

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

# 目 次

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	589
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	脇田隆宇	636
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	656
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	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
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	691
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	707
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	720
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	728
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	740
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	761
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	772
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	783
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	795
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	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
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	836
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	839
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	919
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	939
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	951
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	966

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 ……	979
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 ……	1000
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 ……	1021
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 ……	1042
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 ……	1054
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 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一 ……	1115



## 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。しかし、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 (一部ヒト 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、そこから無血清無フィーダー環境において血液細胞 (2次造血) の分化誘導を試みた。まず、未分化維持継代培養に関しては、サルとヒト ES 細胞の両方において、無血清・無フィーダー・無サイトカイン環境において、長期にわたって安定した増殖と未分化維持が可能で、サルでは40継代以上、ヒトでは25継代以上の長期間の培養が可能であった。また、このように未分化維持されたES細胞は、凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能で、テラトーマ形成能も保持していた。また、昨年見出したマウス ES 細胞の未分化維持に効果のある低分子化合物について、検討した14種類の化合物のうち7つについてサル ES 細胞の無フィーダー培養において明らかな未分化維持効果がみられた。もう一つの課題である血細胞分化誘導に関しては、サル ES 細胞から無フィーダー無血清環境において血液細胞、とりわけ好中球を効率よく分化誘導させるために、新しい発想の元に20種類近い手法を検討して、数種類の無フィーダー培養系が構築された。培養系の概要は、前半と後半が異なるシステムからなる新しい培養方法で、前半が胚様体などの細胞凝集塊形成を駆使する手法で、後半が無フィーダー平面培養であった。前半で形成された細胞凝集塊はほぐすことなく平面培養に移行され、平坦な広がりのある単層培養となり活発な分化増殖が観察された。サイトカイン、増殖因子は系により部分的に異なるが、IGF2 (insulin-like growth factor 2)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、SCF (stem cell factor)、FL (Flt-3 ligand)、IL-3 (interleukin 3)、IL-6 (interleukin 6)、TPO (thrombopoietin)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) を用いた。最も優れた系においては、浮遊細胞の9割がCD45陽性の血液細胞で、このうち半数以上が未分化な芽球で10-40%が成熟好中球の形態を示した。これらの好中球は、好中球特異的な特殊染色が全て陽性で、貪食能、活性酸素産生能、遊走能等の成熟機能もすべて陽性で、十分な機能を有する成熟好中球と考えられた。この様な、未分化血球と成熟好中球の共存する培養系は長期間維持することが出来た。また、凍結融解後も、同様な状態を保つことが出来た。

### 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、さらに今年度は、それらの化合物がサル ES 細胞の未分化維持にも有効であるか否かを検討する。

一方、未分化維持と並んで重要なもう一つの課題である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血球分化培養に関する諸問題を克服するために、OP9 細胞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 を導入すると共に、20 種類近い多くの手法を幅広く精力的に検討して、数種類の無フィーダー培養系が構築されたので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 未分化維持増殖培養法

サル ES 細胞は、京都大学再生医科学研究所と田辺製薬で樹立された CMK6 株を用いた。

未分化サル 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材はマトリゲルを用いた。

サル ES 細胞の無血清、無フィーダー培養の条件は、Noggin と FGF 添加で検討した。さらに、これらのサイトカインを全く添加しない条件も試みた。

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) で検討を行った。ヒト ES 細胞の場合も、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。多分化能の評価は、テラトーマ形成能によって行った。

また、新規合成化合物の未分化維持効果の検定

は以下のように行った。すなわち、常法に従って培養されたサル ES 細胞のコロニーを、0.1% コラゲナーゼを用いてフィーダー細胞から分離し、マトリゲルコートしたディッシュに播種し、無フィーダー培養を開始した。この際、培地は、ES 細胞培養培地 + 5 ng/ml bFGF を用い、ここに DMSO( $\times 1000$ ) または化合物 (4 mg/ml) を添加した。培地交換は 2 日に一度行った。継代は、0.25% Trypsin + 20% KSR + 1 mM  $\text{CaCl}_2$  を加えて、37 °C で 5 分反応させた後、ピペッティングでコロニーをディッシュから解離させ、適当なコロニーサイズになるようにコロニーを分割して、新しいマトリゲルコートディッシュに播種した。

