

によって、継代初期において既に両抗原とも陽性の細胞が約 20%以上を占め、継代後期には 50%を超えることを観察した。すなわち、継代の過程で両方の抗原陽性の細胞は決して減少せずにむしろ増加することを明らかにした。このような血管内皮細胞は 8 継代までは増殖し、 1×10^5 の未分化 ES 細胞から出発して最終的には 2×10^7 の分化細胞を得ることが可能であった。また、分化細胞は凍結融解後に耐え、VE-cadherin、PECAM-1 両抗陽性細胞の比率も低下しなかった。このような分化細胞における膜表面 VE-cadherin 陽性は、免疫染色によっても確認した。さらに、分化細胞は索状構造形成能を有し、アセチル LDL 取込機能が陽性で、成熟血管内皮細胞の指標である eNOS と vWF が免疫染色にて陽性であった。以上より、継代後の分化細胞は、均一な血管内皮細胞として増殖、分化していることが示された。すなわち、我々の開発した無フィーダー分化誘導システムは、ほぼ 100%の純度の血管内皮細胞を産生することが出来る系であることが示された。なお、分化細胞中には、未分化 ES 細胞 (Nanog, Oct-3/4, SSEA-4 陽性の細胞) の残存は認められず、pericytes などの平滑筋細胞も存在しないことが示された。また、リンパ管内皮細胞のマーカー (LYVE-1、Prox-1、VEGF-R4) も陰性であった。

サル ES 細胞かあ分化誘導においては、血管内皮細胞特異的な表面抗原である VE-cadherin と PECAM-1 の 2-color 解析によって、両抗原とも陽性の細胞が約 30%占めることを明らかにした。このような血管内皮細胞は 8 継代までは増殖し、 2×10^5 の未分化 ES 細胞から出発して最終的には 7×10^9 の分化細胞を得ることが可能であった。また、分化細胞は凍結融解後に耐え、VE-cadherin、PECAM-1 両抗陽性細胞の比率も低下しなかった。また、他の血管内皮細胞マーカーである VEGF 受容体、Tie-2、CD34 についても検討した。VEGF-R1 は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (human aortic endothelial cells, HAEC) と比較して同等の発現を示し、Tie-2 発現も、HUVEC、HAEC よりやや低い発現であったが、十分に発現していた。一方、未分化な細胞に発現する CD34 とリンパ管内皮や胎児性内皮のマーカーである VEGF-R3 は、分化細胞と HUVEC において高く発現し、両細胞の共通の未熟性が示唆された。

4. 分化誘導され血管内皮細胞の in vivo における機能解析

以上の解析結果により、サル、ヒトいずれの系においても、若干の未分化形質は有するが、成熟蛋白と成熟機能を有する高純度の血管内皮細胞であることが示された。最後に、生体内での機能について、コラーゲンプラクアッセーを行った。SCID マウスに移植後約 3 5 日間で、移植した血管内皮細胞 (ヒト HLA を有しヒト由来細胞であること (サルではサル HLA と交差反応してサル由来であることの証明になる)、内皮細胞マーカー PECAM-1 陽性であること、が確認された) は管空構造を形成し、しかも、その構造中には血液が流れ、マウス体循環と連結していること (マウス尾静注した FITC デキストランが確認されること) が示された。すなわち、マウス体内で血管内皮細胞として機能していることが示された。

5. 分化細胞の染色体分析

ヒト ES 細胞より分化誘導した上記の血管内皮細胞においても、染色体は正常核形であった。

6. 上記の 1 - 5 とは異なるサル ES 細胞の血管内皮細胞分化誘導系の成果

OP9 細胞との共培養によって、サル ES 細胞から、培養 4 日目以降に VEGF-R2 (KDR, Flk-1) 陽性細胞の誘導が可能であった。培養 8 日に目の細胞群から、セルソーターで VEGF-R2 (KDR, Flk-1) 陽性、VE-cadherin 陰性の分画を採取して、OP9 細胞と共培養すると、VE-cadherin 陽性、eNOS 陽性の血管内皮細胞が分化誘導された。一方、同じ分画を IV 型コラーゲン上で無フィーダー培養すると、 α smooth muscle actin 陽性、calponin 陽性の平滑筋細胞が分化誘導された。

7. 上記の 1 - 5 とは異なるヒト ES 細胞の血管内皮細胞分化誘導系の成果

10 日間の胚様体形成の系においては、VE-cadherin、PECAM-1 両方が陽性の hemangioblasts と考えられる細胞群が認められたが、VEGF-R2 (KDR, Flk-1) は陰性であった。この細胞集団からは、OP9 細胞との共培養によって、未分化造血細胞が誘導された。

D. 考察

我々の行った分化培養によって、霊長類 ES 細胞から極めて高効率に血管内皮細胞が分化誘導できた。世界的に見てもこれほど高効率での分化誘導は例が無く、極めて優れた技術開発に成功したと言っても過言ではない。

他の研究グループで達成できなかった高純度の

血管内皮細胞分化誘導が、我々の研究室で可能であった理由として、以下の2点が推測される。まず第1に、我々の分化誘導系に用いたサイトカイン、増殖因子は、どちらかという血液細胞の分化に作用するものが主体で、血管内皮細胞の分化誘導としては着想しにくい組み合わせである。現在進行中の解析によると、驚くべきことに、今回用いた血液系サイトカイン6種類は、ほぼ全てが血管内皮細胞の至適分化誘導に重要または必須であることが示唆されている。第2には、我々の分化誘導系は前半の細胞凝集塊形成浮遊培養と後半の平面培養の2段階システムからなる分化誘導系であることと考えられる。血液、血管内皮細胞分化誘導などの中胚葉分化法においては、このような2段階培養は殆ど試みられておらず、我々の系の独自性が良好な結果につながった。

今回の検討から、とりわけ様々の成熟蛋白と成熟機能の存在から、あるいは極めて均一な形態から、分化細胞全てが血管内皮細胞と想定される。すなわち、ほぼ100%の分化誘導効率と考えられる。しかし、VE-cadherin、PECAM-1の細胞膜発現の有無に関しては、均一ではなく、双方が陽性の集団と、双方とも陰性の集団に分かれることが明らかにされた。双方陽性集団が血管内皮細胞であることは疑いの余地がないが、双方陰性の集団について、分画操作などによる今後の詳細な解析が必要である。

血管を構成する細胞としては、血管内皮細胞が最も重要であるが、その他に血管平滑筋細胞や壁細胞も重要である。本年度の分担研究者の成果により、サルES細胞から、血管内皮細胞ばかりではなく血管平滑筋細胞も誘導されたことは、興味深い成果である。血管平滑筋細胞の混在による血管内皮細胞の誘導効率の低下の可能性や、平滑筋特異的なsmooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) 低い陽性率など課題は有るが、この興味深い成果を、来年度以降において更に発展させたい。

本年度の成果により、サル及びヒトES細胞から、無フィーダーの独自の分化システムによって、血管内皮細胞を高純度で作成することに成功した。このような成果は、類似した性質を有するヒトiPSに則応用可能であると考えられ今後の発展が期待される。我々の研究室では、平成20年度の早い時期にヒトiPS細胞の供与を受けて分化誘導研究を開始すべく、京都大学山中伸弥教授との共同研究を開始した。

E. 結論

本研究では、異種動物由来の成分の混入を回避

する培養法の開発のために、霊長類（カニクイザルおよびヒト）ES細胞を用いて、無フィーダー分化誘導系による血管内皮細胞の産生を試みた。血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件（15%牛胎児血清と6種類のサイトカイン・増殖因子（VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6））で培養を行い、血管内皮細胞の分化誘導が極めて順調に進捗した。培養法の基本は、前半のsphere形成浮遊培養と後半の平面培養であった。敷石状の細胞の増殖を経て（サルの場合は、さらに、中心部での嚢状構造物の形成を経て）、継代可能な血管内皮細胞が誘導された。均一な形態、全ての細胞でのeNOS、von Willebrand factor、アセチルLDL取込能陽性から、ほぼ100%が血管内皮細胞と考えられ、未分化ES細胞の残存、平滑筋細胞の混在、リンパ管内皮細胞の誘導、マウス細胞の混入は全て否定されたが、血管内皮細胞特異的マーカーであるVE-cadherin、PECAM-1の解析から、双方陽性群と双方陰性群が混在することが示された。また、誘導された血管内皮細胞は、in vitroとin vivoの双方の機能を有することも確認された。以上より、独自の無フィーダー分化誘導システムを駆使して、サル及びヒトES細胞からの極めて高効率な成熟機能を有する血管内皮細胞産生系を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A: The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis* 51:1-8, 2007.
2. Yamamoto M, Tase N, Okuno T, Kondo Y, Akiba S, Shimozawa N, Terao K. Monitoring of gene expression in differentiation of embryoid bodies from cynomolgus monkey embryonic stem cells in the presence of bisphenol A. *J Toxicol Sci* 32:301-310, 2007.
3. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita J-K, Kobayashi T-Y, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao T-H, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K,

Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S-I, Nakao K. A pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 227:2127-2134, 2007.

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、田辺三菱製薬株式会社
PCT/JP2007/71811

2. 学会発表

1. 中原正子、過足芳子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、佐伯久美子、湯尾明：サル・ヒトES細胞からの無フィーダー培養による高効率な血管内皮細胞分化法の開発。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。
2. 横山泰久、鈴木隆浩、坂田（柳元）麻実子、熊野恵城、高戸 毅、黒川峰夫、小川誠司、千葉 滋：ヒト Embryonic Stem Cell (hESC) からの機能的な好中球誘導。第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会・合同総会、2007年10月、横浜。
3. 中原正子、過足芳子、佐伯久美子、佐伯晃一、中村直子、松山さと子、米田麻子、小柳 真、近藤 靖、末盛博文、中辻憲夫、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高効率な血管内皮細胞分化誘導法の開発－各サイトカインの役割の検討及びin vivoでの機能評価－。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会、2007年12月、横浜。
4. 中村直子、過足芳子、中原正子、佐伯久美子、小柳 真、松山さと子、小柳明美、八木田秀雄、湯尾 明：霊長類胚性幹（ES）細胞からの高効率な血管内皮細胞分化。第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。
5. 横山泰久、鈴木隆浩、坂田（柳元）麻実子、熊野恵城、東 克巳、高戸 毅、黒川峰夫、小川誠司、千葉 滋：ヒト胚性幹細胞（hESC）から誘導した成熟的好中球の機能解析。第7回日本再生医療学会総会、2008年3月、名古屋。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許
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

ヒト脂肪由来幹細胞を用いた医薬品開発研究

所属 国立成育医療センター研究所

研究者 田上昭人

研究要旨 美容形成目的に脂肪吸引されたヒト脂肪組織より、脂肪由来幹細胞（間葉系細胞）の分離・樹立を行った。樹立したヒト脂肪由来幹細胞は、保存・バンクングを行い、さらに薬物毒性試験に応用を図った。脂肪由来幹細胞から種々の細胞（神経細胞や脂肪細胞等）への分化誘導法の確立を行い、その分化増殖過程における薬物の影響を分子生物学的・組織学的手法を用いて解析を行った。

分担研究者

- (1) 京都大学再生医科学研究所 田畑泰彦
- (2) 国立成育医療センター研究所 廣山眞巳
- (3) 株式会社バイオマスター 村瀬祥子

A. 研究目的

これまで薬物毒性・薬物代謝の評価試験には、種々の細胞や動物が用いられてきたが、種差の問題等が残されヒト組織を用いた試験法の開発が必要とされている。手術などで得られるヒト組織（主に肝臓、腎臓）を用いた薬物評価も試みられているが、充分量の検体を得ることは非常に困難であり、組織の均一性などの問題も残され、新たな試験法の開発が必要とされている。この問題点を解決する方法の一つとして、ヒト組織由来幹細胞の利用が注目されている。これまでに、血球系幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など種々の組織に由来する幹細胞が同定されているが、最近、ヒト皮下脂肪組織のなかにも間葉系幹細胞（脂肪幹細胞）が存在することが報告され、より簡便な細胞治療の供給源として期待されている。ヒトの皮下脂肪は体重の10%以上

を占める人体最大の組織である。美容形成目的に脂肪吸引された皮下脂肪より分離される脂肪由来幹細胞は、細胞治療の供給源としてのみならず、ヒト組織・細胞を用いた毒性評価にも応用することが可能である。脂肪由来幹細胞は間葉系の多能性を有するだけでなく、CD34陽性で血管新生などの治療にも有効性が示唆されており、採取も簡単で細胞培養による増殖能も高いことから最近注目されている。脂肪由来幹細胞の特徴は、間質細胞でありながらCD34陽性細胞が非常に多いこと、培養すればCD105（間葉系の多分化能に関連）陽性であること、さらに特殊培養技術によって血管前駆細胞に特徴であるFlk-1陽性細胞、CD117（c-kit）陽性細胞を大量に得ることができることなど、他の組織幹細胞にはないユニークな面を持っていることが知られている。このような背景のもと、ヒト皮下脂肪組織から得られた脂肪由来幹細胞を用いて骨格筋細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨・軟骨細胞などに分化誘導を行うことにより、安定して均一なヒト細胞が入手することが可能となる。この脂肪由来幹細胞および脂肪由来幹細胞から分化させた細胞を用いて薬物毒性試験方法の

