

2008年8月5日

独立行政法人 理化学研究所

ES細胞から視床下部ニューロン分化誘導とホルモン産生に成功

- 内分泌や摂食障害の研究に貢献する新しいツール -

脳の一部である視床下部は、ホルモン分泌や摂食制御など全身の恒常性維持をつかさどる“最高中枢”部位として知られます。その大きさはわずか切手大で、異常をきたすと、中枢性尿崩症などの内分泌ホルモン障害、不眠症などの睡眠障害、過食・拒食などの摂食障害といった身体的障害を引き起こします。視床下部は、その重要性が認識されながら、視床下部ニューロンの入手が困難なことや、効率的に分化誘導する実験系が確立できていないなどの理由から、その研究は脳の研究に比べ遅れていました。理研発生・再生科学総合研究センター細胞分化・器官発生研究グループは、これまでマウスやヒトのES細胞を使って、中脳ドーパミンニューロン、大脳前駆細胞、小脳ニューロン、網膜細胞などへ分化誘導することに成功してきましたが、視床下部ニューロンの分化を効率よく誘導することは実現していませんでした。

研究グループは、通常、細胞増殖因子として培地に加えるインスリンが視床下部前駆細胞の分化を強く阻害することを見だし、これを応用し、インスリンを除いた無血清浮遊培養法を確立することで、世界で初めて60%~70%の高効率で視床下部前駆細胞の分化に成功しました。

また、この前駆細胞から神経内分泌細胞であるバゾプレシン産生ニューロンを選択的に分化させることに成功し、多量のバゾプレシンを放出することも確認しました。

視床下部ニューロンを試験管内で大量に産生できるようになると、内分泌ホルモン障害や摂食障害など効果的な治療法がなかった疾患に対する創薬研究が加速すると期待できます。さらに、再生医療の対象に考えられていなかった視床下部も、細胞治療の対象になることが示されたこととなります。

