

200607013A

200607013B

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16～18年度 総合研究報告書

平成18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19（2007）年3月

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16～18年度 総合研究報告書
平成18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19（2007）年3月

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）
総合研究報告書（平成16～18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

区分	氏名	所 属	職名
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	センター長
班員	仁藤 新治	田辺製薬株式会社先端医学研究所	所長
	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
	久和 茂	東京大学大学院農学生命科学	助教授
	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
	中村 紳一郎	社団法人予防衛生協会	主任研究員
	下澤 律浩	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員

目 次

総合研究報告書（平成16～18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

I. 総括研究報告書（平成18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 ----- 7

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）

II. 分担研究報告書

1. 発現遺伝子の解析によるカニクイザルES細胞の未分化性に関する研究----- 10

久和 茂 （東京大学大学院農学生命科学 教授）

2. 遺伝子発現に関する検討 ----- 13

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）

3. 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 ----- 16

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）

4. 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 ----- 21

仁藤 新治 （田辺製薬（株）先端医学研究所長）

5. ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究 ----- 23

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）

6. 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

—霊長類ES細胞の移植で生じる病理変化と指標蛋白の発現—----- 28

中村 紳一郎（社団法人予防衛生協会 主任研究員）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 32

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) 細胞株の究極の多分化能評価法として、マウス胚とカニクイザル ES 細胞のキメラ胚を胚移植し、初期発生の程度から評価する方法の可能性を検証した。

2) カニクイザル ES 細胞に発現している未分化マーカー遺伝子の検索を継続し、Caveolin1、CyclinA1、GABRB3、Oct3/4、PRDM14 遺伝子が未分化マーカー遺伝子であることを確認した。

3) ビスフェノール A (BPA) 存在下での胚様体形成の系を用いて、ES 細胞特異的な未分化マーカー遺伝子の検索を行った。その結果、4 手の候補遺伝子を同定した。また BPA が計 2 種類の各胚葉分化マーカー遺伝子の発現を促進する可能性を示す結果を得た。

4) サル ES 細胞から astrocyte を効率よく分化させる条件を見出した。この培養法で得られた astrocyte の培養上清は、市販の primary astrocyte 馴化培地と同等の ES 細胞から神経幹細胞への分化誘導能を示すことが明らかとなった。

同種移植グループ

1) 免疫機能が正常な成体カニクイザルに ES 細胞を同種移植した場合には、移植部位や移植細胞数にかかわらず拒絶が生じ、テラトーマ形成は認められなかった。また、核型が異常な ES 細胞と正常な ES 細胞が混在した ES 細胞をヒツジに異種移植し、形成されたテラトーマの核型は異常なものと正常なものが混在していた。核型が異常な ES 細胞にも異種移植によりテラトーマが形成されるという結果は、ES 細胞の品質管理に重要な知見である。

2) 免疫不全マウスを用いた品質管理 (多分化能) と安全性評価 (テラトーマ形成能) の有効性を評価する目的で、SCID マウスで確認された奇形種を病理学に解析した。三胚葉の構成成分が確認されたが、移植 3 ヶ月では三胚葉組織が明確に区別できることが明らかになった。

分担研究者

仁藤 新治

田辺製薬先端医学研究所・所長

久和 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 紳一朗

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) 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) 霊長類 ES 細胞の品質管理を目的とした未分化マーカーの同定：

カニクイザルES細胞を指標としてヒトを含む霊長類ES細胞の品質管理、特に必須未分化マーカー (Essential Stemness Marker) の特定とタンパクレベル、遺伝子レベルでの判定法の開発を目的として研究を行い、未分化ES細胞を判定する多分化能指標を同定した。未分化霊長類ES細胞に特異的に発現している6種のタンパク質と4種の遺伝子を特定した。今年度は特に未分化ES細胞に特異的に発現する遺伝子についてその再現性を確認した。

2) 霊長類 ES 細胞の多分化能を迅速かつ効率的に評価するシステムの確立：

霊長類ES細胞の機能 (多分化能) を迅速かつ効率的に評価するシステムの開発を目的として、マウスの受精卵とカニクイザルES細胞のキメラ胚の初期発生能を評価指標とする方法を検討した。GFP導入カニクイザルES細胞 (CMK-6/GFP) をピエゾパルスを利用して、8細胞期のマウス胚卵腔に、もしくは胚盤胞期の胞胚腔へ10-15個のES細胞を注入した。その結果、体外培養下のキメラ胚では8細胞および胚盤胞と受、最終的に消滅した。また、胚移植後妊娠12.5日齢のマウス胎児および胎盤の組織標本ではGFP発現が確認できなかった。異種動物のキメラ胚作成は困難ではあるが、カニクイザルを用いた同種移植による多分化能の評価法に比して簡便でありかつ動物倫理上の問題が少ないことから本法は引き続き検討する価値があると判断する。

3) 霊長類 ES 細胞の神経細胞への効率的な分化誘導系の開発:

カニクイザルの ES 細胞から in vitro で分化誘導した神経幹細胞に FGF と EGF を添加した G5 培地で接着培養することにより、神経幹細胞から効率よくアストロサイトに分化誘導させる培養条件を確立した。さらに、カニクイザル ES 細胞由来アストロサイトの培養上清から conditioning medium を調整し、本培地のカニクイザル ES 細胞の神経系細胞への分化能を検討した。

その結果、カニクイザル ES 細胞から効率的にアストロサイトを誘導する方法が確立できた。さらに、ES 細胞から誘導したアストロサイトの培養上清は、すぐれた神経細胞培養能を示し、神経細胞の長期培養では ACM と同等の成績を示すと共に、共培養により霊長類 ES 細胞を直接、神経系細胞へ分化できることが判明した。

4) 霊長類 ES 細胞から誘導した組織前駆細胞の同種移植の安全性確保:

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を目的として、カニクイザル ES 細胞から誘導した前血液細胞を免疫寛容成立時期の胎児に同種移植し、テラトーマなどのリスクを明らかにすることを目的として、種々の移植実験を行った。その結果、免疫能が正常な成体サルへ未分化 ES 細胞を移植すると、移植部位や移植細胞数にかかわらず、移植細胞の生着もテラトーマ形成も認められないことから、リスク評価には胎仔への移植が必須であることが判明した。

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霊長類を検索し、ES 細胞に特異的に発現している遺伝子として新たに 4 種の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、6 種のタンパク質を同定した。

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るが、免疫機能が正常な成体カニクイザルでは免疫拒絶が生じることから、同種移植によるテラトーマ形成などのリスク評価では、免疫寛容成立前の胎児を利用する方法が必須であることが判明した。

F. 研究発表

Kikuchi T, Hara M and Terao K, Development of microsatellite marker set applicable to genome-wide screening in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, 2006, -in press-

Yamamoto M, Tase N, Kondo Y, Okuno T, and Terao K. Selected gene expressions in embryoid body differentiation derived embryonic stem cells of Cynomolgus monkey in the presence of bisphenol A. submitted for publication.

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. 2006 Jun;24(6):1450-1457.

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. 2006 May;68(5):507-510.

Asano T, Shibata H, Hanazono Y. Use of SIV vectors for simian ES cells. Methods Mol Biol. 2006 Feb;329:295-303.

Asano T, Sasaki K, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate ES cells. Methods Mol Biol. 2006 Feb;329:459-467.

Kitano M, Kakinuma M, Takatori A, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Gene expression profiling of mouse ES cell progeny differentiated by Lumelsky's protocol. Cells Tissues Organs. 2006, 183(1): 24-31.

G. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

発現遺伝子の解析によるカニクイザル ES 細胞の 未分化性に関する研究

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： 本研究では、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の検索を行った。未分化状態、胚様体、分化状態における遺伝子発現パターンを比較し、Caveolin1、CyclinA1、GABRB3、Oct3/4、PRDM14 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。また、これらの遺伝子を通常の RT-PCR 法で検出するためのプライマーを設計した。

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いる。マウス ES 細胞に関する研究が先行していたが、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。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・安全性に関する評価が不可欠である。これまでの研究成果から、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 ES 細胞から得られた情報を直接ヒト ES 細胞へ外挿することは難しいとの認識が広がりつつある。したがって、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ー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、ASS、Caveolin1、Caveolin2、

Connexin-43, CyclinA1, Dystrobrevin1, ERK1, FOXH1, GABRB3, Gemin3, ZNF206, PTPRZ1, GRPR, LEDGF, LR11, Mitosin, Oct3/4, PITPa, PRDM14, Utrophin, ZIC3 について解析を行った。

通常 RT-PCR 法による遺伝子検出を実施するため、Primer3 を用いてプライマー設計を行った。

(倫理面への配慮)

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

本研究で用いた未分化 CMK6 細胞は、既知の未分化 ES 細胞のマーカである SSEA-4 や TRA-1-60 を発現し、また *in vitro* の培養系で三胚葉構造の胚様体を形成し、さらに NOD/Shi-scid マウスへの皮下接種によりテラトーマを形成したことから、未分化性を維持していることが確認された。

未分化 ES 細胞、胚様体、分化細胞の発現遺伝子の解析から Caveolin1, CyclinA1, GABRB3, Oct3/4, PRDM14 遺伝子が未分化 ES 細胞で特異的に強く発現していることが明らかとなった。

設計したプライマーセットの塩基配列は以下の通り。

Caveolin1:

5' -CCTCCTCACAGTTTTTCATCCA-3'

5' -TTGTAGATGTTGCCCTGTTC-3'

CyclinA1:

5' -TACTGTGAACAAGCACTTTTG-3'

5' -GTACGCTTTATGAAGCTCACTCA-3'

GABRB3:

5' -CCCTCAAAGGCAGAAGAAGC-3'

5' -CAATGCCGCCAGAGACCT-3'

Oct3/4: 5' -GAACAGGGAATGGGTGAATG-3'

5' -GGCCCCAAGGAATAGTCTGT-3'

PRDM14:

5' -TGGATATTCCTGTGAGCCTTC-3'

5' -CCTTCCCACATCTTTCACATC-3'

D. 考察

本研究により、霊長類由来 ES 細胞の未分化マーカ遺伝子として5つの遺伝子を同定した。Oct3/4 は以前から知られていた未分化マーカであるが、その他の遺伝子はあまり注目されていなかった遺伝子である。

これらの成果は、霊長類由来 ES 細胞の未分化性を遺伝子レベルで診断する際の貴重な情報となる。

E. 結論

カニクイザル ES 細胞における未分化性のマーカ遺伝子として、Caveolin1, CyclinA1 が有用であることを見出した。RT-PCR 法のプライマーを設計した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kitano M, Kakinuma M, Takatori A, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Gene expression profiling of mouse ES cell progeny differentiated by Lumelsky's protocol. *Cells Tissues Organs*. 183(1): 24-31, 2006.

2. 学会発表

1) 北野真見、柿沼美智留、清水川理恵、八神健一、石井寿幸、久和茂、吉川泰弘 マウス胚性幹 (ES) 細胞移植によるテラトーマ形成：移植部位における腫瘍の成長および組織学的差異の検索 第 142 回日本獣医学会、2006 年 9 月、山口

G. 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—

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、mRNA 発現の観点より、ES 細胞の未分化状態から EB 分化への移行に関与する可能性のある遺伝子を計 4 種類選出した。ES 細胞の未分化能維持に関して安定した結果の得られた遺伝子は、品質管理におけるマーカー遺伝子の候補に成りうると考えられる。また、BPA が計 2 種類の各胚葉分化マーカー遺伝子の発現を促進する可能性を示す結果を得られ、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。

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、各胚葉分化マーカー遺伝子の発現への影響、および ES 細胞未分化能維持関連遺伝子候補について検討した。

検討遺伝子候補として、Stem cell information, NIH、文献情報等を元に選択し

た外胚葉 (4 種)、中胚葉 (2 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。また、当研究班の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)、mRNA 発現の観点からサル ES 細胞未分化能維持関連遺伝子候補のスクリーニングを行った。

試料として、同一の培養条件において得られたサンプル (培養 4 回分) を用い、RT-PCR または real time RT-PCR (SYBR I) を用いた mRNA 発現の解析を行った。PCR は少なくとも二回以上の検討を行い、再現性を確認した。

C. 研究結果

0.1、10・M BPAの存在下において、21d EBにおけるPAX-6（内胚葉分化マーカー）の発現が、コントロール（DMSO）に比較して、各々1.9倍、2.4倍促進される傾向を示した。また、 α -fetoprotein（AFP：外胚葉マーカー）の発現が、14d EBにおいて、10・M BPAの存在下で1.5倍、21d EBにおいて、0.1、10・M BPAの存在下で各々2.4倍、1.9倍促進される結果が得られた。

また、ヒト、マウスにおいてES細胞未分化マーカー遺伝子として知られているOct-3/4をポジティブコントロール遺伝子として、未分化能関連遺伝子候補に関するPCRを行った結果、EB（7d、14d、21d）におけるE-cadherin, argininosuccinate synthetase, Connexin 43, Caveolin-1のmRNA発現が、ES細胞に比較して、各々12~20%、6~10%、27~30%、12~18%の範囲で保たれるという結果を得た。Oct-3/4の発現が、14d以降、1%以下であったことを考慮すると、これらの遺伝子は、いわゆるstemness遺伝子としての可能性は低いものの、ES細胞の未分化状態からEB分化への移行に何らかの形で関与している可能性が示唆される。

以上の結果より、化学物質（BPA）の存在下において、胚葉分化マーカーの遺伝子発現の変化を追跡可能であること、およびES細胞の未分化状態に関連する可能性が推定される遺伝子四種類に関して、安定した結果を示すことができた。

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。以上の検討により得られた、ES細胞の未分化能維

持に関連する可能性のある遺伝子は、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。

E. 結論

mRNA発現の観点より、ES細胞の未分化状態からEB分化への移行に関与する可能性のある遺伝子を計4種類選出した。ES細胞の未分化能維持に関して安定した結果の得られた遺伝子は、品質管理におけるマーカー遺伝子の候補に成りうると考えられる。また、BPAが計2種類の各胚葉分化マーカー遺伝子の発現を促進する可能性を示す結果を得られ、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。

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

論文発表：

Yamamoto, M., Tase, T., Kondo, Y., Okuno, T., Akiba, S., and Terao, K. Selected gene expressions in embryoid body differentiation derived embryonic stem cells of Cynomolgus monkey in the presence of bisphenol A. *submitted for publication.*

学会発表：

Yamamoto, M., Tase, T., Shimozawa, N., Shibata, H., Kondo, Y., Okuno, T., Arizono, K., and Terao, K. Effect of bisphenol A on selected differentiation marker genes in

embryoid bodies derived from Cynomolgus monkey embryonic stem cells. 46th Society of Toxicology Annual Meeting, Charlotte, USA. (March 2007発表予定)

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 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)

研究要旨

ES 細胞の持つ多分化能を評価する最も確実な方法には、免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成法あるいは同種受精卵とのキメラ作成による個体への分化した ES 細胞の寄与を調べる方法がある。しかし、カニクイザルにおいて、それらを確認するにはそれぞれ通常およそ 2-3 ヶ月および 5.5 ヶ月の期間を要するため、多分化能という品質の評価を短期に行うことは不可能である。本研究は長期に培養されたサル ES 細胞の持つ多分化能を確認するとともに、その品質としての多分化能を早期に調べるためにマウス胚とのキメラを作成し、品質評価の可否を検討した。本検討で使用された培養条件で維持された長期継代培養されたカニクイザル ES 細胞はテラトーマの形成が確認されたことから、本培養方法の安定性を示すものである。そのような培養下にある GFP 標識されたサル ES 細胞とマウス胚とのキメラ作成では、体外培養下ならびに胚移植後の胎児に ES 細胞由来の細胞の増殖・分化は認められなかった。異種の初期胚とのキメラ作成の困難さを示唆するものであった。しかし、マウス初期胚からの異種間キメラが作出されるならば、ES 細胞の品質としての多分化能を確認する上で、期間短縮かつ確実な手段となるものと期待される。

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。ES 細胞の持つ多分化能を評価する最も確実な方法は、免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ形成法あるいは同種受精卵とのキメラ作成によるキメラ個体への ES 細胞の寄与を調べる方法がある。しかし、テラトーマの形成には通常およそ 2 ヶ月、同種キメラの作成ではその出生までにおよそ 5.5 ヶ月の時間を要するため、品質評価を早期に行うことは不可

能である。本研究は長期に培養されたサル ES 細胞の持つ多分化能を確認するとともに、その品質としての多分化能を早期に調べるためにマウス胚とのキメラを作成し、品質評価の可否を検討した。

B. 研究方法

長期継代培養下にあるカニクザル ES 細胞における多分化能の有無を明らかにするために、CMK6 株 (108-111 世代) をコラゲナーゼ処理後フィーダー細胞が剥がれないように ES 細胞のコロニーをピペッティングにより回収した。そのコロニーをトリプシン処理後、200 μ ピペットでピペッティングして細胞を単離、計数し、 1.0×10^6 個の ES 細胞を 5 匹の免疫不全マウスの大腿筋中にそれぞれ注入した。2-3 ヶ月後に目立った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。また、マウス胚とのキメラ作成については、ES 細胞には GFP を発現する GFP 標識したものを、受精卵には ICR マウスの 8 細胞期および胚盤胞期胚を使用した。コラゲナーゼ処理後回収した ES 細胞をトリプシン・ピペッティング処理し、1-数個の細胞塊にした。胚への注入はピエゾパルスを利用して、8 細胞期へは囲卵腔、胚盤胞へは胞胚腔へ 10-15 個の ES 細胞を注入した。これらの操作胚は、体外培養および偽妊娠マウスへの胚移植を行った。

(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およびマウスとのキメラ作成実験は、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。

C. 研究結果

長期培養下にある CMK6 株の多分化能を確認するためにテラトーマ形成能を調べたところ、移植した免疫不全マウス全てで腫瘍の形成が認められた。これらの組織標本の観察から三胚葉に由来するテラトーマであることが確認された (図 1)。

キメラ作成においては、体外培養下にあるキメラ胚における GFP 発現を蛍光顕微鏡で観察したところ、8 細胞および胚盤胞期胚ともに、その蛍光は増えることなく減少し、消失した (図 2)。また、胚移植後妊娠 12.5 日齢の胎児および胎盤の組織標本における GFP タンパクの発現を調べたものの、その確認には至らなかった (図 3)。

D. 考察

テラトーマ形成能の確認に使用した長期培養下にある CMK6 株は凍結保存をその培養過程の中で行っているものの、凍結保存および長期継代培養下でのテラトーマ形成能すなわち高品質としての多分化能を維持していることが確認できた。

このような培養条件で培養された ES

細胞を異種動物種であるマウスとのキメラ作成を行った。ES 細胞とマウス初期胚で発生した異種間キメラが作出できれば、テラトーマ形成の期間をより短縮することが可能であり、非常に短気に ES 細胞の多分化能（品質）を調べることが可能である。その結果、キメラ胚の体外培養および胚移植後の胎仔にマーカーとしての蛍光蛋白である GFP は確認できなかった。体外培養下では培養液との相性の問題から ES 細胞が分化できない可能性が考えられることから、母胎への胚移植を行い、体内環境下での分化による宿主への寄与を期待したものの、この場合にも ES 細胞の増殖・分化を確認することができなかった。このことはマウス初期胚とのキメラ作出が困難である可能性を示唆するものである。ニワトリ胚へのマウス神経幹細胞の多分化性やヒツジ胎児へのサル ES 細胞由来細胞の移植によるキメラヒツジの作出が示されていることから、初期胚では ES 細胞が分化する足場が十分ではないこと、あるいは割球との連携が行えずに分化が不可能であったことなどが考えられた。本法をさらに修正し、初期胚からの異種間

キメラが作出されるならば、ES 細胞の品質としての多分化能を早期に確認する有効な手段となるものと期待される。

E. 結論

ES 細胞の最も重要な品質である多分化能を評価するために、テラトーマの形成を確認することが確実であるが、その形成には 2-3 ヶ月を要する。そこで、非常に短期にその多分化能を検証する手段としてマウス胚とサル ES 細胞との組み合わせによる異種間キメラの作出を行ったが、体外培養下および胎仔には ES 細胞の増殖・分化は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 長期培養されたCMK6に由来するテラトーマ

