

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 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700408

研究課題名（和文） 胚性幹細胞由来大脳皮質細胞を用いた脳神経回路網形成および情報処理・伝達法の開発

研究課題名（英文） Innovative methods of neuronal circuit-formation and information-processing and -propagation using embryonic stem cell-derived cerebral cortical cells

研究代表者

出口 誠 (IDEGUCHI MAKOTO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10452640

研究成果の概要（和文）：

胚性幹細胞から分化誘導された神経前駆細胞は *in vitro* において大脳皮質深部の軸索投射性錐体細胞に特異的な神経系転写因子（CTIP2 etc.）を発現し、新生マウス大脳皮質深部に移植すると、皮質第 5 層内で、形態学的に正確な皮質錐体細胞へ分化した。更にこの細胞体からの軸索は錐体路を下降し、脊髓錐体路へと伸長する事が示された。これらの結果から神経細胞移植による神経機能改善効果は、神経保護作用のみならず神経回路網の再構築の結果である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We showed that embryonic stem (ES) cell-derived progenitor cells could express axon-projected cortical pyramidal neuron-specific neuronal transcriptional factors (CTIP2, TBR1 and OTX1). Moreover, these ES cell-derived progenitor cells could differentiate into morphologically accurate cortical pyramidal neurons which possessed pyramidal shaped cell body, apical dendrite and axon growth potential in neonate developing brain. These ES cell-derived pyramidal neurons also expressed CTIP2 that is pyramidal neuronal marker. Furthermore axons from transplanted ES cell-derived pyramidal neurons in layer 5 cortical area descended in pyramidal tract, crossed the pyramidal decussation and extended into spinal pyramidal tract. These results attributed the functional recovery by neural cell-transplantation to not only neuroprotective effect via various secretor factors but also reconstruction of disrupted neuronal circuit via transplanted neural cells, and also indicate significant implication for translational research and stem cell-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：胚性幹細胞、大脳皮質錐体細胞、領域特異的軸索投射、神経回路網

1. 研究開始当初の背景

初期胚から樹立される胚性幹 (ES) 細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であり、細胞移植療法の資源として期待されている。また最近では人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 樹立に成功した事により幹細胞を用いた細胞療法はにわかに現実味を帯び、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脳卒中、脊髄損傷への臨床応用の期待も高まっている。しかしながら、大脳皮質を構成する細胞は多種多様でそれぞれ独特の性質を有し、更に神経回路網は複雑である。幹細胞移植療法を再生医療として臨床応用していく上で、中枢神経系へ移植された神経細胞が宿主神経細胞と同等の情報伝達能力と正確なシナプス結合能力を有する事を証明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) ES 細胞から分化させた神経前駆細胞が、移植された宿主脳内で形態学・免疫組織学・分子生物学的に正確な大脳皮質の軸索投射性錐体細胞へ分化可能である事を証明する。
- (2) ES 細胞から誘導した大脳皮質錐体細胞が局所回路、長距離回路において軸索投射・樹状突起を介した正しい神経回路網を形成可能である事を証明する。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞由来神経前駆細胞 (ES-NPCs) の移植条件の最適化。

- ① ES-NPCs の免疫組織学的解析。

ES 細胞をマウスストローマ細胞株 MS5 との共培養法を用いて神経分化誘導を行う。分化誘導開始後、次の抗体 (Table1) を用いて免疫染色を行い、経時的変化を調べる。

(Table1)

多能性マーカー	SSEA1, Oct4
神経幹細胞・前駆細胞マーカー	Nestin, RC2
神経マーカー	NCAM, Tuj1, NeuN

- ② ES-NPCs の分子生物学的解析。

①で得られる分化誘導 7 日目の ES-NPCs に対して、大脳皮質形成の過程で発現される神経転写因子を RT-PCR 法を用いてその特徴を調べる (Table2)。また Tbr1, Tbr2, CTIP2, Fez, Fez1 等といった皮質第 5 層に特徴的な神経系転写因子についても解析する。

(Table 2)

転写因子	発現領域	機能
Nkx2.1	大脳腹側 (LGE, MGE)	介在性ニューロン
Dlx2	大脳腹側 (LGE, MGE)	介在性ニューロン
Emx1	大脳背側	前脳形成
Emx2	大脳背側	前脳形成
Otx1	大脳背側 (皮質第 5, 6 層)	前脳形成
Otx2	大脳背側	前脳形成
Foxg1	前脳背側	終脳前駆細胞
Pax6	大脳背側	前脳形成、Radial glia marker
En1(Engrailed 1)	中脳	中脳・後脳オーガナイザー

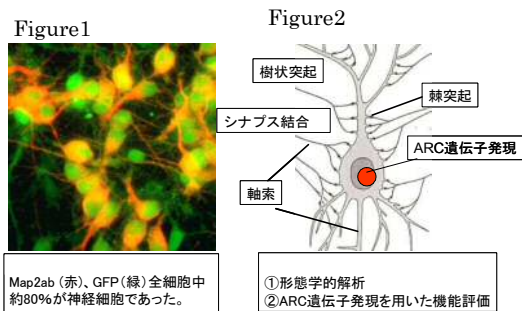
- ③ ES-NPCs の in vitro におけるグルタミン酸作動性投射性細胞への分化能力の評価。

ES-NPCs を更に 7 日間分化培養を行う。十分に分化した神経細胞に対して、神経細胞マーカー、Glutamate, GABA, Dopamine, Serotonin に対する免疫染色を行い、その分化率を評価する。

(2) ES-NPCs の新生マウスへの移植による錐体細胞への分化能力の評価。

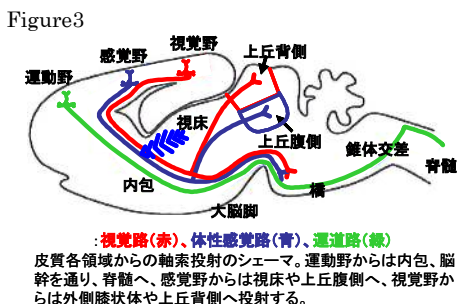
① ES-NPCs の新生マウスへの移植による錐体細胞への分化能力の評価。

GFP (Green Fluorescent Protein) 発現 ES 細胞株を用い、神経細胞へ分化後も GFP を発現している事を確認している (Fig. 1)。ES-NPCs を新生マウスの大脳皮質へ移植し、分化能力を評価する。錐体細胞への分化は GFP 蛋白に対する DAB を用いた免疫染色により、主に形態学的に評価する。つまり a) 錐体状の細胞体、b) 皮質表層まで伸ばす先端樹状突起、c) 皮質下白質へ伸長していく軸索、を併せ持つものを投射性神経細胞と定義する (Fig. 2)。



② 錐体細胞からの樹状突起・軸索を介した正確な局所回路、長距離投射の評価。

各皮質特異的な軸索投射を定量的に評価する。つまり各皮質野へ移植された ES 細胞由来錐体細胞は、運動野からは錐体路へ、感覚野からは視床・上丘腹側へ、視覚野からは外側膝状体・上丘背側へ、聴覚野からは内側膝状体・下丘へと軸索を投射する。これをカウントする事により軸索投射の正確性・特異性を定量化する (Fig. 3)。

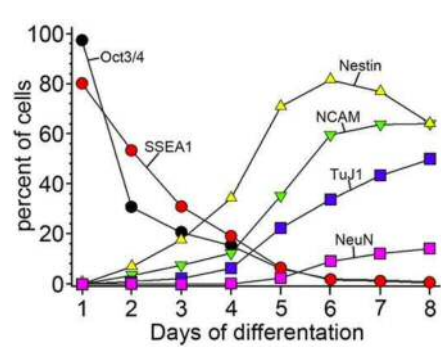


4. 研究成果

ES 細胞をマウスストローマ細胞との共培養法を用いて神経分化誘導を行った。分化の各過程で免疫染色を行い、その経時的变化を解析した。結果分化誘導後 7 日目で 80%以上が Nestin、RC2 陽性、Oct4, SSEA1 は 1%以下という結果が得られ、そのほとんどが神経前駆細胞へ分化していた。次に、RT-PCR 法を用いて分化開始後 7 日目の ES-NPCs に発現している神経系の転写因子を解析した。その結果、Pax6, Emx1, Otx1, Foxg1 といった前脳、特にその背側に発現される神経系の転写因子を発現している事が分かった (Fig. 4)。更に Tbr1, Tbr2, CTIP2, Fez といった大脳皮質深部、第 5 層、6 層錐体細胞前駆細胞に発現される転写因子も発現している事が分かった。更に ES-NPCs から 7 日間、計 14 日間分化誘導を行うと、その約 80%が MAP2ab、NeuN といった神経細胞マーカーを発現し、更に約 40-50%で Tbr1、CTIPs、Otx1 といった大脳皮質深部錐体細胞のマーカーを発現している事が分かった。

以上より本方法を用いて ES 細胞から分化誘導すると、そのほとんどが前脳背側に特徴的な神経前駆細胞に分化する事が免疫組織学的及び分子生物学的に証明された。

Figure 4



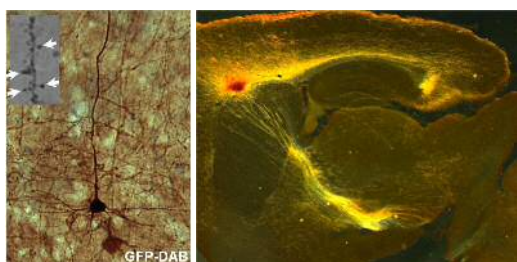
次にこの ES 細胞由来の神経前駆細胞をマウス大脳皮質に移植して生体内での分化能力を評価した。移植された細胞は GFP を恒常的に発現するため宿主細胞、組織との鑑別が出来る。ES 細胞由来神経前駆細胞は宿主脳皮質

深層内で、先端樹状突起を皮質表層へ伸長させ、多数の分枝を出し、かつ皮質下白質へ伸長している軸索を有し、形態学的に矛盾のない第5層錐体細胞へ分化していた。さらにこの樹状突起には多数の棘形成がみられ、周囲宿主神経細胞とシナプス形成し、シナプス・情報伝達に関与している可能性が示唆された(Fig. 5)。また移植脳切片に対する免疫染色ではCTIP2の発現をみとめ、第5層特異的な皮質錐体細胞である事も証明された。

次に、錐体細胞からの樹状突起・軸索を介した正確な局所回路、長距離投射形成能を評価した。当初の予想通り、各皮質野へ移植されたES細胞由来錐体細胞は、運動野からは錐体路へ、感覚野からは視床・上丘腹側へ、視覚野からは外側膝状体・上丘背側へと領域特異的な軸索投射が示された(Fig. 6)。

Figure 5

Figure 6



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 発表者：出口 誠

発表標題：正確な神経回路網の再構築を基盤とした神経機能回復への試み

学会名：第20回日本意識障害学会

発表年月日：2011年9月2日

発表場所：弘前市(ベストウエスタンホテルニューシティ弘前)

② 発表者：出口 誠

発表標題：移植細胞からの軸索投射と樹状突起伸長を介した正確な神経回路網再構築を基盤とした神経機能回復への試み

学会名：第10回日本再生医療学会総会

発表年月日：2011年3月2日

発表場所：東京(京王プラザホテル)

③ 発表者：出口 誠

発表標題：THE CHALLENGE TO RECONSTRUCTION OF THE DISRUPTED NEURONAL CIRCUIT CAUSED BY HYPOXIA AND ISCHEMIA EXPOSURE BY MOUSE EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED NEURONAL PRECURSOR CELLS IMPLANTATION

学会名：ISSCR 8th annual meeting

発表年月日：2010年6月18日

発表場所：San Francisco, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 誠 (IDEGUCHI MAKOTO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10452640