

機関番号：18001

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)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20367361

研究成果の概要（和文）：

マウス胚性幹（ES）細胞のドーパミン産生細胞特異的遺伝子である Lmx1a の一部を緑色蛍光遺伝子（GFP）に置き換え、かつ Lmx1a と同時に GFP を発現させるように相同性遺伝子組み換え（knock/in）技術を用いて Lmx1a-GFP knock/in (K/I) マウス ES 細胞を作製した。GFP 発現を観察することで、高率にドーパミン産生細胞を作り出す分化誘導系を確立した。Parkinson モデルマウスに移植し、脳内での生着とドーパミン産生細胞への分化を確認した。

研究成果の概要（英文）：

To know the efficacy of A9 dopaminergic (DA) neuron differentiation from mouse ES cell, we established Lmx1a-GFP K/I ES cells by homologous recombination. Depend on the monitoring of GFP expression, we also established the efficient method to induce DA neurons from ES cells with appropriate concentration of noggin, Shh, and FGF8 factors. After transplantation of GFP positive cells, they survived and differentiated into A9 DA neurons in the striatum of Parkinsonian mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	540,000	4,140,000

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. 研究開始当初の背景

(1) Parkinson 病は中脳黒質のドーパミン産生細胞 (DA neuron) の消失が病因の主体であり、当初は L-DOPA などの薬剤療法が有効であるが、これらの治療が無効である進行した状態に対して新たな治療法が期待されている。米国では、DA neuron を補充するため Freed らが中絶胎児の中脳を用いた移植治療を行っており、その有用性を証明した。し

かし、中絶胎児を用いることへの倫理面での問題、また、多くの患者のために必要量の DA neuron を得るためにはより多くの中絶胎児が必要となり、制限があることなどから、現在ではこれらの治験は行われていない。

(2) ES 細胞は無限に増殖し、かつ多分化能をもった将来の移植ソースとして期待されている細胞である。また、ES 細胞を用いた移植治療においてもその効果が実験レベ

ルで示されている。しかし、中脳 DA neuron を誘導する方法はいずれの ES 細胞においても未だ検討段階にある。ES 細胞を実際に移植に用いるには、高率な中脳 DA neuron かつ目的細胞以外を排除した移植群を用いる必要である。

(3) 中脳 DA neuron 作成においては DA neuron が個体内で分化、発達するような環境を試験管内で模倣する必要がある。また、適切な時期(神経幹細胞増殖もしくは形成期より前)に Shh や FGF8 といった外因性因子を加えなければ、ES 細胞はその他の神経系細胞へと分化を始め、一旦違う方向に行くと二度と逆戻りは出来ないため、DA neuron つまり Pitx3、TH 二重陽性細胞が得られないことがわかってきた。特にヒト ES 細胞においては今までの方法のみでは移植後の TH 陽性細胞の生存率は非常に低いか無いに等しく、機能改善が見られないとの報告がされるようになった。これらのことから、中脳ドーパミン細胞、つまり Pitx3、TH 二重陽性細胞を目的とした効率のよい分化誘導法を再度見直す必要がある。

2. 研究の目的

(1) Lmx1a promoter 直後に GFP 遺伝子を相同性組み換えすることにより、Lmx1a-GFP knock-in マウス ES 細胞株を作製し、その遺伝子が細胞内で発現すると同時に GFP 蛋白も産生し未分化な DA neuron を生きたままで同定することが可能となる。

(2) 外因性因子を神経幹細胞の増殖期に用いて Lmx1a-GFP の発現を観察することで DA neuron の分化効率を確認し、最適な分化条件を決定する事。

(3) フローサイトメーターを用いて GFP 陽性細胞を抽出し、移植治療に最適であるほぼ純粋な DA neuron を得ること。

(4) 抽出後の細胞群をパーキンソン病モデルラットに移植し、生存率、および機能改善効果を評価すること、不必要な細胞の除去により移植後の腫瘍形成を抑制すること。

(5) Lmx1a-EGFP knock-in マウスを作製し、in vivo で DA neuron の発生・発達過程を詳細に検討すること。

3. 研究の方法

(1) ベクター作製と遺伝子導入

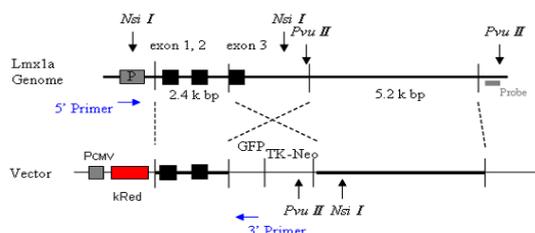


図 1. ベクター構築

Lmx1a promoter 後に GFP 遺伝子を相同性組み換えすることにより、Lmx1a-GFP knock-in マウス ES 細胞株を作製する。

(2) 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 を生きたまま同定すること。

(3) 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。

(4) フローサイトメーターを用いて GFP 陽性細胞を抽出し、移植治療に最適である、ほぼ純粋な DA neuron を得ること。

(5) Lmx1a-GFP knock-in 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。

4. 研究成果

(1) Lmx1a-GFP ES 細胞とパーキンソンモデルラットの作製

①ヒトおよびマウス Lmx1a をデータベース上で比較・解析し、マウスでは不明であった promoter 領域を exon1 の 220bp 上流に発見した。Exon1,2 は Lmx1b との共通配列の homeobox domain であり、Lmx1b の補足的な働きによる非特異的 GFP 発現をさけるため、Lmx1a に特異的である exon3 を ZsGFP 遺伝子に置換する形でベクターを構築した。また、新たな相同性遺伝子導入法(非特異的に遺伝子導入された株は赤色蛍光を発し、同定・排除が可能となることで相同性遺伝子導入株選択効率を改善する目的)の開発にも成功した。これにより通常 1/100 の確率が 1/10 へと 10 倍高効率化できた。ターゲッティングベクターの全体シーケンスを行ったが予定通りの遺伝子配列であり、問題はなかった。

②マウス ES 細胞に直線化 targeting vector を遺伝子導入し、一週間の G418 選択後に耐性コロニーを約 300 個採取し、PCR にて negative selection と positive selection を行い、10 株選択した。サザンブロット法にて確認を行い、3 株の相同性遺伝子導入株を得た。しかし、顕微鏡下で GFP 発現はどの株においても弱く、染色による同定が必須であった。この時点で情報を再整理したところ、この BRC-5 マウス ES 細胞(理化学研究所)には、購入時には提示のなかった染色体異常があることが判明した。また、トランスジェニックマウスは作製することができるものの、詳細な遺伝子異常の解析が行われておらず、解析する予定のないことがわかり、別の ES 細胞株を用いて再度やり直しが余儀なくされ、大幅な時間的ロスが生じた。

③再度、同様の方法で B6-white マウス ES

細胞（ミリポア製）を用いて2株の相同性遺伝子導入株を得た(図2:F80がLmx1a-GFP, F31は非特異的な遺伝子導入株)。

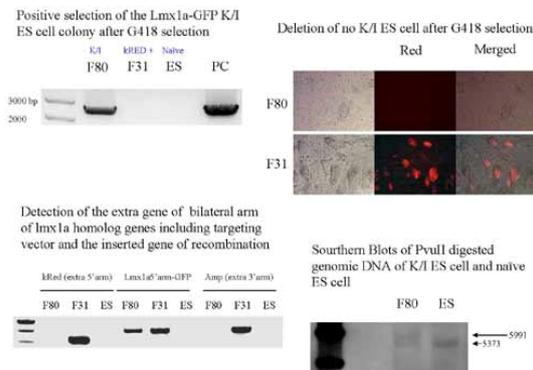


図2. Lmx1a-GFP K/I ES 細胞株の同定

④パーキンソンモデルラットを作製し、薬剤誘発回転運動テストで成功率(24/30匹=約70%)を確認した。

(2) GFP 陽性細胞を用いた新規分化誘導方法の開発

①胚様体形成中に5ng/ml FGF8と500ng/ml nogginを添加することでpitx3、TH二重陽性のGFP陽性DA neuronを効率よく分化誘導できることを発見した。高濃度のFGF8、もしくは胚様体形成後の投与では著しく陽性細胞の減少がみられた。さらに誘導法を改良し、胚様体形成中に5ng/ml FGF8、100 ng/ml Shh、500ng/ml nogginを添加し、さらにsingle cellに分解したあとで、付着培養しながら100ng/ml FGF8、400 ng/ml Shh、500ng/ml nogginを添加することで中脳黒質DA neuronと同じ性格をもつGFP陽性細胞がさらに高率に得られた(図3)。

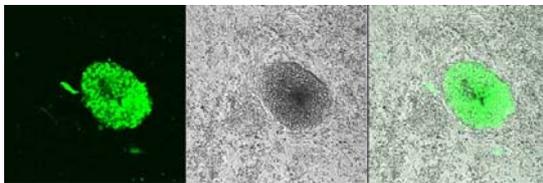


図3 Lmx1a-GFP enriched colony

(3) フローサイトメーターでの抽出とその後の培養

FACS抽出では全体の細胞に対して約19%がGFP陽性であり、抽出後の陽性細胞率は約90%(図4)と高純度の選択細胞を得ることが可能であった。

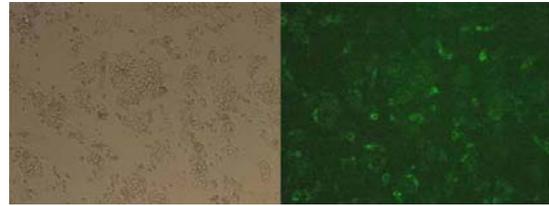


図4 FACS抽出後のLmx1a-GFP陽性細胞の培養。

また、FACS抽出後も培養継続および増殖が可能であり、移植に用いるための純粋なDA neuronの移植細胞群を確保することに成功した。

(4) Lmx1a-EGFP knock-in マウスの作製 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作製依頼し、結果待ちの状況である。その後の評価はこちらですべて行う。

(5) パーキンソンモデルマウスの行動解析と移植

① 研究途中の所属移転に伴い、動物飼育環境に差異があったため、(1)④で作製したラットではなく、パーキンソンモデルマウスを使用せざる得なくなった。そのため、行動医学化学研究所で作製されたSJLB・ヒト型変異タウ過剰発現マウスにおけるパーキンソニズムの行動解析をした。5-6ヶ月齢マウスではFootprintおよびPoleテストで優位にパーキンソン症状が見られ、12ヶ月齢では悪化したものの同様に症状が見られた。

② パーキンソニズムを発症する前の4ヶ月齢マウスの片側線条体にGFP陽性細胞を移植した。移植後4-5週目に生存とDA neuronマーカーが確認された(図5、緑はDA neuron markerでTH、赤は神経マーカーでBetaIII tubulinの二重染色、元々のGFPは組織固定後に消失している)。また、神経突起を長く伸ばしている事からも神経網の修復の可能性が高く、また、移植細胞としての妥当性が高い事が証明された。

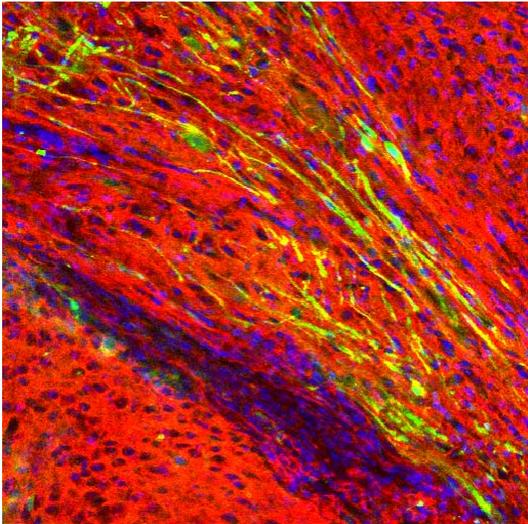


図5. 移植後の線条体

以上より、研究途中での所属異動およびマウス ES 細胞の予期せぬ染色体異常発覚などの障害があったものの、予定されていた研究内容は概ね達成されたと考えている。ただし、Lmx1a-EGFP knock-in マウスにおいては時間的な制限から外部委託せざるを得ない状況となった。作製を待つて引き続き研究継続および分化誘導した Lmx1a 陽性細胞と Lmx1a-EGFP knock-in マウスにおける GFP 陽性細胞の細胞性格を qPCR、DNA マップなどを用いて比較・検討したい。

本研究で得られた結果より、

- ① 生きたまま中脳 DA neuron を同定・抽出することのできる細胞ツールを確立できたこと。
- ② 新規分化誘導因子による高効率な分化誘導法を開発した事。
- ③ 実際にフローサイトメーターにて純化を行い、かつ培養継続する事でいつでも移植のできる細胞ソースを作製する系を確立できたこと。
- ④ 移植することで、組織学的な評価ではあるがその有効性が確認された事。

などがこの研究分野では新規性があり、移植治療応用への大きな前進であると考えられる。

国内外の他の研究者および Chiba ら (Stem cells, 2008) はヒト ES 細胞を用いて分化誘導した DA neuron を移植治療に用いる際に、純化の必要性をすでに報告しており、その後の報告ではこの有効な純化法の報告はなされていない。特に、本研究ではその方法を確立し得たとい

う点で非常にインパクトが高いと考えられる。

また、今回のベクターの作製および遺伝子導入法は Dopamine Transporter (DAT) knock/in ヒト ES 細胞を作製した経験に基づいて計画された方法であり、本方法はヒト ES 細胞および iPS 細胞にも即座に応用可能である。

また、ヒト ES 細胞では相同性遺伝子導入効率はマウスに比し、非常に低率であり、今後の応用を考える上でも、今回、相同性遺伝子導入法を改変 (5'アーム側余剰末端にサイトメガロウイルスプロモーターと赤色蛍光遺伝子を加える事) することで 10 倍の効率化が実現されたことは、本研究テーマの主部分ではないものの、新規かつインパクトの高い成果であると考えられる。

Lmx1a-EGFP knock-in マウスの解析結果をまとめた上での論文投稿を予定している。

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 2 件)

- ① Shunmei Chiba, Erika Takada, Mamoru Tadokoro, Taizo Taniguchi, Keiichi Kadoyama, Noboru Suzuki, Seiya Kato: Loss of Dopaminoreceptive Neurons causes L-dopa Resistant Parkinsonism in Tauopathy (Neurobiology of Aging, resived、査読有)
- ② Takenokuchi M, Kadoyama K, Chiba S, Sumida M, Matsuyama S, Saigo K, Taniguchi T. SJLB mice develop tauopathy-induced parkinsonism. Neurosci Lett. 2010 473:182-185、査読有。

[学会発表] (計 3 件)

- ① 千葉俊明、田所衛、鈴木登、加藤誠也: タウ型認知症における難治性パーキンソニズムの組織・病理学的検討。第 100 回日本病理学会、2011 年 5 月、横浜。
- ② 千葉俊明、谷口泰造、田所衛、鈴木登、加藤誠也: Loss of Dopaminoreceptive Neurons causes L-dopa Resistant

Parkinsonism in Tauopathy. 第29回分子
病理研究会、2010年7月、筑波。

③ 千葉俊明、谷口泰造、鈴木登：認知症モ
デルマウスにおける移植治療への検討。第
9回日本再生医療学会、2010年3月、広島

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：非ヒトモデル動物を用いたパーキン
ソン症候群の検査方法

発明者：谷口泰造、千葉俊明

権利者：谷口泰造

種類：特許

番号：9-11271717

出願年月日：2009年8月21日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 俊明 (CHIBA SHUNMEI)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20367361