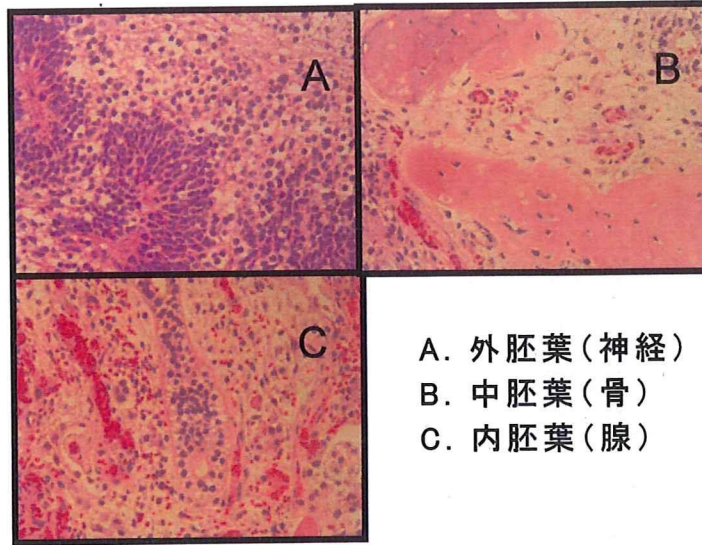
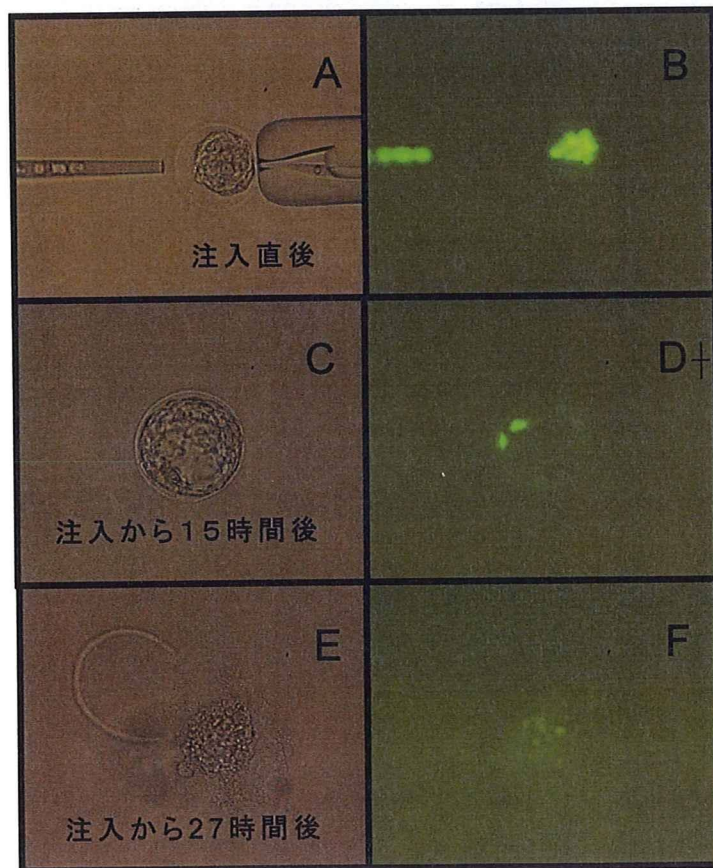
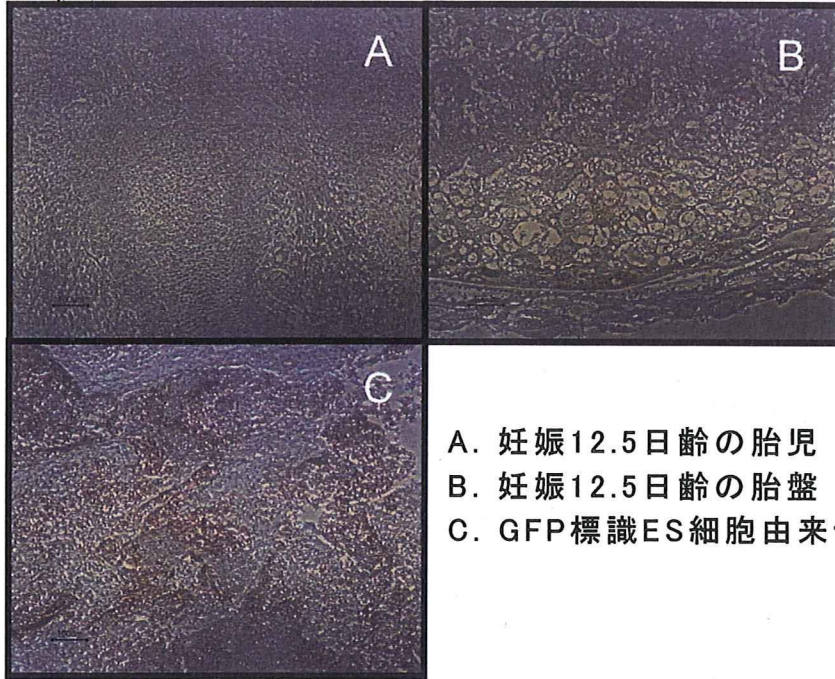


図2. マウス胚盤胞期胚へのES細胞の注入



A, C, E. 明視野像
B, D, F. 蛍光像

図3. GFP標識サルES細胞をマウス初期胚へ注入した胚に由来する胎仔および胎盤組織におけるGFP抗体による検出



- A. 妊娠12.5日齢の胎児
- B. 妊娠12.5日齢の胎盤
- C. GFP標識ES細胞由来テラトーマ

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 田辺製薬株式会社先端医学研究所長

研究要旨：サル ES 細胞からアストロサイトを効率よく分化させる条件を見出した。またその方法で分化させたサル ES 細胞由来アストロサイトの培養上清には、Primary 由来アストロサイト馴化培地と同等の ES 細胞の神経系への分化誘導能およびマウス神経細胞の培養能があることが明らかになった。

A. 研究目的

無制限に増殖し種々の神経細胞に分化可能な 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の ES 細胞を使用して、ヒト ES 細胞を利用する移植治療（パーキンソン病や他の神経系疾患の治療）を安全かつ有効に行うために、至適神経系細胞への分化培養条件を決めることを目的とする。

B. 研究方法

昨年までに、マウス及びサル ES 細胞のコロニーをラット胎仔大脳皮質由来アストロサイトの条件培地 (ACM) に浮遊培養して、Neural Stem Sphere (NSS) と命名した球状の細胞集合体を形成させ神経幹細胞を分化誘導した。NSS を ACM で接着培養することにより、ES 細胞から神経細胞へ効率よく分化でき、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で接着

培養することで、容易に増幅できることを明らかにした。本研究では、神経幹細胞を FGF と EGF を添加した G5 培地で接着培養することにより、神経幹細胞から効率よくアストロサイトに分化誘導させた。また、サル ES 細胞由来アストロサイトの条件培地 (ES-ACM) を作製し、ES-ACM によるマウス（胎生 14・15 日）大脳皮質由来神経細胞の長期培養能やサルおよびマウス ES 細胞の神経系細胞への分化能を検討した。

（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、実験を実施するにあたり、倫理面あのみならず、面大はないものと判断した。

C. 研究結果

カニクイザル ES 細胞を上記の方法でアストロサイトに誘導し、アストロサイトのマーカーである GFAP で免疫染色を行ったところ非常に良い効率で GFAP 陽性細胞に誘導することが出来た。ES-ACM は、すぐれ

た神経細胞培養能を示し、神経細胞の長期培養ではACMと同等の成績を示した。また、マウス ES 細胞やカニクイザル ES 細胞を ES-ACM に浮遊することにより、ACM 同様、ES 細胞を直接、神経系細胞へ分化できることが判明した。

D. 考察

ヒト ES 細胞の臨床応用を考えた場合、培養には、マウスの細胞や牛胎仔血清等を使用しており、この場合、異種動物細胞の混入や異種動物由来ウイルスの感染等の可能性がある。神経細胞への分化にヒト ES 細胞由来アストロサイト条件培地を用いることにより、動物由来成分の混入を排除した移植用神経系細胞の作製が可能となるものと思われる。

E. 結論

ES 細胞由来アストロサイトの培養上清を用いることにより、従来のラット胎仔由来初代培養 ACM と同様の神経分化誘導能並びに神経細胞培養能を有していることが確認された。

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) 古寺美加, 村松慎一, 奈良優子, 滝野直美, 西田紘子, 奥野剛, 小西奈依, 道端英男, 鈴木豊, 近藤靖, 仁藤新治, 中野今治 : 自殺遺伝子を導入したよ

り安全な移植用 ES 細胞の開発. 第 4 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2006 年 5 月 19 日. (抄録集 p 42)

- 2) Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Tamura Y, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Nakano I, Muramatsu S. Embryonic stem cells expressing suicide gene reduced risk of teratoma formation. The 29th Annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Kyoto, July 20, 2006.
- 3) 古寺美加, 山本茂一, 近藤靖, 仁藤新治, 村松慎一 : 自殺遺伝子導入による安全な移植用 ES 細胞の開発. 第 46 回日本臨床化学会年次学術集会, 東京, 2006 年 9 月 8 日.
- 4) Muramatsu S, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishida H, Sato K, Kakiuchi T, Okuno T, Konishi N, Michihata H, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S, Tsukada H and Nakano I. Suicide gene transduction of embryonic stem cells for safer cell therapy. Tenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Kyoto, October 30, Movement Disorders 21(15) s399, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし