

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

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に
関する研究 (H15-再生-007)

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の調整と寿命延長法の開発-----	9
梅澤 明弘	
2. ヒト幹細胞の完全ヒト型培養システムの開発と臨床材料の提供-----	15
藤本 純一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	26

骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

主任研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 教授

研究要旨

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。GFP で標識した各種細胞を心筋への分化誘導後、抗心筋トロポニン抗体で評価した。またそれらの細胞をマウスへ移植後、免疫組織科学的な検討を行った結果、寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが明らかとなった。

梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部・生殖病理学部長
藤本 純一郎 国立成育医療センター研究所副所長

A. 研究目的

心筋梗塞や心筋症による重症心不全に対する根本治療には、脳死患者よりの生体心移植以外存在しないが、ドナー不足は社会問題となっていることは周知である。したがって、心筋再生療法は心不全・心筋梗塞の新しい治療法として注目されている。平成 15 年度はヒト骨髄間葉系幹細胞を *in vitro* で心筋細胞へ形質転換させる方法の開発とそれを誘導する分子の単離、ヒト骨髄間葉系幹細胞をモデルとした完全ヒト型培養システムの開発を主な目的とした。

B. 研究方法

1)心筋誘導因子の精製

ストローマ細胞である OP9 の全長 DNA より発現ベクターライブラリーを作成し、P19CL6 細胞に cDNA を導入する。P19CL6 細胞の心筋細胞への分化効率を自律拍動の有無、心筋蛋白、遺伝子の発現をもとに検討した。この方法により、心筋への分化効率を高める cDNA ライブラリーを同定し、スクリーニングを繰

り返すことにより目的とする遺伝子を単離する。

2)ヒト間葉系細胞の寿命延長

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。ヒト骨髄間葉系細胞を限外希釈法でサブクローニングをして得られた細胞に、レトロウィルスを用いて TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入した。得られたヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞をアデノウイルスにより GFP で標識し、マウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋へ分化させ、さらに免疫組織化学を用いて抗心筋トロポニン抗体で評価した。また、免疫不全マウスの心筋にヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を注射し、心筋への分化を免疫組織化学により評価した。骨髄間質細胞と心筋細胞の共培養に使用する心筋細胞を得るために、培養心筋細胞を用いた。具体的に、妊娠 14 日目マウスを頸椎脱臼後、開腹し、胎児を摘出する。さらに開胸した胎児から心臓を摘出し、細断する。心筋細胞塊をトリプシン液で単細胞に分離した後に培養皿に移して培養を開始した。

3)完全ヒト型幹細胞培養法の確立

遺伝子導入により寿命を延長したヒト間葉系幹細胞を用い、培地組成、増殖因子、細胞増殖動態などにつ

いて有効な成分・濃度を検討し、至適化を行った。具体的には、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を同じ細胞密度でシャーレに播種した後、本培地と 10%牛胎児血清含有 DMEM (従来培地) とでそれぞれ 5 日間培養し、細胞形態を観察した。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 10%牛胎児血清含有 DMEM (従来培地) と本培地で継代培養を行った結果、従来培地に比較した。30 日以上継代した細胞について細胞表面マーカーの発現を検討した

4)幹細胞における分子発現に関する検討

ヒト EC 細胞株 NCR-G3,マウス EC 細胞株 F9 を用いて、抗 SSEA-4 抗体である Raft.2 抗体の NCR-G3,F9 における発現、各種の接着分子の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認)。

実験動物を用いる研究については、千葉大学並びに国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して(動物実験委員会に現在・申請済み)研究を実施する。特に実験は、動物愛護と動物福祉の観点から動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際の手技は、麻酔等手段により苦痛を与えない配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1)心筋誘導因子の精製

OP9 の全長 DMA より発現ベクターライブラリーを作成し、P19CL6 細胞に cDNA を導入し、P19CL6 細胞の心筋細胞への分化効率を自律拍動の有無、心筋蛋白、遺伝子の発現をもとに検討した結果、心筋への分化を促進する cDNA ライブラリーが存在することが明らかになった。現在、目的とする遺伝子を単離するために、さらにスクリーニングを行っている。

2)ヒト間葉系細胞の寿命延長

ヒト骨髄液から浮遊細胞と接着細胞を分離し、得られた接着細胞のうち増殖能の良好な骨髄間質細胞を限外希釈法でサブクロニングした。得られた細胞に、レトロウィルスを用いて TERT、E6、E7、または Bmi-1 を遺伝子導入した。遺伝子を導入した組み合わせにより、4 種類の細胞を得た。Bmi-1、TERT を導入した細胞を UBT-5、Bmi-1、E6、TERT を導入した細胞を UBET-7、E6、E7、TERT を導入した細胞を UEET-11、E7、TERT を導入した細胞を UBET-13 と名付け、それぞれについて心筋への分化能を *in vitro*、*in vivo* において検討した。

GFP で標識されたヒト間葉系幹細胞は胎児心筋細胞との共培養 2 日後に筋管細胞様に延長し、3 日後には GFP 陽性の横紋構造を有する心筋細胞の形態を有する細胞が拍動する像が認められた。拍動細胞は培養を継続すると経時的に増加した。これらの細胞を免疫組織化学により、心筋特異的蛋白である抗トロポニン I 抗体で染色した。GFP 陽性細胞はトロポニン I を発現しており、GFP 陽性骨髄間質細胞が心筋に分化したと考えられた。さらに RT-PCR を用いてヒト心房性ナトリウム利尿ホルモン (hANP)、心筋特異的転写因子である Csx、およびミオシン軽鎖の発現も認められた。また、*in vivo* においてもヒト骨髄間葉系細胞を移植された免疫不全マウスの心臓に抗心筋トロポニン抗体と抗 β 2 ミクログロブリン抗体陽性の移植細胞が認められた。

