

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

研究管理統括者：西野 仁雄（名古屋市立大学医学部）

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

21世紀の前～中期には、我が国は超高齢化社会となり、老人性痴呆、神経変性疾患、脳虚血・梗塞等各種の脳疾患で悩む人が激増することが予想されている。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目ざされ、全世界ですでに400例を越す臨床応用が行われ、成果をあげている。しかし、脳細胞移植の最大の課題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十分な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。

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期では、1) 未分化多能性細胞（神経幹細胞、ES細胞、羊膜細胞、骨髄間質細胞）の分離、その増殖・分化過程の解析及び神経細胞への分化制御のための条件の開発、2) ウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるトランスミッター及び栄養因子活性の上昇した細胞の開発、3) パーキンソン病及びパーキンソン病モデル動物への移植において、移植方法の改良による機能再建の向上、という成果を得た。

第II期では、これらの成果とシーズをさらに発展させ、脳細胞移植研究の成果を臨床に適用できる段階にまで高めることが目的となる。

2. 第I期の成果をうけた第II期の目標

1. 脳神経移植の最終的な臨床応用を見越した際は、遺伝子導入を行わない方法によって、目的とするphenotypeのドナー細胞を分化誘導することが出来れば、最も安全である。そこで、種々の転写因子、分化誘導因子、栄養因子等を用いて、神経幹細胞をドパミン神経へ分化させる方法を開発する。また、未分化多能性細胞（骨髄間質細胞、羊膜細胞）の神経細胞への分化誘導法を確立する。

一方、ここ数年間のES細胞に関する研究及びその成果には目を見張るものがある。ES細胞は神経幹細胞よりもさらに未分化であるため、分化誘導の方向づけが容易と考

えられる。そこで、ES細胞を神経幹細胞を経て神経細胞へ分化誘導するための方法の確立をめざす。このためには、マウスES細胞を、神経前駆細胞を経て神経細胞に分化誘導する方法の確立、マウスES細胞を、骨髄系間質細胞（PA-6、骨髄ストローマ細胞）と共培養することによりドパミン神経へ誘導する方法の開発とその液性及び器質因子の同定、またマウスES細胞を、一つのまとまった組織あるいは器官へ分化誘導する方法の開発を行う。

更に、ES細胞及び神経幹細胞に遺伝子導入することによって、目的とするphenotypeのドナー細胞を大量に、また確実に得る方法は更に追求する必要がある。このために、TH、AADC、GCH 遺伝子やGDNF 遺伝子を、AAV及びRVベクターを用いて神経幹細胞、未分化多能性細胞あるいはES細胞に導入し、ドパミン産生あるいは栄養因子産生細胞を作成し、それらの移植による機能再建法を確立する。

2. 移植方法及び機能評価法の開発及び臨床脳神経移植への応用

ドパミン産生細胞株や各種の神経栄養因子産生株を、カプセル封入して脳内移植するカプセル化細胞移植法により一層の安全性を確立し、臨床応用への道を開く。また神経幹細胞の大型動物への異種間移植法を確立し、それによる機能の再建をめざす。一方、自家組織を用いる臨床脳神経移植法に改良を加え、パーキンソン病患者の機能再建を計る。更に、ヒト流産胎児組織から神経幹細胞株を樹立し、基本的な性質を解析して、その有用性を明らかにする。そして、将来の臨床脳神経移植において、ヒト胎児細胞をドナー細胞として応用するという国民的コンセンサスが生まれるベースを築く。

3. 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) ES細胞、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)

p53KO 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。これらを胎児及び成体マウス脳内に移植し、移植環境との相互関係から最もよく神経細胞に、生着、発達、分化するものを選別しドナー細胞とする。

② FACSにより分離した様々の神経系細胞の移植による

神経変性疾患治療法の開発に関する研究

(慶應義塾大学医学部)

様々な神経系細胞特異的プロモーターの制御下で GFP を発現させる方法を用いて、ES細胞より誘導した様々な神経細胞を 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、分離法を確立する。そして、特定の神経変性疾患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 (細胞化学研究所)

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を解明する。この ES 細胞よりえられた未熟な神経幹細胞を、*in vivo* および *in vitro* において、神経細胞へ分化誘導する方法を確立する。

④ ES 細胞を用いた器官形成モデルの開発に関する研究 (岐阜大学医学部)

ES 細胞から、網膜、色素上皮、レンズなど眼の構成要素を誘導分離する方法を確立し、マウス眼球へ移植することにより、再生治療のモデルを開発する。また、個々の特定の細胞だけでなく、複数の細胞から組織、器官 (眼球) が効率よく形成されるモデル系を確立する。

⑤ 羊膜間葉細胞由来の神経幹細胞分離法の確立および脳移植研究 (東邦大学医学部)

羊膜間質層より間葉細胞を分離し、ニューロスフェアを形成させ、神経幹細胞を大量に調整する。この神経幹細胞の神経細胞への分化誘導法の開発とモデル動物の脳内移植による障害脳機能の再建をめざす。

⑥ ES 細胞から神経細胞への分化誘導に関する研究 (名古屋市立大学医学部)

ES 細胞を神経幹細胞へ分化誘導させる既存および新規因子を同定する。また、ネスチンプロモーターを ES 細胞に導入し、FACS にて分離した後、効率良くドパミン細胞に分化させる方法を開発する。

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)

神経幹細胞を、ソニックヘッジホッグ、FGF8、テネシン及び 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。

(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)

AAV ベクターによる遺伝子導入技術を用いて、サル ES 細胞から効率良くドーパミンニューロンを作成する方法を開発する。また、移植治療の効果判定に必要であるサル

の詳細な行動解析法を開発する。

② 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)

中脳由来神経幹 (前駆) 細胞をドパミンニューロンへ分化誘導・生存促進させる因子を探索する。また、プロモーターの改善、GCH 遺伝子の導入によって、より効率の良い TH 遺伝子の発現と移植による行動改善を目指す。

③ RVV/Tet-on システム下の FGFR/EhpA4R の発現調節と神経幹細胞の開発に関する研究

(和歌山県立医科大学) (15 年度から参加)

マウス神経幹細胞に FGF 受容体及びその情報伝達系に関与する分子 (EphA4 受容体) を遺伝子導入し、神経幹細胞の生存、分化、増殖及び移植後の生着・分化の促進を計る。(RVV/Tet-on システムを用い、神経幹細胞の生存促進、神経細胞への分化制御、さらに移植後の生存維持を計るため、リエゾンとして新規に参加する)

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 (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、ドパミン (神経伝達物質) を産生する細胞株と GDNF (神経栄養因子) 遺伝子を組み込んだ細胞株を作成し、これらを同一の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、機能の改善を計る。そしてこの方法をパーキンソン病の治療法として確立する。

② 臨床前段階としての異種間移植法の確立に関する研究 (慶應義塾大学医学部)

E17 ミニプタよりえた中脳胞部神経板を bFGF 下で培養し、大量の sphere を得る。培養中に SHH を加え、また TH, GCH, AADC 遺伝子を導入し、ドパミンニューロンを誘導し、パーキンソン病モデルラットに移植する。これにより、神経上皮型幹細胞の異種間移植技術を確立する。

(2) 臨床脳神経移植法の改良及び開発に関する研究

① パーキンソン病及びハンチントン病に対する脳細胞移植治療法に関する研究 (和歌山県立医科大学)

神経幹細胞、ヒト神経前駆細胞株、交感神経節細胞にサイトカイン、神経栄養因子を処置し、ドパミン神経を効率良く分化誘導し、ドナー細胞として用いる。また、12 年度から開始しているパーキンソン病患者への自家胸部交感神経節移植の長期臨床評価を引き続き行う。

4. 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、ブタ脳及びヒト羊膜組織より、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した。②Viral 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た。この①②によってドナー細胞として有用ないくつかの細胞を開発することができた。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、機能の改善をめざした。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した。

第Ⅱ期では、第Ⅰ期の成果及び近年のES細胞の研究成果の上に立ち、①ES細胞及び神経幹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(異種間移植)し、その有用性を検証することを目標とする。さらに③将来の流産ヒト胎児脳組織の臨床活用(同種移植)を見据え、ヒト胎児由来神経幹細胞株及び流産ヒト胎児神経幹細胞の培養法、特性、分化誘導法についての基礎研究を行い、ドナー細胞としての有用性を明らかにしていく。これにより、将来、我が国におけるヒト胎児組織(細胞)の臨床応用が、国民的なコンセンサスとして芽生えて来ることを目指す。

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) ES細胞、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	初代細胞及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の開発に関する研究	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 ES細胞を用いた器官形成モデルの開発に関する研究					
⑤ 羊膜間葉細胞由来の神経幹細胞分離法の確立及び脳移植研究	羊膜細胞及び神経幹細胞THプロモーター活性を持つ細胞の同定分離	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再建	
⑥ ES細胞から神経細胞への分化誘導に関する研究					
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					
(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					

研究項目	11年度	12年度	13年度	14年度	15年度
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並びに神経発生に関する研究	LacZ, GFP, <i>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	
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	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	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		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	
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	ラット中脳神経幹細胞をドバ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				
④ RVV/Tet-onシステム下のFGFR/EphA4Rの発現節と神経幹細胞の開発に関する研究					
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	移植ドバ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	197百万円	168百万円

5. 平成15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) ES細胞、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) 株細胞のドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導を試みる。
2) 引き続き株細胞の解析及び胎仔脳内移植を行う。
3) パーキンソン病モデルマウスを作製し、脳内への移植を行う。

達成目標：株細胞にサイトカイン等を与え、ドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導法を探索する。株細胞の解析及び胎仔脳内移植を継続し、*in vitro*と*in vivo*での分化条件、増殖能を比較検討する。パーキンソン病モデルマウスを作製し、株細胞の脳内移植を行い、胎仔脳内移植の結果と比較検討する。

② FACSにより分離した様々な神経系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：ES細胞由来神経前駆細胞よりドーパミンニューロン前駆細胞を効率的に分化誘導後、FACSによって分離し、6-OHDAを用いて作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植し、治療効果を上げる。FACSによって分離したES細胞由来のコリン作動性ニューロンをアルツハイマー病を含めた様々な記憶障害モデル動物に移植し、その治療効果を行動学的に解析し、宿主脳内における長期生存能などの動態についても組織学的に解析する。FACSによって分離したES細胞由来の運動ニューロンを、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデル動物の胎仔脊髄様々な記憶障害モデル動物に移植し、その治療効果を行動学的に解析し、宿主脳内における長期生存能などの動態についても組織学的に解析する。神経幹細胞に特異的に発現している細胞表面抗原の生物学的役割を分子生物学的、発生生物学的に明らかにする。ドーパミンニューロン特異的に発現する細胞表面抗原を同定する。

達成目標：ES細胞由来神経前駆細胞およびさまざまなphenotypeのニューロンへ分化させた細胞を、動物モデルラットの線条体へ移植し機能評価を行うことによって*in vivo*での有用性を評価する。

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：マーカーの導入されたES細胞およびGFPマウスより神経幹細胞株を樹立し、胎仔の脳

に移植して、どのような神経系細胞に分化するか調べる。

達成目標：我々の確立した方法によって得られるES細胞由来の神経幹細胞株の移植用ドナー細胞としての利用可能性を確認する。

④ ES細胞を用いた器官形成モデルの開発に関する研究

実施内容：ES細胞からの試験管内で誘導された眼(培養眼)をニワトリおよびマウスの眼に移植する。培養眼から網膜幹細胞を誘導し同様に移植する。3次元培養や腎皮膜下への移植により培養眼をさらに分化させる。

達成目標：ES細胞から誘導された細胞が眼の再生医療のモデルになることを動物への移植実験で確立する。

⑤ 羊膜細胞由来の神経幹細胞分離法の確立および脳移植研究

実施内容：ヒト羊膜間葉細胞にnestin-GFP, musashi-GFP陽性細胞の存在を確認した。

そこで本細胞を細胞分離装置を用いて、分離・培養を行う。その細胞のphenotypeを同定し、ドーパミン産生細胞やグリア細胞への分化誘導実験を行う。この細胞をNOD-Skid mouse脳内への移植実験を行う。さらにパーキンソンモデル動物や脳虚血動物への移植実験を行い、細胞移植療法による脳組織再建の新しい治療法を開発する。

達成目標：ヒト羊膜間葉細胞へのnestin-GFP, Musashi-GFPの感染実験を終了した。

現在FACS sorting法について検討中である。理論的に、細胞分離、培養が可能であることが判明している。従って、培養実験および動物実験は十分に達成可能である。

⑥ ES細胞から神経細胞への分化誘導に関する研究

実施内容：ES細胞由来神経幹細胞からドーパミン神経への分化を促進するpleiotrophin (PTN)の機能に対し、その制御機構を検討する。一方、PTNを処理することによってES細胞からドーパミン神経へ分化させた細胞をパーキンソン病モデル動物に移植し、その生着及び運動機能の改善効果を検討する。

達成目標：ES細胞からドーパミン神経細胞への分化を促進するPTNの作用機構を*in vitro*で明らかにする。また、ドーパミン神経へと分化させた細胞をパーキンソン病モデル動物へのドナー細胞として適用する。

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：可溶性したホモダイマーのDelta蛋白質を培

地中に加えることにより、神経幹細胞を未分化のまま増殖できるか調べる。また、リコンビナント L1 やテネンシンで神経幹細胞を処理して培養し、ドーパミンニューロンの出現頻度を検討する。さらに、bFGF と shh で処理した系に FGF4 を加え、セロトニンニューロンの出現頻度を検討する。

(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：カニクイサルの ES 細胞を使用する。神経幹細胞を大量に分化誘導し、選択的神経毒 MPTP により作成したパーキンソン病モデルサルの線条体内に移植する。その際、機能的なドーパミン神経細胞の比率を高めるため AAV ベクターによりドーパミン合成酵素などの遺伝子導入を行う。

達成目標：パーキンソン病のモデルサルにおいて、AAV ベクターによる遺伝子導入技術と ES 細胞を使用して、線条体のドーパミン合成能を効率的に回復させる新たな細胞移植治療法を開発する。

② 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 (前駆) 細胞をドーパミンニューロンへ分化誘導させる因子の探索及び解析を行う。
2) TH 遺伝子導入した神経幹細胞を脳内に移植した後、より長期に遺伝子が発現する条件を解析する。

達成目標：1) pleiotrophin が *in vitro* および *in vivo* において神経幹 (前駆) 細胞のドーパミン神経への分化過程に与える作用を明らかにする。
2) 中脳由来神経幹細胞をドーパミンニューロンへ分化誘導・生存促進させる関連因子を同定し、その作用を明らかにする。
3) 神経幹細胞の細胞周期を制御し、神経とくにドーパミン神経への分化誘導を促進させる。
4) TH, GCH1, VMAT 等の遺伝子導入した細胞の脳内移植による長期間の機能改善を明らかにする。

③ RVV/Tet-on システム下の FGFR/EphA4R の発現調節と神経幹細胞の開発に関する研究

実施内容：マウス神経幹細胞に FGF 受容体およびこの情報伝達系に関係する分子を遺伝子導入し、細胞の生存・分化・増殖への影響を調べる。マウス神経幹細胞にレトロウイルス (Tet-on) を用いて FGF 受容体および EphA4 受容体のワイルドタイプ、活性型、ないしドミナントネガティブ型の遺伝子導入を行う。これら

の分子の cDNA と GFP cDNA を IRES を介して繋ぐことにより 1 つのウイルスベクターへ挿入し、同じプロモーターで同時に 2 つ以上の分子を発現させることとする。

達成目標：FACS 等による遺伝子組み替えウイルス産生パッケージング細胞の選別および遺伝子発現神経幹細胞の選別が可能となる。

Tetracycline 存在下および非存在下 (上記分子の発現下および非発現下) で培養中の神経幹細胞の生存率、増殖速度、および分化度を調べるとともに、マウスないしラットの脳に移植後の細胞の生着率および分化度を調べる。

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：ヒト羊膜細胞を不死化し、カプセル化する。分泌される神経伝達物質および神経栄養因子を測定したのち、パーキンソン病モデル動物に脳内移植し、組織学的、生化学的、行動学的効果を検討する。神経栄養因子である GDNF あるいは VEGF 産生細胞を作成し、カプセル化の後、脳虚血モデルラットに移植し、神経保護効果を検討する。

達成目標：これまでヒト由来の細胞株でのカプセル化移植の研究はごくわずかしが行われておらず、カプセル化細胞の脳内移植の臨床応用を考える上で、ヒト由来の細胞株を用いた研究は重要なものと考えられる。また、脳虚血モデルを用いた研究により、カプセル化細胞移植の応用範囲がパーキンソン病のみならず、脳虚血へも広がる期待がもたれる。

② 臨床前段階としての異種間移植法の確立に関する研究

実施内容：【ドナーの人為的修飾】E17 ミニブタ初期胚から得られた神経上皮型幹細胞に Sonic hedgehog (Shh) の添加および Tyrosine hydroxylase (TH, humantype 1), aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC), GTP cyclohydrolase-1 (GCH) の遺伝子導入を行い、人為的に dopamine 作動性神経細胞を誘導し得るか検討する。

【最適な移植方法の検討】中脳胞部神経板から得られた神経上皮型幹細胞、bFGF を 1 週間添加して得られた neurosphere、人為的修飾を加えて誘導した dopamine 作動性神経細胞をドナーとして、正常ラットまたはパーキンソン病モデルラットへ移植し、その生着能、分化能を経時的に評価する。また、行動学的

に機能評価も行う。

【電気生理学的解析】GFP 遺伝子導入ラット (green rat) またはミニプタの初期胚中脳胸部神経板をドナーとした同種異型または異種間移植を行う。ホストとして正常ラットまたはパーキンソン病モデルラットを用いる。移植後、以下の3点について、経時的にスライスパッチ法を用いてドナーとホスト間の電気生理学的解析を行う。①平成14年度と同様のスライスパッチ実験を行い、データを蓄積する。②ホスト細胞を刺激し、ドナー由来細胞の電気生理学的解析を行う。③ドナー細胞を刺激し、ホストのカルシウムイメージングによる解析を行う。また、bFGFで増幅した神経上皮型幹細胞 (neurosphere) をドナーとする移植系においても、同様の電気生理学的解析を行い、その相違について検討する。

達成目標：bFGF 反応性神経上皮型幹細胞を効率的にドーパミン産生細胞へ誘導できるかを明らかにする (妊娠ミニプタは高価なため、ラット由来のbFGF 反応性神経上皮型幹細胞を用いて予備実験を行い、次いでミニプタ細胞を用いることとする)。次に、種々の動物へ移植を行う事により、神経上皮型幹細胞が異種間移植に適するか否かについて解明する。また、電気生理学的解析により合目的な神経回路網の構築がなされているかについても解明する。

(2) 臨床脳神経移植法の改良及び開発に関する研究

① パーキンソン病及びハンチントン病に対する脳細胞移植治療法に関する研究

実施内容：【基礎研究】：本年度はパーキンソン病に対する移植治療のドナーソースとして胚性幹細胞 (ES 細胞) と骨髄由来間葉性幹細胞に注目する。マウスES細胞をLIF存在下で増殖させた後、McKayらの方法に準じてドーパミン細胞への分化誘導を図る。そこで、より高率にドーパミン細胞を分化誘導させるための (a) 培養条件、(b) 移植のタイミング、さらに (c) 移植細胞濃度などに条件を検討する。また、成熟マウス長幹骨の骨髄から multipotent adult progenitor cells (MAPCs) を分離、増殖させた後、同様の手技を用いたドーパミン細胞への分化誘導も試みる。

【臨床研究】：平成12年度から開始している自家胸部交感神経節移植の長期臨床評価を本年度も引き続き行う。

達成目標：基礎研究：ES細胞を高率にドーパミン細胞へと分化誘導させる培養、移植条件の確立。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15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) ES細胞, 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により分離した様々な神経系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 ES細胞を用いた器官形成モデルの開発に関する研究</p> <p>⑤ 羊膜間葉細胞由来の神経幹細胞分離法の確立および脳移植研究</p> <p>⑥ ES細胞から神経細胞への分化誘導に関する研究</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>② 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>③ RVV/Tet-on システム下の FGFR/EphA4R の発現節と神経幹細胞の開発に関する研究</p>	<p>東京理科大学基礎工学部</p> <p>慶応義塾大学医学部</p> <p>歯理化学研究所</p> <p>岐阜大学医学部</p> <p>東邦大学医学部</p> <p>名古屋市立大学医学部</p> <p>信州大学医学部</p> <p>自治医科大学</p> <p>名古屋市立大学医学部</p> <p>和歌山県立医科大学</p>	<p>友岡 康 弘</p> <p>島 崎 琢 也</p> <p>渥 美 忠 男</p> <p>國 貞 隆 弘</p> <p>桜 川 宣 男</p> <p>鄭 旦 均</p> <p>中 山 耕 造</p> <p>中 野 今 治</p> <p>飛 田 秀 樹</p> <p>坂 口 和 成</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の再建に関する研究</p> <p>② 臨床前段階としての異種間移植法の確立に関する研究</p> <p>(2) 臨床脳神経移植法の改良及び開発に関する研究</p> <p>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法に関する研究</p>	<p>岡山大学医学部</p> <p>慶應義塾大学医学部</p> <p>和歌山県立医科大学</p>	<p>伊 達 勲</p> <p>内 田 耕 一</p> <p>板 倉 徹</p>
<p>3. 研究管理</p>	<p>名古屋市立大学医学部</p>	<p>西 野 仁 雄</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	物理化学研究所 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
國貞隆弘	岐阜大学 医学部 教授
鄭 旦均	名古屋市立大学 医学部 研究員
坂口和成	和歌山県立医科大学 教授
桜川宣男	東邦大学 医学部 SRL 代謝病再生医学寄付講座 教授
島崎琢也	慶應義塾大学 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
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
飛田秀樹	名古屋市立大学 医学部 講師

(注：○は研究管理統括者)