

2004-00070A

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

霊長類ES細胞の品質管理と同種移植の  
安全確保に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺尾 恵 治  
国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター

平成17年(2005)3月

## 霊長類ES細胞の品質管理と同種移植の安全性確保に関する研究

主任研究者 寺尾恵治（感染研・筑波医学実験用霊長類センター）センター長

研究概要：本研究ではES細胞を用いた再生医療、細胞治療の臨床応用を最終目的として、ヒトに近縁な霊長類のES細胞を対象として、ES細胞の品質管理および同種移植に伴うリスク評価に関わる標準プロトコルを作成することを当面の目的としている。今年度はES細胞の品質管理に適用するマーカーとして霊長類ES細胞に特異的に発現しているタンパクを網羅的に解析するとともに、Stemness marker とされている遺伝子の発現を調査した。その結果、ES細胞に特異的に発現している新規タンパクを20種抽出した。In vitro 分化誘導にともない発現が低下する遺伝子を3種類特定した。In vitro 分化誘導系の開発では、神経系細胞への分化誘導技術はほぼ確立し、Neuron や Astrocyte への選択的な分化誘導も可能にしつつある。血液系細胞への分化はCD34 および CD31 陰性でコロニー形成能を有する初期中胚葉系細胞への誘導技術は開発できたが、分化細胞率は低く、造血前駆細胞への分化は不安定であった。In vitro で初期中胚葉系細胞に分化誘導した細胞を妊娠初期のカニクイザル胎児に同種移植した結果、全例でテラトーマの形成が確認され、分化誘導細胞中にテラトーマ形成能を有する未分化ES細胞が混在していることが判明した。

### 分担研究者名：

二藤 新治（田辺製薬㈱先端医学研究所・所長）	山元 恵（独）国立環境研究所・主任研究官）
久和 茂（東京大学農学部・助教授）	中村紳一郎（日本獣医畜産大学病理・講師）
花園 豊（自治医科大学再生医療・助教授）	下澤 律浩（筑波霊長類センター・研究員）

### A. 研究目的

本研究は、ヒトを対象とした安全で有効な再生医療技術を確立するために、ヒトに近縁な霊長類のES細胞を対象として、幹細胞の品質管理技術、分化制御技術、リスク評価技術等を先行して開発することを目的とする。そのために申請研究終了時に以下を達成することを短期目標にする。

1. サルES細胞から神経系および血液系細胞への分化誘導技術の開発
2. 未分化ES細胞と分化細胞とを区別する最適な細胞表面マーカーの検索とES細胞の品質管理を目的とした標準プロファイルの作成
3. 分化誘導された細胞の高純度精製技術の開発
4. 精製した細胞の同種移植とテラトーマ形成を指標とした安全性評価システムの開発

上記の内今年度は1、2、4に関わる研究を重点的に実施した。

### B. 研究方法

- 1) 霊長類ES細胞の品質管理に関する研究：  
GFP遺伝子を導入したカニクイザルES細胞株（CMK-6/G）はマウス繊維芽細胞（MEF）をフィーダーとして2〜3日間隔で継代維持した。実態顕微鏡下で継代ES細胞を $10^7$ 個回収した。MEFを除去した培養系で培養することによりランダム分化させた胚様体（EB）を $10^6$ 個回収し、1,050種の抗ヒトモノクローナル抗体をアレイとしたウエスタンブロットに供試した。また未分化ES細胞およびEBからmRNAを抽出し、Stemness marker 遺伝子の発現を比較した。
- 2) in vitro 分化誘導系の開発：  
神経細胞への分化誘導：すでにマウスで確立している分化誘導法を一部修正して、カニクイザルES細胞から効率的に神経幹細胞（ニューロフィラメント陽性、チロシン水酸化酵素陽性）に分化させる培養法を検討した。  
血液系細胞への分化誘導は、OP-6細胞をフ

オーダーとして様々なサイトカイン存在下で6日間培養する方法を検討した。また分化誘導細胞中の未分化ES細胞の混在を確認する方法として未分化マーカーであるSSEA-4を指標にした解析法を検討した。

3) ES細胞および分化誘導細胞の同種移植による安全性確保に関する研究：

未分化ES細胞および分化誘導細胞の体内微小環境を利用した分化能、分化効率、組織分布、テラトーマ形成能などを評価する目的で、妊娠初期（胎齢90日以内）のカニクイザル胎児にエコーガイド下で $10^7$ ~ $10^5$ /頭の細胞を肝臓内に移植した。移植後2~3ヶ月目に胎児を帝王切開により摘出し、病理学的解析を行った。

実験にあたっては、それぞれの分担研究者が所属する研究施設の動物委員会で実験計画の審査をおこない、承認を得た後に実験をおこなった。また、移植実験は実験期間中の動物の福祉および飼育環境エンリッチメントに配慮した設備を有し、十分な獣医学的管理と熟練した技術者による飼育管理が可能な施設で実験処置および飼育管理をおこなった。

### C. D研究結果および考察

#### 1) サルES細胞から神経系と血液系細胞への分化誘導技術の開発：

神経系細胞への分化誘導技術はほぼ確立し、NeuronやAstrocyteへの選択的な分化誘導も可能にしつつある。血液系細胞への分化はCD34およびCD31陰性でコロニー形成能のない初期中胚葉細胞への誘導技術は開発できたが、分化細胞の比率は低く、造血前駆細胞への分化は不安定であった。さらに本法で分化誘導した細胞には未分化マーカーであるSSEA-4陽性細胞が比較的高率（30~40%）に含まれていることが判明した。（仁藤、花園）

#### 2) 当初計画2：未分化ES細胞と分化細胞とを区別する最適な細胞表面マーカーの検索とES細胞の品質管理を目的とした標準プロファイルの作成：

標準サルES細胞株としてCMK-6をとりあげ、未分化CMK-6と当該細胞から分化させた胚様体をそれぞれ $10^7$ 個回収し、発現遺伝子と発現タンパクを網羅的に解析した。1,050種の抗体

アレイを用いたタンパク解析では、これまで報告の無かった20種類のタンパクがES細胞に高発現していることが判明した。現在ESおよびEB細胞で特異的に発現しているタンパクプロファイルを作成中である。（久和、山元、下澤）

#### 3) 分化誘導した細胞の同種移植とテラトーマ形成を指標とした安全性評価システムの開発：

CMK-6から分化誘導した初期中胚葉細胞を免疫能獲得前のサル胎児に移植した結果、全例にテラトーマの形成を認めた。腫瘍組織を病理解析した結果、組織内にはケラチン、ビメンチン、S-100など、上皮、非上皮、神経など、それぞれ分化の方向性が異なる三胚葉すべての細胞が共存し、それらはタグ蛋白であるGFPを持っていることから移植したES細胞由来であることが明らかになった。一方、分化誘導した初期中胚葉細胞からネガティブセレクションでStemness markerであるSSEA-4抗原陰性細胞を精製し、胎児に移植した場合にはテラトーマの発生は認められなかった。このことからSSEA-4は臨床的なStemness markerであることが判明した。（花園、中村、寺尾）

### E. 結論

人と近縁なサルのES細胞を用いて、再生医療技術開発に資する基礎的検討をおこなって以下の成果を得た。

1) 樹立、継代されるES細胞の品質（未分化能保証）を評価するマーカーを抽出する目的で、未分化ES細胞と胚葉体のそれぞれで発現しているタンパクを網羅的に解析し、これまで報告の無かったES細胞で高発現している20種のタンパクを同定した。

2) 神経系細胞と血液系細胞を対象として、in vitro分化誘導技術の開発を試みた。マウスES細胞で確立した培養法を一部修正することにより、サルES細胞から神経幹細胞への効率的な培養法を確立した。

3) 体内微小環境を利用したES細胞の最終分化能、分化効率、組織分布を評価するため、妊娠初期の胎児肝臓内への同種移植を試みた。その結果、未分化ES細胞、血液系に分化誘導した細胞のいずれにおいても、数%のES細胞由来細胞は確認されたが、全例でテラトーマ形成が

認められた。このことは *in vitro* 分化誘導技術の不完全性を示しており、混在する未分化 ES 細胞の除去が同種移植の安全性確保に必須であることが判明した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. : Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel in primary cultured mouse midbrain neural network. *Cell Mol Neurobiol.* 2004, 24:877-882.
- 2) Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. : Glutamate regulates the frequency of spontaneous synchronized Ca<sup>2+</sup> spikes through group II metabotropic glutamate receptor in cultured mouse cortical networks. *Cell Mol Neurobiol.* 2004, 24:841-852.
- 3) Sekiguchi S, Takatori A, Negishi T, Kwon J, Kokubo T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. : Localization of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 in cynomolgus monkey placentas. *Placenta.* 2005, 26:99-103.
- 4) Kimura N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. : Astroglial responses against A $\beta$  initially occur in cerebral primary cortical cultures: species differences between rat and cynomolgus monkey. *Neurosci Res.* 2004, 49:339-346.
- 5) Sekiguchi S, Yoshikawa Y, Tanaka S, Kwon J, Ishii Y, Kyuwa S, Wada K, Nakamura S, Takahashi K. : Immuno-histochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse. *Exp Anim.* 2003, 52:365-369.
- 6) Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. : Primary culture of cortical

neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fetuses. *J Neurosci Methods.* 2003, 131:133-140.

- 7) Asano T, Shibata H, Hanazono Y. : Use of SIV vectors for simian ES cells. In *Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols* (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.
- 8) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. : In vivo tumor formation from primate ES cells. In *Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols* (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.
- 9) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K, Hanazono Y. : Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. *Transplantation,* 2005, 79:32-33.
- 10) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y. : Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther,* 2005, 12:203-210.
- 11) Nagata M, Takahashi M, Muramatsu S, Ueda Y, Hanazono Y, Takeuchi K, Okada K, Suzuki Y, Kondo Y, Suemori M, Ikeda U, Nakano I, Kobayashi E, Hasegawa M, Ozawa K, Nakatsuji N, Shimada K. : Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med,* 2003, 5:921-928.
- 12) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y. : Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation,* 2003, 76:1061-1067.
- 13) Hanazono Y, Asano T, Ueda Y, Ozawa K. :

Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13:106-110.

14) Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii 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.

## 2. 学会発表

1) 北野真見、柿沼美智留、石井寿幸、久和 茂、吉川泰弘： マウス ES 細胞の瞬前駆細胞分化誘導過程におけるリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 第 4 回日本再生医療学会、2005 年 3 月、大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) VSV-G シュードタイプ化サル免疫不全ウイルスベクターを用いた霊長類 ES 細胞への遺伝子導入 (平成 13 年 6 月 8 日、特願 2001-174696)
- 2) 神経系細胞の分化方法 (平成 14 年 6 月 24 日、特願 2002-182386)
- 3) 発生初期血管内皮細胞の製造方法 (平成 16 年 6 月 22 日、特願 2004-184138)
- 4) 環境汚染物質の骨に及ぼす影響に関する代替試験方法 (特願 2002-148639)
- 5) 破骨細胞の分化・増殖阻害剤 (特願 2004-114736)

## Ⅱ. 分担研究報告書

## 霊長類 ES 細胞の品質管理と同種移植の安全性確保に関する研究

分担研究者 仁藤 新治（田辺製薬㈱ 先端医学研究） 所長  
研究協力者 近藤 靖（田辺製薬㈱ 先端医学研究）

研究要旨：Astrocyte Conditioned Medium (ACM) 中の液性因子により、ES 細胞から神経系細胞へと、短期間かつ高効率に分化誘導することに成功した。

### A. 研究目的

ほぼ無制限に増殖し種々の神経細胞に分化可能な embryonic stem cell (ES 細胞) は、神経疾患に対する細胞移植治療の新たなドナー細胞として注目されている。本研究では、ヒトの ES 細胞に類似の性質を持つカニクイザルの ES 細胞を使用して、効率的な神経系細胞への分化誘導法を確立することを目的とする。

### B. 研究方法

マウス ES 細胞及びカニクイザル ES 細胞のコロニーをそのまま ACM 中で浮遊培養することにより、Sphere 形成を行なった。浮遊 Sphere は、ポリリジンでコートした培養ディッシュの表面をラミニンあるいはマトリゲルでさらに処理したディッシュの ACM 中で接着培養するとにより神経突起を進展させた。

(倫理面への配慮)

本実験は動物由来の培養細胞に関するものであり、実験を実施するに当り、倫理面の問題は無いものと判断した。

### C. 研究結果

ACM 中で浮遊培養した sphere は、惑星構造に類似した層構造を有する。すなわち、ネスチン陽性の神経幹細胞層と、マントル層にあたるネスチン及び BrdU のいずれに対しても陰性の前神経幹細胞層、核にあたる BrdU 陽性の ES 細胞層とから構成される三層構造を有し、ACM から放出される因子によって短期間で効率よく神経幹細胞のみが、sphere 表層に分化誘導されるのが明らかとなった。

浮遊 Sphere は ACM 中で接着培養すると、2-3 日中にニューロフィラメント抗体に陽的な神経細胞へ分化し、これらの細胞は高い割合でチロシン水酸化酵素抗体に陽性（ドパミ

ン神経細胞）であった。また、神経細胞への分化は、RT-PCR による遺伝子発現によっても確認した。

### D. 考察

現在、ES 細胞から神経系細胞を作製するためには、①ES 細胞の凝集体をレチノイン酸で処理し、種々の神経系細胞を誘導する方法、②胚様体 (Embryoid Body; EB) を作製し、そこから神経幹細胞を得る方法、③株化したストローマ細胞上で神経系細胞を誘導する方法、④LIF の存在下、ES 細胞を浮遊培養し、そこに含まれる約 0.2% 神経幹細胞から作製する方法が知られている。しかしこれら方法は、神経幹細胞に要する時間及び、分化の割合、収量の効率等の観点から、細胞治療に用いるための細胞を十分量確保することは困難である。これらの方法に比較し、ACM による分化誘導法では短時間に大量の神経細胞の調整が可能であり、今後、ACM で分化誘導した神経系細胞を用いて、モデル動物における細胞移植の安全性と効果を明らかにする予定である。

### E. 結論

ACM を用いることにより、ES 細胞から神経系細胞へ高効率に分化誘導することができるとことが明らかとなった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
発生初期血管内皮細胞の製造方法  
(平成16年6月22日、特願2004-184138)



## カニクイザル ES 細胞の品質管理（遺伝子発現）に関する研究

分担研究者 久和 茂（東京大学大学院農学生命科学）助教授

研究要旨：マウス胚性幹（ES）細胞は白血病阻止因子（LIF）により未分化状態が維持されることが示されているが、ヒトを含む霊長類 ES 細胞についてはその未分化維持の分子基盤が明らかにされておらず、通常マウスフィーダー細胞上で培養しなければならない。霊長類 ES 細胞の未分化状態の指標として、現在までアルカリフォスファターゼ活性および細胞表面抗原である SSEA-4 や TRA-1-60 などのマーカー分子の発現が知られている。この他に Oct3/4 や Nanog 等の特異的遺伝子の発現も近年の遺伝子解析により明らかになった。本実験では CMK6 におけるこれら既知の未分化マーカー分子の発現を確認するとともに、未分化ヒト ES 細胞において高い発現が確認された 8 つ遺伝子について、未分化状態（第 1 群）、胚様体（第 2 群）、分化状態（第 3 群）の 3 群でのそれぞれ発現量を定量的に測定し、その発現パターンをヒト ES 細胞での発現パターンと比較した。その結果、ヒト ES 細胞同様の発現パターンが見られた遺伝子（Oct3/4、GABRB3、PRDM14）以外の 5 つの遺伝子については CMK6 とヒト ES 細胞株で発現パターンに顕著な相違が見られた。この相違がヒトとカニクイザルという種差に起因するのかどうかはより厳密な解析が必要であるが、今回の結果から共通の未分化マーカーのセットで全ての ES 細胞の未分化状態を評価することの困難さが示唆された。

### A. 研究目的

胚性幹（ES）細胞は多分化能と無限増殖能の 2 つの特異的な性質を有しており、1998 年のヒト ES 細胞樹立を受けてそれらの再生医学への応用を目指した検討が世界的に進められている。しかし、そうした臨床応用を実現するためには、ES 細胞の未分化機構の解明・制御、および特異的かつ効率的な分化誘導系の確立が不可欠である。また、同時に分化誘導により産生された移植細胞の安全面における評価モデルの確立も必須である。これまでの研究によりマウスおよびヒト ES 細胞間ではいくつかの相違点が存在することが明らかになった。将来的な臨床応用のためには、よりヒトに近縁である霊長類由来 ES 細胞を用いた評価モデルの確立が必要となってくる。しかし、ヒト以外の霊長類由来 ES 細胞に関する研究は、マウス ES 細胞やヒト ES 細胞に比べ十分に行われていないのが現状である。本研究ではカニクイザル由来 ES 細胞株 CMK6 を用いて、その未分化性状および分化能を形態学および分子生物学的手法で解析を行った。

### B. 研究方法

カニクイザル由来 ES 細胞株 CMK6 は田辺製薬より分与されたものを用いた。培養液は、DMEM/F-12（1:1）に 20% Knock-out serum replacement (KSR)、2 mM L-glutamine、1 mM non-essential amino acid (NEAA)、1 mM sodium pyruvate、penicillin-streptomycin を添加したものを用いた。細胞継代は 3~4 日毎に行った。MMC 処理したマウス胎児線維芽細胞（MEF）をフィーダー細胞として準備し、そこに 0.15% collagenase type IV により分散させ 1/2 に希釈した ES 細胞浮遊液を加え培養した。

胚様体は ES 細胞を collagenase 処理により分散させたものを、10-14 日間浮遊培養したものを用いた。分化細胞は胚様体をさらにゼラチン処理シャーレに接着させ、6 日間 ITSFn 培地で培養したものを用いた。

リアルタイム RT-PCR は Applied Biosystems 社の TaqMan® Gene Expression Assays を用いて行った。測定にはヒト遺伝子発現解析用キットを用い、Brandenberger らにより未分化ヒト ES 細胞で特異的に発現する遺伝子 (Brandenberger et al. 2004 [Nat

