



Title	Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells
Author(s)	吉崎, 崇仁
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45523
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 吉 崎 崇 仁

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 9 4 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 6 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科情報伝達医学専攻

学 位 論 文 名 Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells

(マウス ES 細胞より分化したドパミン作動性ニューロンの純化と移植)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 内 山 安 男

(副査)

教 授 福 田 淳 教 授 佐 古 田 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

パーキンソン病の症状は中脳黒質におけるドパミン分泌ニューロン (DA ニューロン) の変性によって生じており、DA ニューロンや前駆細胞の線条体への移植によりパーキンソン病患者の症状を改善することが数多く報告されている。この移植術では、胎児組織を用いており移植する細胞の数の問題や倫理的問題が生じるため、有望な治療法であるが、実際に臨床で基準にはなりえない。そこでこの問題を解決すべく、さまざまな DA ニューロンを生成する方法が報告されるようになった。その中で神経系前駆細胞や胚性幹 (ES) 細胞を DA ニューロンに分化する方法が報告されている。神経幹細胞や ES 細胞は自己複製能を持つため *in vitro* で簡単に増幅させることができ、ドナー細胞として無限に供給できる。しかし、これらの分化方法ではさまざまな未分化細胞群を含んでおり、腫瘍形成するなど、実際の患者さんへの治療に応用することを考えると分離しておく必要がある。我々は以前の報告でチロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子プロモータ下に緑色蛍光タンパク (GFP) を発現するシステムを用いてフローサイトメトリーにより DA ニューロンをラベル付けした。この報告においてはこの方法を ES 細胞由来の DA ニューロンに応用した。

〔 方法ならびに成績 〕

ES 細胞株 EB3 に p*TH-GFP* と pMC1-neo プラスミドを導入し、*TH13D2* 細胞株を樹立した。分化方法として SDIA (Stromal-cell derived inducing activity) 法を用い、 5×10^5 個の ES 細胞を PA6 細胞でコンフルエントになった T-25 フラスコで共培養した。分化させた ES 由来細胞は、共培養期間の 4 日目より GFP の発現を認め、12 日目には GFP 陽性細胞は $44 \pm 4.1\%$ 、そのうち GFP・TH ともに陽性な細胞は $32 \pm 4.3\%$ となった。また、分化した培養上清のドパミンを HPLC で測定すると、 678 ± 79.8 pg/well/hour であった。そこで GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取した。プロピディウムイオダイドによって死細胞を除くと GFP 陽性細胞は全体の 2.66% であった。一方で、SD ラットの右中脳黒質と内側前脳束に 6 水酸化ドパミン ($2 \mu\text{g/ml}$) それぞれ $4 \mu\text{l}$ を用いてパーキンソン病モデルラットを作成し、4 週間後にメタンフェタミン投与で生じる回転数で症状の重症度を測定した。1 時間に反時計回りに 500 回転以上する 16 匹を移植に用いた。2 群に分け、8 匹には $2 \mu\text{l}$ の分化培地に入れた 1×10^4 個の細胞を、残りの 8 匹には $2 \mu\text{l}$ の分化培地のみを $1 \mu\text{l/min}$ の速度で線条体に移植した。移植前では 2 群間での回転数に有意差は認められ

なかったが、移植後では、細胞移植群の方が培地単独群と比べて 910 ± 127.6 vs. 813 ± 41.4 , $p > 0.05$ で有意な改善を認めた。移植側の線条体には軸索を伸ばした TH 陽性ニューロンが確認され、TH 陽性細胞は GFP 陽性でもあった。

[総 括]

ES 細胞 (TH-GFP) は、SDIA 法により分化して DA ニューロンを形成し、パーキンソン病モデルラット線条体で機能し、症状の改善をもたらしたことがわかった。しかし以前の報告にある、TH-GFP トランスジェニックマウスの中脳腹側部由来の GFP 陽性細胞の移植と比べると回転数の改善率は 77.3% に対し 15.6% と軽度であり、さらなる症状の回復を目指すには ES 細胞から DA ニューロンを誘導する方法の改良が必要と言える。具体的には栄養因子を用いることで *in vitro* における収率の向上やより中脳腹側に似た環境を作り出すことである。別の報告においては SDIA 法により分化した細胞群は、コロニーのまま移植した場合と一つ一つばらばらにして移植した場合、コロニーのまま移植した場合のほうが生着率が高いことより、移植するときにおいても神経保護因子などの使用により保護する方法を考える必要があると考えられる。一方で、移植した細胞群は ES 細胞由来であることより腫瘍形成能についての検討も行った。TH-GFP トランスジェニック ES 細胞だけでなく、すべての細胞において GFP を発現する ES 細胞を樹立し、同様に SDIA 法により 4 日間分化させ、GFP 陽性細胞を移植したところ、8 匹のうち 5 匹に腫瘍形成が認められ、ES 細胞より作成した培養系の移植にはフローサイトメトリーを用いた細胞の分離が必須であると考えられた。

この研究において、ES 細胞由来の DA ニューロンは TH-GFP レポーター遺伝子によりラベルすることが可能であり、フローサイトメトリーを用いて分取することが可能であることが示された。この新しいシステムは DA ニューロンの分子生物学的研究だけでなく、特に腫瘍形成のリスクが減少することなど、パーキンソン病治療の臨床応用にも有用であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

ES (胚性幹) 細胞は PA6 細胞と共培養する (SDIA : Stromal-cell derived inducing activity 法) と高率にドパミンニューロンに分化する。ドパミンニューロン特異的に発現する TH (Tyrosine Hydroxylase) 遺伝子プロモータ下に GFP (Green Fluorescent Protein) cDNA をつないだ遺伝子 (TH-GFP) を ES 細胞に導入し分化誘導すると、30% GFP 陽性、32% TH 陽性であった。フローサイトメトリーで分離した GFP 陽性細胞を、6-ヒドロキシドパミン注入により作成したパーキンソン病モデルラットに移植した。メタンフェタミン誘導性回転運動が 16% 程度改善し、移植細胞の生着が確認された。

以上より、TH-GFP 遺伝子を導入した ES 細胞はパーキンソン病治療に将来的に使用可能なことが示唆されており、学位の授与に値すると思われる。