーカーである A2B5 の発現が S100 β 陽性細胞の一部に見受けられた。また、nestin の発現はほとんど観察されなかった。また、ごく弱い EAAT1 発現が見受けられたが、EAAT2 は検出されなかった。代表的な染色例としてサンプル 3 を示す(図 1)。

1-2. 細胞外グルタミン酸濃度の検出

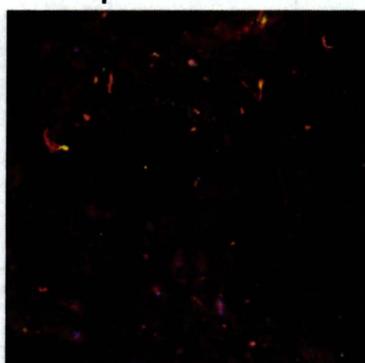
アストロサイト様細胞がグルタミン酸取り込み能を有するかどうか検討するため、コンフルエントになった培養アストロサイト様細胞の細胞外に 100 μ M の濃度でグルタミン酸 (L-glu) を適用し細胞外 L-glu 濃度の変化をモニターしたところ、サンプル 1-3 とともに時間依存的に細胞外 L-glu 濃度が上昇した(図 2)。そこで、そもそもこれらの細胞が自発的に L-glu を放出している可能性を疑い、培地洗浄 24 時間後に細胞外 L-glu 濃度を測定したところ、全てのサンプルで 100 μ M 以上に上昇していることを明らかにした。この上昇に対して、TBOA を添加したところ、サンプル 1 では L-glu 濃度上昇がさらに促進された。サンプル 2 では何ら影響が見られなかった。サンプル 3 では有意な抑制が観察された(図 3)。

S100β-GFAP



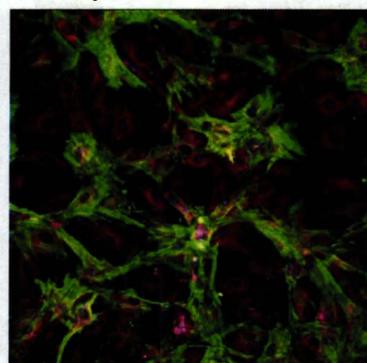
Green: S100β, Red: GFAP, Blue: TOTO-3

S100β-GS-TOTO3



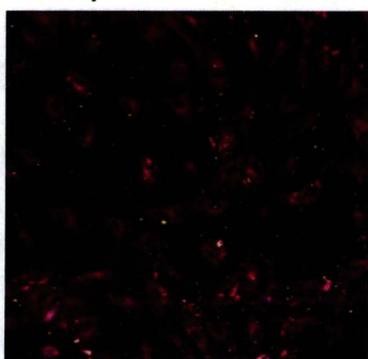
Green: GS, Red: S100β, Blue: TOTO-3

S100β-αSMA-TOTO3



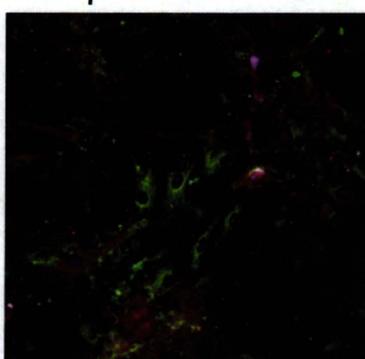
Green: αSMA, Red: S100β, Blue: TOTO-3

S100β-TIE2-TOTO3



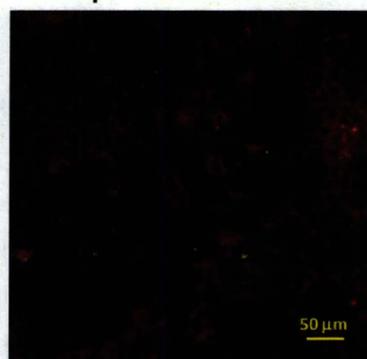
Green: TIE2, Red: S100β, Blue: TOTO-3

S100β-A2B5-TOTO3



Green: A2B5, Red: S100β, Blue: TOTO-3

S100β-nestin-TOTO3



Green: nestin, Red: S100β, Blue: TOTO-3

図1 てんかん患者由来アストロサイト様細胞サンプル3における各種蛋白質発現パターン

てんかん患者由来アストロサイト様細胞における各種蛋白質の発現について免疫組織化学的に検討した。各写真における色と発現蛋白質との対応は各写真の下に示す。

Bar=50 μm

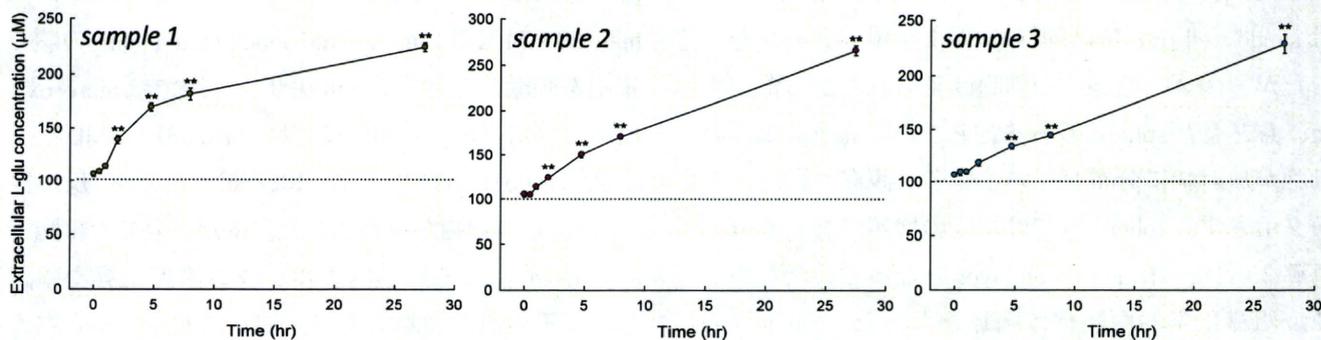


図2 てんかん患者由来アストロサイト様細胞サンプル1-3におけるL-glu添加後(100 μM)の細胞外L-glu濃度変化
 サンプル1-3の細胞外L-glu濃度を24時間後まで経時的にモニターしたところ、全てのサンプルにおいて有意なL-glu濃度の上昇が見受けられた。(**: P<0.01 vs. 0 hr group, N=8, Tukey's test following ANOVA)