### 2. 血液細胞分化誘導培養法

分化誘導に供される未分化サル ES 細胞は、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。

さらに、一部の実験においては、未分化サル ES 細胞を、無血清無フィーダー無サイトカイン培養 (KSR 含有無血清培地を用いてマトリゲル上で培養し、しかも、外から Noggin や FGF を添加しない培養系) で未分化維持増殖させて分化誘導に用いた。

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、無フィーダー分化培養の新しい試みとして昨年度と同様に conditioned dish を作成して用いた。conditioned dish とは、フィーダー細胞 (今回は OP9 細胞と 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。さらに、高品質の完全無フィーダー培養として、今年度はゼラチンコートディッシュを検討した。

今年度は、無フィーダー培養の 1 つとして重要な embryoid body (2 週間程度の長期の系) もしくは短期間 (3 - 7 日間) の細胞凝集塊の形成を行った。これらの手法単独の分化誘導培養も試みたが、これらの系を行った後、細胞凝集塊をほぐさずに、前期の無フィーダー培養系 (conditioned



dish、ゼラチンコートディッシュ)へ移行する手法を新たに試みた。

細分類では20種類近くの分化誘導培養を行ったが、前半の細胞凝集塊作成法によって大きく4種類に分類される。細胞凝集塊を hanging drop 法で行いその後平面培養に移行する手法、細胞凝集塊を96穴プレート法で行いその後平面培養に移行する手法、細胞凝集塊を Bhatia らの手法で行いその後平面培養に移行する手法、細胞凝集塊を当研究室独自の方法(佐伯晃一研究員による)で行いその後平面培養に移行する手法の4種類である。後半の平面培養は、OP9細胞との共培養、OP9細胞の conditioned dish、ゼラチンコートディッシュ、マトリゲルコートディッシュ、ヒト初代間葉系幹細胞との共培養、10T 1/2細胞との共培養、10T 1/2細胞の conditioned dish、などである。

サイトカイン、増殖因子は、分化誘導系によって、文献などを参考に一部異なる組み合わせを用いた。hanging drop 法による場合は、VEGF (vascular endothelial growth factor)、BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、SCF (stem cell factor)、FL (Flt-3 ligand)、IL-3 (interleukin 3)、IL-6 (interleukin 6)を用いた。96穴プレート法による場合は、IGF2 (insulin-like growth factor 2)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、SCF (stem cell factor)、FL (Flt-3 ligand)、IL-6 (interleukin 6)を用いた。Bhatia らの手法による場合は、BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、SCF (stem cell factor)、FL (Flt-3 ligand)、IL-3 (interleukin 3)、IL-6 (interleukin 6)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)を用いた。当研究室佐伯の手法による場合は、IGF2 (insulin-like growth factor 2)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、SCF (stem cell factor)、FL (Flt-3 ligand)、TPO (thrombopoietin)、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)を用いた。

分化の判定は、形態、表面抗原、等によった。細胞の形態や同定は、ライトギムザ染色やその他の特殊染色(ミエロペルオキシダーゼ染色、ナフチルプチレート染色、ナフトール ASD クロロアセテート染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色)により行った。CD34、CD45等の表面抗原はBD社のFACSCaliburにより行った。食食能は、ラテックスビーズもしくはザイモザンの食食により同定した。活性酸素産生能は、NBT還元能により定量した。遊走能は、ケモタキセル(クラボウ社製)を用いて行い、遊走因子はFMLP、IL-8、LTB4を用いた。造血コロニーアッセイは、市販のキットを用いて行った。

(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、研究はいっさい含まれない。

### 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。

さらにその後、研究者の追加削除、使用期間と使用の方法に関する変更についても平成18年11月24日に文部科学大臣の確認(18諸文科振第743号)を得た。

### C. 研究結果

#### 1. 未分化維持増殖培養法

サル ES 細胞の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) を添加して無血清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。40 継代以上培養可能で



あった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。

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、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。40 継代以上の培養が可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。このように継代した未分化サル ES 細胞は、テラトーマ形成能を有していた。

