

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

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目標とした。研究グループは品質管理グループと同種移植グループに大別され、平成16年度から平成18年度までの研究成果は以下に要約される。

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 と当該株より分化させた胚様体 (EB) および *in vitro* で分化誘導した神経幹細胞 (NSC) を対象として、抗体アレイを用いた発現タンパクの網羅的解析を行い、未分化カニクイザル ES 細胞、EB、NSC のそれぞれに特異的もしくは高率に発現している 11 種のタンパク質を同定した。

2) 未分化 ES 細胞に特異的なマーカー遺伝子を検索し、新たに Caveolin1、CyclinA1 遺伝子が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。

3) EB への文化系に内分泌攪乱物質であるビスフェノール A (BPA) を添加し、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計 4 種の新規候補遺伝子を見出した。

4) 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共通の未分化マーカーとなりえるタンパク質として、Caveolin 1、DP103/Gemin、E-Cadherin および MRP1 の 4 種を確認した。

5) 各種増殖因子とフィーダー細胞を適宜組み合わせる方法により、Neural Stem Sphere (NSS) と命名した球状の細胞集合体を形成させ、効率的に神経幹細胞および神経細胞へ分化誘導する技術を確立した。さらに、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、高率に神経幹細胞へ高率に分化誘導する技術を確立した。

同種移植グループ：

1) 未分化 ES 細胞を免疫寛容成立前のサル胎児に同種移植すると、全例にテラトーマの形成が認められた。前造血細胞に分化させた ES 細胞をサル胎児に移植した場合には、その造血系を一部再構築できたが (2-5%)、全例でテラトーマが形成された。一方、分化誘導した前造血細胞から未分化マーカーである SSEA-4 陽性細胞を除去してサル胎児に同種移植した場合には、テラトーマ形成を完全に予防することができた。このことから、SSEA-4 は臨床的な未分化マーカーと判断される。

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。カニクイザルは多形な嚢胞に占められていた。ES 細胞を用いた再生医療における安全性評価では、霊長類を用いて検証する必要があると判断される。

分担研究者

仁藤 新治

田辺製薬株式会社先端医学研究所・所長

久和 茂

東京大学大学院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

国立水俣病総合研究センター・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

1. 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

2. 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。

3. 研究結果および考察

品質管理グループ：

カニクイザルの標準ES細胞株としてCMK6株をとりあげ、未分化細胞、EBおよびNSCに発現している約1000種のタンパク質を網羅的に解析した結果、未分化細胞高発現している9種と分化細胞に高発現している15種のタンパク質を特定した。

由来の異なる二種類のカニクイザルES細胞について、未分化ES細胞に特異的と考えられる11種のタンパク質と代表的な未分化マーカーであるOct-3の発現をWestern blotで解析した。その結果、異なるES細胞に共通のタンパク質としてOct-3に加えてCaveolin1、DP103/Gemin、E-CadherinおよびMRP1の新たな未分化マーカーを特定した。

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。

BPA存在下で分化させたEBでは、PAX-6（内胚葉分化マーカー）と α -fetoprotein（AFP：外胚葉マーカー）の発現が、コントロール（DMSO）に比較して促進される傾向を示した。

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、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。

ES細胞をACMで浮遊培養することにより、ネスチン陽性の神経幹細胞層（表層）、ネスチンおよびBrdUのいずれにも陰性の前神経幹細胞層（中層）、最後に核にあたるBrdU陽性なES細胞層の三層構造を有するNSSが形成された。NSSは、内胚葉、外胚葉、中胚葉がそれぞれ分化誘導される胚様体（Embryoid Body）とは全く異なった構造で、短期間で効率よく神経幹細胞のみが表層に分化誘導されることが明らかとなった。また、NSSを接着培養することにより、分化した神経細胞のマーカーであるニューロフィラメントに対する抗体で強く染色される、遊走した神経細胞と細胞体から伸展した神経突起が数多く観察できた。さらに、ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素、GABA作動性ニューロンのマーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素、またコリン作動性ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーズの発現の誘導が起きていることを、それぞれの酵素に対する抗体によって免疫組織化学の手法により確認することができた。

NSSから多くの神経幹細胞が遊走して周囲に広がり、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氣的興奮性を示した。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。

神経細胞が分化する時と同じく、数日後

にコロニーの周辺部において細胞同士が密着していた状態の細胞が個々に離散し、アストロサイトに特有の分枝した数多くの突起を持つ細胞へと分化してきた。この段階で、免疫蛍光組織化学によりアストロサイトのマーカーである Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の反応性を調べたところ、多数の突起を持った細胞およびコロニー内に存在する全ての細胞が GFAP に陽性であった。さらに、これら GFAP 陽性細胞の培養上清は、ACM と同様の神経細胞への分化誘導能を有していた。

同種移植の安全性評価グループ

未分化のカニクイザル ES 細胞 (CMK6) をサル胎仔肝臓に移植すると、全組織に ES 由来細胞の生着が見られ、腫瘍 (奇形種) 形成は注射針軌跡上の実質臓器外 (胸腔・腹腔) に限られた。漏れた細胞が腫瘍を作る可能性が高い。経血管的に漏れなく移植することは腫瘍形成予防の上で重要である。

CMK6 細胞を前造血細胞に分化させてから移植すると、造血系を部分的に再構築できたが (2-5%), 全例腫瘍をつくった。分化培養後の細胞を移植しても腫瘍形成リスクは依然高い。

ES 細胞から分化させた前造血細胞のうち、未分化マーカーである SSEA4 陽性の細胞を除去して移植すると、生着能を妨げずに、腫瘍形成を完全に予防できた。SSEA4 は臨床的なステムネス・マーカーと判断できる。

カニクイザル胎児で腫瘍形成が認められた細胞を免疫不全マウスやヒツジ胎仔に移植しても腫瘍形成頻度は少ない。異種移植の系は腫瘍形成リスクを過少評価する可能性がある。

成体サルへ移植した場合：免疫能が正常な成体のサルへ未分化 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、生着しないし腫瘍もできない。サル胎仔への同種移植が安全性の評価には必要である。

核型異常のある ES 細胞と核型異常のない ES 細胞が混じった細胞をヒツジ胎児に移植した場合、出来た腫瘍細胞の核型はやはり両者が混じっており、核型が正常だからと

いって腫瘍形成の危険性が下がる事実はなかった。(注：本実験は、同種移植の系ではレシピエントの正常細胞核型が混入しても判別不可能なため、ヒツジ胎仔への異種移植の系で実施した。)

移植した ES 細胞に由来するテラトーマの病理学的所見としては、カニクイザル ES 細胞を免疫不全マウス (SCID、NOG) に移植した場合には、三胚葉系のすべての組織への分化は確認できたが、検索例すべてに径約 1cm 腫瘍が形成され、腫瘍の大きさは SCID>NOG であった。

ヒツジ胎児に移植した場合は、一例は出生時には腫瘍は観察されなかったが、生後半年で充実性の径約 5cm 大型腫瘍が形成された。もう一例は出生時に側腹部に径 3cm 程度の腫瘍が形成されていた。いずれも組織学的には三胚葉組織が認められた。

カニクイザル胎児に移植した場合は、3例に大小多数の嚢胞を含む、径約 1~3cm 腫瘍が形成されていた。いずれも組織学的には三胚葉組織が認められた。これらの結果から、マウス、ヒツジ、カニクイザルへのカニクイザル由来 ES 細胞移植に対していずれも増殖能が優位に働いた結果である腫瘍が形成された。レシピエントの動物種の違いによって、形成される腫瘍の傾向が異なるのは非常に興味深い現象で、それぞれの動物の移植細胞への反応が少しずつ異なっていることを意味していると考えられる。

4. 評価

1) 達成度

品質管理グループでは、人を含めた霊長類の ES 細胞の未分化度を発現タンパクと遺伝子により簡易に検証できるキットの作成を最終目標としていた。そのためには複数の ES 細胞について表現型 (発現タンパクと遺伝子) と機能 (多分化能、テラトーマ形成能など) を比較する必要があったが、霊長類の ES 細胞を未分化状態を維持しつつ継代維持することは予想以上に困難であった。霊長類 ES 細胞の品質管理における Stemness マーカーとなり得る複数のタンパク質と遺伝子は特定できたが、機能と関連させた最終的な絞り込みには至らなかった。この部分の達成度は 60% であると評価

する。

一方で、in vitro での神経細胞への分化技術の開発と、免疫寛容成立前のカニクイザル胎児への移植実験では、ES 細胞を用いた再生医療の安全性評価に関わる重要な知見を提供した。

2) 学術的・国際的・社会的意義

サル類をモデルとして ES 細胞を用いた再生医療の安全性評価に関わる研究を行っているグループは我々のみであり、得られた結果から、人 ES 細胞の品質管理、分化誘導技術、再生医療の安全性評価はマウスやヒツジでは不可能であり、サル胎児を用いた移植実験が最良の方法であることを明らかにしたことは学術的・国際的・社会的に意義深い成果と判断している。

3) 今後の展望

前述したように、ES 細胞を用いた再生医療を安全で有効なものにするためには、継代維持される ES 細胞の Stemness を含めた品質管理技術開発は必須である。倫理的ハードルが高い人 ES 細胞の代替としてサル ES 細胞を用いた表現型(必要な情報は成果として得られている)と機能との関連を解析し、汎用性のある「ヒト ES 細胞品質管理キット」を早急に開発する必要がある。同種移植の安全性評価に関しては、サル胎児を用いた移植実験が必須であることから、前臨床試験として ES 細胞を用いた再生医療のガイドラインに盛り込まれることを期待する。

4) 研究の効率性

品質管理の4分野(タンパク、遺伝子、分化制御、分化誘導)、安全性評価の二分野(同種移植、病理解析)の計6分野でそれぞれ一名の分担研究者を配置し、技術的困難さはあったものの、全体として効率の良い研究が実施できたと評価する。

5. 結論

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。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。

6. 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.

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 Oct;54(5):421-428.

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 Feb;12(3):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 Jan 15;79(1):32-37.

Ikeda R, Kurokawa M, Chiba S, Yoshikawa H, Ide M, Tadokoro M, 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.

7. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

