

(4) 目標達成型脳科学研究

「新たな脳細胞移植法の確立と障害脳機能の再建のための研究」

(H11~13年、第I期)

平成13年度予算額:178百万円(171百万円)

研究管理統括者:西野仁雄(名古屋市大医学部) 研究体制:名古屋市大医学部 他12機関

研究の概要・目標

1 何を目指しているのか

傷害された脳機能を再建するための脳細胞移植法の確立。

第I期の目標:

●ドナー細胞として有用な細胞の開発

●ドナー細胞の移植方法、機能評価法の開発

第II期の目標:

●神経幹細胞及びES細胞から目的とする神経細胞への分化誘導技術の確立

●分化させた神経細胞の大動物(マウス、サル)への移植による有用性の検証

●ドナー細胞の臨床応用

2. 何を研究しているのか

・移植に用いるドナー細胞の開発。

・ドナー細胞の移植方法、機能評価法の開発。

3 何が新しいのか

幹細胞に関して、分子生物学から臨床に至る研究者を統合し、世界的に見てもまだ開発の端緒にある、幹細胞を用いた障害脳機能に対する治療法を確立しようとする。

諸外国等の現状

1 現状及び我が国の水準

・欧米において、自己組織や流産胎児組織を用いた神経移植法が臨床応用され、一定の成果をあげているが、技術的あるいは経済的な問題があり、壁に直面しているところ。

・我が国では、自己組織を用いた神経移植の臨床応用は行われているが、胎児組織の応用については生命倫理の観点からのコンセンサスが得られておらず、大きく遅れをとっている。

・一方、90年代に入って成熟脳で幹細胞が発見されたことと、近年その制御技術が進化したことにより、幹細胞を用いた神経細胞移植に道が開かれ、我が国を含めて世界的に臨床応用にむけてしのぎを削っているところ。

研究進展・成果がもたらす利点

1 世界の水準との関係

パーキンソン病や脳梗塞に対する新しい神経組織移植法が開発されることにより、世界にキャッチアップできる。

2 波及効果

発生・老化生物学の発展や、幹細胞制御技術あるいは新しいウイルスベクターの開発等に資する可能性がある。

新たな脳細胞移植法の確立と障害脳機能の再建のための研究

〔研究管理統括〕
名古屋市大 西野教授

〔移植に用いるドナー細胞の開発〕

幹細胞の制御による移植ドナー細胞の開発

マウス脳由来幹細胞
〔東京理科大・東京医科歯科大・信州大〕

ブタ脳由来幹細胞
〔慶應大〕

ヒト脳由来幹細胞
〔大阪大〕

マウスES細胞由来幹細胞
〔理研〕

マウス・ヒト羊膜由来幹細胞
〔精神・神経センター〕

遺伝子導入による移植ドナー細胞の開発

アデノウイルスベクター
〔理研〕

アデノ随伴ウイルスベクター
〔自治医大〕

レトロウイルスベクター
〔名古屋市大・東京薬科大〕

脳細胞移植法の確立 障害脳機能の再建

第Ⅰ期の目標：

- ドナー細胞として有用な細胞の開発
- ドナー細胞の移植方法、機能評価法の開発

第Ⅱ期の目標：

- 神経幹細胞及びES細胞から目的とする神経細胞への分化誘導技術の確立
- 分化させた神経細胞の大動物（ブタ、サル）への移植による有用性の検証
- ドナー細胞の臨床応用

