

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

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

21世紀の初頭には、我が国は超高齢化社会に突入し老人性痴呆、神経変性疾患、脳虚血・梗塞等で悩む人が激増するであろう（脳神経細胞は分裂を終えた細胞で、一旦傷害されると死滅し、成人以後は1日につき10～20万個の脳細胞が死滅しているとも算定されている）。障害された脳機能を積極的に再建する手段として脳細胞移植が注目され、すでに臨床に応用され一定の成果をあげている。しかし、脳細胞移植の最大のネックは移植に用いるドナー細胞の確保である。我が国では流産ヒト胎児組織をドナー細胞として応用することについては未だコンセンサスがえられていないので、諸外国に比べ大きな遅れをとっている（米国ではすでにヒト脳からえた細胞を株化し、その移植によるパーキンソン病及び脳梗塞の治療が始まりつつある）。

本研究では、パーキンソン病、ハンチントン病、脳梗塞の治療のために適用することができるドナー細胞を開発する方法を確立すること、そしてそれらを脳細胞移植に用いて、障害された脳機能を改善するための脳細胞移植法を確立することを目標とする。

第I期3年間では①神経幹細胞の分離、増殖及び分化制御法の開発とviral vectorによる目的とする遺伝子導入により、ドナー細胞として適する細胞の開発をめざす。また平行して②自然界の細胞及び株細胞を用い、移植後の生着率の向上、長期の安定な発現等移植方法の改良を行う。第II期2年間には、③幹細胞から目的とするニューロンやグリア細胞への分化誘導システム及び移植システムの確立、④前臨床段階として大型動物（ブタ、サル）を用いた検証、⑤臨床における移植細胞の生着と機能発現の評価法の確立をめざす。そしてこれらの総合成果として、⑥「幹細胞からドナー細胞への確立が全く安全であり、また大変大きな成果をもたらすこと」、を何人にも充分納得のいくデータでもって示す。これにより将来、人工中絶ヒト胎児組織がドナー細胞として用いられる際の倫理的課題及び体制的課題の解決のための基礎を築くことを目指す。

2. 研究内容及び目標

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（東京理科大学基礎工学部）

マウス胎仔脳より神経幹細胞を分離し、その株化、亜株化の樹立を行う。これにマーカー遺伝子を導入して標識する方法を確立する。これらを脳内に移植すると、移植細胞と移植環境との相互関係から生着、発達、可塑性の程度が異なると考えられる。これらの中から神経細胞に最もよく分化・発達するものを選別しドナー細胞とする。

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（大阪大学大学院医学研究科附属バイオメディカル教育研究センター）

神経幹細胞特異プロモーター制御下でGFPを発現させる手法を用いてトランスジェニックマウス及びヒト胎児脳組織より、幹細胞をFACSによって分離する。細胞表面マーカーの検索により神経幹細胞の多様性を解析し、分類法を確立する。そして神経変性疾患（パーキンソン病やハンチントン病）の治療の応用に適した神経幹細胞の分離・培養・移植法を確立する。

③ マウスES細胞からの神経幹細胞の形成に関する研究（理化学研究所）

培養下で、マウスES細胞より神経幹細胞を形成するための条件を確立し、その形成過程を制御する因子の解明をする。このES細胞よりえられた未熟な神経幹細胞を脳内に移植し、多様な神経細胞に分化する過程を解析し明らかにする。これによって、ES細胞から神経幹細胞を経て神経細胞（ドナー細胞）の開発を目指す。

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（慶應義塾大学医学部）

マウス、ラット、中型ヨークシャーブタ胎仔中脳脳部神経板組織由来神経幹細胞の生物学的特徴とその修飾因子を解析する。このマウス由来あるいはブタ由来の神経幹細胞を疾患モデルラット脳内に移植する異種脳移植技術を確立する。そしてヒトへの臨床応用可能な人工代用神経細胞ドナー（トランスジェニック神経幹細胞）の樹立をめざす。

⑤ 羊膜細胞からの神経幹細胞の同定、分離法の確立及びその脳内移植に関する研究（国立精神・神経センター）

神経幹細胞マーカー遺伝子を発現している羊膜細胞（ヒト及び動物の出産時あるいは妊娠中絶時にえた羊膜より調節）を単離し、ニューロンやグリアへの分化誘導を操作するシステムを開発する。また羊膜細胞が分泌する新しい神経栄養因子あるいは初期分化誘導因子の同定をめざす。THプロモーター活性をもつ（ドパミン細胞になりえる）羊膜細胞あるいは神経幹細胞を脳内移植し、パーキンソン病あるいは脳梗塞の障害脳機能の再建をめざす。

⑥ 遺伝子操作マウス由来脳神経幹細胞の樹立と脳神経変性疾患細胞治療モデルの確立（東京医科歯科大学）

正常及び各種遺伝子操作（KO）マウスから神経幹細胞を樹立し、その増殖、分化、接着、移動における各遺伝子の機能を解析し明らかにする。これらの神経系幹細胞を脳障害マウスに移植し、神経変性及び神経細胞死の修復・治療法を確立する。

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）（13年度より参加）

神経幹細胞を、ソニックヘッジホッグ、FGF8、テネシンおよびL1を用いてドーパミンニューロンへと分化誘導する条件を確立する。そして分化誘導した細胞をパーキンソン病モデル動物に移植して、パーキンソン病の治療法を開発する。

（新規参加理由：平成11、12年度は共同研究員であったが、平成13年度より1.移植に用いるドナー細胞の開発に関する研究、(1)幹細胞の制御に関する研究を、より発展させるため研究機関（リエゾン）に加わる。）

(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（理化学研究所）

*LacZ*あるいはGFPを発現するAVベクター、*Mash-1*などの分化・発生に関与する因子を発現するAVベクター及び神経幹細胞に特異的に遺伝子を発現させることができるAVベクターを作成する。これらを用いて神経上皮細胞及び神経幹細胞の発生・分化過程を*in vitro*及び*in vivo*で解析する。一方、Prosomerを構成する遺伝子(*Mash-1*など)を過剰発現させることによって遺伝子発現パターンを乱した際の中脳神経系の形成と発達を解析する。これらにより幹細胞の操作、分化誘導因子の操作の有用性と安全性を明らかにする。

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（自治医科大学）

GFPや*LacZ*などのマーカー遺伝子及び増殖・分化に関する遺伝子を組み込んだAAVを作成し、これらを神経幹細胞へ感染させて遺伝子導入し幹細胞の分離・同定を行う。そしてその増殖・分化への影響を明らかにする。これにより神経幹細胞からドーパミンニューロンへ分化・誘導する方法を確立する。えられたドーパミンニューロンをラット脳内及びサル脳内に移植し、*in vivo*の解析より安全なドナー細胞の選別を行う。

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（名古屋市立大学医学部）

ラット中脳腹側部より神経幹細胞を調整し、成長因子、分子誘導因子、線条体環境因子等を用いてドーパミンニュー

ロンへ分化させる手立てを開発する。一方高力価レトロウイルスベクターを調整しこれを用いてTH遺伝子、FGF及びGDNF遺伝子を神経幹細胞に導入する。分化誘導後、疾患モデル動物（パーキンソン病一、ハンチントン病一、虚血一モデル動物）脳内に移植し、機能再建をもたらす細胞を選別して、ドナー細胞として確立する。

④ 高力価レトロウイルスベクターの作製と移植ドナー細胞開発への応用に関する研究（東京薬科大学薬学部）（13年度より参加）

高力価レトロウイルスベクターを用いて中脳神経幹細胞に効率良くTH遺伝子を導入することによってドーパミン産生ニューロンを調整し、移植ドナー細胞として確立する。

（新規参加理由：名古屋市立大学の共同研究者であったが、平成13年度より東京薬科大学薬学部教授として研究室を構え、従来の研究を継続発展させる。）

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再建に関する研究（岡山大学医学部）

PC12細胞にTH遺伝子を組み込み、より多くのドーパ、ドーパミンを産生する細胞株を作成し、高分子半透膜製カプセルに封入後パーキンソン病モデル動物に移植し、機能改善させる。この方法をパーキンソン病の治療法として確立する。同様にGDNF遺伝子を組み込んだ細胞株のカプセル化移植法をめざす。このように異種細胞由来であっても、免疫抑制剤なしに長期に障害脳機能を再建する移植法を確立し、虚血脳障害に対しても適応できることをめざす。

② ドナー・ホスト相互作用及び機能評価に関する研究（味の素中央研究所）

神経幹細胞の分化修飾過程をアクチビン/フォリスタチンの脳内局在性から解析するための条件設定を行う。また機能型MRIで高解像分解能をえるための手法の開発を行う。これらを用いて移植ドナー細胞と宿主脳の相互作用を解析する。そして成長因子、栄養因子、サイトカイン、分化誘導因子等の発現と機能改善との関連を評価する。

(2) 臨床脳神経移植法の改良及び開発に関する研究

① パーキンソン病、ハンチントン病及び脳梗塞に対する脳細胞移植治療法の開発に関する研究（和歌山県立医科大学）

パーキンソン病モデル動物へのドーパミン細胞移植時にGDNFの同時注入あるいはGDNF遺伝子を導入した細胞の同時移植を行い、神経線維の伸長と神経回路の形成を促進させ機能の回復を高める。この方法を、現在既に行っているパーキンソン病への自家交感神経節移植にも適応し、臨床神経移植における治療成績を向上させる。これらの成果のもとに、ハンチントン病及び限局した脳梗塞に対する臨床神経移植法の開発をめざす。一方人工中絶ヒト胎児脳細胞の特性の解析を通して、胎児組織を活用することの必

要性, 安全性, 重要性を明らかにする。

3. 年次計画

本プロジェクトでは, 21 世紀の超高齢化社会において, 益々深刻となることが予想される神経変性疾患 (パーキンソン病, ハンチントン病) 及び脳虚血・梗塞の治療のために適用することができるドナー細胞を開発する方法を確立すること, そしてえられたドナー細胞を脳細胞移植に用いて, 障害された脳機能を改善するための脳細胞移植法を確立することを目標とする。

第Ⅰ期では, ①マウス, ラット, ブタ脳及び羊膜組織より, 神経幹細胞及び ES 細胞を分離し, その増殖と分化過程を解析し, 種々のニューロンへ分化制御させるための諸条件を解析する。② Viral vector を用いて TH 遺伝子, GDNF 遺伝子等を神経幹細胞に導入し, トランスミター及び栄養因子活性の上昇した神経幹細胞や神経細胞を得る。

この①②によってドナー細胞として有用な細胞を開発することを目標とする。一方, ③自然界の細胞及び株細胞を用いパーキンソン病モデル動物及びヒト脳への神経移植を行い機能の改善をめざす。この時, ドナー細胞の活性化, ドナー細胞のカプセル化, ホスト脳細胞の活性化等, 移植方法の改良や機能評価法の改良を行い, より良い機能再建を得る方法を開発することを目標とする。第Ⅱ期では, ①神経幹細胞及び ES 細胞から目的とする神経細胞やグリア細胞への分化過程を種々の方法を用いて解析し, その分化誘導システムを確立することを目標とする。②神経幹細胞から分化された神経細胞及び遺伝子導入後神経細胞に分化させた細胞を, 前臨床段階として大動物 (ブタ, サル) に移植し, その有用性を検証することを目標とする。さらに③将来の人工流産ヒト胎児の活用 (同種移植) についてのコンセンサスの形成を目標とする。

研究項目	11 年度	12 年度	13 年度	14 年度	15 年度
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	脳由来株細胞の特性と株化	初代細胞および株細胞の標識とマウス胎仔・成体脳移植の研究		適正な移植ドナー株細胞と移植環境条件の相互関係の理解	
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に関する研究	神経幹細胞の分離のための基礎技術の開発	神経細胞の多様性の理解と分類法の開発		神経変性疾患への応用に適した神経幹細胞の分類・培養・移植法の確立	
③ マウス ES 細胞からの神経幹細胞の形成に関する研究	マウス ES 細胞の神経系細胞への分化誘導条件	ES 細胞より神経幹細胞への形成過程の制御因子の解明		ES 細胞由来神経幹細胞の脳内移植後の分化・発達の解析	
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の解析	中脳由来神経幹細胞の生物学的特徴の把握と修飾因子	神経幹細胞の異種脳内への移植技術の開発		人工代用神経細胞ドナー (トランスジェニック動物神経幹細胞) の開発	
⑤ 羊膜細胞からの神経幹細胞の同定, 分離法の確立及びその脳内移植に関する研究	羊膜細胞及び神経幹細胞及び TH プロモーター活性をもつ細胞の同定分離	羊膜細胞から神経幹細胞単一クローンの分類とモデル動物脳への移植及び羊膜細胞由来神経栄養因子の分離		ニューロン及びグリアへの分化誘導システムの確立, 及びパーキンソン病, 脳梗塞患者への移植による機能の再建	
⑥ 正常及び遺伝子操作マウス由来神経系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	正常及び遺伝子操作マウス神経幹細胞の樹立とその増殖・分化移動に対する myosin 遺伝子の機能の解析	培養脳切片, 培養マウス胎仔, 子宮内胎仔に神経系幹細胞を移植し, 細胞の分裂, 分化, 接着, 移動に対する各遺伝子の機能の解析		樹立した神経幹細胞を脳障害モデルマウスに移植し, 神経変性, 細胞死を修復する方法を確立する。	
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開発に関する研究					

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
(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	<i>LacZ, GFP, Mash-1</i> を発現するAVベクターの作成と神経発生の解析	神経幹細胞に特異的に遺伝子発現させるAVベクターの作成と幹細胞の分化・発達の解析		中枢神経系の形成とProsomer遺伝子群の相互関係の理解	
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する研究	AVでマーカー遺伝子を導入した神経幹細胞の分離・同定・分化の解析	増殖・分化誘導遺伝子によるドパミンニューロンへの分化の誘導		ラット及びサル脳への移植による安全なドナー細胞の選別	
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	ラット中脳神経幹細胞をドパミンニューロンに分化させる条件の解析とRVベクター調整	高力価RVベクターを用いたTH, FGF, GDNF遺伝子の導入と、その分化の誘導		ラット及びサルのパーキンソン病、ハンチントン病及び梗塞モデルへの移植による機能再建	
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					
④ 高力価レトロウイルスベクターの作製と移植ドナー細胞開発への応用に関する研究					
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	TH遺伝子を組み込んだPC12細胞のカプセル化移植による機能再建	GDNF遺伝子を組み込んだ細胞株のカプセル化移植によるパーキンソン病及び梗塞モデル動物の機能再建		カプセル化異種細胞株移植による機能再建法の確立	
① カプセル化細胞脳内移植による障害脳機能再建に関する研究	アクチビン及びフォリスタチンの脳内局在の解析とfMRI高分解能の開発	移植細胞と宿主脳の相互作用の解析		分化誘導システムの開発と機能評価システムの確立	
② ドナー・宿主相互作用及び機能評価に関する研究					
(2) 臨床脳神経移植法の改善及び開発に関する研究	移植ドパミン細胞の活性化の研究	ハンチントン病動物モデルへの移植及びパーキンソン病患者への自家交感神経節移植の成果の向上		ヒト胎児脳組織細胞の特性の解析とその活用についての研究	
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					
所要経費(合計)	171百万円	171百万円	178百万円		

4. 平成13年度における実施内容と達成目標

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

実施内容：1. 樹立した神経系幹細胞株の培養系における分化・増殖の制御法を確立する。2. 引き続き株細胞の解析を行い、移植に適した細胞株を選択し、亜株を更に樹立する。3. 胎仔脳に移植した細胞の表現型を解析する。

達成目標：樹立した神経系幹細胞株を未分化に保つ培養条件を確立し、さらにマーカー遺伝子を導入し亜株を樹立する。

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

実施内容：Tyrosin hydroxylaseあるいはnestin遺伝子のプロモーター制御下でEGFP遺伝子が発現するES細胞を樹立する。このES細胞から、PA-6をfeeder layerとした*in vitro*分化系を用いて、ドパミンニューロン

や神経幹細胞を誘導・生産し、FACSによって分離精製する。分離した神経幹細胞およびドーパミンニューロンをパーキンソンモデルラットの線条体へ移植し、治療効果を行動学的に解析する。神経幹細胞およびドーパミン神経細胞に特異的に発現する細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製する。神経幹細胞およびドーパミン神経細胞で特異的に発現する遺伝子をDNAマイクロアレイを用いたスクリーニングによって同定する。

達成目標：ES細胞より分離した神経幹細胞の*in vitro*および*in vivo*におけるドーパミンニューロンへの分化能力について検討する。また神経幹細胞のより精密な分類・分離を目指して特異的に発現する遺伝子の同定および細胞表面抗原に対する抗体の作製を継続する。

③ マウスES細胞からの神経幹細胞の形成に関する研究

実施内容：ES細胞から、EGF依存性の幹細胞をコンスタントに得られるようになった。その幹細胞からアストロサイトではなく、高頻度に神経細胞に分化させる条件を確立する。そしてどのような神経細胞に分化できるかを解析する。またより未熟幹細胞と考えられるbFGF依存性幹細胞をES細胞から形成する技術を開発する。

達成目標：EGF依存性幹細胞を高頻度に神経細胞に分化させる方法の確立とそれがいかなる神経細胞に分化できるかの解析。

bFGF依存性幹細胞など、より未熟幹細胞のES細胞からの形成技術の開発。

④ トランスジェニック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

実施内容：ラット、マウス、ブタ中脳脳部神経板由来神経幹細胞に対する各種神経栄養因子(FGF, EGF, NGF, BDNF, NT-3, PDGF, CNTF, LIF等)の効果について検討する。脳損傷時に周囲脳組織内に発現する各種サイトカイン(IL-1 β , IL-6等)の培養中脳脳部神経板由来神経幹細胞への効果について検討する。脳梗塞作成後経時的(梗塞作成後1日目, 3日目, 7日目, 21日目)に移植を行い、脳損傷後のいかなる時期に移植を行うのが良いかについて解明する。

達成目標：ラット、マウスに加え、ブタ中脳脳部神経板由来細胞の生物学的特徴を*in vitro*, *in vivo*両面から解明し、ヒト損傷脳への最適な移植ドナーを樹立する事を目標とする。

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

実施内容：羊膜幹細胞を無血清培地で培養すると、neurosphere類似の羊膜スフェロイドが作成される。そこで、この羊膜スフェロイドの性質を検討し、羊膜幹細胞の分離と同定を行う。

達成目標：羊膜幹細胞の同定と神経系細胞への分化制御の研究を行う。羊膜に存在していると予想される神経幹細胞

類似の羊膜幹細胞を分離培養し、ニューロンやグリア細胞への分化制御を試みる。そして動物実験により脳移植への有効なドナー細胞であることを立証する。

⑥ 正常およ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

実施内容：発生・再生時の神経幹細胞の組織形成を解明するため、NMHC-Bミオシン欠損マウスおよびEGFP発現マウスから樹立した神経幹細胞を、胎児・神経組織培養装置および蛍光顕微鏡組織培養装置を用いて神経組織に移植し、培養条件下で連続的に顕微鏡解析し、神経幹細胞が宿主神経組織に生着し、分裂、分化、移動し、組織形成する過程を解析する。

達成目標：発生・再生過程において神経系各部位の神経幹細胞を培養条件下で神経組織に移植し、各神経幹細胞の部位特異性とその可塑性を確定する。移植した神経幹細胞が宿主神経組織に生着し、分裂、分化、移動し、組織形成するための至適条件を確立する。

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

実施内容：FGF8, テネンシンおよびL1のcDNAを2種類の自己増殖型ベクターを用いて293T細胞に導入し、リコンビナント因子を発現させる。その後、リコンビナント因子の精製をおこなう。神経幹細胞をマウスから分離し、各種のリコンビナント因子の存在下で培養して、蛍光抗体法により、ドーパミンニューロンを検出する。

達成目標：一過的に、もしくは恒常的に、活性型リコンビナント因子(FGF8, テネンシンおよびL1)を培地中に高濃度で分泌するシステムを構築する。その後精製を試み、純化した活性型因子を得る。この活性型因子を用いて、種々の組み合わせ、および種々のタイミングで神経幹細胞を処理するこより、ドーパミンニューロンの誘導を試みる。

(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する分化誘導因子の機能に関する研究

実施内容：神経発生に関与する遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作製する。このアデノウイルスベクターをマウス胎仔脳へ注入し、神経発生の初期過程を解析する。

達成目標：生体内における神経幹細胞から神経細胞への発生・分化機構を明らかにする。

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

実施内容：ES細胞から神経細胞を分化させる培養系において、分化誘導因子やドーパミン合成系の酵素を発現するAAVベクターを使用することにより、効率よくドーパミン細胞を作製する方法を確立する。MPTPによるパーキンソン病モデルサルを使用して、遺伝子導入・細胞移植を行うための定位脳手術、行動解析、*in vivo* dialysisなどの

技術を確立する。

達成目標：パーキンソン病の細胞移植による治療を目標として、AAVベクターを使用してES細胞から効率よくドパミン神経細胞を作製する方法を開発する。また、MPTPモデルサルを使用して細胞移植に必要な定位脳手術や行動評価法を確立する。

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と移植ドナー細胞の開発に関する研究

実施内容：1. 中脳由来神経幹細胞をドパミンニューロンへ分化誘導させる新規および既存因子を解析する。2. ラットおよびサルの骨髄支持細胞を培養し、ニューロンとくにドパミン系神経へと分化誘導させる条件を検討する。3. 神経幹細胞を脳内移植した後により効率良くTH遺伝子発現が行われる方法を検討する。

達成目標：1. 中脳由来神経幹細胞をドパミンニューロンへ分化誘導させる新規および既存因子を同定し、その作用を *in vitro* および *in vivo* で明らかにする。2. ラットおよびサルの骨髄支持細胞をニューロンとくにドパミン系神経へと分化誘導させる条件を確立し、線条体への移植を行いドナー細胞としての可能性を明らかにする。3. TH および GDNF の両遺伝子を神経幹細胞に導入・発現させ、移植ドナー細胞の生着率の改善により効率良くTH遺伝子発現がおこなわれることを明らかにする。

④ 高価レトロウイルスベクターの作製と移植ドナー細胞開発への応用に関する研究

実施内容：1. THの補酵素であるBH4の産生に必要なGCHの遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター、ドパミントランスポーター (VMAT) あるいは成長因子 (GDNF など) を組み込んだレトロウイルスベクターを作製する。2. TH遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターのプロモーターを改良し、より長期に安定的な発現を図る。

達成目標：1. 2の両ベクターを用いて神経幹細胞にTH遺伝子の導入を行い、長期に安定してドパミン (L-dopa) を産生する細胞株の確立を図る。

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

実施内容：これまでのパーキンソン病モデル動物に対するカプセル化細胞脳内移植のデータに基づき、脳虚血動物モデルに対するカプセル化神経栄養因子産生細胞脳内移植を行い、脳梗塞に対する保護効果を検討する。

達成目標：神経栄養因子の一つである basic fibroblast growth factor (bFGF) 産生細胞株を遺伝子操作によって樹立する。この細胞株を高分子半透膜製カプセルに封入し、脳内に移植後、宿主に脳虚血を負荷し、カプセルが脳梗塞の範囲を減少することができるかどうかを観察する。

② ドナー・ホスト相互作用及び機能評価に関する研究

実施内容：MRIを用いて、脳障害 (脳浮腫、脳血腫) の解剖学的な発生・進行部位を、非侵襲的に経時測定する。また、神経作用薬に対する脳応答変化についても解析を行う。さらに、脳障害動物の脳における神経伝達物質の基礎放出量および刺激に対する応答を調べる。

達成目標：ドナー細胞移植後の脳機能回復を評価するための、高感度な *in vivo* 脳機能評価法の構築。

(2) 臨床脳神経移植法の改良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

実施内容：基礎研究・胎仔神経組織由来神経幹細胞やヒト神経前駆細胞株を種々のサイトカインや神経栄養因子で処置し、効率よくドパミン細胞へと分化させる方法を探索する。臨床研究・2000年から開始している自家胸部交感神経節移植の臨床応用を重ね、その効果の評価を Core Assessment Program for Intracerebral Transplantations (CAPIT) に準じて行う。

達成目標：基礎研究・(1)胎仔神経細胞からの安定した神経幹細胞の分離と(2)分離した神経幹細胞やヒト神経前駆細胞株を効率よくドパミン細胞へと分化させる手段の確立。臨床研究・自家胸部交感神経節移植の長期臨床効果を明らかにする。

II 平成13年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>1. 移植に用いるドナー細胞の開発に関する研究</p> <p>(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</p> <p>① 脳内移植による神経系細胞の可塑性に関する研究</p> <p>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</p> <p>③ マウスES細胞からの神経幹細胞の形成に関する研究</p> <p>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</p> <p>⑤ 羊膜細胞からの神経幹細胞の同定、分離法の確立及びその脳内移植に関する研究</p> <p>⑥ 遺伝子操作マウス由来脳神経幹細胞の樹立と脳神経変性疾患細胞治療モデルの確立</p> <p>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</p> <p>(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</p> <p>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關与する分化誘導因子の機能に関する研究</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>④ 高力価レトロウイルスベクターの作製と移植ドナー細胞開発への応用に関する研究</p> <p>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</p> <p>(1) 移植方法及び機能評価法の開発に関する研究</p> <p>① カプセル化細胞脳内移植による障害脳機能再建に関する研究</p> <p>② ドナー・ホスト相互作用及び機能評価に関する研究</p> <p>(2) 臨床脳神経移植法の改善及び開発に関する研究</p> <p>② 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</p>	<p>東京理科大学基礎工学部</p> <p>大阪大学大学院医学部</p> <p>理化学研究所</p> <p>慶應義塾大学医学部</p> <p>厚生労働省国立精神・神経センター</p> <p>東京医科歯科大学</p> <p>信州大学医学部</p> <p>理化学研究所</p> <p>自治医科大学</p> <p>名古屋市立大学医学部</p> <p>東京薬科大学薬学部</p> <p>岡山大学医学部</p> <p>味の素(株)中央研究所</p> <p>和歌山県立医科大学</p>	<p>友岡 泰 弘</p> <p>島 崎 琢 也</p> <p>渥 美 忠 男</p> <p>内 田 耕 一</p> <p>桜 川 宣 男</p> <p>原 嘉 信</p> <p>中 山 耕 造</p> <p>橋 本 光 広</p> <p>中 野 今 治</p> <p>飛 田 秀 樹</p> <p>馬 場 広 子</p> <p>伊 達 勲</p> <p>鳥 居 邦 夫</p> <p>板 倉 徹</p>

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○西野 仁 雄	名古屋市立大学 医学部教授
渥美 忠 男	理化学研究所 分子細胞生物学研究室前任研究員
板倉 徹	和歌山県立医科大学 教授
内田 耕 一	慶應義塾大学 医学部講師
桜川 宣 男	厚生労働省 国立精神・神経センター神経研究所部長
島崎 琢 也	大阪大学 医学部助手
伊達 勲	岡山大学 医学部講師
友岡 泰 弘	東京理科大学 基礎工学部生物工学科教授
鳥居 邦 夫	味の素㈱ 中央研究所基礎研究所主席研究員
中野 今 治	自治医科大学 教授
中山 耕 造	信州大学 医学部講師
橋本 光 広	理化学研究所 脳科学総合研究センター研究員
馬場 広 子	東京薬科大学 教授
原 嘉 信	東京医科歯科大学 疾患遺伝子実験センター助教授
飛田 秀 樹	名古屋市立大学 医学部助手

(注：○は研究管理統括者)