

## Methods and Results

### Preparation of Biotubes

Nine New Zealand White rabbits, weighing 2.0 to 2.5 kg, according to the Principles of Laboratory Animal Care (formulated by the National Society for Medical Research) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication, No. 56-23, revised 1985) were used as hosts. Six kinds of polymers with rod shape (length; 20 mm, diameter; 3 mm) were placed in the subcutaneous layer of dorsum of rabbits. The polymer materials were polyethylene (PE), poly-fluoroacetate (PFA), poly-methyl methacrylate (PMMA), segmented polyurethane (PU), polyvinyl chloride (PVC) and silicone (Si). The coating thickness was 50  $\mu\text{m}$ . At 1 month after insertion, rods were found to be encapsulated by a membranous tissue in the subcutaneum of rabbits (Fig. 1a, 1b). After 3 months, all implants were still covered with membranous capsular tissues. We called these autologous capsular tissues "Biotubes".

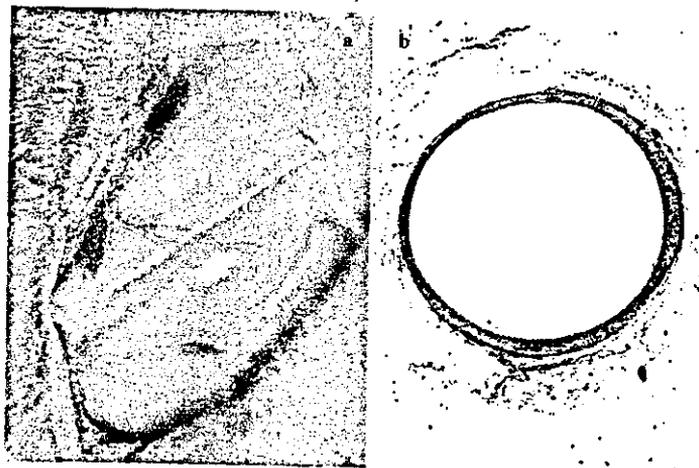


Fig. 1. (a): "Biotube", which was formed by implantation of the PMMA for 1 month in rabbit dorsal skin. (b): A photomicrograph of a cross section of the PMMA tube obtained after 3-months implantation

## Histological Examination

The explanted Biotubes were fixed in 10 % buffered formalin solution and embedded in paraffin. Tissue cross sections were stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation (Fig. 1b, 2). The wall thickness of the Biotubes was approximately 70  $\mu\text{m}$  one month after implantation of Si, PVC, and PFA rods. In cases of PU or PMMA implants the wall showed 100-150  $\mu\text{m}$  in thickness (Fig. 2). The capsules by the PE implant revealed the thickest wall (approximately 200  $\mu\text{m}$ ). For PMMA, PVC, and PE, the wall thickness increased by 1.5 to 2 fold after 3-month (Fig 3). The Biotube walls around the PFA showed sparse collagen with fibroblasts. Regarding the Si rod, the Biotube wall was thin but contained collagen fibers with sparse fibroblast. The walls around PMMA, PU and PVC rods were of a moderate thickness and contained relatively thick collagen fibers. The Biotubes that formed around the PU, PE and PVC bases showed numerous inflammatory cell infiltrations such as lymphocytes. Especially in the tubular tissues of PE and PU, foreign body giant cells were also observed. The capsular wall of PE rod showed 200 $\mu\text{m}$  in thickness but almost no regular mesh structure of collagen fibers.

Immunohistochemistry was also performed to identify the muscular component of the Biotubes. Vimentin, a mesenchymal tissue marker, was positive for all tubular tissues around the various rods after 1- and 3-month implantation.  $\alpha$ -smooth muscle actin was intensely positive for all tubular tissues after 3 months. Desmin as a cytoskeleton of matured muscle was negative in all tubular tissues after 1 and 3 months. A small number of macrophages (RAM 11), were observed in the tubular tissues of PU, PFA and PMMA after 3-month of implantation.

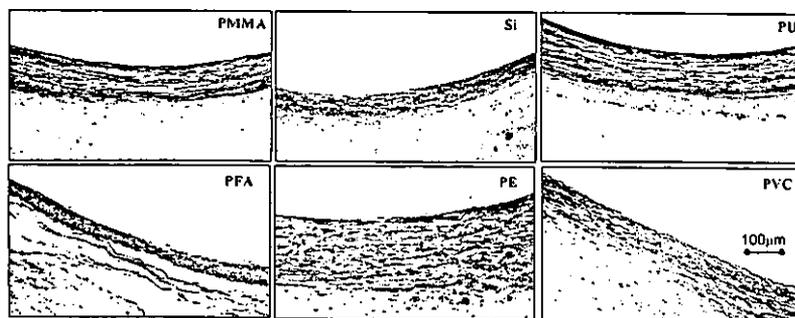


Fig. 2. Photomicrographs of cross sections of the Biotubes, They were formed by 3 months implantation of six kinds of polymer rods in the rabbit skin (hematoxylin and eosin stain)

## Mechanical Properties of the Biotubes

The luminal pressure-diameter relationship was determined using an apparatus designed by Takamizawa and Hayashi (Takamizawa K and Hayashi K 1987). Changes in the outer diameter of the Biotubes were measured. None of the Biotubes ruptured even after 200 mmHg of inner pressure after 1 month of implantation. The Biotubes around Si rod became slightly dilated when exposed to water at low pressure but did not change significantly with high pressure (about 20 mmHg or higher). In contrast, the Biotube formed around the PMMA rod became dilated at low-pressure ranges and gradually increased with pressure up to a high range, indicating "J"-shaped curves. The dilatation rate of the outer diameter at a water pressure of 200 mmHg was about 5 % for Si and about 25 % for PMMA.

Repeated water pressure loadings, range of 0 to 200mmHg, were investigated in the PMMA Biotube rods. The external diameter of the PMMA Biotube was about 2.7 mm before loading and dilated to about 3 mm after loading at several 10 mmHg water pressure and thereafter continuously dilated slowly with an increase in inner load reaching about 3.2 mm at 200 mmHg. Changes in the outer diameter luminal pressure were basically the same with repeated pressure loadings in the lumen (Fig 3).

Repeatable Diameter Change of Biotube with Change in Intraluminal Pressure

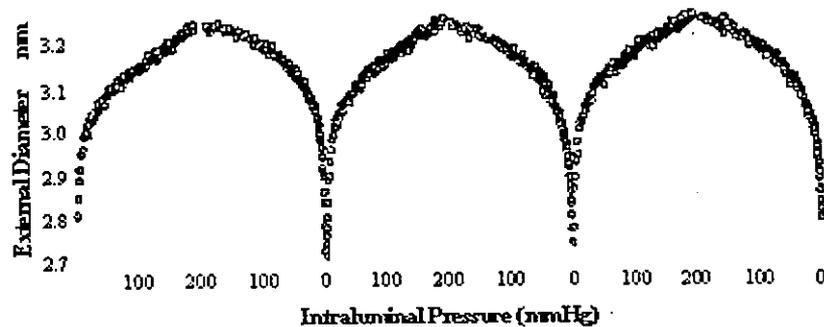


Fig. 3. External diameter changes in loading and removing of water pressure in range of 0 to 200 mmHg to the lumen of the Biotube around the PMMA rod after 3 months of implantation

The compliance of the tube was determined by the stiffness parameter ( $\beta$ ) as defined by Hayashi et al., (Hayashi K, et al. 1980, Hayashi K and Nakamura T 1985) which is described according to the following equation:

$$\ln(P/P_s) = \beta(D/D_s - 1)$$

where  $P$ ,  $P_s$ ,  $D$  and  $D_s$  denote luminal pressure, standard pressure (100 mmHg in this study), external diameter and diameter at the pressure  $P_s$ , respectively. The relationship between logarithmic value of the relative pressure and relative outer diameter was obtained from the relationship between outer diameter and luminal pressure. After 1-month of implantation, the highest  $\beta$  value was obtained from the Si Biotube and the  $\beta$  value decreased in the order of PMMA, PE and PVC (Fig 4). The Biotube around the PMMA rod exhibited the  $\beta$  value resembling that of the human coronary artery whilst the  $\beta$  values of the Biotubes formed around PE and PVC bases were similar to those of the human femoral and common carotid arteries, respectively.

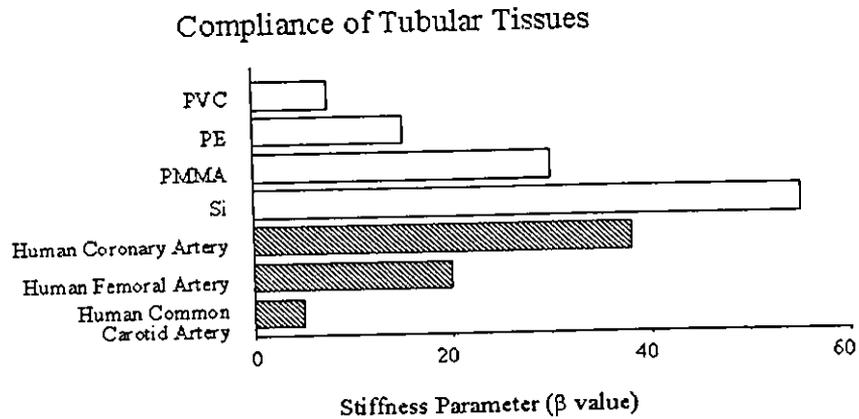


Fig. 4. The stiffness parameters ( $\beta$  values) of the Biotubes by 1 month of implantation. The Biotubes formed around the PMMA, PE, and PVC rods exhibited a  $\beta$  value close to those of the human coronary artery, the human femoral artery, and common carotid artery, respectively

## Discussion

Considering immune responses among tissue or organ transplants, grafts are better if they consist simply of own self tissues. For example, autografts such as a great saphenous vein, an internal thoracic artery, and a radial artery are used for conventional aorto-coronary bypass operations.

However, it is sometimes difficult to obtain a sufficient amount of grafts or healthy grafts due to the patient's limited supply of vessels.

Larger caliber grafts vessels, with more than 5 mm in diameter, are usually composed of artificial materials such as Dacron fabrics or expanded poly-tetrafluoroethylene (ePTFE). Small caliber artificial grafts, however, may occlude within a short period after implantation by thrombosis. Therefore, the development of hybrid type artificial blood vessels combining artificial and biological materials is expected. The layered hybrid vessels resembling biological vascular walls have been developed *in vitro*. (Ishibashi K and Matsuda T 1994, Matsuda T and Miwa H 1995, Miwa H and Matsuda T 1994). The invented hybrid vessels with 4 mm in diameter showed high patency after 1-year of autotransplantation in a canine carotid artery. Other hybrid grafts prepared by seeding and culturing cells from the own great saphenous vein in a polylactic acid tubular sponge, have successfully been used in reconstruction of the pulmonary artery in humans (Hibino N, et al. 2003, Shin'oka T, et al. 2001, Shin'oka T, et al. 1998). Recently, it has been proposed that the preparation of various hybrid artificial vessels could be achieved by *in vitro* tissue engineering techniques using stem cells, including endothelial progenitor cells (Asahara T and Isner JM 2002, Isner JM, et al. 2001) and ES cells (Nishikawa S 1997, Yamashita et al. 2000), as a cell source (Kaushal S, et al. 2001, Shirota T, et al. 2003).

For patency of artificial blood vessels, particularly those with a small caliber (5 mm or less in diameter), the following factors are required. 1) Resistance to blood pressure, 2) antithrombotic properties to avoid thrombotic occlusion in the early stage of implantation, and 3) mechanical compatibility including compliance matching and pulse follow-ability to avoid occlusion in the chronic stage. We aimed to develop small caliber artificial blood vessels for a clinical application that have high patency in combination of the tubular tissue preparation technique and *in vivo* tissue engineering (Nakayama Y, et al. 2004). Biotubes consist of own self cells and extracellular matrices, which is similar to autotransplantation. Therefore, immunological rejections to the tubular tissue may be avoided. Moreover, the tissue may grow after transplantation in the body. In this study, various polymeric rods as a mold were implanted in the skin to form own tissue tubes. The materials used for the polymeric rods were PMMA, PU, PVC, PE and Si, all of which are hydrophilic, and PFA, which is water-repellent, and all are currently used as biomaterials. None of the Biotubes ruptured with 200-mmHg inner pressures except for tissue created by PFA. The walls of the Biotube by PFA showed sparse collagen fibers with numerous inflammatory cells, without capsularization (Fig. 2). In the tube that formed around PU, inflammatory cell infiltration was noted. Although PU

is used as a tissue compatible material for artificial hearts (Zdrahala RJ and Zdrahala IJ 1999), when transplanted as an artificial vessel, granulation is often recognized (Seifalian AM, et al. 2003, Sonoda H, et al. 2003). PU is considered to have a strong tissue response. A dense collagen mesh structure was formed around Si. The wall thickness of the Biotubes after 1-month of implantation decreased in the order of PE>PU>PMMA>PVC>Si>PFA and increased with transplantation period apart from PFA, PU, and Si.

The Si base tubular tissue as a graft strengthened with Dacron has been attempted for arterial bypass in the lower limbs clinically (Hallin RW and Sweetman WR 1976, Sparks CH, 1972). The tubular tissue showed vascular function at an early stage of the transplantation. However, the grafts were occluded within a short period in most cases because of lack of endothelialization. It has recently been reported that mesothelial cells were arranged on the luminal surface of tubular tissue obtained using Si bases (Campbell JH, et al. 1999). The patency rate was high, about 70 %, after 2-month of transplantation in animal experiments.

The stiffness parameter ( $\beta$ ) is one of the indexes for compliance of blood vessels and indicates the mechanical property under physiological blood pressure (Hayashi K, et al. 1980, Hayashi K and Nakamura T 1985). Lower values in the  $\beta$  value indicate the material is soft and flexible. Within the polymers used in this study, the  $\beta$  value decreased in the order of Si>PMMA>PE>PVC. The Biotubes that formed around Si were relatively firm and inflexible, while the Biotubes that formed around PMMA were elastic within a low-pressure range and less extensible at a high-pressure range, showing a mechanical property similar to that of biological arteries. The relationship between intraluminal pressure and external diameter showed a 'J'-shaped curve, similar to genuine arteries. The Biotube obtained after one month by PMMA, PE and PVC exhibited compliance similar to that of the human coronary artery, human femoral artery and human carotid artery, respectively. Selection of specific rod materials and embedding period allow the design of artificial blood vessels with matching mechanical properties to that of genuine vessels. This matching is expected to prevent intimal hyperplasia causing luminal occlusion in the chronic stage. Biotubes are expected to grow with the patient blood vessels and are ideal vascular grafts. Furthermore, it is possible to design specific mechanics and it is easy to match the host's vascular shapes. We are planning to establish the Biotube preparation method that combines surface design as described above and demonstrate the usefulness of Biotubes as small caliber artificial blood vessels by animal transplantation experiments. These results will be reported in near future.

## References

- Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF (1987) Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg* 5:376-382
- Asahara T, Isner JM (2002) Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 11:171-178
- Campbell JH, Efendy JE, Campbell GR (1999) Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* 85:1173-1178
- Hallin RW, Sweetman WR (1976) The sparks' mandril graft. A seven year follow-up of mandril grafts placed by Charles H. Sparks and his associates. *Am J Surg* 132:221-223
- Hayashi K, Handa H, Nagasawa S, Okumura A, Moritake K, (1980) Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomech* 13:175-184
- Hayashi K, Nakamura T (1985) Material test system for the evaluation of mechanical properties of biomaterials. *J Biomed Mater Res* 19:133-144
- Hibino N, Shin'oka T, Kurosawa H (2003) Long-term histologic findings in pulmonary arteries reconstruction with autologous pericardium. *N Engl J Med* 348:865-867
- Ishibashi K, Matsuda T (1994) Reconstruction of a hybrid vascular grafts hierarchically layered with three cell types. *ASAIO J* 40:M284-M290
- Isner JM, Kaka C, Kawamoto A, Asahara T (2001) Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann NY Acad Sci* 953:75-84
- Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Briscoff J, Mayer JE Jr (2001) Fabrication small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7:1035-1040
- Kinley CE, Marble AE (1980) Compliance: a continuing problem with vascular grafts. *J Cardiovasc Surg* 21:163-170
- Kott I, Peirce EC II, Mitty HA, Geller SA, Jacobson JH II (1973) The tissue tube as a vascular prosthesis. *Arch Surg* 106:206-207
- Matsuda T, Miwa H (1995) A hybrid vascular model biomimicking the hierarchic structure of arterial wall: neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110:988-997
- Miwa H, Matsuda T (1994) An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prosthesis. *J Vasc Surg* 19:658-667
- Nakayama Y, Ishibashi-Ueda H, Takamizawa K (2004) In vivo Tissue-engineered Small Caliber Arterial Graft Prosthesis Consisting of Autologous Tissue (Biotube). *Cell Transplantation* (in press)
- Nishikawa S (1997) Embryonic stem cells as a source of hematopoietic and vascular endothelial cells in vitro. *J Alberg Clin Immunol* 100:S102-S104