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。表面コートはサル ES 細胞の場合と同様のマトリゲルであるが、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血清無フィーダー培養、すなわち、KSR 含有無血清培地の中で Noggin (500 ng/ml) と FGF (40 ng/ml) を添加して無血清無フィーダー培養を行ったところ、安定した増殖と未分化維持が可能で、40 継代以上培養可能であった。

最後に、ヒト ES 細胞においても無血清、無フィーダーで未分化維持状態に有る細胞を、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、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。25 継代以上培養可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。このように継代した未分化ヒト ES 細胞は、テラトーマ形成能を有していた。この成果は、用いたヒト ES 細胞のうちでの 2 株 (KhES-1、KhES-3) において達成されたが、KhES-2 においては困難であった。

新規低分子合成化合物の未分化維持作用に関しては、化合物または DMSO (コントロール) を培地に添加し、サル ES 細胞の無フィーダー培養を行った。培養を開始して数日間、化合物添加群、コントロールとも細胞は増殖を続け、細胞の形態や増殖速度などに差はみられなかったが、継代操作により、いずれの化合物を添加した場合も多くの細胞が脱落した。さらに数日間の培養後、いくつかの化合物を添加した細胞について、コントロールと明確な差が現れ、フィーダー上で培養した未分化状態のサル ES 細胞と非常に良く似たコロニーを形成した。これに対し、DMSO およびその他の化合物を加えた場合こうしたコロニーはみられなかった。およそ 3 ヶ月間この条件下で培養した細胞を、霊長類 ES 細胞の未分化マーカーである SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 の抗体で免疫染色した。その結果、これらのコロニーがこの 3 種類の未分化マーカーを発現している

ことが確認でき、この細胞が未分化状態を維持していることが示された。

## 2. 分化誘導培養法

今回検討した手法は、培養前半の細胞凝集塊作成法によって大きく 4 種類に分類された。

細胞凝集塊を hanging drop 法 (数日間の短期)で行いその後平面培養に移行する手法においては、後半の平面培養は、OP9 細胞との共培養、OP9 細胞の conditioned dish、10T 1/2 細胞の conditioned dish、ゼラチンコートディッシュ、マトリゲルコートディッシュ、を検討した。OP9 細胞との共培養、OP9 細胞の conditioned dish、10T 1/2 細胞の conditioned dish においては、細胞凝集塊形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した細胞凝集塊は次第に平坦となって周囲に広がり、細胞凝集塊が存在した中心付近から囊状の構造物が出現した。その囊状構造物の中には球状の細胞が充満していた。これらの細胞は 10-30% CD34 陽性であった。ゼラチンコートディッシュにおいては、さらに血球コロニー形成能陽性で好中球への分化も確認された。一方、マトリゲルコートディッシュにおいては、血球産生も認められたが、むしろ血管内皮細胞の分化誘導が優位であった。以上の系は通常 FCS 存在下で行ったが、一部の実験においては (10T 1/2 細胞の conditioned dish、ゼラチンコートディッシュ) 無血清でも分化誘導ができ、特にゼラチンコートディッシュにおいてエステラーゼ染色陽性、ペルオキシダーゼ染色陽性の好中球が確認された。なお、この手法においては、MEF 上で未分化維持したサル ES 細胞から分化をスタートした。

細胞凝集塊を 96 穴プレート法 (2 週間程度の長期)で行いその後平面培養に移行する手法においては、後半の平面培養は、ヒト初代間葉系幹細胞との共培養、10T 1/2 細胞との共培養、10T 1/2 細胞の conditioned dish、を検討した。この手法においては、無血清無フィーダー無サイトカイン培養で未分化維持したサル ES 細胞を用いるという利点があったが、CD34 陽性細胞の出現率や囊状構造物と球状細胞の出現が顕著ではなかった。ただし、ヒト初代間葉系幹細胞との共培養においては CD34 陽性細胞が高効率に認められた。

細胞凝集塊を Bhatia らの手法 (2 週間程度の長期)で行いその後平面培養に移行する手法においては、後半の平面培養は、10T 1/2 細胞の conditioned dish、ゼラチンコートディッシュ、を検討した。15 日間の胚様体形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した胚様体は次第に平坦となり周囲に広がり、約 2 週間後には胚様体が存在した中心付近から囊状の構造物



が出現した。その囊状構造物の中には球状の細胞が充満していた。その後の継代により、培養系には不定形の付着細胞と球状の浮遊細胞が混在する状態となった。球状の浮遊細胞は CD45 陽性 (90%以上) であり血液細胞と考えられた。この血液細胞のライトギムザ染色形態は、半数以上が未分化な芽球の形態で、10-40%が成熟好中球の形態を示した。これらの好中球は、ミエロペルオキシダーゼ染色、ナフトール ASD クロルアセテート染色、好中球アルカリフォスファターゼ染色が陽性であり、成熟好中球と考えられた。また、貪食能、活性酸素産生能、遊走能も、いずれも陽性で、十分な機能を有する好中球と考えられた。この様な、未分化血球と成熟好中球の共存する培養系は 100 日間以上維持することが出来た。また、凍結融解後も、同様な状態を保つことが出来た。この手法においても、無血清無フィーダー無サイトカイン培養で未分化維持したサル ES 細胞を用いるという利点があった。

細胞凝集塊を当研究室独自の手法(佐伯晃一研究員による)(数日間の短期)で行いその後平面培養に移行する手法においては、後半の平面培養は、10T 1/2 細胞との共培養、10T 1/2 細胞の conditioned dish、を検討した。細胞凝集塊形成に引き続き、平面培養を行うと、フラスコの底に接着した細胞凝集塊は次第に平坦となり周囲に広がり、細胞凝集塊が存在した中心付近から囊状の構造物 appeared。その囊状構造物の中には球状の細胞が充満していた。これらの細胞は 30-60% CD34 陽性であった。球状細胞の 3 割が CD11 陽性の骨髄系細胞で、形態、エステラーゼ染色、ペルオキシダーゼ染色において好中球の存在を確認した。

#### 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た。

さらに、ヒト ES 細胞においても、無血清無フィーダー無サイトカイン環境による未分化維持増殖培養が達成され、今後はヒトの系での研究が大きく進展することが期待される。

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。

昨年度に引き続き、マウス ES 細胞に対して

未分化維持機能を有する 14 種類の化合物のうち 7 化合物が、サル ES 細胞に対しても効果をもつことがわかった。また、これらの化合物を用いて、サル ES 細胞を無フィーダーで、未分化性を維持したまま、長期間培養することができた。今後、無フィーダーで培養した細胞を分化誘導条件下におき、フィーダー上で培養した細胞と同じように分化能を持つかどうかを検討する必要がある。また、今回の研究ではサル ES 細胞を用いたが、ヒト ES 細胞も同じように無フィーダーで培養ができるかどうか重要な点であり、今後検討していく予定である。現段階では、この化合物がどのようなメカニズムで未分化維持の作用をもたらしているのか分かっていないが、このメカニズムの解明が霊長類 ES 細胞の未分化維持機構の解明につながる可能性もあり、非常に興味深い。

本年度は、サル ES 細胞からの血液細胞の分化誘導を目的として、さまざまな手法を試み、重要な成果を上げることができた。分化誘導培養の前半を複数の手法による細胞凝集塊形成を行わせて、その後、後半は平面培養を行った。細胞凝集塊形成は、2 週間程度の長期による胚様体をほぼ形成していると思われる手法と、数日間の短期による胚様体形成に至らないと思われる方法の 2 種類で、いずれの方法でも効率の良い分化誘導が可能であり、細胞凝集塊形成の期間は短くても良いと考えられた。いずれにしてもこの期間は浮遊培養でありフィーダー細胞は不要で、研究目的の重要要素である無フィーダー培養は達成できた。後半の平面培養に関しては、まず、基本に立ち返り OP9 という ES 細胞からの血球分化に定評のあるフィーダー細胞を用いて一定の結果を得て、次に、あまりフィーダー細胞として用いられない 10T 1/2 細胞を検討して良好な成果を得た。次に、無フィーダーの一形式である conditioned dish (OP9, 10T 1/2) を用いて分化誘導に成功し、最終的にはゼラチンをコートしたのみの完全無フィーダー血球分化誘導に成功した。

今回の検討で、種々の培養系において相次いで良好な成果を得ることができた理由に関しては、幾つか可能性が考えられる。まず、特定のロットの牛胎児血清存在下での分化誘導であるが、他のロットの血清存在下でも良好な結果を得ており、さらに、無血清分化誘導培養もある程度成功しており、血清の寄与は少ないと考えられる。今回の手法においては、前半は細胞凝集塊形成で後半は平面培養である。細胞凝集塊形成のみで押しでも、あるいは、初めから平面培養のみでも不十分で、この 2 つの手法がこの順序で組み合わせられたことが良好な結果を生むことにつながったものと想定



される。また、前半で形成された細胞凝集塊をほぐすことなく後半の系に移行して、次第に無理なく、平坦な平面培養にできたことも成功の原因であると考えられる。前半で重要な初期分化のシグナルが惹起され、後半では分化と共に2次元的な増殖が惹起されたものと考えられる。

今回検討した幾つかの系においては数十%の比較的高い効率で好中球の誘導が確認され、霊長類のES細胞から、世界に先駆けて、成熟好中球の産生に成功した。このような成果は、現在、ヒトES細胞にも応用され、同様の注目すべき成果を生み出している。当初に計画ではサルES細胞に限定されていた本研究課題を十分に達成した上で、ヒトES細胞にもつながる結果を出せたので、さらに臨床応用に近づく方向で研究を推進してゆきたい。

## E. 結論

本年度は最終年度に当たって、カニクイザルES細胞のみならず、ヒトES細胞も一部用いて、無血清、無フィーダー、無サイトカイン培養という動物成分を排除した経済効率の優れた未分化維持増殖継代培養法の開発を達成することができた。また、サル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。一方、血球分化誘導に関しては、サルES細胞から無フィーダー無血清環境において好中球を効率よく分化誘導させるために、多くの手法を幅広く精力的に検討して、数種類の無フィーダー培養系が構築された。培養系の概要は、前半と後半が異なるシステムからなる培養方法で、前半が胚様体などの細胞凝集塊形成を駆使する方法で、後半が無フィーダー平面培養である。前半で形成された細胞凝集塊はほぐすことなく平面培養に移行し、分化増殖が活発に観察された。最も優れた系においては、浮遊細胞の9割がCD45陽性の血液細胞で、このうち半数以上が未分化な芽球で、10-40%が成熟機能を有する好中球であった。この培養系は長期間維持することができ、凍結融解後も同様な状態を保つことが出来た。今後はヒトES細胞の系に応用してゆ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

1. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E,

Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ* 48:177-188,2006.

2. Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A: Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells. *Int J Hematol* 84:231-237,2006.
3. 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* 73:298-305,2006.

### 2. 学会発表

1. 中原正子、松山さと子、過足芳子、中村直子、佐伯晃一、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類(サル・ヒト)ES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞・血管内皮細胞分化。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
2. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、佐伯久美子、湯尾 明：霊長類ES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月、名古屋。
3. 中原正子、佐伯久美子、松山さと子、佐伯晃一、中村直子、過足芳子、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、湯尾 明：カニクイザルおよびヒトES細胞からの無フィーダー培養による造血細胞。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
4. 中村直子、過足芳子、佐伯久美子、中原正子、佐伯晃一、松山さと子、湯尾 明：カニクイザルES細胞からの無フィーダー培養条件下における継代培養可能な血管内皮細胞への分化誘導。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
5. 佐伯晃一、米田麻子、中原正子、末盛博文、中辻憲夫、佐伯久美子、湯尾 明：ヒトES細胞から分化誘導した好中球の機能解析。第6回日本再生医療学会総会、2007年3月、横浜。
6. Okuno T, Nakayama T, Inoue N, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S: An Efficient and Xeno-free



method for Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: The use of the Conditioned Medium from ES cell-derived Astrocytes. 4th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada, Jun, 2006.

7. Konishi N, Yamamoto M, Miyabayashi T, Kobayashi K, Suzuki Y, Kondo Y, Nito S: A synthetic compound maintains pluripotency of monkey and human embryonic stem cells without feeders. 4th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Tronto, Canada, Jun, 2006.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、米田麻子

出願人：国立国際医療センター、田辺製薬株式会社

特願2006-303929

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

---

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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