

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791404

研究課題名（和文）

マーモセットをモデルとした多能性幹細胞由来神経幹細胞による脊髄損傷前臨床研究

研究課題名（英文）

Efficient derivation of neural stem/progenitor cells from common marmoset embryonic stem cells for preclinical study of spinal cord injury.

研究代表者

嶋田 弘子 (SHIMADA HIROKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：60528644

研究成果の概要（和文）：

本研究では、コモンマーモセット ES 細胞から神経幹細胞へと効率良く分化誘導する方法を確立した。得られた神経幹細胞は自己増殖能を持ち、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出すことが可能であった。また、ES 細胞から分化誘導に伴い、遺伝子発現プロファイルが胎児由来ニューロスフェアに近づいていることが示された。従って、マーモセット ES 細胞から、*in vitro* で神経発生をある程度再現しながら、胎児由来ニューロスフェアに近い性質を持つニューロスフェアへと分化誘導することができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We established *in vitro* culture method to efficiently derive multipotent neural stem/progenitor cells (NS/PCs) from non-human primate, common marmoset embryonic stem cells (ESCs). These marmoset ESC-derived neurospheres could be passaged repeatedly and sequentially gave rise to neurons and glial cells, including both astrocytes and oligodendrocytes. Importantly, marmoset ESC-derived NS/PCs could generate functional neurons, and showed closer expression profiles to fetal brain-derived neurospheres by repeated passages. Thus, this culture system is applicable to derive donor cells for allograft transplantation into marmoset models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

コモンマーモセットは小型の霊長類で、生理学的、解剖学的にヒトに近く、霊長類の中では際立って繁殖率が高い。また実験動物用繁殖コロニーが存在するため、遺伝学的に比較的均一な個体を複数匹そろえることが可能である。これらの理由から、前臨床研究モデル動物として最適な霊長類の実験動物である。我々はこれまでに、コモンマーモセット脊髄損傷モデルの作製、および評価系を確立しており、亜急性期におけるヒト胎児由来神経幹細胞移植の有効性を報告している。しかしながら、ヒト胎児からは少量の細胞しか得られず、倫理的にも問題がある。そこで、ヒト ES/iPS 細胞由来神経幹細胞を脊髄損傷モデルマウスに移植し、その有効性を確認した (Nori et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2011)。しかし、異種間での移植のため、厳密に安全性、特に腫瘍化の問題を評価することは難しい。一方、マウスの細胞をマウスに移植した実験は、げっ歯類と霊長類では大きな隔りがあるため、ヒトに応用することができない。ヒトの細胞をマウスに移植した研究は、異種間移植のため、厳密な意味での安全性の評価は難しい。ヒトの細胞をヒトに移植することは不可能である。コモンマーモセットの細胞をコモンマーモセットに移植する本研究は、霊長類における同種間移植であり、安全性、有効性を厳密に評価することが可能である。

これらの知見をもとに、本研究では、コモンマーモセット ES/iPS 細胞から、神経幹細胞への分化誘導法の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、まず、コモンマーモセット ES/iPS 細胞から、脊髄損傷部位への移植最適な神経幹細胞への分化誘導法を開発する。そ

して分化誘導した神経幹細胞を、コモンマーモセット脊髄損傷モデルへ同種間移植することにより、詳細に神経幹細胞移植の有効性、特に安全性を評価することを目的としている。

3. 研究の方法

我々はコモンマーモセット ES 細胞および iPS 細胞を、複数株樹立している。共同研究者である岡田らが開発した、マウス、ヒト ES/iPS 細胞からの、胚様体形成を介してニューロスフェアを形成する神経幹細胞への分化誘導法をもとに、コモンマーモセット ES/iPS 細胞から、脊髄損傷部位への移植に最もふさわしい神経幹細胞への分化誘導法の開発を行う。分化誘導した細胞は、免疫染色、RT-PCR によってその性質を詳細に検証する。そして、分化誘導した神経幹細胞を、コモンマーモセット脊髄損傷モデルに移植し、下肢運動機能評価を経時的に行い、移植の有効性を評価する。また、移植細胞の生着や生体内での分化傾向、また長期観察により腫瘍化について、免疫組織染色等を用いて解析を行う。

4. 研究成果

我々はこれまでに、コモンマーモセット ES 細胞および iPS 細胞を複数ライン樹立した (Sasaki et al, Stem Cells, 2005, Tomioka et al, Genes Cells, 2010)。また、共同研究者の岡田らによって確立された方法で、マウス/ヒト ES 細胞を神経幹細胞へと分化誘導し、培養することに成功している (Okada, et al, Stemcells, 2008)。この方法をもとに、

我々が樹立したコモンマーモセット

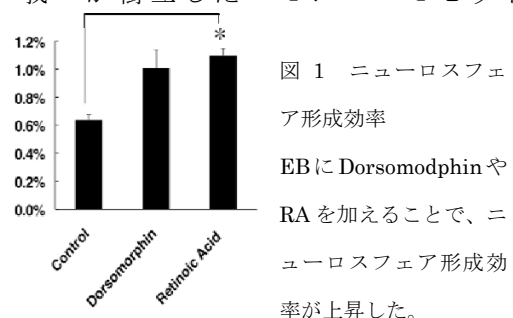


図 1 ニューロスフェア形成効率
EBにDorsomorphinやRAを加えることで、ニューロスフェア形成効率が上昇した。

ES/iPS 細胞から胚葉体(Embryoid Body; EB) 形成を介して神経幹細胞へと分化誘導する方法の開発を行った (Shimada et al, in preparation)。その結果、EB 形成の際に、BMP のマスキング因子である Noggin と同様の生理活性を持つ Dorsomorphin、あるいは、レチノイン酸を加えることにより、ニューロスフェア形成効率が上昇することが示された (図 1)。得られたニューロスフェアは、一次ニューロスフェアから二次ニューロスフェア、三次ニューロスフェアへと継代することが可能であり、自己増殖能を持つことが示された。それぞれのニューロスフェアを 10 日間、接着培養し、神経細胞へと分化させ免疫細胞染色により分化傾向を解析したところ、一次ニューロスフェアからは主にニューロンが、二次ニューロスフェアからは、ニューロンに加えてアストロサイトが生み出されることが明らかとなった (図 2)。

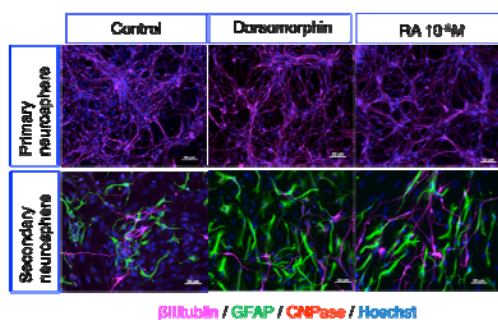


図 2 マーモセット ES 細胞由来ニューロスフェアの分化傾向を示す免疫染色像

Primary neurosphere からは主にニューロンが、Secondary neurosphere からはニューロンに加えてアストロサイトが生み出された。

これは、中枢神経系の発生において、まずニューロンが産生され、遅れてグリア細胞が産生される現象を、*in vitro* で再現しているものと考えられる。また培養条件を工夫することで、オリゴデンドロサイトを生み出すことのできるニューロスフェアの分化誘導にも

成功した (図 3)。

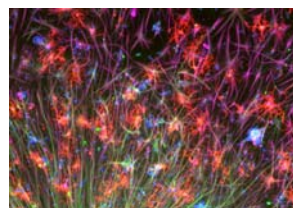


図 3 マーモセット ES 細胞由来ニューロスフェアからオリゴデンドロサイトへの分化を示す免疫染色像
培養条件をさらに改良したところ、O4 陽性のオリゴデンドロサイトを生み出すことのできるニューロスフェアを得ることができた (β III tubulin / GFAP / O4 / Hoechst)。

この方法により得られたニューロスフェアについて、分化の各段階における遺伝子発現プロファイルを調べるためにマイクロアレイを行い、マイクロアレイのデータから主成分解析(PCA)を行った。その結果、ES 細胞から分化誘導に伴い、遺伝子発現プロファイルが胎児由来ニューロスフェアに近づいていることが示された(図 4)。

これらの結果より、マーモセット ES 細胞から、*in vitro* で神経発生をある程度再現しながら、胎児由来ニューロスフェアに近い性質を持つニューロスフェアへと分化誘導することができたと考えられる。

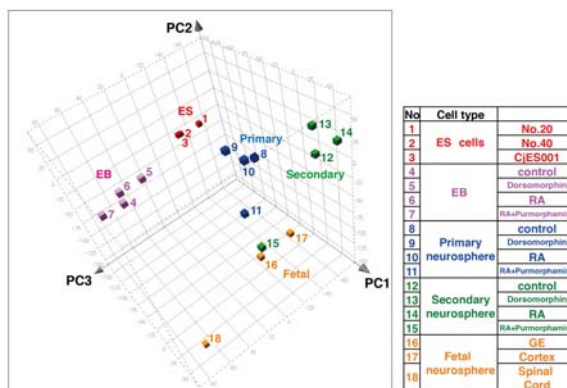


図 4 マイクロアレイデータの主成分解析による遺伝子発現プロファイルの変移

また、マーモセット iPS 細胞のいくつかのラインにおいても、この方法により神経幹細胞へと分化誘導が可能であった。

今後、マーモセット ES 細胞由来ニューロスフェアをマーモセット脊髄損傷モデルへ同種移植することにより、機能評価に加えて免疫抑制、腫瘍化の問題を詳細に検証し、再生医療実現に近づきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. Hiroko Shimada, Yohei Okada, Hayao Ebise, Shin-ichi Ota, Ikuo Tomioka, Erika Sasaki, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano
"Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells."
Frontiers in Biomedical Researches on Marmosets as a Primate Model
Japan Society for Marmoset Research
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, 2012. 2/20-21
2. Hiroko Shimada, Yohei Okada, Hayao Ebise, Shin-ichi Ota, Ikuo Tomioka, Erika Sasaki, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano
"Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells."
Neuroscience 2011, SfN's 41st annual meeting
The Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, U.S.A., 2011. 11/12-16

3. Hiroko Shimada, Yohei Okada, Ikuo Tomioka, Erika Sasaki, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano
"Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells."
Neuroscience2011, Yokohama, 2011, 9/14-17

4. Hiroko Shimada, Yohei Okada, Ikuo Tomioka, Erika Sasaki, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano
"Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells."
ISSCR 9th Annual Meeting, Toronto, Canada, 2011, 6/15-18

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 弘子 (SHIMADA HIROKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号：60528644