Keio Associated Repository of Academic resouces

培養ヒト神経幹細胞における細胞特性解析とその評価システムの開発
Cell characteristic analysis in cultured human neural stem cells and development of the evaluation system
永井, 康雄(NAGAI, YASUO) 松崎, 有未(MATSUZAKI, YUMI)
2009
科学研究費補助金研究成果報告書 (2008.)
本研究は、高率に神経へ分化する神経幹細胞のマーカーを同定することによって分化傾向の違う神経幹細胞の精製を目指した。ヒト神経幹細胞を様々な細胞表面特異的抗原に対するモノクローナル抗体で染色後、サブポピュレーションをフローサイトメーターにより分離した。また、CD133陽性ヒト神経幹細胞の中でもCD24陰性細胞が、CD24陽性細胞やフローサイトメーターで分離していない細胞に比べて自己増殖能に優れていることを明らかにした。
研究種目:基盤研究(C) 研究期間:2007~2008 課題番号:19590287 研究分野:医歯薬学 科研費の分科・細目:基礎医学・医化学一般
Research Paper
https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19590287seika

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.

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 6月16日現在

研究種目:基盤研究(C) 研究期間:2007~2008 課題番号:19590287

研究課題名(和文) 培養ヒト神経幹細胞における細胞特性解析とその評価システムの開発 研究課題名(英文) Cell characteristic analysis in cultured human neural stem cells

and development of the evaluation system

### 研究代表者

永井 康雄 (YASUO NAGAI) 慶應義塾大学・医学部・助教 研究者番号:10425704

### 研究成果の概要:

本研究は、高率に神経へ分化する神経幹細胞のマーカーを同定することによって分化傾向の違う神経幹細胞の精製を目指した。ヒト神経幹細胞を様々な細胞表面特異的抗原に対するモノクローナル抗体で染色後、サブポピュレーションをフローサイトメーターにより分離した。また、CD133 陽性ヒト神経幹細胞の中でも CD24 陰性細胞が、CD24 陽性細胞やフローサイトメーターで分離していない細胞に比べて自己増殖能に優れていることを明らかにした。

#### 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・医化学一般

キーワード:再生医学 神経幹細胞

#### 1.研究開始当初の背景

神経幹細胞はニューロスフェア法という特殊な培養法を用いることによって、自己複製能や多分化能を保ちながら試験にはニューロスフェア法で試験管内である。実際にはニューロスフェア法で試験管内増高させたには、神経幹細胞を含みながらも神経前駆細胞やグリア前駆細胞などが混在する雑多コスフェア法により増幅させた細胞を含みながらも神経前駆細胞地グリア前駆細胞などが混在する雑多コースでは、実験動物レベルにはニュのをはが中枢神経系疾患に対する治療としており、特別であるという証明が数多くなされており、ないの期待は非常に高まっている。今後、神経幹細胞移植治療を実現化するために

は、実験動物レベルではなく、実際に医療現場で使用することのできる細胞を確立することが重要となる。ヒト神経幹細胞は移植の細胞源として有望視されている細胞の一つであるが、実験動物由来の神経幹細胞とは異なり基礎的研究が進んでいないのが現状である。

我々はフローサイトメトリーを活用した 組織幹細胞分離に関する研究を行ってきた。 これまでに、マウス、ヒト全骨髄細胞に対し、 様々な細胞表面抗原に対する抗体で骨髄細 胞を染色後、フローサイトメトリー解析によ リサブポピュレーションに分類・分離後、 CFU F 法により付着細胞を検出するという 手法でスクリーニングを行い、間葉系幹細胞の指標となりうる細胞表面抗原を数種類同定した。さらに同定された特異抗原を指標に、マウスおよびヒト骨髄から、間葉系幹細胞を直接分離することに成功している。(Morikawa et al. 投稿中、Mabuchi et al. 投稿準備中)

さらに我々の研究グループでは培養ヒト神経幹細胞を用いたプロジェクトを進行している。造血幹細胞の研究分野では、細胞表面抗原を認識する抗体を組み合わせて造血幹細胞の分離が行われているが、同じ原理を利用してヒト胎児脳から CD133 に陽性で、血球系・血管内皮細胞マーカーである CD34 やCD45 陰性の細胞が神経幹細胞の性質を持つとの報告がある (Uchida,N. et al.: Proc. Natl.Acad.Sci.USA,97:14720-14725,2000)。我々はヒト神経幹細胞において、現在未報幹の細胞表面抗原に対する抗体でヒト神経幹細胞のさらなる分離を行っており、表面抗原の違いによりニューロスフェアの増殖能や分化能が違うことを見出している。

#### 2. 研究の目的

神経幹細胞を培養下で神経細胞へ分化させることが出来るようになり、神経幹細胞や分化させた神経細胞を移植して損傷神経を再生させる細胞移植治療が期待されている。しかし、神経細胞には数千もの種類があり、しかもそれぞれが複雑なネットワークを形成しているため、単純に細胞移植だけでは効果が得られない可能性がある。そこで神経幹細胞から特定の神経細胞へと分化させることは重要な課題である。

本課題では、ヒト神経幹細胞による神経変性疾患への実用化に向けて、フローサイトメトリーの技術を応用し、高率に神経へ分化する神経幹細胞のマーカー抗原を同定することによって分化傾向の違う神経幹細胞の精製を目指す。効率的な神経分化細胞群の濃縮や培養条件などを検討するとともに、分化した神経細胞の種類の同定を行う。さらに、それらの安全性や安定性を評価するために役立つデータを取得する。

本研究により、神経幹細胞を細胞表面抗原の発現を指標としてサブポピュレーションに分類し、その生物学的特性を精査するによって、これまで定義の曖昧だった神経を厳密に特徴づけることが出来るを出りない。一方、細胞移植治療が有効は、が生まると期待される・アルツハイマー病、所とよるにもなどの神経変性疾患や、外傷にした事ででは、脳損傷、および血流障害にの疾患に利したがする移植治療に適した細胞群を、同定したサ

ブポピュレーションの中から選び出し移植 に用いることによって、より効果的な治療方 法の開発が期待される。従来の神経幹細胞を 用いた移植療法に関する研究は、そのほとん どが培養によって得られた動物由来の細胞 を用いて行われてきた。これらの研究によっ て、試験管内増幅された神経幹細胞を含む細 胞群が様々な中枢神経系疾患に対して有効 であることが既に示されている。しかし、マ ウスとヒトとでは細胞表面マーカーの違い や分化傾向に様々な違いがあることが ES 細 胞研究などからも指摘されている。当研究は ヒト由来の細胞を用いており、今後の中枢神 経系の再生医療の発展の基盤を成すもの、と 位置づけられる。また培養ヒト神経幹細胞群 を細胞表面抗原の発現を指標にして生物学 的特性を調査し、神経細胞の機能解析などに より神経細胞を特定する、というアプローチ を用いることにより、本研究は神経幹細胞の 基礎的研究の発展にも貢献すると考えられ

ヒトES細胞は多能性幹細胞として注目されているが、移植後にテラトーマを形成することやヒト受精卵を使用することから倫理上の問題も残されている。ヒト骨髄由来とは自動整することで免疫拒絶反応が起こりに製造することで免疫拒絶反応が起こりにより、からないメリットがあるが未知の部分が多い。緊急の移植にも対応できるような神経細胞に分化しやすい神経幹細胞をそれらの生物学的性質をよく理解したうえで維持していくことは意義のあることと考えられる。

慶應義塾大学にて研究目的で使用される ヒト神経幹細胞は、国立病院機構・大シター臨床研究部から2次プロセシンター 目的で送られたものである。ヒト神経幹細胞 は組織細胞ではあるが、胎児由来のた動現 は組織細胞が手に入らない状況で貴重の 調たな細胞が手に入らない状況・早急の に用が出来ない。しかし、ヒト神経幹 にの用が出来ない。しかし、ヒト神経幹 にの用が出来ない。しかし、ヒト神経 にの用が出来ない。しかし、ヒト神経 にの用が出来ない。しかし、ヒト神経 にの用が出来ない。しかし、ヒト神経 にの間題が解決 ものであり も倫理的な問題が解決 ものったとし も 今後使用可能になるである 神経細胞再生 医療に多くの情報を与えるも のである。

#### 3.研究の方法

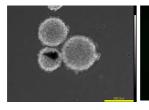
申請者はこれまでにニューロスフェア法を改良した培養法を用いて、妊娠9,10週の中絶ヒト胎児前脳から分離した神経幹細胞群を1年以上にわたり試験管内で生存、大量増幅させることに成功している。 また、選択したヒト神経幹細胞をモニターする系として三好浩之博士(理化学研究所)より供与された



レンチウイルスベクターシステムを利用した(図1)。レンチウイルスゲノムは細胞のセルサイクルに関係なく宿主染色体に組み込まれ、外来遺伝子を安定にかつ長期的に発

#### 図1 レンチウイルスベクター

現させることができる。EF プロモーターの下流に、基質依存的に発光する CBR ルシフェラーゼ (生体透過性に優れた改変型ルシフェラーゼ) および蛍光タンパク質である EGFP を恒常的に発現するレンチウイルスを作製し、ヒト神経幹細胞への導入を確認している(図2)。



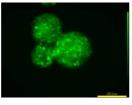


図 2 レンチウイルスベクター導入後の

ヒト神経幹細胞

# 4. 研究成果

ヒト神経幹細胞は長期間の培養により、増殖能の低下、フラスコへの接着等が観察されるが、細胞表現抗原の中から CD133 と CD24 に着目して培養期間の異なる細胞(DIV230、406、443、504)についてその表面抗原の発現量の解析を行ったところ、長期間の培養により CD133 陽性細胞の減少、CD24 陽性細胞の増加が認められた。今回 CD133 陽性細胞の中でも CD24 陰性細胞のが、CD24 陽性細胞やフローサイトメーターで分離していないヒト神経幹細胞に比べて自己増殖能に

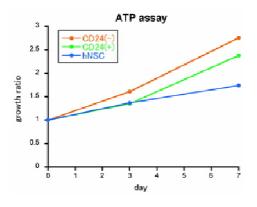
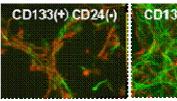
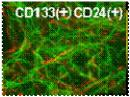


図3 CD24 抗原の発現の違いによる細胞増殖の差

優れていることを ATP アッセイ法にて明らかにした。(図3) さらに、これらフローサイトメーターで分離した細胞を分化培地にて培養したところ、CD133 陽性、CD24 陽性細胞に比べて、CD133 陽性、CD24 陽性細胞の方がより - -Tubulin 陽性ニューロンへの分化能を示した。(図4・赤; GFAP、緑;抗 - -Tubulin )これらのことから、CD133 陽性細胞、CD24 陰性細胞が未分化な培養とト神経幹細胞のマーカーとして有用である一方、CD133 陽性、CD24 陽性細胞が効率のよいニューロンへの分化につながるマーカーとして有用である可能性が示唆された。

また、増殖・分化能がニューロスフェアの 培養条件によってさらに変化する可能性も 考えられる。これまでのヒト中枢神経組織由 来神経幹細胞の培養は通常酸素濃度(約 20%)条件下で行うことが多いが、発生途中 の胎児ではより低い酸素濃度(1.5~5.3%) にさらされていることから、低酸素条件で培 養することにより、ヒト神経幹細胞を比較的 生理的条件に近い状態で増殖・分化をさせる ことができるのではないかと考えられる。そ こで、ヒト神経幹細胞とマウス神経幹細胞を 低酸素濃度(3%)と通常酸素濃度(20%) の培養条件下にて一週間培養し、それぞれの 細胞数を比較検討した結果、マウス神経幹細 胞では低酸素培養条件で増殖能の亢進が認 められたのに対し、ヒト神経幹細胞では低酸 素培養条件で増殖の変化がみられなかった。





5 . 主な発表論文等

図4 分離ヒト神経幹細胞の分化傾向の違い

(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2件)

Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. Biochem Biophys Res Commun.;379(4):1114-1119. (2009) 査 読有り

Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, <u>Nagai Y</u>, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda

T, <u>Matsuzaki Y</u>, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. Cell Stem Cell.;2(4):392-403. (2008)査読有り

## 〔学会発表〕(計1件)

<u>Yasuo Nagai</u> Effect of low oxygen environment on cultured human fetal neural stem/progenitor cells 第31回日本神経科学大会、2008年7月10日、東京国際フォーラム

[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〕

### 6.研究組織

(1)研究代表者 永井 康雄 (NAGAI YASUO) 慶應義塾大学・医学部・助教 研究者番号:10425704

(2)研究分担者 松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI) 慶應義塾大学・医学部・准教授 研究者番号:50338183

(3)連携研究者 なし