

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発牛工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
 第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	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	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	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	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

## 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** 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、昨今は、霊長類 ES 細胞の研究が注目されている。再生医療への応用のためには、異種動物由来の成分 (マウス由来フィーダー細胞やウシ胎児血清) の混入を回避する方策が急務である。本研究では、カニクイザル ES 細胞を用いて、無血清無フィーダーで未分化状態と細胞増殖を維持することを目指すとともに、一部、その成果をヒト ES 細胞にも応用する。まず、ICR マウスの MEF をフィーダーとしてサル ES 細胞の未分化維持継代培養を行い、良好な増殖と安定した未分化維持をえることが出来た。次に、KSR 含有無血清培地の中で Noggin、FGF を添加して無フィーダー培養を行ったところ、長期にわたって安定した増殖と未分化維持が可能であった。この様な無血清、無フィーダーでの未分化維持状態に有るサル ES 細胞を、ある種の培養条件に移行すると Noggin、FGF の添加も不要となり、一定期間継代できることが確認された。ヒト ES 細胞においては、KhES-1 株を用いて無血清無フィーダー未分化維持増殖培養を試み、MEF 培養上清の存在下において良好な未分化維持増殖状態を達成できた。この他に、本年度は、ケミカルライブラリーからマウス ES 細胞を用いて、分化抑制機能を有する化合物をスクリーニングした。その結果、既知のマウス ES 細胞の分化抑制剤である白血病抑制因子 (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) と同等の未分化維持機能を有する数種の低分子化合物を見出すことができた。他方、ES 細胞からの血球分化誘導においては、分化誘導効率の悪さ、2 次造血の困難さ、などの諸問題を克服するために、骨髓球系への分化誘導に優れているフィーダー細胞 10T1/2 を用いて研究を行った。その結果、サイトカイン、増殖因子の存在下でシート状コロニー (敷石状細胞からなる平たい円形のコロニー) と球状細胞の集塊が多数認められ、これらの細胞は CD34 抗原発現量が陽性 (約 25%) であった。さらに、EB を 3 日間形成させた後に 10T 1/2 細胞との共培養を行い FACS 解析を行ったところ、さらに高率の CD34 陽性細胞が認められた。今後は、この有望な培養系を基盤として、培養上清や conditioned-dish による無フィーダー培養系を目指して研究を進める。

### 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。

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」を確立することが重要である。また、BSE 問題からも明白なようにウシ胎児血清成分の排除も重要である

本研究では、カニクイザル ES 細胞を用いて、無血清、無フィーダーで未分化状態を維持したまま良好な細胞増殖も維持することを目指す。また、ヒト ES 細胞を用いた無血清無フィーダー環境を駆使した未分化維持増殖培養法の開発にも着手する。また、今回の研究では、まずマウス ES 細

胞を用いて、ケイカルライブラリーから未分化維持機能を有する低分子化合物の検出も試みた。

他方、分化誘導培養系においては、ES細胞からの血球分化誘導における深刻な困難が存在する。すなわち、分化誘導効率の悪さ、2次造血の困難、好中球を中心とする骨髄系の分化の困難、等が上げられる。これらの諸問題はフィーダー細胞との共培養においても同様であり、従来頻繁に用いられていたフィーダー細胞であるOP9細胞の限界を示すものと考えられる。

本年度は以上のような諸問題を克服するために、より骨髄球系への分化誘導に優れていると報告されたフィーダー細胞 10T1/2 での研究成果を報告する。

## B. 研究方法

### 1. 未分化維持増殖培養法

未分化サル ES 細胞は、MMC 処理した B6 マウスの MEF をフィーダーとして特定のロットのウシ胎児血清存在下において継代培養したものをを用いた。

サル ES 細胞の無血清、無フィーダー培養においては、無血清培地 (KSR 含有) の中で、放射線照射した ICR マウスの MEF をフィーダーとして継代した後に、無フィーダー培養に移行した。無フィーダー培養の場合の培養皿の表面コートはマトリゲルにより行った。

サル ES 細胞の無血清無フィーダー培養の条件は、Noggin と FGF 添加で行った。さらに、これらのサイトカインを全く添加しない条件にも挑戦した。

無フィーダー以外にヒトフィーダーも有用と考えられたの、ヒト間葉系幹細胞上での培養も試みた。

ヒト ES 細胞の未分化維持に関しては、樹立機関である京都大学再生医科学研究所から分配を受けた 3 株 (KhES-1、KhES-2、KhES-3) のうちで、KhES-1 で検討を行った。ヒト ES 細胞の場合は、当初よりウシ胎児血清は用いず無血清培地 (KSR 含有) で培養した。フィーダーは ICR マウスの MEF を原則として放射線照射して用いたが、一部の実験において MMC 処理も行った。

未分化状態の評価は、形態、SSEA4 の発現、Oct3/4 の発現、Nanog の発現、アルカリホスファターゼ染色、等によって行った。

一部の実験においては、マウス ES 細胞をゼラチンコートした直径 6 cm の培養ディッシュに  $3 \times 10^5$  個播種した。培地にはジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した化合物を添加し、30

日間培養した。培地は毎日交換し、2~3日毎に継代した。30日間培養したES細胞は、コロニーアッセイにより、アルカリフォスファターゼ活性を定量した。

### 2. 分化誘導培養法

今年度は、分化誘導に供される未分化サル ES 細胞は、すべて無血清培地 (KSR 含有) の中で、放射線照射した ICR マウスの MEF をフィーダーとして継代した。

フィーダー細胞としては、従来頻繁に使用されてきた OP9 細胞の他に、理研によりそのフィーダー細胞としての特性が報告された C3H 10T 1/2 細胞を用いた。また、一部の実験においては、ヒト初代間葉系幹細胞をフィーダー細胞として用いた。

また、一部の実験においては embryoid body の形成を行った。

また、一部に実験では、無フィーダー分化培養の新しい試みとして、conditioned dish を作成して用いた。conditioned dish とは、フィーダー細胞 (今回は C3H 10T 1/2 細胞) を培養した dish をグルタルアルデヒド (電子顕微鏡のサンプル作成の際に使われる固定剤であり強力な蛋白変性剤) で固定して、そこで ES 細胞の分化誘導を行う手法である。培養上清と異なり、病原体や可溶性蛋白が持ち込まれることもないので、その点では上清を使用する系より安全であると考えられる。

サイトカイン、増殖因子は VEGF (vascular endothelial growth factor)、IGF (insulin-like growth factor)、TPO (thrombopoietin)、FL (Flt-3 ligand)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)、SCF (stem cell factor) 等を用いた。

分化の判定は、顕微鏡による形態観察、FACS による表面抗原 (CD34、CD45、など) の解析によった。

血液分化と密接に関連する分化培養系として、血管内皮細胞の分化誘導も行った。手法は、Thomson らのアカゲザル ES 細胞からの血管内皮細胞分化誘導法に準じた。すなわち、VEGF、FGF (fibroblast growth factor)、IGF、EGF (epidermal growth factor) 存在下で EGM2 培地で培養した。

### (倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいつさい含まれない。

## ヒト ES 細胞研究を開始するための生命倫理 に対する取り組み

1. 主任研究者による使用計画書とその概要の作成
2. 機関内倫理委員会（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会」）の人選と確定
3. 当機関としての倫理規定、倫理委員会運営規定などの作成
4. 生命倫理に関する勉強会、講演会の開催と参加
5. 主任研究者が提出した使用計画に対する機関内倫理審査委員会の審査  
第1回：平成17年4月18日  
第2回：平成17年5月30日  
第3回：平成17年8月 2日
6. 使用計画書一式、機関内倫理委員会審査経過を文部科学省に提出
7. 文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会にて当機関の使用計画が審査され承認。（平成17年9月30日）

最終的には、平成17年11月9日に当機関長宛に文部科学大臣の確認の文書（17 諸文科振第734号）が送付され、ヒト ES 細胞使用が認められた。

## C. 研究結果

### 1. 未分化維持増殖培養法

ウシ胎児血清存在下において B6 マウス由来の MEF (MMC 処理) 上で培養しているカニクイザル ES 細胞は、ほぼ良好な増殖速度と未分化維持状態を保つことができたが、血清中の成分のためか、時に未分化維持状態が不安定であった。

次に、無血清培養を達成するために KSR 存在下で、ICR マウスの MEF (放射線照射) をフィーダーとして未分化維持継代培養を行い、良好な増殖と安定した未分化維持をえることが出来た。

次に、上記の無血清培養未分化サル ES 細胞を用いて、Thomson らの方法に準じて無フィーダー培養を行った。すなわち、KSR 含有無血清培地の中で Noggin (500 ng/ml) と FGF (40 ng/ml) を添加して無フィーダー培養を行ったところ、長期にわたって安定した増殖と未分化維持が可能であった。

この様な無血清、無フィーダーでの未分化維持状態に有るサル ES を、ある種の培養条件に移行すると Noggin、FGF の添加も不要となり、一定期間継代できることが確認され、現在長期培養に挑戦中である。

また、分化誘導の系に用いる予定で導入した正常ヒトフィーダーであるヒト間葉系幹細胞は、予

想外にも未分化維持に貢献することが確認された。

ヒト ES 細胞においては、まず、最も培養が安定しているとされている KhES-1 株を用いて検討を開始した。ヒト ES 細胞の場合は血清添加培養は行わずに当初より無血清培地 (KSR 添加) にて培養し、安定した結果を得た。フィーダーはサル ES 細胞の無血清培養と同じ ICR マウス MEF (放射線照射) であるが、サル ES 細胞の場合よりも MEF の細胞密度が重要で、低密度で継代しないと未分化維持が保てなかった。

次に、ヒト ES 細胞においても無血清、無フィーダー未分化維持増殖培養を試みた。表面コートはマトリゲルで、先ず、ICR マウス MEF の培養上清添加で検討し、良好な未分化維持増殖状態を達成できた。

次に、Thomson らの方法に準じて無フィーダー培養、すなわち、KSR 含有無血清培地の中で Noggin (500 ng/ml) と FGF (40 ng/ml) を添加して無フィーダー培養を行ったところ、ある程度は安定した増殖と未分化維持が可能であったが、さらなる改善を検討中である。

一部の実験において、マウス ES 細胞を用いて、ケイカルライブラリーから未分化維持機能を有する低分子化合物の検出を試みた。検討した低分子化合物の中で、数種の化合物については、マウス ES 細胞を 30 日間培養した後でも、強いアルカリフォスファターゼ活性を維持していた。これらの細胞は、未分化マーカーである SSEA-1 や Oct-4 の発現も認められた。

### 2. 分化誘導培養法

OP9 細胞との共培養においては、血液細胞と思われる形態を示す状態に至らず、他からの報告の再現をえることが出来なかった。

そこで、10T 1/2 細胞との共培養を行った。VEGF、IGF、TPO、FL、G-CSF、SCF 等のサイトカイン、増殖因子の存在下で培養し、浮遊細胞を集めて更に長期間培養し、球状の血球と思われる細胞の出現を観察したが、CD45 陽性の細胞は出現することなく、ごく少数の CD34 陽性細胞が認められた。その後、次第に死細胞が多くを占めるに至り、十分な分化細胞は得られなかった。

次も、10T 1/2 細胞との共培養ではあるが、浮遊細胞ではなく接着細胞を継代して分化誘導を行ったところ、培養開始 2 週間目においてシート状コロニー (数石状細胞からなる平たい円形のコロニー) が多数認められ、その中には球状細胞の集塊が載っている部分も多く認められた。

この様な時期の細胞を回収して生細胞の CD34 抗原発現量を FACS で定量したところ

25%程度の陽性細胞が認められた。

次に、EBを3日間形成させた後に10T 1/2細胞との共培養を行い、前期と同様に生細胞のFACS解析を行ったところ、30%とさらに高率のCD34陽性細胞が認められ、しかも、CD34発現の非常に高い分画が認められた。

無フィーダー分化培養の新しい試みとして、conditioned dishを作成して用いた。具体的には、EBを3日間形成後、C3H 10T 1/2細胞を培養したdishをグルタルアルデヒドで固定して、そこでES細胞の分化誘導を行った。この方法においても、敷石状の細胞が観察され、CD34陽性細胞が出現した。

Thomsonらの方法に準拠した血管内皮細胞分化培養系に関しては、培養開始後9日目において内皮細胞様の形態を示す細胞が現れているが、その表面抗原の解析などは行われていないので、今後の継続的な観察を行う。

#### D. 考察

カニクイザルES細胞を用いて、確実に無血清無フィーダー未分化維持増殖培養が達成され、MEFの持ち込みを防ぐための分化培養に向けての準備が整った。しかも、サイトカインも不要となり、利便性と低コスト性が向上している。

さらに、ヒトES細胞においても、MEFの培養上清を用いる手法によって安定した未分化維持増殖培養が確立され、今後は細胞株間での比較検討などを行ってゆきたい。ヒトES細胞においては、MEFの細胞密度が低い方がES細胞の未分化状態の維持に好都合であり、サルES細胞に比べて、無フィーダーの達成に有利な面が示唆される。

本年度の成果によって、サルとヒトの霊長類の胚性幹細胞の培養技術開発において、動物由来成分を排除する方向への大きな前進が認められた。将来的には、最も安全な完全合成培地に向けてさらに検討を進めたい。

一方、本年度の研究において、数種の低分子化合物について、マウスES細胞に対して、LIFとほぼ同等の未分化維持機能を有することが判明した。今後この中から、より安全な霊長類ES細胞の分化抑制剤として利用できる低分子化合物を開発し、フィーダーを用いない培養システムを確立する予定である。

本年度の研究において分化誘導のフィーダーとして用いたC3H 10T 1/2細胞そのものは古くから研究に用いられてきた間葉系(線維芽細胞系)のマウス細胞株であるが、この細胞とサルES細胞との共培養は、あまり行われていない培養系

である。そのような新しい培養系を用いて、いわゆるシート状コロニー(血管内皮細胞様のコロニー)と、その上で増殖してくる球状細胞集塊が観察され、しかも、CD34抗原が高率で認められたことは、この培養系が有望であることを強く示唆している。今後は、このフィーダー細胞の培養上清を用いた無フィーダー培養系、もしくは、conditioned-dishによる無フィーダー培養系を目指して研究を進める。

フィーダーとの共培養に先立って短期間のEBの作成(もしくは、細胞凝集塊の時期)を経ることによって、CD34強陽性の画分が現れたことは興味深い。この方式はある意味では間違いなく無フィーダーであり、今後その条件をさらに検討してゆくことが重要である。

血管内皮細胞の分化誘導系に関しては、未だこれからの課題であるが、hemangio-endotheliumからの2次造血という観点から、今後も検討課題としてゆきたい。

#### E. 結論

カニクイザルES細胞を用いて、無血清、無フィーダー等の動物成分を排除する培養法の開発を進めることができた。また、これらのサルでの成果を順調にヒトES細胞にも応用して無血清無フィーダー未分化維持増殖培養法を安定させることに成功した。

また、マウスES細胞の未分化維持機能を有する数種の低分子化合物を見出した。

分化誘導培養に関しては、EB様の細胞凝集塊やC3H 10T 1/2細胞という新しい支持細胞を用いて、無血清培養で継代維持してきたカニクイザルES細胞からCD34陽性細胞を誘導することができた。今後はこれらの系をもとに、できるだけ無フィーダー無血清へと研究を進めて行くことが重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

Yano T, Itoh Y, Kubota T, Sendo T, Koyama T, Fujita T, Saeki K, Yuo A, Oishi R: A prostacyclin analog prevents radiocontrast nephropathy via phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein. *Am J Pathol* 166:1333-1342,2005.

Saeki K, Yasugi E, Okuma E, Breit SN, Nakamura M, Toda T, Kaburagi Y, Yuo A: Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E419-E428,2005.

Horiuchi A, Yasugi E, Yuo A: Structural requirement of dolichyl phosphate as an apoptosis inducer. *J Oleo Science* 54:341-346,2005.

Zhang H, Saeki K, Kimura A, Saeki K, Nakahara M, Doshi M, Kondo Y, Nakano T, Yuo A: Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells. *Biol Reprod* 74:295-306,2006.

Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: PPAR $\gamma$  ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* in press.

Takada T, Nemoto K-I, Yamashita A, Kato M, Kondo Y, Torii R: Efficient gene silencing and cell differentiation using siRNA in mouse and monkey ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1039-1044,2005.

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T: Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 27:298-305,2006.

## 2. 学会発表

佐伯久美子、張 弘、木村朗子、道志 勝、近藤 靖、仲野 徹、湯尾 明：無フィーダー単層培養系での霊長類ES細胞からの効果的な造血細胞と血管内皮の産生。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会。2005年9月、横浜。

道志 勝、小柳 真、伊藤 守、佐伯久美子、湯尾 明：マウス空気嚢炎モデルによるヒト臍帯血CD34陽性細胞由来の成熟好中球の同定。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会。2005年9月、横浜。

Yasugi E, Okuma E, Saeki K, Kaburagi Y, Nakamura M, Toda T, Yuo A: Analysis of splicing factor, SRp20 by MALDI-TOF-MS in PSD mode. 第78回日本生化学会大会、2005年10月、神戸。

佐伯晃一、佐塚正樹、伊勢村護、小出武比古、湯尾 明：フィブロネクチンにおけるEGCG結合部位の解析。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

佐伯久美子、張 弘、木村朗子、中原正子、佐伯晃一、道志 勝、近藤 靖、仲野 徹、湯尾 明：無フィーダー単層培養系を用いた霊長類ES細胞からの造血細胞・血管内皮細胞の分化制御の解析。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

木村朗子、佐伯久美子、張 弘、中原正子、佐伯晃一、道志 勝、近藤 靖、仲野 徹、湯尾 明：無フィーダー単層培養系にて霊長類ES細胞より分化誘導した造血細胞と血管内皮細胞の機能解析。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許

無フィーダー分化用培地及び霊長類動物胚性幹細胞からの無フィーダー分化方法  
発明者：張 弘、湯尾 明、佐伯久美子  
特願2004-365221

無フィーダー分化用培地及び霊長類動物胚性幹細胞からの無フィーダー分化方法  
発明者：張 弘、湯尾 明、佐伯久美子  
国際出願番号 PCT/JP2005/003474

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社