分化心筋細胞の活動電位は、共培養 7 日目では、膜電位が浅い胎児型の心筋細胞様であり、不規則なりズ

ムを示したが、3週間の培養により、膜電位は深くリズムは規則的になり、培養を継続することによって、より成熟した心筋細胞に分化することが証明された。

3)完全ヒト型幹細胞培養法の確立

完全ヒト型幹細胞培養法の培地組成については、増殖因子以外は細胞種を変えても同程度の増殖を示した。これらは寿命延長をしていない初代細胞についても同様の結果を示した。増殖因子については細胞系列による差異が大きい、初代細胞での結果を重視し、最適な増殖因子を選択した。その結果、従来の増殖培地には通常10%の血清成分を含んでいたが、血清中には特定不能な種々の因子が存在し、実験の解析に障害となっていた。本培地は培地成分に改良を重ねた結果、血清成分を1%に抑えることが出来た。細胞増殖動態については、継代培養における培養日数と細胞倍加集団数との関係について従来培地(10%FCS-DMEM)及びMSCGM(10%血清)との比較を行った結果、完全ヒト型幹細胞培地は複数の細胞増殖因子を組み合わせることで、従来培地(10%血清含有DMEM)より増殖性が優れた。また、6代程度継代した後、細胞表面マーカー発現を従来培地と比較してみたが、変化は認められなかった。

4)幹細胞における分子発現に関する検討

ヒトEC細胞株NCR-G3について、レチノール酸による分化誘導系での各種細胞の骨格発現様式の変化を共焦点レーザー顕微鏡により検討した結果、アクチン結合タンパクであるファスチンが分化に伴って他の細胞接着分子とは全く異なる局在を示すこと、分化がさらに進むに従って、消失することが明らかとなった。Raft.2抗体のNCR-G3およびマウスEC細胞株F9における発現を検討したところ、本来細胞膜上に糖脂質あるいは糖蛋白として存在すべきSSEA-4エピトープが細胞質内で特定の場所に糖蛋白として存在することを確認した。したがって、ファスチンが他の細胞接着関連分子とは異なる役割を担っている可能性が示唆された。また、SSEA-4構造が細胞膜上での機能以外を保

有していることが示された。

D. 考察

ストローマ細胞は支持細胞として分泌因子、接着因子、マトリックスを産生し、細胞の分化制御、誘導に関与している。Teratcarcinoma由来のP9CL6細胞はDMSOにより高率に心筋細胞へ分化するが、その機序は明らかではない。現在我々がスクリーニングしている誘導因子が同定されれば、心筋細胞への分化の分子機序の解明に大きく前進すると考えられる。細胞が他の細胞の形質を獲得する機序にtransdifferentiationと細胞融合が存在する。我々は、GFP陽性のヒト骨髓間葉系細胞とLac-Z陽性マウス心筋細胞を共培養したが、GFPおよびトロポニンI陽性の分化誘導細胞はLac-Zを発現しておらず、ヒト骨髓間葉系細胞はマウス心筋細胞との細胞融合ではなく、transdifferentiationにより分化していると考えられた。完全ヒト型幹細胞培地は低血清培地でありながら、従来の培地に匹敵またはそれ以上の増殖性を有した。本培地に含まれるタンパク質成分は添付の牛胎児血清以外はヒト型(或はヒト由来)のものを使用しており、ヒト由来細胞の培養に適しており、今後、ヒト幹細胞移植が臨床応用される上で有用と考えられた。

E. 結論

ストローマ細胞は心筋分化誘導因子を発現している可能性が、発現ベクターによる実験系から強く示唆された。また、寿命延長したヒト骨髓間葉系細胞は心筋細胞に分化することがin vitro、in vivoの実験から明らかになった。低血清濃度で非ヒト蛋白を排除した完全ヒト型培養システムはヒト骨髓間葉系細胞の培養に有用であり、今後、他のヒト幹細胞にも応用可能である。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamashita, J., Kita, S., Iwamoto, T., Ogata, M., Takaoka, M., Tazawa, N., Nishikawa, M., Wakimoto, K., Shigekawa, M., Komuro, I., and Matsumura, Y. Attenuation of Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury in Mice Deficient in Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *J Pharma Experimental Therapeutic* 304:284-293, 2003.
- (2) Fan, C., Duhagon, M.A., Oberti, C., Chen, S., Hiroi, Y., Komuro, I., Duhagon, P.I., Canessa, R., Wang, Q. Novel TBX5 mutations and molecular mechanism for Holt-Oram syndrome. *J Med Genet* 40:e29, 2003.
- (3) Funabashi N, Komiyama N, Komuro I. Multiple cystic aneurysms in aortitis demonstrated by three dimensional volume rendering images of multislice computed tomography. *Heart*: 89:257, 2003.
- (4) Funabashi, N., Komiyama, N., Yanagawa, N., Mayama, T., Yoshida, K., Komuro, I. Coronary artery patency after metallic stent implantation evaluated by multislice computed tomography. *Circulation*:107:147-148, 2003.
- (5) Koizumi .T., Miyazaki, A., Komiyama, N., Sun, K., Nakasato, T., Masuda, Y., Komuro, I. Improvement of left ventricular dysfunction during exercise by walking in patients with successful percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Circ J* 67:233-237, 2003.
- (6) Yao, A., Kohmoto, O., Oyama, T., Sugishita, Y., Shimizu, T., Harada, K., Matsui, H., Komuro, I., Nagai, R., Matsuo, H., Serizawa, T., Maruyama, T., Takahashi, T. Characteristic effects of alpha-1-beta1, 2- adrenergic blocking agent, carvedilol, on [Ca²⁺]_i in ventricular myocytes compared with those of timolol and atenolol. *Circ J* 67:83-90, 2003.
- (7) Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Komuro, I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomeres in endothelial dysfunction *J Cardiol.* 41:39-40, 2003.
- (8) Funabashi, N., Komiyama, N., Komuro, I. Patency of coronary artery lumen surrounded by metallic stent evaluated by three dimensional volume rendering images using ECG gated multislice computed tomography. *Heart* 89:388, 2003.
- (9) Iijima, Y., Nagai, T., Mizukami, M., Matsuura, K., Ogura, T., Wada, T., Akazawa, H., Takano H., Nakaya, H., Komuro, I. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. *FASEB J* 17:1361-1363, 2003.
- (10) Kudoh, S., Akazawa, H., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Nagai, T., Komuro, I. Stretch-modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport. *Prog Biophys Mol Biol* 82:57-66, 2003.
- (11) Akazawa, H., Komuro, I. Too much Csx/Nkx2-5 is as bad as too little? *J Mol Cell Cardiol* 35 :227-229, 2003.
- (12) Kayaba, Y., Nakamura, A., Kasuya, Y., Ohuchi, T., Yanagisawa, M., Komuro, I., Fukuda,., Kuwaki, T. Attenuated defence response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R581-R593, 2003.
- (13) Nagai, T., Tanaka-Ishikawa, M., Aikawa, R., Ishihara, H., Zhu, W., Yazaki, Y., Nagai, R., Komuro I. Cdc42 plays a critical role in assembly of sarcomere units series of cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 305:806-810, 2003.
- (14) Funabashi, N., Toyozaki, T., Matsumoto, Y., Yonezawa, M., Yonagawa, N., Yoshida, D., Komuro, I. Images in cardiovascular medicine. Myocardial fibrosis in fabry disease demonstrated by multislice computed tomography: comparison with biopsy findings. *Circulation* 107:2519-2520, 2003.
- (15) Wakimoto, K., Fujimura, H., Iwamoto, T., Oka, T., Kobayashi, K., Kita, S., Kudoh, S., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Shigekawa, M., Imai, Y., Komuro, I. Na⁺/Ca²⁺ exchanger-deficient mice have disorganized myofibrils and swollen mitochondria in cardiomyocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135:9-15, 2003.

- (16) Sato, M., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Usui, H., Kasuya, Y., Fukuda, M., Kohara, Y., Komuro, I., Kimura, S., Characterization of a novel C. elegans RGS protein with a C2 domain:evidence for direct association between C2 domain and Galphaq subunit. *Life Sci* 73:917-932, 2003
- (17) Funabashi, N., Komiyama, N., Komuro, I. Images in cardiology. Fibromuscular dysplasia in renovascular hypertension demonstrated by multislice CT: comparison with conventional angiogram and intravascular ultrasound. *Heart* 89:639, 2003.
- (18) Kuroda, N., Kobayashi, Y., Desai, K., Costantini, C., Kobayashi, M., Komuro, I. Impact of change in the price of percutaneous coronary intervention devices on medical expenses. *Circ J* 67:576-578, 2003.
- (19) Takano, H., Hasegawa, H., Nagai, T and Komuro, I. The role of PPAR γ -dependent pathway in the development of cardiac hypertrophy. *Drugs of Today* 39:347-357, 2003.
- (20) Zou, Y., Takano, H., Mizukami, M., Akazawa, H., Qin, Y., Toko, H., Sakamoto, M., Minamino, T, Nagai,T.,Komuro I. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Survival of Cardiomyocytes and Induces Regeneration of Myocardium After Myocardial Infarction. *Circulation* 108:748-753, 2003.
- (21) Hasegawa, H., Yamamoto, R., Takano, H., Mizukami, M., Asakawa, M., Nagai, T.,Komuro, I. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol* 35:953-960, 2003.
- (22) Funabashi, N., Yoshida, K., Komuro, I. Thinned myocardial fibrosis with thrombus in the dilated form of hypertrophic cardiomyopathy demonstrated by multislice computed tomography. *Heart* 89:858, 2003.
- (23) Funabashi, N., Teramoto, K., Komuro, I. Patency of multiple coronary artery bypass grafts demonstrated by multislice CT. *Heart* 89:818, 2003.
- (24) Minamino, T., Komuro, I. The role of telomerase activation in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Drug News Perspect* 16:211-216, 2003.
- (25) Funabashi, N., Ito, K., Komuro, I. Multi-vessel dissections in Marfan syndrome demonstrated by multislice computed tomography. *Heart* 89 :1146, 2003.
- (26) Funabashi, N., Yonezawa, M., Iesaka, Y., Umekita, H., Yanagawa, N., Matsumoto, Y., Yoshida, K., Komuro, I. Complications of pulmonary vein isolation by catheter ablation evaluated by ECG-gated multislice computed tomography. *Heart Vessels* 18:220-223, 2003.
- (27) Minamino, T., Yoshida, T., Tateno, K., Miyauchi, H., Zou, Y., Toko, H., Komuro, I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in Human atherosclerosis. *Circulation* 108: 2264-2269, 2003.
- (28) Cohen-Barak, O., Yi,Z., Hagiwara, N., Monzen, K., Komuro, I., Brilliant, M.H. Sox6 regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Res* 31:5941-5948, 2003.
- (29) Kuroda, N., Kobayashi, Y., Mintz, G.S., Komuro, I. Images in cardiovascular medicine. Multiple ruptured plaques: serial intravascular ultrasound examinations. *Circulation* 4: 131e-132e, 2003.
- (30) Funabashi, N., Misumi, K., Ohnishi, H., Watanabe, M., Suzuki, Y., Imai, N., Yoshida, K., Komuro, I. Endoluminal perspective volume rendering of coronary arteries using electron-beam computed tomography. *Circ J* 67: 1064-1067, 2003.
- (31) Zou, Y., Zhu, W., Sakamoto, M., Qin, Y., Akazawa, H., Toko, H., Mizukami, M., Takeda, N., Minamino, T., Takano, H., Nagai, T., Nakai, A., Komuro, I. Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 108: 3024-3030, 2003.
- (32) Naito, A.T., Tominaga, A., Oyamada, M., Oyamada, Y., Shiraishi, I., Monzen, K., Komuro, I., Takamatsu, T. Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation

- and expression of Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Exp Cell Res* 291:56-69, 2003.
- (33) Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Akihiro Umezawa, A.: A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, in press.
- (34) Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., Umezawa, A.: Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?, *J Gene Med*, in press.
- (35) Sharov, A. A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D. B., Qian, Y., VanBuren, V., Falco, G., Martin, P. R., Stagg, C. A., Bassey, U. C., Wang, Y., Carter, M. G., Hamatani, T., Aiba, K., Akutsu, H., Sharova, L., Tanaka, T. S., Kimber, W. L., Yoshikawa, T., Jaradat, S. A., Pantano, S., Nagaraja, R., Boheler, K. R., Taub, D., Hodes, R. J., Longo, D. L., Schlessinger, D., Keller, J., Klotz, E., Kelsoe, G., Umezawa, A., Vescovi, A. L., Rossant, J., Kunath, T., Hogan, B. L. M., Curci, A., D'Urso, M., Kelso, J., Hide, W., and Ko, M. S. H.: Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos, *PLoS Biology*, 1(3): 410-419 2003.
- (36) Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288: 35-50, 2003.
- (37) Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., and Umezawa, A.: In vivo Cardiovasculogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells. *Exp Cell Res*, 288: 51-59, 2003.
- (38) Allan, E. H., Ho, P.W., Umezawa, A., Hata, J., Makishima, F., Gillespie, M. T., Martin, T. J.: Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem.*, 90(1):158-169, 2003.
- (39) Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H.: Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by notch signaling. *Exp Cell Res*, 290(2):370-80, 2003.
- (40) Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and Umezawa, A.: Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocr.* 203 105-116, 2003.
- (41) Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J Periodontal Res.* 38(3):333-342, 2003.
- (42) Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A.: Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 22(1): 1-9, 2003.
- (43) Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A.: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003
- (44) Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology international*, 53: 214-220, 2003
- (45) Shibata, R., Umezawa, A., Takehara, K., Aoki, D.,

- Nozawa, S., Hata, J.: Primary carcinosarcoma of the vagina, *Pathol Int.*, 53:106-110, 2003
- (46) 梅澤明弘：神経幹細胞の供給源 骨髄-骨芽細胞、神経疾患の再生医療-その現状と将来、*Clinical Neuroscience*, 21(10): 1127-1130, 2003.
- (47) 梅澤明弘：再生医療の展望 1. 細胞移植による再生医療、*日本内科学会誌* 第92巻 第9号 平成15年9月10日 1758-1762。
- (48) 森泰昌、今林英明、梅澤明弘：再生医学と幹細胞-成体幹細胞、*日医雑誌*、129(3): 307-312, 2003。
- (49) 槌谷宏平、松野丈夫、梅澤明弘：間葉系幹細胞、*日本医学会新聞* (2523), 2003年2月17日。
- (50) 梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医療、*慶應医学部新聞* (615), 2003。
- (51) 竹田征治、梅澤明弘：筋ジストロフィーに対する再生医療、*医学のあゆみ*、204(3): 179-182, 2003。
- (52) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H and Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J-Immunol*, 2003; 170(1):252-260.
- (53) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J and Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development.. *Br-J-Haematol*, 2003 Apr;121(1):94-6.
- (54) Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y and Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*, 2003 Jun;17(6):1164-74.
- (55) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T. Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. *Mol Immunol* 2003 May;39(14):871-8.
- (56) Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Takeda K, Kubo M, Izaike Y, and Tokunaga T. In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning-Stem-Cells*. 2003;5(2):109-15.
2. 学会発表
- (1) 小室一成：「Cardiovascular continuumにおけるアンジオテンシン II の役割」第67回日本循環器学会総会・学術集会、福岡、平成15年3月28日～30日。
- (2) 小室一成：「循環器における再生医療の位置付け」日本心臓血管外科学会、札幌、平成15年5月14日。
- (3) 小室一成：「心臓再生の可能性」第24回日本循環制御医学会総会、大阪、平成15年5月16日～17日。
- (4) Komuro I. *The Fourth Oulu Symposium Advances in Molecular and Cellular Biology of Vasoactive Factors, Angiotensin II and cardiac hypertrophy*, June 4-9, 2003, Finland.
- (5) 小室一成：「心不全の発症及び心臓の発生・分化・再生の機序」第40回日本臨床分子医学会学術総会・学会賞記念講演、東京、平成16年7月11日。
- (6) Komuro I. *XXV Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR), Oxidative stress and development of cardiac hypertrophy*, June 28-July 30, 2003, USA.
- (7) 小室一成：「Cardiovascular continuum：心血管疾患とRA系」第51回日本心臓病学会学術集会、東京、平成15年9月8日～9日。
- (8) Komuro I. *Mini-Symposium The Biology of Cardiac Injury and Regeneration, A novel mechanisms of AT1 activation and regeneration of the heart*, Nov 13-16, 2003, USA.
- (9) 小室一成：「心、血管系の再生医学」第56回日本胸部外科学会総会、東京、平成15年11月20日。
- (10) Umezawa, A.: Cellular synchronization during the

cardiomyogenic differentiation of human marrow stromal cells. The Second International Symposium on Molecular Synchronization for Design of New Materials System., Yokohama, Japan, July 18, 2003

(11) Umezawa, A.: In vivo and in vitro cardiomyogenesis of human marrow stromal cells with a prolonged life span by BMI-1, E6, E7 and/or telomerase, Tenth N.A.T. Meeting, Stem cells and Transplantation, NANTES, France, June 19-20, 2003

(12) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. 新たに樹立した単クローン性抗体 Raft1 を用いた GTP タンパク β 鎖の細胞内局在の検討. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡, 4 月 23-25 日, 2003.

(13) 田口智子, 清河信敬, 鈴木恭子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎. 網羅的遺伝子発現解析による小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討. 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 9 月 25-27 日 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

小室 一成分

(1) 心筋梗塞および心不全の治療薬、特願 2002-260665、平成 14 年 9 月 5 日 (申請中)

(2) 標識化テネイシン C モノクローナル抗体、特願 2003-004959、平成 15 年 1 月 10 日 (申請中)

(3) 細胞移植療法後の予後改善剤、特願 2004-13354、平成 16 年 1 月 21 日 (申請中)

梅澤 明弘分

1) 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内 (第 372826 号、平成 11 年 12 月 28 日)

「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/001148、平成 13 年 2 月 28 日)

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/07741、平成 13 年 11 月 2 日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際 (PCT/JP00/09323、平成 13 年 12 月 27 日)

出願人：協和醗酵株式会社

2) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第 251365 号、平成 13 年 8 月 22 日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産業技術総合研究所

3) 「間葉系細胞から膵 β 細胞を形成する方法」

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成 14 年 4 月 17 日

出願番号 特願 2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の調整と寿命延長法の開発

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。GFP で標識した各種細胞を心筋への分化誘導後、抗心筋トロポニン抗体で評価した。またそれらの細胞をマウスへ移植後、免疫組織科学的な検討を行った結果、寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

再生医療が広く注目されている理由のひとつとして、胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立、多能性体性幹細胞の発見があげられる。体性幹細胞は成体の臓器に広く存在し、再生医療への応用を目的とした培養、移植実験の報告が多数なされている。心臓は一旦、障害が生ずると十分に再生できないために、これまでに胎児、新生児心筋細胞、骨格筋芽細胞などの移植研究が行われてきた。実際、臨床において急性心筋梗塞患者に骨髄単核球や骨格筋芽細胞を用いた心筋再生治療がすでに用いられ、心機能の改善を得るといった結果が得られている。しかし、障害心筋において機能的にはある程度の改善が得られているものの、実際に十分量の心筋が再生されているかどうかまた、どのようにして心筋が再生されるのかは依然、解明されていない。骨髄には未分化なままで増殖を続けることが可能な幹細胞が存在

し、種々の細胞に分化しうる事が報告されている。骨髄間葉系幹細胞は *in vitro* におけるマウスの心筋分化が報告されて以来、*in vivo* を中心に研究されてきた。骨髄間葉系幹細胞は自己由来の幹細胞であり、免疫抑制剤が不要であること、骨髄移植と同様の方法で採取でき確立された方法であること、腫瘍化しないことなどから有用な移植源と考えられている。骨髄間葉系幹細胞から分化した心筋細胞は典型的なサルコメア構造と、心房性ナトリウム利尿ペプチドやミオシンなどの心筋特異的遺伝子および蛋白を発現し、ペースメーカー細胞または心室筋様の活動電位とイオンチャンネルの発現を呈する。また、移植された分化心筋細胞は周囲の細胞と Gap junction を形成しすると報告されており、機能的にも十分働きうるものであると考えられる。最近では *in vivo* においてヒト骨髄間葉系幹細胞をマウス心臓に移植することで心

筋細胞への分化が認められている。本研究は、当研究室で行われてきたマウス骨髄間葉系幹細胞の心筋分化の技術を用いて、ヒト骨髄間葉系幹細胞を樹立し、*in vitro* において心筋に分化させることを目指す。さらに分化心筋細胞を用いて、心筋分化のメカニズムを解明することにより、より効率よく多量の分化心筋細胞の獲得することにより、従来の細胞移植医療の欠点を克服することを目指す。

B. 研究方法

1) ヒト間葉系細胞の寿命延長

TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋に分化するかどうかを検討した。ヒト骨髄間葉系細胞を限外希釈法でサブクロニングをして得られた細胞に、レトロウイルスを用いて TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入した。得られたヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を GFP で標識し、マウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋へ分化させ、さらに免疫組織化学を用いて抗心筋トロポニン抗体で評価した。また、免疫不全マウスの心筋にヒト寿命延長骨髄間葉系幹細胞を注射し、心筋への分化を免疫組織化学により評価した。

2) フィーダー細胞の準備

骨髄間質細胞と心筋細胞の共培養に使用する心筋細胞を得るために、培養心筋細胞を用いた。具体的に、妊娠 14 日目マウスを頸椎脱臼後、開腹し、胎児を摘出する。さらに開胸した胎児から心臓を摘出し、細断する。心

筋細胞塊をトリプシン液で単細胞に分離した後に培養皿に移して培養を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認）。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター動物実験指針に準拠して研究を実施している。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなっている。

C. 研究結果

寿命延長遺伝子を導入したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* において心筋細胞に分化するかどうかを検討した。

ヒト骨髄液から浮遊細胞と接着細胞を分離し、得られた接着細胞のうち増殖能の良好な骨髄間質細胞を限外希釈法でサブクロニングした。得られた細胞に、レトロウイルスを用いて TERT、E6、E7、または Bmi-1 を遺伝子導入した。遺伝子を導入した組み合わせに

より、4種類の細胞を得た。Bmi-1, TERT を導入した細胞を UBT-5、Bmi-1, E6, TERT を導入した細胞を UBET-7、E6, E7, TERT を導入した細胞を UEET-11、E7, TERT を導入した細胞を UBET-13 と名付け、それぞれについて心筋への分化能を検討した。

さらに、寿命を延長したヒト骨髄間質幹細胞に GFP 遺伝子を組み込んだアデノウィルスに感染させることで細胞を標識し、脱メチル化剤である 5-azacytizine 処理した後にマウス胎児心筋細胞と共培養した。GFP 陽性細胞は共培養 2 日後に筋管細胞様に延長し、3 日後には GFP 陽性の横紋構造を有する心筋細胞の形態を有する細胞が拍動する像が認められた。拍動細胞は培養を継続すると経時的に増加した。拍動細胞は遺伝子導入前の骨髄細胞でも検討し、拍動細胞を認めたことから、遺伝子導入の心筋分化への関与は否定された。これらの細胞を免疫組織化学により、心筋特異的蛋白である抗トロポニン I 抗体で染色した。GFP 陽性細胞はトロポニン I を発現しており、GFP 陽性骨髄間質細胞が心筋に分化したと考えられた。さらに RT-PCR を用いてヒト心房性ナトリウム利尿ホルモン (hANP)、心筋特異的転写因子である Csx、およびミオシン軽鎖の発現も認められた。

分化心筋細胞の活動電位は、共培養 7 日目では、膜電位が浅い胎児型的心筋細胞様であり、不規則なリズムを示したが、3 週間の培養により、膜電位は深くリズムは規則的になり、培養を継続することによって、より成熟した心筋細胞に分化することが証明された。

また、GFP 陽性のヒト骨髄間質細胞と Lac-Z 陽性マウス心筋細胞を共培養する事で、心筋細胞への分化における細胞融合の関与の可能性を検討したが、GFP およびトロポニン I 陽性の分化誘導細胞は Lac-Z を発現しておらず、ヒト骨髄間質細胞とマウス心筋細胞は細胞融合していないと考えられた。これらの検討により、寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが証明された。

D. 考察

現在、心筋梗塞や心筋症による重症心不全に対する根本治療には、脳死患者よりの生体心移植以外存在しない。しかしそのドナー不足は社会問題となっていることは周知である。近年の医学の進歩より、不足したドナーやその倫理的な問題を解決する打開策として、多能幹細胞より各種臓器を再生する試みがなされ、心臓分野での試みにおいても一定の成果を上げている。我々は、世界に先駆けて骨髄間質多能幹細胞から心筋細胞を分化誘導することに成功した。その後もその試みは続けられ現在、人骨髄細胞より人再生心筋細胞の誘導に成功している。しかしその再生心筋細胞を人体に移植する場合多くの問題点があることも事実で、当該研究室ではその問題点解決に向けて努力を続けている。

第一の問題点は、再生心筋細胞の電気的な不安定さにある。細胞を移植する際、幼弱な細胞であるほど遊走し、生体組織内での生着性も良いことは十分予想されることである。しかし幼弱な細胞においては、心臓の正常な

同期収縮に必要な不可欠な電気現象が不安定であることを我々は観察している。単一再生心筋細胞で見られるこの不安定な電気活動は、おそらく生体に移植した際、不整脈を生じる可能性がある。元々心機能の悪い患者に移植することを考慮すると、正常な心機能患者であれば耐えられる様な良性の不整脈でも容易に心不全を呈する可能性もあり、どのような弊害が生じるか現在の所予想がつかないのが現状である。しかし同時に移植した際に生着部位での近隣の細胞と電氣的に強く結合するために、正常心筋細胞の電氣的な安定性によって不安定性は消失することも予想される。そのために、薬剤不応性の重症心不全患者に注入してみると言った、考え方が主流を占めつつある。しかし、以前より多くの動物実験による心筋症モデルや心筋梗塞モデルが存在しているわけで、それらを用いて十分な不整脈源性に対する安全性を確保した上でこれら検討は行われるべきであると考え。現在、我々はこの細胞電気生理学的な発生過程を検討するために、パッチクランプ法による電流解析を行っている。

第二の問題点は、再生心筋細胞の純度の問題である。骨髄間質細胞のすべてが心筋に分化するわけでは無い。そのため心臓移植時に心筋に心筋細胞以外を注入する可能性がある。心臓は電氣的に均一な組織であるために不整脈を生じないが、このような異種細胞が伝導の不均一性を生じ、不整脈源性となる可能性がある。そのため現在、心筋細胞に分化される細胞のみを抽出濃縮する試みを行っている。第三の問題点は、移植効率の問題である。前

述したごとく心筋細胞の形質を有する成熟した細胞群を効率よく大量に心筋内に移植するのは困難で、そのため我々は独自の細胞移植方法を編み出し、それによって大量にしかも成熟して不整脈源性の無い細胞組織群を移植する方法を確立している。まだ同時に移植時に不整脈を生じないか否かを、動物実験レベルで明確にする必要がある。

これらの問題を解決することによって、自己骨髄より誘導した再生心筋細胞の移植の実現が可能となると考えられる。

E. 結論

ヒト骨髄間質細胞においては CD34⁻、CD90⁺、CD105⁺、CD117⁻の細胞群は、少なくとも心筋分化能を有する細胞であると考えられる。寿命延長したヒト骨髄間葉系幹細胞は心筋に分化し得ることが明らかとなった。

寿命を延長したヒト骨髄間質細胞に関する表を以下のサイトにおいた。

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/cells/namel.html>

ヒト骨髄間質から分化した心筋細胞に関し、以下のサイトに動画をおいた。

<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/jgm/ubet7>

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Akihiro Umezawa, A.: A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, in press.
- Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., **Umezawa, A.**: Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?. *J Gene Med*, in press.
- Sharov, A. A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D. B., Qian, Y., VanBuren, V., Falco, G., Martin, P. R., Stagg, C. A., Bassey, U. C., Wang, Y., Carter, M. G., Hamatani, T., Aiba, K., Akutsu, H., Sharova, L., Tanaka, T. S., Kimber, W. L., Yoshikawa, T., Jaradat, S. A., Pantano, S., Nagaraja, R., Boheler, K. R., Taub, D., Hodes, R. J., Longo, D. L., Schlessinger, D., Keller, J., Klotz, E., Kelsoe, G., **Umezawa, A.**, Vescovi, A. L., Rossant, J., Kunath, T., Hogan, B. L. M., Curci, A., D'Urso, M., Kelso, J., Hide, W., and Ko, M. S. H.: Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos, *PLoS Biology*, 1(3): 410-419 2003
- Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and **Umezawa, A.**: Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288: 35-50, 2003
- Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., and **Umezawa, A.**: In vivo Cardiovasculogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells. *Exp Cell Res*, 288: 51-59, 2003
- Allan, E. H., Ho, P.W., **Umezawa, A.**, Hata, J., Makishima, F., Gillespie, M. T., Martin, T. J.: Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem.*, 90(1):158-169, 2003.
- Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, **Umezawa A**, Takagi M, Katsube K, Suda H.: Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by notch signaling. *Exp Cell Res*, 290(2):370-80, 2003
- Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and **Umezawa, A.**: Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocr.* 203 105-116, 2003
- Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, **Umezawa A**, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J Periodontal Res.* 38(3):333-342, 2003.
- Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and **Umezawa, A.**: Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 22(1): 1-9, 2003.
- Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J-i., and **Umezawa, A.**: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003
- Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, **Umezawa A**, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology international*, 53: 214-220, 2003
- Shibata, R., **Umezawa, A.**, Takehara, K., Aoki, D., Nozawa, S., Hata, J.: Primary carcinosarcoma of the vagina, *Pathol Int.*, 53:106-110, 2003
- 梅澤明弘：神経幹細胞の供給源 骨髄-骨芽細胞、神経疾患の再生医療-その現状と将来、*Clinical Neuroscience*, 21(10): 1127-1130, 2003
- 梅澤明弘：再生医療の展望 1. 細胞移植による再生医療、*日本内科学会誌* 第92巻 第9号 平成15年9月10日 1758-1762.
- 森泰昌、今林英明、梅澤明弘：再生医学と幹細胞-成体幹細胞、*日医雑誌*、129(3): 307-312, 2003

槌谷宏平、松野丈夫、梅澤明弘：間葉系幹細胞、日本医学会新聞 (2523), 2003 年 2 月 17 日 (4)

梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医療、慶應医学部新聞 (615), 2003

竹田征治、梅澤明弘：筋ジストロフィーに対する再生医療、医学のあゆみ、204(3): 179-182, 2003

2. 学会発表

Umezawa, A.: Cellular synchronization during the cardiomyogenic differentiation of human marrow stromal cells. The Second International Symposium on Molecular Synchronization for Design of New Materials System., Yokohama, Japan, July 18, 2003

Umezawa, A.: In vivo and in vitro cardiomyogenesis of human marrow stromal cells with a prolonged life span by BMI-1, E6, E7 and/or telomerase, Tenth N.A.T. Meeting, Stem cells and Transplantation, NANTES, France, June 19-20, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1) 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内（第 372826 号、平成 11 年 12 月 28 日）
「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由

来細胞」国際（PCT/JP00/001148、平成 13 年 2 月 28 日）

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際（PCT/JP00/07741、平成 13 年 11 月 2 日）

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際（PCT/JP00/09323、平成 13 年 12 月 27 日）

出願人：協和醗酵株式会社

2) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第 251365 号、平成 13 年 8 月 22 日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産業技術総合研究所

3) 「間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法」

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成 14 年 4 月 17 日

出願番号 特願 2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

ヒト幹細胞の完全ヒト型培養システムの開発と臨床材料の提供
分担研究者 藤本純一郎 国立成育医療センター研究所副所長

研究要旨

本研究では骨髄細胞の心筋への形質転換の臨床応用に向けて、より安全性の高い細胞供給を行うため、（１）完全ヒト型幹細胞培養法の確立（２）ヒト間葉系細胞の規格化（３）幹細胞における分子発現に関する検討、を行なった。低血清培地の開発、全長 cDNA レベルでのプロファイル作製、モノクローナル抗体を用いた既知遺伝子の解析、ヒト EC 細胞株、マウス EC 細胞株を用いた細胞形態並びに接着等に密接に関与する細胞骨格の発現を検討した。

A. 研究目的

細胞治療に用いられる幹細胞の定義は研究者によりまちまちであり、また、その培養法についても議論を呼んでいる。従来の培地では異種動物由来の血清等が用いられ、未知遺伝子の交叉感染等が危惧されている。そこで、本研究では臨床応用をにらんだ新たな培養環境の開発と、幹細胞の定義付けおよびその分化機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 完全ヒト型幹細胞培養法の確立

遺伝子導入により寿命を延長したヒト間葉系幹細胞を用い、培地組成、増殖因子、細胞増殖動態などについて有効な成分・濃度を検討

し、至適化を行った。また、それらの培地を Non-Stress 培地として数施設に提供し、その妥当性についての検討結果を受け新規開発へフィードバックした。

2) ヒト間葉系細胞の規格化

企業との共同研究における全長 cDNA レベルでのプロファイル作製、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix 社 GeneChip) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行った。

3) 幹細胞における分子発現に関する検討

ヒト EC 細胞株 NCR-G3, マウス EC 細胞株 F9 を用いて、抗 SSEA-4 抗体である Raft. 2 抗体の NCR-G3, F9 における発現、各種の接着分子の発

現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認)。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウィルス等の汚染の危険性排除については、本研究の課題でもあり、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討する。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(未定稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行

う予定である。

実験動物を用いる研究については、各施設の動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

1) 完全ヒト型幹細胞培養法の確立

培地組成については、増殖因子以外は細胞種を変えても同程度の増殖を示した。これらは寿命延長をしていない初代細胞についても同様の結果を示した。増殖因子については細胞系列による差異が大きいが、初代細胞での結果を重視し、最適な増殖因子を選択した。細胞増殖動態については、継代培養における培養日数と細胞倍加集団数との関係について従来培地(10% FCS-DMEM)及び MSCGM(10%血清)との比較を行った結果、寿命延長した細胞では MSCGM と同程度、初代細胞では従来培地の 2 倍の増殖性を示した。また、6 代程度継代した後、細胞表面マーカー発現を従来培地と比較してみたが、変化は認められなかった。

特徴 1. 低血清培地

従来の増殖培地には通常 10% の血清成分を含んでいたが、血清中には特定不能な種々の因子が存在し、実験の解析に障害となっていた。本培地は培地成分に改良を重ねた結果、血清成分を 1% に抑えることが出来た。

特徴 2. 優れた増殖性

本培地は複数の細胞増殖因子を組み合わせることで、低血清培地でありながら、従来培地（10% 血清含有 DMEM）より増殖性が優れる。

特徴 3. 血清以外はヒト型タンパク質を使用している。

本培地に含まれるタンパク質成分は添付の牛胎児血清以外はヒト型（或はヒト由来）のものを使用し、ヒト由来細胞の培養に適している。

2) 本培地と従来培地との比較

実施例 1. 本培地と従来培地との比較

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を同じ細胞密度でシャーレに播種した後、本培地と 10% 牛胎児血清含有 DMEM（従来培地）とでそれぞれ 5 日間培養し、細胞形態を観察した結果、より多くの細胞増殖が認められた。

実施例 2. 従来培地との増殖性の比較

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 10% 牛胎児血清含有 DMEM（従来培地）と本培地で継代培養を行った結果、従来培地に比較して約 2 倍の細胞増殖が見られた。

実施例 3. 表面抗原の発現

実施例 1 で 30 日以上継代した細胞について細胞表面マーカーの発現を検討した結果、本培地で培養した細胞と従来培地で培養した細胞とでは表面マーカーの発現に変化はなかった。

3) 幹細胞における分子発現に関する検討

ヒト EC 細胞株 NCR-G3 について、レチノール酸による分化誘導系での各種細胞の骨格発現様式の変化を共焦点レーザー顕微鏡により検討した結果、アクチン (Actin) 結合タンパクであるファスチン (Fascin) が分化に伴って他の細胞接着分子とは全く異なる局在を示すこと、分化がさらに進むに従って、消失することが明らかとなった。Raft. 2 抗体の NCR-G3 および F9 における発現を検討したところ、本来細胞膜上に糖脂質あるいは糖蛋白として存在すべき SSEA-4 エピトープが細胞質内で特定の場所に糖

蛋白として存在することを確認した。

D. 考察

完全ヒト型培養システムの開発について、培地の組成が細胞増殖に与える影響だけでなく、細胞周期による細胞発現タンパクに与える影響について検討の余地があった。

幹細胞における分子機構の検討では、ファスチンが他の細胞接着関連分子とは異なる役割を担っている可能性が示唆された。また、SSEA-4 構造が細胞膜上での機能以外を保有していることが示唆された。

E. 結論

完全ヒト型培養システムの開発は幹細胞の分子機構を明らかにすることで、より完成度の高いものになり得ることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H and Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J-Immunol*, 2003; 170(1):252-260.
- 2) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J and Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research

Institute for Child Health and Development.. *Br-J-Haematol*, 2003 Apr;121(1):94-6.

- 3) Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y and Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*, 2003 Jun;17(6):1164-74.

- 4) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T. Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. *Mol Immunol* 2003 May;39(14):871-8.

- 5) Ohkoshi K, Takahashi S, Koyama S, Akagi S, Adachi N, Furusawa T, Fujimoto J, Takeda K, Kubo M, Izaike Y, and Tokunaga T. In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning-Stem-Cells*. 2003;5(2):109-15.

2. 学会発表

- 1) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. 新たに樹立した単クローン性抗体 Raft1 を用いた GTP タンパク β 鎖の細胞内局在の検討. 第92回日本病理学会総会, 福岡, 4月23-25日, 2003.

- 2) 田口智子, 清河信敬, 鈴木恭子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎. 網羅的遺伝子発現解析による小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 9月25-27日 2003.

H. 知的財産権の出願・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

研究協力者

梅澤明弘

国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部長