

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

月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系幹細胞の  
提供システムのすみやかな確立と成育疾患への適応

平成18年度 総合・総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成19(2007)年4月

## 目 次

|     |  |    |
|-----|--|----|
| I   | 総合研究報告書  | 1  |
|     | ヒト月経血・臍帯血・末梢血・骨髄由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング             | 3  |
|     | 梅澤 明弘  |    |
| II  | 総括研究報告書  | 11 |
|     | ヒト月経血・臍帯血・末梢血・骨髄由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング             | 13 |
|     | 梅澤 明弘  |    |
| III | 分担研究報告書  | 19 |
|     | 1. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による「移植片宿主病の治療」に関する臨床応用の検討   | 21 |
|     | 室井 一男  |    |
|     | 2. ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と細胞移植後の組織学的検証 | 23 |
|     | 武田 伸一  |    |
|     | 3. 末梢血由来の間葉系幹細胞の調整                               | 27 |
|     | 落合 淳志  |    |
|     | 4. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞の分化機構に関する分子レベルでの解明          | 29 |
|     | 望月 直樹  |    |
| IV  | 研究成果に関する一欄表                                      | 33 |
| V   | 研究成果の刊行物・別冊                                      | 39 |

## II 総括研究報告書

ヒト月経血・臍帯血・末梢血・骨髄由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

梅 澤 明 弘

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）  
総括研究報告書

月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系幹細胞の提供システムのすみやかな  
確立と成育疾患への適応（H16-再生-009）

主任研究者 梅澤 明弘  
国立成育医療センター研究所  
生殖医療研究部 部長

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。臨床においても、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骨髄間質細胞の移植が行われている。同時に、骨髄移植において生着不全を防ぐことを目的に、骨髄間質細胞移植が始められている。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。本研究では、マウスのみならずヒト骨髄からも比較的増殖能力の高い間葉系細胞を数種類、分離、培養した。しかしながらこれらの細胞も通常の培養では、その細胞増殖には限界があり細胞治療への応用までは至っていない。ヒト骨髄由来間葉系細胞の寿命が延長するという発見を元に、多くのヒト骨髄間質細胞の寿命延長に成功し、心筋細胞、神経、骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋への分化をさせ、独自に確立した間葉系細胞培養システムを用いて、子宮内膜、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構築を試み、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供することを開始した。間葉系細胞は臍帯血、末梢血から得ることになり、間葉系細胞を用いた細胞治療に関する倫理性の due process を提示することになり、この提示された過程に従い、提供医療施設を増やしていくと同時に公的細胞バンクに寄託する倫理的手続きを進めた。現在の間葉系細胞培養に使用されている条件は、ウシ胎児血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は否定できない。このため治療法としての安全性の基準の確立は急務であり、日本国内で進められている様々な幹細胞に対するフィーダー能を有するのみならず、その細胞自身が多分化能を有する間葉系細胞を適切に提供するシステム構築は重要な意義を有する。ヒト臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞の増殖をコントロールし移植への系を確立することは移植医療の新たなパラダイムの獲得につながる。

## A. 研究目的

骨髄間質細胞は、臨床においても、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て始め、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が示されてきた。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きた。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 (Stress-free medium)」の開発経験に基づき、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞を増殖させ、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を開発する。具体的には、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、培養細胞の寿命延長過程における細胞の分化能を含めた検討を行う。

## B. 研究方法

臍帯血・末梢血由来のヒト間葉系幹細胞を用いた。同時に対象として、従来より蓄積されている骨髄由来のヒト間葉系細胞を用いた。

### (1) ヒト臍帯血由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

既に国立成育医療センター・倫理委員会(承認番号 25, 26, 27, 49, 55、全て平成 15 年)にて、承認を受けた臍帯血・骨髄由来の間葉系細胞を単離、培養を行った。ならびに、慶應義塾大学倫理委員会にて承認された分離培養したヒト間葉系細胞の性質を細胞表面マーカー、gene chip 解析 (Affymetrix) を用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を詳細に検討を終了した。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、方法等を確立するための一助としている。

### (2) 免疫不全マウスへのヒト間葉系細胞の移植

ヒト由来の細胞移植には、免疫不全マウス (NOG: NOD/SCID/IL-2 受容体γノックアウトマウス) を利用した。病理形態学的解析を中心に、移植後の病理組織学的な解析を遂行した。

### (3) 培養条件によるヒト細胞寿命の延長と分子レベルにおける解析

清野ら (Nature, 1999) により発見されたヒト細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。その際、寿命延長には、p16INK4a の上昇を介した Rb 経路に関わることが知られ、この経路に関するシグナル伝達を細胞毎に検討できるよう、シグナル伝達にかかわる分子の定量ならびにリン酸化状態を検討した。またその際のヒト細胞の染色体、遺伝子レベルでの検討、遺伝子導入効率に対する基盤的研究を同時に行った。

### (4) 臨床応用への具体的な検討

細胞の臨床応用を視野におき、科学性および倫理性を確保する。①治療プロトコルに関しては、分担研究者の室井らが検討し、②ヒト細胞に関しては、具体的な手続きを通じて、倫理委員会における議論の元に調整する。

## C. 研究結果

### (1) ヒト間葉系細胞の培養

マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌの骨髄から間葉系細胞を多数樹立し、心筋細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨格筋細胞、神経細胞への分化を示し、ヒ

ト間葉系細胞に関しては臍帯血、骨髄、末梢血より間葉系細胞の培養を開始しており、それらが少なくとも複数の分化形質を示した。これらを培養するにあたり、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法を確立し、Non-stress 培地として数施設に提供し、その妥当性についての報告を受け、新規開発へフィードバックしている。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を終了した。これらの細胞について、さらに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終了し、一部はホームページ上で公開

(<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/link.html>) し、それらはデータベースとして構築した。幹細胞を用いた治療基盤確立のための準備状況としては、分化能検定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。特に生体への移植は、実験中央研究所より供与を受けている免疫不全動物 (NOD/SCID/IL-2 受容体 $\gamma$ ノックアウトマウス) 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進行中である。これらの成果を利用して目的の細胞へ分化しうる臍帯血・末梢血由来のヒト間葉系細胞を選別し、疾患モデル動物で確立された治療戦略をヒトへ応用することを着実に進めている。

## (2) 細胞治療用ヒト月経血・臍帯血由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

中胚葉に由来する幹細胞の供給源として、子宮内膜、月経血、臍帯血を利用した。マイクロアレイ解析から、これらの幹細胞は元の組織の性質を保持すると同時に各組織に由来する間葉系細胞に多様性があることが明らかとなった。

## (3) 免疫不全マウスへのヒト間葉系細胞の移植

骨格筋多能性幹細胞の候補として、筋再生時に増殖する CD31-CD45-SP 細胞を新たに見出した。この細胞は *in vitro* にて間葉系細胞 (骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞) に分化した。また免疫不全マウスに筋芽細胞と共移植すると、著しく筋再生を促進したが、C57BL/6 マウス骨格筋を X 線照射し、内因性の筋衛星細胞と SP 細胞を抑制した後に移植すると、筋芽細胞の分化を抑制し、脂肪細胞に分化した。CD31-CD45-SP 細胞はマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、炎症反応を制御する ST-2 分子を特異的に発現した。CD31-CD45-SP 細胞は筋再生時に微小環境に応じてその fate を変え、筋ジストロフィーで見られる繊維化、脂肪化に関与する可能性が示唆された。

## (4) 培養条件によるヒト細胞寿命の延長と分子レベルにおける解析

臓器再生のために利用可能な間葉系細胞の分化への情報伝達のメカニズムと多分化能の維持機構を分子レベルで解明することを目的に研究を行った。月経血・臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞のコントロールの目標は、目標とする分化誘導シグナルの同定と、多分化能を保持したままの増殖である。ヒト骨髄間質から得られた細胞に特異的発現する分子を同定することにより、①分化誘導シグナルを受ける受容体②シグナルを増幅するような因子を探索すること③多分化能の維持に不可欠な接着や増殖にかかわる分子を明らかにすることを目的として、シグナルシーケンストラップ法 (SST 法) でこれらの因子の同定を試みた。細胞から分泌される因子、細胞膜表面分子などシグナルシーケンスをもつ 300 以上の蛋白質を見つけた。この内、機能未知の分子 PTK7 についてその機能の解析に着手した。

## (5) 臨床応用への具体的な検討

臨床試験に用いる治療用の骨髄間葉系幹細胞を製造するため、平成12年12月に通知された「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について(医薬発第1314号)」に従い、臨床用細胞プロセッシング室を整備し細胞処理に係る必要な書式の作成を試みた。血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」を計画し、院内の倫理委員会へ申請し臨床試験実施の許可を得た(臨05-63号)。第3者から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の治療の第1/II相臨床試験の試験計画作成に参加するとともに、本研究に関連した海外における臨床試験の情報を収集し、骨髄間葉系幹細胞を投与した17例中10例に効果が認められ、重篤な副作用はみられなかった。

#### (6) 成体幹細胞の特性を決定

成体幹細胞に関する網羅的な遺伝子発現に関し、米国NIH/NIAのグループとの共同研究を行い、国際誌に発表し(PLoS Biology, 1: 410-419, 2003)、その成果はNature誌のNewsに取り上げられた。また、その情報はWeb上に公開([http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA\\_7\\_4k.html](http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA_7_4k.html))しており、すべての医療関係者に共有可能となっている。

#### (7) Cell processing center 設立と各種手順書・基準書作製

国立成育医療センター研究所が保有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養技術ならびに製造管理及び品質管理規則(Good Manufacturing Practice, GMP基準)を満たすセル・プロセッシング・センターを基盤

として、動物由来成分を排除しヒト由来成分のみで構成される幹細胞培養法を確立した。「セル・プロセッシング・センター(CPC)」設立が承認され、厚生労働省直轄研究機関としては初のCPCとして整備された。国立成育医療センターでは、上記CPCを使用したヒト間葉系幹細胞の培養ならびに臨床研究への供給を課題として、研究部横断的な推進体制を構築した。

#### D. 考察

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、その増殖能、多分化能より、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多くの基盤研究ならびに細胞の整備が必要となり、時間がかかると予想される。胎児由来の神経細胞を初めとする細胞は、細胞移植によりパーキンソン病に効果があることが示されて久しいものの、ヒト中絶胎児を細胞治療の供給源とすることが許容される可能性は高くない。組織幹細胞は分化能に限られているが、目的の細胞に分化させることは比較的容易であり、現在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。本研究に用いた骨髄・臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞は既に培養を進行させており、その初期培養された細胞が蓄積され、これらの細胞を用いた神経、心筋、骨組織を構築する研究は臨床的な観点から極めて重要といえる。

間葉系幹細胞は驚くべき多岐に渡る胚葉を越えた可塑性を有し、試験管内においても生体外培養にて増殖させることが可能である。この体性幹細胞の利用は、自己の細胞を使用できるため倫理的な面からも臨床応用への理解が得られやすく現段階では、

再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 細胞の分離培養技術の確立、2) 細胞のカタログ化、3) 細胞品質管理の標準化がある。細胞の分離培養技術であるが、これらは造血幹細胞の領域で既に臨床応用され多くの実績を得てきている。このような現状では特に①骨髄・臍帯血・末梢血由来のヒト細胞を移植することによる細胞治療戦略の確立、②ヒト間葉系細胞の寿命延長、増殖法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、臨床への探索的研究が必要である。ヒト間葉系細胞を薬品、医療機器の範疇としてとらえ米食品医薬品局 (FDA) 基準を指標とする、細胞提供システムの確立、ならびにそれらの方法の安全性、科学性、倫理性を確立したうえで、再生医療を具体的に遂行する上での基盤的な成果を得ることに成功した。

## E. 結論

本研究では、骨髄間質に由来する幹細胞を含めた体性幹細胞を利用した細胞治療法の確立に向けた基盤研究を行った。さらに、これらの幹細胞を臨床応用するための安全かつ効果的な培養システムの確立を目指している。ヒト間葉系幹細胞は、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、細胞治療における供給源のひとつとなっている。ヒト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、骨髄、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞の分離培養技術を開発した。

これらの知見を基に、国立成育医療センター内に臨床研究を前提とした ad hoc 委員会を設立し、臨床試験研究への具体的なロードマップを作製し、医療に提供できる新

たな間葉系細胞の分離・培養を行い、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を終了した。また、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い、国立成育医療センター研究所が有する GMP 基準に沿った機関内の細胞プロセッシング・センターにおいて日本国内の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供することを可能とした。運用は「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針 (平成 18 年 9 月)」に沿うレベルで行い、各組織由来のヒト細胞を移植することによる細胞治療戦略を確立した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 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し、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研究所、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、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認)。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 (平成 18 年 9 月)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮した。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した (承認番号 2003-002, 2005-003)。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った。

## H. 研究発表

### 論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell*, in press. 2007
2. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
3. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing *Csx/Nkx2.5* and *GATA4* undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 2006
4. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. 2006
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells*. 24(10):2270-8. 2006
6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>(KSL) cells and colony-forming units in

spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J. Cellular Physiology* 208:188-194. 2006 AU is a corresponding author.

7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology*. 147(9):4104-11. 2006

## I. 知的財産権の出願・登録状況

### 1) 特許取得

「コラーゲン代謝促進組成物」

発明者：梅澤明弘、吉田優子

特願出願施設内準備中

### 2) 実用新案登録

なし

### 3) その他

なし

### Ⅲ 分担研究報告書

1. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による「移植片宿主病の治療」に関する臨床応用の検討  
室井 一男
2. ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と細胞移植後の組織学的検証  
武田 伸一
3. 末梢血由来の間葉系幹細胞の調整  
落合 淳志
4. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞の分化機構に関する分子レベルでの解明  
望月 直樹

「月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による  
『移植片宿主病の治療』に関する臨床応用の検討」