- Peirce EC II (1953) Autologous tissue tubes for aortic grafts in dogs. *Surgery* 33:648-657
- Pevec WC, Darling RC, L'Italien GJ, Abbott WM (1992) Femoropopliteal reconstruction with knitted, non veleur Dacron versus expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg* 16:60-65
- Seifalian AM, Salacinski HJ, Tiwari A, Edwards A, Bowald S, Hamilton G (2003) In vivo biostability of a poly (carbonate-urea) urethane graft. *Biomaterials* 24:2549-2557
- Shin'oka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE (1998) Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:536-545, discussion:545-546
- Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y (2001) Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344:532-533
- Shirota T, He H, Yasui H, Matsuda T (2003) Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabricated processing. *Tissue Eng* 9:127-136
- Sonoda H, Takamizawa K, Nakayama Y, Yasui H, Matsuda T (2003) Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and compliance changes after implantation. *J Biomed Mater Res* 65A:170-181
- Sparks CH (1972) Silicone mandril method of femoropopliteal artery bypass. Clinical experience and surgical technics. *Am J Surg* 124:244-249
- Stewart SF, Lyman DJ (1992) Effects of a vascular graft/natural artery compliance mismatch on pulsatile flow. *J Biomech* 25:297-310
- Takamizawa K, Hayashi K (1987) Stain energy density function and uniform strain hypothesis for arterial mechanics. *J Biomech* 20:7-17
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000) Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408:92-96
- Zdrahala RJ, Zdrahala IJ (1999) Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *J Biomater Appl* 14:67-90

## Monkey Embryonic Stem Cell Lines Expressing Green Fluorescent Protein

Tatsuyuki Takada,\*<sup>1</sup> Yutaka Suzuki,†<sup>1</sup> Yasushi Kondo,‡ Nae Kadota,‡ Kinji Kobayashi,‡ Shinji Nito,‡ Hiroshi Kimura,\* and Ryuzo Torii†

\*Department of Experimental Radiology and †Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Ohtsu, Shiga, 520-2192, Japan

‡Discovery Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka 532-8505, Japan

The major limitation of nonhuman primate (NHP) embryonic stem (ES) cell research is inefficient genetic modification and limited knowledge of differentiation mechanisms. A genetically modified NHP-ES cell with biomarkers, such as green fluorescent protein (GFP), that allow noninvasive monitoring of transgenic cells, is a useful tool to study cell differentiation control during preimplantation and fetal development, which also plays a crucial role in the development of cell transplantation medicine. Here we report the establishment of transgenic NHP-ES cell lines that express GFP without jeopardizing their pluripotency, which was confirmed by *in vitro* and *in vivo* differentiation. These GFP-expressing ES cells reproducibly differentiated into embryoid bodies, neural cells, and cardiac myocytes. They formed teratoma composed of tissues derived from the three embryonic germ layers when transplanted into severe combined immunodeficient disease (SCID) mice. GFP expression was maintained in these differentiated cells, suggesting that these cells were useful for cell transplantation experiments. Furthermore, we showed that these ES cells have the ability to form chimeric blastocysts by introducing into the early preimplantation stage NHP embryo.

Key words: Nonhuman primate; Cynomolgus monkey; Embryonic stem cell; Green fluorescent protein; Pluripotency

### INTRODUCTION

Nonhuman primate (NHP) embryonic stem (ES) cells are considered to be one of the best models for studying human development and the development of stem cell therapy for patients suffering from Parkinson's disease (5) and diabetes mellitus (6), etc. (1,2,9,12–14,16). The introduction of disease-related genes and the capability to replace specific genes using the gene targeting technique in NHP-ES cells without jeopardizing their pluripotency is the key for the success of stem cell therapies. However, the effect of the transfection procedure on pluripotency of NHP-ES cells is poorly understood. It has been demonstrated that NHP-ES cells tend to differentiate when dissociated into single cells (3,9,12–14), which limits the application of commonly used transfection protocol. The establishment of a genetically modified NHP-ES cell line with a biomarker, enhanced green fluorescent protein (eGFP), provides a powerful tool to study pluripotency in ES cells by monitoring the differ-

entiation process. The capability to distinguish ES cells from the host cells allows accurate cell lineage analysis, systematic monitoring of the tissue regeneration process, and the validation of clinical application of cell transplantation. Here we report the establishment of eGFP-expressing NHP-ES cells preserving the pluripotency, which is crucial for the advancement of stem cell technology and clinical applications.

### MATERIALS AND METHODS

#### ES Cell Culture

The cynomolgus monkey ES cell line (CMK5) was maintained on a mitomycin C inactivated feeder layer of neomycin-resistant mouse embryonic fibroblasts in DMEM/F12 (1:1) medium containing 15% fetal bovine serum (FBS; JRH, Lenexa, KS), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, and 1000 U/ml of leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO) (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described previously (9).

Accepted June 19, 2002.

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Ryuzo Torii, Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Ohtsu, Shiga, 520-2192, Japan. Tel: +81-77-548-2334; Fax: +81-77-543-1990; E-mail: torii@belle.shiga-med.ac.jp

### eGFP Expression Vector Construction

The CMV-IE enhancer and human elongation factor 1 $\alpha$  promoter (4) was excised from the GFP expression vector (10) using *Hind*III and *Eco*RI site. It was then cloned into the *Hind*III-*Eco*RI digested pEGFP-1 vector (Clontech, Palo Alto, CA). This resulting plasmid was linearized by *Hind*III-*Alw*NI digestion and used for electroporation (11).

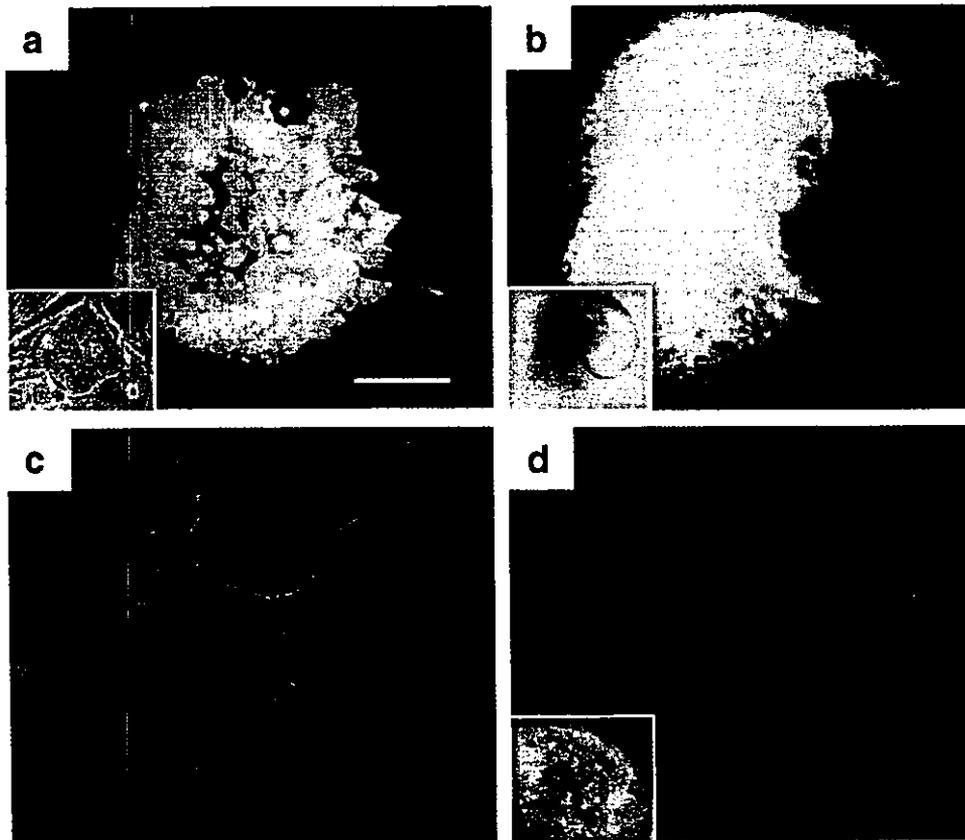
### Electroporation and Selection of ES Cells

Twenty micrograms of linearized transgene was electroporated into a suspension of ES cells ( $1 \times 10^7$ ) in 1 ml of PBS using a Bio-Rad gene pulser (500  $\mu$ F, 250 V). Cells were then incubated on ice for 10 min, plated, and allowed to recover for 24 h before selection in medium containing G418 (200  $\mu$ g/ml). Cells were fed daily, and after 5 days of culture the resulting G418-resistant

ES colonies with strong eGFP expression were individually picked and transferred to 24-well plates with feeders. Then ES clones were propagated and used for differentiation analysis.

### In Vitro Differentiation and Characterization of Differentiated Cell Types

GFP-expressing ES cells were cultured in suspension using bacteriological petri dishes with the ES medium without 2-mercaptoethanol and LIF to form embryoid bodies (EBs). After 2–3 weeks of suspension culture, the resulting EBs were transferred into the tissue culture dish to induce spontaneous differentiation in vitro. Differentiated cells were characterized immunocytochemically using antibodies against human neurofilament protein, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC).



**Figure 1.** Established eGFP-expressing ES cell line and its differentiation. (a) Fluorescent image of typical undifferentiated monkey ES cell colony (CMK5G-2) transfected with the eGFP gene (bar = 100  $\mu$ m). Inset is a bright field image (1/3 scale of the fluorescent image). (b) Fluorescent image of cystic embryoid body. Inset is a bright field image (1/3 scale of the fluorescent image). (c) Differentiation to neuron. Immunostaining was carried out with antibody against human neurofilament protein and detected with Cy3-labeled secondary antibody. (d) Differentiation to cardiac myocytes. Immunostaining was carried out with antibody against human  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC) and detected with Cy3-labeled secondary antibody. Inset is a fluorescent image (1/3 scale of the immunostaining).

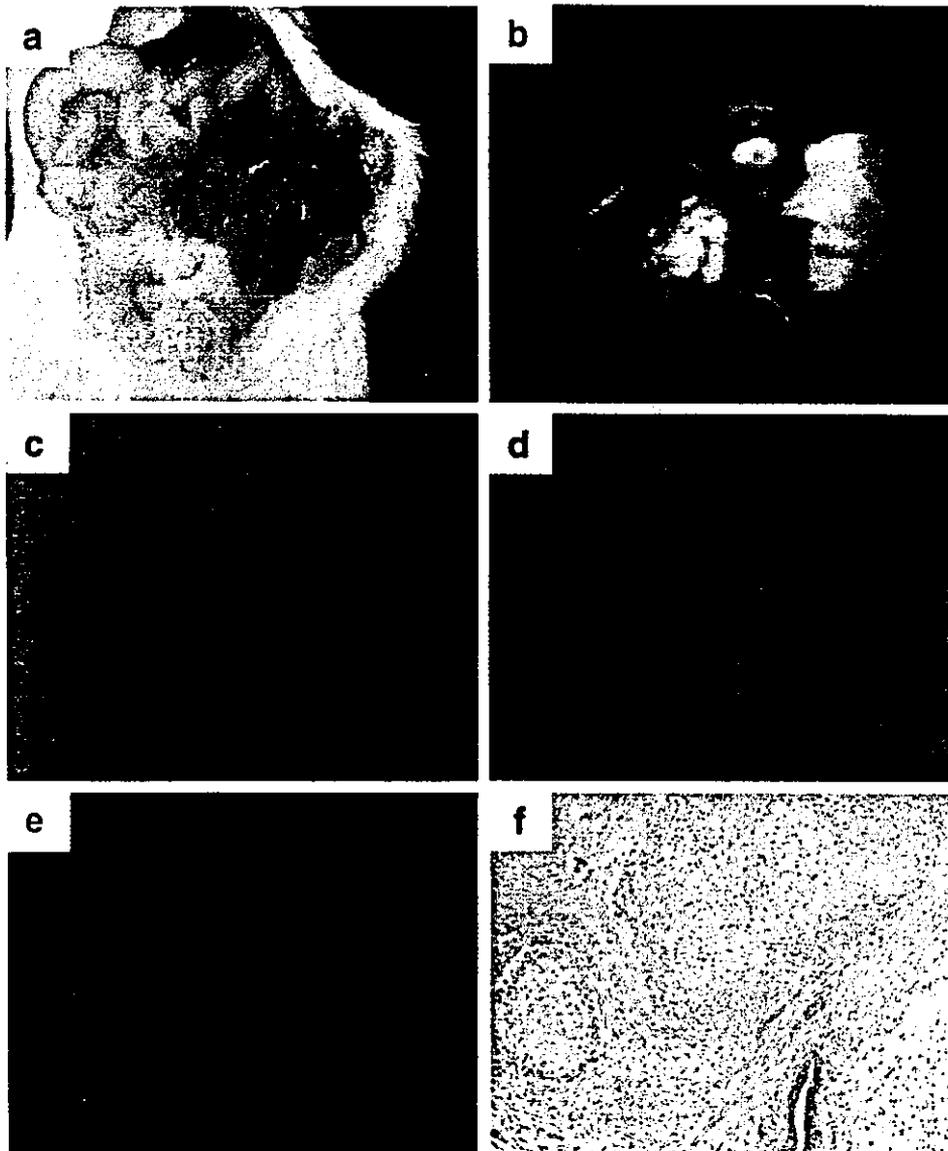
*Teratoma Formation in SCID Mice*

Approximately  $1 \times 10^6$  of eGFP-expressing ES cells were injected either intraperitoneally (IP) or subcutaneously (SC) into 8-week-old severe combined immunodeficient disease (SCID) mice (three male mice). Six weeks later, the resulting tumors were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and examined histologically after hematoxylin eosin staining.

*Detection of eGFP Expression*

Expression of eGFP was monitored by fluorescent microscopy (IX-70 or SZX-12, Olympus, Japan) with a filter set for GFP (BP 470-490 and BA515). A handy UV light (365 nm) was used to observe the eGFP fluorescence of teratoma recovered from mice.

Immunohistochemical analysis was carried out in the sections prepared from teratoma using GFP monoclonal



**Figure 2.** Teratoma and its eGFP expression. (a) Teratoma formed in the intraperitoneal space of a mouse. (b) Fluorescent image of teratoma. (c, d, e) eGFP expression in the teratoma sections detected with monoclonal antibody against GFP and Cy3-labeled secondary antibody. (c, d) Teratoma sections from the eGFP-expressing NHP-ES cells. (e) Teratoma sections from the parental ES cells (GFP gene is not transfected). (f) Hematoxylin and eosin staining of the serial section of the teratoma from the parental ES cell line.

antibody (Clontech) and localized with Cy3-labeled goat anti-mouse immunoglobulin secondary antibody.

#### *ES Cell Injection Into Monkey Preimplantation Embryos*

Cultured eGFP ES cells were dissociated with collagenase. eGFP-expressing ES cells were collected after removal of the feeder cells by the attachment to the gelatinized culture dish at 37°C for 20 min. eGFP expression was confirmed before and after aspirating ES cells into the injection pipette. Zona pellucida was drilled with a piezo-driven injection pipette (PRIMtech, Ibaraki, Japan) and two to four of the eGFP-expressing ES cells were expelled into the perivitelline space of the four-cell stage cynomolgus monkey embryo. These injected embryos were cultured as described previously (15).

### RESULTS AND DISCUSSION

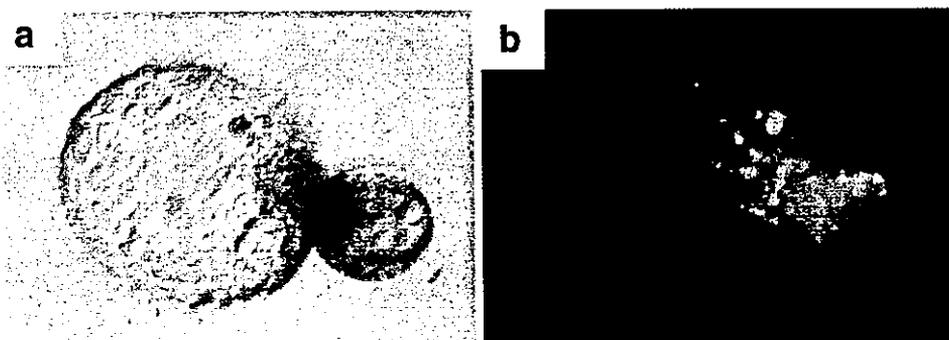
Parental NHP-ES cells (CMK5) were cultured as reported previously (9) and electroporation was carried out using linearized expression vector of eGFP under the control of the human elongation factor 1 $\alpha$  promoter and the CMV-IE enhancer (4,10,11). After G418 selection, eGFP-expressing ES cell colonies were picked mechanically and propagated. We established two cell lines (CMK5G-1, CMK5G-2) from two independent electroporations (one cell line per experiment) (Fig. 1a). The normal karyotype (2n = 42) of eGFP-expressing ES cell lines was maintained in culture for more than 6 months in both cell lines. In addition, they remained undifferentiated as indicated by the expression of alkaline phosphatase and stage-specific embryonic antigen-4 (data not shown), a commonly used marker for NHP-ES cells.

In vitro differentiation was conducted as reported by Suemori et al. (9). After 1 week of suspension culture of CMK5G-1 in ES medium without 2-mercaptoethanol and LIF, cystic embryoid bodies (EBs) were formed.

These EBs were then plated onto a tissue culture dish (Fig. 1b) for further spontaneous differentiation. Elongation of process was observed at 2–3 weeks after plating. The presence of neurons (Fig. 1c) and astrocytes (data not shown) was identified by immunocytochemistry (ICC) using antibodies against neurofilament proteins and GFAP, respectively. In addition, we observed the beating motion in some of the differentiated cells and further identified by ICC using antibody against human  $\alpha$ -MHC, a marker for cardiac myocytes (Fig. 1d). Differentiation to cardiac myocytes was observed in approximately 1 of 10 EBs. This result suggested that the NHP-ES cell line was capable of differentiating to the cardiac lineage. Nevertheless, all EBs and differentiated cells expressed eGFP ubiquitously (Fig. 1a, b, d).

For further confirmation of pluripotency, we grafted  $1 \times 10^6$  of eGFP-expressing ES cells into SCID mice to investigate their differentiation potential in vivo. Six weeks after either IP or SC injection, teratoma formation was observed in all three mice (Fig. 2a). All teratomas and their cross sections showed green fluorescence under the handy UV light (365 nm) (Fig. 2b), which indicated the expression of eGFP. Expression of eGFP was also confirmed immunohistochemically using monoclonal antibody against GFP (Fig. 2c, d). Histological examination suggested that these teratomas composed of tissues derived from the three embryonic germ layers, ectoderm (neuron and glia), mesoderm (muscle, cartilage, bone), and endoderm (ciliated columnar epithelium, gut epithelium) (data not shown). Basically similar results were obtained in both cell lines.

We further investigated the developmental potential of the eGFP-ES cells by producing a chimeric preimplantation embryo. We injected the eGFP-ES cells (CMK5G-2) into four-cell stage preimplantation embryos of cynomolgus monkeys and cultured in vitro (15). Under this normal embryo culture condition, these ES cells



**Figure 3.** Chimeric blastocyst produced by eGFP-NHP-ES cell injection. (a) Bright field image of hatching blastocyst. (b) Fluorescent image of a blastocyst. Contribution of eGFP-expressing ES cells to the inner cell mass is shown.

mingled with host embryonic cells and proliferated to form chimeric blastocysts. The distribution of progeny of eGFP-ES cells was easily confirmed by monitoring the eGFP expression of the blastocyst by fluorescent microscopy and the extent of the contribution was significant (Fig. 3a, b).

The present results suggested that the eGFP-expressing NHP-ES (eGFP-ES) cell line was maintained at a pluripotent stage as its parental cell line, which was confirmed by differentiation in vitro and teratoma formation. In addition, due to the finding that teratoma formation may not provide definitive evidence of pluripotency (7,8), we investigated the developmental potential by re-introducing eGFP-ES cells into early preimplantation embryos and the production of chimeric blastocysts. We demonstrated that the eGFP-ES cells proliferated and behaved like normal embryonic cells when returned to the embryonic environment. Progeny cells of the eGFP-ES cells were easily identified by their eGFP expression.

In conclusion, we established an eGFP-expressing NHP-ES cell line that has developmental potential to form chimeric blastocysts and to differentiate into a wide spectrum of cell types in vitro and in vivo. Although true pluripotency of this eGFP-ES cell line needs to be shown by reimplantation of the chimeric blastocysts and the generation of a normal chimeric monkey, this cell line should be useful for studying the cell lineage, differentiation process, cell transplantation, and tissue regeneration.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank S. Sugano for providing the EF-1 $\alpha$  promoter and CMV-IE enhancer. We also thank N. Fujinami and K. Kitada for the excellent technical assistance, especially micromanipulation, Y. Hosoi and A. Iritani for the support of our study, and A. W. S. Chan for critical review of this manuscript. This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research to R.T., H.K., and T.T. from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

## REFERENCES

- Chan, A. W. S.; Chong, K. Y.; Martinovich, C.; Simerly, C.; Schatten, G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291:309–312; 2001.
- Chan, A. W. S.; Dominko, T.; Luetjens, C. M.; Neuber, E.; Martinovich, C.; Hewitson, L.; Simerly, C. R.; Schatten, G. P. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287:317–319; 2001.
- Eiges, R.; Schuldiner, M.; Drukker, M.; Yanuka, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Benvenisty, N. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr. Biol.* 11:514–518; 2001.
- Kim, D. W.; Uetsuki, T.; Kaziro, Y.; Yamaguchi, N.; Sugano, S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 91:217–223; 1990.
- Kordower, J. H.; Emborg, M. E.; Bloch, J.; Ma, S. Y.; Chu, Y.; Leventhal, L.; McBride, J.; Chen, E. Y.; Palfi, S.; Roitberg, B. Z.; Brown, W. D.; Holden, J. E.; Pyzalski, R.; Taylor, M. D.; Carvey, P.; Ling, Z.; Trono, D.; Hantraye, P.; Deglon, N.; Aebischer, P. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290:767–773; 2000.
- Lee, H. C.; Kim, S. J.; Kim, K. S.; Shin, H. C.; Yoon, J. W. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408:483–488; 2000.
- Sobis, H.; Verstuyf, A.; Vandeputte, M. Endodermal origin of yolk-sac-derived teratomas. *Development* 111:75–78; 1991.
- Sobis, H.; Verstuyf, A.; Vandeputte, M. Visceral yolk sac-derived tumors. *Int. J. Dev. Biol.* 37:155–168; 1993.
- Suemori, H.; Tada, T.; Torii, R.; Hosoi, Y.; Kobayashi, K.; Imahie, H.; Kondo, Y.; Iritani, A.; Nakatsuji, N. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev. Dyn.* 222:273–279; 2001.
- Takada, T.; Iida, K.; Awaji, T.; Itoh, K.; Takahashi, R.; Shibui, A.; Yoshida, K.; Sugano, S.; Tsujimoto, G. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat. Biotech.* 15:458–461; 1997.
- Takada, T.; Yoshida, K.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Tsujimoto, G.; Katsuki, M.; Sugano, S. Expression of green fluorescent protein in transgenic mice. *Methods Enzymol.* 302:233–250; 1999.
- Thomson, J. A.; Kalishman, J.; Golos, T. G.; Durning, M.; Harris, C. P.; Becker, R. A.; Hearn, J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844–7848; 1995.
- Thomson, J. A.; Kalishman, J.; Golos, T. G.; Durning, M.; Harris, C. P.; Hearn, J. P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* 55:254–259; 1996.
- Thomson, J. A.; Marshall, V. S. Primate embryonic stem cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133–165; 1998.
- Torii, R.; Hosoi, Y.; Masuda, Y.; Iritani, A.; Nigi, H. Birth of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) infant following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Primates* 41:39–47; 2000.
- Wolfgang, M. J.; Eisele, S. G.; Browne, M. A.; Schotzko, M. L.; Garthwaite, M. A.; Durning, M.; Ramezani, A.; Hawley, R. G.; Thomson, J. A.; Golos, T. G. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10728–10732; 2001.

## ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)

Human Embryonic Stem Cells

近藤 靖\*<sup>1</sup>, 鈴木 豊\*<sup>2</sup>, 仁藤新治\*<sup>3</sup>

2003年、京都大学再生医科学研究所で国内初のヒト ES 細胞が3株樹立され、国産のヒト ES 細胞株の分配体制も整った。今後、国内のヒト ES 細胞研究は一層盛んになるものと思われる。本稿では、ヒト ES 細胞をとりまく研究の現況や今後の課題について、特に再生医療への応用の観点から概説してみたい。

## 1. はじめに

ES 細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) は、胚の初期段階である胚盤胞の内部細胞塊から分離される特殊な細胞であり、未分化状態を保持したまま分裂増殖して無限に自らのコピーを作り出せる能力 (自己複製能) と体を構成するあらゆる細胞に分化する能力 (多能性) とを併せもつ。

ES 細胞は 1981 年にマウスで初めて試験管内で増殖できる細胞株として樹立されて以来<sup>1, 2)</sup>、分化・発生機構を解明するための基礎研究材料として、また遺伝子改変技術を応用した遺伝子の機能解析や疾患モデル作製のための研究ツールとして分子生物学の分野で広く利用されてきた。そして現在までに、マウス以外のさまざまな動物種でも ES 細胞の樹立が報告されてきている。霊長類に関しては、1995 年にアカゲザルとコモンマーモセットから ES 細胞が樹立されたのが最初であり<sup>3, 4)</sup>、その後筆者らも、カニクイザルからの ES

細胞の樹立に成功している<sup>5)</sup>。

ヒト ES 細胞としては、1998 年 11 月、米国ウィスコンシン州立大学のトムソンらによってその樹立がなされ、科学雑誌『Science』に掲載されたのが最初となる<sup>6)</sup>。この発表により、それまで一般の人にはあまり馴染みのなかった ES 細胞という言葉が一躍、“市民権”を得ることになり、以来、再生医療の切り札として関心を集め、各国の多くの施設でヒト ES 細胞を用いた研究が盛んに進められている。

## 2. ヒト ES 細胞

ヒト ES 細胞株はマウス ES 細胞株と比較していくつかの相違点がある。形態的には、マウスに比べてコロニー形態が扁平である (写真 1)。マウス ES 細胞を未分化のまま培養・維持するためには、LIF (leukemia inhibitory factor) を培養液に添加しなければならないが、LIF にはヒト ES 細胞を維持する効果が認められていない。ま

\*<sup>1</sup>Yasushi Kondo 田辺製薬(株) 先端医学研究所 主任研究員

\*<sup>2</sup>Yutaka Suzuki 田辺製薬(株) 先端医学研究所 研究員

\*<sup>3</sup>Shinji Nito 田辺製薬(株) 先端医学研究所 所長

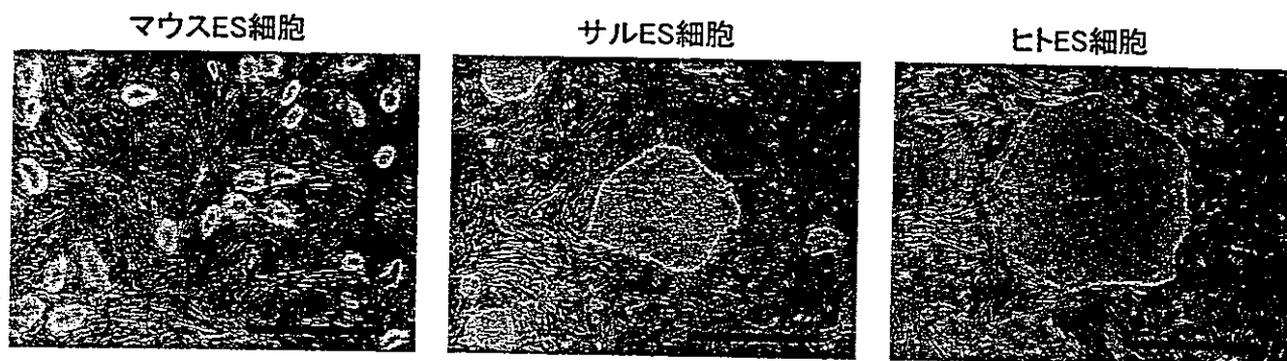


写真1 ES細胞コロニー形態の比較 (カラー写真参照)  
(Scale Bar は 1 mm)

表1 ヒトES細胞株の樹立機関と所有細胞株数

樹立機関	細胞株数
Wisconsin Alumni Research Foundation (米国ウィスコンシン州 Madison)	5
California 大学 (米国カリフォルニア州 San Francisco)	2
CyThera 社 (米国カリフォルニア州 San Diego)	9
Geron Corporation (米国カリフォルニア州 Menlo Park)	7
BresaGen 社 (豪州・米国支店はジョージア州 Athenes)	4
ES Cell Internatinal 社 (豪州 Melbourne)	6
Technion-Israel Institute of Technology (イスラエル Haifa)	4
Reliance Life Sciences (インド Mumbai)	7
Pochon CHA University (韓国 Seoul)	2
Maria Biotech 社 (韓国 Seoul)	3
Seoul National University (韓国 Seoul)	1
Cellartis 社 (スウェーデン Goteborg)	3
Karolinska Institute (スウェーデン Stockholm)	6
Goteborg 大学 (スウェーデン Goteborg)	16

米国 NIH の資料より

た ES 細胞の細胞表面マーカーである SSEA (stage specific embryonic antigen) や TRA-1 (tumor rejection antigen-1) 等の発現パターンも、ヒトとマウスでは異なっている。これらの差異は、ヒトとマウスでは胚体組織や胚体外組織の構造など、胚発生の過程で異なる面があることに起因するのかもしれない。筆者らはカニクイザル ES 細胞の樹立に成功しているが<sup>9)</sup>、サルの ES 細胞は、形態、培養条件、マーカー分子の発現パターンなど、ヒト ES 細胞のものとはほぼ一致している。

ヒト ES 細胞に関する各国の考え方は、その作製を認めていないドイツのような国から、ヒトのクローン胚研究までもを認めるイギリスまでさ

まざまである。NIH (National Institutes of Health; アメリカ) が公表した資料によると、アメリカ、オーストラリア、スウェーデン、インド、イスラエル、韓国の 6 か国・14 機関の企業や大学で分離された 75 株のヒト ES 細胞がリストされている (表 1)。アメリカではヒト胚作製や、ヒト胚を破壊、廃棄し、故意に傷つけ、または死に至らしめる研究に対して連邦資金を支出することを禁じており、ヒト ES 細胞の樹立やクローン技術による胚の作製も禁止の対象に含まれている。実際にトムソンらは公的資金には頼らず、米ジェロン社が提供した民間資金を利用して ES 細胞の樹立に成功しており、これをきっかけにアメ

リカではヒト胚研究をめぐる論議が再燃した。

2001年8月9日、ジョージ・ブッシュ大統領はNIH「ヒト多能性幹細胞を使用する研究に関するNIHガイドライン (National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells)」が初めてヒトES細胞研究に助成金を提供することを発表した。ただし、対象となる研究は8月9日以前に作られた受精卵由来の細胞株を使用するものに限定された。ヒトES細胞を樹立することと、すでに樹立されているヒトES細胞を利用して研究することを区別し、樹立されているヒトES細胞の研究利用のみ連邦政府の研究助成を認めるかたちとなっている。従って、NIHにリストされているヒトES細胞株は、すべて2001年8月までに樹立されたものである。最近でもハーバード大学が民間資金により17種類のヒトES細胞を作ること成功したという報道があり、わが国(京都大学)で樹立された3株など、それ以降に世界で樹立された細胞株を考慮に入れると、すでにかかなりの数のヒトES細胞株が存在するようである。

### 3. わが国の状況

わが国では、2001年9月に文部科学省から「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」が

公布・施行された。この指針の策定は、内閣総理大臣の諮問機関である科学技術会議生命倫理委員会と1999年に発足した同ヒト胚小委員会によってまとめられた「ヒト胚性幹細胞を中心としたヒト胚研究に関する基本的考え方」(2000年3月)に従い、パブリック・コメントを経て指針案が作成され、総合科学技術会議およびその下に設置されている生命倫理専門調査会における検討を踏まえたものである。これによって、不妊治療の過程で余剰となったヒト初期胚(凍結胚)のうち夫婦から研究利用へ無償による提供についての同意が得られた場合に限ってのみES細胞を樹立することが認められることになった。すでに樹立されているヒトES細胞を使用する研究だけでなく、樹立研究そのものを認めるという点においては、NIHガイドラインとは異なっている。

指針では、ヒトES細胞の使用に関して、研究目的は当面医療の発展等につながる基礎研究に限定し、個体産生は勿論のことES細胞から再生した組織や細胞を人体へ移植するなどの研究は認められていない。併せて、医療に用いるための医薬品の製造や、医薬品の安全性試験等に用いるためのヒトES細胞の大量供給など医療関連分野への使用も現時点では行わないこととしている。

研究の実施開始の手続きや進め方にも厳しい基

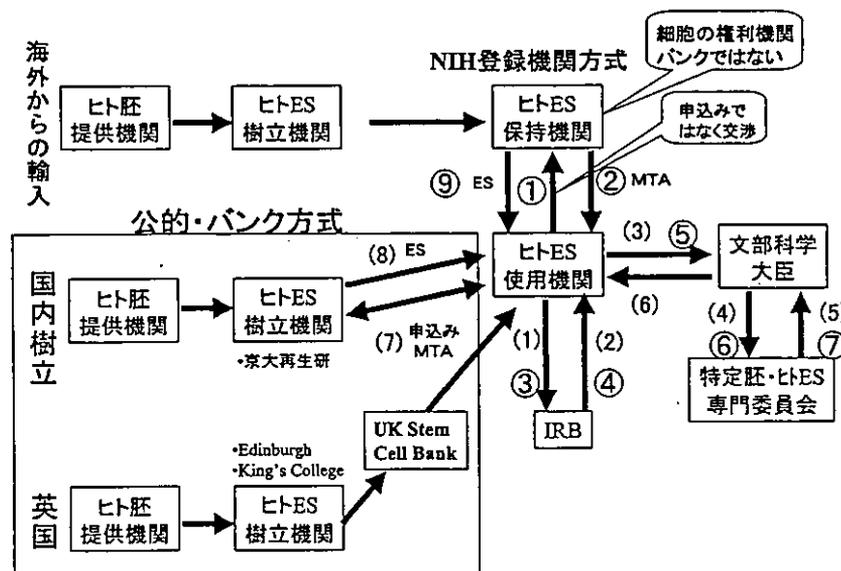


図1 ヒトES細胞使用までの手続き

表2 大臣確認されたヒトES細胞の使用計画

使用計画	使用機関	大臣確認日	細胞の由来
血管発生・分化機構の解析と血管再生への応用	京都大学	2002年 4月	Monash 大
血管発生・分化機構の解析と血管再生への応用	田辺製薬	2002年 6月	Monash 大
中枢神経系の再生医学の基礎的研究	慶応義塾大学	2002年 6月	Monash 大, WiCell
造血細胞への分化誘導法の開発	東大医科研	2002年 12月	WiCell
ES細胞由来造血幹細胞による造血の再生	東京大学	2002年 12月	WiCell
維持と分化に関する研究	信州大学	2002年 12月	WiCell
血液細胞の分化誘導系の確立	岐阜大学	2003年 4月	Monash 大
心筋細胞の再生医学の研究	岐阜大学	2004年 8月	Monash 大
パーキンソン病モデルサルにおける移植効果及び安全性評価	田辺製薬	2004年 3月	Cellartis
パーキンソン病モデルサルにおける移植効果及び安全性評価	自治医科大学	2004年 3月	Cellartis
神経細胞, 感覚系細胞への分化誘導	理化学研究所	2004年 3月	京大再生研
脂肪細胞, 中胚葉系幹細胞への分化誘導	理化学研究所	2004年 3月	京大再生研
ヒトES細胞の維持培養を可能にするシグナル因子の研究	理化学研究所	2004年 3月	京大再生研
安全かつ簡便な新規培養技術の開発研究	京大再生研	2004年 7月	京大再生研
遺伝子導入法の開発と遺伝子改変技術の確立	京大再生研	2004年 7月	京大再生研

準が設けられ、受精卵の提供やES細胞の作製・利用にかかわるすべての機関に倫理審査委員会の設置を義務づけ、個別の研究について研究の妥当性を綿密に作成された計画をもとに研究機関内倫理審査委員会と国の二重の審議を受けることが決められている(図1)。研究成果は原則として公開、指針に反した場合、研究機関名や内容などが公表されることになっている。

この指針を受けて、文部科学省は2002年4月、京都大学が申請していたヒトES細胞の樹立計画を承認したのに続き、同大学が申請していたヒトES細胞から血管の内皮細胞や壁細胞に分化できる細胞を取り出し血管を再生させる使用研究を承認した。今までに文部科学大臣の確認が得られている使用計画は15件で、内10件は、アメリカ、オーストラリア、スウェーデンなどから輸入された細胞を用いるものである(表2)。国内で唯一ヒトES細胞の樹立計画の政府の承認が得られている京都大学再生医科学研究所では、2003年3株の樹立に成功し、2004年3月より分配を始めた。すでに5件の国産ヒトES細胞を用いた研究が進められており、国産ヒトES細胞を用いた研究は今後一層盛んに行われるようになるものと思われる。使用計画の研究対象は、神経系に関する

ものが4件と一番多く、血液(3件)、血管(3件)、心筋(1件)などの研究がつづいている。指針は施行から3年が経過し、現在、特定胚およびヒトES細胞研究専門委員会によって指針の見直し作業が行われている。

#### 4. 医療への応用

受精卵では完全な条件を備えた子宮という理想的な“培養器”の中で、細胞の増殖と分化が統制されて進み、三次元的な形態形成が行われる。ES細胞では分化増殖を試験管内で行う場合、三次元的形態形成のメカニズムが未解明な上、分化誘導に関わる諸条件が完全にはわかっていないため、細胞から直接立体的な組織を作ることはできない。また肝臓や腎臓などほとんどの臓器は複数の種類の細胞から出来上がっており、これらを再構成させることや、臓器に血管を導入することは非常に難しく、今後さまざまな検討が必要である。

臓器そのものを作ることは無理でも、ES細胞から生体と同じ機能を持った細胞を作ったり、作った細胞を病気の治療に活用することは可能である。ヒトの体は多種類の細胞からできているが、病気の中には特定の細胞の変性や機能不全で引き起こされるものも多い。例えば、脳の一部の神経細胞

が変性脱落してしまうためにおこるパーキンソン病や、脊髄の中の神経線維が事故などで断ち切られた脊髄損傷、心臓の心筋細胞の壊死を引き起こす心筋梗塞、膵β細胞の機能低下に基づく糖尿病などである。これらの患者に正常細胞を移植することにより病気を治そうとするのが細胞移植（補充）療法である。ES細胞から作り出した神経細胞をパーキンソン病患者や脊髄損傷患者に移植したり、インシュリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島細胞を作り出して糖尿病患者の治療に利用するといったことも現実的に臨床応用を視野に入れ想定されている。

米ジェロン社は、ヒトのES細胞から作ったオリゴデンドロサイトを脊髄損傷の患者に移植して治療する臨床試験を2005年より始める計画を明らかにしている。同社ではすでに8種類の細胞をヒトES細胞から作り出すのに成功し、このうち神経細胞（パーキンソン病）、心筋細胞（心疾患）、骨細胞（骨粗鬆）、β細胞（糖尿病）、軟骨細胞（骨関節炎）、血液細胞（血液疾患）の6種類は動物実験での効果を確認中という。

## 5. 臨床応用への課題

ヒトES細胞を再生医療に臨床応用する場合の課題は何であろうか？

移植医療で最も重要な問題となるのは、ヒトES細胞の分化によって生じた細胞に対して起きる可能性のある免疫拒絶反応である。脳内への移植など一部の例を除いて一般的には重要な課題になる。その解決策としては、主要組織抗原複合体（MHC）遺伝子の一部を破壊したES細胞株の作製や、さまざまなMHCのタイプの受精卵からES細胞を分離して集めるES細胞バンク構想が考えられる。これらは免疫拒絶反応を完全に抑えることは不可能としても、免疫抑制剤と共用することによっての対処が可能になるであろう。

この他究極の拒絶反応回避技術として、患者の体細胞（たとえば皮膚細胞）の核を除核した受精卵に移植して、受精卵と同じように発生させたクローン胚からES細胞を作り出す方法が考えられ

ている。クローン羊ドリーを作り出した体細胞核移植技術（クローン技術）の応用である。ウシでは体細胞の核を別のウシの除核未受精卵に移植してクローン胚をつくり、それをもとに心筋細胞や腎臓の細胞などを作った後、これらを体細胞を取り出した元のウシに移植した場合、拒絶反応が起こらないことが確認されている<sup>7)</sup>。また、マウスではすでに核移植卵からES細胞の作製に成功しており、作製されたES細胞が正常発生する能力をもつことが示されている<sup>8)</sup>。

ヒトクローン胚研究は、2001年、米国アドバンスト・セル・テクノロジー社が行ったのが最初の報告で、作製したクローン胚は6細胞期の段階で止まっており、ES細胞樹立のために必要な胚盤胞期胚まで発生が進まなかった。しかし彼らは、第2減数分裂を終えた未受精卵をサイトカラシンB処理とカルシウムイオノフォアを用いて単為発生させることにより、胚盤胞まで発生が進むことが明らかにしている<sup>9)</sup>。2004年2月には、韓国ソウル大学などの研究チームが、ヒトクローン胚からヒトES細胞を作製することに成功した<sup>10)</sup>。彼らは同意を得た16人の女性から242個の卵母細胞の提供を受け、このうち176個の卵母細胞の核を取り除いて卵母細胞と同じ人の体細胞を移植し、クローン胚を作製した。このうち30個が子宮に着床できる胚盤胞期胚と呼ばれる段階まで分裂が進み、さらにその中の20個の胚盤胞期胚から最終的に1株のES細胞を作製することに成功している。

ヒトクローン胚の作製は、韓国では2003年末にクローン人間づくりを禁止する生命倫理法が成立したものの、医療研究目的に限ってヒトクローン胚の作製が認められている。ドイツではヒトクローン胚の作製は禁止、アメリカでも政府予算を使った研究は禁止されている一方、今まで全面禁止していたフランス議会が2004年7月、ヒトクローン胚の研究を5年間の期間限定で容認する生命倫理法を採択した。わが国でもヒトクローン胚研究については、それまで「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律（2001年6月施行）

に基づく「特定胚の取り扱いに関する指針」によって禁じられていたが、2004年7月政府の総合科学技術会議は、再生医療などへの応用が期待されるヒトクローン胚について、基礎研究の解禁を決定した。イギリス政府は2004年8月に国立ニューキャッスル大学が申請していた人のクローン胚からES細胞を作る研究を承認したと発表した。イギリスは2001年に世界で初めて人のクローン胚を作成する研究を容認していたが、許可を与えたのはこれが初めてである。このようにヒトクローン研究はソウル大学の成功以降、世界的に大きく動き出した感はあるが、成功率はまだ低く、研究には多くのヒト卵子を必要とすることや、胚を新規に作製することの懸念等、問題点は多い。

再生医療を現実のものとするためには、免疫拒絶問題以外にも、ヒトES細胞を思い通りに目的の細胞へ導くための方法が確立されなければならない。また、目的とする特定細胞だけを確実に分離する技術も重要となる。仮にES細胞が混じっていたりすると移植後の体内で奇形腫を形成したり、思わぬ細胞を作り出してしまう恐れがあるからである。また現状では、ヒトES細胞の培養にフィーダーとしてマウス胎児由来線維芽細胞が使用されていたり、培養液としてウシ血清が使用されていたりするケースがあるが、異種タンパク質や未知ウイルスの混入等を避ける意味でも、こうした動物製剤を使用しなくても行える培養系技術の開発といったことも安全性を確保する観点から必要な課題と考えられる。

さらに、ES細胞の実際の臨床応用を考えたときには、どの段階まで分化した細胞を患者の体内のどこにどれだけ移植すれば効果があるかや、どのような副作用があるかなど、有効性や安全性を検討する前臨床的試験が不可欠となる。通常このような場合、モデル動物を利用することになるが、ES細胞やモデル動物がマウスのものであったりした場合には、実験結果がヒトを十分反映しないこともしばしば指摘されており、このような場合、ヒトに近縁なサルおよびサルES細胞を用いた前臨床的検討が有用となる。サルのES細胞株は、

Thomsonらの研究グループ以外には、オレゴン大学のWolfらが樹立したアカゲザルES細胞株<sup>10</sup>と筆者らの樹立したカニクイザルES細胞<sup>9</sup>の数株が報告されているのみであり、ヒトES細胞に比べるとサルES細胞を用いた研究報告例も少ない。しかし、サルES細胞のモデルサルへの移植は、同種間移植の評価系として、ヒトES細胞の臨床応用に貴重な情報をもたらすものと思われる。

## 6. ヒトES細胞研究のその他の用途

ここで、ヒトES細胞の利用について再生医療以外の用途についても少しだけ言及してみたい。

### (1) 発生・分化機構や疾患原因解明のための基礎的研究

いうまでもなくヒトES細胞は、発生・分化の分子機構を解明する研究において直接的な情報を提供してくれる。ヒトの発生初期の未解明の現象が原因で新生児の先天性欠損や自然流産につながる胎盤異常が起きると考えられているが、ヒトES細胞を試験管内で研究することで、このような問題を引き起こす遺伝子・分子および細胞現象を解明し、これを防止する方法を見つけ出すことができるかもしれない。また、発生初期の染色体異常が及ぼす影響の解明にも利用できる。初期小児癌の多くが胎生期に原因があるとされているが、ES細胞の研究によりこの癌の発生過程を追跡するような研究も可能である。

### (2) 創薬研究への活用

ヒトES細胞の分化によって得られる各種機能細胞を創薬研究開発に活用することも極めて実現性の高い利用法と考えられる。現状の創薬研究では、臨床試験に先立って、その有効性や安全性を評価する目的で、動物に薬剤を投与することによる生体内試験や、動物細胞を使用する生体外（試験管内）試験など数多くの前臨床試験が行われている。しかし、動物やその細胞を用いた試験では、ヒトの細胞に与える影響を予測することが困難な場合もある。ヒトES細胞に由来する機能細胞は真にヒト細胞そのものであり、生体内の細胞とよく似た反応を示す可能性が高く、薬効・薬理作用

や毒性など薬剤開発の評価系として、より安全で安価なモデルを提供できるようになるものと考えられている。

### (3) 遺伝子工学上の新技術の開発

マウス ES 細胞ではすでに行われてきたことではあるが、ヒト ES 細胞において試験管内で遺伝子改変や遺伝子導入（特定の遺伝子発現やタンパク質発現）を行うことができるようになれば、生命科学の進展において有益な情報を提供し、遺伝子治療法をはじめとして医療に多大な貢献をもたらすであろう。

## 7. おわりに

ヒト ES 細胞は再生医療への応用のみならず、疾病原因の解明、創薬開発への利用等において多大な可能性を有することは確実と考えられるが、ヒト ES 細胞の研究はまだ緒についたばかりといっても過言ではなく、現状では重要な技術的課題が多く残されている。再生医療の実現に向けては発生生物学、分子生物学以外にも、遺伝子工学、組織工学などの幅広い分野における研究が併せて進められる必要がある。

また、ヒト ES 細胞は、生命の萌芽としてのヒト初期胚に人為的操作を加えることによって初めて得られるものであることから、生命倫理という観点でも大きな課題を有している。ヒト胚ならびにヒト ES 細胞に対する考え方は個々人の生命観により様々であり、あらゆる立場の人の意見を束ねることは難しいかもしれない。しかしながら、

それを研究に使用すること自体が倫理的な観点から極めて慎重に行うべき行為であることについては論を待たないであろう。研究者は研究を推進するにあたり、常に社会の声に耳を傾けながら、どのような研究を何の目的で行っているのかを社会に情報発信し、それについて社会全体が議論を重ねることが、再生医療を実現し、その恩恵を受けるために必要なことではないだろうか。

## 文 献

- 1) M. J. Evans *et al.*, *Nature*, 292, 154 (1981)
- 2) G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 7634 (1981)
- 3) J. A. Thomson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 7844 (1995)
- 4) J. A. Thomson *et al.*, *Biol. Reprod.*, 55, 254 (1996)
- 5) H. Suemori *et al.*, *Develop. Dynamics*, 222, 273 (2001)
- 6) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, 282, 1145 (1998)
- 7) R. P. Lanza *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 20, 665 (2002)
- 8) T. Wakayama *et al.*, *Science*, 292, 740 (2001)
- 9) J. B. Cibbeli *et al.*, *J. Regenerative Med.*, 2, 25 (2001)
- 10) W. S. Hwang *et al.*, *Science*, 303, 1669 (2004)
- 11) K. Y. Pau & D. P. Wolf, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2, 41 (2004)