

700500177 A

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
安全性確保に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺尾 恵 治

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

平成18年(2006)3月

目 次

I. 総括研究報告書（平成17年度）

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

班長 寺尾 恵治（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長）・・・ 1

II. 分担研究報告書

カニクイザル ES 細胞の未分化状態のマーカー遺伝子に関する研究

久和 茂（東京大学大学院農学生命科学 教授）・・・ 5

—遺伝子発現に関する検討—

山元 恵（国立水俣病総合研究センター 基礎研究部 生理室 室長）・・・ 7

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

下澤 律浩（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター研究員）・・・ 9

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

仁藤 新治（田辺製薬（株）先端医学研究所長）・・・ 13

ES 細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究

花園 豊（自治医科大学 分子病態治療研究センター 再生医学研究部 助教授）・・・ 16

霊長類 ES 細胞の移植で生じる病理変化

中村 紳一郎（社団法人予防衛生協会 主任研究員）・・・ 21

III. 研究成果の刊行物・・・ 24

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 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター長

研究要旨

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分化細胞の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標としている。今年度は品質管理技術開発グループと同種移植グループとで役割分担しつつ以下の研究を行った。

品質管理グループ

1) カニクイザル由来胚性幹（ES）細胞株 CMK6 における未分化マーカー遺伝子を検索し、新たに Caveolin1、CyclinA1 遺伝子が未分化 ES 細胞のマーカー遺伝子となりうることをリアルタイム RT-PCR 法で確認した。

2) 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、遺伝子発現の観点から ES 細胞の未分化能維持に関与すると考えられる新規候補遺伝子を計 4 種類選出することができた。

3) ES 細胞に高発現する 11 種のタンパク質について、由来の異なる 2 種類のカニクイザル ES 細胞の培養初期および継代期、初期分化期に相当する胚様体のそれぞれで、発現を比較解析した結果、ES 細胞のみに発現するタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種が確認された。

4) 神経幹細胞への分化誘導技術を改良し、Astrocyte Conditioned Medium (ACM) 中の液性因子により、ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞を、FGF-2 と EGF を添加した神経細胞用無血清培地中で接着培養することによって、分裂をさらに促進することを明らかにした。

同種移植グループ

1) ES 細胞を前造血細胞に分化させてからサル胎仔に移植すると、その造血系を一部再構築できたが（2-5%）、全例テラトーマをつくった。しかし、免疫不全マウスやヒツジ胎仔へ同じ細胞を移植しても腫瘍形成は比較的稀であることから、サル同種移植の系は安全性の厳密な評価に適していると判断した。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。

2) 免疫不全マウス、ヒツジおよび同種のカニクイザルで形成した奇形腫を病理学的に比較した。SCID マウス、ヒツジ胎仔およびカニクイザルに形成された奇形腫は、NOG マウスと GM1 投与の SCID マウスの奇形腫より小型であった。マウスでは充実性の多様な腫瘍組織、ヒツジでは充実性の多様な腫瘍組織に強い炎症反応を認めた。カニクイザルは多様な嚢胞に占められていた。

分担研究者

二藤 新治

田辺製薬先端医学研究所・所長

九和 茂

東京大学農学生命科学研究科・助教授

花園 豊

自治医科大学再生医療研究部・助教授

山元 恵

国立水俣病研究センター・室長

中村 紳一郎

予防衛生協会・主任研究員

下澤 律浩

医薬基盤研究所

霊長類センター・研究員

研究協力者

柴田 宏昭

医薬基盤研究所・特任研究員

田勢 直美

医薬基盤研究所・協力研究員

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、分化誘導技術、同種移植のリスク評価技術をヒトに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期間終了時に以下を達成することを短期目標とする。

1. サルES細胞からin vitroで効率的に神経系、血液系細胞に分化誘導する技術の開発。
2. 未分化ES細胞に特異的に発現しているタンパク質および遺伝子マーカーの検索と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と、精製した分化細胞の同種移植に伴うテラトーマ形成リスク評価法の開発

B. 研究方法

分担研究者により樹立されたカニクイザルのES細胞(CMK6、CMK6/G)と滋賀医科大学で樹立されたカニクイザルES細胞(CMSA3、CMSA-6)の3種のES細胞株について解析を行った。具体的培養方法、分化誘導方法、解析

方法については分担研究報告書に詳述する。同種移植の実験は独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターの交配方法で妊娠し、胎齢の明らかな胎児に移植した。

上記実験のうち個体レベルでの動物実験および個体からの材料採取については、独立行政法人医薬基盤研究所・動物実験委員会により審査・承認された後実施した。また、動物の取り扱いにあたっては、霊長類医科学研究センター諸内規、作業方式に従って動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果および考察

1) サルES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発：これまでに、サルES細胞から神経幹細胞を分化誘導する技術として、アストロサイトの条件培地(ACM)中での浮遊培養法を確立していた。今年度は効率的分化誘導法として、ACMにFGF-2とEGFを高濃度添加して浮遊培養を行なう技術を確立した。その結果、Neural Stem Sphere中の神経幹細胞の分裂が促進されることが判明した。

2) 未分化ES細胞の品質管理を目的としたマーカーの検索：

未分化ES細胞(CMK6)と胚様体から抽出したcDNAについて、リアルタイムRT-PCR法により遺伝子発現を定量的に解析した。その結果、Caveolin1、CyclinA1、Oct3/4は胚様体に比較して未分化ES細胞で高発現していることが明らかとなった。検索した他の遺伝子に関しては、未分化状態との関連性は見られなかった。

内分泌かく乱物質(BFA)を用いて、ES細胞の未分化能維持に関わる遺伝子を解析した結果、代表的遺伝子であるOct-3/4以外に、計4種類のES細胞の新規な未分化能維持関連候補遺伝子を選出することができた。

ES細胞の株間および継代維持による特性変化を指標とした品質管理技術の開発を目的として、由来の異なる2株のカニクイザルES細胞をSCIDマウスに移植した結果、テラトーマ形成能、形成されたテラトーマの性状に関して差異は認められなかった。未分化ES細胞と胚様体で発現タンパク質を比較した

結果、ES 細胞で特異的発現が確認できたタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種を同定した。

3) 同種移植の安全性評価：

未分化サル ES 細胞をサル胎仔の肝臓内に移植した (n = 3) 結果、全例にテラトーマ形成を認めた。次に、分化誘導培養 6 日目の前造血細胞をサル胎仔に移植したところ、移植した全例でテラトーマの形成を認めた。分化誘導培養 6 日目の前造血細胞から SSEA-4 陽性細胞を除去してサル胎仔に移植した結果、全例 (6 例) で、テラトーマの形成は認められず、かつ移植細胞からの造血細胞への分化を確認した。これらの結果から、in vitro 分化誘導では程度の差はあるが未分化な ES 細胞が残存し、テラトーマ形成のリスクが生じることが明らかになった。

異種のヒツジおよび免疫不全マウスと同種のカニクイザルで形成された霊長類 ES 細胞由来の奇形腫の病理学的性状を解析した。SCID マウス、ヒツジ胎仔およびカニクイザルに形成された奇形腫は、NOG マウスと GM1 投与の SCID マウスの奇形腫より小型であった。組織学的にマウスでは充実性の多様な腫瘍組織が見られ、ヒツジでは充実性の多様な腫瘍組織に強い炎症反応を認めた。カニクイザルは多形な嚢胞に占められていた。SCID マウスの移植で 3 ヶ月の奇形腫は、2 ヶ月より高分化だった。ES 細胞移植による宿主間の奇形腫形成の差異は ES 細胞の安全性評価に用いる宿主選択の重要性を示唆している。

E. 結論

1) 霊長類 ES 細胞の品質管理に適用可能な遺伝子マーカー、タンパク質マーカーを検索し、ES 細胞に特異的に発現している遺伝子として新たに Caveolin1、CyclinA1 遺伝子と 4 種の新規候補遺伝子を同定した。霊長類 ES 細胞に高発現するタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種が確認された。

2) 神経幹細胞への分化誘導技術を改良し、Astrocyte Conditioned Medium (ACM) 中の液性因子により、ES 細胞から分化誘導した神

経幹細胞を、FGF-2 と EGF を添加した神経細胞用無血清培地中で接着培養することによって、分裂をさらに促進することを明らかにした。

3) 分化誘導培養した霊長類 ES 細胞を胎児に同種移植すると全例にテラトーマ形成が認められた。分化誘導細胞から SSEA-4 陽性細胞を除去すると、テラトーマの形成は認められないことから、in vitro 分化誘導では程度の差はあるが未分化な ES 細胞が残存し、テラトーマ形成のリスクが生じることが明らかになった。

F. 研究発表

Ikeda R, Kurokaw M, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Tadokoro M, MD, Nito S, Nakatsuji N, Kondo Y, Nagata K, Hashimoto T, Ueda Y, Takada E, Masuda C, Suzuki T.: Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiology of Disease*, 2005, 20: 38-48

近藤靖, 鈴木豊, 仁藤新治: ヒト胚性幹細胞 (ES細胞), バイオインダストリー, 2005, 22: 10-16.

Sone M, Itoh H, Yamashita J, Kobayashi T-Y, Suzuki Y, Kondo Y, Nonoguchi A, Sawada N, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Nito S, Shibuya M, Nishikawa S-I, Nakao K: Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation*, 2003, 67: 2085-2088.

Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells in press*.

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Prevention of immune responses to human erythropoietin in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci in press*.

Asano T, Shibata H, Hanazono Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. *Methods Mol Biol in press*.

Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. *Methods Mol Biol* in press.

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima N, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim* 2005;54:421-428.

Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono, Y. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34⁺ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005;23:355-364.

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.

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;79:32-37.

G. 知的所有権の出願・登録状況

特許出願

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

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)

神経系細胞の分化方法 (平成 14 年 6 月 24 日、特願 2002-182386)

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)

アストロ様細胞馴化培地の製造方法 平成 16 年 9 月 6 日、特願 2004-259043)

H. 健康危険情報

特になし

カニクイザル ES 細胞の未分化状態のマーカ― 遺伝子に関する研究

分担研究者

久和 茂 (東京大学大学院農学生命科学)

研究協力者

柿沼美智留、北野真見 (同上)

研究要旨

カニクイザル由来胚性幹 (ES) 細胞株 CMK6 における未分化マーカ―遺伝子の検索を行った。新たに Caveolin1、CyclinA1 遺伝子が未分化 ES 細胞のマーカ―遺伝子となりうることをリアルタイム RT-PCR 法で確認した。

A. 研究目的

胚性幹 (ES) 細胞は多分化能と無限増殖能の2つの特異な性質を有しており、1998 年のヒト ES 細胞樹立により再生医学への応用が現実的な目標となってきた。しかし、ヒト ES 細胞を用いた再生医療を実現するためには、ES 細胞の特異的かつ効率的な分化誘導系の確立に加えて、有効性ならびに安全性に関する評価が不可欠である。これまでの研究結果から、マウス ES 細胞とヒト ES 細胞の間には相違点が存在し、マウスから得られた情報を直接ヒトへ外挿することは難しいと考えられるようになった。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系の確立が必須である。しかし、ヒト以外の霊長類由来 ES 細胞に関する情報は、マウス ES 細胞やヒト ES 細胞に比べ少ない。本研究ではカニクイザル由来 ES 細胞株 CMK6 を用いて、その未分化性状を確認するため

のマーカ―遺伝子について検索した。

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。CMK6 細胞の培養法ならびに胚様体の形成は既報のとおりに行った。未分化状態の ES 細胞ならびに胚様体から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現量の定量に供した。

リアルタイム RT-PCR 法は 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、Gemin3、Caveolin1、Dystrobrevin1、ERK1、Utrophin、PITPa、LEDGF、CyclinA 1、Connexin-43、ASS、Caveolin2、LR11、Mitosisin、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

大学農学部動物実験委員会の承認を受け、東京大学動物実験実施規則に則って行った。

C. 研究結果

Caveolin1、CyclinA1、Oct3/4 は胚様体に比較して未分化 ES 細胞で高く発現していることが明らかとなった。検索した他の遺伝子に関しては、未分化状態との関連性は見られなかった。

D. 考察

昨年度はカニクイザル ES 細胞のマーカー遺伝子として Oct3/4、GABRB3、PRDM14 遺伝子が有用であることを見出したが、今回の研究結果からさらに Caveolin1 ならびに CyclinA1 遺伝子が未分化 ES 細胞のマーカー遺伝子として有効であることが示唆された。

これまでの成果をもとに、ES 細胞の未分化性を遺伝子レベルで診断できる簡易なキットを開発したい。

E. 結論

カニクイザル ES 細胞における未分化性のマーカー遺伝子として、Caveolin1、CyclinA1が有用であることを見出した。

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

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 細胞の膝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

2) 柿沼美智留、北野真見、吉川泰弘、久和茂：カニクイザル由来未分化胚性幹細胞株 CMK6 の発現遺伝子解析 第 52 回日本実験動物学会、2005 年 5 月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

—遺伝子発現に関する検討—

分担研究者

山元 恵（国立水俣病総合研究センター 基礎研究部 生理室）

研究要旨

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、遺伝子発現の観点から ES 細胞の未分化能維持に関与すると考えられる新規候補遺伝子を計 4 種類選出することができた。また、BPA が計 3 種類の各胚葉分化マーカー遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を示す結果を得た。

A. 研究目的

カニクイザル未分化 ES 細胞および分化細胞の、薬剤に対する分子レベルにおける応答、すなわち未分化能維持に関与する遺伝子や分化関連遺伝子の発現への影響を検討することにより、ES 細胞の品質管理のための基礎的情報を得ることを目的とする。

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: 0.1・M, 10・M）に曝露し、得られた各細胞群を用いて、ES 細胞未分化能維持候補遺伝子および各胚葉分化マーカー候補遺伝子の発現への影響を検討した。

当グループの他研究者によるウェスタンブロットを用いたタンパク質発現のプロファイリング（Power Blot）の結果を受けて、ES/EB 比が高い遺伝子を上位から選出し（14 種）、遺伝子発現の観点から新規サル ES 細胞未分化能維持候補遺伝子の

スクリーニングを行った。

さらに、NIH (USA) の stem cell information を元に、外胚葉（4 種）、中胚葉（1 種）、内胚葉（3 種）分化マーカー遺伝子について、BPA 曝露の影響を検討した。

各々の細胞における遺伝子発現の解析は、RT-PCR または real time PCR (SYBR I) を用いて検討した。

C. 研究結果

昨年度、ヒトやマウス同様、カニクイザル ES 細胞において、転写因子 Oct-3/4 が ES 細胞未分化能維持マーカーとして用いることが可能であることを報告した。

今回、ES 細胞の未分化能維持関連の新規候補遺伝子のスクリーニングにおいて、Oct-3/4 以外に、計 4 種類の ES 細胞の新規な未分化能維持関連候補遺伝子を選出することができた。

また、計 3 種類の胚葉分化マーカー遺伝子発現に関して BPA が影響を及ぼす結果、すなわち特定の胚葉分化を促進/抑

制する可能性を示す結果を得た。

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関する知見を得ることは、細胞分化促進、抑制の両面からの解析が可能になり、ES 細胞の品質管理のための情報を得ることができるのみならず、化学物質の毒性評価にも応用可能であると考えられる。

今年度の検討により得られた、ES 細胞の未分化能維持関連候補遺伝子は、品質管理におけるマーカー遺伝子候補として重要な知見であると考えられる。また、各胚葉分化へ BPA が影響を及ぼすことを示しており、EB 分化系を用いて化学物質の初期発生への影響評価を行うことが可能であることを示唆していると思われる。現在、再現性の確認実験を行っている。

今後は、一方向の細胞群への分化系の一つとして神経幹細胞塊 (Neural Stem Sphere: NSS) を経由したニューロンやアストロサイト等の神経系細胞への分化系の確立を試み、本分化系を用いて環境有害物質の影響を検討することにより、特に神経系への ES 細胞由来細胞移植における細胞の品質管理に関する基礎的情報の収集を進める。

E. 結論

今年度の検討により、遺伝子発現の観点から ES 細胞の未分化能維持に関与すると考えられる新規候補遺伝子を計 4 種類選出することができた。また、BPA が計 3 種類の各胚葉分化マーカー遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を示す結果を得た。ES 細胞の未分化能維持関連候補遺伝子は、品質管理におけるマーカー遺伝子候補として重要な知見であると考えられる。また、各胚葉分化へ BPA が影響を及ぼすこと

を示しており、EB 分化系を用いて化学物質の初期発生への影響評価を行うことが可能であることを示唆していると思われる。本結果に関して、再現性の確認が取れ次第、成果発表を行う。

F. 健康危険情報

特になし (P1実験室において、in vitro 実験のみを行っている。)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

下澤律浩 基盤研・霊長類センター研究員

研究要旨

ES 細胞の株間および継代維持による特性変化は十分に明らかにされていない。また、マーカーとなるタンパク質の発現やテラトーマ形成能に違いが認められることがある。本研究は発現しているタンパク質を解析することで ES 細胞株の品質管理指標の確立を目的に、サル ES 細胞株間での免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成能の検討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を行った。2 株の ES 細胞におけるテラトーマ形成能に関して差異は認められず、移植された全ての免疫不全マウスで三胚葉性のテラトーマが形成された。タンパク質の発現に関しては、PowerBlot 解析の結果から、ES 細胞で高発現していたタンパク質 11 種に関して、培養初期および継代期の ES 細胞 2 株、ならびにそれらから作製された初期分化期に相当する胚様体で Westernblot 解析を行ったところ、ES 細胞で発現が認められ、かつ胚様体で発現が認められなかったタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種が確認された。これら 4 種の内、E-Cadherin を除く 3 種はサル種を含めた他の動物種の ES 細胞で報告されておらず、新たな特異的タンパク質と考えられた。今後はこれらタンパク質の発現を細胞内局在やその他のサル ES 細胞株においても検討を加え、新たな指標として評価する。

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いない。また、形態的には差異の見られない ES 細胞間において、マーカーとなるタンパク質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サル ES 細胞を使用した各種研究などへの応用は、その内容に何らかの影響を与える可能性がある。本研究は発現して

いるタンパク質を解析することで 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 細胞株間での免疫不全マウスへの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比較対応させ、未分化性や多分化能を評価することが可能なマーカーとなるタンパク質を明らかにするものである。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可能となり、サル類での ES 細胞

研究のみならず、ヒトの ES 細胞研究においても大いに貢献できるものと考えられる。

B. 研究方法

サル ES 細胞株、CMK6 およびその遺伝子導入細胞株である CMK6-GFP (CMK6G) の 2 株において、それらのテラトーマ形成能の検討および初期分化期に相当する胚様体を作成し、それらで発現しているタンパク質の比較を培養初期 ES 細胞と継代 ES 細胞間で行った。

まず、使用した ES 細胞における多分化能の有無を明らかにするために、フィーダー細胞上で培養した CMK6 および CMK6-GFP をコラゲナーゼ処理後フィーダー細胞を除いてコロニーを回収した。そのコロニーをトリプシン処理後ピペッティングにより細胞を単離し、 $0.5-1.5 \times 10^6$ 個の ES 細胞を scid マウスの大腿筋中にそれぞれ注入した。2-4 ヶ月後に直径 2cm 程の腫瘍が形成されたところで安楽殺し、腫瘍を摘出して切片を作製後、組織解析を行った。発現タンパク質については、培養初期 CMK6G およびそれから作成した胚様体の間で行った PowerBlot 解析 (ベクトンディッキンソン社) の結果から CMK6G で高発現しており、かつ胚様体で発現が認められないタンパク質を選抜した。なお、CMK6G での発現値が 80000 以上を示した抗原タンパク質を高発現タンパク質として 11 種選抜した。これら 11 種の抗原タンパク質に対する抗体を用いて発現を確認するために、Western blot 解析を次のサンプルにて行った。1) CMK6G の培養初期および継代期

細胞、2) 上記 2 種の CMK6G に由来した胚様体 (CMK6G-EB)、3) CMK6 の培養初期および継代期細胞、4) 上記 2 種の CMK6 に由来した胚様体 (CMK6-EB)。

また、ES 細胞における上記発現タンパク質の細胞内局在を明らかにするために、免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

上記 ES 細胞に加えて、他の株間での発現を解析するために、新たに CMSA3 および CMSA6 株の培養を開始した。

(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、独立行政法人医薬基盤研究所・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、本実験で行うテラトーマ形成法は、国際的に認められた方法であり、動物実験以外にテラトーマの形成を確認する方法はない。

C. 研究結果

本研究の解析に使用した ES 細胞、CMK6G および CMK6 の多分化能の有無を明らかにするために、テラトーマ形成能を調べたところ、それぞれ移植した 6 匹全てにおいて、三胚葉に由来した細胞 (骨、神経様細胞、平滑筋、腺構造、分泌細胞、毛根鞘など) で構成されたテラトーマであることが確認された。なお、CMK6G を移植した 2 匹については、2 ヶ月目に死亡および衰弱が認められたため、移植部位を確認したところ小さいながらも腫瘍が確認され、上述のようにテラトーマであることが確認された。

PowerBlot 解析により高発現していた 11 種のタンパク質および未分化マーカーである Oct-3 について、それらの発現の再確認および他のサンプルにおける発現の有無を Westernblotting を行って調べた。その結果、ES 細胞 2 株において発現が認められ、かつそれらに由来する胚様体では発現が認められなかったタンパク質として、Oct-3、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 5 種が確認できた。

また、高発現が認められたタンパク質および一般的な未分化マーカーとされている 6 種のタンパク質について、免疫染色による蛍光観察で細胞内局在を現在確認中である。

新たに培養を開始した CMSA3 株については、現在発現タンパク質の解析を行うために、現在サンプリングを随時行っている。

D. 考察

本研究で使用した ES 細胞株、CMK6 および CMK6G とともに三胚葉性のテラトーマが形成されたことから、正常な未分化細胞であることが示された。PowerBlot 解析により選抜された 11 種のタンパク質については、今回サンプルとした ES 細胞において検出され、かつ胚様体では検出されなかったものは 4 種であることが、Westernblot により確認した。未分化マーカーである Oct-3 の発現が ES 細胞のみで認められたことに加え、同様な特異的な発現が Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種で認められたことから、これらが ES 細胞の特性である未

分化性あるいは多分化能の維持と何らかの関連性があるものと推察される。あるいは、新たなマーカーの候補になるものと期待される。なお、これら 4 種のうち、E-Cadherin はヒト ES 細胞においても特異的に発現されていることが示されているが、サル ES 細胞においては、これを含めた上記 4 種のタンパク質の特異的な発現が確認されたのは初めてである。これらの発現が、他のサル ES 細胞株においても発現しているか否かを明らかにするために、今後 CMSA3 および CMSA6 株あるいは他の株においても、テラトーマ形成ならびに Westernblot 解析を行う。

なお、PowerBlot 解析された抗原の中で、ヒト ES 細胞株における未分化マーカーとされている Connexin 43 の発現は、CMK6G で極めて高い発現が確認されたが、胚様体においても高発現していることが確認された。このことは、種差による発現の違いと推察される。

E. 結論

本研究で使用した ES 細胞株は、テラトーマ形成能の確認により、多分化能を維持した正常な ES 細胞株と断定された。このような ES 細胞における発現タンパク質の解析によって、サル ES 細胞における新たなマーカーに成り得る特異的なタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

中村紳一郎、柴田宏明、下澤律浩、
田中裕次郎、林聡、北野良博、花
園豊、寺尾恵治

サル ES 細胞の同種または異種移
植後に形
成される奇形腫の免疫組織化学的
検索、
第 140 回日本獣医学会学(鹿児島)、
2005 年 9 月

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 仁藤 新治 田辺製薬（株）先端医学研究所長

研究要旨

Astrocyte Conditioned Medium (ACM) 中の液性因子により、ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞を、FGF-2 と EGF を添加した神経細胞用無血清培地中で接着培養することによって、分裂をさらに促進した。

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サル 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

昨年、マウス及びサルの ES 細胞のコロニーを、アストロサイトの条件培地 (ACM) 中で浮遊培養して、Neural Stem Sphere と命名した球状の細胞集合体を形成させ、その表層に神経幹細胞を分化誘導した後、Neural Stem Sphere を接着培養することによって、ES 細胞を神経細胞に短期間で効率良く分化誘導できることを報告した。本研究では、ACM に FGF-2 と EGF を高濃度添加して、ES 細胞のコロニーの浮遊培養を行ない、Neural Stem Sphere 中の神経幹細胞の分裂を促進した。その後、Neural Stem Sphere を、FGF-2 と EGF を添加した

神経細胞用無血清培地中で接着培養することによって、神経幹細胞の分裂をさらに促進した。

(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たり、倫理面の問題はないものと判断した。

C. 研究結果

Sphere から多くの神経幹細胞が遊走して周囲に広がり、遊走した細胞を培養することにより、大量の神経幹細胞を調製することができた。この神経幹細胞は凍結保存可能であり、一方、ACM 中で培養することによって効率良く神経細胞に分化した。分化した神経細胞には種々のフェノタイプが存在したが、特に高い頻度でドーパミン作動性神経細胞が含まれた。また、分化した神経細胞は電気的興奮性を示した。RT-PCR 法による遺伝子発現の解析で、この ES 細胞から神経幹細胞へ、さらに神経細胞への分化を確認した。

D. 考察

神経幹細胞は、神経細胞やグリア細胞に分化できる多分化能を持ち、また自己複製能を持つ細胞であり、神経系の移植再生医学にとって重要な役割を果たす細胞である。神経幹細胞を未分化な状態で維持し増殖させる方法として、N2 添加物、EGF、bFGF を含む無血清培地中で浮遊培養する Neurosphere 法と接着性の基質でコートしたプレート上で神経幹細胞を培養し増殖分化させる単層培養法が知られている。しかし、これらいずれの方法においても、どの細胞が未分化のまま神経幹細胞として増殖するか正確に判断することは困難で、また神経幹細胞の増殖も遅いため、大量の神経幹細胞を必要とする目的には適していない。これらの方法と比較し、ACM による分化誘導法では短時間に大量の神経幹細胞の調整が可能であり、今後、本細胞の神経再生医療への応用が期待される。

E. 結論

ES 細胞由来神経幹細胞は、FGF-2 と EGF を添加した神経細胞用無血清培地中で接着培養することによって、容易に増殖できる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

- 1) Ikeda R, Kurokaw M, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Tadokoro M, MD, Nito S, Nakatsuji N, Kondo Y, Nagata K, Hashimoto T, Ueda Y, Takada E, Masuda C, Suzuki T. :

Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiology of Disease*, 2005, 20: 38-48

- 2) 近藤靖, 鈴木豊, 仁藤新治: ヒト胚性幹細胞 (ES細胞), *バイオインダストリー*, 2005, 22: 10-16.
- 3) Sone M, Itoh H, Yamashita J, Kobayashi T-Y, Suzuki Y, Kondo Y, Nonoguchi A, Sawada N, Yamahara K, Miyashita K, Park K, Nito S, Shibuya M, Nishikawa S-I, Nakao K: Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation*, 2003, 67: 2085-2088.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 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) アストロ様細胞馴化培地の製造方法
(平成 16 年 9 月 6 日、特願
2004-259043)

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 分子病態治療研究センター 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、免疫能未成立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細胞を前造血細胞に分化させてからサル胎仔に移植すると、その造血系を一部再構築できたが（2-5%）、全例テラトーマをつくった。しかし、免疫不全マウスやヒツジ胎仔へ同じ細胞を移植しても腫瘍形成は比較的稀である。サル同種移植の系は安全性の厳密な評価に適している。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（OP9フィーダー細胞上、各種サイトカイン存在下）で6日間培養した。分化培養6日目の細胞はCD31, CD34, VE-cadherin, VEGFR-2の発現が高まるが、CD45の発現はまだ無い。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前造血細胞（将来、造血細胞になる細胞）が含まれると考えられた。この培養6日目の細胞を、造血再構築のための移植実験に用いた。

(2) **遺伝子標識：**移植後の細胞の運命を追跡できるように、GFP遺伝子を恒常的に発現するサルES細胞を用いた（田辺製

薬より供与)。

(3) **移植法**: 移植細胞に対する免疫拒絶を避けるために、免疫能が未成立(妊娠1/3期前後)のカニクイザル胎仔をレシピエントとした。細胞は胎仔の肝臓内にエコーガイド下で移植した。この時期の胎仔の肝臓は造血器官だからである。

(4) **セレクション法**: 安全性を高めるために、未分化細胞を除去してから移植した。具体的には、セルソーターを使って未分化マーカーであるSSEA4が陽性の細胞を除去した。

(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: 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。

・花園豊申請「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6月1日承認(H16-51)

・花園豊申請「幹細胞治療法のサルを用いた有用性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成17年4月1日承認(DNA-070)

・長尾慶和申請「緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)を組み込んだサルES細胞をin vitroで造血系へ初期分化させ、この細胞を妊娠ヒツジ子宮内の胎子の肝臓内へ外科的に移植する」宇都宮大学 平成17年7月27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た。

・花園豊申請「サルを用いた幹細胞治療法の開発」自治医科大学 平成17年2月22日承認(No.3)

・花園豊申請「サルの幹細胞を用いた治療法の有効性と安全性の評価」医薬基盤研究所 平成17年6月21日承認(第4-11

号)

ヒツジを用いる実験は、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「ヒツジを利用するES細胞の分化技術の開発」自治医科大学 平成17年2月22日承認(No.4)

マウスを用いる実験は、実験実施機関から以下の通り承認を受けた。

・花園豊申請「ES細胞の増殖・分化の解析」自治医科大学 平成17年2月22日承認(No.2)

C. 研究結果

(1) **未分化ES細胞を移植した場合**: 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、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。腫瘍形成は、注射針の軌跡上の胸腔または腹腔内だけに認められ、実質臓器内には認められなかった。

実質臓器を定量的PCRで調べると、全ての組織で約1%の移植細胞由来の細胞を認めた。in situ PCRでこれらの細胞は集落を作らずほとんど単独で存在し、周囲の細胞と同じ形態を示していた。

(2) **前造血細胞を移植した場合**: 次に、前造血細胞(ES細胞分化培養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)。コロニーアッセイで4-5%がES細胞由来であった。ところが、移植した全例でテラトーマの形成を認めた。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であった。腫瘍形成は、やはり注射針の軌跡上の胸腔または腹腔内だけに認めら

れ、実質臓器内には認められなかった。

移植細胞（培養 6 日目の細胞）を FACS 解析すると、未分化細胞（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。

(3) SSEA4 陽性細胞を除去して移植した場合：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=7)。その結果、全例で、テラトーマの形成は認められず、かつ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 (2-5%)。

(4) 免疫不全マウスやヒツジ胎仔に移植した場合：サル胎仔に移植したのと同じ分化培養 6 日目の細胞をヒツジ胎仔や免疫不全マウス (NOD/SCID) に移植した。いずれの場合も腫瘍形成の頻度はサル胎仔に移植した場合に比べてずっと少なかった (腫瘍形成率: 免疫不全マウス 3/10, ヒツジ胎仔 1/10)。研究協力者: 長尾慶和 (宇都宮大学農学部), 北野良博 (国立成育医療センター), 林聡 (同)

D. 考察

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、免疫能成立前 (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。

未分化の ES 細胞をサル胎仔肝臓に移植すると、各組織に ES 由来細胞の“生着”が見られた。この現象が、移植した ES 細胞が場に応じて分化した結果か、あるいは移植細胞が既存細胞と融合した結果なのかは不明である。いずれにしても、腫瘍は実質臓器内には認められず、常に注射針の軌跡上の胸腹腔内に認められたことから、移植時に血管から漏れた細胞が腫瘍を形成する可能性が高い。経血管的に漏れなく移植する技術の開発も重要であろう。

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。しかし、同じ細胞を NOD/SCID 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むしろ稀である。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、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、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