SFEB法の改変による視床下部誘導法

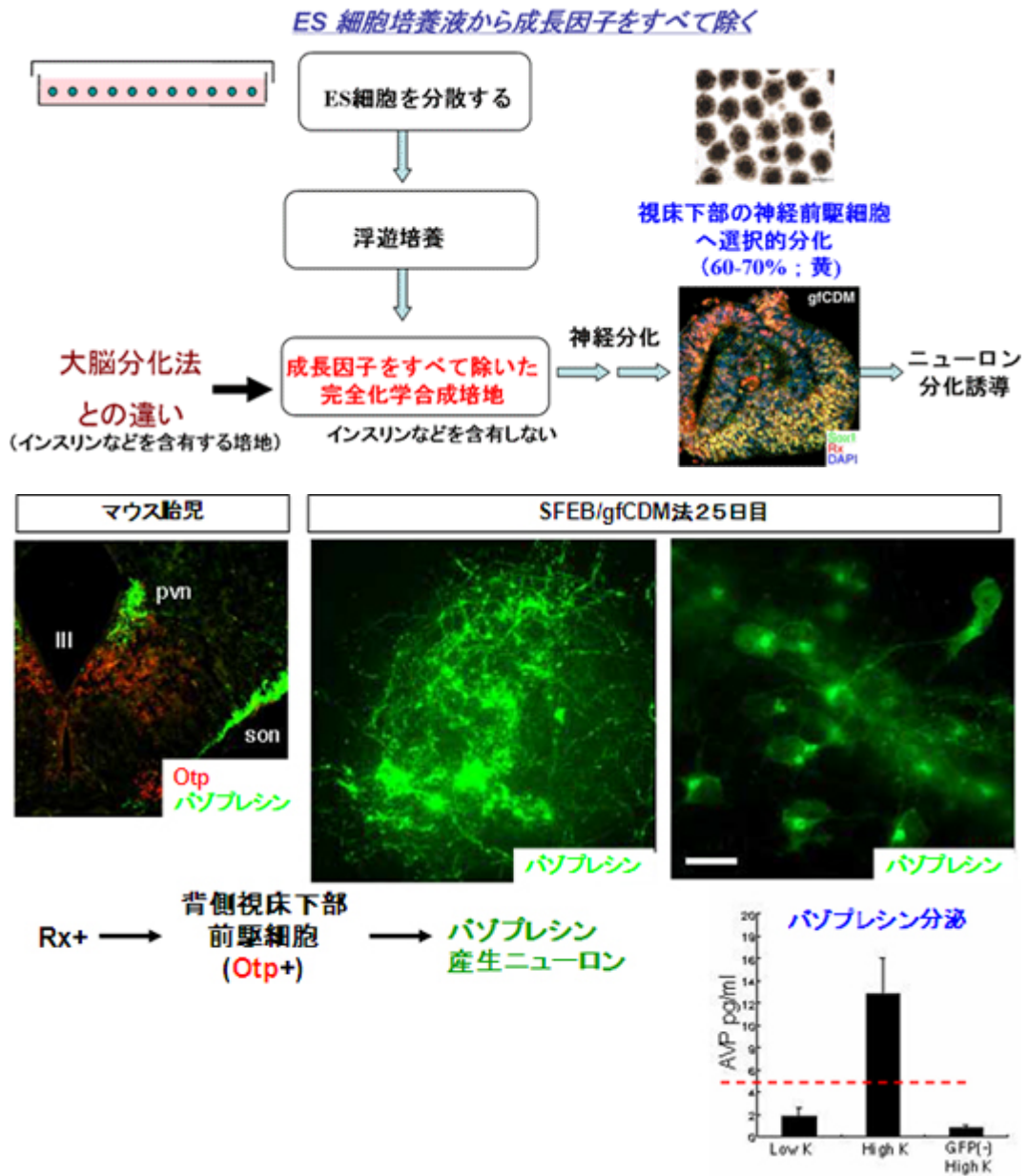


図 SFEB法の改変による視床下部誘導法（上）とマウス ES 細胞からバソプレシン産生ニューロンへの分化誘導（下）

2008年8月5日
独立行政法人 理化学研究所

ES細胞から視床下部ニューロン分化誘導とホルモン産生に成功

- 内分泌や摂食障害の研究に貢献する新しいツール -

◇ポイント◇

- ES細胞から視床下部前駆細胞の選択的分化誘導を世界で初めて実現
- 視床下部前駆細胞から、複数の視床下部ニューロンへ分化誘導
- 水分排泄調整ホルモン「バゾプレシン」を高効率で試験管内産生

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、マウスおよびヒトのES細胞（胚性幹細胞）^{*1}から身体の恒常性をつかさどる脳の視床下部^{*2}の神経組織へ分化誘導させることに世界で初めて成功しました。理研発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）細胞分化・器官発生研究グループの笹井芳樹グループディレクター、綿谷崇史リサーチアソシエイトを中心とした研究グループの成果です。

研究グループでは、これまでに、マウスおよびヒトのES細胞から、大脳ニューロンなどの試験管内分化法を開発してきました。しかし、脳内でホルモン分泌や摂食制御などの全身の恒常性をつかさどる視床下部組織への分化誘導は、実現していませんでした。

研究グループは、視床下部が大脳のすぐ近傍で発生することに注目し、これまでに開発していた大脳分化誘導のための無血清浮遊培養法（SFEB法）を改良し、視床下部前駆細胞の分化誘導を可能としました。具体的には、通常は無血清培養法で頻用されるインスリンの添加が、この視床下部前駆細胞への分化を強く阻害することを見だし、インスリンを除いた培地を用いることで、60～70%という高効率で視床下部前駆細胞への分化誘導に成功しました。さらに、この前駆細胞から、視床下部の背側部^{*3}の神経内分泌細胞^{*4}や、視床下部の腹側部^{*3}の摂食調整ニューロン^{*5}へ選択的に分化させることにも成功しました。特に、視床下部背側部に存在する水分排泄調整ホルモン「バゾプレシン^{*6}」を産生するニューロンの分化誘導では、このホルモンを正常成人の血中の数倍の濃度で分泌することも確認しました。

今回の研究成果により、これまで試験管内での研究が困難であった中枢性尿崩症^{*7}などの内分泌ホルモン障害や摂食障害（過食、拒食）^{*8}の研究に、新しい研究ツールを提供することが期待できます。また、従来、再生医療の対象と考えられていなかった視床下部も、長期的には細胞治療の対象となりうることを示唆した点でも大きな意義があります。

本研究成果は、米国科学アカデミー紀要『*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*』8月4日の週にオンライン掲載されます。

1. 背景

視床下部は、全身の恒常性の維持を制御する脳の“最初中枢”部位であり、その機

能異常は内分泌ホルモン障害、睡眠障害^{※9}、摂食障害などさまざまな身体的障害をもたらします（図 1）。このような高度な恒常性の維持に関係するいくつかの遺伝子は、徐々に解明されてきていますが、正常なニューロンを研究に使用することは難しく、また、試験管内で視床下部ニューロンを効率よく分化誘導する実験系が限られていたため、視床下部の研究は脳の研究に比べて遅れています。

研究グループでは、これまでに、マウスやヒトのES細胞を用いて、試験管内での選択的なニューロンの分化誘導法をいくつも開発し、中脳ドーパミンニューロン、大脳前駆細胞（皮質前駆細胞、基底核前駆細胞）、小脳ニューロン、網膜細胞などの分化誘導に成功してきました。しかし、これまでに開発したどの分化誘導法でも、視床下部ニューロンの分化を効率よく誘導することができませんでした。

2. 研究手法と成果

研究グループは、胎児脳の発生過程で、視床下部が大脳のすぐ近傍で発生することに着目し、これまでに開発してきたES細胞からの大脳前駆細胞への分化誘導法を改良することで、視床下部ニューロンの効率のよい分化に世界で初めて成功しました。

(1) 新規分化誘導法（SFEBq/gfCDM法）の確立

これまでに、研究グループでは、ES細胞からニューロンへの試験管内分化誘導として、ES細胞を1つ1つの細胞にバラバラにして、再凝集させた上で、浮遊培養させる培養法「無血清浮遊培養法（SFEB法）」を開発してきました（渡辺ら、*Nature Neuroscience*、2005）。このSFEB法の特徴は、浮遊培養をする際に無血清培地を使用することで、大脳細胞への分化を効率よく（30～40%）行うことができます。また、神経分化への選択性が非常に高い（90%以上）優れた方法として知られ、広く活用されていました。

しかし、SFEB法では、大脳ニューロンは効率よく産生されるものの、脳発生過程で大脳に隣接する部位から発生する視床下部のニューロンは、ほとんど分化誘導できませんでした。このため、研究グループの綿谷らは、SFEB法の培養中には、視床下部ニューロンの分化に対する何らかの阻害因子が存在しているのではないかと考え、SFEB法を改変することを試みました。その結果、ES細胞などの無血清培養の培養液に、通常細胞の増殖や生存などを促進させる目的で添加しているインスリンなどが、視床下部ニューロンへの分化を抑制していることを見いだしました。そこで、インスリンなどの細胞増殖因子をまったく含まない無血清培地（gfCDM培地）を用いた改良版SFEB法（SFEBq/gfCDM法）を確立し、マウスES細胞の神経分化誘導を行いました。その結果、培養後7日間で、ES細胞由来の細胞の60～70%が、*Rax*、*Six3*、*Vax1*、*Nestin*などの視床下部前駆細胞に特異的なマーカー遺伝子を発現する細胞に分化していることがわかりました（図 2）。

(2) マウスES細胞からの視床下部の背側部ニューロンの試験管内産生

マウスES細胞を7日間、SFEBq/gfCDM法で培養させて分化誘導した視床下部前駆細胞を、マーカー遺伝子の*Rax*の発現を指標に蛍光細胞分離装置（FACS）

で分離し、純化した視床下部前駆細胞を長期培養することで、視床下部に特有のニューロンを産生できるか解析しました。

純化した視床下部前駆細胞は、2〜3日後には視床下部の背側部から発生する神経前駆細胞に特徴的なタンパク質マーカー (Otp) を発現しました。さらに培養を続けると、視床下部の背側部から発生する典型的な神経内分泌細胞であるバゾプレシン産生ニューロンが分化誘導されました(図 3)。バゾプレシン産生ニューロンは、培養細胞全体の6〜8%程度を占めていました。また、カリウムイオン (K⁺) 刺激に反応して神経興奮を起こし、多量のバゾプレシンを培養液の中に放出することも確認しました。その量は、1mlあたり4000個程度のES細胞由来のバゾプレシン産生ニューロンから、正常成人の末梢血清中の数倍の濃度のバゾプレシンが放出されるほどでした。

このことは、試験管内で、ES細胞から機能的な視床下部ニューロン、しかも神経内分泌細胞が産生できたことを示す世界初の研究成果となりました。

(3) マウス ES 細胞からの視床下部の腹側部ニューロンの試験管内産生

SFEBq/gfCDM法により生じた視床下部前駆細胞は、視床下部の中でも特に背側部に存在するニューロンへ効率よく分化誘導されました。一方、同じ視床下部でも、腹側部には摂食や睡眠、下垂体ホルモン分泌制御など多様な機能を持つさまざまなニューロンが存在します。そこで、SFEBq/gfCDM法により生じた視床下部前駆細胞に、腹側部ニューロンの分化を促進する分泌性タンパク質であるソニックヘッジホグ (Shh) を作用させてみたところ、視床下部前駆細胞から多様な視床下部腹側部のニューロンが生じることを確認できました (図 4)。その中には、満腹中枢^{*10}の主要ニューロンである内腹側核SF1ニューロン (培養細胞全体の約14%) や摂食調整ニューロンの1つ弓状核AgRPニューロン (全体の約1%) や母乳分泌などを制御するA12ドーパミンニューロン^{*11} (全体の約9%) など、重要な生理機能に関係するニューロンが含まれていました (図 5)。このように、腹側部ニューロンの試験管内での産生を実現した成果についても、世界初となりました。

(4) ヒト ES 細胞への応用

最後に、マウス ES 細胞で開発した SFEBq/gfCDM 法をヒト ES 細胞からの視床下部分化誘導に利用することができるかを検討しました。SFEBq/gfCDM 法はインスリンをまったく含みませんが、マウス ES 細胞と異なり、ヒト ES 細胞の場合、インスリンをまったく含まない培養液では増殖・生存の効率が極めて悪く、そのままの方法では培養できないことがわかりました。

一般に、インスリンが細胞に働く場合には、大きく分けて MAP キナーゼ経路と PI3K 経路の2つの細胞シグナル伝達経路が活性化されることが知られています。研究グループは、阻害剤を用いた研究の結果から、視床下部の分化抑制に関与するのは PI3K 経路だけであることを発見しました。さらに解析を進め、インスリンを含む培養液でも PI3K 経路を阻害剤で遮断すると、ヒト ES 細胞から、視床下部ニューロンへの分化誘導が促進されることを突き止めました。そこで、ヒト ES 細胞に応用し、PI3K 経路阻害剤を含む培地を使って

SFEBq/gfCDM法で分化誘導を行ったところ、ヒトES細胞から、視床下部前駆細胞に特異的なマーカー遺伝子である *Rax* や *Vax1* を発現する細胞を、分化誘導できることが確認できました。この培地には、ヒトES細胞の細胞死を抑制する Rho キナーゼ阻害剤も添加しています（渡辺ら、Nature Biotechnology 2007）。

3. 研究成果の基礎研究として意義

生理的に非常に重要な中枢でありながら、効率のよい分化誘導が不可能であった視床下部へ、ES細胞から選択的に分化誘導することに世界で初めて成功したことは、基礎研究の成果として非常に大きな意義を持ちます。

これまで研究グループで成功してきたほかの中枢神経系への分化誘導に加え、視床下部ニューロンへの分化にも成功したことで、さまざまな脳の領域に存在する神経組織やニューロンを、系統的に分化誘導するための研究基盤がより強固になったといえます。

特筆すべきは、今回の視床下部の分化誘導条件では、外因性のシグナル因子をES細胞培養液からほぼ完全に除去した培養を行っていることです。これは、ES細胞（特にマウスES細胞）が、外部から特別の刺激（指令）を受けない場合、自動的に視床下部のニューロンに分化誘導される（発生学では、内因性分化という表現をします）ことを初めて実験的に示した成果になります（図6）。すなわち、ES細胞の分化方向の基底状態（デフォルト）は視床下部であるといえます。これまでのSFEB法では、インスリンなどの微量の増殖因子が存在していたため、基底状態には近いものの、大脳組織への分化方向がより促進されていたと考えられます。

この点に関連して、非常に興味深いことに、ドイツEMBL研究所の最新の比較神経発生学の研究から、バゾプレシン産生ニューロンを含めた視床下部のニューロンは、脊椎動物のみならず、一部の無脊椎動物（ゴカイなどの環形動物）にも存在することが示されています。つまり、視床下部という脳の部位は、脳の中でも最も進化上よく保存されているといえます。これは、ニューロン分化の基底状態を考える上で、示唆に富んだ結果であると思われます。

3. 今後の展望

ES細胞から視床下部へ分化誘導できたことは、今後、重要な生理機能を担う視床下部ニューロンを、試験管内で大量に産生することができることを意味します。これらを用いて、さまざまな創薬研究を行うことが可能となると期待されます（図7）。

例えば、バゾプレシン産生ニューロンに関しては、生体内でその分泌が減少すると「中枢性尿崩症（尿からの過剰な水分の排泄）」を生じます。一方、その分泌が過剰になると「SIADH（抗利尿ホルモン不適合分泌症候群）^{*7}」と呼ばれる病態になり、尿崩症とは逆に水分の排泄が障害され、著しく血液中の電解質（ナトリウムなど）濃度が低下してしまいます。これらの病気は、視床下部の外傷、腫瘍、術後後遺症などにより起こることがありますが、根本的な治療法はありません。最近、中枢性尿崩症では、バゾプレシン・ホルモンの点鼻薬などが使用されますが、SIADHには効果的な治療法はなく、対症療法が行われます。そこで、ES細胞を用いた分化誘導法で、大量にバゾプレシン産生ニューロンを産生することが

できると、それらを用いて、バゾプレシンの分泌を調整する新薬の開発などが進むことが期待されます。

今回の研究では、ホルモン障害に関するもの以外に、視床下部で摂食制御に関するニューロン（満腹中枢のSF1ニューロンや弓状核のAgRPニューロンなど）の試験管内産生にも成功しています。これらのニューロンに作用し、その機能を調整する物質は、過食症・拒食症の特効薬になる可能性が高く、今後、ES細胞由来のニューロンを用いた創薬スクリーニングも可能となると考えられます。視床下部の摂食制御中枢には、そのほかレプチン、オレキシンなどの摂食行動を制御するホルモンを産生するニューロンがあり、これらの細胞も近い将来、同様の方法で分化誘導が可能となり、同様に創薬のスクリーニングに貢献することが期待できます。

一方、視床下部は生体時計の中枢としても働き、その異常は睡眠障害（不眠症、ナルコレプシーなど）といった生活に支障を来す重篤な疾患の原因となります。今回の研究では、生体時計に関係する視交差上核などのニューロンの産生はいまだ確認されていませんが、近い将来、同研究センターシステムバイオロジー研究チーム（上田チームリーダー；生体時計研究の世界的な研究者）と共同で、その分化誘導にも挑戦する予定です。

（問い合わせ先）

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

細胞分化・器官発生研究グループ

グループディレクター 笹井 芳樹(ささい よしき)

Tel : 078-306-1841 / Fax : 078-306-1854

神戸研究推進部 企画課

Tel : 078-306-3008 / Fax : 078-306-3039

（報道担当）

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ES細胞(胚性幹細胞)

哺乳類の着床前胚（胚盤胞）に存在する内部細胞塊から作成した細胞株で、身体を構成するすべての種類の細胞に分化する能力（多能性）を有する。マウス、サル、ヒトなどから樹立されており、マウスのES細胞を初めて樹立したマーチン・エバンス卿（英国）は昨年のノーベル医学・生理学賞を受賞した。未分化なまま試験管内で培養して無限に増やすことができる多能性幹細胞の1つ。

マウス ES 細胞とヒト ES 細胞は、ともに着床前胚（胚盤胞）の内部細胞塊に由来する細胞株で、多能性を有するなど多くの面で共通性を持つ。また、分化培養法に関しても、互いに似た条件で分化誘導できることが多い。一方、分化誘導シグナルに対する一部の挙動や感受性、細胞生存シグナルに対する要求性、分化速度や増殖速度などに違いがあり、培養法も細部で異なった調整が必要なことも多い。それらの違いが何に由来するかは不明で、いくつかのモデルもいまだ仮説の域を超えない。

※2 視床下部

脳の一部であり、体内の活動を調節する最高中枢。視床下部の体積は脳全体の約 0.3% しかないが、末梢性自律神経性機序、内分泌的活動度および水分バランス、体温、睡眠、食物摂取、第 2 次性徴など、多くの身体機能の亢進、調節、統合をつかさどる中枢である。また、視床下部は摂食行動や飲水行動、性行動などの本能行動や情動行動などをつかさどる中枢でもある。

※3 視床下部の背側部と腹側部

視床下部の背側部にはバゾプレシン（体液量調節に関わるホルモン）やオキシトシン（乳汁分泌や子宮収縮に関わるホルモン）を分泌する室傍核などがある。腹側部には満腹中枢である腹内側核や摂食行動に強くかかわる弓状核などがある。室傍核（背側部）の分化を同定するための特異的マーカーとしては **Otp** というタンパク質、腹内側核（腹側部）の特異的マーカーとしては **SF1** というタンパク質がある。

※4 神経内分泌細胞

視床下部ニューロンには、内分泌細胞としての機能を有する特殊なニューロンが存在し、神経内分泌細胞と呼ばれる。これらの細胞は、電気的に興奮するとホルモンを血中に放出する。

※5 摂食調整ニューロン

視床下部の最腹側にある弓状核に存在する。摂食を促進するペプチドには、ニューロペプチド Y、オレキシン、アグーチ関連タンパク質などがあり、ニューロンに存在する。それらのニューロンが興奮すると摂食促進ペプチドが分泌され、摂食行動が活発になる。弓状核 **AgRP** ニューロンもその 1 つ。

※6 バゾプレシン

抗利尿ホルモン（ADH）とも呼ばれる。体液が尿として排出されるのを抑制する働きを持つ。視床下部で生産され、下垂体後葉で分泌される。血しょう浸透圧の恒常性に重要な役割を担う。腎臓の集合管に作用して、水分再吸収を促進し、尿量を減少させる。

※7 中枢性尿崩症と SIADH（抗利尿ホルモン不適合分泌症候群）

尿崩症は腎臓での尿量調節が破綻した病態である。病的に低張な尿が大量（時間尿量が 250ml を超える）に排泄され、脱水を来す。原因が視床下部にあるものと腎臓にあるものがあり、視床下部性のものを中枢性尿崩症という。中枢性尿崩症は抗利

尿ホルモンであるバゾプレシンの欠乏でおこる。脳外科手術後（特に下垂体腫瘍）や髄膜炎後におこる。治療には人工バゾプレシンの点鼻投与を行うが、現在、根本的治療法はない。SIADH（抗利尿ホルモン不適合分泌症候群）はその逆の病態であり、バゾプレシンの過剰分泌により体内に水分貯留がおこる状態。症状として悪心嘔吐や、錯乱、けいれん、昏睡などがみられる。

※8 摂食障害(過食、拒食)

精神神経疾患の1つで、しばしば治療抵抗性を示す。重度の拒食症の場合、最終的な致死率は5~20%程度と高い。摂食亢進作用のあるホルモンの治療応用が近年研究されている。拒食、過食などの摂食障害の原因には心因性のものが多いとされているが、直接的・間接的に視床下部機能障害が生じていると近年考えられている。例えば、満腹中枢の障害では過食症が、摂食中枢の障害では拒食症が起きると考えられている。

※9 睡眠障害

視床下部は周日リズムの中枢としても機能している。特に有名なものとして、視床下部前部に位置する視交叉上核が知られている。周日リズムの異常は、不眠症などの睡眠障害の原因となる。一方、ナルコレプシーでは、日中でも突然深い眠りに陥ってしまう。ナルコレプシーの一部は摂食亢進ホルモンとして知られるオレキシンの異常で発症することが知られている。

※10 満腹中枢

視床下部腹側の内側部を破壊すると過食・肥満し、外側部を破壊すると摂食量が減りやせることが、動物実験から知られている。詳細な研究から、視床下部の腹内側核が満腹中枢、外側野が摂食中枢として機能していることが明らかになっている。

※11 A12 ドーパミンニューロン

視床下部にもドーパミンニューロンが存在するが、パーキンソン病で特異的に変性する中脳ドーパミンニューロンとは異なる。弓状核に存在し、内分泌細胞として血中にドーパミンを分泌する。中脳ドーパミンニューロンは運動調節に関わっているが、視床下部ドーパミンニューロンはプロラクチン（乳汁分泌ホルモン）放出抑制因子として働く。

視床下部

恒常性維持の最高中枢

ホルモン調節

摂食など諸行動調節

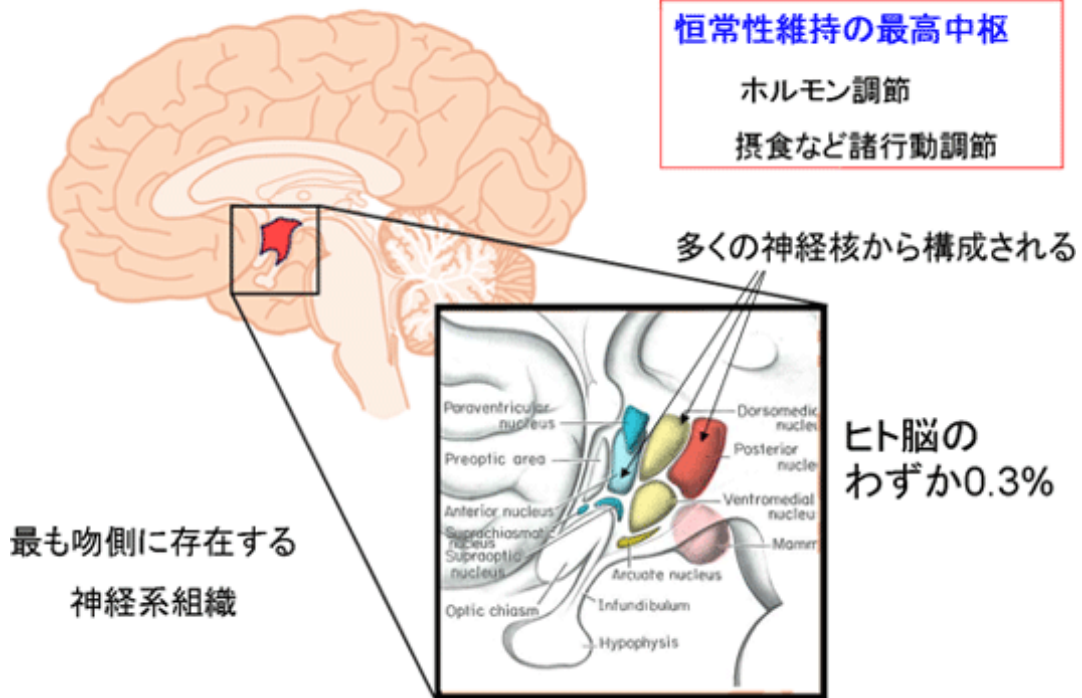


図1 視床下部の説明

SFEB法の変更による視床下部誘導法

ES細胞培養液から成長因子をすべて除く

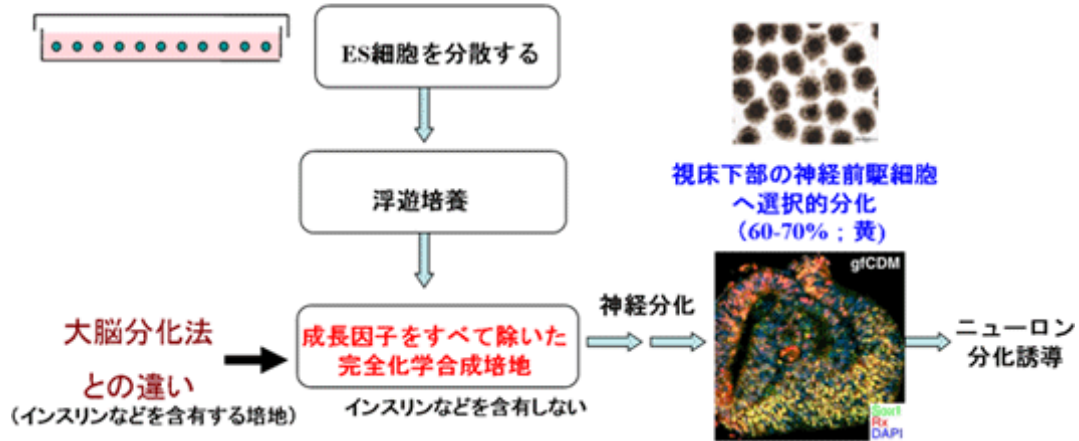


図2 マウス ES 細胞からの視床下部前駆細胞の分化誘導

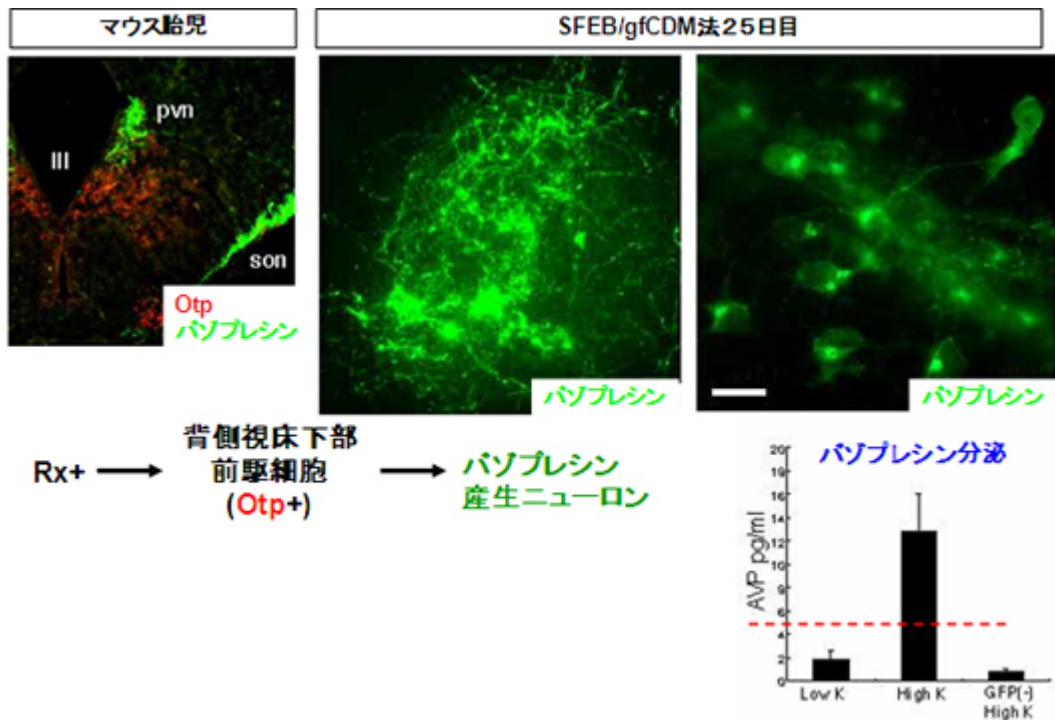


図3 マウス ES 細胞からバソプレシン産生ニューロンへの分化誘導

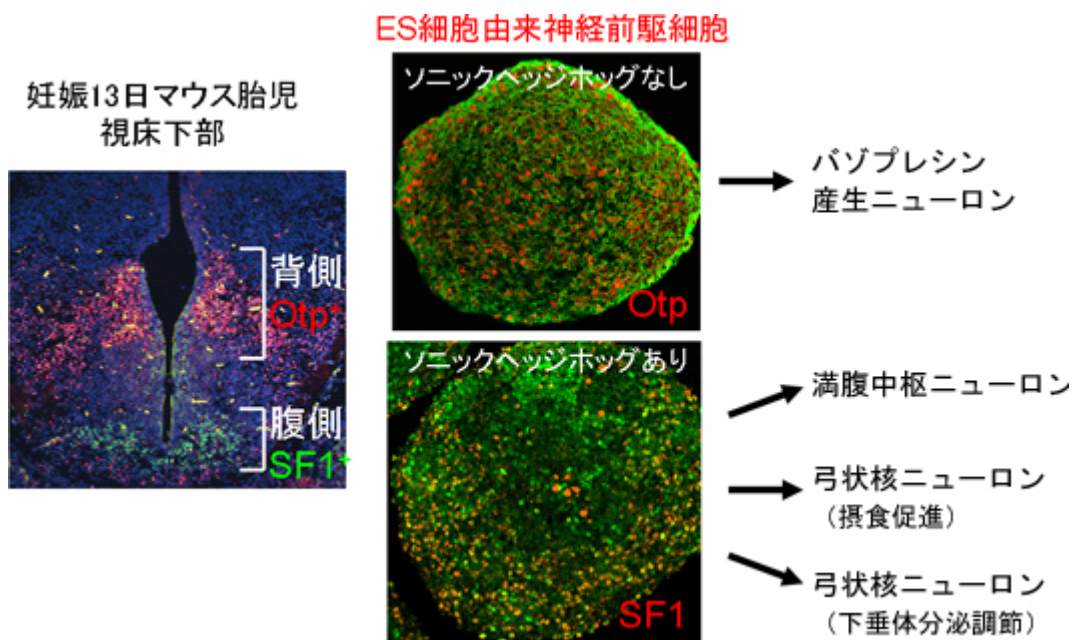


図4 マウス ES 細胞から視床下部の腹側部ニューロンへの分化誘導 (I)

SFEBq/gfCDM法, 4日目にソニックヘッジホッグ処理, 25日目

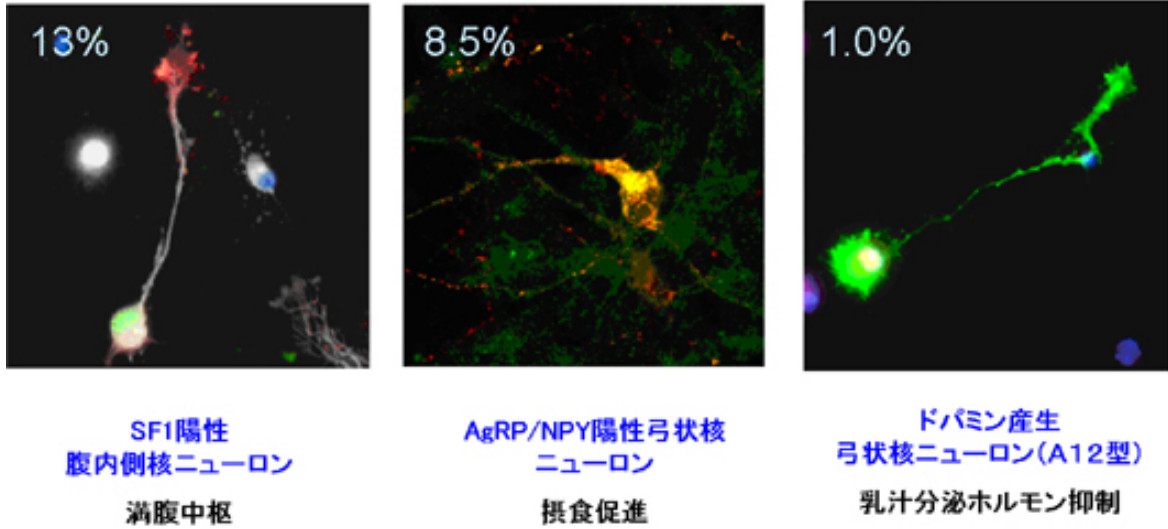


図5 マウス ES 細胞から視床下部の腹側部ニューロンへの分化誘導 (II)

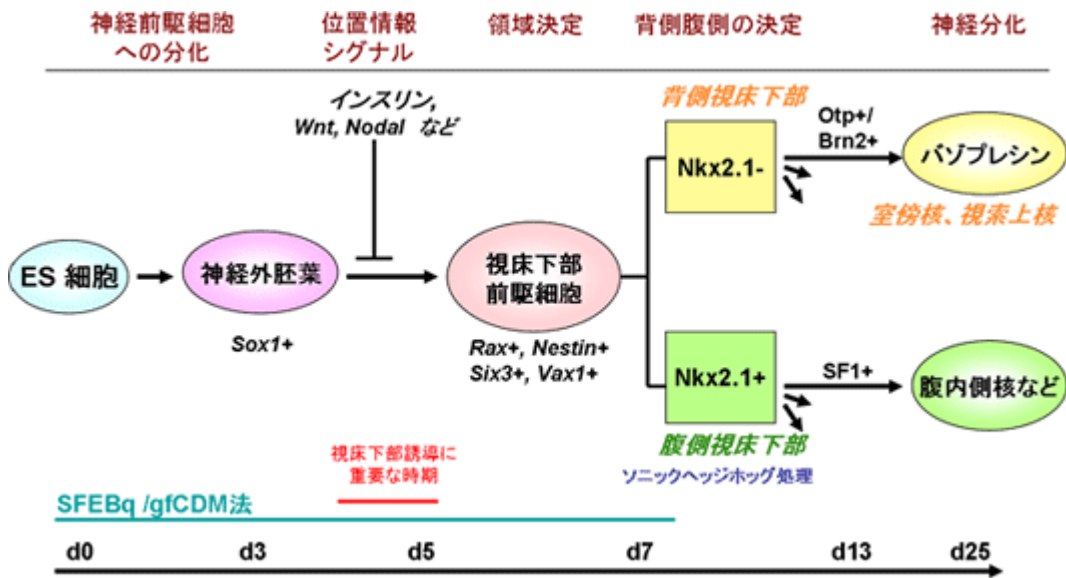


図6 マウス ES 細胞からの視床下部ニューロン分化のまとめ

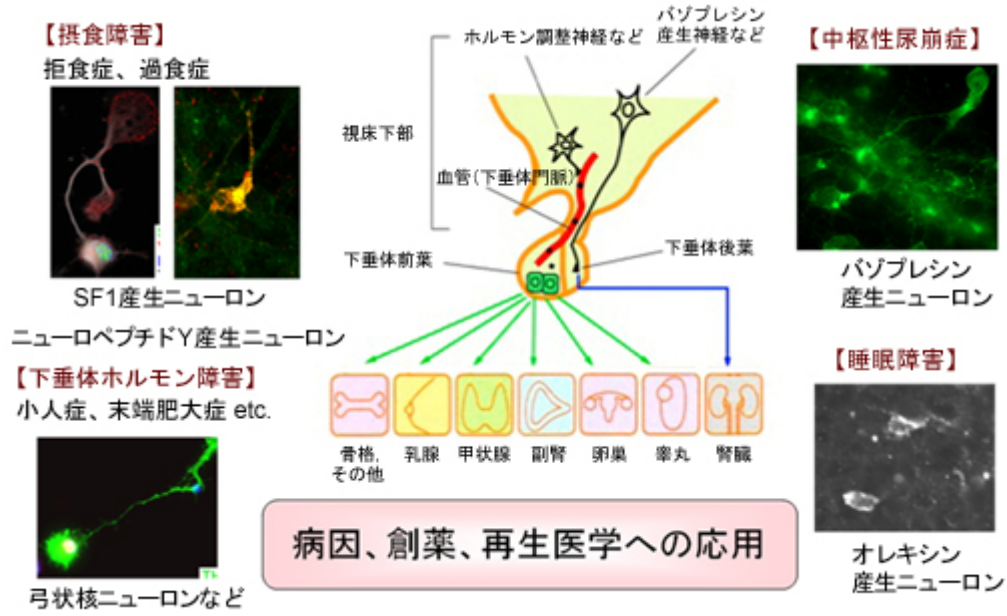


図7 ES細胞からの試験管内分化誘導法の応用への展望