分担研究者 室井一男 自治医科大学血液学教授

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の移植片対宿主病 (GVHD) に対する抑制機序を解明し、同種造血幹細胞移植後の難治性GVHDを発症した患者にMSCを投与する臨床試験を実施する。

**A. 研究目的**

MSCの免疫抑制機序に係る分子を同定し、同種造血幹細胞移植後に難治性GVHDを発症した患者にMSCを投与する臨床試験を実施する。

**B. 研究方法**

マウスの骨髄細胞からMSCを分離し、マウスの活性化した脾のT細胞と共培養し、T細胞の増殖抑制に係るシグナル伝達機構を細胞生物学手法および分子生物学的手法を用いて解明する。同種造血幹細胞移植後、難治性のGVHDを発症した患者に対して、GVHDの治療目的として、血縁者の骨髄から得られたMSCを投与する。

(倫理面への配慮)

「造血幹細胞移植に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」(臨06-52号)は、平成18年8月7日自治医科大学生命倫理委員会より承認されている。

**C. 研究結果**

MSCは、nitric oxide (NO)の産生を介して活性化T細胞のSTAT5のリン酸化を抑制し、T細胞の増殖を抑制した。NO合成酵素の阻害薬であるL-NAMEを加えると、活性化T細胞のSTAT5のリン酸化が回復し、MSCによるT細胞増殖抑制効果は減弱した。MSCのGVHD抑制作用は、MSCから産生されるNOの関与が明らかとなった。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、必要な設備である細胞プロセッシング室を完備し手順書を作成した。難治性のGVHDを発症した患者から同意を得、血縁者の骨髄細胞からMSCを分離し増殖させた。分離したMSCの安全性の確認を行い、臨床試験に備えた。

**D. 考察**

MSCから産生されるNOを介するGVHD抑制機序を明らかにしたが、今後他の因子の関与や他の因子とNOとの相互作用を検討する必要がある。

難治性のGVHDに対する有効な治療法は少ない

ため、血縁者の骨髄細胞のMSCを用いた臨床試験を早急に実施する必要がある。

**E. 結論**

MSCは活性化T細胞の存在下でNOを産生し、NOが活性化T細胞のSTAT5のリン酸化を抑制し、活性化T細胞の細胞増殖の抑制をもたらす。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

## 1. 論文発表

Sato K, Muroi K (7番目), et al: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood 109:228-234, 2007.

## 2. 学会発表

(1)Sato K, Muroi K (8番目), et al: Mesenchymal stem cells produce nitric oxide, a key molecule for T cell suppression, upon interaction with activated T cells. Blood vol.108, Issue 11, 723a, 2006

(2)佐藤一也、室井一男(7番目)他: 間葉系幹細胞によるnitric oxide(NO)を介したT細胞増殖抑制機構. 臨床血液 47巻9号, p.1017, 2006.

(3)佐藤一也、室井一男(7番目)他: 間葉系幹細胞によるGVHD制御の分子機構に関する基礎的検討. 日本癌学会総会 p.444, 2006.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む)

## 1. 特許取得

なし

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

研究報告書

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）  
分担研究報告書

ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と  
細胞移植後の組織学的検証

分担研究者

武田伸一

国立精神・神経センター神経研究所  
遺伝子疾患治療研究部 部長

**研究要旨：**骨格筋前駆細胞（筋芽細胞、myoblasts）は分裂後、分化し、融合して多核の筋管を形成する。今回筋再生医療の基盤として、筋分化を制御する転写因子のネットワークを調べる目的で、マウス全転写因子をほぼ網羅する SiRNA ライブラリーを用いて、筋分化を制御する転写因子の genome-wide なスクリーニングを行った。合計 71 遺伝子が筋分化制御の候補として同定された。その幾つかについては更に研究を進めている。

**A. 研究目的**

筋分化過程は MyoD, Myf-5, myogenin, MRF-4 といった myogenic basic helix-loop-helix 転写調節因子によって主に制御されているが、その制御機構はまだよくわかっていない。我々は筋再生医療の基盤として、筋分化を制御する転写因子のネットワークを調べる目的で、全マウス転写因子を網羅する SiRNA ライブラリーを用いて、筋分化を促進する転写因子のスクリーニングを行った。

**B. 研究方法**

1. 産業技術総合研究所（筑波）で構築されたマウス転写因子 2200 遺伝子をターゲットとする SiRNA ライブラリー中の 4400 プラスミドクローンを 96well プレートに播種した筋芽細胞株 C2C12 細胞に個々に FuGene6 でトランスフェクションして、その後筋分化誘導して、C2C12 筋芽細胞の融合により形成される筋管の形成を観察し、筋管の形成が阻害されたクローンをピック

アップした。

2. ピックアップされた遺伝子について、C2C12 細胞及びマウス初代培養筋芽細胞の筋分化前、分化後の mRNA 発現を RT-PCR 及び real-time PCR を用いて調べた。

**C. 研究成果**

- 2200 個のマウス転写因子をコードする遺伝子（SiRNA ベクターとしては 4400 クローン）をスクリーニングしたが、その結果、71 遺伝子に対する SiRNA が筋管形成を阻害した。
- 71 個の遺伝子について RT-PCR 及び real time PCR によって筋分化前後の発現の変化を検討した。結果 17 遺伝子では分化後に mRNA レベルの上昇が認められた。4 遺伝子は逆に分化後に下がり、30 遺伝子に関しては其の発現は筋分化誘導後に変化がなかった。
- 筋分化誘導後に発現が著明に上昇する遺伝子 4 つに関してはノーザンブロットを行ない、結果を確認した。
- 3 で筋分化誘導後に顕著な発現上昇が確認された 3 つの遺伝子については a) cDNA のクローニングを行った。現在発

現ベクターの構築中である また、b) 特異抗体の作成 c) ノックアウトマウスの手配を開始した

#### D. 考察

今回、我々は 2200 個にも上るマウス転写因子をコードする遺伝子全ての筋分化への関与を SiRNA ライブラリーを用いて調べた。スクリーニングの結果、筋管形成を阻害した 71 遺伝子が筋分化制御因子の候補として同定されたが、これらの転写因子がどのように筋分化に関与しているか、今後検討して行く必要がある。

最近、骨格筋以外の組織（骨髄、胎盤等）や筋細胞へ分化する幹細胞が単離され、また ES 細胞から誘導する事により、移植に供せられる事が多くなってきている。筋分化の制御機構を明らかにする事はこういった筋ジストロフィー等における多能性幹細胞移植治療にも多いに役立つと期待される。

#### E. 結論

筋分化過程には多くの転写制御因子のネットワークが働いていると推察され、今回のマウス転写因子の genome-wide なスクリーニングは筋分化制御ネットワークに関わる因子を同定するのに有効であると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

1. Uezumi A, Ojima K, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, : Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle Biochem Biophys Res Commun, 341:864-73, 2006
2. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Kosaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N: Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation. J Bone Miner Res. 21(5):722-34. 2006
3. Yokota T, Lu QL, Morgan JE, Davies KE, Fisher R, Takeda S, Partridge TA:

Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. J Cell Sci. 119(Pt 13):2679-87. 2006

4. Shiga K, Yoshioka H, Matsumiya T, Kimura I, Takeda S, Imamura M. zeta-Sarcoglycan is a functional homologue of gamma-sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex. Exp Cell Res. ;312(11):2083-92. 2006.
  5. Pramono ZA, Lai PS, Tan CL, Takeda S, Yee WC: Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin\_v1. Hum Genet. 120(3):410-9. 2006
  6. Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, Nakamura A, Wada M, Nakura M, Shimatsu Y, Tomohiro M, Takahashi A, Machida N, Wakao Y, Takeda S: Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD<sub>J</sub>): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies BMC Cardiovasc Disord. 6:47. 2006
  7. Suzuki N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Future Neurology, 2(1), 87-96 2007
  8. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I: Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. J Cell Biol. 176(3):329-41. 2007
  9. 松尾雅文、武田伸一：最近分かった筋ジストロフィーの病態と治療. 脳と発達 38(2) : 129-131, 2006
  10. 横田俊文、武田伸一：筋ジストロフィーに対する遺伝子治療 の試み. 医学のあゆみ 216(10) : 743-747, 2006
  11. 上住聡芳、鈴木直輝、武田伸一：筋疾患の病態と診断, 治療戦略の最前線筋ジストロフィーの再生医療. 小児科診療・第69巻・4号 : 570-574, 2006
  12. 西山章代、武田伸一：筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療. CURRENT INSIGHTS IN Neurological Science VOL.14 No.1: 8-9, 2006
- ##### II. 学会発表
1. Takeda S: The canine muscular dystrophy testing facility, Wellstone High Throughput Screening (HTS) Workshop Children's National Medical Center (CNMC), Washington D.C., April 18, 2006

2. **Takeda S** : Muscle stem cells and muscle regeneration Seminar in Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, Washington D.C., April 19, 2006
3. Suzuki N, Motohashi N, Uezummi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, **Takeda S** : Dislocated neuronal nitric oxide synthase controls myofiber size during tail suspension. Vth Asian and Oceanian Myology Center Meeting in Cebu, Philippines, May 25-27, 2006
4. Ikemoto M, Fukada S, Uezumi A, Masuda S, Ampong BN, Miyoshi H, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, **Takeda S** : Transplantation of SM/c-2.6+ satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mic American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006
5. S. Takeda: Gene therapy in canine muscular dystrophy Symposium, XIth International Congress on Neuromuscular Diseases Istanbul, Turkey, July 3, 2006
6. Nishikawa M, Hirata K, Machida K, Takahashi Y, Yuasa K, **Takeda S**, Takakura Y: Increased transgene expression of dystrophin in mdx muscle by RNAi-mediated silencing of calpain expression American Society of Gene Therapy, Baltimore, June 1, 2006  
Suzuki N, Motohashi N, Uezumi A, Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Yoshimura T, Itoyama Y, Aoki M, **Takeda S** : Dislocated neuronal nitric oxide synthase results in muscle atrophy during tail suspension XI th International Congress of the World Muscle Society, Bruges, Belgium, October 4-7, 2006
7. Yokota T, Qi Lu, Partridge T, Nakamura A, **Takeda S**, Hoffman E: Antisense morpholino injection restores extensive dystrophin expression to potentially therapeutic levels in canine muscular dystrophy in vivo XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
8. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Nakamura A, Miyagoe-Suzuki Y, Nakai H, **Takeda S** : A recombinant serotype 8 AAV-mediated gene transfer into canine skeletal muscle XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
9. Nishiyama A, Ampong B, Kinoshita K, Nakai H, **Takeda S** : Efficacy of adeno-associated virus serotype 8 in gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan deficient mice XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, November 9-12, 2006
10. **Takeda S** : The NCNP dog facility Wicker Project Workshop: Exon skipping in Muscular Dystrophy Workshop, Washington D.C., Jan 7-8, 2007
11. **Takeda S** : An adeno-associated virus-mediated gene transfer into canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) AFM Workshop, Evry, France, Jan 15-17, 2007
12. 武田伸一 : 筋ジストロフィー治療の新戦略-筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.12, 2006
13. 鈴木直輝, 武田伸一 : マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO を介した筋萎縮の分子機構の解析 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006
14. 武田伸一 : 筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療第 27 回日本炎症・再生医学学会, 東京, 7.11, 2006
15. 鈴木直輝, 本橋紀夫, 上住聡芳, 深田宗一朗, 鈴木友子, 吉村哲彦, 糸山泰人, 青木正志, 武田伸一 : マウス尾部懸垂モデルにおける nNOS/NO を介した筋萎縮の分子機構の解析 第 27 回日本炎症・再生医学学会, 東京, 7.11, 2006
16. Oshima S, Nishiyama A, Yuasa K, Nakamura A, Yoshimura M, Miyagoe-Suzuki Y, Nakai H, **Takeda S** : A Recombinant AAV-mediated gene transfer into canine skeletal muscle 第 12 回日本遺伝子治療学会, 東京, 8.25, 2006
17. Nishiyama A, Beryl A.N, Yuasa K, Nakai H, **Takeda S** : Efficacy of adeno-associated virus serotype 8 in  $\alpha$ -sarcoglycan deficient mice 第 12 回日本遺伝子治療学会, 東京, 8.25, 2006
18. 武田伸一 : ジストロフィン欠損を巡る新たな分子病態 第 36 回小児神経学セミナー, 神奈川, 10.9, 2006
19. 武田伸一 : 筋ジストロフィーに対する遺伝子治療日本人類遺伝学会第 51 回大会, 米子市, 10.18, 2006
20. 武田伸一 : 筋ジストロフィーの臨床遺伝学 第 3 回遺伝医療倫理討論ピアカウンセラー養成講座, 福岡県, 10.28-29, 2006
21. 武田伸一 : 筋ジストロフィーの治療法開発の現状藤田保健衛生大学第 4 回 21 世紀 COE 国際ワークショップ, 名古屋市, 12.5,

2006

22. 谷端淳, 鈴木直輝, 鈴木友子, 武田伸一 : 内在性ユートロフィンの発現調節機構の解明日本分子生物学会 2006 フォーラム, 名古屋市, 12. 6, 2006
23. 武田伸一 : 筋ジストロフィーに対する治療法開発東北大学医学部神経内科セミナー, 仙台市, 1. 31, 2007
24. 武田伸一 : AVV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療研究の進展ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会, 東京, 2. 21, 2007

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

成人末梢血由来間葉系幹細胞の提供システムの  
速やかな確立と育成疾患への適応の研究分担研究者 落合淳志  
国立がんセンター  
東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理 部長

研究要旨：成人末梢血由来間葉系幹細胞の存在を明らかにし、その採取のための条件を検討する目的で、肺がん患者の切除肺動脈内に存在する血液内の慣用景観細胞の存在と、その表面マーカーを検索した。また、今年度は動脈外膜にも骨および脂肪への分化能を有する間葉系幹細胞が存在することを明らかにした。この細胞は試験管内において長期培養可能であり、実際の臨床導入への可能性の検討が必要と思われた。

**A. 研究目的**

成人末梢血内に間葉系幹細胞が存在し、その末梢血由来間葉系幹細胞が採取可能になれば、間葉系幹細胞の採取および利用が可能になる。本研究は、成人末梢血由来間葉系幹細胞の存在を明らかにし、その採取のための条件を検討するものである。

**B. 研究方法**

成人末梢血由来間葉系幹細胞を肺がん患者の切除された肺組織内に含まれる肺静脈および肺動脈から採取された血液により分離し、市販の間葉系幹細胞培地にて培養を行った。同時に、動脈外膜に存在する間葉系幹細胞を単離し、その培養条件を検討した。また、これら間葉系幹細胞を脂肪、骨そして軟骨への分化能を試験管内にて検討した。同時に試験管内における継代数や形質変化をあわせて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト血液や血管外膜細胞を扱うため、本研究内容は国立がんセンター倫理審査にて審査許可を得た後、採取に当たり患者への説明と同意を得て行った。

**C. 研究結果**

成人末梢血である肺がん患者の肺動脈内には間葉系幹細胞と同様に、ヒト肺動脈が今国も間葉系細胞が存在することを初めいて明らかにした。これら動脈外膜由来間葉系幹細胞は血液由来間葉系幹細胞と同様に骨組織および脂肪組織には分化するが軟骨組織への分化は認められなかった。また、成人血液由来間葉系幹細胞の継代は多くが5代までしか培養できなかったが、外膜由来間葉系幹細胞は、10代を越えて培養可能であり、また、単コロニー培養により多分化

能が存在することを明らかにした。

**D. 考察**

本研究において、成人末梢血中だけでなく大動脈外膜にも間葉系幹細胞が存在することが初めて示された。血液由来間葉系幹細胞に比べ外膜由来間葉系幹細胞は採取後の長期間の継代が可能であった。

肺動脈外膜だけでなく、どの程度の血管外膜に間葉系幹細胞が存在するのか明らかにする必要があると考えられた。

**E. 結論**

成人ヒト末梢血だけでなく、大動脈壁外膜には骨および脂肪細胞へ分化能を有する間葉系幹細胞が存在することが明らかになった。外膜由来間葉系幹細胞は長期間継代可能であり、また、分化能も比較的長期間保たれている事より、実際のヒト組織再構築に用いられる可能性もあると考えられた。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

## 1. 論文発表

Sangai T, Ishii G, Fujimoto H, Ikehara A, Ito T, Hasebe T, Magae J, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A. Hormonal stimulation increases the recruitment of bone marrow-derived myoepithelial cells and periductal fibroblasts into the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 11;346(4):1173-80. 2006

## 2. 学会発表

なし



H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞の 分化機構に関する分子レベルでの解明

分担研究者

望月直樹

国立循環器病センター研究所  
循環器形態部 部長

**研究要旨** : 骨髄間葉系細胞がさまざまな組織(骨、軟骨、筋肉)へ分化する。この分化には間葉系細胞から分泌される分子あるいは細胞外からの分化刺激を受ける間葉系細胞の受容体が重要であると考えた。これらの分子をsignal sequence trapを用いて検討したところ細胞の極性を決定する重要な因子PTK7を同定した。PTK7は細胞接着に重要な分子であることがわかり、分化にPTK7を介した接着の重要性が示唆された。

### A. 研究目的

骨髄・臍帯血・月経血間葉系細胞は骨・軟骨・脂肪細胞に分化する。このために再生担当細胞として細胞治療を目指した臨床応用可能な有効な資源になると考えられている。間葉系細胞の分化に重要な、あるいは分化抑制機構を解明することで、分化を促す情報伝達系が明らかになると考え、この分子メカニズム解き明かすことを目的とした。

昨年度Signal Sequence Trap (SST) 法で、候補分子として同定したPTK7について分化への影響を調べた。PTK7が接着分子として機能することで間葉系細胞の分化を調節していることが考えられた。

間葉系細胞の脂肪・筋肉・骨への分化に対するPTK7の機能の意義を検討し、これを分化のコントロールに応用し再生担当細胞を効率よく分化させる手段を開発することが本研究の最終目的である。

### B. 研究方法

#### 1. SSTに用いたヒト骨髄間葉系細胞

ヒト間葉系細胞は本研究の主任研究者梅澤より入手した(生育医療センターの倫理委員会で承認を得ている)。提供されたRNAからcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーcDNAをSST-REXで使用するレトロウイルスベクターに組み込んだ。

#### 2. SST-REX法によってえられたPTK7の機能の解明

SST法は東京大学医科学研究所北村教授の開発さ

れた方法(SST-REX, retrovirus-mediated expression screening, Nat. Biotech. 17: 487 (1999))を用いた。300クローン得られた膜貫通分子あるいは分泌因子のなかでPTK7に着目して、その機能解析を行った。

- ①PTK7の抗体の開発
- ②PTK7の細胞間接着制御機構の解明
- ③PTK7のリン酸化の有無の検討
- ④PTK7の結合分子の探索を行った。

### C. 研究結果

#### PTK7の機能

PTK7はtyrosin kinase ドメインを有するがキナーゼ活性を有しない1回膜貫通型蛋白質である。イムノグロブリン様ドメイン細胞外ドメインを持っていて、PDGF, VEGF受容体ファミリーと類似していた。

#### 1. PTK7は細胞間接着を調節する。

接着に関係するか否かを検討したところホモフィリック結合ではないことがわかった。PTK7を発現しない細胞とPTK7を発現する細胞の接着が見られることから上記結論にいたった。浮遊系の細胞である293F細胞は通常凝集が見られないが、PTK7-EGFP(green fluorescent proteinタグ付きPTK7)を発現させるとPTK7-EGFPを発現する細胞同士だけではなく、PTK7発現細胞と野生型293F細胞も接着した。

#### 2. PTK7はGalectin-1と結合する。

PTK7が何らかの受容体としての機能を有しているか否かを調べるために、PTK7結合蛋白質をTOF-MSで解析した。PTK7を強制発現した細胞を

回収して、SDS-PAGE後銀染色を行いPTK7を発現しない細胞から回収した蛋白質との差を検討した。PTK7がGalectin-1分子と結合することがわかった。Galectin-1分子との結合依存性にPTK7を介した細胞の接着が促進されるか否かを検討している。

### 3. PTK7のリン酸化は他のチロシンキナーゼにより受ける。

PTK7はチロシンキナーゼ活性を持たないので、細胞内情報伝達系を制御するためには自身がリン酸化を受ける必要が考えられた。このため、受容体型チロシンキナーゼ(EGF, VEGF, Eph) あるいはnon-receptor型チロシンキナーゼ(Src, Fer)でPTK7がリン酸化を受けるか検討した。Ferチロシンキナーゼによって著名なリン酸化を受けることがわかった。

## D. 考察

間葉系細胞が細胞表面に発現して分化或いは増殖を調節する可能性のある分子として、PTK7を同定した。PTK7分子が細胞接着に関わる分子であり、細胞接着(凝集)を促進することを明らかにした。細胞間接着は細胞-細胞の情報伝達にはカドヘリンに代表されるように非常に重要である。また、細胞間接着が解除されたときのmesenchymal-epithelial transitionは、従来カドヘリン分子が重要であることが示唆されていた。本研究では、PTK7もホモフィリックではないが、結合促進蛋白質であり、これが増殖抑制にかかわることを示唆する結果を得たことになったと考えている。

一方PTK7が細胞外シグナルの受容体として機能する可能性も考え、リガンド探索としてPTK7の細胞外ドメインに結合する蛋白質Galectin-1を同定した。Galectin-1はこれまでneural stem cellの増殖が可能であることから非常に注目されている。他にもOsteoblastic differentiationやadipocyte differentiationに関係するという研究もこれまでに発表されており、間葉系細胞にGalectin-1が作用する受容体としてPTK7が重要である可能性がある。主任研究者との共同研究でこの点を解明することを計画している。

またこれまでにGalectin-1の受容体は同定されておらず、PTK7が受容体となっている可能性も十分考えられる。Galectin-1は細胞の運動制御を調節していることも報告されている。またPTK7のノックアウトマウスの解析からPTK7がplanar cell polarity (PCP)であることが予想されておりPCPに重要な細胞運動がGalectin-1-

PTK7系で制御されていることも考えられた。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 結論

間葉系細胞に発現していて、機能未知の分子PTK7の間葉系細胞の分化・増殖に関わる機能を検討した。PTK7がGalectin-1分子と結合することがわかった。また、PTK7が細胞間接着に関わることを突き止めた。PTK7を介した情報伝達を改変することで間葉系細胞の分化促進を得られる可能性が考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 研究業績「英文」) 【原著】

1. Masuda M, Takeda S, Sone M, Ohki T, Mori H, Kamioka Y, Mochizuki N. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J.* 25: 2889-2897, 2006
2. Maeng YS, Min JK, Kim JH, Yamagishi A, Mochizuki N, Kwon JY, Park YW, Kim YM, Kwon YG. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-kappaB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. *Cell Signal* 18; 994-1005, 2006
3. Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N. Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res.* 98: 897-904, 2006
4. Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Sako K, Mochizuki N. Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1. *J Biochem. Mol. Biol.* 39: 132-139, 2006
5. Linguh H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene* 25:3547-3556, 2006

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。