

霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発

所属 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部
研究者 湯尾 明

研究要旨 霊長類ES細胞の未分化維持培養に適したヒト由来フィーダー細胞を確立する目的で、カニクイザルES細胞を利用して、比較的入手の容易な数種のヒト由来株化細胞について試験した。その結果、ヒト新生児表皮線維芽細胞(NHDF-Neo)、ヒト成人表皮線維芽細胞(NHDF-Ad)、ヒト胎児肺線維芽細胞(TIG-3)において、従来使用されているマウス胎仔由来のフィーダー細胞と同等あるいはそれ以上のフィーダー能が得られた。また、カニクイザルES細胞からの血液細胞産生を目指した研究においては、無フィーダーで胚様体を用いずに、さらに、特異の分画をFACS等で濃縮するという操作(ソーティング)も行わずに、単層培養という観察しやすい視野の中胚葉系と思われる方向への分化誘導に成功した。OP9細胞培養上清と6種類のサイトカインの中で数日間培養すると、均一な指様の形態を有する増殖能の高い細胞(CD34、c-kit、CD133、Flk-1陽性で、VEカドヘリン陰性)が出現して、その後次第に球形の細胞が多数を占めるに至った。この球形の細胞はCD45陽性、CD34陽性のコロニー形成能の高い未分化血液細胞で、MS5培養上存在下で活性酸素産生能陽性の単球・マクロファージに分化した。指様の細胞は大多数の血液細胞を回収した残りの少ない状態からでも再度増殖して、再度血液細胞を産生した。一方、異なる培養条件において指様の細胞は高純度の血管内皮細胞(VEカドヘリン陽性)にも分化した。この様に指様の細胞を介する我々の分化誘導系は高純度の血液細胞と血管内皮細胞を繰り返し産生できる優れた単層無フィーダー培養系であることが判明した。

分担研究者

(1) 田辺製薬(株) 先端医学研究所 近藤 靖

A. 研究目的

安全で高品質な血液成分を医療材料として安定して供給することは現代医療における重要な課題であり、人工的に血液細胞成分(特に好中球)を作成する技術の開発は国民の保健と福祉の向上につながる。

近年、胚性幹細胞(embryonic stem cell(ES細胞))はその無限増殖能と多能性分化能とから再生医療における有望な材料と期待されている。すでにマウスES細胞から試験管内で成体組織の作成が報告され、昨今は、霊長類ES細胞の研究が注目されている。しかし、再生医療への応用のためには、異種動物細胞(マウス由来フィーダー細胞)の混入を回避する方策が急務である。即ち、霊長類ES細胞の研究に際しては「霊長類のフィーダー細胞」を用いるか、もしくは、「フィーダーを用いない培養システム」を確立することが最重要課題である。フィーダーを用いない培養系としては、胚様体を用いる方法もあるが、この方法では分化の方向性が制御できずに、種々

の系列の細胞が出来てしまう。また、立体構造を形成してしまうので、内部においてどのような分化が進んでいるかを直視下に観察することは困難である。

さらに、未分化維持のためにはマウスでは有効なleukemia inhibitory factor(LIF)も、霊長類では無効である。

本研究では、カニクイザルES細胞を用いて、無フィーダーもしくは霊長類フィーダー存在下で、未分化維持と血液細胞(好中球や造血幹細胞)分化の培養法を確立することを目指す。

B. 研究方法

未分化維持培養を霊長類のフィーダー細胞で行う研究においては、ヒト新生児表皮線維芽細胞(NHDF-Neo)や、ヒト成人表皮線維芽細胞(NHDF-Ad)、株化したヒト胎児肺線維芽細胞(TIG-3)を大量培養後、定法に従ってマイトマイシンCで処理しフィーダー細胞を作成した。これらのフィーダー細胞上でカニクイザルES細胞を連続して3から4継代培養し、得られる細胞数をマウスフィーダー細胞上で培養されたものと比較した。

血液細胞系列への分化実験においては、未分化

サル ES 細胞は通常的手法 (MMC 処理した MEF との共培養) にて維持した。中胚葉系ならびに hemangioblasts、未分化血液細胞、血管内皮細胞への分化においては、6 種類のサイトカイン (VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-ligand, IL-3, IL-6) と OP9 細胞の培養上清を用いた。OP9 細胞は、放射線照射した後に培養上清を回収した。未分化血液細胞から白血球への分化においては、MS5 細胞の培養上清と G-CSF を用いた。細胞表面抗原の同定は、FACS もしくは免疫染色を行い、白血球機能は活性酸素産生能 (NBT 還元能) を測定した。未分化血液細胞の増殖能に関しては、コロニーアッセイも行った。

C. 研究結果

未分化維持培養を霊長類のフィーダー細胞で行う研究においては、いずれのヒト由来フィーダー細胞 (ヒト新生児表皮線維芽細胞 (NHDF-Neo) や、ヒト成人表皮線維芽細胞 (NHDF-Ad)、株化したヒト胎児肺線維芽細胞 (TIG-3)) においてもマウスのフィーダー細胞と同等か、もしくはそれ以上の細胞数が得られた。また TIG-3 においては 40 PDL 以上でもフィーダーとしての能力が認められ、1 種類のヒト正常細胞株から継続的に霊長類 ES 細胞用フィーダー細胞を作成することが可能であることが明らかとなった。

血液細胞系列への分化実験においては、カニクイザル未分化 ES 細胞を放射線照射した OP9 細胞の培養上清中で 6 種類のサイトカイン

(VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-ligand, IL-3, IL-6) 存在下に培養すると、培養開始後数日で「指」のような形状を有する細胞へと極めて均一に分化した。フィーダー細胞との共培養ではなく「指様」細胞のみの単層培養となり、形態観察などは極めて容易であった。この指様の細胞を、同じ条件でさらに 1、2 週間培養すると大部分の細胞が球状の細胞へと変化した。この球状の細胞は、CD45、CD34 が何れも高率 (60-80%) で陽性で、未分化血液細胞で有ると考えられた。このような未分化血液細胞は、造血因子存在下にてコロニーアッセイを行うと、極めて高効率にコロニーを形成し、2 次コロニーの形成も認められた。

この未分化血液細胞を、MS5 の培養上清でさらに 2 週間培養すると、単球様の形態を有し、CD14 抗原陽性で、NBT 還元能陽性の細胞が出現し、単球・マクロファージ系への分化が誘導されたと考えられた。

指様の細胞は、ある種の条件で異なる培養皿に移すと、指様の細胞とも球状の血液細胞とも異なる敷石上の細胞に均一に変化し、それらの細胞は CD34、CD45 何れも陰性で、VE カドヘリ

ンと PECAM-1 が陽性で、血管内皮細胞と考えられた。さらに、この細胞は cord formation 陽性であることから血管内皮細胞で有ることが確認された。

以上より、指様の細胞は血液細胞と血管内皮細胞の両方に分化したことから中胚葉系の細胞、もしくは hemangioblasts と考えられたが、表面抗原は、CD34、c-kit、CD133、Flk-1 が陽性で、VE カドヘリン陰性であった。

このような指様の細胞の増殖能は高く、大多数の細胞が血液細胞となった時点で浮遊している血液細胞を回収して、培養皿の表面にわずかに指様の細胞が残る状態から、再度活発に増殖して培養皿いっぱいになり、再び球状の血液細胞を大量に産生した。

D. 考察

マウスの胎仔の代わりにヒト胎児の線維芽細胞、成人輸卵管上皮細胞や、ヒト新生児の包皮由来線維芽細胞、成人表皮線維芽細胞、ヒト骨髓細胞をフィーダー細胞として利用する方法が報告されている。しかし、これらのほとんどは初代細胞を利用するものであり、ES 細胞を大量に得るためには複数のドナー由来の材料が必要となるため、ドナー毎に感染源のチェックが必要となり手間がかかる。今回、入手が容易な複数のヒト由来株化細胞が、高いフィーダー能を有するとともに、安定的に増殖できることを明らかにした。これら細胞を使用することにより、人畜共通感染症等のおそれが少ない ES 細胞を提供することができるものと思われる。

今回の研究においては、霊長類の ES 細胞から、胚様体もフィーダー細胞も用いずに、また、特異の分画を FACS 等で濃縮するという操作 (ソーティング) も行わずに、単層培養という観察しやすい視野での中胚葉系と思われる方向への分化誘導に成功した。しかも、分化誘導された血液細胞や血管内皮細胞の純度は、これまでの報告よりもはるかに高く、極めて効率の高い分化培養系であると考えられる。

分化誘導された血液細胞に関しては、CD34 陽性で有ることから極めて未熟な細胞と考えられ、コロニーアッセイの結果からは増殖能の高い細胞と考えられた。これを造血幹細胞と言えるかどうかは不明であるが、もしそれに近いものとする、成人の体内の造血幹細胞よりも増殖能の高い細胞であることは明らかである。造血幹細胞を増幅することが困難であることを考えると、この現象の持つ意義は大きいものと考えられる。

その成熟血球への分化能に関しては、培養条件を変えることによって活性酸素産生能陽性の単球

・マクロファージ系の細胞が誘導された。今後は、同じ食細胞系の白血球である「好中球」の産生を目指して、更に培養条件の検討が必要である。

指様の細胞に関しては、形態は均一であるが表面抗原からは均一な集団ではなく、今後一層の研究が必要である。この細胞から血液細胞と血管内皮細胞が誘導されることから、中胚葉系の細胞、おそらくは hemangioblasts というべき様な細胞と想定されるが、いわゆるマウスにおける hematogenic endothelium (VE カドヘリン陽性) とは異なる。いずれにしても、この細胞の高度の増殖能によって繰り返し血液細胞が得られることは特記すべきことである。

E. 結論

ヒト由来の数種の株化細胞が、マウス胎仔由来のフィーダー細胞と同等あるいはそれ以上のフィーダー能 (カニクイザル ES 細胞を未分化な状態で維持する能力) を有することが明らかとなった。一方、血液細胞の分化培養においては、フィーダー細胞、胚様体、ソーティングを用いない単層の血液細胞血管内皮細胞分化培養法を開発した。しかも、得られる血液細胞も血管内皮細胞も極めて高純度で、増殖能も高く、効率の高い手法である。分化の中間段階において、血液細胞にも血管内皮細胞にもなりうる前駆細胞 (指様の形態を有する増殖能の高い細胞) をへている培養系で、この細胞のさらなる研究が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, Yuo A, Suzuki H, Mizutani S: Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocytic differentiation. Mol Cell Biol 24: 8236-8243, 2004.
2. Nakatsu M, Doshi M, Saeki K, Yuo A: Synergistic effects of dehydroepiandrosterone and retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic NB4 cells. Int J Hematol 81: 32-38, 2005.
3. Kondo Y, Suzuki Y, Nito S.: Human embryonic stem cells. Bio Industry 22: 10-16, 2005.
4. 湯尾 明 : ATRA による顆粒球のアポトーシスの分子機構。臨床免疫 41:148-152,2004.
5. 湯尾 明 : NF- κ B 依存性リンパ球活性化におけるパラカスパーゼの役割。BIO clinica 19: 1027-1031, 2004.

6. 湯尾 明 : ATRA とアポトーシス。Medical Technology 33: 127-128, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし