

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2010
課題番号：19790220
研究課題名（和文） Lmx1a 相同性遺伝子導入 ES 細胞を用いたドーパミン産生細胞の分化誘導と移植治療
研究課題名（英文） Establishment of the method of A9 dopaminergic neuron differentiation using Lmx1a-GFP homologous recombinant ES cell and transplantation of the GFP+ cells.
研究代表者
千葉 俊明（CHIBA SHUNMEI）
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：20367361

研究分野： 医学薬学
科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般
キーワード：脳・神経 再生医学 胚性幹細胞 パーキンソン病

1. 研究計画の概要

Lmx1a promoter 後に GFP 遺伝子を相同性組み換え（knock-in）することにより、Lmx1a-GFP knock-in マウス ES 細胞株を作製する。これにより、Lmx1a 遺伝子が細胞内で発現する際に、同時に GFP 蛋白も産生し、未分化な Dopamine(DA) neuron を FACS を用いて生きたまま同定、回収することが可能となる。新規 DA neuron 誘導因子 Noggin に既存の分化誘導因子である Shh や FGF8 を神経幹細胞増殖期に加えることにより、中脳 DA neuron をより高率に作り出す。最終的には移植治療に最適である、ほぼ純粋な DA neuron を得ることを目的とする。また、トランスジェニックマウスを作製し、DA neuron の発生を詳細に検討する。

2. 研究の進捗状況

中脳黒質型 DA neuron の新規分化誘導法の確立において、得られた相同性遺伝子導入株を用いて最適な条件を決定することができた。また、FACS 抽出もその性質を変えずに培養・増殖が可能であることが確認できた。しかし昨年度までに確認した相同性遺伝子導入株は理化学研究所において樹立された BRC-5 マウス ES 細胞由来であるが、染色体異常のある ES 細胞株であることが後に判明しており、さらに詳細な遺伝子異常の解析が行われていないため（問合せたところそれ以上の解析予定はないとのことであった）、純粋な Lmx1a 遺伝子の働きを解析するには不適であり、また純粋なトランスジェニック

マウスを得られない可能性が高いことから、作製した細胞株を用いた研究を中止せざるを得ない状況になった。以上のことより最初から別の ES 細胞株を用いて再度 Lmx1a-GFP 相同性遺伝子導入株を作製した。今回の ES 細胞（Pluri Stem B6-White、Millipore）は作製元でのトランスジェニックマウス作製経験も多くあり、遺伝子解析も十分な細胞株である。遺伝子異常のない白色 C57BL/6 マウス由来であり、トランスジェニックマウス作製における子の判定において毛色で簡便に判断でき、有用であると共に、系統樹立（通常6回以上の交配が必要）においても遺伝子条件が同じであることから、樹立が簡便で非常に有用な細胞を選択した。しかし、1株を作製したのみであるため、さらに2-3の遺伝子導入株が GFP 強発現株の選定等には必要であると考えている。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている

新規分化誘導法の確立および FACS 抽出後の培養にも成功しており、これまでに当社の計画を達成しているものの、前述の予期せぬトラブル（ES 細胞販売元の染色体異常の発覚）により、有効な相同性遺伝子導入株の作製を振り出しに戻すという予想外の遅延がみられた。しかし、作製方法は確立していたので、本年度において導入株を再作製し得ている。また、移植治療とトランスジェニックマウスの作製においても再作製した細胞株が必要であり、中断せざる得なくなり、

未達成である。

4. 今後の研究の推進方策

今後は本年度に予定した GFP 強発現株の選定（あと数個の相同性遺伝子導入株の作製を含む）および FACS 抽出後のパーキンソン病ラットへの移植を行う予定である。また、時間的制約を考え、トランスジェニックマウスの作製の部分のみは外部に委託することが望ましいと考えている。その後の評価はこちらですべて行う予定であるが、非常に有用な ES 細胞株を新たに用いているので、時間的な遅れの改善と、技術的な促進を図ることが出来ると考えている。

5. 代表的な研究成果

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

特になし。