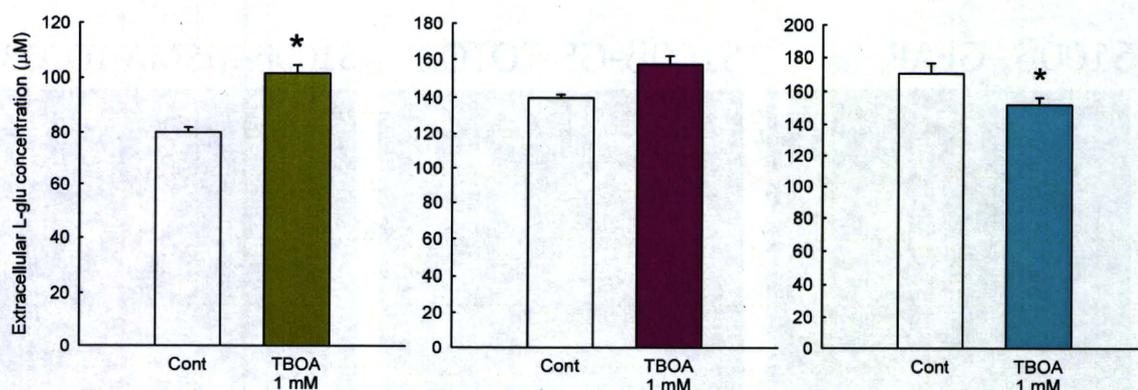


図3 てんかん患者由来アストロサイト様細胞サンプル1-3からのL-glu放出とそれに対するTBOAの作用

サンプル1-3の培地を洗浄し、新たな培地に交換し24時間後に細胞外L-glu濃度を測定したところ、細胞外へのL-glu放出が確認された。TBOA存在下、サンプル1ではL-glu濃度上昇がさらに促進され、サンプル2では何ら影響が見られず、サンプル3では有意に抑制された。(*: $P < 0.05$ vs. control, $N=8$, Tukey's test following ANOVA)

2. 健康人iPS由来neurosphereの特性解析

2-1. 免疫組織化学的解析

分化誘導20日後の位相差顕微鏡像ではsingle cell法とsphere法の両サンプルともほぼsingle cell layerとなり、神経細胞の特徴的な形態(細胞体、長い突起等)を持つ細胞が現れていた(図4)。神経細胞マーカーTuj1、アストロサイトマーカーGFAP、神経幹細胞マーカーNestinの発現を免疫組織化学的に検出したところ、single cell法では顕著にTuj1を発現する突起が数多く観察された。また、1視野につき1-2 cell程度、GFAP陽性の細胞が見いだされた(図5)。樹状突起マーカーMAP2陽性の樹状突起も観察されたが、シナプス後部マーカーPSD95は樹状突起上に弱く発現が観察された(図6)。Sphere法ではsingle cell法とほぼ同様のTuj1発現パターンを示したが、GFAP強陽性の細胞は見られなかった。また、もともとsphereのあったところにnestin陽性の細胞が放射状に分布している様子が観察された(データ示さず)。sphere法では細胞の増殖が著しく分化誘導30日後にはmulti cell layerとなっていたため、免疫組織化学的な観察は困難となった。Single cell法ではTuj1強陽性の神経突起が確認された。また、GFAP強陽性の細胞数がさらに増加していた(図7)。また、MAP2陽性の樹状突起の上部にスパイン様のPSD95クラスタリングを見いだした(図8)。

2-2. 細胞内カルシウム変動測定

分化誘導20日後のsingle cell法サンプルを用いて

細胞内カルシウム変動測定を行った(図9)。細胞は還流装置により50 μM picrotoxin 8 min, 50 μM NMDA 1 min, 100 μM ATP 1 min, 80 mM KCl 1 min, 5 μM ionomycin 30 sの順に刺激した。これらの刺激の内、ATP刺激に対してのみ顕著な細胞内カルシウム濃度上昇を呈した細胞が観察された(14/30)。Ionomycinに対しては全ての細胞が細胞内カルシウム濃度上昇を示したことから、本実験システムおよび細胞が正常に機能していることが確認された。一方、sphere法サンプルでは上記いずれの刺激に対しても反応を記録できなかったことから、sphere法では光透過性が低くなり測定が困難となることが示唆された。培養30日目のサンプルでは50 μM picrotoxin 3 min, 100 μM L-glu 2 min, 50 μM NMDA 2 min, 100 μM ATP 2 min, 80 mM KCl 2 min, 5 μM ionomycin 1 minの順で細胞を刺激した。Single cell法サンプルではpicrotoxin反応性(37/66)、L-glu反応性(13/66)、NMDA反応性(1/66)、ATP反応性(66/66)、high K⁺反応性(66/66)の細胞が観察された。また、全ての細胞でionomycinによる細胞内カルシウム濃度上昇を確認した。その他の刺激に比べ、ATPに対して細胞内カルシウム濃度は著しく上昇した(図10)。Sphere法サンプルではL-glu反応性(35/63)、ATP反応性(63/63)、high K⁺反応性(52/63)の細胞が観察されたが、single cell法に比べ反応は小さかった。また、picrotoxinに応答する細胞は見受けられなかった(図11)。

