

「知と構成」研究領域延長研究者 事後評価報告書

- 平成 13 年度終了研究課題 -

領域総括 鈴木 良次

1. 研究領域の概要

知覚・認識・理解・問題解決などの高度で柔軟な「知」の働きに着目し、その発現のメカニズム（構成）を神経科学、数理科学などさまざまな視点から追求する。具体的には、神経細胞、脳神経系さらには行動そのものを対象とし、「知」の発現につながる物質、構造、理論などを明らかにする実証的あるいは理論的研究を含む。

2. 延長研究課題・延長研究者名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (延長時所属)	研究費* (百万円)
岡ノ谷 一夫 (兼任)	鳥の歌の生成文法とその脳内表現 (千葉大学文学部)	千葉大学文学部 助教授 (千葉大学文学部 助教授)	10
澤田 誠 (兼任)	LTP 形成におけるミクログリアの役割の検討 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所)	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所 助教授)	10

*：研究費には研究者の人件費は含まず。

3. 延長研究について

事後評価を行って、領域総括から「3年間の研究結果を踏まえた上で、さらに一定期間の研究を行えば一層の展開が期待され、我が国の科学技術に大きな貢献をされると考えられる」との考察(別紙8)をもとに、事後評価の対象となった研究課題の一部について、研究期間の延長を試行的に行うこととした。具体的には、領域総括が必要に応じ領域アドバイザーの協力を得て選考を行い、事業団が引き続き研究を支援することとした。これらの課題についてはあらかじめ具体的な研究目標を明確化することとし、追加する研究期間は最長2年間とした。

4. 研究実施期間

平成 12 年 3 月～平成 14 年 2 月

5. 研究状況

各研究者は、各自研究を実施するとともに、関連する進行中の研究領域「情報と知」の領域会議、さきがけの研究報告会に積極的に参加し、研究進捗状況の報告と討論、研究交流を図るよう努めた。

6. 評価の手續き

領域総括が各研究者からの報告・自己評価を基に必要な応じて領域アドバイザーの協力を得て行った。

(評価の流れ)

平成 14 年 2 月	研究終了
平成 14 年 4 月まで	研究報告書及び自己評価提出
平成 14 年 6 月	領域総括等による評価

7. 評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じた新たな知見の取得など、研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

8. 研究結果

(1)岡ノ谷一夫「鳥の歌の生成文法とその脳内表現」

岡ノ谷研究者は、平成8年から11年の3年間にわたって「知と構成」領域の研究者として、ジュウシマツの歌の分析と歌の生成と認識に関わる脳内機構の解析を行ってきた。その結果、一般に鳥の歌のパターンが線形の要素配列をもつ固定的なものであるのに対し、ジュウシマツの歌が、有限状態文法で記述される複雑な時系列構造を持つこと、また、大脳の階層的な構造が有限状態文法の階層に対応することなどを明らかにしてきた。2年間の延長期間においては、ジュウシマツとその祖先種と思われるコシジロキンパラの遺伝的関係の解明、大脳の歌制御にかかわる神経核における聴覚情報の階層処理機構の解明、同神経核の歌生成に関わる神経活動の記録、歌分析のより詳細なモデルの構成と対応する電気活動の測定、歌の進化と言語の起源に関する仮説のまとめなどを目標として研究を行った。その主な結果は次の通りである。RAPD法およびマイクロサテライト法を用いてジュウシマツとその祖先種と思われるコシジロキンパラが同種であることを明らかにした。歌の解析から確定したチャンク構造の実在性を電気生理学的に確認する目的で、チャンク構造の異なる歌刺激に対する神経核HVcの神経応答を記録し、コラム様構造の存在を示唆する結果を得た。これまでの固定長に代わって、可変長マルコフモデルを推定するアルゴリズムを用いて、歌文法のより明瞭な遷移図の得られることを示した。

(2)澤田 誠「LTP 形成におけるミクログリアの役割の検討」

澤田研究者は、平成8から11年にかけて「知と構成」領域での研究を通して、高次脳機能発現においてミクログリアが大きな役割を担っている可能性を指摘した。また、ドラッグデリバリーシステム担体として有用な株化ミクログリアを創出した。延長期間においては、3年間の研究で構築したシステムの特性を生かしてミクログリアによる細胞間の協調による脳機能発現のメカニズムの解明と株化ミクログリアの脳疾患治療への応用に取り組んだ。主な成果は次の通りである。生体内に移入しても腫瘍化する危険性のないミクログリアの細胞株の樹立した。ミクログリアが脳に特異的な親和性をもつ細胞であることを示し、この親和性を利用して末梢血流中から特定物質や遺伝子を脳に特異的に導入できることを示した。株化ミクログリアを用い、脳選択的に外来遺伝子を導入し、活性を持つ酵素を発現させることに成功した。ミクログリアを用いて、薬物を封入したマイクロカプセルを脳内に運搬することに成功した。ミクログリアの貪食性を利用してMRI造影剤を取りこみ、脳内でのミクログリアの動態を非侵襲的に観察できる可能性を示した。

脳に導入したミクログリアそのものが神経変性を抑制する働きを持つ可能性を示した。さらに、これら「バイオターゲット技術」のヒト疾患への応用の可能性と問題点を具体的に検討した。

9. 評価者

領域総括 鈴木 良次 金沢工業大学人間情報システム研究所 所長

領域アドバイザー

安西 祐一郎 慶応義塾長
 乾 敏郎 京都大学大学院 情報学研究科 教授
 臼井 支朗 豊橋技術科学大学 情報工学系 教授
 曾我部 正博 名古屋大学大学院医学研究科 教授
 田中 啓治 理化学研究所 脳科学総合研究センター グループディレクター
 淵 一博 慶応義塾大学 理工学部 教授
 星宮 望 東北大学大学院工学研究科・工学部 教授
 三木 直正 大阪大学大学院 医学系研究科 教授
 三宅 なほみ 中京大学 情報科学研究科 教授

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	15	16
口頭	18	5	23
その他	11	0	11
合計	30	20	50

(2) 特許出願件数

国内	外国	計
0	0	0

(3) 受賞等

なし

(4) 招待講演

なし

研究課題別研究評価

事後評価報告書構成案

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：

鳥の歌の生成文法とその脳内表現

2. 研究者名：

岡ノ谷一夫

3. 研究のねらい：

平成8～11年度にかけて「知と構成」領域における研究で、ジュウシマツのさえずりが有限状態文法をなすこと、大脳の階層的な構造が有限状態文法の階層に対応すること等が判明した。2年間での延長期間における主なねらいは、ジュウシマツとその祖先種とおもわれるコシジロキンパラの遺伝的関係を解明すること、大脳の歌制御にかかわる神経核における聴覚情報の階層処理機構を解明し、破壊実験と関連づけること、同神経核の歌生成に関わる神経活動を記録すること、歌分析のより詳細なモデルを構成し、対応する電気活動を測定すること、歌の進化と言語の起源に関する仮説をまとめること、であった。

4. 研究結果：

RAPD法およびマイクロサテライト法により、ジュウシマツはコシジロキンパラと同種であることが判明した。(1) これらの方法により、さらにジュウシマツの父子鑑定が可能になり、将来の研究の進展につながった。

有限状態文法のチャンキングにかかわる脳神経核HVCおよび個々の音制御にかかわるRAにおいて聴覚反応を記録し、破壊実験と矛盾ない結果を導いた。(1,3,4,5,6)

歌生成中の個体から脳神経活動を得る技術を確立した。しかし、歌生成のアルゴリズムを解明するに至らなかった。

歌のチャンク分析にもとづき、チャンク選択性をもつ神経活動を調べた。(1)

言語の性淘汰起源説をまとめ、オックスフォード大学より出版した。(2,7)

5. 自己評価

2年間の追加研究により、階層的構造の生成と分析に関する解剖学的・生理学的な知見が整理され、「文法的構造が性淘汰で進化した」とするまったく新しい仮説を出版することができた。また、一連の研究を総括した論文が、動物行動学の最高峰の年報に出版されることとなった。こうした成果をあげることができたのは、ひとえに本制度の柔軟性のおかげである。

さらに、これまでの研究から生じた疑問を「分節化」というキーワードで捉え直し、乳幼児の音声発達と関連づけた研究を計画して、あらたに「さきがけ研究21ポスドク参加型・協調と制御領域」の一課題として採用していただいた。平成8年度に始まった研究が、内容を深めながら8年間にわたりサポートされることになり、大きな感謝と責任を感じている。

延長期間中に実現すべきテーマのひとつとして、の歌生成時の神経活動の記録があったが、これについては技術を確立したにとどまったのが、反省点として残る。新領域において新たな問題意識のもとに、このテーマを追求したいと思う。

6. 領域総括の見解：

岡ノ谷研究者は、平成8年から11年の3年間にわたって「知と構成」領域の研究者として、ジュウシマツの歌の分析と歌の生成と認識に関わる脳内機構の解析を行ってきた。その結果、ジュウシマツの歌が、有限状態文法で記述される複雑な時系列構造を持つこと、また、大脳の階層的な構造が有限状態文法の階層に対応することなどを明らかにしてきた。2年間の延長期間においては、ジュウシマツとその祖先種と思われるコシジロキンパラの遺伝的関係の解明、大脳の歌制御にかかわる神経核における聴覚情報の階層処理機構の解明、同神経核の歌生成に関わる神経活動の記録、歌分析のより詳細なモデルの構成と対応する電気活動の測定、

歌の進化と言語の起源に関する仮説のまとめなどを目標として研究を行った。この中で、コシジロキンパラがジュウシマツと同種であることを確定できたこと、可変長マルコフモデルにより確定したチャンク構造と対応する神経応答が神経核HVcから記録でき、しかも、コラム様構造が存在する可能性が示せたこと等は、歌制御に関する階層的構造の生成と分析に関する解剖学的・生理学的解明をすすめる上での着実な一歩として評価できる。一方、岡ノ谷研究者が最も主張したいことの一つである「言語の起源の性淘汰説」は、国際的な注目を惹き、実証のための基礎的研究がこの2年間でいくつか行われた。たとえば、同居によってより強度な歌選択性が雌の脳内に成立することを確かめている。しかし、実証のための本格的研究はこれからであり、新プロジェクトでの進展を期待する。

主な論文等：

Okanoya, K. (2002). Finite-state syntax in Bengalese finch songs: Tinbergen's four questions asked. *Advances in the Study of Behaviour*, 32. (掲載決定・編集作業中)。この年報は動物行動学関係の雑誌ではもっともIFが高く(3.9)、この分野の最高峰であり、日本人の研究が掲載されるのははじめてである。)

Okanoya, K. (2002). Sexual display as a syntactical vehicle: A sexual selection origin of birdsong and human language. In: A. Wray (ed.). *Transition to Language*, Oxford: Oxford University Press. 言語起源に関わる論文集で、本研究がこの分野にも大きな影響を与えたことを物語る。

3. Kobayashi, K. & Okanoya, K. Partial lesions in the anterior forebrain pathway affect song production in adult Bengalese finches. *NeuroReport*, 12, 353-358, (2001).

4. Ikebuchi, M. & Okanoya, K. Limited auditory memory for conspecific songs in a non-territorial songbird. *NeuroReport*, 11, 3915-3939, (2000).

5. Okanoya, K., Tsumaki, S. & Honda, E. Perception of temporal structures in self-generated songs by Bengalese finches (*Lonchura striata* var. *domestica*). *Journal of Comparative Psychology*, 114, 239-245, (2000).

6. Hosino, T. & Okanoya, K. Lesion of a higher-order song nucleus disrupts phrase level complexity in Bengalese finches. *NeuroReport*, 11, 2091-2095, (2000).

7. 日経新聞4月28日第26面「言語の起源に『歌う動物』」

研究課題別研究評価

1. 研究課題名：

LTP 形成におけるミクログリアの役割の検討

2. 研究者名：

澤田 誠（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

3. 研究のねらい：

さきがけ研究では脳内での細胞間の協調による高次脳機能発現を調べるために LTP 形成におけるミクログリアの役割を検討することを目的として行ない、

(1) 新生ラット大脳皮質スライス培養に単離ミクログリアを添加すると LTP 様の EPSP の増大が生じること

(2) ミクログリアの役割を動物個体レベルで検討するためのシステムとして脳特異的細胞移入技術を確立したこと

(3) ドラッグデリバリシステム担体として有用な株化ミクログリアを創出し特許申請を行ったことなどの成果を得た。今回の研究によってミクログリアの脳機能発現における役割は多岐にわたり、記憶や学習といった高次脳機能のメカニズムにまでおよぶことがわかり、脳をシステムととらえ機能発現の制御を理解する上で細胞間の協調という観点からとらえる必要があることを指摘できた。また、細胞間の協調による脳機能発現の制御について個体レベルで検討するシステムを構築することができた。

そこで、延長研究では、3年間の研究で構築することができたシステムの特性を生かしてミクログリアによる細胞間の協調による脳機能発現の制御について分子生物学的、細胞生物学的に解析するために以下のような研究を行う。

[研究の意義]

ミクログリアなどのグリア細胞が積極的に脳の機能発現を調節しているという概念はこれまでほとんど考えられてこなかった。さきがけ研究の3年間でミクログリアが少なくとも高次脳機能の調節にかかわっていることが証明できた。このことを端緒にして、さらに脳内細胞の細胞間の協調による脳機能発現の制御について研究を進めることにより、さきがけ研究で得られた成果をさらに発展させることができると考えている。

[研究計画]

(1) ミクログリアの神経可塑性調節のメカニズムを調べる

ミクログリア導入の個体レベルでの効果

脳特異的細胞移入技術を用いて動物個体にミクログリアを導入し、賢いマウスが創出できるかという観点から行動薬理的な解析をおこなってミクログリア移入の効果調べた。実際の行動解析にかかる実験システムは、痴呆モデル動物の行動解析を行っている名古屋大学医学部鍋島教授との共同研究で行うよう計画を検討した。また、行動解析終了後、事業団貸借物件の MED システムを用いて脳スライスを作成して電気生理学的に解析した。

(2) 脳疾患の細胞治療への応用

脳特異的細胞移入技術およびドラッグデリバリシステム担体として有用な株化ミクログリアを用いることによって脳疾患に対する細胞治療の有用性を判定するシステムとして利用価値がある。しかし実際に治療法として応用するにはマウスミクログリアを用いることは現実的で

ない。そこで、マウス株化ミクログリアを用いてこのシステムが実際の疾患に有用であるかを検討すると同時に、脳特異的細胞移入を規定する分子を同定し、また、ヒト治療に利用できる骨髄細胞中にミクログリアと同等の性質を持った細胞が存在するか否かを検討した。

- 1) 変性疾患モデル動物への遺伝子導入
脳虚血モデル、痴呆モデルなどにミクログリアを導入してその治療効果を検討した。
- 2) 脳特異的移入のメカニズム--ホーミング分子の単離
ミクログリア細胞膜上に発現していると考えられる脳特異的ホーミングを起こすタンパクの遺伝子をクローニングした。ミクログリア cDNA から構築したファージディスプレイライブラリーから目的分子を検索した。
- 3) 骨髄細胞中の脳移行細胞の同定とその性質の検討
マーカー遺伝子を発現している骨髄細胞を正常マウスに移植して脳に移行する細胞を同定し、さらに分離培養してその性質を調べた。

4. 研究結果：

1. はじめに - 脳疾患の治療の現状と難しさ (参考文献 1)

脳の疾患は非常に多く、従来補充療法により対処されている。しかし臓器の中で脳は血液脳関門が存在するため、末梢からの物質や細胞の浸潤がほとんどなく、薬物や遺伝子導入が困難である(図1)。実際に正常脳ではT細胞やマクロファージなどの免疫細胞の浸潤はほとんどみられない。脳の疾患を治療するためには有効な薬物や生理活性物質を脳へ選択的に導入することが必要であるが、脳に特異的な物質移送のシステムの開発には国内外の多くの研究者が取り組んでいるにもかかわらず、非侵襲的(直接脳に注入するような負担の大きい手術を伴う手技を行わない)しかも脳特異的に導入するにはいたっていない。動物個体レベルでの脳内への遺伝子導入については向神経性をもったヘルペスウイルスを用いた方法やアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを遺伝子のベクターとして用いる方法が考案され、神経細胞特異的に遺伝子を導入できるシステムが報告されている。レトロウイルスベクターを用いる方法も作成され、肝臓や血液細胞などでは成功している。また、レンチウイルスベクターを用いることによってこれまでレトロウイルスベクターでは難しいとされていた神経細胞などの非分裂性の細胞にも効率よく遺伝子導入でき、しかも高効率でタンパク質を発現させられることも報告されている。

しかし脳は血液脳関門が存在するため末梢からの投与では脳に特異的に導入することができず、したがって手術によって脳に直接注入する以外に方法がなかった。一方、手術などの侵襲的な手技を伴わない方法としてリポソームを利用する方法があり、リポソームの構成要素を変えることによって脳に比較的入りやすいものが国内のグループによって開発された。しかしこの方法でも脳への取り込みは注入量の1%程度で、脳に特異的であるとはいえない。

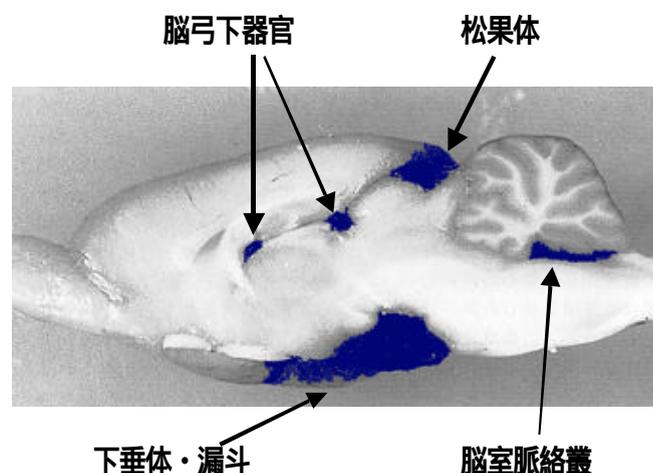


図1 ラット血液中に青い色素を注入したときの脳への浸透
下垂体などの一部の場所をのぞいてほとんど脳実質へは取り込まれない。

最近我々は新規な2つのことを発見し相次いで新聞記事として紹介された(参考文献 2,3)。その第一点は、脳に特異的な親和性をもつミクログリアの細胞株の樹立に成功し、これを末梢血管投与することにより脳に特定遺伝子を局限して発現させるシステムを確立したことである。さらにミクログリア細胞は高い貪食能を持つため、薬物や生理活性物質、タンパク質などをあらかじめ取り込ませておけば、脳に特異的な物質輸送(ドラッグデリバリー)を実現する運搬担体となりうる。一方、第二点は脳に導入したミクログリアそのものが神経変性を抑制する働きを持つことで、この点を応用することによってアルツハイマー病やパーキンソン病など治療法のない神経変性疾患の新しい治療法を開発できる可能性がでてきたことについてである。このような細胞の特殊な性質を利用して「脳特異的バイオターゲティング技術」を開発した。この技術の基本となる株化ミクログリアについては科学技術振興事業団から国内および国際特許が出願済みで、現在公開されている。

2. 脳のバイオターゲティング技術

2-1 株化ミクログリア

ミクログリアは株化細胞を分離することが難しく、これまでにがん遺伝子をもったウイルスにより形質転換して樹立した細胞とがん抑制遺伝子 p53 ノックアウトマウスから樹立した細胞が報告されているのみである。これらの細胞はマクロファージ様性質が強く、脳に移植した場合神経細胞やオリゴデンドロサイトに対する好ましくない影響が起こる可能性がある。またがん遺伝子や遺伝子変異をもっているため、細胞の増殖の調節が難しく、動物体内に注入したり移植したりした場合に腫瘍を形成する危険性が高い。これに対し我々の樹立した株化ミクログリアは増殖因子依存的に増殖し、因子非存在下では増殖能を失い分岐したミクログリアの形態(通常脳内で見られる形態)をとるため、生体内に移入しても腫瘍化する危険性はないと考えられる。もともと脳内に存在する細胞の状態に戻るため、脳内に移植または移入してもほとんど悪影響は持たないと思われる。このような性質を持つ株化ミクログリアについては科学技術振興事業団から国内および国際特許が出願済みで、現在公開されている。

2-2 脳特異的な細胞の侵入

われわれはミクログリアを貪食細胞に特異的に染色性を示す蛍光色素を用いて染色してラットの腋窩動脈に注入しそれら細胞の組織配向性を調べた。標識したミクログリアを注入した場合には脳には多くの蛍光細胞が見られたが、肝臓にはわずしか見られなかった。これに対しマクロファージを注入した場合には正常脳にはほとんど蛍光細胞が見られないが肝臓には多くの蛍光細胞が見られた。以上の結果からミクログリアはマクロファージとは異なり脳に特異的な親和性をもった細胞であること、この親和性を利用すれば末梢血流中から特定物質や遺伝子を脳に特異的に導入できることがわかった。

2-3 遺伝子運搬の担体としてのミクログリア

株化ミクログリアの一つに大腸菌由来の遺伝子である lacZ を発現するベクターを特定遺伝子発現のモデルとして導入したものをラット血流中に注入して、脳に選択的に遺伝子を発現させることができるかどうかを検討した。その結果、lacZ 発現細胞を注入したラット脳切片でその遺伝子の転写産物である -galactosidase の活性が検出できた(参考文献 4)。この酵素活性は肝臓、腎臓、脾臓、肺などの脳以外の臓器ではほとんど検出できなかった(図 2A)。すなわち、脳選択的

に外来遺伝子を導入し、活性を持つ酵素を発現させることに成功したわけである。現在までは一過性遺伝子発現導入(transient expression)法によって遺伝子を導入した株化マイクログリアを用いているが、この方法でも導入後約3週間経過しても導入2日後の約半分から3分の1程度の酵素活性の発現を示すことがわかった(図2B)。また脳に導入した細胞は1ヶ月以上経過した段階でも導入直後の細胞数とあまり変わらないことから、いったん脳内に移入した細胞は排除されることなくそのまま脳内に生着すると考えられる。

図3

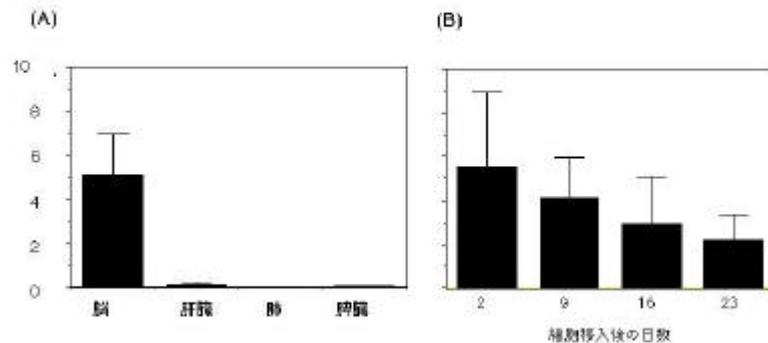


図2 lacZ 遺伝子導入した株化マイクログリアを注入した動物での β -ガラクトシダーゼ活性の検出臓器特異性。脳での活性は他の臓器の 50-100 倍であった。

(B) 脳内での導入遺伝子発現の経時変化。導入遺伝子は約3週間後でも検出できた。

2-4 薬物を封入したマイクロカプセルの脳への運搬

マイクログリアは脳に存在する貪食細胞であり、その性質を利用するとある特定の化合物を大量に取り込ませることができる。たとえば、脳内に侵入したマイクログリアの同定に用いている蛍光色素は水溶液中で会合し貪食に適した大きさの顆粒状になる。この顆粒をマイクログリアが貪食して蛍光色素標識ができるが、同様に脳に特異的に導入したい薬物についても疎水性官能基の非対称的導入によるドラッグデザインの工夫によって顆粒状に凝集させるか、リポソームなどに封入した物をマイクログリアに貪食させれば、同様に脳に特異的に導入できる。また、蛍光色素を封入したラテックスビーズを取り込ませた細胞をマウス尾静脈に注入すると、脳内にマイクログリア特異抗原で標識される細胞の中にのみ蛍光を発するビーズが観察できた。

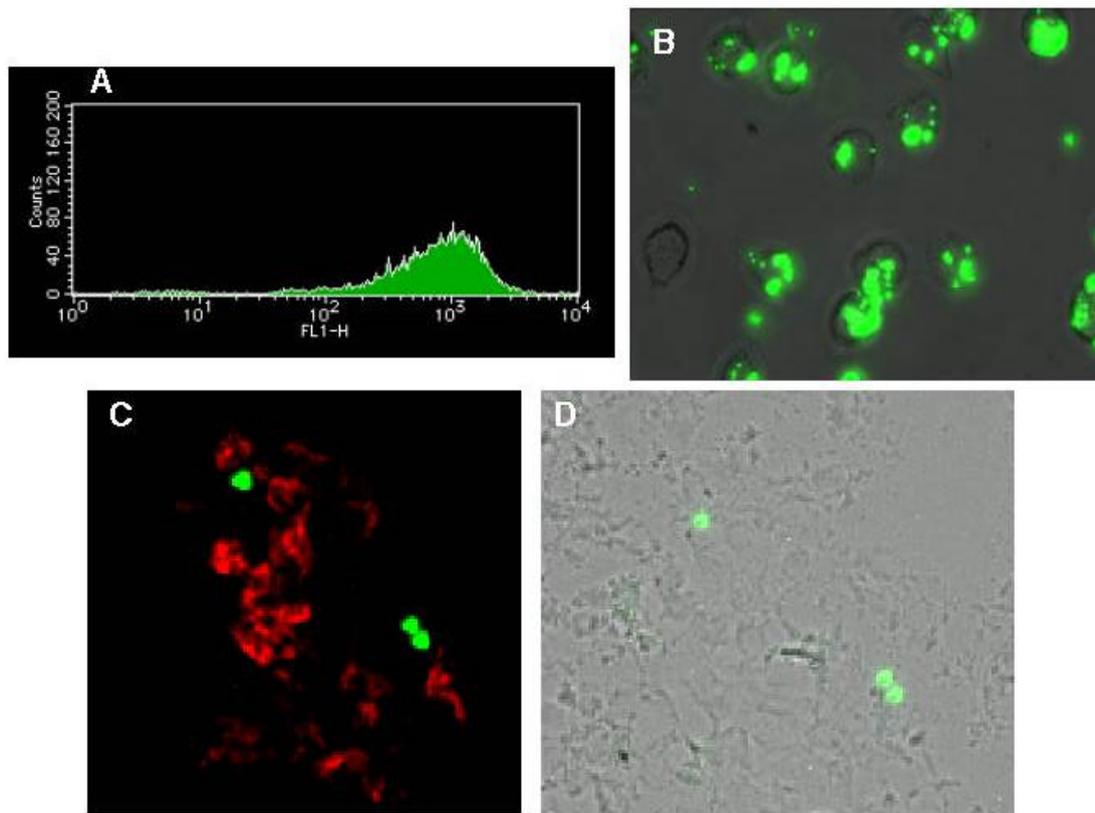


図3 (A) 蛍光ビーズを取り込ませたミクログリアの蛍光強度の測定
 (B) 蛍光ビーズを取り込ませたミクログリアの形態
 (C) 脳内にミクログリアを認識する抗体で染色できる細胞に取り込ませた蛍光ビーズが観察できた(D) C の位相差像

2-5 脳に到達した細胞のMRIによる非侵襲的モニタリング

ミクログリアの貪食性を利用してマグネタイトなどのMRI造影効果をもつ物質を取り込ませることによって脳内に導入したミクログリアの動態を非侵襲的に観察できる可能性が考えられる。実際に細胞治療を行う場合、導入した細胞の分布や動態が観察できることが望ましい。我々はラットを用いた実験により MRIを利用して脳内でマグネタイトを取り込んだ細胞が最低数千個の集団として存在すれば観察できることを確認している。

2-6 脳に移行したミクログリアの脳に対する保護作用

血管内注入することによって脳実質内に侵入したミクログリアは内在性ミクログリアのように分岐した休止型になり長期にわたって脳実質内にとどまることがわかった。それでは外来性のミクログリアは周囲の神経細胞や内在性のグリア細胞に対してどのような影響を持つのだろうか。一般的に活性化したミクログリアは神経細胞やオリゴデンドロサイトなどに対して細胞障害性に作用すると信じられているので、それらの細胞に対して変性を起こすような悪影響はないのだろうか。

ミクログリアがtoxicであるか trophicであるかについては直接脳内で調べるのが良いと思われる。そこでミクログリアによる脳のバイオターゲティングを用いて一過性前脳虚血を起こした砂ネズミで遅延性神経細胞死が見られる海馬CA1領域の錐体細胞層に標識ミクログリアを集積させ

ることを行った。この時、内在するミクログリアも海馬の広範囲に渡って集積活性化し、一過性脳虚血処理をしたが、遅延性細胞死が見られなかった例においても内在ミクログリアの集積活性化が観察できた(参考文献 5)。さらに、ミクログリアを脳内導入した場合や虚血再還流直後にミクログリアを注入した場合においては有意に CA1 錐体細胞の神経細胞死が抑制されることがわかった。したがって、このシステムで調べる限りにおいてはミクログリアは海馬 CA1 錐体細胞の虚血後にみられる 遅延性神経細胞死に対して保護的であると考えられる(参考文献 6)。

このようなミクログリアの神経細胞死に対する保護作用が脳虚血後の遅延性細胞死以外の神経変性や障害を受けていない健全な神経細胞に対してみられるかどうかは今後検討する必要があるが、少なくともミクログリアを導入したマウス脳の長期観察からは神経変性などを生じせしめているような所見は得られておらず、導入したミクログリアは周囲の脳内細胞に対して悪影響を及ぼすことはないように思える(参考文献 7)。

3. 脳のバイオターゲティング技術の展開と応用 (参考文献 8)

3-1 脳のバイオターゲティング技術の展開

本技術を実際のヒト疾患への臨床応用を行うためにはヒトの脳に特異的に侵入できる細胞を分離しなければならない。しかし、ヒトミクログリアを分離することは多くの制約があり難しく、さらに遺伝子導入が可能な株化細胞を確立することはほとんど不可能と言える。さらにヒトに注入する場合は自己非自己の問題も考えなければならない。したがって実際の技術利用においては以下のような技術展開が必要となる。

- (1) 移行性分子および遺伝子の単離とそれに基づく薬物、遺伝子、細胞の脳への標的化：ミクログリアは脳という臓器を認識してそこに侵入する分子的な機構があり、これがラットやマウス、ヒトといった種を越えてかなり共通のメカニズムで支配されている可能性があるという点に注目し、細胞株の脳に侵入するために働くタンパク質を同定してその遺伝子を分離し、ヒトの細胞、たとえば骨髄細胞または臍帯血細胞に導入すればヒト細胞を脳に特異的に移入できることになる。また、機能分子をリボソームなどの人工担体に埋め込むことによって細胞によらないドラッグデリバリーシステムを実現できると考えられる。さらに、これらの活性ペプチドを直接標的化したい薬物に結合することによって薬物そのものを脳に移行させることができる。(図 4) われわれは現在、いくつかの方法論によりこの脳に侵入するために必要な基本分子の単離について分離作業を行っている。

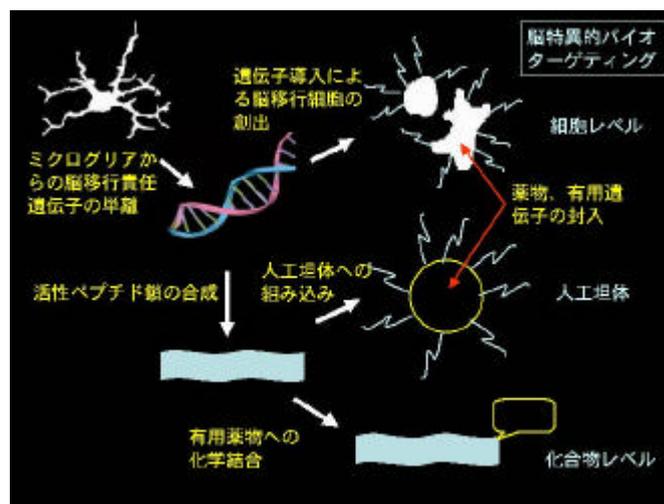


図 4 脳特異的侵入を規定する遺伝子およびシグナルペプチドの分離と脳のバイオターゲティング

- (2) ヒト臓器をバイオターゲティングする場合に実際上用いる細胞として骨髄細胞の利用が考え

られるが、骨髄移植による脳への細胞移行は報告がない。そこで GFP 恒常的発現骨髄細胞を正常マウスに移植するシステムを用いて、骨髄細胞移植における脳親和性細胞の存在やその性質について検討した。その結果、レシピエントの脳と末梢臓器において、移植骨髄細胞由来の GFP 陽性細胞が移行していることが確認できた。このとき、末梢臓器でみられる GFP 陽性細胞数はホスト細胞のレシピエント骨髄への置換率に比例して増大していたが、脳内での GFP 陽性細胞数はこの置換率には無関係であった。さらに脳と末梢臓器での GFP 陽性細胞では細胞表面の分化抗原の発現が異なり、脳における GFP 陽性細胞は、末梢臓器に比較して未分化であり通常の単球では発現しえない抗原を発現していることを見いだした。この結果から脳に移行した細胞は末梢臓器に移行した細胞とは異なり、骨髄で単球に分化してから臓器に侵入したのではなく、移植時に血流中に投与された未分化な造血系前駆細胞の一部が直接脳に侵入したと考えられる。したがって、骨髄中の造血系前駆細胞中にはミクログリアのように脳に親和性を持って侵入できる細胞が存在し、この細胞を単離培養できれば脳特異的バイオターゲティング細胞として用いることが可能となる。さらに自己の骨髄細胞または臍帯血細胞の培養細胞を用いれば自己非自己の問題も克服できる。十分にヒト疾患の治療に対して応用できる可能性があると考えている。しかし、骨髄に存在する脳に親和性を持った細胞はごく少数しか存在せず、今後この細胞の効率のよい分離法や、特異的な増殖条件等を検討する必要があると考えられる。

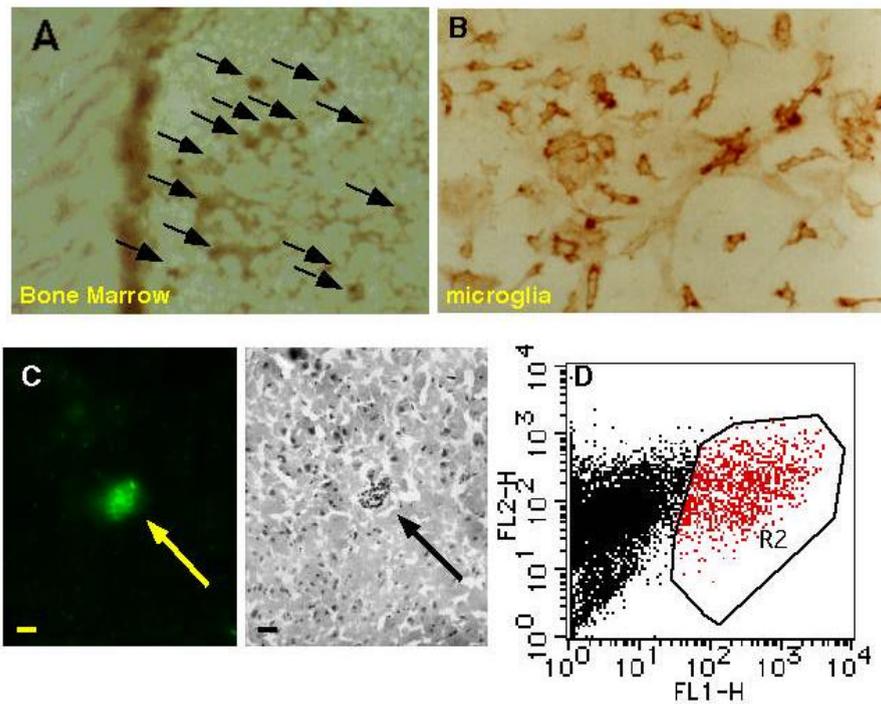


図5 (A,B) 骨髄未分化細胞 (A) とミクログリア(B)に共通に発現している分子 (C) 骨髄移植によって脳内に侵入した骨髄細胞 (D) 脳に移行する能力がある骨髄細胞の精製

3-2 脳のバイオターゲティング技術のヒト疾患への応用

我々が開発した株化ミクログリアを用いた脳をターゲティングしたドラッグデリバリシステムは細胞を用いたいわゆる cell therapy であるため、薬物などの化合物だけでなくあらかじめ目的遺伝子を細胞に導入しておくことで酵素やタンパク質を脳内で持続的に発現させることができる。したがってあらゆる脳神経疾患の治療に応用できると考えている。また、血管に注入するだけで脳に特異的に移入されるので、重篤な手術を行うことなく目的を達成できる。マウスやラ

ットでは尾静脈に注入した細胞も脳に移入できることから、ヒトの場合、静脈の点滴などでも導入できると考えられる。

脳神経疾患の治療に対しての治療戦略としては、以下の5つの場合に応用することが可能である。

- (1) 欠損または変異などによって量や活性が低下した酵素や生理活性タンパク質を補う補充療法：これは遺伝子欠損や遺伝子変異により特定の酵素またはタンパク質が脳内で欠乏することによって生じる様々な脳疾患に対し、欠乏するタンパク質や酵素の遺伝子を導入した細胞を注入することにより行われる。また、特定の神経細胞が変性脱落するパーキンソン病やアルツハイマー病に対し、神経の変性脱落により欠乏する神経伝達物質の合成を促進するような遺伝子、たとえばパーキンソン病におけるチロシン水酸化酵素やビオプテリン合成酵素などのドーパミン生合成系の酵素遺伝子が考えられる。
- (2) 変性などで脱落する神経細胞を保護し機能を強化する保護療法：変性疾患や脳虚血など色々な原因で生じる神経細胞死を抑制し、神経突起の再生を促す神経栄養因子(NGF, BDNF, GDNF, NT3 など。特にパーキンソン病では BDNF や GDNF が有効であることが近年示されている。) 遺伝子を発現する細胞を注入することが考えられる。また多発性硬化症のように免疫細胞が関与する疾患では免疫抑制作用がある TGF β や IL-10 遺伝子を発現する細胞を導入することが考えられる。
- (3) 腫瘍や血栓などを除去するような方法：抗腫瘍作用を持つ因子を発現させたり抗がん剤を導入した細胞を脳に移入したりすることが考えられる。血栓除去については線溶系の酵素を発現させることが考えられる。
- (4) 有効な薬物を脳にだけ導入するような方法：神経系に作用を持つ薬物は末梢毒性が高かったり、末梢神経系に作用を持つ物、血液脳関門を通過しにくい物など色々あり、脳への特異的なドラッグデリバリーシステムが必要とされていた。今回のシステムでは末梢臓器にあまり影響を与えず脳に特異的に薬物投与ができると考えている。
- (5) 脳疾患予防システムとしての利用法：もともとミクログリアはその細胞の性質として変性や炎症部位に集まり死細胞を取り除き損傷修復にも関わったり、抗腫瘍作用や抗ウイルス作用を持つ、いわば脳内防御システムともいふべき細胞であることから(11, 19, 20) その性質を遺伝子操作などで強化することによって単一疾患の治療だけでなく、脳内防御システムそのものの強化を行うことによってあらゆる疾患に対する予防措置にも応用しうる。

4. 脳のバイオターゲティング技術の問題点

4-1 脳の特定部分のターゲティング

担体となる細胞は理想的には脳の病変部位にだけ移入させることが望ましいが、末梢血管からの細胞投与では脳全体に広がって細胞が移入する。そこで脳動脈カテーテルを用いてミクログリアを目的とする病変部位近傍の局所脳循環に投与したり、細胞に導入する遺伝子の発現を遺伝子工学的手法によって病変部に限局して発現させることによって部位特異性をもたせられると考えている。後者の場合、活性化したミクログリアで発現する TNF α や iNOS のプロモータを用いることによって、病変部近傍に侵入して活性化したミクログリアに特異的に目的遺伝子を発現させることができると考えられる。もしくは電磁波やレーザーを使った温熱療法と組み合わせると熱ショックタンパク遺伝子プロモータで目的遺伝子を発現させられるようにしたミクログリアを導入することなども考えられる。そのほかいろいろな可能性がある。また前述したように、ミクログリアは変性や炎症部位に集まる性質を持つため、単にミクログリアの性質だけを利用するだけでも有効な治療に結びつく可能性もある。実際に前述した一過性脳虚血後の遅延性細胞死に対しては海馬錐体細胞層に外来性ミクログリアが虚血によりダメージを受けることで多く侵入し、神経細胞死を抑制することが観察された。

このような方法を単独または組み合わせて行うことによって多くの脳神経疾患の治療が可能となると考えられる。現在まだ動物実験の段階ではあるが、脳腫瘍、脳虚血、パーキンソン病やアルツハイマー病などの変性疾患、多発性硬化症、遺伝疾患であるリソゾーム蓄積症などのモデル動物に対して有効性をいくつかの医療機関との共同研究で検討している。

4-2 細胞移植上の問題点

実際のヒト疾患への応用にはいくつかの克服しなければならない問題点がある。最大の問題はヒトの脳に特異的に侵入できる細胞を分離しなければならないことである。さらにヒトに注入する場合は自己非自己の問題も考えなければならない。現在開発中の技術展開によりこれらの問題は解決できると思われる。

5. おわりに

近年の発生工学的手法の進歩によりジーンターゲティング法が確立され染色体遺伝子への欠失の導入や変異遺伝子の正常遺伝子による置換が可能になり、遺伝病などに対する遺伝子治療の可能性が一步前進した。しかしヒトを対象とする発生工学的手法の導入には倫理的問題等の難問があり、現在のところ特定の臓器に限った遺伝子導入が現実的である。

脳への選択的物質移送のシステムの開発には国内外の多くの研究者が取り組んでいるが、有効性や安全性から実際に治療に用いることは難しい。しかし今回筆者らが開発した株化マイクログリアを用いる方法は正常で脳に存在する細胞を担体に用いること、この細胞は脳以外の臓器にあまり親和性をもたないこと、継代培養ができるため遺伝子導入したクローンが分離できること、血管内注入により脳にターゲティングできることなどの多くの利点を持ち、これまでになく有用な方法であると考えられる。現時点ではなぜ細胞が脳にはいるのか、脳に対する特異性はなにによって規定されているかなどわかっていないことが多くあるが、これらの疑問点の解明とともに、今後ヒト疾患の治療に応用されるべく研究が進展していくものと期待している。

参考文献

1. 澤田誠：マイクログリア細胞株を用いた脳疾患の治療の可能性 日本医事新報, 3844:28-30, 1997.
2. 中日新聞 1996.11.1 第1面、手術なし脳治療に道、世界初の手法開発--抗がん剤や遺伝子細胞が患部に運搬
3. 中日新聞 1999.10.20 第3面、脳細胞死滅を防ぐ作用 - 藤田保健大グループマイクログリア研究 「アルツハイマー」治療に道
4. Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T.: Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. *FEBS Lett.*, 433:37-40, 1998.
5. Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Zlokovic, B.V., Kojima, J., Kuno, S., Nagatsu, T., Nitatori, T., Uchiyama, Y., Kanno, T. : Exogenous microglia enter the brain and migrate into ischaemic hippocampal lesions. *Neurosci. Lett.* 272, 127-130, 1999.
6. Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Kanno, T.: Brain specific migration and protective roles in ischemic brain lesion of microglia. *Rev. Neurol. IV th Eur Meeting of Glial Cell Function in Health and Disease.* 78, 2000.
7. 澤田誠：マイクログリアの新規な性質と脳での役割—マイクログリアは脳でなにをしているか。細胞工学 18: 550-558,1999.
8. 澤田誠：マイクログリア細胞を用いた脳疾患の治療戦略。神経進歩 45: 63-72, 2001.

5. 自己評価

今回の延長研究においては、前のさきがけ研究において研究させていただいた時にその可能性について考察したミクログリアの新たな有用な性質について、その可能性の一部を証明できたことが大いに有意義であったと考えています。前研究では神経伝達に特化したミクログリアの性質を調べることに、またその研究のための新しい技術を開発することを目的に行いましたが、今回はもっと広範囲な応用について研究することができました。その結果、ミクログリアを用いた脳のバイオターゲティングシステムを構築することができ、さらに、その応用としてヒトの細胞治療に応用するための脳移行性責任遺伝子の候補遺伝子断片をクローニングできたこと、また、骨髄細胞中にもミクログリアと同様な脳移行性を持った細胞が存在することが証明できたことなど、研究の幅を広げることができました。実用化という点でも今回の延長研究の成果をさらに追求することによりいくつかの遺伝子や方法論など研究の中から実用化できる対象をはっきりと絞ることができ、有意義であったと思います。これらを権利化することによって更に実用化を目指した研究に発展できると考えています。

さきがけ研究では文部科学省の科学研究費などのほかの研究費とことなり、自由度が高いこと、物品購入や会計などのサポートの業務を領域事務所が負担して下さること、そのほか領域会議やシンポジウムで情報交換ができることなど、個人研究を行う上での最良の条件を設定していただけるよいシステムだと思います。このシステムのサポートによって今回のような成果が出せたことは大変うれしく思いますと同時に、すべての面に関わってくださった領域事務所のみなさま、JST 個人研究推進室のみなさま、評価委員の諸先生方に心より感謝いたします。

6. 領域総括の見解：

澤田研究者は、平成8年から11年にかけて「知と構成」領域での研究を通して、高次脳機能発現に関わる神経可塑性においてミクログリアが大きな役割を担っている可能性を指摘した。また、ドラッグデリバリーシステム担体として有用な株化ミクログリアを創出した。延長期間においては(1)ミクログリアによる神経可塑性調節のメカニズムの解明と(2)株化ミクログリアの脳疾患治療への応用を目標として研究に取り組んだ。(1)については、必ずしも、十分な進捗がみられたとはいえないが、(2)については、2年間の延長によって、大きな成果が得られている。脳に特異的な親和性をもつミクログリアの細胞株の樹立に成功し、これを末梢血管投与することにより、脳に特定遺伝子を局限して発現させるシステムを確立した。また、脳に導入したミクログリアそのものが神経変性を抑制する働きを持つことを明らかにした。これらの成果は、脳腫瘍、脳虚血、パーキンソン病、アルツハイマー病など脳疾患の治療に大きな道を開いたものとして高く評価される。澤田研究者は、株化ミクログリアの特殊な性質を利用しての特異的な物質輸送を「脳特異的バイオターゲティング技術」と呼んでいるが、これはわが国から発信した新しい技術であり、今後の展開を期待したい。

7. 主な論文等：

【学術論文】

- (1) Suzuki, H., Imai, F., Kanno, T., Sawada, M.: Preservation of neurotrophin expression in microglia that migrate into the gerbil's brain across the blood brain barrier. *Neurosci. Lett.* 312: 95-98, 2001.
- (2) Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., Nukina, N.: α -Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* 77; 239-252, 2001.
- (3) Katoh, Y., Niimi, M., Yamamoto, Y., Kawamura, T., Morimoto-Ishizuka, T., Sawada, M., Takemori, H., Yamatodani, A.: Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci. Lett.* 305; 181-184, 2001.

- (4) Ishiguro, H., Yamada, K., Sawada, H., Nishii, K., Ichino, N., Sawada, M., et al (other 7 persons): Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene. *J. Neurosci. Res.* 65; 289-297, 2001.
- (5) Imamura, K., Sawada, M., Ozaki, N., Naito, H., Iwata, N., Ishihara, R., Takeuchi, T., Shibayama, H.: Activation mechanism of brain microglia in patients with diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a comparison with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 15; 45-50, 2001.
- (6) Morihata, H., Kawawaki, J., Sakai, H., Sawada, M., Tsutada, T., Kuno, M.: Temporal fluctuations of voltage-gated proton currents in rat spinal microglia via pH-dependent and -independent mechanisms, *Neurosci. Res.* 38; 265-271, 2000.
- (7) Kanzawa, T., Sawada, M., Kato, K., Yamamoto, K., Mori, H., Tanaka, R.: Distinctive regulation of antigen presentation by different type of murine microglial clones. *J. Neurosci. Res.* 62; 383-388, 2000.
- (8) Hasegawa, Y., Sawada, M., Ozaki, N., Inagaki, T., Suzumura, A.: Increased soluble tumor necrosis factor receptor levels in the serum of elderly people. *Gerontology*, 46; 185-188, 2000.
- (9) Hasegawa, Y., Inagaki, T., Sawada, M., Suzumura, A.: Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 101; 159-164, 2000.
- (10) 澤田誠: ミクログリア細胞を用いた脳疾患の治療戦略 *神経研究の進歩* 45:63-72, 2001.

【学会発表】

[国内学会・会議・シンポジウム・特別講演]

- (1) Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H. (2001) Brain-Specific Migration and Protective Roles in Brain Damage of Microglia; A New Therapeutic Approach for Catecholamine Neuronal Dysfunctions. 9th International Catecholamine Symposium. Kyoto, March 31-April 5.
- (2) Sawada, M. (2001) Neurotoxic vs Neurotrophic Effects of Microglia. 8 th MPO Meeting, Yokohama, Oct 14-15.
- (3) Imai, F., Sawada, M., Suzuki, H., Ninomiya, T., Kanno, T. (2000) Development of Brain-Targeted Cell Therapy Using Microglia as a Vehicle. 12th World Congress of Neurosurgery, Sydney, September 16-20.
- (4) Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Kanno, T. (2000) Brain-Specific Migration and Protective Roles in Ischemic Brain Lesion of Microglia. IV European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Barcelona, May 24-27.
- (5) Sawada, M. (2000) Identification of novel characteristics and possible origin of microglia. Int MPO Meeting, Atami, June 25-26.
- (6) 澤田誠 (2001) ミクログリアによる脳特異的遺伝子導入 (特別講演) 第5回活性アミンシンポジウム、東京 8月24日
- (7) 澤田誠 (2001) 脳疾患における脳内免疫反応: ミクログリア活性化の意味 (シンポジウム) 第2回日本分子脳神経外科学会、名古屋、9月7-8日
- (8) 澤田誠 (2001) 脳特異性バイオターゲティング技術 (シンポジウム) 第3回 国際新技術フェア 2001、東京、11月13-15日
- (9) 小野健治、田中謙二、瀧井猛将、小野崎菊夫、澤田誠 (2001) 骨髄由来脳移行細胞の性質、第74回日本生化学会大会、京都 October 25-28.
- (10) 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2001) 脳虚血におけるミクログリアの神経細胞に

- 対する保護作用、第 74 回日本生化学会大会、京都 October 25-28.
- (11) 小野健治、田中謙二、瀧井猛将、小野崎菊夫、澤田誠 (2001) 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学 合同大会 (Neuro2001) 京都, Sep, 26-28
- (12) 田中謙二; 鹿島晴雄; 川上真紀子; 澤田誠 (2001) ミクログリアはモノアミントランスポーターとカテコラミン代謝能を持つ 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学 合同大会 (Neuro2001) 京都, Sep, 26-28
- (13) 小野健治、田中謙二、瀧井猛将、小野崎菊夫、澤田誠 (2001) 骨髄由来脳移行細胞の性質、第 27 回東海遺伝子医療研究会、名古屋、2 月 9 日
- (14) 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2001) 脳虚血におけるミクログリアの神経細胞に対する保護作用、第 27 回東海遺伝子医療研究会、名古屋、2 月 9 日
- (15) 澤田誠 (2000) ミクログリアの新規な性質と細胞起源 (シンポジウム) 第 43 回日本神経化学会、金沢、Oct 18-20.
- (16) 澤田誠 (2000) 細胞を使って脳の疾患を治療する (特別講演) Cell Biology Meeting 2000, 修善寺 July, 1-2.
- (17) 小野健治、瀧井猛将、小野崎菊夫、澤田誠 (2000) 骨髄キメラマウスでの脳移行性細胞の解析、第 73 回日本生化学会大会、横浜 October 11-14.
- (18) 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2000) 脳虚血におけるミクログリアの神経細胞に対する保護作用、第 73 回日本生化学会大会、横浜 October 11-14.
- (19) 山田晃司, 澤田 誠, 他 10 名(2000)ハンチントン病モデルマウスを用いた CAG リピートの不安定性に関する研究、」第 73 回日本生化学会大会、横浜 October 11-14.
- (20) 鈴木弘美、今井文博、神野哲夫、澤田誠 (2000) 脳虚血におけるミクログリアの神経細胞に対する保護作用、第 43 回日本神経化学会、金沢、Oct 18-20.
- (21) 田中謙二、澤田 誠、鹿島晴雄(2000)ミクログリアのカテコラミン受容体、第 43 回日本神経化学会、金沢、Oct 18-20.
- (22) 澤田浩秀, 澤田誠, 他 10 名(2000) ハンチントン病モデルマウスを用いた神経病理組織学的検討, 第 23 回 日本神経科学大会, 第 10 回 日本神経回路学会 合同大会
- (23) 澤田浩秀, 澤田 誠, 他 6 名 (2000)モデルマウスを用いたハンチントン病の発症機構解明に関する研究、第 64 回 生化学会 中部支部会、名古屋、5 月 13 日

取材報告

- (1) 時事通信社産業部 湯川 鶴章 (平成 13 年 11 月 14 日) ミクログリアの脳特異的侵入と神経疾患への治療への応用の可能性、特許の詳細、実用化の時期、方法など

【報道】

- ・ 中日新聞 2001.11.16 第 3 面、脳に薬剤運ぶ細胞増殖法の開発成功 — 藤田保健衛生大の澤田教授
- ・ 神戸新聞 2001.11.16 第 3 面、脳に薬はこぶ細胞増殖 愛知の大学教授が開発、幹部に直接作用
- ・ 北海道新聞 2001.11.16 ミクログリア、運びや細胞増殖に成功 — まるでミクロの決死圏、血管通り薬剤を直接脳疾患部へ
- ・ 長野日報 2001.11.16 脳疾患治療に道開く、薬はこぶバイオ技術開発 — 藤田保健大澤田教授、国際特許を申請
- ・ 日本工業新聞 2001.11.19 脳に薬を効率運搬、藤田保健衛生大がバイオ技術、痴呆治療などに道開く
- ・ インターネットニュース 2 件

- Yahoo! Japan ホットニュース 2001.11.16
- 時事通信 HP ニュース速報 2001.11.16

- 選択出版 山本、フリーライター 森山和道(平成 13 年 12 月 5 日)研究室見学、写真撮影、研究者としての背景、これまでの研究の概要、現在の研究内容(ミクログリアの脳特異的侵入と神経疾患への治療への応用の可能性、特許の詳細、実用化の時期、方法など)雑誌「選択」平成 14 年 2 月号 Sci&Tech Frontier エウレカ 21 12 回「脳の掃除屋は芸達者」