Biotechnol 22:707-716]) として報告された ZNF206、PRDM14、PTPRZ1、GABRB3、GRPR、FOXH1、ZIC3、Oct3/4 について解析を行った。

動物実験の実施に当たっては、東京大学動物実験実施規則に則って行った。

### C. 研究結果

カニクイザル ES 細胞株 CMK6 をマウス胎児線維芽細胞上で培養した。この細胞は、アルカリフォスファターゼ陽性であり、かつ既知の未分化マーカーである SSEA-4 や TRA-1-60 陽性であった (図 1)。この細胞を NOD/Shi-scid マウス (抗アジアロ GM1 処理) の皮下に約  $10^6$  個接種したところ、2-3 ヶ月後にテラトーマ (図 2-A) が形成された。組織学的検索により、テラトーマは外胚葉 (図 2-B, C)、内胚葉 (図 2-D)、中胚葉由来と推定される構造物 (図 2-E) からなることが示された。これらの結果は、実験に供した CMK6 細胞は多分化能を持った ES 細胞であることを示唆している。

次に、CMK6 細胞を用いて、胚様体 (図 3-B) および分化細胞 (図 3-C) を作製した。これらのサンプルならびに未分化 CMK6 細胞 (図 3-A) から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行い、遺伝子の発現量を比較した。

Oct3/4 (図 4-A)、GABRB3 (図 4-B)、PRDM14 (図 4-C) の発現は未分化 ES 細胞で一番高く、胚様体ならびに分化細胞で低かった。一方、PTPRZ1 (図 4-D)、ZIC3 (図 4-E) の発現量は未分化 ES 細胞と胚様体においてほぼ同等であった。さらに、ZNF206 (図 4-F)、FOXH1 (図 4-G) については、未分化 ES 細胞よりも胚様体での発現の方が高く、GRPR (図 4-H) は未分化 ES 細胞と分化細胞の発現量がほぼ同等であった。

### D. 考察

本実験ではカニクイザル ES 細胞株 CMK6 における、既知の未分化マーカー分子 (アルカリフォスファターゼ、SSEA-4、TRA-1-60) の発現を確認した。また、3 胚葉からなるテラトーマを形成することが確認された。したが

って、本実験に用いられた細胞は多分化能を保持した未分化 ES 細胞であることが示唆された。

未分化ヒト ES 細胞において高い発現が確認された遺伝子のうち 8 つについて、未分化状態 (第 1 群)、胚様体 (第 2 群)、分化状態 (第 3 群) の 3 群でのそれぞれ発現量を定量的に測定した。その結果、ヒト ES 細胞同様の発現パターンが見られた遺伝子 (Oct3/4、GABRB3、PRDM14) 以外の 5 つの遺伝子については CMK6 とヒト ES 細胞株で発現パターンに顕著な相違が見られた。この相違がヒトとカニクイザルという種差に起因するののかどうかはより厳密な解析が必要であるが、今回の結果から共通の未分化マーカーのセットで全ての ES 細胞の未分化状態を評価することの困難さが示唆された。

### E. 結論

カニクイザル ES 細胞とヒト ES 細胞において、Oct3/4、GABRB3、PRDM14 は未分化状態で特異的に発現している遺伝子であろうと考えられた。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

### 2. 学会発表

北野真見、柿沼美智留、石井寿幸、久和 茂、吉川泰弘： マウス ES 細胞の隣前駆細胞分化誘導過程におけるリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 第 4 回 日本再生医療学会、2005 年 3 月、大阪

H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし



図1 未分化カニクイザル ES 細胞株 CMK6 のアカリフォスファターゼ染色像 (A)、および抗 SSEA-4 (B)、抗 TRA-1-60 抗体 (C) による免疫組織像。

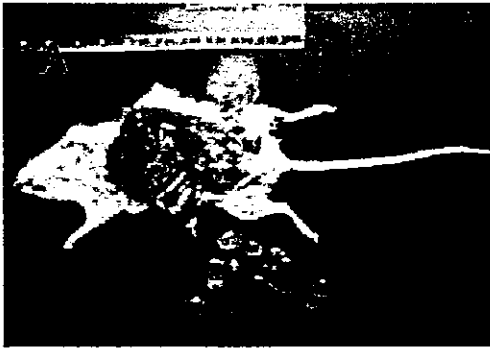


図2 CMK6 によるテラトーマ。肉眼所見 (A)、ならびに病理組織像 (B-E)。

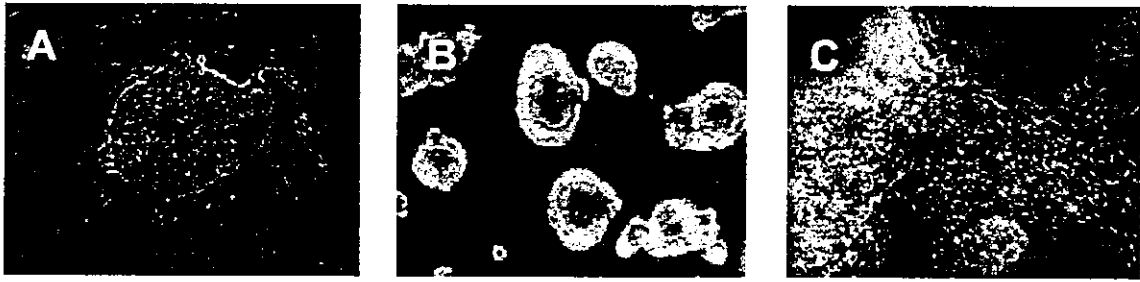


図3 未分化ES細胞 (A)、胚様体 (B)、分化細胞 (C) の倒立顕微鏡像。

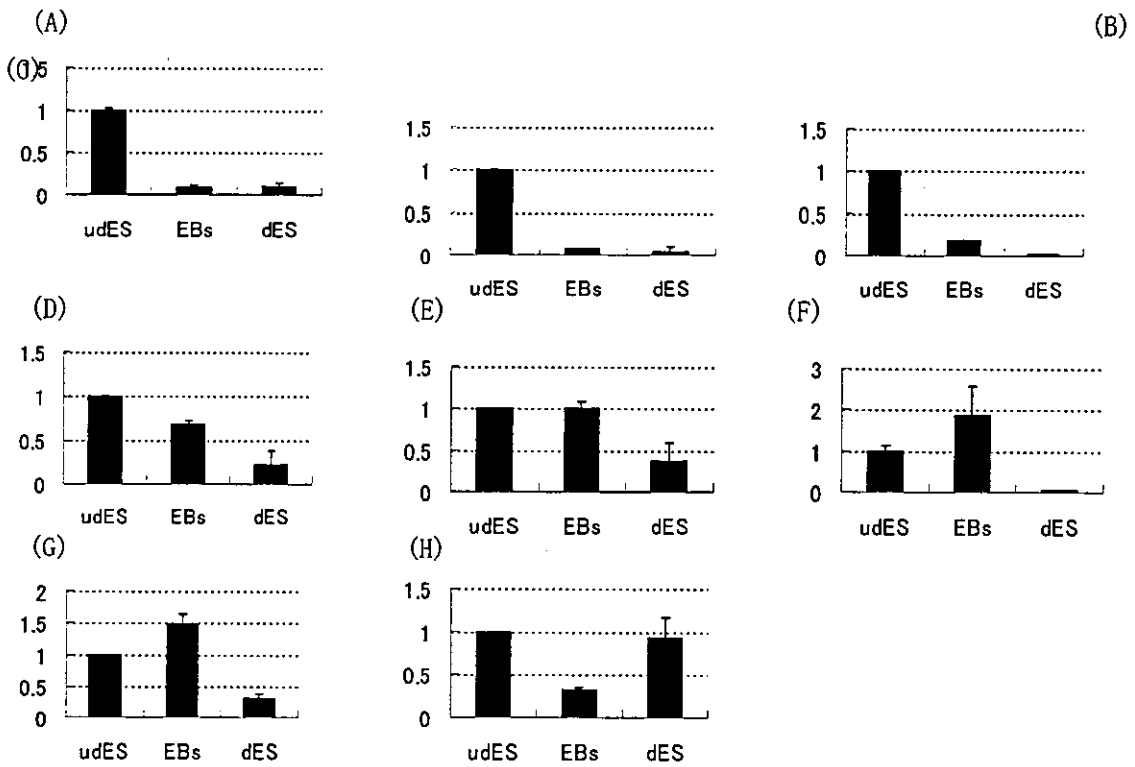


図4 リアルタイム RT-PCR 法による Oct3/4 (A)、GABRB3 (B)、PRDM14 (C)、PTPRZ1 (D)、ZIC3 (E)、ZNF206 (F)、FOXH1 (G)、GRPR (H) 遺伝子の発現解析。udES : 未分化 ES 細胞、EBs : 胚様体、dES : 分化細胞。

## ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究

分担研究者 花園 豊（自治医科大学 再生医学研究部）助教授

### 研究要旨

目的：ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性の評価および向上。

方法：ヒトES細胞に近いサルES細胞を用いた同種移植実験を行う。移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能獲得前のサル胎仔に細胞を移植する。

期待される成果：ES細胞を利用する移植・再生治療における腫瘍形成のリスクを明らかにする。また、腫瘍形成リスクを軽減して安全性を高める技術（ネガティブ・セレクション法およびポジティブ・セレクション法）を開発し、この技術の有用性を明らかにする。

当該年度の成果：ES細胞を利用する移植・再生治療では、腫瘍形成のリスクは予想以上に高いことがわかった。しかし、SSEA4陽性細胞を除去してから移植することによって、腫瘍形成を完全に予防することが出来た。

### A. 研究目的

ES細胞を利用する移植・再生治療の腫瘍形成リスクをサル同種移植の系で評価する。さらに、リスクを軽減する技術（ポジティブ・セレクション法およびネガティブ・セレクション法）を開発し、本治療法の安全性の向上をめざす。

ヒトES細胞を利用する治療の安全性や有効性は、もっぱら齧歯類で評価されているのが現状である。言うまでもなくヒトES細胞を用いる同種移植実験は行えないからである。齧歯類で得られた結果が必ずしもヒトに外挿できるわけではないので、ヒトES細胞を利用する治療の安全性や有効性の評価のためには、ヒトES細胞に近いサルES細胞を用いた同種移植の系が望まれる。

### B. 研究方法

(1) 移植細胞：カニクイザルES細胞を至適条件下でヘマンジオブラスト（造血細胞と血管内皮の元になる細胞）に分化させた。このヘマンジオブラストを移植細胞とした。ヘマンジオブラストは、将来、造血再生や血管再生に広く応用されることが予想され、本研究で用いる移植細胞として適当である。本研究では、ES細胞由来ヘマンジオブラスト移

植による造血再生を評価系として用いた。

(2) 遺伝子標識：移植後の細胞の運命を追跡できるように、細胞をあらかじめGFP遺伝子で標識した。GFP遺伝子導入はサル免疫不全ウイルスベクターを用いて行った。あるいはGFP遺伝子を恒常的に発現するサルES細胞の亜株を用いた。

(3) 移植法：移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能獲得前（妊娠1/3期前後）のカニクイザル胎仔に同種移植した（子宮内移植法）。胎仔の肝臓内にエコーガイド下で細胞を移植した。

(4) セレクション法：安全性を高めるために、移植前に実施する細胞のセレクション法を検討した。セレクション法には、不要な細胞を取り除くネガティブ・セレクション法と、必要な細胞だけを取り出すポジティブ・セレクション法があるが、本年度は前者の開発を行った。具体的には、未分化ES細胞（SSEA4陽性細胞）を除去してから移植を行った。

(5) 評価：移植後、満期帝王切開を行い、生まれたサル新生仔における腫瘍形成の有無、移植細胞の生着・分化をGFPを指標にして調べた。

(6) 倫理面への配慮

組換えDNA実験：サル個体を用いる組換

え DNA 実験については、以下の通り承認が得られている。

「幹細胞を利用する再生医療の基盤技術の開発」自治医科大学 平成 16 年 4 月 1 日承認

「幹細胞治療法のサルを用いた有用性と安全性の評価」国立感染症研究所 平成 16 年 9 月 7 日承認

動物実験倫理：サルを用いる動物実験については、以下の通り承認を受けている。

「サルを用いた幹細胞治療法の開発」自治医科大学 平成 16 年 2 月 24 日承認

「サルの幹細胞を用いた治療法の有効性と安全性の評価」国立感染症研究所 平成 16 年 6 月 1 日承認

### C. 研究結果

まず、サル ES 細胞を未分化のまま、サル胎仔の肝臓内に移植した ( $n = 3$ )。満期に相当する移植 3 ヶ月後に胎仔を取り出して調べてみると、案の定、胸腹腔内にテラトーマ形成を認めた。これらの腫瘍は GFP の蛍光を発しており、移植した ES 細胞由来であることは明らかであった。

カニクイザル ES 細胞を前述条件で培養すると、6 日目の細胞の CD31, CD34, VE-cadherin の発現が高まり、VEGFR-2high の分画が現れ始めたが、CD45 の発現はまだ無かった。従来からの報告から (Wang L et al. *Immunity* 2004;21:31-41), この時期の細胞中にヘマンジオブラストが含まれると考えられた。

この分化培養 6 日目の細胞をサル胎仔に移植したところ、生まれたサル新生仔体内で、サル ES 細胞由来の造血細胞を確認した ( $n = 3$ )。造血前駆細胞の 2-5% が ES 細胞由来であった。ところが、移植した全例で胸腹腔内に腫瘍の形成を認めた。腫瘍は GFP の蛍光を発しており、移植細胞由来であることは明らかだった。組織学的に三胚葉性の細胞からなっており、テラトーマと診断された。

移植する前の細胞 (培養 6 日目の細胞) を FACS 解析すると、分化誘導後にもかかわらず未分化な細胞 (SSEA-4 陽性細胞) がまだかなり残存していること (約 40%) が判明した。移植細胞中に残存した未分化細胞がテラトーマを形成したと考えられた。

そこで、分化培養した 6 日目の細胞から SSEA-4 陽性細胞を除去したものを、サル胎仔に移植する実験を行った ( $n = 6$ )。その結果、全例で、テラトーマの形成は認められず、移

植細胞からの造血細胞への分化を確認した。この際、移植由来の造血キメラ率は低下していなかった。

### D. 考察

我々は、マウス、ヒツジ、サルをレシピエントとして ES 細胞からの造血再構築実験を実施し、ES 細胞が将来はたして骨髄バンクや臍帯血バンクに代るドナーソースになりうるかどうか検討している。実験に用いる ES 細胞はサル (カニクイザル) のものである。言うまでもなく、それはヒトに近いからである。マウスへの移植実験は、ES 細胞を利用する造血再生の基盤研究と位置づけている。ヒツジへの移植実験は、動物に移植用血液細胞を作らせる「動物工場」をめざす研究として行っている。一方、サルへの移植実験は、本研究事業の補助を得て行われているもので、同種移植という、より臨床応用に近い系で有効性と安全性の評価をめざしている。

国内外で、当然ながらヒト ES 細胞をヒトに同種移植する実験は実施されていない。ヒト ES 細胞を利用する治療の有用性や安全性は、もっぱら齧歯類で評価されているのが現状である。本研究は、まさに霊長類 ES 細胞の同種移植実験であることが、他にはない最大の特色である。しかし一方、同種移植に伴う、移植細胞に対する免疫拒絶が大きな障壁になる。移植免疫を避けるために、免疫能獲得前 (妊娠 1/3 期頃) のサル胎仔に細胞を移植する方法 (子宮内移植法) を採った。また、胎仔は日々成長するため、移植細胞生着のためのスペースが創出され、前処置無しで移植細胞が生着するという利点がある。こうしたサル ES 細胞の同種移植実験は、国内外でほとんど行われておらず、本研究のオリジナリティーは高い。

分化培地の中で数日間にわたって分化させた細胞を移植したにもかかわらず、移植した 3 例全例でテラトーマが形成された。ES 細胞を利用する移植治療では、腫瘍形成のリスクは予想以上に高いことがわかったのである。これは非常に意外な結果でもあった。というのは、同じ細胞を免疫不全マウスやヒツジ胎仔へ移植した実験では、テラトーマの形成は今まで全く認められていなかったからである。マウスやヒツジをレシピエントとする異種移植の方が、腫瘍細胞に対して免疫拒絶をより誘導しやすいのかもしれない。したがって、異種移植の系では腫瘍形成のリスク

を過小評価する危険性が否定できない。同種移植系が ES 細胞を用いる移植治療法の安全性の評価に重要になると言える。

移植に用いた、6日間分化培養した細胞中には、約40%のSSEA-4(未分化ES細胞マーカー)陽性細胞が残存していた。我々は、この残存した未分化細胞がテラトーマを形成したのではないかと考え、このSSEA-4陽性細胞を除去したものを移植した。その結果、移植由来の造血キメラ率を下げることなく、6例全例で腫瘍形成は認められなかった。ES細胞由来の移植細胞からSSEA-4陽性細胞(未分化細胞)を除去するネガティブ・セレクション法は、ES細胞を用いた移植・再生医療の安全性の向上のために普遍的に応用できそうである。

#### E. 結論

ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性の評価にサル同種移植の系がきわめて有用である。この系では、免疫不全マウスを用いた通常の系では見逃すような腫瘍形成能を鋭敏に検出できる。移植細胞からSSEA-4陽性細胞を除去することにより、テラトーマの形成を予防できることを、この系で明らかにした。SSEA-4は、臨床的なステムネス・マーカーと言え。このマーカーによるネガティブ・セレクション法は、ES細胞を用いる移植・再生治療の安全性の向上をめざして普遍的に応用可能であろう。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Asano T, Shibata H, Hanazono Y. : Use of SIV vectors for simian ES cells. In Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.

2) Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. : In vivo tumor formation from primate ES cells. In Embryonic Stem cells II: Methods and Protocols (edited by Turksen K). Humana, Totowa, NJ, USA in press.

3) Sasaki K, Nagao Y, Kitano Y, Hasegawa H, Shibata H, Takatoku M, Hayashi S, Ozawa K, Hanazono Y. : Hematopoietic microchimerism

in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. Transplantation, 2005, 79:32-33.

4) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K, Hanazono Y. : Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. Gene Ther, 2005, 12:203-210.

5) Nagata M, Takahashi M, Muramatsu S, Ueda Y, Hanazono Y., Takeuchi K, Okada K, Suzuki Y, Kondo Y, Suemori M, Ikeda U, Nakano I, Kobayashi E, Hasegawa M, Ozawa K, Nakatsuji N, Shimada K. : Efficient gene transfer of a simian immuno-deficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. J Gene Med, 2003, 5:921-928.

6) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y. : Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. Transplantation, 2003, 76:1061-1067.

7) Hanazono Y., Asano T, Ueda Y, Ozawa K. : Genetic manipulation of primate embryonic and hematopoietic stem cells with simian lentivirus vectors. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13:106-110.

8) Asano T, Hanazono Y., Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii 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.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

霊長類ES細胞の品質管理と同種移植の安全性確保に関する研究  
（一遺伝子発現に関する検討一）

分担研究者 山元 恵（独立行政法人国立環境研究所 環境健康研究領域）主任研究官

研究概要：カニクイザルES細胞の品質管理のための情報収集を目的として、未分化ES細胞、および胚様体（Embryoid Body: EB）へ分化誘導した細胞を、内分泌攪乱物質の一つであるビスフェノール A（BPA）に曝露し、未分化能維持に関与する遺伝子や分化関連遺伝子発現の検討を行った。その結果、ヒトやマウスES細胞において、未分化能維持に関与することが報告されている転写因子 Oct-3/4、Sox-2 がカニクイザルにおいても未分化能マーカーになりうることを示された。また、EBへ分化誘導 21 日後、0.1・M、10・M BPA の存在下において、内胚葉分化マーカーの一つである  $\alpha$ -fetoprotein の発現が抑制されるというデータを得た。

A. 研究目的

カニクイザルES細胞の品質管理のための情報収集を目的として、未分化ES細胞、および種々の分化細胞における未分化能維持に関与する遺伝子や分化関連遺伝子の検討を行う。また、サルES細胞を用いた新規応用分野の開発の一環として薬剤の毒性評価への応用の検討を行う。

B. 研究方法

カニクイザルES細胞株、およびES細胞から胚様体（Embryoid Body: EB）へ分化誘導した細胞（0, 7, 14, 21 days）を、内分泌攪乱物質の一つであるビスフェノール A（BPA）に曝露し、これまでに報告のあるヒトやマウス由来ES細胞の情報をもとにして、カニクイザルにおける未分化能維持候補遺伝子や分化マーカー候補遺伝子の検討を行った。

各々の細胞において発現する遺伝子の解析は、RT-PCR、real time PCR（SYBR I）を用いて検討した。

C. 研究結果

ヒトやマウスES細胞において未分化能維持マーカーの一つであるとされる転写因子 Oct-3/4 の発現を、上記サルES細胞およびEBを用いて検討したところ、Oct-3/4 の発現は 7

日目以降発現が見られず、分化に伴って抑制されることが明らかになった。また、BPA は Oct-3/4 の発現にほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、ヒトやマウスES細胞において、Oct-3/4 以外に未分化能維持に関与することが報告されている遺伝子の発現を検討し、Sox-2 が検出可能であった。

また、EBへ分化誘導 21 日後、0.1  $\mu$ M、10  $\mu$ M BPA の存在下において、内胚葉分化マーカーの一つである  $\alpha$ -fetoprotein の発現が抑制されるというデータを得た。

D. 考察

ES細胞や分化細胞の薬剤に対する分子レベルにおける応答についてプロファイリングすることは、分化促進、抑制の両面からの解析が可能になり、毒性評価のみならず、未分化能維持に関与する機能のスクリーニングにも有用であると考えられる。

今年度の検討より、カニクイザルES細胞において Oct-3/4 が未分化マーカーとして用いることが可能であり、また Sox-2 の検出も可能であったため、さらに分化過程における発現を解析する予定である。

また、 $\alpha$ -fetoprotein に関する結果は、BPA がサルES細胞における内胚葉分化を阻害する可能性を示唆すると考えられる。さらに EB



が0.1 $\mu$ M BPA に応答を示したことより、従来の細胞を用いたBPAに関する毒性評価系に比べて、鋭敏な系になりうることが示唆された。これらの結果について、さらに再現性の確認を行うとともに、他の未分化能維持、分化マーカー候補遺伝子に関する検討を進める予定である。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 山元 恵、鈴木信雄、服部淳彦「環境汚染物質の骨に及ぼす影響に関する代替試験方法」特願 2002-148639

2) 河岸洋和、山元 恵、菅野さな枝、高橋 守「破骨細胞の分化・増殖阻害剤」特願 2004-114736

## 霊長類 ES 細胞の品質管理と同種移植の安全性確保に関する研究

分担研究者 中村 紳一郎（獣医畜産大学獣医病理学研究室）講師

研究要旨：カニクイザル由来 ES 細胞を異種であるマウス、同種であるカニクイザル胎児それぞれへの移植した結果によって発生した奇形腫を、組織学的および免疫組織化学的に解析した。マウスに形成された奇形腫は形態学的にも免疫組織化学的にも三胚葉性の奇形腫であった。一方カニクイザルに形成された奇形腫は形態学的には二胚葉性であったが、免疫組織化学的には三胚葉性を示した。本研究で用いる ES 細胞は、多分化能を有し、かつ確実な品質を有する細胞であることが明らかになった。

### A. 研究目的

ES 細胞の性質の一つとして、三胚葉すべての組織に分化しうる、多分化能が挙げられる。本研究課題全般で用いているカニクイザル由来 ES 細胞がこの性質を有するかどうか、すなわち、品質として適切なものであるか否かを確認するのが本研究の目的である。

### B. 研究方法

分化誘導されていない cyESC 株 ES 細胞を SCID マウス皮下に、中胚葉への分化誘導のために 6 日間培養された cyESC 株 ES 細胞をカニクイザル胎児肝臓に、それぞれに移植して発生した腫瘍を、組織学的および免疫組織化学的に検索した。これらの細胞にはタグとして GFP が組み込まれている。10% 中性緩衝ホルマリン固定およびパラフィン包埋材料を用いて、HE 染色、免疫染色を行った。免疫染色の一次抗体には、外胚葉マーカーとして Anti-Neuron Specific Enolase (NSE) 抗体、中胚葉マーカーとして Anti-alpha smooth muscle actin (SMA) 抗体、内胚葉マーカーとして Anti-alpha 1 fetoprotein (AFP) 抗体、ES 細胞のタグ蛋白である GFP に対して Anti-GFP 抗体を用いた。

倫理面への配慮：移植に関しては、共同分担研究者である花園豊博士の元で行われたものであり、氏の分担報告書を参考にさせていただきたい。当研究で用いられるのは、専ら摘出ホルマリン固定材料であるため、倫理的な問題は生じない。

### C. 研究結果

マウスに ES 細胞を移植した結果生じた腫瘍は、肉眼的に白色で充実性であった。組織学的には神経管、腺、骨、平滑筋、血管などに類似する構造が認められた。それぞれの構造に一致して GFP に対する免疫染色は陽性だった。さらに神経管様構造の周囲の細胞は NSE に、平滑筋様構造を構成する細胞は SMA に、腺様構造を構成する細胞は AFP に対して陽性を示した。

一方、カニクイザル胎児に移植した結果生じた腫瘍は、嚢胞状で内腔に漿液様成分を容れていた。組織学的には不整で大小異なる腺腔構造とそれぞれの腺腔の間に平滑筋様の構造が観察された。これらの構造はいずれも GFP に対する免疫染色で陽性だった。不整な腺腔構造は NSE と AFP に、平滑筋様構造は SMA に対して陽性を示した。

### D. 考察

マウスならびにカニクイザルに形成された腫瘍、ともに GFP が検出されたことから ES 細胞に由来することが明らかである。マウスに形成された腫瘍には比較的よく分化傾向を表現した様々な組織が形成され、形態学的に明確な三胚葉性の奇形腫だった。三胚葉性の性質は免疫染色によってさらに明確にされた。カニクイザルに形成された腫瘍は、あまり分化傾向が明確でなく、形態学的には二胚葉性であった。しかし、免疫染色によって

三胚葉性のマーカーすべてが検出されたため、免疫組織化学的には三胚葉であることが明らかとなった。

マウスとカニクイザルに生じた腫瘍の性質の違いは、移植された ES 細胞の分化程度、あるいは宿主の種の違いによる免疫応答の違いなどに起因していると思われる。

#### E. 結論

以上のことから、本研究ではいずれも三胚葉への分化能を持つ、適切な品質の ES 細胞を用いているといえる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 霊長類 ES 細胞の品質管理と同種移植の安全性確保に関する研究

分担研究者 下澤律浩（感染研・霊長類センター） 研究員

研究要旨：ES 細胞株の品質管理指標を確立するために、異なったサル ES 細胞株についてテラトーマ形成能およびその未分化細胞と初期分化細胞間における発現タンパク質の解析結果とを対応させ、多分化能を評価するマーカーを明らかにする。そこで、未分化細胞と初期分化細胞の間の発現タンパク質の比較およびマウスへの移植によるテラトーマ形成の比較を行った。テラトーマ形成については現在解析中であるが、Power Blot 解析による発現タンパク質の比較では、未分化 ES 細胞は初期分化胚葉体に比べ、9 種類の高発現（5 倍以上）および 15 種類（1/5 以下）の低発現のタンパク質が判明した。今後は高発現タンパク質について詳細な検討を行い、ES 細胞の品質管理に関わる発現タンパク質のスクリーニングを実施する。

### A. 研究目的

ES 細胞の株間および継代維持による未分化性や多分化能などの特性変化については十分には明らかにされておらず、極一部の細胞表面マーカーによってそれらを保持していることが確認されているのみである。しかし、形態的には差異のない ES 細胞における細胞表面マーカーの発現の違いやテラトーマ形成能の違いが認められることがある。このような状況下で ES 細胞を使用した再生治療などの医学研究へ応用を計る実験での誤差になり兼ねない。本研究は ES 細胞株の品質管理指標を確立するために、異なったサル ES 細胞株についてマウスへの ES 細胞移植によるテラトーマ形成能とその未分化細胞と初期分化細胞間における発現タンパク質の解析結果とを対応させ、多分化能を評価するマーカーを明らかにする。これによりサル ES 細胞の標準プロファイルを確立することができ、ヒト ES 細胞研究にも貢献できるものと考えられる。

### B. 研究方法

今年度は、本研究課題の研究分担者である仁藤氏が維持しているサル ES 細胞、CMK6 および CMK6GFP の 2 株を新たに導入した。この分与初期における ES 細胞の発現タンパク質

およびテラトーマ形成能を以下のように調べた。発現タンパク質については、2 つの ES 細胞株の未分化細胞および初期分化させた胚様体を次のように採取した。ES 細胞コロニーをフィーダー細胞と混雑しないように、コラゲナーゼで接着が弱くなったコロニーを先端を細くしたキャピラリーピペットで剥がして回収し、PBS で洗浄後-80℃で保存した。また、胚様体については、単離したコロニーを浮遊培養後 2-3 週間に 3 胚葉様の形態を示したものを回収し、上記同様に保存した。これら採取した細胞は日本ベクトンディッキンソン社において Western Blot 法を用いた Power Blot 解析により未分化および初期分化細胞間で発現タンパク質を比較した。また、未分化 ES 細胞はテラトーマ形成能を確認するために、免疫不全マウスの大腿筋中に  $5 \times 10^5$  個/匹の ES 細胞を一株につき 6 匹に 25G 注射針で注入した。この ES 細胞はコラゲナーゼ処理後回収したコロニーをトリプシン処理により個々の細胞に単離して、血球計算盤で細胞数を計測した。

（倫理面への配慮）

本研究における免疫不全マウスにおけるテラトーマ形成実験は、国立感染症研究所・動物実験委員会の承認を受けて実施した。ES 細胞の多分化能を確認する方法として、本実験