

Title	初期胚神経上皮由来神経幹細胞の脳移植ドナーとしての可能性に関する検討
Sub Title	Feasibility of using proliferated neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin as donor cells for intracerebral grafting
Author	林, 拓郎(Hayashi, Takuro)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.85- 94
JaLC DOI	
Abstract	<p>The biological character of neuroepithelial stem cells (NESCs) was assessed <i>ix vitro</i> and <i>in vivo</i> to confirm the feasibility of using them as donor cells for intracerebral grafting. All of the NESCs, which were derived from mesencephalic neural plates, were immunohistochemically positive for both nestin and fibroblast growth factor (FGF) receptor. Isolation and proliferation of NESCs was attempted from culture under various conditions. Neurospheres formed in medium containing FGF2, and NESCs were able to grow at a maximum proliferation rate of approximately 7.3 fold in seven days. The single cells derived from primary spheres differentiated into neurons that extended long neurites in two days and expressed several neurochemical markers, suggesting maturation of the cells, but hardly any filial cells were observed. The growth potential of the NESCs, however, subsequently diminished even in the medium containing FGF2, and NESCs derived from FGF2-responsive neurospheres after serial weekly passages tended to differentiate into glial cells more than into neurons. The NESCs proliferated in seven days with FGF2, which was transplanted into normal rat striata, also expressed nestin and TuJ 1, but GFAP positive cells were hardly seen. These experimental results indicated that the neural stem cells were not always equal in their differentiation paths and that the features of neural stem cells could be changed with the duration of culture.</p> <p>NESCs could be proliferated with the addition of FGF2 with having preserved vigorous neuronal differentiation depending on the required amount at its maximum under FGF2 at the 7-day time point, suggesting that 7-day-old NESCs proliferated with FGF2 may be favorable donor cells for intracerebral grafting to restore damaged neuronal circuits in diseased brain.</p>
Notes	原著
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070600-0085

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

原 著

初期胚神経上皮由来神経幹細胞の 脳移植ドナーとしての可能性に関する検討

慶應義塾大学医学部外科学教室脳神経外科

はやし たく ろう
林 拓 郎

ABSTRACT

Feasibility of using proliferated neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin as donor cells for intracerebral grafting

Takuro Hayashi, M.D.

Department of Neurosurgery, School of Medicine, Keio University

The biological character of neuroepithelial stem cells (NESCs) was assessed *in vitro* and *in vivo* to confirm the feasibility of using them as donor cells for intracerebral grafting. All of the NESCs, which were derived from mesencephalic neural plates, were immunohistochemically positive for both nestin and fibroblast growth factor (FGF) receptor. Isolation and proliferation of NESCs was attempted from culture under various conditions. Neurospheres formed in medium containing FGF2, and NESCs were able to grow at a maximum proliferation rate of approximately 7.3 fold in seven days. The single cells derived from primary spheres differentiated into neurons that extended long neurites in two days and expressed several neurochemical markers, suggesting maturation of the cells, but hardly any glial cells were observed. The growth potential of the NESCs, however, subsequently diminished even in the medium containing FGF2, and NESCs derived from FGF2-responsive neurospheres after serial weekly passages tended to differentiate into glial cells more than into neurons. The NESCs proliferated in seven days with FGF2, which was transplanted into normal rat striata, also expressed nestin and TuJ1, but GFAP positive cells were hardly seen. These experimental results indicated that the neural stem cells were not always equal in their differentiation paths and that the features of neural stem cells could be changed with the duration of culture. NESCs could be proliferated with the addition of FGF2 with having preserved vigorous neuronal differentiation depending on the required amount at its maximum under FGF2 at the 7-day time point, suggesting that 7-day-old NESCs proliferated with FGF2 may be favorable donor cells for intracerebral grafting to restore damaged neuronal circuits in diseased brain.

Key Words : neural stem cell, neuroepithelium, intracerebral grafting, fibrillary growth factor 2, neuronal differentiation

緒 言

神経幹細胞は自己再生能と多分化能を有する細胞と定義され^{1,2)}、中枢神経系を構成する神経細胞、グリア系細胞(星状細胞、希突起膠細胞)の元となる細胞である。これまで、損傷した神経回路網の修復に関して、神経幹細胞をドナーとして用いた多くの神経移植実験が諸施設により報告されてきた。これらの中で、成体型神経幹細胞は自家移植に関して量的にも倫理的にも問題点は少ないと考えられるが、神経細胞よりもグリア系細胞等に分化しやすいとの報告が散見され⁴⁾、神経回路網の再構築のためのドナーとしての臨床応用には困難と考えられる。神経幹細胞は発生初期から生体に至るまでのすべての年齢の脳に存在するものと理解されているが^{3,10)}、近年、神経幹細胞は自己と同一の細胞を複製し続けているわけではなく、成長に伴って性格の異なる細胞を複製している可能性が示唆されている¹⁰⁾。すなわち、神経発生初期において神経幹細胞は神経上皮細胞として現れ神経細胞のみを産生し、その後、星状細胞、希突起膠細胞が産生されるようになり、中枢神経が形成されていると考えられる。我々は神経幹細胞による神経回路網を再構築するドナーとして、神経細胞に分化する発生初期の神経幹細胞すなわち神経上皮型幹細胞に着目し、初期胚中脳胞部神経板から得られた神経上皮型幹細胞につき *in vivo* および *in vitro* において検討してきた。これまで、我々は神経上皮型幹細胞の①旺盛な神経細胞への分化能、②旺盛な神経突起伸展能、③移植片と宿主間の旺盛な細胞移動能を証明してきた¹³⁻¹⁹⁾。このような特長を有する神経上皮型幹細胞を損傷部に移植すれば新たな神経回路網の再建を介して機能再生を達成できる可能性がある。しかしながら、この中脳胞部神経板からは少量の神経上皮型幹細胞しか得られず、移植ドナーとして応用するには実用的な問題が残されている。

本研究においては、以上の背景を踏まえ、神経上皮型幹細胞が脳移植ドナーとしての可能性を有するかを明らかにするため、①神経上皮型幹細胞の生物学的特長、特に分離し、増殖させられるかについて *in vitro* において検討した。②増殖させた神経上皮型幹細胞は旺盛な神経細胞への分化能を維持しているのか、移植ドナーとしての可能性を有するのか *in vitro* において検討した。③正常ラット線条体に FGF2 を添加して増殖した神経上皮型幹細胞を移植し、その組織片を免疫組織学的に検討した。

方 法

1 E10 ラット初期胚の抽出、中脳胞部神経板の分離

妊娠 10 日雌ウィスターラットを株式会社埼玉実験動物供給所より購入し使用した。十分に腹腔麻酔した妊娠 10 日ウィスターラットの子宮から胎生 10 日初期胚を抽出し、4%ゲンタマイシン入りの Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco) に移した。5-15 の初期胚を N-2suppliment と 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, 以上 Gibco) 内でよく洗浄した後、実体顕微鏡下 (Olympus) で頭部原基のみ切断し、0.5%トリプシン、0.25%パンクレアチン (以上 Gibco) 入り溶液内で 4°C、15 分間反応させた。PBS でよく洗浄した後、頭部原基をトリプシンインヒビター (Boeringer-Mannheim) 内に移した。その後、Hank's buffer (Gibco) 内で実体顕微鏡下に mesenchyme 等の周辺組織を除去し中脳胞部神経板を分離した。

2 初期胚中脳胞部神経板の免疫組織学的検討

中脳胞部神経板における nestin, fibroblast growth factor receptor (FGFR), epithelial growth factor receptor (EGFR) の発現を免疫組織学的に検討した。E10 ラット初期胚をパラフィンで包埋した後、マイクロームを用いて 4 μm の中脳胞部神経板の切片を作成した。切片は脱パラフィン後、一次抗体 (anti-nestin 抗体 (Rat 401), 1:10; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, anti-FGFR 抗体, 1:100; Santa Cruz, anti-EGFR 抗体, 1:2000; Sigma-Aldrich) と 4°C で一晩反応させた。PBS で 6 回洗浄後二次抗体 (Alexa 568, 488) と反応させ PBS で 5 回洗浄した。

3 神経上皮型幹細胞の分離培養、継代培養

神経上皮型幹細胞を分離し、増殖させられるか培養系で検討した。中脳胞部神経板を解離 (dissociation) し、生存している細胞 (viable cell) を、①3%FBS を含む medium (control)、②20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Upstate-Biotech) を含む medium、③10 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2, Upstate-Biotech) + 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン (Hoechst) を含む medium の 3 条件下で 37°C、5%CO₂ humidified incubator 内で 7 日間培養した。細胞数は 10000 viable cells/ml (5000/well) とし、well との接着を防ぐため¹¹⁾、poly(2-

hydroxy-ethylmethacrylate) (poly-HEME, Sigma-Aldrich) でコートした直径 35 mm-well plate (Iwaki) を用いた。

また、FGF2 添加培養 7 日後に得られた神経塊 (neurosphere) を dissociation した後、800x g, 5 分間遠心し、5000 viable cell を同様の FGF2 添加条件下でさらに 7 日間培養した。継代による FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の増殖能の相違を評価するため neurosphere を 7 日毎に同様に dissociation して 28 日後まで継代培養した。7 日毎に primary sphere (初代, Day7), secondary sphere (2 代, Day14), tertiary sphere (3 代, Day21), quaternary sphere (4 代, Day28) とし、dissociation 後、5000 viable cell を poly-HEME でコートした coverslip を敷いた 16 mm-well 内で上記と同様の incubator を用いて培養した。培養液は各継代時に半量交換した。

4 神経上皮型幹細胞の増殖能

CellTiter 96 Aqueous assay with MTS tetrazolium (MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]) (MTS アッセイ) を用いて、神経上皮型幹細胞の EGF と FGF2 に対する増殖能を定量化した。また、FGF2 を用いて継代しても増殖させられるか、継代時にも行った。5000 viable cell を poly-HEME でコートした 96-well plate (Iwaki) 内で 3 と同様に各条件で培養した。初代培養では Day 0, 1, 3, 7 で、FGF2 を添加した継代培養では継代と同日の Day 7 (primary sphere), 14 (secondary sphere), 21 (tertiary sphere), 28 (quaternary sphere) に測定した。測定時に 20 μ l MTS 溶液を各 well に加え、上記と同様の incubator 内で 1 時間さらに培養した後、490 nm での吸光度を測定した。

5 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の免疫組織学的検討

FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の nestin の発現について評価するため、免疫組織学的検討を行った。

Day 7, 14, 21, 28 に得られた各 neurosphere を室温で 4% パラホルムアルデヒド用いて 20 分間固定し、0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) を添加した PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄した。5% BSA/PBS-Triton X で 37°C, 30 分間ブロックした後、一次抗体 (1:10 anti-nestin 抗体) と 4°C で一晩反応させた。0.1% BSA/PBS で 6 回洗浄後、二次抗体 (Alexa 488; Molecular Probe) と反応させ、PBS で 5 回洗浄した。

また、FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は FGF2 存在下で神経細胞への分化能を維持できるか検討するため分散培養を行い、免疫組織学的検討を加えた。Day 0 の神経板 (control) および Day 7 (primary), 14 (secondary), 21 (tertiary), 28 (quaternary) に得られた各 neurosphere を dissociation し、5000 viable cell を 3% FBS 添加して培養した。上記と同様の poly-HEME でコートした coverslip を敷いた 16 mm-well と incubator を用いた。2 日後、coverslip を上記と同様に免疫組織染色を施した。一次抗体は anti-TuJ1 (β tubulin-III) 抗体 (1:500; Babco), anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (1:400; Sigma-aldrich), 二次抗体は Alexa 488, 568 (Molecular Probe) を用いた。1 coverslip で無作為に選んだ 5 視野の TuJ1 陽性細胞と GFAP 陽性細胞数の比率を算出した。

さらに Day 7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞では、分化によって得られた神経細胞の種類 (phenotype) を免疫組織学的に検討した。Day 0 の中脳脳部神経板 (control) と Day 7 の primary sphere を dissociation し、上記と同様に、PLL コートした well で培養した。2 日後 coverslip を上記と同様に免疫組織染色を加えた。一次抗体は anti-TuJ1 抗体と各 neurochemical marker (1:1000 anti-glutamate 抗体; Sigma-Aldrich, 1:1000 anti- γ -aminobutyric acid (GABA) 抗体; Sigma-Aldrich, 1:500 anti-tyrosine hydroxylase (TH) 抗体; Sigma-Aldrich, 1:100 anti-choline acetyl transferase (ChAT) 抗体; Diasorin), 二次抗体は Alexa 488 と 568 を用いた。1 coverslip で無作為に選んだ 5 視野の TuJ1 陽性細胞の合計数に対する TuJ1/neurochemical marker の二重陽性 (double-positive) 細胞の合計数の比率を算出し、control と Day7 で比較した。

6 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の移植片の免疫組織学的検討

FGF2 反応性神経上皮型幹細胞が移植環境において *in vivo* と同様に旺盛な神経細胞への分化能を有するか *in vitro* で検討した。Day 7 に得られた FGF2 反応性 primary sphere を dissociation し 30 \times 10⁶ viable cell を、8 週齢雄ウィスターラット (株式会社埼玉実験動物供給所より購入) の右線条体に定位的に移植した。移植 7 日後に移植脳を摘出し、パラフィン包埋した後、ミクロトームを用いて 5 μ m の切片を作成し、脱パラフィン後、hematoxylin and eosin (H&E) 染色した。また別の切片は室温でメタノール (0.1% H₂O₂ 含む) と 20 分

間反応させた後、一次抗体 (anti-nestin 抗体, anti-TuJ1 抗体, anti-GFAP 抗体) と 4 °C で 16 時間反応させた。室温で biotinylated anti-mouse IgG (1 : 200 ; Amersham) と 5 回反応させ、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB ; Muto Pure Chemicals) で発色した。隣接切片を用いて検討した。

7 統計学的手法

データは平均±標準偏差で表記し、群間の差を評価するにあたり post-hoc テストを用いた多重比較を行った。危険率が 0.01 未満のものを統計学的に有意とした。

結 果

1 E10 ラット中脳脳部神経板の nestin, FGFR の発現

E10 ラット中脳脳部神経板の切片標本では同様に nestin 陽性細胞から成るが、これらの細胞は FGFR 陽性でもあった。EGFR 陽性細胞は明らかには認められなかった (第1図)。

2 神経上皮型幹細胞の分離, 増殖, 神経細胞への分化能

MTS アッセイによれば、Day 1 ではいずれの条件でも増殖しており、有意差は認めなかったが (control ; n=13, EGF ; n=12, FGF2 ; n=11) ($p>0.01$)。Day 3 では FGF 添加群において細胞の増殖効果は他の 2 群に比べ有意差を認めた (control ; n=17, EGF ; n=10, FGF2 ; n=11) ($p<0.01$)。Day 7 では FGF2 添加群では Day 0 の 7.3 倍に細胞を増殖させることが可能であり、この群でのみ neurosphere の形成も認めた (control ; n=16, EGF ; n=10, FGF2 ; n=12) ($p<0.01$) (第2図A)。神経上皮型幹細胞は Day1 までは成長因子に依存せず増殖するが、その後は FGF2 添加により増殖させることが可能と考えられた。FGF2 添加による継代培養では継代毎に増殖できるが、その細胞の増殖効果は低下した (各継代とも n=24) (第2図B)。FGF2 のみの添加では継代により神経上皮型幹細胞の自己増殖能は維持されないと考えられた。

Day7 において得られた primary sphere を構成する多くの細胞が nestin 陽性であった。分化させた際には多くの TuJ1 陽性細胞を認め、GFAP 陽性細胞は観察されず、control も同様の結果であったことから Day7 までは旺盛な神経細胞への分化能を維持していると考えられた。継代により neurosphere の形成は認められたが、形成された neurosphere での nestin 陽性細胞の発現は次第に低下し、分化後は GFAP 陽性細胞が増加し

た。quinternary sphere では TuJ1 陽性細胞はほとんど観察されなかった (第3図)。各 sphere の TuJ1 陽性細胞 : GFAP 陽性細胞比は secondary で 52.8 : 47.2 (n=6), tertiary では 3.3 : 96.7 (n=6), quinternary sphere では、1.1 : 98.9 (n=9) となり (第4図)、FGF2 のみでは神経上皮型幹細胞の分化を長期間制御する効果はないと考えられた。

3 FGF 反応性神経上皮型幹細胞由来神経細胞の phenotype

Day 7 に得られた FGF2 反応性神経上皮型幹細胞を分化させると多くの TuJ1 陽性細胞が得られた (前項)。この TuJ1 陽性神経細胞の neurochemical marker の発現を免疫組織学的に検討した。glutamate (第5図A-C), GABA (第5図D-F), TH (第5図G-I) を発現していたが、ChAT の発現は認められなかった (第5図J-L)。TuJ1 陽性細胞に対する比率は glutamate/TuJ1 double-positive cell は $79.9 \pm 1.83\%$ (n=6), GABA/TuJ1 double-positive cell は $12.4 \pm 1.94\%$ (n=7), TH/TuJ1 double-positive cell は $1.3 \pm 0.27\%$ (n=5) であった。control では glutamate/TuJ1 double-positive cell は $75.1 \pm 4.66\%$ (n=6), GABA/TuJ1 double-positive cell は $9.93 \pm 1.41\%$ (n=6), TH/TuJ1 double-positive cell は $1.41 \pm 0.69\%$ (n=5) であり、両者とも ChAT/TuJ1 double-positive cell は明らかには観察されなかった (各 n=6)。control と Day 7 に得られた FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の neurochemical marker の発現に有意差は認められず ($p>0.01$) (第1表)、増殖した FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は成熟した神経細胞に分化したと考えられた。

4 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の移植環境における免疫組織学的検討

ホストの線条体には HE 染色では明らかな壊死像は認められず移植片は生着していると考えられた。免疫組織染色では移植片には nestin および TuJ1 陽性細胞が多く認められた。ホスト組織に比し、移植片内の GFAP 陽性細胞はわずかであり (第6図)、Day 7 での FGF 反応性神経上皮型幹細胞は移植環境においても旺盛な神経細胞への分化能を維持していると考えられた。

考 察

多分化能と自己複製能を有すると考えられる神経幹細胞³⁾は、近年では神経系の発達段階によって神経幹細胞

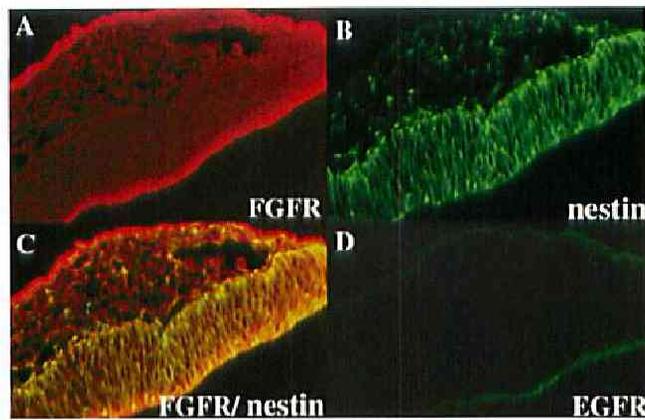


図1 胎生10日ラット初期胚中脳胞部神経板の nestin, FGFR, EGFR の抗体を用いた免疫染色像 (パラフィン切片)。抗 nestin 抗体, 抗 FGFR 抗体に陽性であったが, 抗 EGFR 抗体に明らかに陽性な細胞は認められなかった。A, 抗 nestin 抗体, B, 抗 FGFR 抗体, C, 抗 nestin 抗体, 抗 FGFR 抗体の二重染色, D, 抗 EGFR 抗体

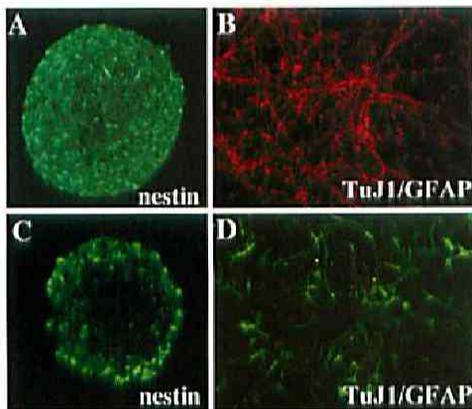


図3 継代して得られた neurosphere を免疫組織学的に検討した。Primary sphere は抗 nestin 抗体に陽性細胞から構成されていたが, その発現は継代により低下した。また, 分化培養の TuJ1 と GFAP の免疫染色では, 培養後 Day7 であれば TuJ1 陽性細胞のみ認められたが, Day28 では GFAP 陽性細胞が大多数であった。A, Day7 に得られた primary neurosphere の抗 nestin 抗体染色像, B, primary neurosphere の分化培養後の TuJ1 (緑) /GFAP (赤) 二重染色像, C Day28 に得られた quinternary neurosphere の抗 nestin 抗体染色像, D, quinternary neurosphere の分化培養後の TuJ1 (緑) /GFAP (赤) 二重染色像

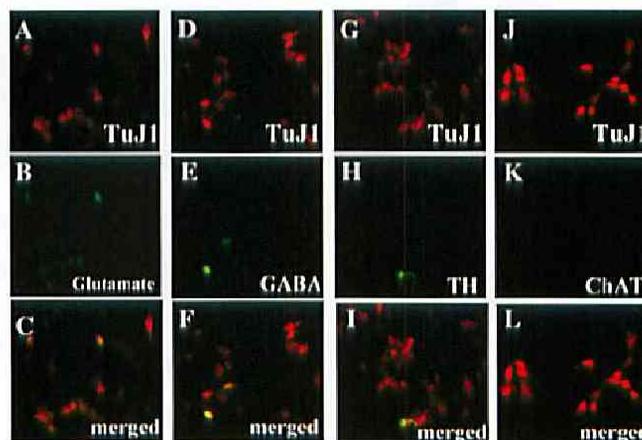


図5 増殖後 Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞が分化して得られた神経細胞を各 neurochemical marker で免疫組織学的に検討した。Glutamate, GABA, TH の各抗体に陽性細胞を認め, 成熟した神経細胞へ分化したと考えられた。抗 ChAT 抗体陽性細胞は明らかに認められなかった。A-C, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 glutamate 抗体 (赤), 二重染色像, D-F, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 GABA 抗体 (赤), 二重染色像, G-I, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 TH 抗体 (赤), 二重染色像, J-L, 抗 TuJ1 抗体 (緑) と抗 ChAT 抗体 (赤), 二重染色像

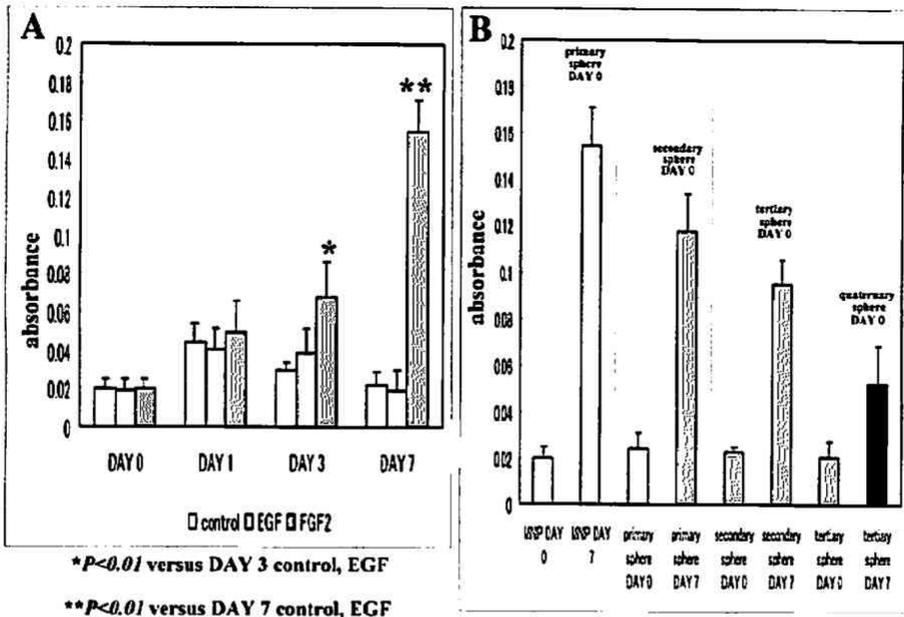


図2 神経上皮型幹細胞の増殖能について MTS アッセイを用いて検討した。Day1 までは神経上皮型幹細胞は成長因子に非依存性に増殖したが、Day3 以降は FGF2 添加群の方が他の 2 群に対して細胞増殖に有意差を認めた。しかし、継代培養では FGF2 添加をしても細胞の増殖効果は低下していた。A、初代浮遊培養の MTS アッセイ、B、継代培養での MTS アッセイ (MNP: 中脳脳部神経板の初代培養、各 Day 7 は次の Day0 と同じものを意味する)

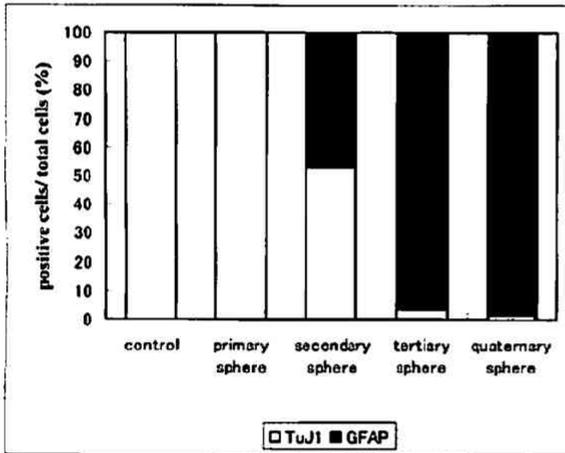


図4 神経上皮型幹細胞と増殖した神経上皮型幹細胞の分化培養での TuJ1 および GFAP 陽性細胞の比率を算出した。Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は control と同様に旺盛な神経細胞への分化能を維持していたが、継代につれてグリア系細胞への分化能を獲得した。

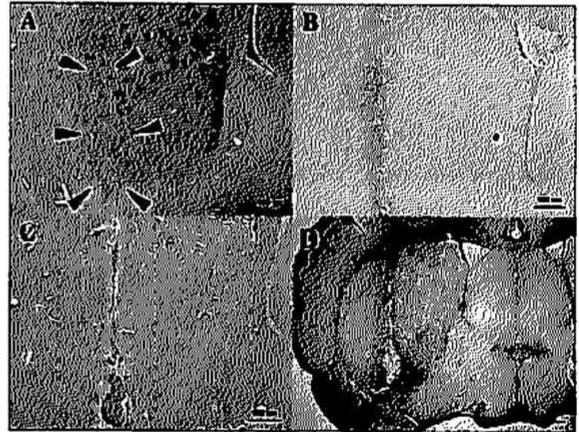


図6 増殖後 Day7 の FGF2 反応性神経上皮型幹細胞を正常脳へ移植し、組織片を検討した。移植片の宿主脳との生着は良好であり、移植片は抗 nestin 抗体、抗 TuJ1 抗体に陽性であり、抗 GFAP 陽性細胞に乏しかった。A、HE 染色 (arrowhead で囲まれた部分が移植片)、B、抗 nestin 抗体の免疫組織染色像、C、抗 TuJ1 抗体の免疫組織染色像、D、抗 GFAP 抗体の免疫組織染色像

胞の生物学的特長は異なり、比較的発生初期段階に得られた神経幹細胞はグリア系細胞よりも神経細胞に分化する傾向にある^{9, 10, 12, 20)}と提唱されている。我々は神経細胞への旺盛な分化能を有するドナー細胞こそ損傷した神経回路網を再構築するにはふさわしいと考えている。そ

こで中脳脳部神経板由来の神経上皮型幹細胞の移植ドナーとしての有用性に注目し、これまでその旺盛な神経分化能に関して検討してきた。本研究では移植ドナーとしての有用性に関して検討するため、培養系において分離し、増殖させることが可能であるか、移植環境ではどのよう

表 1

	Glutamate/TuJ1	GABA/TuJ1	TH/TuJ1	ChAT/TuJ1
Day0 control	75.1±4.66% (n=6)	9.93±1.41% (n=6)	1.41±0.69% (n=5)	0 (n=6)
Day7 FGF2 反応性神経上皮型幹細胞	79.9±1.83% (n=6)	12.4±1.94% (n=7)	1.3±0.27% (n=5)	0 (n=6)

な挙動を示すか考察した。

まず、中脳脳部神経板由来神経上皮型幹細胞の特有の生物学的特徴を評価するため、成長因子受容体 (receptor) の発現や成長因子への反応について免疫組織学的に検討した。諸家の報告によれば FGF2 や EGF の存在下に様々な発生段階において神経幹細胞を分離できるとされ²¹⁻²⁴⁾、また、発生初期段階でも FGFR のみを発現しているため FGF2 のみの存在下で未分化なドナーソースから neurosphere として神経幹細胞が得られると報告されている²⁵⁻²⁶⁾。本研究でも中脳脳部神経板を構成する細胞は抗 nestin 抗体および抗 FGFR 抗体に陽性であり、EGFR 抗体の発現は認めなかった。神経板の培養では control 群、EGF 添加群では著明な神経突起の伸展を認めたが、FGF2 添加群では突起の伸展は明らかに認められず、neurosphere の形成が認められた。したがって、神経上皮型幹細胞は FGF2 により分離できる可能性があるとともに未分化のまま増殖できる可能性も考えられた。この結果を踏まえ、神経上皮型幹細胞の分散培養を行ったが、同様に FGF2 添加群のみに著明な細胞増殖が認められ、MTS アッセイによれば FGF2 無添加に比して 7.3 倍まで増殖させることが可能であった。FGF は濃度や Notch pathway, tau の発現などある特定のメカニズムにより神経分化を制御しているとの報告があり^{23, 27-30)}、本研究でも同様に FGF2 は中枢神経系の発生初期段階において神経細胞への分化を抑制し、自己複製能を加速させる重要な役割を持つことが示唆された。遺伝子の発現や神経成長因子の相互関係など他の因子も幹細胞の分化に関与しており^{11, 31-37)}、神経上皮型幹細胞の分化制御を解明することが重要である。一方で control 群や EGF 添加群でも Day 1 までは増殖を認めており、神経上皮型幹細胞は自律的な自己複製能を有することも示唆された。したがって、神経上皮型幹細胞は成長因子に非依存性に分裂し、培養系でも増殖や性質の維持が可能のため、遺伝子操作などの人為的修飾が比較的容易とも考えられる¹⁸⁾。

次に増殖した FGF2 反応性神経上皮型幹細胞の分化能が年齢に相関しているか検討するため、神経上皮型幹細胞を FGF2 の存在下でさまざまな期間、継代培養を

行った。FGF2 添加により neurosphere は各培養で繰り返し形成され、neurosphere を構成する細胞は免疫組織学的に nestin 陽性であった。さらに FGF2 を添加することで神経上皮型幹細胞数を増殖させることが可能であり、その神経細胞への分化傾向は primary sphere の分散培養で維持されていることも分かった。しかしながら、継代により sphere の nestin 陽性細胞数や神経上皮型幹細胞の FGF2 による増殖効果は徐々に低下し、グリア系細胞への分化傾向が発現されるようになった。FGF2 反応性神経上皮型幹細胞は遅くとも培養開始 14 日後にはグリア系細胞への分化能を獲得すると考えられ、さらに 28 日後にはほとんどの神経上皮型幹細胞はグリア系細胞へ分化した。このことは神経上皮型幹細胞の神経細胞への分化能は FGF2 存在下では少なくとも 7 日間で最大になり、その後グリア系細胞への分化能を獲得するというを示唆している。Qian らは E10 マウスの初期神経管から得られた幹細胞の時間経過を検討した結果、皮質の発達のタイミングにおける神経幹細胞の役割を提唱している¹⁰⁾。彼らの仮説によれば、初期の胎生幹細胞は非対称性分裂をしており、神経細胞への分化能は減衰し、ある switch-point を過ぎると幹細胞はグリア系の細胞へと分化してゆく。この仮説は、本研究にもあてはまり、本研究で用いた神経上皮型幹細胞は in situ での中枢神経系の発達に類似しており、internal biological time clock を *in vitro* で反映しているとも解釈できる。かつてはすべての神経幹細胞が、神経細胞とグリア系細胞に分化する多分化能と自己複製能を有する幹細胞として同一の範疇に分類されていたが、本研究では神経幹細胞は発達段階においてすべてが同一とは限らないと考えられた。神経幹細胞の特長は年齢により変化し、神経上皮由来のより初期の幹細胞ほど胎仔型あるいは成体型神経幹細胞よりも神経細胞へ分化する能力を有する可能性が示唆された。

我々の *in vivo* における電子顕微鏡を用いた検討では神経上皮型幹細胞からなる中脳脳部神経板は移植環境においてホストとシナプスを形成することが証明されており¹⁷⁾、また別の検討でも虚血モデルラットにこの神経板を移植し機能回復を認めた¹⁹⁾。最近の知見においてはブ

タの神経上皮型幹細胞をパーキンソン病モデルラットの線条体に移植し、髄鞘化された軸索の形成やドナー由来の未分化な神経細胞と求心性/遠心性シナプスの形成、TH陽性ドナー細胞を確認した³⁸⁾。これらの電子顕微鏡による解剖学的な検討および免疫組織学的な検討の結果は、異種間移植ドナーとしての神経上皮型幹細胞の将来的な有用性を示唆している。しかし、ヒトのような大きな脳では損傷した神経回路網の再建には多くの神経上皮幹細胞が必要であり、充分量の神経上皮型幹細胞を確保しなければならない。しかし、本研究で示したようにFGF2で少量の神経上皮型幹細胞を増殖させることで充分量を確保することが可能となる。神経幹細胞のパーキンソン病モデルラットへの移植実験で、移植ドナー細胞がTH陽性の神経細胞に分化し、機能回復も認めたとの報告が散見される³⁹⁻⁴²⁾。本研究では正常ラットへの移植実験ではあるが、神経上皮型幹細胞は宿主脳に生着しており、多くのnestinおよびTuJ1陽性細胞が移植片内に認められるが、一方GFAP陽性細胞は明らかに認められない。我々の別の検討においても、移植2および4週後でも、増殖した神経上皮型幹細胞は依然として神経細胞への分化能を維持しており⁴³⁾。これらの結果は、FGF2により増殖した神経上皮型幹細胞も移植環境においても旺盛な神経細胞への分化能を有することを示唆している。さらに、Day7のFGF2反応性神経上皮型幹細胞は、神経細胞に分化するとneurochemical markerを発現することも分かった。我々の最近の知見ではこの神経細胞はパッチクランプ法を用いた電気生理学的な検討において活動電位を発生しており⁴⁴⁾。この細胞は成熟した神経細胞に自発的に分化すると考えられた。長期間の免疫組織学的検討や疾患モデルホストの機能回復の評価などさらなる検討は必要であるが、胎仔型および成体型神経幹細胞とは異なり、神経上皮型幹細胞は少なくともFGF2添加7日後までなら旺盛な神経細胞への分化能を維持したまま増殖させることが可能であり、少量ではありながら損傷した神経回路網を再構築するための移植ドナー細胞として応用され得る可能性を有すると考えられた。

総括

神経上皮型幹細胞の神経移植ドナーとしての可能性について明らかにするため、*in vivo*、*in vitro*において、ラット初期胚中脳胞部神経板から得られた神経上皮型幹細胞を検討し、以下の結果が得られた。

1. 神経上皮型幹細胞はFGF2を添加することによ

り、増殖させることが可能であった。

2. FGF2反応性神経上皮型幹細胞は少なくとも増殖後7日以内であれば旺盛な神経細胞への分化能を維持しており、自発的にneurochemical markerを発現する神経細胞に分化した。

3. 正常宿主脳ではあるが、移植環境においても増殖7日後のFGF2反応性神経上皮型幹細胞は神経細胞への分化能を維持していた。

以上の結果より、神経上皮型幹細胞は、神経細胞への分化能を維持したまま増殖させることが可能であり、移植環境でもその性質を維持しているという質的、量的な面から考えて、損傷した神経回路網の再構築のための移植ドナーとして可能性を有することが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部外科学教室河瀬斌教授に深甚なる謝意を表します。また、直接研究の御指導をいただきました慶應義塾大学医学部外科学教室内田耕一講師に深謝いたします。

なお、本研究の一部は第61回日本脳神経外科学会総会(2002年、松本)、第2回日本再生医療学会総会(2003年、神戸)において発表した。

文献

- 1) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34, 1999
- 2) Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines W A, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D: Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: 1071-1082, 1994
- 3) Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12: 4565-4574, 1992
- 4) Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN: Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19: 475-479, 2001
- 5) Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi A: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091-1100, 1996
- 6) Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG,

- Vescovi AL : Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 15 : 437-445, 2002
- 7) Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH : Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19 : 8487-8497, 1999
 - 8) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M : Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 172 : 115-127, 2001
 - 9) Lillien L, Raphael H : BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 127 : 4993-5005, 2000
 - 10) Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S : Timing of CNS cell generation : a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28 : 69-80, 2000
 - 11) Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M : Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126 : 443-456, 1999
 - 12) Zhu G, Mehler MF, Mabie PC, Kessler JA : Developmental changes in progenitor cell responsiveness to cytokines. *J Neurosci Res* 5 : , 131-145, 1999
 - 13) Fukunaga A, Uchida K, Hara K, Kuroshima Y, Kawase T : Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain. *Cell Transplant* 8 : 435-441, 1999
 - 14) Hara K, Uchida K, Fukunaga A, Toya S, Kawase T : Implantation of xenogeneic transgenic neural plate tissues into parkinsonian rat brain. *Cell Transplant* 6 : 515-519, 1997
 - 15) Hara K, Uchida K, Fukunaga A, Kuroshima Y, Yamada M, Kawase T : Neurite growth capability of rat fetal neuronal cells against matured CNS myelin *in vitro*. *Cell Transplant* 9 : 717-724, 2000
 - 16) Hayashi T, Uchida K, Mine Y, Yamada M, Kawase T : Feasibility of using early mesencephalic neural plate for intracerebral grafting. *Cell Transplant* 11 : 465-470, 2002
 - 17) Uchida K, Kawaja MD, Toya S, Roach AH : Transgenic neural plate contributes neuronal cells that survive greater than one year when transplanted into the adult mouse central nervous system. *Exp Neurol* 132 : 194-208, 1995
 - 18) Uchida K, Toya S : Grafting of genetically manipulated cells into adult brain : toward graft-gene therapy. *Keio J Med* 45 : 81-89, 1996
 - 19) Uchida K, Roach AH, Kawaja MD, Toya S : Successful survival of grafted transgenic neural plate cells in adult central nervous system environment. *Cell Mol Neurobiol* 19 : 79-86, 1999
 - 20) Tropepe V, Sibilio M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D : Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208 : 166-188, 1999
 - 21) Gage FH : Mammalian neural stem cells. *Science* 287 : 1433-1438, 2000
 - 22) Martens DJ, Tropepe V, van Der Kooy D : Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci* 20 : 1085-1095, 2000
 - 23) Quinn SM, Walters WM, Vescovi AL, Whittemore SR : Lineage restriction of neuroepithelial precursor cells from fetal human spinal cord. *J Neurosci Res* 57 : 590-602, 1999
 - 24) Ray J, Gage FH : Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 14 : 3548-3564, 1994
 - 25) Cai J, Wu Y, Mirua T, Pierce JL, Lucero MT, Albertine KH, Spangrude GJ, Rao MS : Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev Biol* 251 : 221-240, 2002
 - 26) Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS : Expression of EGF receptor and FGF receptor isoforms during neuroepithelial stem cell differentiation. *J Neurobiol* 38 : 207-224, 1999
 - 27) Bartlett PF, Brooker GJ, Faux CH, Dutton R, Murphy M, Turnley A, Kilpatrick TJ : Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain. *Immunol Cell Biol* 7 : 414-418, 1998
 - 28) Faux CH, Turnley AM, Epa R, Cappai R, Bartlett PF : Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. *J Neurosci* 21 : 5587-5596, 2001
 - 29) Qian X, Davis AA, Goderie SK, Temple S : FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18 : 81-93, 1997
 - 30) Tatebayashi Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I : Dynamic regulation of expression and phosphorylation of tau by fibroblast growth factor-2 in neural progenitor cells from adult rat hippocampus. *J Neurosci* 19 : 5245-5254, 1999
 - 31) Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, Aebischer P : Insulin-like growth factor-1 is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 15 : 7194-7202, 2001
 - 32) Chevet E, Lemaitre G, Janjic N, Barritault D, Bikfalvi A, Katinka MD : Fibroblast growth factor receptors participate in the control of mitogen-activated protein kinase activity during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol*

- Chem 274 : 20901-20908, 1999
- 33) Hossain WA, Brumwell CL, Morest DK : Sequential interactions of fibroblast growth factor-2, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and their receptors define critical periods in the development of cochlear ganglion cells. *Exp Neurol* 175 : 138-151, 2002
- 34) Li W, LoTurco JJ : Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex. *Dev Neurosci* 22 : 68-73, 2000
- 35) Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, del Carmen Cardenas M, Covarrubias L : The *in vivo* positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* 18 : 1073-84, 2003
- 36) Takahashi J, Palmer TD, Gage FH : Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 38 : 65-81, 1999
- 37) Wislet-Gendebien S, Bruyere F, Hans G, LePrince P, Moonen G, Rogister B : Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci* 5 : 33, 2004
- 38) Uchida K, Okano H, Hayashi T, Mine Y, Tanioka Y, Nomura T, Kawase T : Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons. *J Neurosci Res* 72 : 661-669, 2003
- 39) Baker KA, Hong M, Sadi D, Mendez I : Intrastriatal and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 162 : 350-360, 2000
- 40) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S : Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344 : 710-719, 2001
- 41) Sanchez-Pernaute R, Studer L, Ferrari D, Perrier A, Lee H, Vinuela A, Isacson O : Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation. *Stem Cells* 23 : 914-922, 2005
- 42) Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H : Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 21 : 3895-3903, 2001
- 43) Yamada M, Uchida K, Hayashi T, Mine Y, Kawase T : Vigorous neuronal differentiation of amplified and grafted basic fibroblast growth factor-responsive neurospheres derived from neuroepithelial stem cells. *Cell Transplant* 13 : 421-428, 2004
- 44) Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T : Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin. *Neurosci Res* 52 : 276-286, 2005