

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年～2009 年
 課題番号：19790716
 研究課題名 (和文) シスタチン C を用いたヒト胚性幹細胞由来の神経幹細胞作製の基盤研究
 研究課題名 (英文) Study on generation of neural stem cells from human embryonic stem cells by using Cystatin C.
 研究代表者
 加藤 竹雄 (KATO TAKEO)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：60422945

研究成果の概要：

ヒト胚性幹細胞からの Cystatin C を用いて神経幹細胞作製に応用出来るかを評価するべく実験を行なった。ヒト胚性幹細胞では効率良く分化誘導する事が出来ず、その問題点について検討を行なっているところである。新生児マウス精巣由来の多能性幹細胞 (MGS 細胞) を用いて神経幹細胞分化誘導の基盤研究を行なった。シスタチン C を用いる事によって無血清培養条件で多分化能、自己増幅能を有する細胞塊を効率良く形成する事ができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	0	2,000,000
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7212

キーワード：胚性幹細胞、神経分化

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患など、変性、または損傷を受けた中枢神経を再生させる事はこれまで不可能な事であり、その治療は対症的なものであった。しかしながら、近年の再生医学の進歩によって、これまで難治とされていた中枢神経系疾患の治療において神経幹細胞移植などの再生医療を用いた研究が精力的におこなわれている。実際に、パーキンソン病罹患

者に対して、中絶したヒト胎児脳から分離したドーパミン作動性ニューロンを用いたパーキンソン病罹患患者への移植治療が既に行なわれており、いくつかのグループからその有効性についての報告がされている。しかしながら、中絶胎児を用いていることの倫理的問題をはじめ、供給面、感染、拒絶反応など様々な問題点が臨床応用に立ちはだかっている。これらの問題点を解消すべく、新たな

幹細胞移植の担い手として注目を浴びているのが胚性幹細胞 (ES 細胞) であり、その現実化が大きく期待されている。ES 細胞は生体のあらゆる組織に分化し得る能力を維持しながら、ほぼ無尽蔵に増殖する性質を有する細胞であり、近年では霊長類においてもその樹立が確立されている。ES 細胞から神経系への分化誘導法に関する研究は多数報告されているが、その培養法の便宜性、安全性など様々な問題点があげられている。臨床応用に向けて無血清培用条件下で液性因子のみによって目的とする神経細胞へ特異的に誘導する基盤技術の確立が求められている。

我々は、神経幹細胞から分泌されるシスタチン C によって無血清下で効率よくマウス ES 細胞を神経幹細胞へ分化誘導させる基盤技術を確立した (Kato, T., Heike, T., Nakahata, T. (他 9 名省略, 1 番目) A Neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. PNAS 103: 6019-6024.)。シスタチン C によって分化誘導された神経幹細胞は様々な成熟神経細胞へ分化する能力を有しており、その中でもドーパミン作動性神経細胞へ優位に分化する特徴を有していることが判っている。この分化誘導法では他の細胞と共培養せず、また血清を用いていないという点、RA など神経毒性のある因子を使用していないという点から安全性に優れた方法であり、中枢神経を構成する Neuron、Astrocyte、Oligodendrocyte の 3 系統への多分化能を維持しながら細胞増殖する事が可能であるという点より今後の神経系疾患への再生医療において有用な培養技術であると考えている。

2. 研究の目的

本研究ではシスタチン C 用いて、ヒト ES 細胞、更には胎児精巣細胞起源の ES 細胞 (MGS cells: Multipotent Germline Stem cells) を無血清培養条件下で神経幹細胞へ分化誘導すること、さらに様々な神経細胞に特異的に分化誘導する基盤技術の開発を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞、マウス MGS 細胞の維持培養

Feeder 細胞上に付着培養を 7 日間行なう。Feeder 細胞として OP9、MEF (mouse embryonic fibroblast) を用いる。培養液は DMEM+15%FCS+non-essential amino acids+ 2ME を用い、成長因子 LIF を加える。

(2) ヒト ES 細胞、マウス MGS 細胞の神経細胞誘導培養

先の維持培養で形成されたヒト ES 細胞、マウス MGS 細胞をトリプシン処理し、単一細胞に分離させる。その後、Gelatin 培養皿で 4-6 日間付着培養させる。その時の培養液は DMEM+15%FCS+non-essential amino acids+ 2ME で成長因子として LIF を用いる。

その後、トリプシン処理し、単一細胞に分離させ、無血清培養 (DMEM/F12+insulin+transferrin+glucose+progesterone+putrescine+selenium) 条件下で 14 日間培養を行なう。この間成長因子 (FGF2 + EGF + リコンビナント cystatin C) を 2 日毎加える。

(3) 神経細胞分化培養

無血清培養条件下で Gelatin 培養皿に付着培養させる。

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞からの神経細胞分化誘導

ヒト ES 細胞を無血清培養条件下で培養したところ、ほとんどの細胞は死滅した。無血清培養に移行する前に、ヒト ES 細胞を血清下培養で Hanging drop 法を用いて小細胞塊を一端形成した後に、無血清培養に移行させても同様に、無血清培養で培養維持させる事は出来なかった。

ヒト ES 細胞の神経系分化誘導を行なうためには付着培養等の培養条件の検討が必要である。

(2) 胎児精巣細胞起源の多能性幹細胞 (Multipotent Germline Stem Cells (MGS 細胞)) からの神経幹細胞への分化誘導

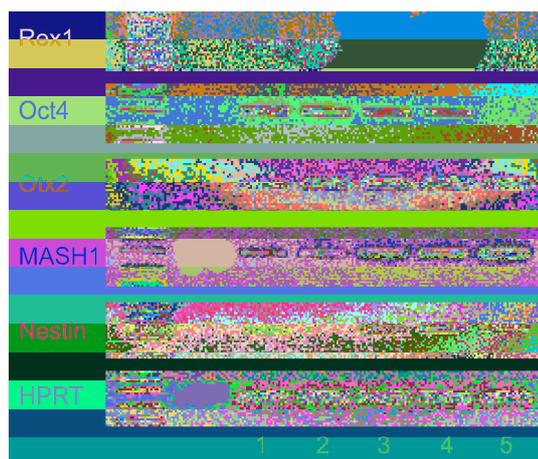


Fig.1. MGS 由来の sphere の遺伝子発現形式
Lane 1: ES 細胞、Lane 2: MGS 細胞、Lane 3, 4: MGS 由来の sphere、Lane 5: マウス Primary neurosphere

①MGS 細胞を Cystatin C 存在下、無血清培

養条件で 14 日間培養することによって、細胞塊 (sphere) を形成する事が出来た。

この細胞塊が神経幹細胞の特徴を有しているかどうか評価するため、未分化細胞特異的マーカーとして Rex1, Oct4、早期神経系マーカーとして Otx2、MASH1、神経幹細胞に特異的なマーカーとして Nestin の遺伝子発現形式を RT-PCR 法を用いて評価した。MGS 由来の細胞塊の遺伝子発現形式はマウス Primary neurosphere とほぼ同じである事が判った。また、未分化細胞特異的なマーカーの発現が認められない事が判明した (Figure 1)

② Cystatin C 存在下、無血清培養条件で形成された MGS 由来の sphere が神経幹細胞の特徴の 1 つである多分化能 (Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte の 3 系統の神経細胞に分化可能) を有しているかを評価した。神経分化培養条件下で培養する事によって Neuron に特異的な Tuj、Astrocyte に特異的な GFAP、Oligodendrocyte に特異的な MBP を用いて免疫細胞組織染色を行なった。Figure 2 に示すように MGS 由来の sphere は Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte に分化する事が可能であることが判明した。

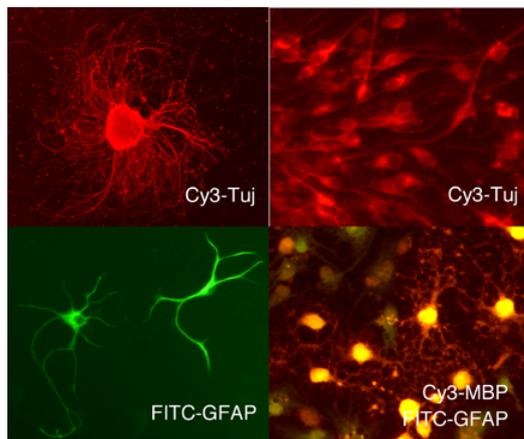


Fig. 2

また、多分化能の評価として MGS 由来の sphere の発現される遺伝子表現マーカーを RT-PCR 法を用いて評価したところ、Neuron に特異的な Tuj, MAP2、Astrocyte に特異的な GFAP、Oligodendrocyte に特異的な Gal C を発現している事が判明した。従って、MGS 由来の sphere は神経幹細胞と同様な多分化能を有している事が判明した。

③ この MGS 由来の sphere は無血清培養条件下で少なくとも 3 継代は維持することが出来た (Figure 3)。

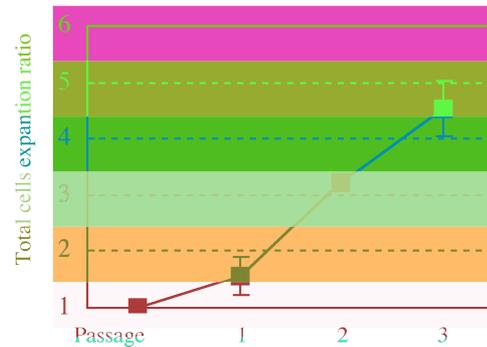


Fig. 3

この継代して形成された sphere は神経分化誘導することによって Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte の 3 系統の神経細胞に分化することが可能であり、また RT-PCR 法によって Tuj, MAP2, GFAP, Gal C を発現している事が判明した。従って、本培養法で形成された MGS 由来の sphere は自己増幅能を有していることが判明した。

以上より MGS 細胞もマウス ES 細胞と同様に Cystatin C を用いて無血清培養条件下で神経幹細胞を分化誘導する実験系を確立する事が出来た。

④ この MGS 由来の細胞はドーパミン産生細胞に特異的なチロシンヒドロキシゲナーゼ (TH) 陽性細胞にも分化する事が可能である事も判明した (Figure 4)。

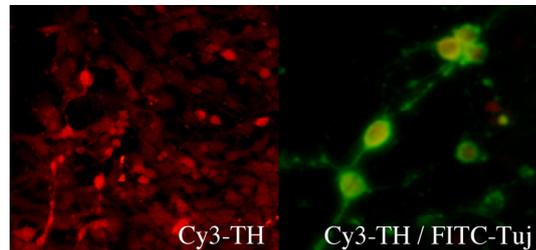


Fig. 4.

MGS 細胞は遺伝子操作を用いずに作製されているという点、体性幹細胞を用いていることから、将来的な移植治療において拒絶という問題点を回避出来るという点で非常に優れたツールである。現在、この MGS 細胞由来の神経幹細胞を用いて、パーキンソンモデルマウス、脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を準備中である。

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 件)

① Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis.

Kanatsu-Shinohara, M., Kato, T., Heike, T., Nakahata, T., Shinohara, T. (他 13 名省略、8 番目) Cell. 119: 1001-1012. 2004. 査読有

②A Neurosphere-derived factor, Cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. Kato, T., Heike, T., Nakahata, T. (他 9 名省略、1 番目) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 6019-6024. 2006. 査読有

③ヒト ES 細胞を用いた造血幹細胞や神経幹細胞への分化誘導 平家俊男, 梅田雄嗣, 加藤竹雄, 中畑龍俊 医学のあゆみ, 220(2) : 186-190, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 竹雄 (KATO TAKEO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 60422945

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし