

ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す 有効性、安全性の検証システムの確立

所属 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部
研究者 梅澤 明弘

研究要旨 間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担う。本研究では、間葉系細胞培養システムを用いて、月経血、臍帯血、末梢血由来の間葉系細胞を単離し、増殖させ、細胞移植の供給源とする細胞提供システムを速やかに構築することを目指す。

分担研究者

- (1) 国立成育医療センター研究所 梅澤明弘
- (2) 東京医科大学医学部 黒田雅彦
- (3) サミット・グライコリサーチ株式会社 安達俊幸
- (4) 徳島大学ゲノム機能研究センター 原英二
- (5) 株式会社ピオドック 小杉 好紀
- (6) 株式会社TMセルリサーチ 石橋 卓也
- (7) 中外製薬株式会社 牧島 房夫
- (8) 大塚製薬株式会社 澁谷 功

A. 研究目的

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞、胎児由来細胞、組織幹細胞があげられる。胚性幹細胞は、将来的に期待されているものの、臨床応用を開始するまでは時間がかかると予想される。胎児由来の細胞はパーキンソン病に効果があることが示されたが、ヒト中絶胎児を供給源とすることが許容される可能性は高くない。組織幹細胞は目的の細胞に分化させることは容易であり、最も注目をあびている。特に、骨髄由来細胞は、虚血四肢に用いられ効果が示され、臨床応用が拡大している。間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担い、骨髄細胞と共に細胞治療における事実上の標準となっている。本研究では、骨髄由来間葉系細胞の寿命延長を可能とした「ストレスのない培地」の開発経験に基づき、月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞を増殖させ、先天性代謝疾患を含めた遺伝病および細胞治療が有効とされる疾病に対する新たな細胞治療法の開発を目的とする。また、ヒト間

葉系細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、免疫不全化した疾病モデル動物に対する治療効果を詳細に明らかにすることも目的とする。

B. 研究方法

1. 月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系幹細胞に関する培養システムの確立

月経血、臍帯血、骨髄よりヒト間葉系幹細胞を得ると同時に、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法を開発する。フィーダー細胞について、最適の細胞を同定しその培養法についての情報を整備する。

2. 細胞に関する規格化

得られたヒト間葉系細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix 社 GeneChip による解析) 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う。モノクローナル抗体は、ヒト幹細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/-4、STRO-1 である。

3. 細胞を用いた治療基盤の確立

ここでは、ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行う。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。

4. ヒト間葉系細胞に対する新たなモノクローナル抗体作成

ヒト間葉系細胞を免疫することによる新規

分子探索も開始する。

5. ヒト細胞を移植することによる有効性の検証

細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定する。ヒト骨髄間質細胞のラベルならびに通常の病理学的評価に耐えられるマーカーの同定を行う。マーカーはクラゲ由来の蛍光色素 (Green fluorescent protein)、 β -ガラクトシダーゼ、Y 染色体、BrdU を候補に考えている。しかし、発現が低くとも検出感度が高いものであり、毒性を鑑み、病理検査に耐えられるものあれば検討対象とする。

6. 間葉系細胞の心筋への分化と生体内の心拍動に関する検討

試験管内でシンクロナイゼーションを示す分化した心筋細胞を、心臓に移植し生体内での同期を明らかにする。

7. 間葉系細胞の骨への分化と生体内における足場の開発

試験管内で分化させた子宮内膜、臍帯血、末梢血、骨髄由来のヒト間葉系細胞細胞を、免疫不全動物の骨欠損部に移植し生体内での機能を明らかにすることを本年度の目標とする。骨芽細胞に分化し基質を産生する子宮内膜、臍帯血、末梢血、骨髄由来のヒト間葉系細胞を、免疫不全マウスの骨欠損部に移植した。

8. 先天性代謝疾患に対する、ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化の検討

リゾゾーム蓄積症モデルマウス(ムコ多糖症 VII 型モデルマウス) に関する研究を行った。間葉系細胞株を用いて、リゾゾーム蓄積症の一つであるムコ多糖症 VII 型のモデルマウスに移植を行い、その治療効果を検討した。新生仔期の (ムコ多糖症 VII 型マウス) の脳室内に、間葉系幹細胞を移植することにより、その中枢神経症状が改善可能か否かを検討する。移植後は病理学的、生化学的に蓄積物質の減少の度合いを検討した。また蓄積物質の減少が認められた場合は中枢神経障害の神経機能的な改善も合わせて検討する。具体的には水迷路試験にて海馬依存性の記憶能の改善を検討した。すなわち移植を行ったマウス、行っていないムコ多糖症 VII 型マウス、ワイルドタイプのマウスに、

それぞれ継時的に水迷路試験を行い、その改善の度合い、および改善の持続時間を検討した。

9. 子宮内膜幹細胞を利用した子宮内膜症原因遺伝子の単離と治療への応用

細胞治療用ヒト月経血由来の間葉系細胞の調整と細胞表面マーカーの検討を行い、遺伝子発現プロファイリングを HRF 処理及び非処理の細胞にて gene chip (Affymetrix) を用いて行い、細胞の有する性格を詳細に検討した。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を検討した。さらに、抗アレルギー剤や、抗炎症薬の有効性を子宮内膜幹細胞をもちいることで検討した。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関する、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倫理委員会、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)。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・ウイ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「ヒト幹細胞プロジェクト推進会議」にて検討する。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った。

倫理的配慮の必要となる研究については、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し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行した。

C. 結果

1. 月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系幹細胞に関する培養システムの確立

本年度の最大の成果は、ヒト細胞取得に関する倫理的な手続きを明確にできたことと、実際にヒト細胞を培養することに成功したことである。その過程で、月経血、臍帯血、骨髄よりヒト間葉系幹細胞を得ると同時に、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法及びフィーダー細胞について、最適の細胞を同定しその培養法を確立し、細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。

2. 細胞に関する規格化

得られたヒト間葉系細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix 社 GeneChip による解析) 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. 細胞を用いた治療基盤の確立

ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行った。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能を検討中である。

4. ヒト細胞を移植することによる有効性の検証

細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。分化した骨格筋細胞、心筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞を、それぞれの組織に移植し、生体内での生着を明らかにした。ヒト骨髄間質細胞のラベルならびに通常病理学的評価に耐えられるマーカーの同定を行った。

5. 間葉系細胞の心筋への分化と生体内の心拍動に関する検討

マウス骨髄より CD34・CD117 陽性、CD45 陰性の細胞株 KUM2 を取得し、本細胞が心筋に対する分化能を有することを見出した。間葉系に対する分化能のみを有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞は CD90 陽性、CD34・CD45 陰性である。また同様のマウス骨髄間葉系幹細胞 (KUM9) は CD34・CD117・CD45 陰性である。これらの結果は、間葉系組織を誘導する幹細胞には階層構造が存在することを示している。また間葉系幹細胞は成体組織において、骨髄だけではなく骨格筋や真皮などの結合組織にも存

在することを示している。

心筋細胞が *in vitro* で大量に確保できるという状況が現れれば、それらの細胞を用いた細胞移植という方法論で、末期重症心不全の治療に用いることが可能であろう。In vivo において、胎児心筋細胞を用いて心臓への移植の可能性が証明されて以来、遺伝子を導入した細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、無処置の骨髄細胞などがドナー細胞として用いられてきた。また、胎児性幹細胞を用いた実験も報告されているが、倫理的問題を含んでいる。現在、ヒト胎児由来の間葉系細胞および間質由来の間葉系細胞の培養に成功し、転写因子を導入することで細胞移植の供給源として提供できるよう研究をすすめている。

6. 間葉系細胞の骨への分化と生体内における足場の開発

骨形成に関わるヒトの材料研究の開発は必要不可欠であり、マウスと同様の材料システムの確立を試みた。ヒト細胞数種類を移植し、生着させることに成功した。一方、骨分化誘導及び軟骨誘導を生体内で生じさせることはできなかった。

7. 先天性代謝疾患に対する、ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化の検討

リゾゾーム病のマウス疾病モデルを用いて、細胞移植を試みた。骨髄間質細胞に対して、欠損酵素である β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した後に脳室内に注入した。注入された細胞は脳室内から脳実質内に移動し、生着した。リゾゾーム病マウスの脳内酵素量は正常以上に回復した。この酵素量の上昇は、細胞注入後 8 週間持続した。それに伴い、蓄積した基質は正常値と同様の値を示した。一方、中枢神経症状、特に記憶能を水迷路試験を行うことで検討した。記憶能は有意に改善を示す一方、正常マウスの記憶能まで回復することはなかった。

8. 子宮内膜幹細胞を利用した子宮内膜症原因遺伝子の単離と治療への応用

DIF-1/HRF の子宮内膜症における標的因子の同定を試み、数種類の遺伝子候補を挙げることができた。用いた細胞は、月経血由来の培養細胞であり、その形態から間葉系細胞であることがうかがわれた。DIF-1/HRF により、発現量が大きく変動する遺伝子は数種類程度であり、その数は極めて少ない。DNA チップの精度から考えると誤差による可能性があり、半定量的な RT-PCR によりそれら

の遺伝子の変動を確定する必要がある。

D. 考察

骨髄間質細胞は、臨床において、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に移植が行われ始めている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。そのような状況の中で、近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、*in vivo*において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。本研究の成果によって、これらの間葉系細胞を用いた細胞治療の実現化に向けて、月経血、臍帯血、末梢血を供給源として示されたことは骨髄のみならず、他の組織を利用して細胞を得ることができることを意味している。また、本研究は骨髄間葉系細胞を用いた研究成果を生かす点でも極めて重要な意味をもち、政策医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題である。

E. 結論

月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞を増殖させ、先天性代謝疾患を含めた遺伝病および細胞治療が有効とされる疾病に対する新たな細胞治療法の開発に関する基盤的情報を得ることができ、それらについての情報を米国・欧州のデータベースに登録できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S., Makino, H., Matsumoto, H., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J-i, Umezawa, A.: Combination of hTERT and Bmi-1, E6 or E7 induce prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol*, in press, Correspondence to AU.

Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T.: Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, in press. Correspondence to AU.

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A.: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004

Umezawa, A.: Mesenchymal stem cells and epigenetics,

Brain & Development, 26: 417-418, 2004

Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Eto, Y.: Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Therapy*, 11(19):1475-1481, 2004

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press.

Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and 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*, 6(8): 833-845, 2004.

Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.: Photon-modulated changes of cell attachments on poly (spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes, *Biomacromolecules*, 5(5): 1770-1774, 2004.

Kato, Y., Imabayashi, H., Mori, M., Tani, T., Taniguchi, M., Umezawa, A., and Tsunoda, Y.: Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal: Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Biol Reprod*, 70: 415-418, 2004

梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療、昭和学会誌、64 (1) 2004

梅澤明弘、竹田征治：骨髄間質細胞の可塑性、実験医学、22 (1) :12-16、2004

梅澤明弘、五條理志：間葉系幹細胞の基礎と臨床、40(12), *Molecular Medicine*、2004

梅澤明弘：骨芽細胞から神経細胞への分化、再生医療、3(1):61-68、2004

高橋祐司、細井美彦、梅澤明弘、齊藤英和、入谷明：7 生殖補助技術の展望 クローン技術・卵細胞質移植と核置換、産婦人科の世界、56 増刊号、2004

梅澤明弘：細胞分離・幹細胞工学、「図解 再生医療工学」第3章 再生医療のキーテクノロジー 技

術編5、(株)工業調査会、2004

梅澤明弘：[6]再生医療とエピジネティクス エピジネティクス 佐々木裕之編 シュプリンガー・フェアラーク東京、229-234、2004

梅澤明弘：書評「絵で分かる 血液のはたらき」 医学のあゆみ、209 (2) 115、2004

梅澤明弘：第1部必要な基礎知識[9]遺伝子変異 病理と臨床臨時増刊号、22、47-53、2004

梅澤明弘：遺伝子変異、病理と臨床「病理診断における分子生物学」、22:47-53、2004

梅澤明弘：間葉系幹細胞を用いた細胞治療、7章再生治療モデル、「ヒト疾患モデルー難病の病態解明と診断・治療への応用」、秦順一編集、文光堂、2004年4月21日

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：骨再生・形状システムの構築ー生分解性ハイブリッドシートを用いて。 医学のあゆみ、209 (12) 964-967、2004

梅澤明弘：骨をつくるー細胞移植の基盤研究とバイオマテリアルによる臨床応用 医学の歩み、209(12) 929、2004

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：再生医療の現状と化学工学への期待 化学工学、68(8)414-417、2004

梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療 昭和医学会雑誌、第64 (1) 58-64、2004

梅澤明弘、竹田征二：単離間葉系幹細胞心筋細胞への分化 生体の科学、55 (4) 329-333、2004

梅澤明弘：骨髄間葉系幹細胞を用いた再生医療 顕微鏡、39 (2) 84-87、2004

梅澤明弘：精子形成に関わるエピジネティクス Hormone frontier in genecology 11(3)231-234、2004

梅澤明弘：骨髄間葉細胞の現状と展望 治療学、38(10):1056-1060、2004

小室一成、山下潤、桜田一洋、梅澤明弘：「座談会」細胞移植 細胞移植の現状と課題ー基礎から臨床へー 治療学 38(10):1133-1143、2004

2. 学会発表

梅澤明弘：「再生医学における間葉幹細胞研究の現状と展望」、福島県立医科大学特別講義、福島県、3月、2005

梅澤明弘：第4回日本再生医療学会総会、大阪府、3月、2005

梅澤明弘：間葉系幹細胞の分離と幹細胞可塑性を利用した臓器再構築、「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構」平成16年度第2回公開班会議、東京、2月24-25日、2005

梅澤明弘：「皮膚創傷治癒の癒痕形成を目指したヒト骨髄間葉系細胞の臨床応用」、再生医療の実現プロジェクト、東京都、2月、2005

梅澤明弘：「骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植」平成16年度研究成果等普及啓発事業基礎研究成果の臨床応用推進研究「トランスレーショナル研究成果発表会」、東京都、2月、2005

梅澤明弘：鳥取大学医学部遺伝子医療学セミナー、鳥取県、1月、2005

梅澤明弘：第50回日本病理学会秋期特別総会、愛知県、12月、2004

梅澤明弘：「骨髄幹細胞及び循環調節ペプチドを用いた心血管再生に関する多施設共同研究」国立循環器病センター研究所セミナー、大阪府、12月、2004

梅澤明弘：International Symposium on Cell Biology 2004、中華人民共和国・重慶、10月、2004

梅澤明弘：第8回日本歯科大学国際歯学研修会、東京都、10月、2004

梅澤明弘：第26回心筋生検研究会、千葉県、11月、2004

梅澤明弘：“Marrow stroma as a source of stem cell transplantation.” Third international symposium of stem cell, 中華人民共和国・瀋陽、9月、2004

梅澤明弘：自治医科大学21世紀COEプログラム、栃木県、9月、2004

梅澤明弘：「失われた骨の再生と高分子ゲル」ゲルワークショップイン浜名湖、高分子学会 高分子ゲル研究会、静岡県、8月、2004

梅澤明弘：「骨髄間葉系細胞による再生医療について

て]国立循環器病センター研究所セミナー、大阪府、
7月、2004

梅澤明弘：「体性幹細胞による再生医療」第8回循環
器学術講演会、岐阜県、7月、2004

梅澤明弘：「骨髄細胞と再生医療」第9回慶応義塾大
学形成外科同門会、東京都、7月、2004

梅澤明弘：平成16年度厚生科研「ヒトゲノム・再生
医療等研究事業」心筋細胞の開発に関する研究、千葉
県、7月、2004

梅澤明弘：“Multipotency of human mesenchymal
stem cells with the prolonged life span by bmi-1
as a source of cell therapy”.The 14th Lake
Shirakaba Conference entitled “International
Symposium on Epigenetics and Regenerative
Medicine” デンマーク王国コペンハーゲン、6月、
2004

梅澤明弘：「細胞治療の基礎」第13回日本癌病態治
療研究会、千葉県、6月、2004

梅澤明弘：第93回日本病理学会総会、北海道、6月、
2004

梅澤明弘：「骨髄に由来する間葉系幹細胞を利用す
る臨床研究」東京医科歯科大学第4回運動機器外科
学セミナー、東京都、6月、2004

梅澤明弘：「臓器再生に向けて」第11回日本臓器保
存生物医学会、広島県、5月、2004

梅澤明弘、清野透：間葉系幹細胞の分離と幹細胞可
塑性を利用した臓器再構築、「幹細胞の可塑性と未
分化性維持機構」平成16年度第1回公開班会議、4
月27-28日、東京都、2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし