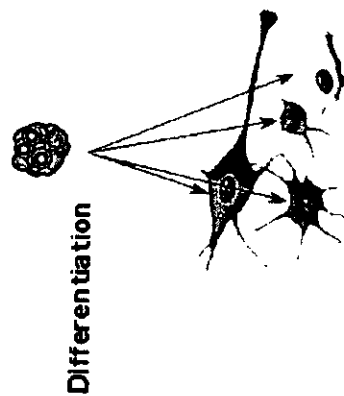


# 結果: TGF- $\beta$ 添加による分化に対する

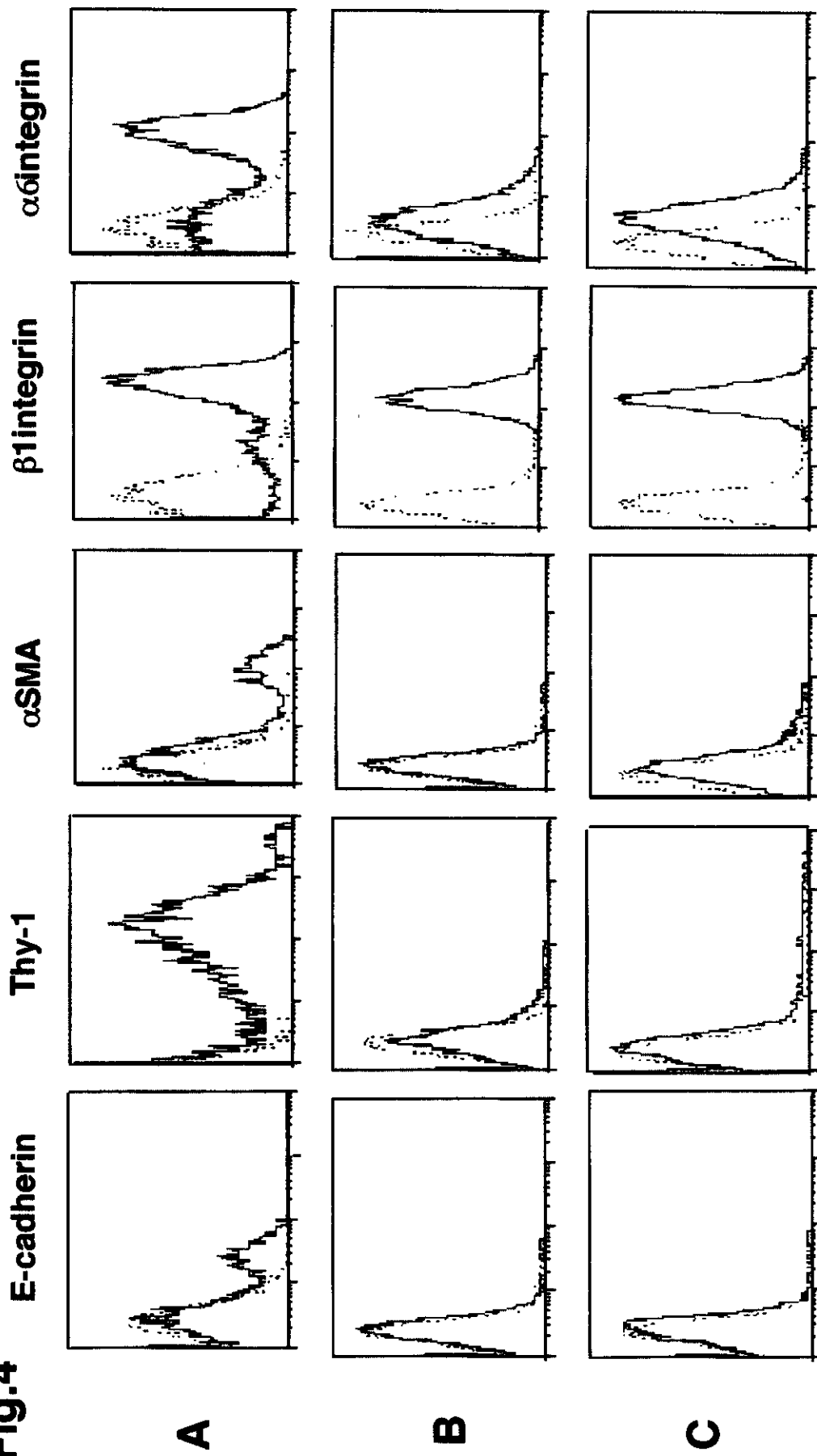
## 影響



・分化誘導 ; 1%ウシ血清, without EGF, bFGF で 1週間培養

増殖条件	EGF+bFGF	EGF+bFGF +TGF- $\beta$
分化条件	+TGF- $\beta$	+TGF- $\beta$
$\beta$ III Tubulin	~ 5%	~ 7%
GFAP	~ 6%	~ 5%
$\alpha$ SMA	~ 6%	~ 34%
Oil red O	rare	rare

**Fig.4**



**A : スフェア形成前    B : TGF-β非添加スフェア    C : TGF-β添加スフェア**

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

角化細胞 side population の解析

分担研究者 橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

## 研究要旨

角化細胞の幹細胞を同定する目的で、side population 細胞の分離法について検討した。Side population 細胞は骨髄で明らかにされたもので、ヘキスト 33342 色素を強く排出する能力を持った細胞で、幹細胞としての要素を持つものとして注目されている。表皮幹細胞を利用した再生医療を推進する上で、表皮幹細胞を効率よく分離する方法の確立が望まれる。そこで、表皮において side population が存在するかについて検討した。マウス表皮細胞を用いた FACS 解析により side population の存在が確かめられた。

### A. 研究目的

表皮角化細胞を用いた再生医療を推進するうえで、効率のよい細胞の分離と培養が必要である。このためには、表皮角化細胞の幹細胞を分離・培養することが最も適していると思われる。表皮角化細胞の幹細胞は過去の報告によると b1 integrin を強発現していることが明かとなっており、これらに対する抗体を用いた細胞の分離法が利用されてきた。しかし、抗体を用いる方法は少なからず細胞に対するダメージがあるため、臨床応用については疑問が持たれる。そこで、抗体を用いない幹細胞の分離法として骨髄細胞で行われているヘキスト 33342 を用いた分離法が角化細胞においても有用であるかについて検討を行った。

### B. 研究方法

新生児マウス皮膚を外科的に採取し、エタノール処理後、PBS にて洗浄し、ディスペパーゼ処理を 4℃、18 時間行った。表皮と真皮を剥離し、表皮部分をトリプシン処理し細胞を分離した。ヘキスト 33342 を 5, 10, 20 ug/ml の濃度で添加し、37℃ 60 分間染色を行った。遠心操作後細胞を 3x10E6/ml の濃度で再懸濁し、FACS により解析を行った。同時にレセルピンで処理した細胞をヘキスト 33342 で染色し、同様に解析を行った。

### C. 研究結果

マウス表皮角化細胞においても side population 細胞が存在していることが明かとなった。ヘキストの濃度は 5, 10, 20 ug/ml

の濃度すべてで良好に染色された。Side population であることの確信は、この細胞集団がレセルピンないしはベラパミルにより消失することにより確かめられるが、今回用いたレセルピン処理でこの細胞集団は消失した。以上のことにより、この集団は side population であることが確かめられた。全細胞集団に対する side population 細胞の割合は 0.5-5%の間であった (図)。

#### D. 考察

表皮角化細胞の幹細胞の分離法として表面マーカーを用いた分離法が従来おこなわれていたが、この方法では少なからず細胞に対するダメージが危惧されている。また、決定的な表面マーカーは見いだされておらず、抗体による染色に時間がかかることもあり、最適の分離法とはいえない。Side population 細胞 (SP) は骨髄において当初検討された細胞であり、骨髄 SP 細胞は幹細胞である可能性が高いと報告されている。その他の組織における SP の存在は精力的に検討されているが、表皮角化細胞における SP の存在はなされていなかった。今回の検討においてマウス表皮角化細胞には SP が含まれていることが明らかとなった。この細胞が表皮幹細胞としての性質を有するか否かについては次年度の検討課題である。この分離法がヒト角化細胞において確立されれば今後の表皮角化細胞を用いた再生医療に大きな貢献をもたらすことであろう。

#### E. 結論

マウス表皮角化細胞においても side population 細胞の存在が確かめられた。この side population 細胞が従来いわれている幹細胞のマーカーである b1 integrin, a6 integrin を強発現しているかどうか、さらには増殖能力が高いかについては cell sorter を用いて生きたまま細胞を回収し、検討を行うことが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表 (平成 14 年度)

##### 1. 論文発表

英語論文

1. Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, **Hashimoto K**, Raab G, Klagsbrun M, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Mekada E: HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function. **Proc Natl Acad Sci in press**
2. Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, **Hashimoto K**: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. **J Dermatol in press**
3. Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, **Hashimoto K**: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by

Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol in press**

4. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, **Hashimoto K**: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. **J Biol Chem.** 277:40390-40396, 2002
5. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K**: Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation **J Invest Dermatol** 119: 1231-1236, 2002
6. Tsuda T, Thoyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, **Hashimoto K**: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. **J Dermatol Sci in press**
7. Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Nishikawa T: BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci** 30:224-232, 2002
8. Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Tamaki K.: Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. **J Invest**

**Dermatol.** 119:403-410, 2002

日本語論文

1. 白方裕司、橋本公二: 下腿潰瘍の治療: 培養皮膚による治療。皮膚病診療 24:1006-1011 2002. 09
  2. 橋本公二: 上皮再生の現状と新たな展望。Medical Science Digest 28:8-10, 2002. 12
  3. 白方裕司、徳丸晶、橋本公二: 先天性表皮水疱症の治療。玉置邦彦ほか編 最新皮膚科学体系 6 水疱症・膿疱症 P198-204 東京:中山書店 2002. 05
2. 学会発表
1. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K**: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
  2. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K**: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society

for Dermatological Research September  
19, 2002, Geneva, Switzerland

HYPERSENSITIVITY” 20<sup>th</sup> World  
Congress of Dermatology June 1, 2002,  
Paris, France

3. **Hashimoto K.**, Shirakata Y, Yamasaki K:  
Cre-loxP adenovirus mediated foreign  
gene expression in skin equivalent  
keratinocytes. Symposia “GENE  
THERAPY” 20<sup>th</sup> World Congress of  
Dermatology June 5, 2002, Paris, France

4. **Hashimoto K.**, M Tohyama: HHV-6  
associated drug eruption (HADE).  
Symposia “CUTANEOUS DRUG  
ERUPTIONS & DRUG

**G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を  
含む）**

1. 特許取得

なし

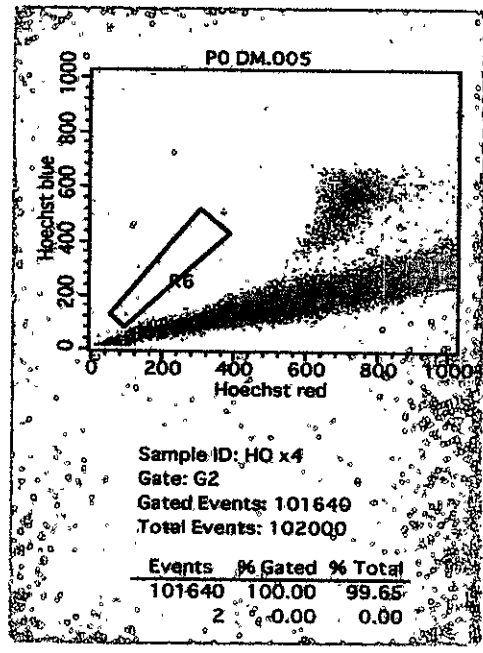
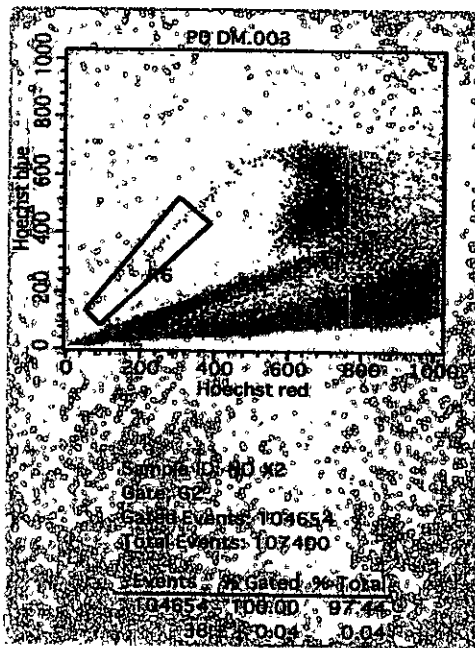
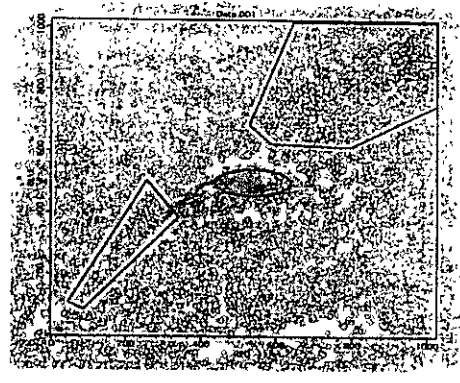
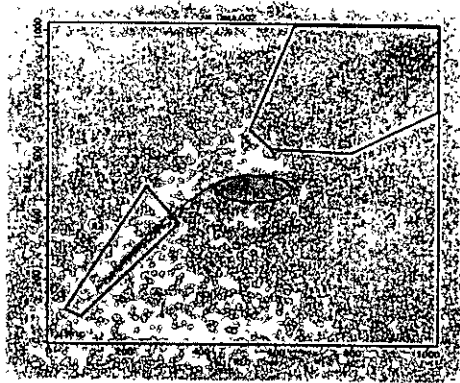
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 マウス角化細胞における SP の FACS パターン。ヘキスト 33342 を用いて染色し、UVlaser を用いて FACS 解析を行った。



厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

ヒト表皮角化細胞幹細胞におけるシグナル伝達に関する研究

分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨 表皮を構成する角化細胞の幹細胞における増殖や生存を維持し続ける分子メカニズムについて、表皮幹細胞のマーカーである $\beta 1$ -integrin (CD29) に着目してそのシグナル伝達機序を解析した。 $\beta 1$ -integrin の高発現は表皮角化細胞に PI3 キナーゼ, Gab1 の恒常的活性化を介して Akt および ERK の活性を誘導しておりことが示され、幹細胞の増殖能の維持や生存にはたらいっていることが明らかになった。

A. 研究目的

ヒト表皮は生涯にわたり分裂・増殖を続ける組織であり、再生能力も非常に高い。しかしながら、表皮を構成する角化細胞の幹細胞における増殖や生存を維持し続ける分子メカニズムについてはまだ明らかになっていない。われわれは、表皮幹細胞に高発現し表皮幹細胞のマーカーと考えられている $\beta 1$ -integrin (CD29) に着目し、角化細胞における $\beta 1$ -integrin の高発現がもたらすシグナル制御の機構を解析した。

B. 研究方法

ヒト表皮角化細胞株として HaCaT を用いた。HaCaT を蛍光標識された抗 $\beta 1$ -integrin 抗体と反応させ、フローサイトメーターにより $\beta 1$ -integrin 高発

現の細胞を分離し培養することにより、 $\beta 1$ -integrin 高発現 HaCaT 株を樹立した。

HaCaT 細胞は溶解バッファー (1% Nonidet P-40, または 1% Triton-X, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM Na orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF および蛋白分解酵素阻害剤) にて細胞を溶解し、溶解液を SDS-PAGE あるいは免疫沈降に用いた。免疫沈降は、細胞溶解液をマウスないしウサギ IgG およびプロテイン G 結合アガロースビーズで非特異反応を吸収した後、適当な抗体とプロテイン G ビーズを混合し、3~6 時間程度反応させた。ついで、ビーズを溶解バッファーにて 4 回洗浄し、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解した。細胞溶解液あるいは沈降させた蛋白



は SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜はペルオキシダーゼ標識抗リン酸化チロシン抗体または適当な抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス/ウサギ IgG 抗体で反応させた。これらのプロットは enhanced chemiluminescence を用いて化学発色させた。これらは Fluoro-S イメージャー (Bio-Rad) を用いて測定、定量し、解析に用いた。なお、各レーンの蛋白量が等しいことを確認するため、あるいは結合している別の蛋白を検出するために、プロット後抗体をはがし、適当な抗体で再度プロットを行った。また、PI3 キナーゼの活性の定量は ELISA を用いた。

また表皮角化細胞の増殖を制御するサイトカインである IL-15 のシグナル伝達機構についても同様の手法を用いて検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

本実験系は培養細胞株を用いるものであり、倫理面への配慮は特に生じない。

### C. 研究結果

セルソーターを用いた分離の繰り返しにより、通常の HaCaT 株よりも  $\beta 1$ -integrin を約 10 倍高発現する HaCaT 株を樹立することができた。

$\beta 1$ -integrin 高発現株において種々のシグナル分子・経路の活性化を解析した。

$\beta 1$ -integrin 高発現株では通常株に比べて、PI3 キナーゼの活性が約 2 倍程度増強しており、Gab1 の恒常的リン酸化が同様に約 2 倍に亢進していた。一方で Shc のリン酸化には両株で有意な差は認められなかった。

さらに  $\beta 1$ -integrin 高発現株においては Akt および ERK の活性化の著明な増強が認められた。

また、HaCaT において IL-15 を添加し刺激を加えると PI3 キナーゼと ERK の活性化が誘導された。PI3 キナーゼ阻害剤あるいは Erk 阻害剤を添加すると IL-15 の誘導する HaCaT の増殖は抑制された。一方、JNK, p38, STAT1, STAT3 の有意な活性化は検出されなかった。

### D. 考察

接着分子の  $\beta 1$ -integrin は幹細胞をはじめとする各種未分化細胞に高発現が認められ、未分化能や増殖能の維持に重要な役割をもつことが想定されている。われわれの検討では  $\beta 1$ -integrin 高発現により PI3 キナーゼの恒常的な活性増強が誘導された。また、ERK 活性化を調節するはたらきのあるアダプター分子である Gab1 の恒常的なリン酸化も増強し、それに

ともなって ERK の活性化が著明に増強していた。Gab1 ノックアウトマウスは表皮の形成に著明な障害があることが報告されていることから Gab1 の表皮角化細胞シグナルにおける重要性が示唆される。一方で同様に ERK の活性化に至る経路を制御する Shc のリン酸化には差が認められず、 $\beta 1$ -integrin による刺激非依存性の恒常的な増殖能の維持および生存には Gab1 を介したシグナルが重要であることが示唆された。このように  $\beta 1$ -integrin の発現は単にマーカーとして有用なだけでなく、その作用から見て合目的的であることが明らかになった。

IL-15 は表皮角化細胞において強い増殖誘導能をもつサイトカインで、その増殖制御機構が注目されている。IL-15 刺激により、Akt および ERK の活性化が誘導され、これらの共通したシグナル伝達経路が表皮角化細胞およびその幹細胞において、いろいろな側面からその機能を制御していることが示唆された。

#### E. 結論

表皮角化細胞の幹細胞に高発現する  $\beta 1$ -integrin は、Pi3 キナーゼ、Gab1 の恒常的活性化を介して Akt および ERK の活性を正に制御していることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### (ア) 論文発表

Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Interleukin 15 Induces the Signals of Epidermal Proliferation through ERK and PI 3-Kinase in Human Epidermal Keratinocyte Cell Line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303:841-847.

##### (イ) 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### (ア) 特許取得 なし

##### (イ) 実用新案登録 なし

##### (ウ) その他 特になし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

皮膚由来多能性幹細胞におけるその表面マーカーの同定と  
その由来の探索に関する研究

分担研究者 藤本 学 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨 再生医療に用いる細胞ソースとしてきわめて実用性が高いと考えられる皮膚由来の多能性幹細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体株を樹立した。皮膚由来多能性幹細胞には固有の表面マーカーが存在する可能性が高いことが示され、皮膚由来多能性幹細胞の基礎的研究および臨床応用に有用な手段となりうることが明らかになった。

A. 研究目的

近年、再生医学の目覚ましい進歩によってほぼすべての組織に幹細胞が同定されるようになり、その治療上の有用性が注目されている。同時に、それらの組織幹細胞はまったく異なる他の組織細胞に脱分化・再分化しうる可塑性を有することも明らかになってきた。これはある組織・臓器を再生する際に必ずしもその組織・臓器由来の細胞が必要とはならないことを意味し、再生医療の可能性をおおいに広げるものである。こうした観点から、もっとも侵襲が少なくアクセスでき再生能の高い「皮膚」がそのソースとして有用と考えられる。このため、われわれは皮膚から取得される多能性幹細胞に注目し、その由来や機能を探索すること

を目的とし、モノクローナル抗体の作製によって表面マーカーを同定することからアプローチした。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス皮膚より single cell suspension を作り、各種細胞成長因子の存在下で浮遊培養し、sphere 状のコロニーを得た。このコロニーには多能性幹細胞が含まれていることが確認されているため、これをおおよそ  $2 \times 10^7$  個の細胞数にて Wistar ラット腹腔内に 4 回免疫したのち、脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの反応性はフローサイトメトリーにて確認し、皮膚細胞に反応せず sphere コロニー細胞にのみ反応するものを陽性クローンと判定し、

サブクロニングを行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は当センター研究所動物管理委員会の定める規則を遵守し、実験方法の承認を得た。特に、処置にあたっては麻酔を行うなどによって動物に苦痛を与えないよう最大限の配慮を払った。

### C. 研究結果

C57BL/6 マウス皮膚より single cell suspension を浮遊培養し、約 10 日で sphere 状のコロニーを得、これを Wistar ラット腹腔内に投与した。4 週間の間隔で 3 回免疫した後に試験採血を行いコロニー細胞を免疫染色したところ、免疫前血清にくらべてきわめて強い反応性が確認されたため、さらに 1 回追加免疫を行った後に、脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。1500 クローンのうち、皮膚細胞と反応せず (mean fluorescence intensity 1.5 以下)、sphere 状のコロニー細胞と強い反応性 (mean fluorescence intensity 4.0 以上) をもつものを陽性クローンと判定したところ、陽性クローンは約 50 個得られた。このうち、反応性の強いものをサブクロニングし、14 個のクローンを得た。これらは、皮膚細胞に全く反応せず sphere 状コロニーの多数の細胞に強く反応するも

のおよび皮膚細胞のごく少数に反応し sphere 状コロニーの多数の細胞に強く反応するものが存在した。皮膚細胞の single cell suspension から直接得られる 1 次コロニーよりも継代した 2 次以降のコロニーの方が陽性細胞の割合が高く、継代によるクローン化によって幹細胞ないし未分化細胞が純化されていることが示唆された。

### D. 考察

近年報告された皮膚由来の多能性幹細胞の存在は、再生医療のストラテジーに大きなインパクトを与えた。すなわち、侵襲が少なく簡単にかつ頻回に採取しうる皮膚が組織再生のソースになることが示唆され、皮膚由来の多能性幹細胞の由来や機能、分化の制御法に大きな注目が集まっている。しかしながら、この皮膚由来幹細胞の由来や選択的な培養法はまだ確立されておらず、この解明が大きな課題と成っている。われわれは、この皮膚由来幹細胞の性状解析が今後の臨床応用の上で必須の課題と考え、その表面マーカーを同定し、その由来の探索をモノクローナル抗体作製から試みた。現在、陽性クローンの標的分子を同定中であるが、これまでに得られた結果より、皮膚由来幹細胞には固有の表面マーカー

が存在する可能性が高いことが明らかになり、同時に、皮膚細胞に全く反応しないクローンと皮膚細胞のごく少数に反応するクローンが存在したことから、特に後者はこれらの幹細胞の由来および in vivo での幹細胞を同定する有力なツールになることが期待される。

#### E. 結論

皮膚由来多能性幹細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体株を樹立した。これらの標的分子は現在同定中であるが、皮膚由来多能性幹細胞の基礎的研究および臨床応用に有用な手段となると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許取得 なし

(イ) 実用新案登録 なし

(ウ) その他 特になし

## 霊長類 ES 細胞への遺伝子導入法の開発

花園 豊

自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

### ① 目的

ヒト ES 細胞は三胚葉性の多分化能と無限増殖能を併せ持つことから、様々な疾患や傷害に対する細胞治療への応用が期待されている。ただしこの実現にはヒト ES 細胞の遺伝子操作技術が重要になると思われる。例えば、マウス ES 細胞に HoxB4 遺伝子がある期間発現させると造血幹細胞に分化できるように、分化制御のために ES 細胞の遺伝子操作が広く行われるようになる。本研究では、霊長類の ES 細胞に対して効率的な遺伝子導入技術の確立を目指す。従来の ES 細胞研究の大半はマウスの系で行われてきたが、マウスの系はヒトを必ずしもよく反映しない。また、将来ヒト ES 細胞を臨床応用するためには、その有効性と安全性をヒト以外の霊長類の系で検証することが必須になる。そこで我々はカニクイザル ES 細胞を用いて研究を進めている。

### ② 方法と結果

サル ES 細胞: カニクイザル ES 細胞株 (CMK6 または CMK10) を使用した (京都大学中辻教授および田辺製薬から供与)。

アデノウイルスベクターとアデノ随伴ウイルスベクター: カニクイザル ES 細胞にアデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターで GFP 遺伝子を導入すると、いずれのベクターでも最高で約 20% の細胞が GFP 陽性になる (FACS による観察)。しかし、GFP 陽性細胞は次第に減少し、遺伝子導入 1 週間後には GFP 陽性細胞は検出されなくなった。アデノウイル

スベクターは宿主ゲノムに組み込まれないし、アデノ随伴ウイルスベクターは宿主ゲノムに組み込まれてもその頻度は高くない。そのためこれらのベクターで導入した GFP 遺伝子は、細胞が分裂して増えるに従い希釈されてしまったと考えられる。

レトロウイルスベクターとレンチウイルスベクター: 安定した遺伝子発現を得るためには、導入遺伝子がゲノムに組み込まれるベクターが必要である。ゲノムに組み込まれるベクターにはレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターがある。レンチウイルスもレトロウイルスの一つであるが、本稿ではオンコレトロウイルスを単にレトロウイルスと呼ぶことにする。

レトロウイルスベクターは、従来モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) ベクターが汎用されてきた。今回の実験では、その long terminal repeat (LTR) を改変して、マウス ES 細胞や造血幹細胞で導入遺伝子の発現を高める工夫をしたマウス幹細胞ウイルス (murine stem cell virus, MSCV) ベクターを用いた。MSCV ベクターでカニクイザル ES 細胞へ GFP 遺伝子の導入を試みたところ、GFP 発現率は約 1% に過ぎなかった。

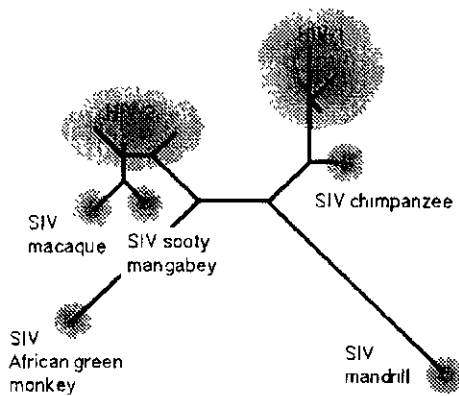


図1 霊長類レンチウイルスの系統樹 (rev 遺伝子の塩基配列を元に作成)

レンチウイルスベクターは、一般的にはヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をベースにしたものが用いられている。しかし、HIV-1 はヒトに対して強い病原性があるため、そのベクターの使用はどうしても慎重にならざるを得ない。一方、同じ霊長類レンチウイルスでも、アフリカミドリザル由来のもの (simian immunodeficiency virus African green monkey, SIVagm) は自然宿主に対して病原性がない。しかも HIV-1 とは遺伝学的にかなり離れている (図1)。実際、塩基配列の相同性は 50% と低い。したがって SIVagm ベクターが HIV-1 と組換えを起こして新種ウイルスを作り出す可能性が低い。すなわち、SIVagm ベクターは安全性が高い。今回実験に使ったのはこの SIV ベクターである (ディナベック研究所より供与)。

SIV ベクターでカニクイザル ES 細胞へ GFP 遺伝子を導入すると、非常に高い GFP 発現率を示した (FACS によると 1 TU/cell で 58%, 10 TU/cell で 82%, 100 TU/cell で 92%)。しかもこの高い GFP 発現は 5 ヶ月以上観察された (図 2A)。GFP 平均蛍光強度も同様に長期間にわたって安定していた (図 2B)。GFP 遺伝子を導入した未分化 ES 細胞から胚様体を形成させると、胚様体形成後も高い GFP 発現を認めた。レンチウイルスベクターを用いると、ES 細胞をある程度分化させても導入遺伝子の発現が衰えないことがわかった。

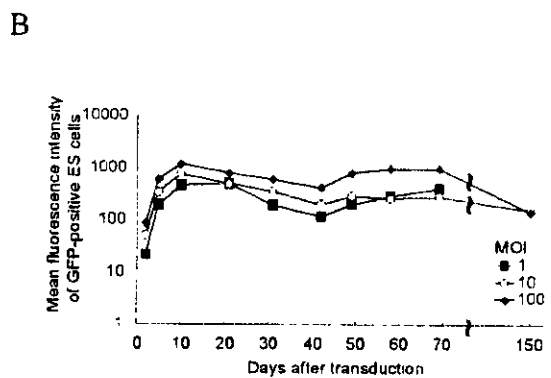
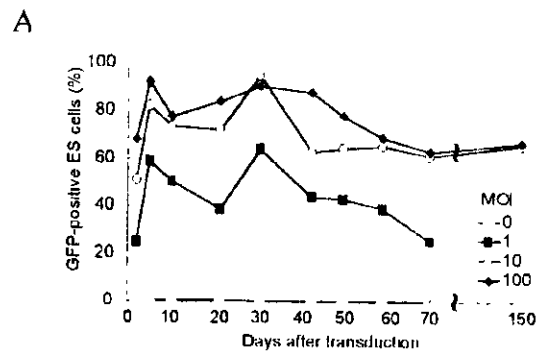


図2 カニクイザル ES 細胞に対する SIV ベクターを用いた GFP 遺伝子導入。(A) GFP 陽性細胞 (%)。 (B) GFP 平均蛍光強度。MOI: TU/cell

### ③ 考察

サル ES 細胞に対する遺伝子導入法では、アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを用いた場合、導入遺伝子の発現が一過性であった。レトロウイルスベクターでは遺伝子導入効率がきわめて低かった。サル ES 細胞への遺伝子導入にはレンチウイルスベクターが断然優れていると言える。

従来のレトロウイルスでは、たとえ ES 細胞に遺伝子が導入できても、発生途上でサイレンシングを受け、その発現は抑制されてしまう。そのためレトロウイルスベクターを用いる ES 細胞への遺伝子導入法では、よいトランスジェニックマウスは得られないと言われている。一方、最近の報告によると、マウス ES 細胞にレンチウイルスベクターで遺伝子を導入して、それを胚盤胞に戻しキメラマウスをつくると、生

まれたマウスで導入遺伝子の発現が認められたという。

レンチウイルスベクターとレトロウイルスベクターで導入した遺伝子発現のこの顕著な違い（サイレンシングの有無）は、これらのウイルスの生活環に関係すると思われる。レトロウイルスの伝播は生殖細胞を通じた垂直感染に依存している。したがって、宿主ゲノムに組み込まれたレトロウイルスの遺伝子発現を抑えなければ、ウイルスはその宿主個体内に広がるのみならず、生殖を通じて後代まで伝わることになる。これを避けるために、哺乳動物はゲノムに組み込まれたレトロウイルスをメチル化等によってサイレンシングする機構を備えるようになったといえる。一方、レンチウイルスは、その内因性ウイルスが哺乳類で見つかっていないことからわかる通り、その伝播は、生殖細胞を介さない水平感染に依存している。したがって、ゲノムに組み込まれたレンチウイルスをサイレンシングする機構を備える必要が生じなかったのであろう。

#### ④ 発表

1. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A., Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *Biochem Biophys Res Comm* in press
2. Hanazono Y, Asano T, Ueda Y, Ozawa K: Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors *Trends in Cardiovascular Medicine* in press
3. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K: *In vivo* expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* in press
4. Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Nishino H, Takeuchi K, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K: Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice *Gene Ther* 2003;10:51-58.
5. Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I: Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport *Neurosci Res* 2003;45:33-40.
6. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ohto K, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Donahue RE, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K: Safe and efficient methods for cynomolgus monkey autologous hematopoietic stem cell transplantation for biomedical researches. *Comp Med* 2002, 52: 445-451.
7. Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Okada T, Ozawa K: Selective expansion of transduced cells for hematopoietic stem cell gene therapy. *Int J Hematol* 2002; 76: 299-304.
8. Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Lijun W, Lu Y, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Muramatsu S, Nakano I, Ozawa K: Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* 2002; 28: 237-247.
9. Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I: Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis *J Neurosci* 2002; 22: 6920-6928
10. Hanazono Y, Terao K, Shibata H, Nagashima T, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Kato I, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K: Introduction of the GFP gene into hematopoietic stem cells results in



prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells in nonhuman primates. *J Gene Med* 2002; 4: 470-477

- 11 Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Hani K, Hasegawa M, Nakatsuji N, Ozawa K: Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol. Ther* 2002; 6: 162-168.
12. Kume A, Koremoto M., Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Sugamura K, Ozawa K: Selective growth advantage of wild-type lymphocytes in X-linked SCID recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30: 113-118.
13. Hanazono Y, Nagashima T, Takatoku M, Shibata H, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Dunbar CE, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K: *In vivo* selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. *Gene Ther.* 2002; 9: 1055-1064
14. Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M, Hanazono Y, Kume A, Tobita K, Ozawa K, Kawai N AAV mediated gene transfer for gene therapy of ischemia-induced neuronal death *Methods. Enzymol.* 2002, 346: 378-393.
- 15 Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada K, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 2002; 9: 381-389

(平成 14 年度 分担研究)

## 報告書

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）

### 分担研究報告書

Stem cell を用いた人工皮膚の再構築に関する研究  
分担研究者 古江 美保 神奈川歯科大学口腔生化学

研究内容要旨： マウス胚性未分化細胞(ES)の無血清培養条件を確立し、同条件下において未分化性が制御できることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

上皮細胞だけでなく、汗腺や毛のうなども兼ね備えた機能性皮膚を *in vitro* で構築するために、胚性未分化細胞の自立性分化を制御して分化制御法を確立し、効率的に皮膚組織幹細胞を誘導することを目的として研究を行った。

#### B. 研究方法

マウス胚性未分化細胞(ES)D3細胞をフィーダー細胞を用いず、種々の無血清培養条件(chemically defined serum-free culture)にて培養を行い、胚性未分化細胞のマーカであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の検出、さらに、OCT3/4の発現を免疫組織学的に解析、ならびにフローサイトメトリーによる解析を行った。

#### C. 研究結果

本研究にて確立した無血清培養条件にて D3 細胞の培養を行うと、培養6日目であっても ALP 陽性、抗 OCT3/4 抗体陽性の未分化な形態を維持した細胞がほとんどであった。さらに、これまで報告されている血清を添加した ES 細胞用の培養条件 (1) と同無血清培養条件 (2) で4日間培養を行った細胞の OCT3/4 の発現率をフローサイトメトリーで解析したところ、(1) では 72.3%、(2) では 93.3%であった。

#### D. 考察

ES 細胞を今回確立した培養条件で培養を行うと、その未分化性を制御できることが明らかとなった。これにより、今後、添加因子の影響を正確に解析し、上皮細胞への分化制御機構を解析することが可能となった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

マウス胚性未分化細胞の無血清  
培養条件につき出願予定

2. 実用新案登録

なし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大河内 仁志	天疱瘡・類天疱瘡		薬学部学生のための臨床医学テキスト	文光堂	東京	印刷中	
大河内 仁志	糖尿病性潰瘍		難治性皮膚疾患をなおすスキル	文光堂	東京	印刷中	
大河内 仁志	毛髪再生にむけて		臨床現場での再生医療の最前線	羊上社	東京	2003年 3月	P 84-88
大河内 仁志	若年性類天疱瘡	玉置 邦彦 他編	最新皮膚科学体系6 水疱症 膿疱症	中山書店	東京	2002年 5月31日	P117-120
大河内 仁志	薬物による粘膜障害、物理化学的粘膜障害		今日の皮膚疾患治療指針第3版	医学書院	東京	2002年 6月1日	P669-672
白方 裕司 徳丸 晶 橋本 公二	先天性表皮水疱症の治療	玉置 邦彦 他編	最新皮膚科学体系 6 水疱症・膿疱症	中山書店	東京	2002年 5月	P198-204

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大河内 仁志	毛髪再生医療	遺伝子医学			印刷中
大河内 仁志	皮膚の幹細胞と再生医療	最新医学	58	789-796	2003
大河内 仁志	皮膚と再生医療	日皮会誌	113	247-251	2003
大河内 仁志	皮膚にある幹細胞と再生医療への応用	BIO Clinica	18	76-80	2003
大河内 仁志	皮膚を幹細胞ソースに	Doctor's magazine	38	38-39	2002