神経幹細胞と中枢神経再生

戸田正博^{*1)}, 岡野栄之^{*2)}

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Neural stem cell and regeneration of central nervous system

Neural stem cells are a subtype of progenitor cells in the nervous system that can self-renew and generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Stem cells have been isolated from many regions of the embryonic nervous system. Recent studies revealed that adult neural stem cells exist in the adult neurogenic regions, the hippocampus and the subventricular zone, and in some non-neurogenic regions, including spinal cord. Now, neural stem cells can be isolated and cultured as floating, multicellular neurospheres. This review summarizes isolation methods for neural stem cells and the regulatory mechanisms of neural differentiation. The potential therapeutic uses of neural stem cells are also discussed.

Rec. 2/22/2002, Acc. 4/17/2002, pp 469~473

Masahiro Toda^{*1)}, Hideyuki Okano^{*2)}

key words : neural stem cell, central nervous system, regeneration, multipotency, self-renewality

神経幹細胞は、分裂・増殖することができる自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する3種類の細胞に分化する能力、すなわち多分化能を有する未分化な神経系の細胞である¹⁾。近年きわめて再生能力が低い成人脳においても神経幹細胞が存在することが明らかになり、さらにヒト神経幹細胞の分離、調製が可能になったことから、現在の再生医療研究において大変注目されている存在となっている。

本稿では、神経幹細胞の分離法、分化調節機構を中心に概説し、さらに神経幹細胞を用いた再生医療への応用について考察する。

神経幹細胞の分離法

1. Neurosphere 法

神経幹細胞は、脳や脊髄を構成するニューロンやグリア細胞をつくり出すことができる多分化能と自己増幅できる自己複製能を有する細胞であると定義されている(図1)²⁾。1992年、Weissらのグループにより neurosphere 法という神経幹細胞の選択的培養法が開発されたことにより、神経幹細胞の研究は大きな展開を迎えた³⁾。神経幹細胞を含む細胞群をインスリン、トランスフェリン、セレン、プロゲステロンおよび分裂促進因子である EGF または FGF 2 を含む無血清培養液で培養するもので、神経幹細胞のみが増殖して細胞塊(neurosphere)をなして浮遊する。さらにこの出来た neurosphere を一つひとつの細胞に分離して、また上記の無血清培養液で培養すると同様に neurosphere が形成される。

一方、この neurosphere を上記の無血清培養液から分裂促進因子の EGF や FGF 2 を除いて培

^{*1)} Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所

^{*2)} Department of Physiology, Keio University School of Medicine 慶應義塾大学医学部生理学教室

図 1
神経幹細胞の分化系譜
(澤本和延・他, 2000²⁾より改
変引用)

図 2
Neurosphere 法による神経
幹細胞の培養
(澤本和延・他, 2000²⁾より改
変引用)

養すると分化が誘導され、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの3種の細胞ができる(図2)²⁾。すなわち、この neurosphere 法を用いると多分化能を持ち自己複製する神経幹細胞が増幅できる。この neurosphere 法の利点は、神経幹細胞を未分化状態で増殖させることができ(造血幹細胞では、いまだに難しい)、“*in vitro* で培養したとき、neurosphere を形成する能力を有している細胞”として神経幹細胞を実験的に定義できることである。

2. GFP レポーター遺伝子を用いた分離法

Neurosphere 法で単離された細胞中には、神経幹細胞以外に特定の系譜へとコミットした前駆細胞が含まれること、また培養中に神経幹細胞の性質が変わる可能性(多分化能や自己複製能の低下、腫瘍化等)などの問題点が指摘されてきた。そこでこれらの問題点を克服するため、神経幹細胞を生きた状態でかつ培養せずに直接分離する方法が開発された。神経幹細胞のマーカーである *nestin* 遺伝子のエンハンサー領域を用いて、green fluores-

cent protein(GFP)という緑色蛍光蛋白質を神経幹細胞に選択的に高く発現させる技術である^{4,5)}。

Nestin-EGFP レポーター遺伝子を有するトランスジェニックマウスにおいては、神経幹細胞を含む未分化な細胞が密集している脳室周囲部(ventricular zone: VZ)に強い蛍光が観察され⁴⁾、EGFP 陽性の細胞をセルソーター(fluorescence activated cell sorter: FACS)により分離したところ、マーカーの発現、多分化能、自己複製能などの指標を満たす神経幹細胞が濃縮できることが明らかになった。neurosphere 法のような細胞培養法を介さずに、FACS により神経幹細胞を直接濃縮できるため、これまであまり解析が進んでいなかった神経幹細胞の領域特異性、時期特異性などの生物学的な解析への応用が期待される。

また、ヒト成人海馬の細胞に同じトランスジェンをリポフェクションにより遺伝子導入し、FACS を用いて神経幹細胞/神経系前駆細胞を単離することも可能である^{6,7)}。過去の BrdU の取り込み実験により、ヒトの海馬・歯状回において神経前駆細胞が成人になっても存在しつづけることが示されてきた⁸⁾。そこで、難治性癲癇患者(成人)から摘出された海馬組織由来の細胞に *nestin-EGFP* レポーター遺伝子を導入したところ、*nestin-EGFP* を発現する細胞の多くは培養下で BrdU を取り込み、分裂能があることが確認された。さらに FACS を用いて、これら *nestin-EGFP* を発現する細胞を分離・濃縮を行ったところ、分離された細胞は、培養下で形態学的にも、抗原性のうえでも成熟したニューロンへと分化することが確認された。したがって、成人脳の海馬には、ニューロン新生を起こすことのできる分裂能のある前駆細胞が存在することが明らかとなった。

3. 細胞表面抗原を用いた分離法

最近では神経幹細胞を分離する方法として、造血幹細胞と同様に細胞表面抗原に対する抗体を用いた分離法の開発が試みられている。Uchida らは、細胞表面マーカーに対する抗体とセルソーターを用いて、新鮮なヒト胎児の脳組織から、クローナに増殖するヒト中枢神経系幹細胞の直

接的な分離を行った⁹⁾。

ヒト神経系幹細胞は、表面マーカーの解析から CD 133⁺, 5 E 12⁺, CD 34⁻, CD 45⁻, CD 24^{-/low} という性質を示していた(CD 34 および CD 133 はヒト造血幹細胞マーカーとして用いられているが、CD 133 は CD 34 強陽性のヒト造血幹細胞に選択的に発現している新規抗原である。5 E 12 は TNF レセプター(p 75)を認識する抗体で、CD 45 は汎白血球マーカー、CD 24 は B 細胞および顆粒球マーカーである)。一方、CD 133⁺ CD 34⁻ CD 45⁻ としてソートしてきた単一の細胞は、培養下で neurosphere を形成し、ニューロンとグリアの両方の系譜へと分化することが示された。また CD 133⁺ CD 34⁻ CD 45⁻ 細胞に由来する neurosphere を再度単一細胞へと分離したところ、その単一細胞は再び neurosphere を形成した。このことから、CD 133⁺ CD 34⁻ CD 45⁻ という表面マーカーを呈する細胞が自己複製能力を示すことが明らかとなった。今後、他の細胞表面抗原との組み合わせにより、神経幹細胞の特異性と回収率をさらに高める試みが望まれる。

神経幹細胞の分化制御機構

1. 液性因子

幹細胞の運命決定には selection モデルと instructive モデルが提唱されている。selection モデルでは、幹細胞は環境に非依存的に確率的(stochastic)にさまざまな細胞系譜へと運命付けられるが、環境に応じて特定の系譜の細胞のみが選択的に生き残り、増殖すると考える。instructive モデルでは、増殖因子やサイトカインなどの環境因子の作用により、幹細胞が特定の系譜を辿るように運命付けられると考える。

McKay らは胎生期ラット海馬由来の細胞を低密度で培養し、5~10%は nestin 蛋白質陽性のクローンとして増殖する培養系を用いて、神経幹細胞の分化制御機構について解析した¹⁰⁾。これら nestin 陽性のクローンを無血清かつ FGF-2 非存在下で培養すると、おのおののクローンにおける 50%の細胞はニューロン、8%の細胞はアストロサ

イト, 8%の細胞はオリゴデンドロサイトへと分化した(残りの細胞は分化マーカーを発現していない未分化な細胞である)。

一方, FGF-2 存在下で IL-6 ファミリーサイトカインである CNTF あるいは LIF を 2 日間培地に加え, その後, 無血清かつ FGF-2 非存在下で培養すると, 単一クローン内のほとんどすべての細胞はアストロサイトの分化マーカーである GFAP 陽性で形態的にも扁平なアストロサイト様の細胞に分化した。この場合, 死細胞の割合は変化しなかったため, CNTF や LIF の作用が特定の系譜の選択的生存維持に効いているわけではなく, 神経幹細胞のアストロサイト系譜への分化に instructive に働いたものと解釈できる。また, 甲状腺ホルモン T3 は, 神経幹細胞に instructive に働き掛け, オリゴデンドロサイトの発生を促すことが示されている¹⁰⁾。

2. Notch シグナル, bHLH 型転写調節因子

近年, ショウジョウバエの神経発生に関与する proneural 遺伝子群, neurogenic 遺伝子群の哺乳類相同分子(あるいは類似分子)が, それぞれ神経系に発現している bHLH 型転写調節因子, notch シグナル関連分子として, 神経幹細胞の分化や自己複製の制御因子であることが明らかになってきている。

HES 1 はショウジョウバエの En(spl) の哺乳類相同分子であり, bHLH 型の転写抑制因子であり, notch 1 の下流のエフェクター分子として働くことが示されている¹¹⁾。HES 1 ノックアウトマウスにおいては, 神経幹細胞の自己複製能が低下するとともに神経幹細胞のニューロンの系譜への運命決定が促進され, 神経前駆細胞からニューロンへの分化が亢進していることが明らかになった¹²⁾。HES 1 遺伝子産物が notch シグナルの下流標的分子であることを考えると, notch シグナルは神経幹細胞のニューロン系への運命決定を抑制するとともに, 神経幹細胞の自己複製能を正に制御しているものと考えられる。最近の報告では, 恒常的活性化 notch 1 および notch 3 を神経幹細胞株において強制発現することにより, instruc-

tive に神経幹細胞からアストロサイトへ分化を誘導できることが示されている¹³⁾。

一方, ショウジョウバエ proneural 遺伝子の哺乳類相同分子(あるいは類似分子)には, *achaete* *scute* に相同性の高い Mash 1, *atonal* に相同性の高い neurogenin などがある。これら bHLH 蛋白質は, いずれも神経幹細胞からニューロンの分化を促進するとともにグリア(アストロサイト)への分化を抑制する作用を有することが示されている。興味深いことに, neurogenin 1 (Ngn 1) のニューロン分化促進作用とグリア分化抑制作用は異なる機構によって担われることが明らかになってきた¹⁴⁾。Ngn 1 のニューロン分化促進作用は, Ngn 1 の E-box への結合による標的遺伝子の転写活性化によるものであるが, グリア分化抑制作用は, Ngn 1 の DNA 結合能を必要とせず, Ngn 1 が CBP-Smad 複合体と結合し, グリア分化に促進的に働く STAT 3/CBP/Smad 複合体の形成を阻害するためであった。

成体の脊髄損傷では, 内在性神経幹細胞が脊髄内に存在しながらも, ニューロン新生は抑制されており, アストロサイトの増生のみが起きるものと考えられている。単に神経幹細胞を損傷部位に導入したとしても, ニューロンをつくらずに, グリアだけをつくってしまい, 病態の改善にはつながらないことが予想される。神経幹細胞の移植に加えて, ニューロンをつくるための微少環境の整備が不可欠と考えられる。今後どのような環境を整える必要があるのかを知るために, 神経幹細胞からニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトそれぞれの分化制御のメカニズムを明らかにすることが重要である。

神経幹細胞移植による神経再生¹⁵⁾

近年欧米では, 中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが変性・脱落するパーキンソン病に対して, 胎児の脳細胞移植による臨床試験が行われた^{16,17)}。本治療法により, 60 歳未満の患者の運動能力が改善されることが明らかになったが, この移植治療を 1 人のパーキンソン病患者に対して行

うためには、5～10 体の中絶胎児が必要とされる。

一方最近、試験管内で増やした神経幹細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化誘導する方法が開発された。この方法により誘導された細胞をドナー細胞として移植することが可能になれば、多くの中絶胎児を必要とする現行の方法よりはるかにすぐれたパーキンソン病の治療法となることが期待される。

ドーパミン作動性ニューロンのようなモノアミンニューロンは、1 対 1 (point-to-point) の精巧な神経回路ではなく、いわゆる広範性投射といわれるシナプスをつくることが知られている。今後、幹細胞生物学を駆使し、大量に調製されたドーパミン作動性ニューロンをドナー細胞とした移植治療の有効性が、実際の臨床試験により明らかにされてゆくと思われる。

文 献

- 1) Temple S : The development of neural stem cells. *Nature* 414 : 112-117, 2001.
- 2) 澤本和延, 岡野栄之 : 神経幹細胞と神経再生. 脳神経科学イラストレイラッド. 羊土社, 東京, 2000, p 130-135.
- 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) Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama AW, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA, Okano H : Nestin-EGFP transgenic mice : Visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 17 : 259-273, 2001.
- 5) Okano H, Goldman SA : Identification and selection of neural progenitor cells. *Neuro Science News* 3 : 27-31, 2000.
- 6) Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA : *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Med* 6 : 271-278, 2000.
- 7) Roy NS, Benraiss A, Wang S, Fraser RA, Goodman R, Couldwell WT, Nedergaard M, Kawaguchi A, Okano H, Goldman SA : Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J Neurosci Res* 59 : 321-331, 2000.
- 8) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH : Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 4 : 1313-1317, 1998.
- 9) Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL : Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 14720-14725, 2000.
- 10) Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD : Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Gene Dev* 10 : 3129-3140, 1996.
- 11) Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R : Hes 1 and Hes 5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18 : 2196-2207, 1999.
- 12) Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H : The bHLH gene hes 1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20 : 283-293, 2001.
- 13) Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T : Notch 1 and Notch 3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29 : 45-55, 2001.
- 14) Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME : Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 10 : 365-376, 2001.
- 15) 岡野栄之 : 神経幹細胞. 再生医学と生命科学, 蛋白質・核酸・酵素 45 (増刊号) : 102-116, 2000.
- 16) 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.
- 17) Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O : Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2 : 1137-1140, 1999.