

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592012
 研究課題名（和文） マウス網膜神経変性後の自殺遺伝子導入胚性幹細胞による神経再生と腫瘍化の抑制
 研究課題名（英文） Neuron-Like Differentiation and Selective Ablation of Undifferentiated Embryonic Stem Cells Containing Suicide Gene with Oct-4 Promoter
 研究代表者：
 原 明（HARA AKIRA）
 岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10242728

研究成果の概要：研究成果が 5 編の論文として国際雑誌に掲載された。これら論文には、基礎研究としての海馬神経細胞、眼球光彩色素細胞の研究も含まれる。OCT-4 遺伝子プロモーター下流に自殺遺伝子 thymidine kinase を挿入した ES 細胞（OCT-TK-ES 細胞）を 3 次元培養し、ganciclovir 投与により選択的に未分化 ES 細胞の増殖を抑制し、神経分化蛋白発現の変化を検索し、ganciclovir 投与により未分化細胞成分のみが除去され、神経分化を示すことが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：胚性肝細胞, ES 細胞, 神経組織再生, 奇形腫, 自殺遺伝子, thymidine kinase, ganciclovir human

1. 研究開始当初の背景

正常な臓器や組織に障害をきたした際、その失われた機能を取り戻すため、様々な臓器・組織の再生が研究されている。なかでも網膜を含む神経組織再生の試みは近年注目されているものの、実際の臨床応用に関しては進んでいない。神経組織に関してはその構造の複雑さ故に、未だ、生体内で

の機能を伴った神経組織の再生の報告はほとんどない。実際、in vitro での知見が必ずしも in vivo では、実現できていない。その理由の一つとして、胚性幹細胞 (ES 細胞) を組織再生に利用した場合、しばしば奇形腫として正常組織まで破壊して腫瘍性増殖をきたすことがあげられる。

2. 研究の目的

ES 細胞移植後の腫瘍発生を抑制するため、自殺遺伝子 thymidine kinase を ES 細胞の未分化維持に関わる OCT-4 遺伝子プロモーター下流に挿入した ES 細胞を網膜移植に使用し、移植後、網膜に定着した時点で ganciclovir を投与して未分化状態の腫瘍性 ES 細胞を除去し、より純粋な神経組織成分からなる網膜の再生を最終目的として、以下の①～④に着目し、研究を進めることとした。

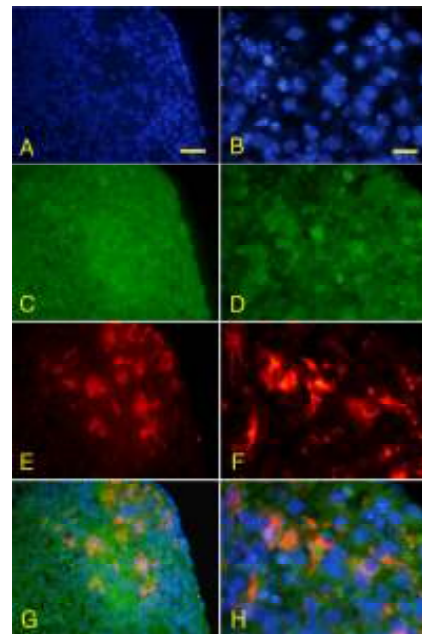
3. 研究の方法

- ①手術用顕微鏡にて操作、到達が容易である網膜を対象臓器とし、移植細胞として成体動物においても良好に生着する ES 細胞を用いる。
- ②網膜全構造を再生することは極めて困難なため、網膜内の特定細胞のみを傷害した動物モデルを作成し、単一種の神経細胞の再生について、修復再生を試みる。
- ③あらかじめ培養細胞の段階で神経幹細胞へ分化させるのではなく、未分化な状態で移植し組織内での確実な細胞の生着をはかり、完全に定着した後、神経系への分化を誘導する。
- ④ES 細胞を再生医療の材料として使用する際には、奇形腫の発生が問題となる。ES 細胞移植後の奇形腫発生を抑制させることを試みるため自殺遺伝子 thymidine kinase を ES 細胞の未分化維持に関わる OCT-4 遺伝子プロモーター下流に挿入した ES 細胞を移植に使用し、移植後、網膜に定着した時点で ganciclovir を投与して未分化状態の腫瘍性 ES 細胞を除去する。

4. 研究成果

OCT-4 遺伝子プロモーター下流に自殺遺伝子 thymidine kinase を挿入した ES 細胞 (OCT-TK-ES 細胞) を 3 次元培養し、その後、ganciclovir 投与により選択的に未分化 ES 細胞の増殖を抑制し、アポ

トーシスあるいは分化誘導について、遺伝子発現、神経分化蛋白発現の変化を検索した。3 次元培養は培養細胞を回転させながら培養することにより行った。3 次元培養された ES 細胞は、ganciclovir を培養液中に投与することにより未分化細胞成分のみが除去され、神経分化を示すことが明らかとなった。下図は、神経シナプスマーカーである Synapophysin 陽性の神経細胞および GFAP 陽性のグリア細胞が神経構築を 3 次元構造とともに示される神経分化をきたしている。



【図】 ganciclovir 投与による神経分化
(A, B)DAPI, (C, D)Synapophysin,
(E, G)GFAP, (H, I)merge
Scale Bars, A; 25 μ m, B; 10 μ m

さらに継続して、OCT-4 遺伝子プロモーター下流に自殺遺伝子 thymidine kinase を挿入した ES 細胞をマウス網膜に移植し、その後、ganciclovir 投与により選択的に未分化 ES 細胞の増殖を抑制しうるかどうか、また ganciclovir 投与により未分化細胞成分のみが除去され、神経分化を示すか否か、動物実験において組織学的に解析している。

ganciclovir 投与により未分化 ES 細胞由来の腫瘍形成が抑制されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Niwa M, Hara A, Taguchi A, Aoki H, Kozawa O, Mori H: Spatiotemporal expression of Hsp20 and its phosphorylation in hippocampal CA1 pyramidal neurons following transient forebrain ischemia. *Neurol Res*, 2009, in press, 査読・有
2. Hoshi M, Saito K, Murakami Y, Taguchi A, Fujigaki H, Tanaka R, Takemura M, Ito H, Hara A, Seishima M. Marked increases in hippocampal neuron indoleamine 2, 3-dioxygenase via IFN- γ -independent pathway following transient global ischemia in mouse. *Neurosci Res* 63:194-198, 2009, 査読・有
3. Taguchi A, Hara A, Saito K, Hoshi M, Niwa M, Seishima M, Mori H. Localization and spatiotemporal expression of IDO following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res* 1217:78-85, 2008, 査読・有
4. Aoki H, Yoshida H, Hara A, Suzuki T, Kunisada T. Transplantation of melanocytes into iris: Method for iris repigmentation. *Transplantation* 85:492-494, 2008, 査読・有
5. Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, Mori H: Neuron-like Differentiation and Selective Ablation of

Undifferentiated Embryonic Stem Cells Containing Suicide Gene with Oct-4 Promoter. *Stem Cells Dev* 17:619-628, 2008, 査読・有

6. Aoki H, Hara A, Motohashi T, Chem H, Kunisada T: Iris as a recipient tissue for pigment cells: organized in vivo differentiation of melanocytes and pigmented epithelium derived from embryonic stem cells in vitro. *Dev Dynam* 237:2394-2404, 2008, 査読・有

[学会発表] (計 4 件)

1. 原 明 Neuronal differentiation and control of teratoma formation in transplanted embryonic stem cells using retinal neurodegenerative mouse model. Symposium: Molecular pharmacological understandings of neurodegenerative disorders. The spring international convention, organized by The Pharmaceutical Society of Korea. 平成 21 年 5 月 7 日 韓国 Daejeon
2. 原 明、田口紋子、山田泰広、森 秀樹 Methotrexate induces neuronal differentiation of human embryonic stem (ES) cells transplanted into nude mouse retina. 第 67 回日本癌学会学術総会 平成 20 年 10 月 29 日 名古屋
3. 原 明、田口紋子、尾山 武、山田泰広、森 秀樹 Selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. 第 66 回日本癌学会学術総会 平成 19 年 10 月 2 日 横浜
4. 原 明 Suppression of tumorigenicity and induction of neuronal differentiation in embryonic stem cells transplanted in the adult mouse retina by folate antagonist

methotrexate. AACR Annual Meeting
April 15, 2007 Los Angeles

〔図書〕（計 1 件）

1. Hara A, Oka N, Aoki H, Taguchi A, Yamada Y, Niwa M, Mori H. OCT-3/4 Expressing Cells as Cancer Stem Cells in Human Immature Teratoma: Cancer Differentiation Potential. In: New Cell Differentiation Research Topics, ed by Saitama H, Nova Science Publish. 1-6, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 明 (HARA AKIRA)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 10242728

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究 なし