〔移植方法の開発〕

新しい移植法及び機能評価法の開発

カプセル化細胞脳内移植法
〔岡山大〕

ドナー・ホスト相互作用及び機能評価
〔味の素〕

臨床脳神経移植への応用

パーキンソン病
ハンチントン病
脳梗塞
〔和歌山医大〕

実施体制及び所要経費

研 究 項 目	研究実施機関等	所要経費 (千円)
1. 移植に用いるドナー細胞の開発に関する研究		
(1) 幹細胞の制御による移植ドナー細胞の開発に関する研究		
① 脳内移植による神経系細胞の可塑性に関する研究	文部科学省研究振興局 東京理科大学基礎工学部(委託)	39,615
② FACSにより分離した神経幹細胞の移植による神経変性疾患治療法の開発に関する研究	大阪大学医学部	39,435
③ マウス ES 細胞からの神経幹細胞の形成に関する研究	文部科学省研究振興局 理化学研究所(委託)	37,174
④ トランスジェニックブタ神経幹細胞を用いた神経疾患移植治療用「人工代用神経細胞ドナー」の開発に関する研究	文部科学省研究振興局 慶應義塾大学医学部(委託)	35,410
⑤ 羊膜細胞からの神経幹細胞の同定と分離法の確立および脳細胞移植法の研究	国立精神・神経センター	40,922
⑥ 正常及び遺伝子操作マウス由来脳神経幹細胞の樹立と脳移植による脳神経変性疾患治療モデルの研究	東京医科歯科大学	37,197
⑦ ドーパミンニューロンの分化誘導・移植による、パーキンソン病治療法の開発に関する研究	信州大学医学部	7,633
(2) 遺伝子導入による移植ドナー細胞の開発に関する研究		
① アデノウイルス (AV) ベクターを用いた神経幹細胞への遺伝子導入ならびに神経発生に関与する分化誘導因子の機能に関する研究	文部科学省研究振興局 理化学研究所(委託)	35,731
② アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた神経幹細胞の制御に関する研究	文部科学省研究振興局 自治医科大学(委託)	44,506
③ レトロウイルス (RV) ベクターを用いた神経幹細胞への遺伝子導入による移植ドナー細胞の開発に関する研究	文部科学省研究振興局 名古屋市立大学医学部(委託)	56,423

④高力価レトロウイルスベクターの作成と移植ドナー細胞開発への応用に関する研究	文部科学省研究振興局 東京薬科大学薬学部(委託)	6,600
2. 移植方法・機能評価法の開発及び臨床脳神経移植への応用に関する研究		
(1)移植方法及び機能評価法の開発に関する研究		
①カプセル化細胞脳内移植による障害脳機能の再建に関する研究	岡山大学医学部	38,636
②ドナー・ホスト相互作用及び機能評価に関する研究	文部科学省研究振興局 味の素中央研究所(委託)	36,104
(2)臨床脳神経移植法の改善及び開発に関する研究		
①パーキンソン病及びハンチントン病に対する脳細胞移植治療に関する研究	文部科学省研究振興局 和歌山県立医科大学(委託)	46,478
3. 研究管理	文部科学省研究振興局 名古屋市立大学医学部(委託)	18,727

研究成果の概要

【研究成果の概要】

1. 移植に用いるドナー細胞の開発に関する研究

(1) 幹細胞の制御による移植ドナー細胞の開発に関する研究

発生早期(mouse E8.5, rat E10, swine E17-18)の中脳脳部神経板から分離した神経上皮様神経幹細胞は、bFGF下で増殖が活発で、他の時期のものに比べ神経細胞への分化傾向がきわめて強いことを見いだした。これらの細胞は異種間(ブタラット)移植も可能であるので有力なドナー前駆細胞候補となる。

神経幹細胞の単離は、ネスチン遺伝子のプロモーター下にGFPを発現するトランスジェニック動物を作成し、この動物よりFACSを用いて蛍光を発する細胞として分離することができた。同様の方法で単離したドバミン細胞(TH遺伝子プロモーター下で発光)をパーキンソン病モデル動物に移植すると、運動障害を著明に改善した。p53KOマウス脳から多くの株細胞を樹立することができ、多能性幹細胞株(神経細胞、アストロサイト、オリゴサイトに分化)、神経産生株、グリア幹細胞株に分類することができた。この中で、ブルキンエ細胞株細胞へ分化と増殖を可逆的に繰り返す神経産生株(2Y-502b)を確立できた。E10.5マウス全脳から調整した神経幹細胞は、高濃度bFGF、無血清下で、長期間増殖させることが可能で、shh処理によって成熟ニューロンまでに至らないが、THの発現を誘導することができた。

一方、神経幹細胞の発生、分裂、移動を、正常マウスとNMHC-B KOマウスで比較したところ、脳室壁の形成不全をおこすMHC-B KOマウスでは幹細胞の分裂・移動が障害されることから、幹細胞の分裂、移動には脳室壁の構造が必要であることがわかった。

多能性細胞であるヒト羊膜細胞から90%以上の純度で間葉細胞層を分離することができた。これらの細胞はネスチン/ムサシ陽性であるので神経幹細胞の性質をもつこと、そしてB27培養液で培養すると神経細胞(ネスチン/ムサシ陰性、 β -tubulin陽性)に分化することを明らかにした。

また、未分化多能性の骨髄ストローマ細胞にメルカプトエタノールあるいはDMSOを処理することによって、 β -tubulin陽性の神経細胞様細胞に分化させることが可能となった。一方、マウスES細胞をフィブロネクチンコート上に播きレチノイン酸で処理すると、効率良く神経系に誘導させることが可能となった。分化誘導後、浮遊培養し、再度フィブロネクチン皿上に少数の細胞を播いて、単一細胞由来のクローンを確立することができた。このクローンはネスチンを発現することから神経幹細胞であり、3次元培養で神経細胞に分化した。

このようにして得られた神経幹細胞は、異種間移植が可能で、子宮内胎児脳内に移植しても80%以上の頻度で出産させることが可能となった。また、パーキンソン病/脳虚血モデル動物に移植すると、宿主脳内で生着し、障害機能を改善した。

(2) 遺伝子導入による移植ドナー細胞の開発に関する研究

非増殖細胞にも遺伝子導入可能なAVベクター、安全性の高いAAVベクター及び増殖期の細胞の核に安定的に遺伝子導入できるRVベクターを作成した。

AVベクターは神経幹細胞に良く感染し、感染によって分化が誘導されることがなかったの

で、神経幹細胞への遺伝子導入に有用である。レポーター遺伝子を組み込んだAAVベクターを胎生期のマウス脳内に注入すると、注入時期依存性に大脳皮質の異なる層がパルス的にラベルされるので、発生、分化、移動など神経系の解析に有用であることがわかった。

AAVベクターは幹細胞などの未分化の細胞には感染しにくい、成熟神経細胞には効率良く感染することを明らかにした。TH、AADC、GCH遺伝子を組み込んだ3種類のAAVベクターを作成し、これらをミックスして、MPTP投与パーキンソン病モデルサルに注射すると、長期にわたりドパミン及び代謝産物が増加し、対側の運動障害の改善が得られた。

RVベクターは多くの利点をもつ一方、高いタイトルのウイルスが得にくいという欠点がある。FACSによって感染細胞を選別し、遠心法によってウイルスを濃縮することによって、高タイトル（10⁹-10¹²CFU/ml）のウイルスを遊離するウイルス産生細胞を確立することができた。TH遺伝子を組み込んだ10⁹力価程度のRVベクターは神経幹細胞に良く感染し、TH遺伝子を導入することが可能となった。この細胞をパーキンソン病モデル動物に移植すると、運動障害が改善され、遺伝子導入した幹細胞の移植が有効であることを明らかにした。

2. 移植方法・機能評価法の開発及び臨床脳神経移植への応用に関する研究

(1) 移植方法及び機能評価法の開発に関する研究

種々の細胞をカプセル封入し、脳内に長期間、安全に移植する方法を確立した。PC12細胞をポリマーカプセルに封入し、MPTP投与パーキンソン病モデルサルの線条体に移植すると、1年以上にわたり、ドーパ及びドパミンが安定して産生され、免疫反応は極くわずかで、運動機能の改善を得ることができた。同様に、GDNF遺伝子を導入したBHK細胞をカプセル化してパーキンソン病モデルラットの線条体に移植すると、ドパミン神経系に対する保護効果が得られ、アポモルフィン誘起回転運動が減少した。

一方、高感度の脳機能評価法を開発することを目的として、高解像分解能fMRIの条件設定を行い、種々の脳障害の発症過程を非侵襲的に感度良く解析する方法を確立した。

(2) 臨床脳神経移植法の改良及び開発に関する研究

パーキンソン病患者に、内視鏡的に摘出した自家胸部交感神経節組織を移植し、1年以上にわたり臨床効果を追跡した。L-dopa効果の持続時間の延長とオン状態時間の増加を得ることができ、移植による臨床症状の改善をえた。この実験系での治療効果をさらに上げることが目的として、交感神経節細胞からのカテコラミンの放出に及ぼす種々の生理活性物質の作用を解析し、cAMPが最も有効であることを見いだした。