

機関番号：22604
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度
課題番号：20500339
研究課題名 (和文) ヒト ES 細胞から神経幹細胞・神経細胞への新規分化誘導法の確立
研究課題名 (英文) Establishment of a new method to induce differentiation from human ES cells into neural stem cells and neurons
研究代表者
井上 順雄 (INOUE NOBUO)
首都大学東京・人間健康科学研究科・教授
研究者番号：50159985

研究成果の概要 (和文)：新規培養法を確立し、ヒト ES 細胞を一方向的に神経系細胞へ分化誘導し、均質な神経幹細胞を大量に調製することができた。この神経幹細胞は、選択的に神経細胞 (主にドーパミン作動性神経細胞) に、あるいは、アストロサイトに分分化誘導することが可能であった。さらに、その培養法の基本的な培養条件をわずかに変えることによって、ヒト ES 細胞を脳の領域が異なる様々な種類の神経系細胞に分分化誘導できる可能性を開いた。

研究成果の概要 (英文)：We have developed a new method to induce uni-directional differentiation from human ES cells into neural cells and to prepare a large amount of homogeneous neural stem cells. The neural stem cells could be selectively induced to differentiate into neurons, mainly dopaminergic neurons, or astrocytes. We have also opened the possibility that human ES cells can be differentiated into many different types of neural cells by simply modifying the basic culture conditions of the method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学・神経薬理

キーワード：幹細胞生物学・再生・修復

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) 由来の神経系細胞の移植による再生医療は、難治性神経疾患の治療法として有望である。しかし、その治療の実現のためには、ヒト ES 細胞を神経系へ分化させ、移植用の神経系細胞を大量に調製する新たな技術を確立する必要がある。

2. 研究の目的

マウスおよびサル ES 細胞について独自に確立した ES 細胞から神経系細胞への一方

向的分化誘導法である NSS 法 (neural stem sphere 法) を基にして、ヒト ES 細胞から神経幹細胞および神経細胞を分化誘導する。そして、調製した細胞の生物学的・神経科学的特徴を明らかにして、移植用細胞として安全な神経系の領域に特異的な種々の神経幹細胞・神経細胞の調製法を確立することを目的とする

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞から神経幹細胞・神経細胞

への分化誘導培養

マウスおよびカニクイザル ES 細胞で成功した方法に従い、フィーダー細胞上に培養したヒト ES 細胞の塊を、フィーダー細胞上から取り上げ、塊のまま、非接着性ディッシュ中のアストロサイト条件培地 (ACM) の中に移して 12~20 日間浮遊培養する。浮遊培養によって、ES 細胞塊から球状の細胞集合体 (neural stem sphere: NSS) を形成させ、その細胞集合体の中で ES 細胞から神経系細胞への分化が引き起こす。分化の過程を解析するために、細胞集合体から mRNA を抽出し、種々の細胞のマーカ―遺伝子を特異的に認識するプライマーを使用するリアルタイム RT-PCR 法を用いて、その mRNA 量を測定する。さらに、細胞集合体の凍結切片を作成し、固定後、種々の細胞のマーカ―となるタンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、細胞集合体内における細胞の種類を同定し、その局在を解析する。

(2) ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞の調製と神経細胞への分化誘導

ACM 中で浮遊培養してヒト ES 細胞塊から形成させた NSS を、マトリゲルコートしたディッシュ上に接着させ、神経幹細胞の増殖因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含む培養液中で培養して、接着した NSS の周囲に細胞を遊走させる。遊走した細胞を回収し、bFGF 存在下で培養し増殖させることによって均質な神経幹細胞を調製する。異なる培養液中で培養することによって、神経幹細胞から神経細胞あるいはアストロサイトへ分化誘導する。細胞の種類を同定は、細胞の mRNA をリアルタイム RT-PCR 法により解析することにより行い、さらに、細胞種に特異的な抗体を用いた蛍光免疫染色による解析も行う。

(3) ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞・神経細胞の生物学的・神経科学的特徴の解析

脳領域に特異的な種々の神経系細胞の分化誘導を目的にして、神経幹細胞の形成期である浮遊培養期間における培養条件を変え、その結果形成した NSS、さらに、NSS から調製される神経幹細胞および神経細胞の生物学的・神経科学的特徴を解析する。脳領域については、中枢神経系の前後軸に沿う、前脳、中脳、後脳、脊髄のマーカ―遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR によって解析する。神経細胞種の解析については、ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニン、GABA、アセチルコリン作動性神経細胞のマーカ―遺伝子の発現を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞から神経幹細胞・神経細胞

への一方向的な分化

NSS 法に従い、ヒト ES 細胞の塊を ACM 中で浮遊培養することにより、球状細胞集合体 (neural stem sphere: NSS) を形成させた。浮遊培養の 20 日間に亘って、NSS の遺伝子発現を解析することにより、培養に伴って、ES 細胞のマーカ―遺伝子の発現が培養 5 日目までにほぼ無くなるのに対して、神経外胚葉、神経幹細胞のマーカ―遺伝子発現は培養 12 日目から、神経細胞のマーカ―遺伝子発現は培養 20 日目に顕著に増加しうことを明らかにした。一方、その浮遊培養期間中、内胚葉、中胚葉、上皮のマーカ―遺伝子発現は変化しなかった。さらに、NSS の切片の免疫染色法による解析によって、神経幹細胞が NSS の表層に存在するとともに、NSS の内部においても中空の球状細胞集合体として存在することを明らかにした。そして、その中空の球状細胞集合体には、神経細胞が存在することも明らかにした。一方、この分化誘導の過程で、アポトーシスがほとんど起こらないことも示した。すなわち、ヒト ES 細胞の塊を ACM 中で約 2 週間浮遊培養することにより、ヒト ES 細胞を神経系細胞に一方向的に分化誘導できることを明らかにした。

(2) ヒト ES 細胞から神経幹細胞の調製と神経幹細胞から神経細胞・アストロサイトへの分化誘導

12 日間の浮遊培養によってヒト ES 細胞の塊から形成した NSS を、ディッシュ上に接着させ、bFGF を含む培養液中で培養することによって、NSS の周囲に細胞を遊走させることができた。この細胞が、接着培養下では bFGF が存在すると対数増殖すること、一方、浮遊培養下では bFGF が存在すると neurosphere を形成すること、神経幹細胞のマーカ―遺伝子およびマーカ―タンパク質を発現することを明らかにして、この細胞が純度 90% 以上の均質な神経幹細胞であること証明した。さらに、その神経幹細胞は、神経細胞、特にドーパミン作動性神経細胞へ分化誘導できること、あるいは、アストロサイトへも分化誘導できることを明らかにした。さらに、そのヒトアストロサイトを用いて調製したアストロサイト条件培地を使用することにより、他の動物種由来のアストロサイト条件培地を使用しないでも、ヒト ES 細胞から均質な神経幹細胞を調製できることを示した。すなわち、ヒト ES 細胞からパーキンソン病治療に適した安全なドーパミン作動性神経細胞を分化誘導できることを明らかにした。

(3) ヒト ES 細胞からの脳領域に特異的な種々の神経幹細胞および神経細胞の分化誘導

神経幹細胞が主に存在し神経細胞はまだ

あまり存在しない時期である浮遊培養 12 日目のNSS と、神経幹細胞が増加し神経細胞の存在が顕著になる時期である浮遊培養 20 日目のNSS それぞれについて、脳領域に特異的マーカー遺伝子の発現を解析したところ、どちらのNSS も前脳および中脳のマーカー遺伝子を発現するが、前脳のマーカー遺伝子の発現は 12 日目の方が高く、逆に中脳のマーカーは、20 日目の方が高かった。それに対して、後脳や脊髄のマーカー遺伝子の発現は低値であった。しかし、浮遊培養 20 日目のNSS から調製した神経幹細胞、および、その神経幹細胞から分化させた神経細胞においては、前脳と中脳のマーカーの発現は消失したが、後脳のマーカー遺伝子を発現するようになった。さらに、神経細胞種に特異的なマーカー遺伝子発現については、浮遊培養 20 日目のNSS においてドーパミン作動性神経細胞マーカーの発現が顕著に見られたが、そのNSS 由来の神経細胞においては、発現が減少することを明らかにした。これに対して、浮遊培養 20 日目のNSS において、ノルアドレナリン、セロトニン、GABA、アセチルコリン作動性神経細胞のマーカーはほとんど発現しないにも関わらず、そのNSS に由来する神経細胞ではノルアドレナリン、セロトニン、GABA、アセチルコリン作動性神経細胞のマーカーの顕著な発現が見られた。

一方、浮遊培養 15 日目および 20 日目のNSS から調製した神経幹細胞では、どちらも神経幹細胞のマーカー遺伝子を発現したが、15 日目のNSS 由来の神経幹細胞の方が、未分化性に関係するマーカー遺伝子の発現がより高かった。一方、脳領域に関連するマーカーについては、15 日目のNSS 由来の神経幹細胞において、中脳、後脳、脊髄のマーカー遺伝子が顕著に発現した。これらの結果から、浮遊培養の進行に伴い、さらに、神経幹細胞調製および神経細胞への分化のための培養の進行に伴って、脳領域の後方化、生成する神経細胞種の変化が起こり、脳領域特異的な細胞の分化誘導に応用できる可能性が示唆された。さらに、日核実験として行ったマウス ES 細胞についての結果から、浮遊培養に ACM を用いるNSS 法（原法）では、中脳から後脳の領域の神経系への分化誘導が優位であるが、ACM を変えるNSS 法の変法によって、前脳から中脳の領域への分化誘導が優位であることを見出し、培養液を変えることにより、脳のより前方の領域への分化を誘導できることを示した。

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）

〔雑誌論文〕（計 19 件）

1. Otsu M, Sai T, Nakayama T, Murakami T, Inoue N: Uni-directional Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Neurons by the Neural Stem Sphere Method. *Neurosci Res*, (査読有) 69, 2011, 314-321.
2. Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M, Imaizumi N, Nakamura M, Toda T, Inuma M, Hirano H, Kondo Y, Suzuki Y, Inoue N: Proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in vitro. *Biochim Biophys Acta*, (査読有) 1814, 2011, 265-276.
3. Inoue N, Otsu M, Nakayama T: Differentiation of embryonic stem cells into the neuronal cells. *J Neurochem*, (査読無) 115 (Suppl. 1), 2010, 62.
4. Terashima M, Kobayashi M, Motomiya M, Inoue N, Yoshida T, Okano H, Iwasaki N, Minami A, and Matsuoka I: Analysis on the expression and function of BRINP family genes during neuronal differentiation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *J Neurosci Res*, (査読有) 15, 2010, 1387-1393.
5. 村上祐治, 細川健太郎, 祭友昭, 笠井久隆, 井上順雄: 骨中コラーゲン高親和性タンパク質の骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞の骨形成過程に及ぼす影響. *日本保健科学学会誌*, (査読有) 12, 2010, 237-244.
6. 祭友昭, 岩山賢一, 大津昌弘, 井上順雄, 笠井久隆: トリペプチドアルデヒド Z-Leu-Leu-Leu-HはマウスES細胞由来の神経幹細胞をニューロンへ分化誘導する. *日本保健科学学会誌*, (査読有) 12, 2010, 230-236.
7. 井上順雄: ES細胞から神経系細胞への分化誘導. *日仏工業技術*, (査読無) 55, 27-31, 2009.
8. Akama K, Horikoshi T, Nakayama T, Otsu M, Imaizumi N, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Suzuki Y, Inoue N: Proteomic characterization during neural differentiation from monkey embryonic stem cells into neurons in vitro. *J Neurochem*, (査読無) 110 (Suppl. 2), 2009, 232.
9. Kume N, Otsu M, Kobayashi H, Inada D, Yoshie T, Nakayama T, Suzuki Y, Kondo Y, Inoue N: Effects of Methylmercury on proliferation of mouse and monkey ES cell-derived neural stem cells. *J Neurochem*, (査読無) 110 (Suppl. 2), 2009,

- 52.
10. Omori H, Otsu M, Isono M, Kume N, Shinya F, Yoshie T, Nakayama T, and Inoue N: Effects of heat shock on proliferation and differentiation of mouse ES cell-derived neural stem cells. *J Neurochem*, (査読無) 110 (Suppl.2), 2009, 29.
 11. Isono M, Otsu M, 2, Konishi T, Nakayama T, Inoue N: Effects of X- irradiation on embryonic stem cells- derived neural stem cells. *J Neurochem*, (査読無) 110 (Suppl.2), 2009, 25.
 12. Inoue N, Otsu M, Kume N, Isono M, Shibata M, Sai T, Nakayama T, Momoki-Soga T, Kasai H: Unidirectional differentiation from human embryonic stem cells into neurons. *J Neurochem*, (査読無) 110 (Suppl.2), 2009, 25.
 13. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self- contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS One*, 4, 2009, (査読有) e6318 (1-8).
 14. Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y, Tsukada H: Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse*, (査読有) 63, 2009, 541-548.
 15. Otsu M, Kobayashi H, Inada D, Nakayama T, Inoue N: Effects of methyl- mercury on growth of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Neurosci Res*, (査読無) 61 (Suppl.1), 2008, S269.
 16. Nagano H, Shinya F, Otsu M, Ohtani H, Fukushi M, Nakayama T, Inoue N: Effects of X-irradiation on neural differentiation from mouse embryonic stem cells. *Neurosci Res*, (査読無) 61 (Suppl.1), 2008, S159.
 17. Horikoshi T, Nakayama T, Akama K, Otsu M, Nakamura M, Toda T, Inoue N: A proteomic approach to differentiation from monkey ES cells to neural stem sphere. *Neurosci Res*, (査読無) 61 (Suppl.1), 2008, S158.
 18. Isono M, Tanabe T, Otsu M, Ohtani H, Fukushi M, Nakayama T, Inoue N: Effects of X-irradiation on proliferation and maintenance of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Neurosci Res*, (査読無) 61 (Suppl.1), 2008, S130.
 19. Akama K, Tatsuno R, Otsu M, Horikoshi T, Nakayama T, Nakamura M, Toda T, and Inoue N: Proteomic identification of differentially expressed genes in mouse neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*, (査読有) 1784, 2008, 773-782.
- [学会発表] (計 33 件)
1. 吉江拓也: マウス胚性幹細胞由来の神経幹細胞の性質と細胞増殖因子の関係. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011 年 3 月 1 日.
 2. 上田理沙: ES 細胞からドーパミン作動性神経細胞への分化過程における脳領域形成関連遺伝子の発現解析. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011 年 3 月 1 日.
 3. Inoue N: Differentiation of embryonic stem cells into the neuronal cells. 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry (APSN 2010), Phuket Island, Thailand. 2010 年 10 月 20 日.
 4. 上田理沙: ヒト ES 細胞・iPS 細胞から神経系細胞への分化過程の解析と分化した神経系細胞の特徴付け. 第 20 回日本保健科学学術集会, 東京, 2010 年 10 月 9 日.
 5. 井上順雄: パーキンソン病の移植治療を目指すES細胞から神経細胞の分化誘導. 第 20 回日本保健科学学術集会, 東京, 2010 年 10 月 9 日.
 6. Shibata M: Effects of methyl mercury on the differentiation of monkey ES cell-derived neural stem cells. *Neuro2010*, 神戸, 2010 年 9 月 4 日.
 7. Yoshie T: Effects of FGF-2 and EGF on proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Neuro2010*, 神戸, 2010 年 9 月 3 日.
 8. Akama K: Proteomic characterization of monkey initial neurogenesis from embryonic stem cells to neural stem cells by neural stem sphere method. *Neuro2010*, 神戸, 2010 年 9 月 3 日.
 9. Isono M: Proliferation and differentiation of X-irradiated neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells. *Neuro2010*, 神戸, 2010 年 9 月 3 日.
 10. Omori H: Changes in proliferation and gene expression of mouse ES cell-derived neural stem cells after heat shock. *Neuro2010*, 神戸, 2010 年 9 月 3 日.
 11. 井上順雄: ES細胞から神経系細胞への分

- 化誘導法の開発とその応用. 荒川キャンパス産学交流会 2009, 東京, 2009年12月9日.
12. 大津昌弘: 初期神経発生過程で発現する新規神経分化マーカー遺伝子の探索. 第19回日本保健科学学術集会, 東京, 2009年9月19日.
 13. Omori H: Effects of heat shock on proliferation and differentiation of mouse ES cell-derived neural stem cells. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Busan, 2009年8月24日.
 14. Kume N: Effects of Methylmercury on proliferation of mouse and monkey ES cell-derived neural stem cells. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Busan, 2009年8月24日.
 15. Inoue N: Unidirectional differentiation from human embryonic stem cells into neurons. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Busan, 2009年8月24日.
 16. Isono M: Effects of X-irradiation on embryonic stem cells-derived neural stem cells. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Busan, 2009年8月24日.
 17. Akama K: Proteomic characterization during neural differentiation from monkey embryonic stem cells into neurons in vitro. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Busan, 2009年8月24日.
 18. Isono M: Biological effects of radiation on mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, 2009年6月23日.
 19. Shinya F: Effects of X-irradiation on differentiation from mouse embryonic stem cells into neuron. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, 2009年6月22-23日.
 20. Kume N: Effects of methyl mercury on proliferation of monkey ES cell-derived neural stem cells. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, 2009年6月22-23日.
 21. Omori H: Effects of heat shock on proliferation and differentiation of mouse ES cell-derived neural stem cells. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, 2009年6月22-23日.
 22. Otsu M: Dramatically different effects of methyl mercury on uni-directional differentiation from embryonic stem cells into neurons by Neural Stem Sphere method. 第52回日本神経化学学会大会, 群馬, 2009年6月22-23日.
 23. 井上順雄: ES細胞から神経細胞への一方的分化誘導法を用いる発達神経毒性試験研究. 第8回産学官連携推進会議, 京都, 2009年6月20-21日.
 24. 井上順雄: ES細胞から神経細胞への一方的分化誘導法を用いる発達神経毒性試験研究. 第8回国際医薬品原料・中間体展.TLO/大学知的財産本部 技術移転セミナー, 東京, 2009年4月22日.
 25. 大津昌弘: Neural Stem Sphere 形成を介したヒト胚性幹細胞の神経分化. 第8回日本再生医療学会総会, 東京, 2009年3月5-6日.
 26. 堀越朋恵: Neural Stem Sphere 法によるサル胚性幹細胞からの神経分化誘導過程のプロテオーム解析から得られた新発見. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学学会大会 合同大会 (BMB2008), 神戸, 2008年12月9-12日.
 27. Inada D: Effects of methyl mercury on neural differentiation from mouse embryonic stem cells by Neural Stem Sphere method. 第51回日本神経化学学会大会, 富山, 2008年9月11-13日.
 28. Otsu M: Uni-directional neural differentiation from human embryonic stem cells by Neural Stem Sphere method. 第51回日本神経化学学会大会, 2008年9月11-13日, 富山.
 29. 井上順雄: ES細胞を用いた神経毒性試験法の基礎検討. 第7回日本化学工業協会LRI研究報告会, 2008年8月1日, 東京.
 30. Horikoshi T, Nakayama T, Akama K, Otsu M, Nakamura M, Toda T, Inoue N: A proteomic approach to differentiation from monkey ES cells to neural stem sphere. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京.
 31. Isono M: Effects of X-irradiation on proliferation and maintenance of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京.
 32. Nagano H: Effects of X-irradiation on neural differentiation from mouse embryonic stem cells. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京.
 33. Otsu M: Effects of methylmercury on growth of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京.
- [図書] (計2件)
1. 大津昌弘, 中山孝, 井上順雄: ES細胞からの神経幹細胞・神経細胞の分化誘導—自

給型分化誘導法によるヒト細胞の安定供給— 幹細胞の分化誘導と応用, エヌ・ティイー・エス, 2009, 179-186.

2. Nakayama T, Otsu M, Inoue N: Neural Stem Sphere method. Stem Cell Application in Diseases Research, Ed Sorensen ML, Nova Science Publishers Inc. NY, USA., 2008, 33-40.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 神経系細胞の製造方法

発明者: 井上順雄, 中山孝, 鈴木豊, 近藤靖

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4439396 号

取得年月日: 22 年 1 月 15 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.metro-hs.ac.jp/pt/shinkeisai/sei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 順雄 (INOUE NOBUO)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号: 50159985

(2) 研究分担者

中山 孝 (NAKAYAMA TAKASHI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号: 90150060

(3) 連携研究者

()

研究者番号: