

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890282
 研究課題名（和文） Wnt シグナルを利用した ES 細胞からドーパミン産生神経の誘導法の開発
 研究課題名（英文） Development of the method of dopaminergic neuron induction from ES cells using Wnt signaling pathway
 研究代表者
 林 英樹（HAYASHI HIDEKI）
 財団法人田附興風会・医学研究所 第6研究部・研究員
 研究者番号：70510642

研究成果の概要（和文）：

パーキンソン病に対する細胞移植治療を研究するため、胚性幹細胞をマウス由来の PA6 細胞と共培養してドーパミン産生神経に分化させる方法が使用されてきた。臨床応用ではマウスの細胞を使用することができないため、分化誘導の機序を解明する必要がある。我々は PA6 から分泌される Wnt シグナルを調べ、Wnt5a と sFRP1 が神経分化誘導に協調的に働いていることを突き止めた。今後、マウス細胞を使用しない化学的に決定された方法でドーパミン産生神経を誘導することが可能になるであろう。

研究成果の概要（英文）：

For the research of cell transplantation therapy for Parkinson's disease, the method of coculture with mouse derived PA6 cells has been used for the differentiation of embryonic stem (ES) into dopaminergic (DA) neurons. For the clinical application, nevertheless, it is impossible to use PA6 cells derived from mouse, the molecular mechanism of the method should be revealed.

We investigated the roles of Wnt-related molecules and revealed that PA6 cells secreted Wnt5a and sFRP1, and both of them cooperatively induced neural stem cells from mouse ES cells. These results will lead to understanding the mechanism of SDIA and provide a new chemically defined method of DA neuron induction from ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：移植・再生医療、脳神経疾患、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病などの神経難病の治療法として細胞移植による機能再生が期待されており、移植細胞の候補として高い増殖能と多分化能をもつ幹細胞の利用が考えられている。特にES細胞（胚性幹細胞）からはパーキンソン病治療に必要なドーパミン産生神経が効率よく分化誘導され、動物モデル（ラット、カニクイザル）に対する移植実験で行動改善が報告されている。ただし、この効率的な神経誘導にはマウス骨髄由来フィーダー細胞であるPA6との共培養が必要であり（stromal cell-derived inducing activity, SDIA法）、病原体伝播の危険性からこの方法は臨床には用いられない。今後、PA6を用いることなく異種細胞を含まない分化誘導法が開発されることが期待される。

2. 研究の目的

これまでの研究でマウス髄膜細胞がES細胞からドーパミン産生神経を誘導することを示し、SDIA法に共通する機序としてWnt5aが重要な働きをしていることを示した。Wntシグナルに着目することにより、他のWntシグナル因子もPA6が産生していることが分かってきた。これまでSDIA法の機序は不明であったが、今後、PA6を用いることなく異種細胞を含まない分化誘導法が開発されることが期待される。

本研究の目的は、この神経分化誘導のメカニズムを解明し、動物由来因子を含まない臨床応用可能な神経誘導法を確立することにある。

3. 研究の方法

(1) PA6細胞のconditioned mediumによる神経誘導

マトリゲルを基質としてマウスES細胞を培養し、PA6 conditioned mediumがES細胞の分化に与える影響を調べる。その存在により、神経幹細胞、中脳神経、腹側中脳神経、ドーパミン産生神経前駆細胞、ドーパミン産生神経への分化がどのように変化するかを免疫染色およびreal time PCRを用いて詳細に検討する。

(2) PA6細胞が産生するWntタンパクの同定と神経誘導に対する影響の検討

PA6細胞が産生するWntタンパクをRT-PCRおよびウェスタンブロットによって同定する。さらにそのリコンビナント蛋白を分化誘導中のES細胞培養培地に添加し、中脳神経、腹側中脳神経、ドーパミン産生神経前駆細胞、ドーパミン産生神経それぞれの分化ステージごとにおける分化への影響を免疫染色およびreal time RT-PCRにより検討する。同時にWntタンパクの中和抗体やRNA

干渉によってWntシグナルを抑制することにより分化への影響も検討する。

(3) ES細胞に発現するWnt受容体の発現の検討

これまでのところES細胞の分化過程におけるWntの受容体Frizzled、LRP5/6などの発現は検討されていないため、まずRT-PCRでスクリーニングして、さらに免疫染色で確認する。

(4) ES細胞におけるWntシグナルの伝達の解析

Wntタンパクにmyc-tagをつけたリコンビナント蛋白を発現させるための各種ベクターを作成し、マウスES細胞に遺伝子導入して機能解析を行う。また、リコンビナント蛋白を作成・精製し、各分化ステージでのWnt受容体との結合を、蛍光免疫組織染色および免疫沈降を用いて検討する。Wntシグナルにはcanonical経路、non-canonical経路としてPCP経路、Ca²⁺経路が知られており、どのシグナルを介して神経誘導およびドーパミン産生神経誘導がなされるかをウェスタンブロットにて解析を行う。

4. 研究成果

まず、PA6細胞の分泌因子がどの分化段階で働くかを調べるため、マトリゲルを基質としてPA6のConditioned mediumを添加してマウスES細胞を培養し、免疫染色およびreal time PCRを用いて検討した。その結果、分泌因子は神経幹細胞の誘導、中脳神経への誘導に働いているが、腹側中脳神経への誘導はむしろ抑制していた(図1)。

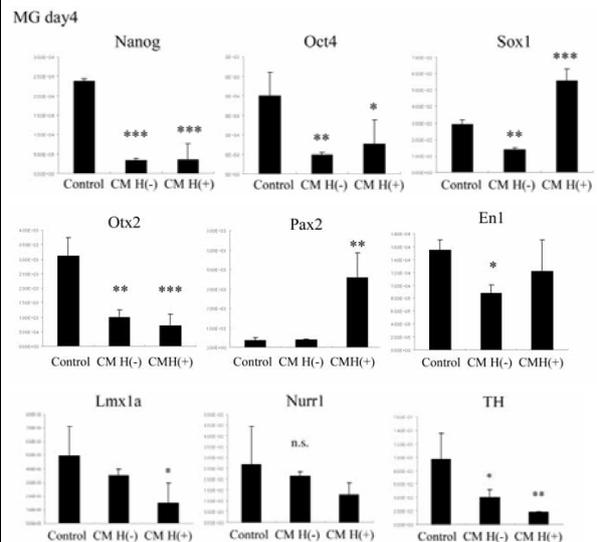


図1 PA6のconditioned mediumを添加して分化誘導したES細胞に対して行ったreal time PCR

分泌因子のうち、Wnt シグナルに関する因子をスクリーニングしたところ、Wnt5a と sFRP1 の発現を RT-PCR およびウェスタンブロットで同定した (図 2)。

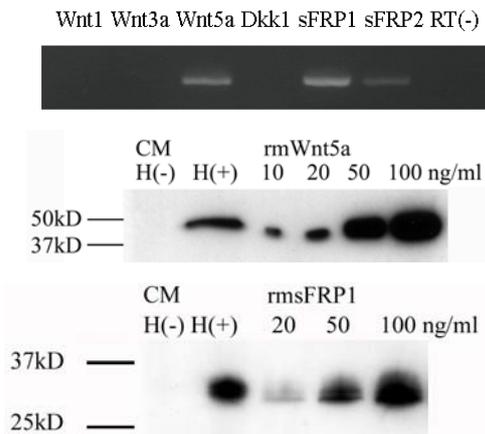


図 2 PA6 の RT-PCR (最上段)
PA6 の conditioned medium に対する Western blotting (中・下段)

PA6 細胞の分泌因子のうち Wnt に関連する因子では Wnt5a と sFRP1 が未分化 ES 細胞の神経分化誘導において重要な役割を果たしていることを突き止めた。神経幹細胞に誘導されると蛍光発色する Sox1-GFP knock-in mouse ES 細胞を FACS で解析することにより、Wnt5a および sFRP1 とともに協調的に神経誘導に作用することが分かった。sFRP1 は通常 Wnt のアンタゴニストとして働くが、Wnt5a の神経分化誘導能を促進することが分かった (図 3)。

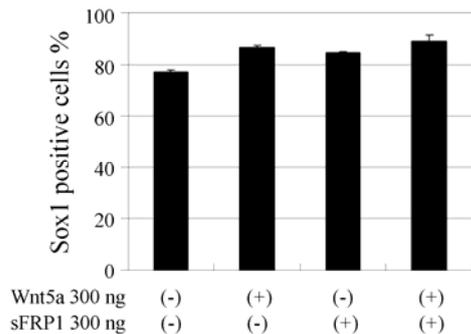


図 3 Wnt のリコンビナント蛋白を添加して未分化 Sox1-GFP ES 細胞を分化させ、FACS により解析を行った。

また、RNA 干渉により Conditioned medium 中の Wnt 関連蛋白を knock-down すると神経誘導作用は低下し、リコンビナント蛋白を加えることにより作用が回復することが分かった (図 4)。

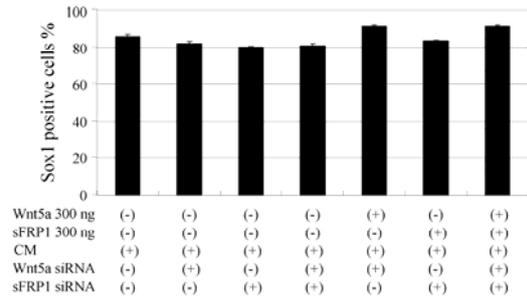


図 4 Wnt のリコンビナント蛋白と RNAi で Wnt5a と sFRP1 を抑制した PA6 の conditioned medium を添加して未分化 Sox1-GFP ES 細胞を分化させ、FACS により解析を行った。

Wnt5a に myc tag を付加したベクターを ES 細胞に誘導すると発現量が適切なものでは神経系への分化が促進されるが、過剰に発現させるとむしろ神経誘導は抑制されて内胚葉系への分化が促進された (図 5)。

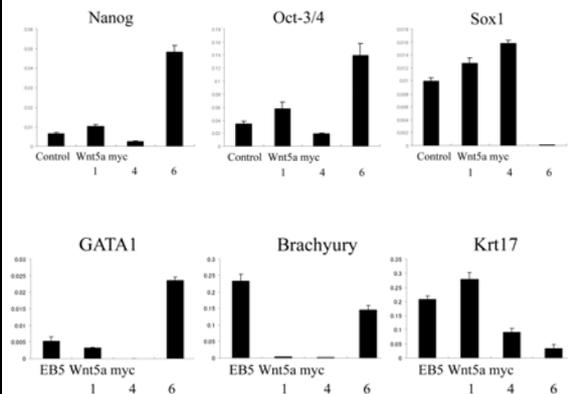


図 5 Wnt5a-myc 遺伝子の発現量が異なる細胞株を作成して 3 日 (上段)、6 日 (下段) 分化させて、real time RT-PCR を行った。

次に定量的 real time RT-PCR で分化過程の ES 細胞に発現する Wnt 受容体の mRNA の発現量を調べると、未分化 ES 細胞から神経幹細胞へ分化誘導するまでに 4 日を要するが、分化途中の 2 日目の細胞では Frizzled (Fz) 2、Fz7、Fz8、LRP5、Ror2 が強く発現していることが分かった (図 6)。免疫染色でも蛋白レベルでの発現が確認された。

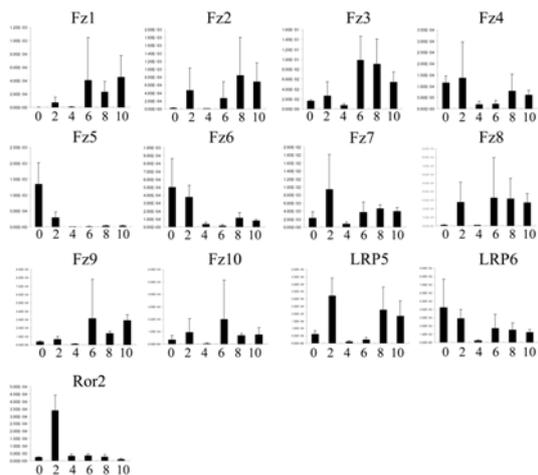


図6 未分化ES細胞をSDIA法で2、4、6、8、10日分化させた細胞に対してreal time RT-PCRを行った。

また2日目では神経幹細胞誘導に必要なOct4は陽性だが、ES細胞の未分化維持に必要なNanogが消失していることを免疫染色で確認した(図7)。

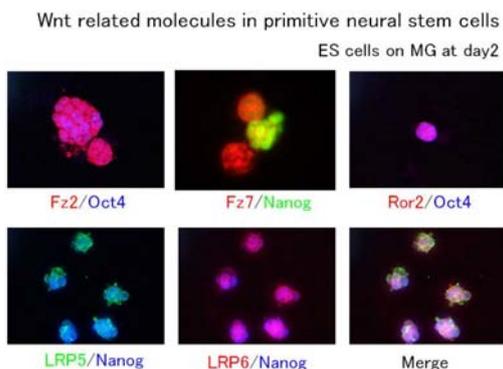


図7 未分化ES細胞を神経に分化させる際に、2日目の細胞に対して行った免疫染色

特定のWnt受容体が発現していることにより、Wnt5aとsFRP1が協調して未分化ES細胞から神経への誘導がなされるものと考えられた。

これまでヒトES細胞からの神経誘導にマウス由来のPA6細胞を利用していたが、PA6細胞から分泌されて神経分化誘導を促進するWnt5aとsFRP1を培養液に直接入れることにより純粋な培養系を開発することが可能となった。

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)

[学会発表] (計3件)

① 林 英樹、Wnt5a and sFRP1 induce neural cells from embryonic stem cells:

The mechanism of stromal cell-derived inducing activity (SDIA)、第40回米国神経科学学会年次集会、2009年10月19日、McCormick Place convention center (Chicago, USA)

② 林 英樹、Wnt5aとsFRP1はES細胞から神経を誘導する：SDIAのメカニズム、第68回日本脳神経外科学会学術総会、2009年10月14日、京王プラザホテル(東京都)

③ 林 英樹、Wnt5aとsFRP1はES細胞から神経を誘導する：SDIAのメカニズム、第67回日本脳神経外科学会学術総会、2008年10月3日、岩手県民会館(岩手県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 英樹 (HAYASHI HIDEKI)

財団法人田附興風会・医学研究所 第6研究部・研究員

研究者番号：70510642