Single cell Day 20

Sphere Day 20

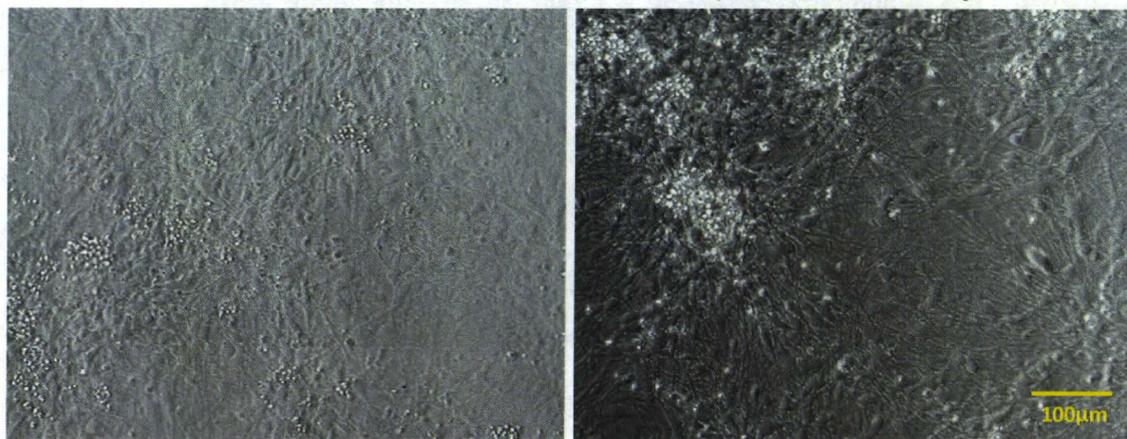


図4 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 20 日目の位相差顕微鏡像

Single cell 法、sphere 法の両サンプル共に形態的に神経細胞様の細胞が数多く見受けられた。
Bar=100 μm

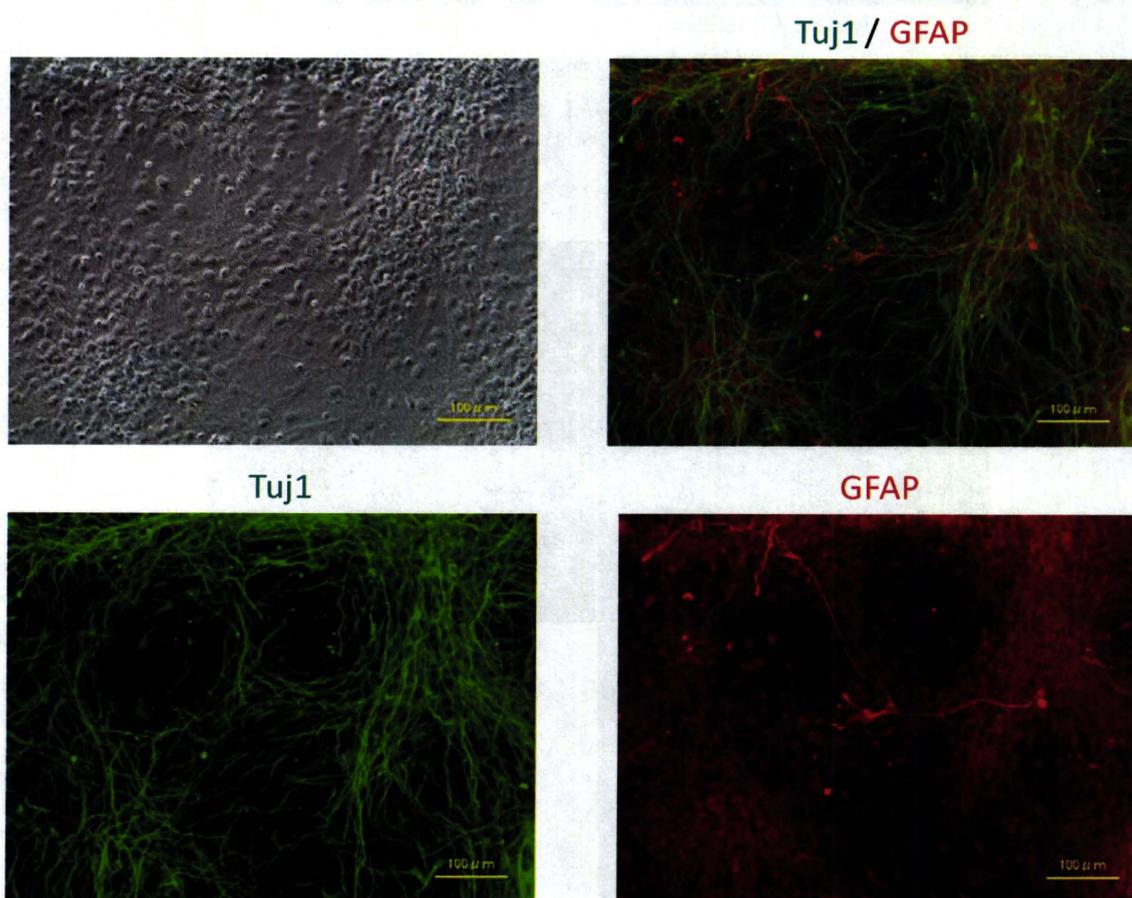


図5 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 20 日目の分化マーカーの発現

各分化マーカーの色については各写真上に示すとおり。

Single cell 法では多数の TuJ1 陽性細胞の中にまれに GFAP 陽性細胞が見いだされた。

Bar=100 μm

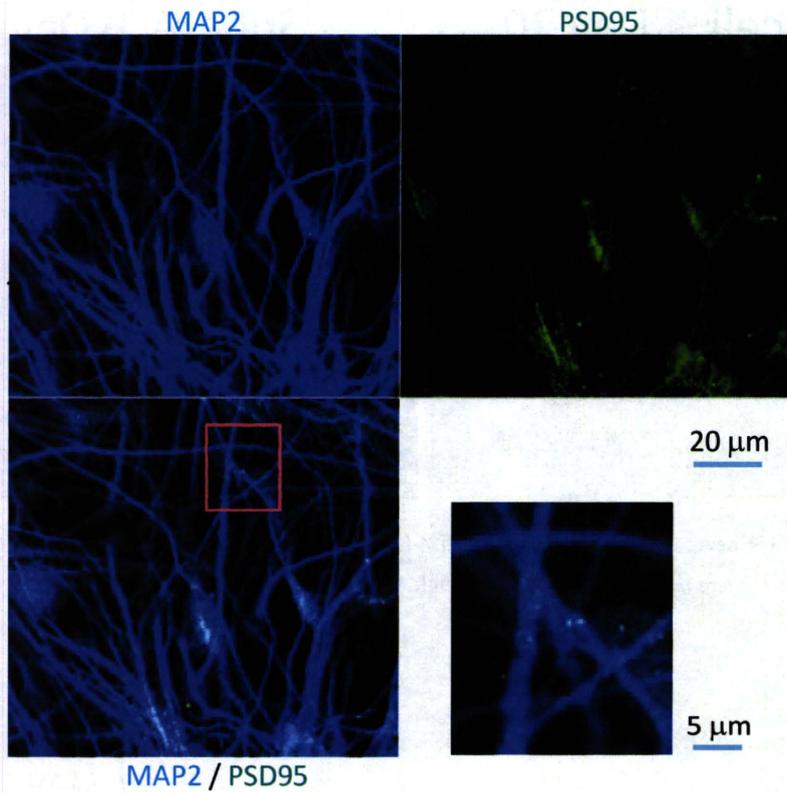


