

## ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞を作製 ～再生医療や加齢研究に貢献～

名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学の三輪田 勤 医員(筆頭著者)、須賀 英隆 准教授(責任著者)および有馬 寛 教授らの研究グループは、ヒト胚性幹細胞(ヒト ES 細胞)<sup>\*1</sup>を用い、視床下部神経幹細胞の性質を持つ細胞を新たに作製しました。

視床下部は生体内の恒常性の維持を司る脳の神経組織です。視床下部が障害されると下垂体ホルモン分泌不全、体温調節障害、肥満やそれに伴う生活習慣病を来しますが現在は対症療法しか治療がなく生涯にわたり加療を必要とします。

近年、多能性幹細胞を用いた再生医療が注目を浴びており特に神経に関しては神経幹細胞<sup>\*2</sup>の移植が臨床応用されてきています。これまで本研究グループはマウス胚性幹細胞を用いて視床下部神経幹細胞の性質をもつ細胞を作製しましたが、今回はこの方法を改良することにより、ヒト ES 細胞からの視床下部神経幹細胞の作製に成功しました。この細胞は神経幹細胞の性質である自己複製能と多分化能とを有していました。またこの細胞を免疫不全モデルマウスの腹側視床下部に移植したところ、生着し視床下部神経細胞に分化することを確認しました。さらに将来この細胞を臨床応用につなげるために、細胞表面抗原<sup>\*3</sup>を利用して野生型のヒト ES 細胞から作製することにも成功しました。

本研究の成果は視床下部障害を認める患者への再生医療の実現に向けた研究を加速させるだけでなくマウスの視床下部神経幹細胞で分泌が報告されている抗加齢作用を持つエクソソーム<sup>\*4</sup>の研究に役立つと考えられます。

本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) 創発的研究支援事業(研究開発代表者:須賀 英隆)や、文部科学省科学研究費助成事業のサポートを受けて実施され、米国科学誌『Stem Cell Reports』の2023年3月23日付オンライン版に掲載されました。

## ポイント

- 本研究では、ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞の作製に成功した。
- 作製した神経幹細胞を免疫不全モデルマウスに移植することで、生着能と視床下部神経細胞への分化能とを確認した。
- 細胞表面抗原を利用して野生型ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞を作製可能であることが分かった。
- この方法を応用することで、視床下部障害患者への再生医療や、加齢研究に貢献することが期待される。

## 1. 背景

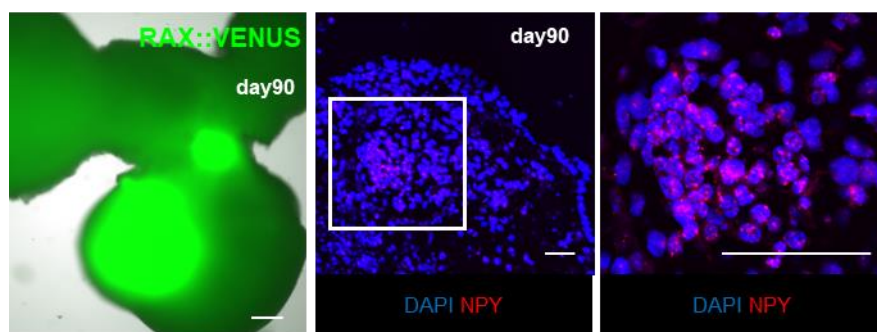
視床下部は生体内の恒常性の維持を司る神経組織です。視床下部が障害されると機能が再生することはなく、ホルモン分泌不全、体温調節障害、肥満やそれに伴う生活習慣病などを来しますが根治療法は存在せず現在は対症療法が行われています。しかしながら多くの場合、肥満や生活習慣病のコントロールは不良であり、より優れた治療法の必要性がありました。

近年、多能性幹細胞から作製した臓器を移植する再生医療が注目を浴びており、特に神経に関しては、ドパミン神経の前駆細胞や脊髄神経の神経幹細胞 をヒトに移植する臨床試験が進められています。同様の手法を視床下部に応用することが考えられますが、これまで視床下部に神経幹細胞が存在するかどうかはわかっていませんでした。最近げっ歯類においてタニサイトと呼ばれる第 3 脳室周囲の細胞が視床下部神経幹細胞の性質を持つと示されました。これまでに本研究グループはマウス胚性幹細胞を用いて視床下部神経幹細胞の性質をもつ細胞を作製しました。今回はこの方法を改良することにより、ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞の作製を試みました。

## 2. 研究成果

まず、胎生後期においてタニサイトに特異的に発現する RAX<sup>※5</sup> に蛍光蛋白をノックインしたヒト ES 細胞を用いて、RAX が長期発現する成熟した視床下部神経組織を作製しました。(図 1)

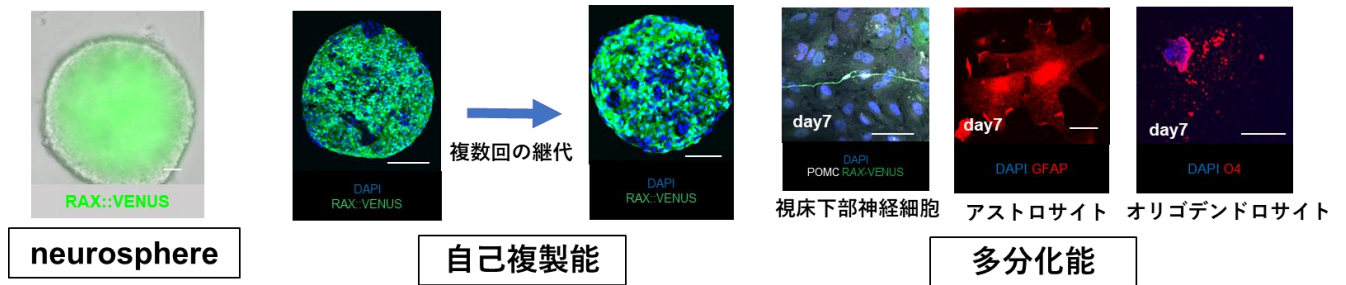
図 1



(図 1)ヒト ES 細胞から作成した視床下部神経組織に発現している RAX 陽性細胞  
成熟した視床下部神経で発現するマーカー(赤色)が陽性となる時期に、RAX(緑)が発現し続けている領域があり、この細胞がタニサイトに相当する細胞であることが示唆された。

この神経組織内の RAX 陽性細胞を分取し培養したところ、RAX 陽性細胞のみで構成される細胞塊である neurosphere<sup>※6</sup> が形成されました。この neurosphere は神経幹細胞の性質である自己複製能と多分化能とを認めました。(図 2)

図 2

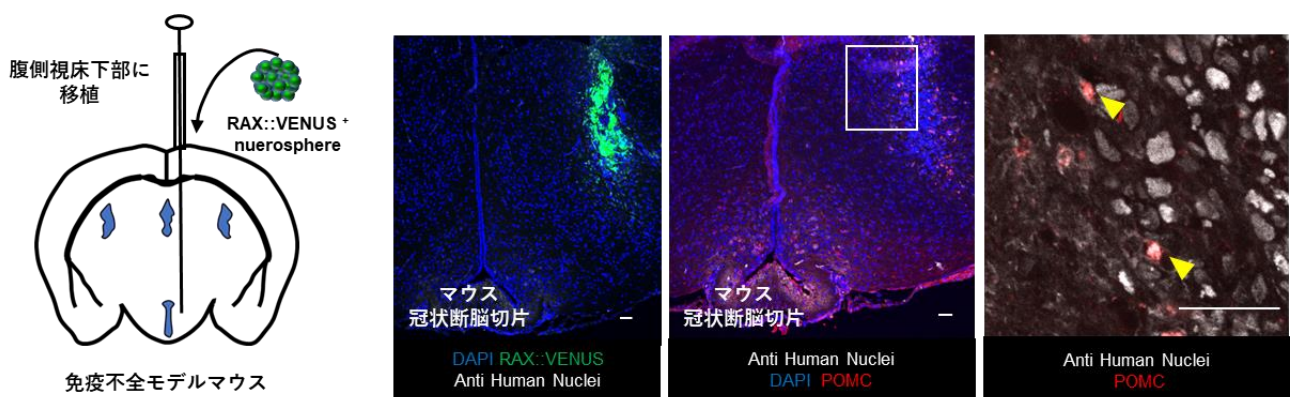


(図 2) neurosphere は神経幹細胞の性質を持つ

左の図が RAX 陽性細胞のみを抽出して培養した neurosphere という細胞塊。この neurosphere は中央の写真のように細胞をバラバラにする継代という作業を複数回行っても再度凝集する能力(自己複製能)を持ち、また、右の写真のような神経を構成する三系統(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)の細胞へ分化する多分化能を有している。

この neurosphere を免疫不全マウスの腹側視床下部に移植したところ、マウスの脳内で neurosphere が生着し、一部の細胞が視床下部神経細胞に分化していることを確認できました。(図 3)

図 3

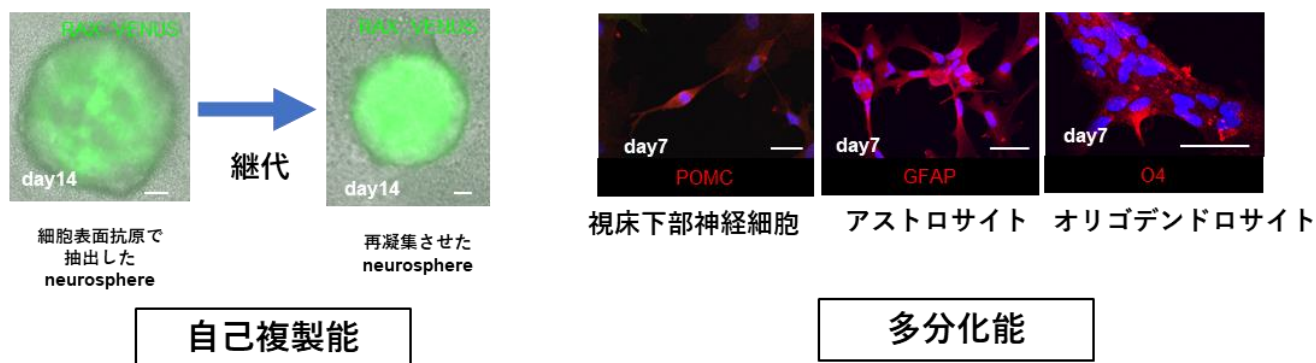


(図 3)neurosphere はマウスの脳内で生着し視床下部神経細胞に分化する

左の図は neurosphere を免疫不全マウスの腹側視床下部に移植する模式図。移植 1 週間経過しても真ん中の図のように RAX(緑)の発現を認めており neurosphere の生着が確認できる。さらに右の図のように neurosphere の一部で成熟視床下部神経細胞で発現するマーカー(赤)が発現している。

加えて、遺伝子導入されていない野生型ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞を作製することを試みました。検討の結果、細胞表面抗原を利用して視床下部神経幹細胞の性質を持つ細胞を作製することができました。(図 4)

図 4



(図 4)細胞表面抗原を用いて抽出した neurosphere が神経幹細胞の性質を持つ

左の図は細胞表面抗原のみを用いて抽出した neurosphere。この neurosphere は一度細胞をバラバラにしても再凝集する能力(自己複製能)と右の図のように神経を構成する三系統(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)の細胞に分化する多分化能とを有している。

### 3. 今後の展開

ヒト ES 細胞から視床下部神経幹細胞の性質を持つ細胞を作製する基盤技術ができたと考えられ、今後視床下部障害を来した患者さんへの再生医療に応用できることが期待されます。またマウスの視床下部神経幹細胞から分泌されるエクソソームは抗加齢作用を持つことが報告されており、加齢に関する研究にも役立つと考えられます。

### 4. 用語説明

#### ※1. 胚性幹細胞(ES 細胞)

胚性幹細胞(ES 細胞)とは発生初期の動物胚に存在する内部細胞塊から作られる細胞で、あらゆる種類の体細胞へ分化する能力とほぼ無限に増殖する能力を合わせ持つ多能性幹細胞の 1 つである。

#### ※2. 神経幹細胞

神経幹細胞とは、分化することなく自ら増殖することができる自己複製能と、中枢神経系を構成する 3 系統の細胞(ニューロン、アストロサイト、オリゴデントロサイト)へと分化することができる多分化能とを有する細胞のことである。

#### ※3. 細胞表面抗原

細胞の表面に発現している抗原である。細胞表面抗原に蛍光色素を標識した抗体を反応させることで細胞を生きたまま選別することが可能である。

#### ※4. エクソソーム

細胞から分泌される直径 50-150 nm(ナノメートル:10 億分の 1 メートル)の顆粒状の物質。

その内部にマイクロ RNA などの細胞内物質を含んでおり細胞間の情報伝達に使われているといわれている。

#### ※5. RAX

retina and anterior neural fold homeobox の略。視床下部や網膜の発生に関わる転写因子で胎生早期においては視床下部前駆細胞や網膜前駆細胞に広く発現するが胎生後期においてはタニサイトに限局して発現する。

#### ※6. neurosphere

神経幹細胞を培養した際に認める特徴的な細胞塊。neurosphere を形成することが神経幹細胞の重要な性質の一つであると考えられている。

### 5. 発表雑誌

掲載誌名: Stem Cell Reports

論文タイトル: Generation of hypothalamic neural stem cell-like cells in vitro from human pluripotent stem cells

著者・所属

三輪田 勤<sup>1</sup>、須賀 英隆<sup>1</sup>、川口 頌平<sup>1</sup>、榊原 真弓<sup>1</sup>、加納 麻弓子<sup>1</sup>、多賀 詩織<sup>2</sup>、宗圓 美香<sup>1</sup>、尾崎 創<sup>1</sup>、浅野 友良<sup>1</sup>、佐々木 博勇<sup>3</sup>、宮田 崇<sup>1</sup>、安田 康紀<sup>1</sup>、小林 朋子<sup>1</sup>、杉山 摩利子<sup>1</sup>、尾上 剛史<sup>1</sup>、高木 博史<sup>4</sup>、萩原 大輔<sup>1</sup>、岩間 信太郎<sup>1</sup>、有馬 寛<sup>1</sup>

1. 名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科学
2. 住友ファーマ株式会社
3. 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科科学
4. 名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器・代謝内科学

DOI:10.1016/j.stemcr.2023.02.006

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Ste\\_230324en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Ste_230324en.pdf)