図6 健康人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 20 日目の MAP2, PSD95 の発現
 マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。
 MAP2 陽性の樹状突起も観察されたが、PSD95 の発現は弱く樹状突起上に分散していた。

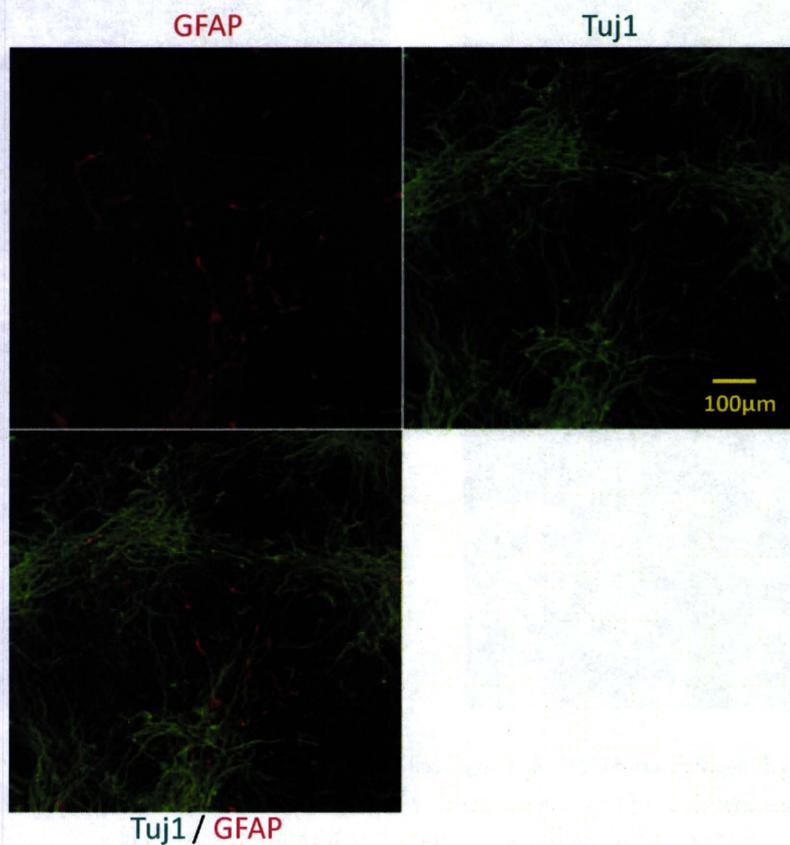


図7 健康人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 30 日目の分化マーカーの発現
 各分化マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。Tuj1 強陽性の神経突起が観察された。
 GFAP 強陽性の fiber の数が分化誘導 20 日目よりさらに増加していた。

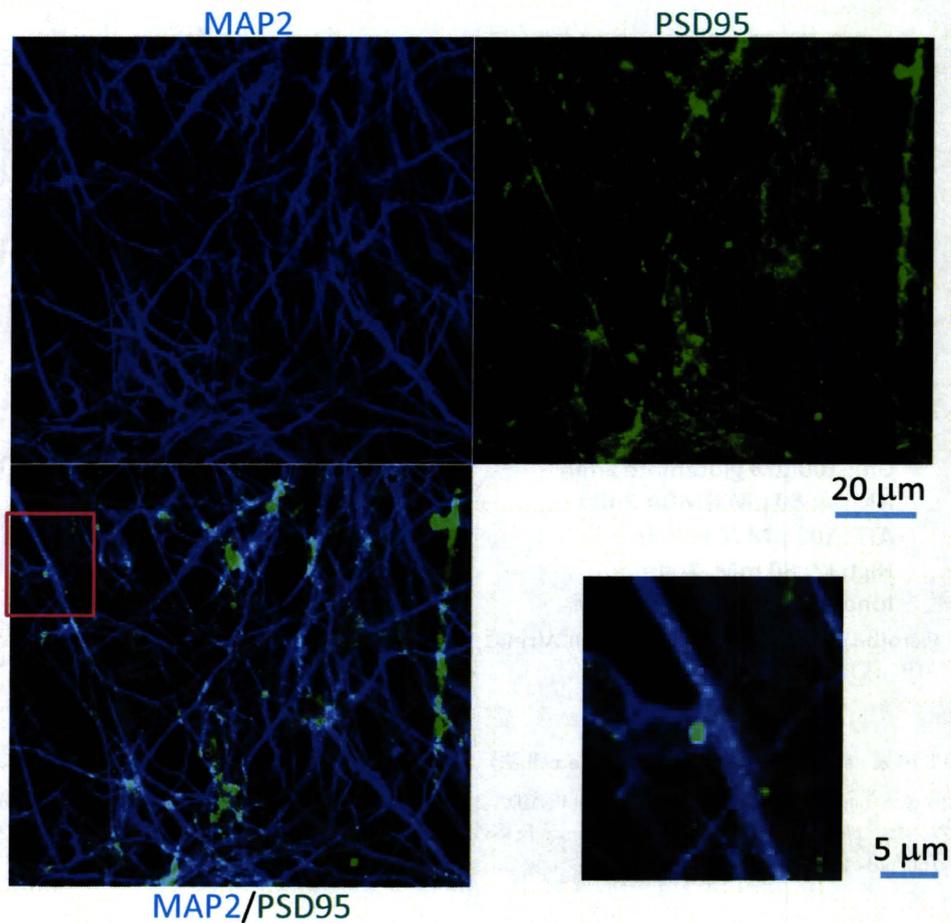


図8 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 30 日目の MAP2 と PSD95 の発現
 マーカーの色については各写真の上下に示すとおり。MAP2 陽性の樹状突起の上部にスパイン上の PSD95 クラスターリングを見いだした。

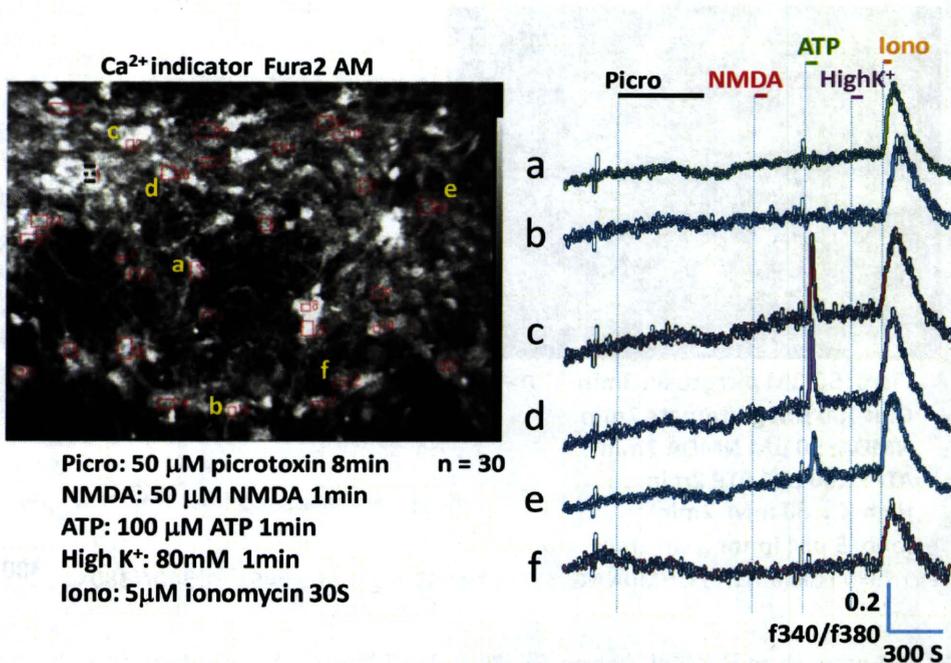


図9 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 20 日目の各種刺激に対する細胞内カルシウム変動
 50 μM picrotoxin 8 min, 50 μM NMDA 1 min, 100 μM ATP 1 min, 80 mM KCl 1 min, 5 μM ionomycin 30 s の刺激のうち、ATP 刺激に対してのみ顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇がおこった (12/30)。

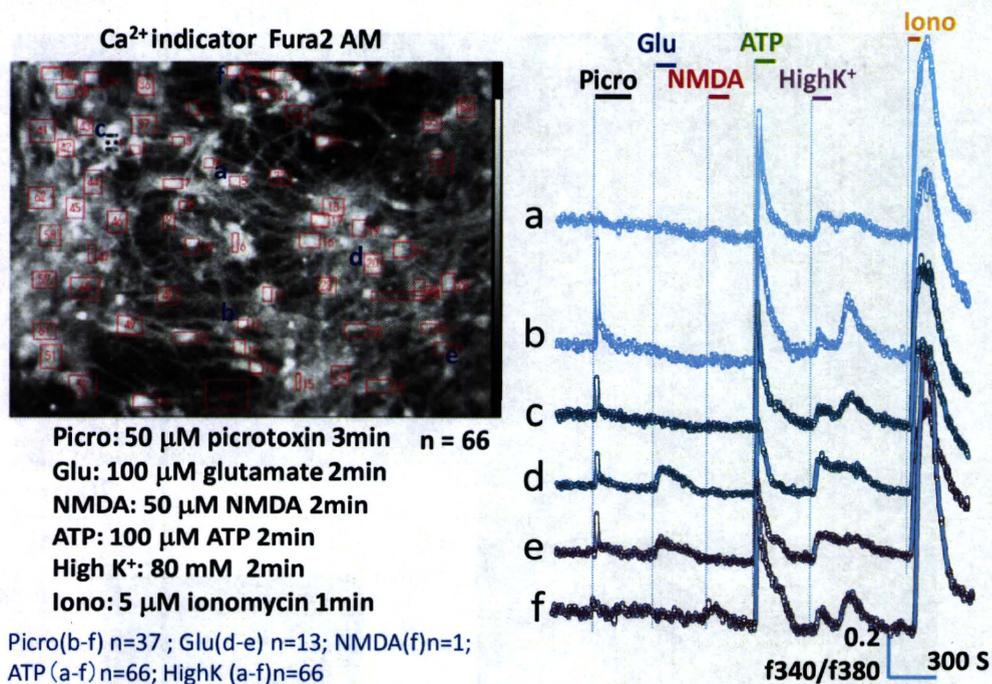


図 10 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (single cell 法) 30 日目の各種刺激に対する細胞内カルシウム変動

50 μM picrotoxin 3 min, 100 μM L-glu 2 min, 50 μM NMDA 2 min, 100 μM ATP 2 min, 80 mM KCl 2 min, 5 μM ionomycin 1 min の刺激を与えた。picrotoxin 反応性 (37/66)、L-glu 反応性 (13/66)、NMDA 反応性 (1/66)、ATP 反応性 (66/66)、high K⁺ 反応性 (66/66) の細胞が観察された。

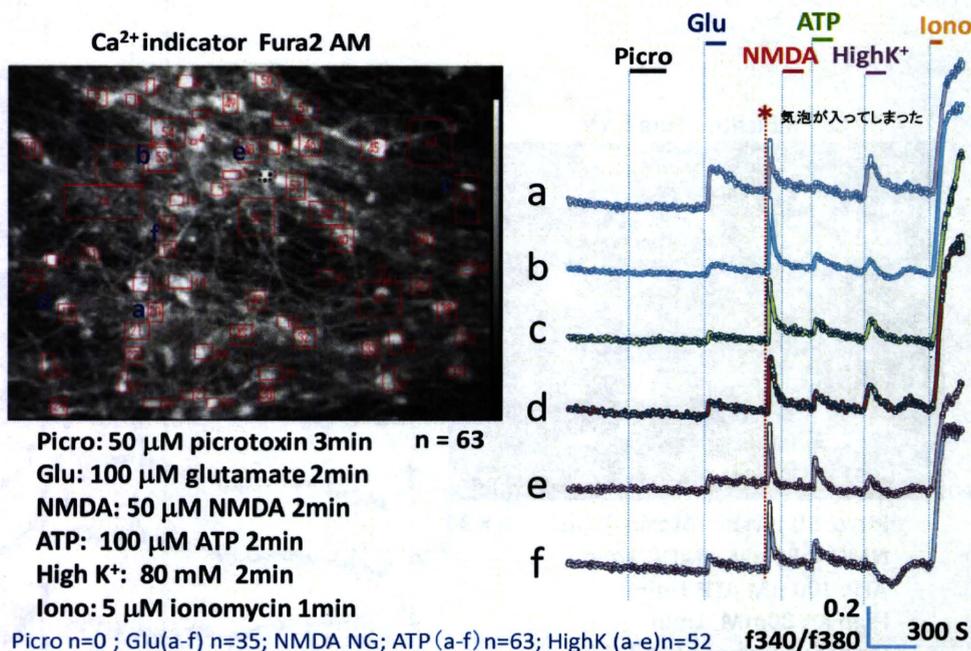


図 11 健常人 iPS 由来 neurosphere 分化誘導 (sphere 法) 30 日目の各種刺激に対する細胞内カルシウム変動

50 μM picrotoxin 3 min, 100 μM L-glu 2 min, 50 μM NMDA 2 min, 100 μM ATP 2 min, 80 mM KCl 2 min, 5 μM ionomycin 1 min の刺激を与えた。L-glu 反応性 (35/63)、ATP 反応性 (63/63)、high K⁺ 反応性 (52/63) の細胞が観察された。Picrotoxin に反応する細胞は見受けられなかった。

D. 考察

1. てんかん患者由来アストロサイト様細胞の特性解析

健常アストロサイトはアストロサイトマーカーである S100 β , GS, GFAP 陽性であり、L-glu トランスポーター EAAT1, EAAT2 を発現している。しかし、サンプル 1-3 は S100 β 以外のアストロサイトマーカーの発現が低く、本来アストロサイトには発現していない α SMA を発現していた。このようにマーカー蛋白質発現パターンは健常アストロサイトの典型的なパターンとは大きく異なっていた。近年、てんかん病態とアストロサイトとの関連が注目され始めている。アストロサイト gliosis が側頭葉てんかんの発作誘導に深く関わっていることが指摘されている (Epilepsia 49, 42-52 [2008]; Epilepsia 49, 3-12 [2008])。近心側頭葉てんかん患者ではアストロサイトにおける GS 発現量が漸減しており、glutamate-glutamine サイクルが非常に遅くなっていることも知られている (Epilepsia 49, 42-52 [2008])。また、BBB 機能低下により脳内に浸潤した albumin がてんかんを誘発するという報告があるが (Brain 130, 535-547 [2007])、このとき albumin は TGF β 受容体を介して作用を呈することが知られている。この TGF β がアストロサイトに α SMA 発現を誘導するという報告もあり (Neuropathol. Appl. Neurobiol. 34, 532-46 [2008])、てんかんアストロサイトでは α SMA が発現している可能性も否定できない。以上の免疫組織化学的知見を考え合わせると、今回のサンプル 1-3 はてんかん病態を反映するアストロサイトである可能性が考えられる。

さらに我々は、本細胞から L-glu が自発的に放出されていることを見いだした。虚血などの病態時、細胞内外のイオン勾配が破綻すると L-glu トランスポーターが逆回転して L-glu が放出されることが報告されている (reversed transport) (Nature 403(6767), 316-21 [2000])。TBOA は非選択的な L-glu transporter 阻害薬であり (Mol. Pharmacol. 53(2), 195-201 [1998])、L-glu transporter の正常機能および reversed transport の両者を阻害する。TBOA 添加により、サンプル 1 では細胞外 L-glu 濃度上昇がさらに促進され、サン

プル 2 では何ら影響がなく、サンプル 3 では有意な抑制が観察された。以上の結果は L-glu 放出が reversed transport とそれ以外の複合的なメカニズムによって引き起こされており、サンプル 1 では L-glu transporter が正常に機能しており、サンプル 2 では L-glu transporter は機能しておらず、サンプル 3 では reversed transport が起こっている可能性が示唆される。てんかん患者由来のアストロサイトがグルタミン酸を積極的に放出するという報告もある (Glia 54, 358-368 [2006])。近心側頭葉てんかん患者の sclerotic な海馬における過剰な細胞外 L-glu がてんかん障害をひきおこすことも示されている (Epilepsia 49, 42-52 [2008])。したがって、自発的に L-glu を放出するという細胞特性はこれらの細胞がてんかん病態を反映するアストロサイトであることをさらに支持するものである。

留意すべき点として、近心側頭葉てんかん患者に見られる症状は sclerosis を伴う場合にのみ報告されている症状であり、sclerosis のない患者では見受けられない、とうことがある。従って、本実験結果と供与されたサンプルの症例との突き合わせが必要である。

2. 健常人 iPS 由来 neurosphere の特性解析

分化誘導 20 日目の single cell 法サンプルでは細胞は picrotoxin, NMDA, high K⁺ に反応せず、ATP、ionomycin にのみ反応した。この結果は、これらの細胞に GABA_A 受容体、NMDA 受容体、電位依存性カルシウムチャンネルが発現していないことを示している。分化誘導 20 日目にはほぼ全ての細胞が Tuj1 陽性細胞であるが、神経細胞としては機能的に未成熟であることが示唆される。一方、分化誘導 30 日目には picrotoxin 反応性、L-glu 反応性、NMDA 反応性、high K⁺ 反応性の細胞が現れた。これは興奮性グルタミン酸神経および抑制性 GABA 神経が分化したことを強く示唆している。データには示していないが、細胞外還流液をカルシウムフリーにすると、全ての細胞で細胞内カルシウム濃度が即時低下した。これは自発的な発火も起こっていることを示唆している。興味深いことに、single cell 法では picrotoxin 反応性、L-glu 反応性は一部の細胞にのみ観察された。また、

これらの反応性はオーバーラップしていなかった。一方、sphere 法サンプルではほぼ全ての細胞が picrotoxin に反応せず、L-glu, ATP, high K⁺ にほぼ同じ強度で反応しており、反応が同期していることが示唆された。Single cell 法のほうが細胞の分化バリエーションが多くなる一方、sphere 法では全ての細胞が同期しながら分化が進む可能性が考えられる。sphere 法は single cell 法よりも細胞の増殖が著しく、サンプルの光透過性が失われる場合が多いので、今後評価系には single cell 法を採用した方がよいかもしれない。

分化誘導 20 日目で唯一、反応を示したのは ATP 刺激に対してであるが、ATP に関しては神経前駆細胞が P2Y 受容体を介して細胞増殖していることが報告されている (Development 133(4), 675-84 [2006]; Dev. Biol. 302, 356-66 [2007])。P2Y signaling を阻害すると増殖が抑制され、分化が進むことも報告されている。しかし、我々の実験では分化誘導 20 日目に観察された ATP への反応が分化誘導 30 日目でさらに増強し、細胞の反応率もほぼ 100% になった。P2Y 受容体阻害剤存在下で培養した場合の影響に非常に興味を持たれる。

以上の結果が示すとおり、分化誘導 30 日目まで培養すればグルタミン酸興奮性神経と GABA 抑制性神経が現れてくることが明らかとなった。しかし、現時点の培養条件では増殖性の細胞の活性が著しく、single cell 法、sphere 法、ともに分化誘導 30-40 日目までしか培養することができない。現在、より長期間分化誘導をかけられるようにコーティング、cell density の最適化、アストロサイトインサートとの共培養などを試みている。

E. 結論

てんかん患者由来アストロサイト様細胞サンプル 1-3 がてんかん病態を反映するアストロサイトである可能性が示された。健康人 iPS 由来 neurosphere を 30 日以上分化誘導すると興奮性グルタミン酸神経および抑制性 GABA 神経が分化し、薬理的解析が可能になることが示された。これは、この細胞が、てんかん患者 iPS 由来 neurosphere の特性解析のコ

ントロールとなることを示すばかりでなく、iPS 由来 neurosphere のモデル細胞としての有望性を示すデータである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 佐藤 薫, 重本一最上由香里, 大野泰雄, 関野祐子: ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を誘導する. Neuro2010, 2010.9; 神戸市
- 2) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲子, 竹内幸一, 関野祐子, 佐藤 薫: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 substrate-gated conductance の調節. Neuro2010, 2010.9; 神戸市
- 3) 佐藤 薫, 重本一最上由香里, 大野泰雄, 関野祐子: 生後初期脳におけるミクログリアの役割. 内藤コンファランス, 2010.10; 神奈川県湘南市
- 4) 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲子, 竹内幸一, 関野祐子, 佐藤 薫: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 コンダクタンスの調節. 内藤コンファランス, 2010.10; 神奈川県湘南市
- 5) 佐藤 薫, 高橋華奈子, 中澤憲一, 石井一野澤玲子, 竹内幸一, 関野祐子: ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011.3; 横浜市
- 6) 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳之: パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011.3; 横浜市
- 7) 佐藤 薫, James E Goldman, 関野祐子: 生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築. 日本薬学会第 132 回年会, 2011.3; 静岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	書籍名	書籍全体の 編集者名	出版社名	出版地	ページ 出版年
高橋幸利.	小児てんかん診療マニ アル	藤原建樹 (監修) 高橋幸利 (編集)	診断と治療社	東京都	360頁 2011

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号：ページ 出版年
Yamane J, Nakamura M, Iwanami A, Sakaguchi M, Katoh H, Yamada M, Momoshima S, Miyao S, Ishii K, Tamaoki N, Nomura T, Okano HJ, <u>Kanemura Y</u> , Toyama Y, Okano H.	Transplantation of Galectin-1-Expressing Human Neural Stem Cells Into the Injured Spinal Cord of Adult Common Marmosets.	J Neurosci Res	88(7):1394-1405, 2010
<u>Kanemura Y</u> .	Development of cell-processing systems for human stem cells (neural stem cells, mesenchymal stem cells, and iPS cells) for regenerative medicine.	Keio J Med	59(2):35-45, 2010
Sakai Y, Yoshida S, Yoshiura Y, Mori R, Tamura T, Yahiro K, Mori H, <u>Kanemura Y</u> , Yamasaki M, Nakazawa K.	Effect of microwell chip structure on cell microsphere production of various animal cells.	J Biosci Bioeng	110(2):223-229, 2010
金村米博, 森 英樹, 八尋寛司, 中澤浩二.	細胞凝集塊形成プロセス制御による幹細胞の培養・分化制御.	再生医療	9(3):47-52, 2010
<u>金村米博</u> .	中枢神経疾患に対する細胞移植療法を用いた再生治療.	脳神経外科	39(1):5-23, 2011
Sakuma H, Awaya Y, Shiomi M, Yamanouchi H, <u>Takahashi Y</u> , Saito Y, Sugai K,	Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS): a peculiar form of childhood encephalitis.	Acta Neurol Scand	21(4):251-256, 2010

Sasaki M.			
Kashihara K, Ohno M, Takahashi Y.	Twenty-one- year course of adult-onset Rasmussen's encephalitis and bilateral uveitis: case report.	J Neurol Sci	294(1-2):127-130, 2010
Muto A, Oguni H, Takahashi Y, Shirasaka Y, Sawaishi Y, Yano T, Hoshida T, Osaka H, Nakasu S, Akasaka N, Sugai K, Miyamoto A, Takahashi S, Suzuki M, Ohmori I, Nabatame S, Osawa M.	Nationwide survey (incidence, clinical course, prognosis) of Rasmussen's encephalitis.	Brain Dev	32(6):445-453, 2010
Yoshikawa T, Asano Y, Takahashi Y.	Detection of DNA of six human herpesviruses in the cerebrospinal fluid of immunocompetent non-herpetic acute limbic encephalitis patients.	Microbiol Immunol	54(8):471-474, 2010
Tachibana N, Shirakawa T, Ishii K, Takahashi Y, Tanaka K, Arima K, Yoshida T, Ikeda S.	Expression of various glutamate receptors including N-methyl-D- aspartate receptor (NMDAR) in an ovarian teratoma removed from a young woman with anti-NMDAR encephalitis.	Intern Med	49(19):2167-2173, 2010
Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group.	HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients.	Epilepsia	51(12):2461-2465, 2010

Tojo K, Nitta K, Ishii W, Sekijima Y, Morita H, Takahashi Y, Tanaka K, Ikeda S.	A Young Man with Anti-NMDAR Encephalitis following Guillain-Barré Syndrome.	Case Rep Neurol	3(1):7-13, 2011
Takahashi Y, Mori H, Mishina M, Watanabe M, Kondo N, Shimomura J, Kubota Y, Matsuda K, Fukushima K, Shiroma N, Akasaka N, Nishida H, Imamura A, Watanabe H, Sugiyama N, Ikezawa M, Fujiwara T.	Autoantibodies to NMDA-type GluR ϵ 2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua.	Epilepsia	in press
Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, Matsuo M, Saito K, Yamamoto T.	Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis.	Epilepsy Res	in press
Nomura Y, Aihara M, Matsukura S, Ikezawa Y, Kambara T, Aihara Y, Takahashi Y, Ikezawa Z.	Evaluation of serum cytokines levels in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in compared with other delayed-type adverse drug reactions.	J Dermatol	in press
高橋幸利, 最上友紀子, 高山留美子.	神経疾患と抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体.	Clinical Neuroscience	28(4):364-365, 2010
高橋宏佳, 高橋幸利, 美根潤, 向田壮一, 池上真理子, 池田浩子, 大谷英之, 下村次郎,	Dravet 症候群における Topiramate の治療効果.	脳と発達	42(4):273-276, 2010