開発を行い、薬物の評価を行う。

B. 研究方法

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）の分離・保存・バンキング

湘南美容外科クリニックにおいて吸引された脂肪組織から脂肪由来幹細胞を分離し解析に用いる。

(1) 脂肪由来幹細胞の分離

ヒト吸引脂肪を遠心し脂肪部分と廃液部分に分け、脂肪部分はコラゲナーゼ処理を行なった。フィコール処理または溶血処理により赤血球を除去し脂肪由来幹細胞を含む細胞群を分離した。

(2) 細胞培養と分化誘導

PLA 細胞と LAF 細胞の増殖培養用培地は M199(10%FBS)を用いた。

(3) 分化誘導培養

分離した PLA 細胞と LAF 細胞を 1 週間培養し、その後分化誘導培地に置換して分化誘導を行なった。脂肪への分化誘導は、分化培地で 4 週間培養後にオイルレッド O 染色で確認した。骨への誘導も同様に実施し、von Kossa 染色を行なった。軟骨への誘導は 3 週間マイクロマス培養を行い軟骨様細胞塊の形成で確認した。

(4) 表面抗原解析

分離した脂肪由来幹細胞を、各標識抗体 (BD Bioscience) と 30 分間反応させ、1%パラホルムアルデヒド固定後にフローサイトメーターで解析した。装置は FACS Vantage (BD) を用い

た。

(5) 凍結保存

脂肪由来幹細胞はセルバンカー（日本全薬工業）に懸濁し -80°C で凍結保存した。

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立（骨・軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋細胞、内胚葉系細胞など）

(1) 培養方法の開発（田畑）

ヒト脂肪組織をはさみで細片化、コラゲナーゼ消化により、細胞を遊離させた。この細胞を 10%仔牛血清を含む MEM 培地（通常培地）中で培養、接着細胞をヒト脂肪由来幹細胞として用いた。継代数 2 回目の細胞を以下の細胞接着、増殖、分化などの実験に供した。用いた基材は、ガラスおよび表面の水漏れ性（水に対する接触角）の異なる種々なプラスチック、市販の細胞培養シャーレ、およびその表面にコラーゲン (type I)、フィブロネクチン、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) をコーティングした培養シャーレなどである。これらの異なる培養基材上にヒト脂肪由来幹細胞を播種、6 時間後の接着細胞数、および 1, 3, 7 日後の増殖挙動を調べた。次に、脂肪由来幹細胞を骨分化および脂肪分化培地中で培養し、それぞれの細胞への分化を検討した。骨分化は、分化特異マーカであるアルカリホスホターゼ活性 (ALP) とカルシウム沈着から、脂肪分化は分化マーカである Glycol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性と細胞内での脂肪滴蓄積の程度から評価した。また、基材表面の電荷的および親水一疎水性質を変化させるために、アルカンチオ

ールからなる自己凝集型単分子膜 (self assembled monolayer, SAM) 技術を利用した。チオール基を片末端に、もう片末端にカルボキシル基 (負電荷)、アミノ基 (正電荷)、水酸基 (非電荷親水性)、あるいはメチル基 (疎水性) をもつアルカンチオールを用いた。まず、ポリエチレンテレフタレート (PET) フィルム表面に金薄膜を蒸着した。これらの金蒸着 PET フィルムを異なるアルカンチオールを含むエタノール中に所定時間浸漬することで、PET 表面に種々の化学官能基を導入した。また、2 種類のアルカンチオールを異なる濃度比で反応させることで、2 種類の化学官能基が異なる比率で混合した基材表面を作ることを行った。(混合 SAM 技術) これらの表面化学組成の異なる基材上でヒト由来幹細胞を培養し、それらの性質が細胞の接着、増殖、分化におよぼす効果について検討した。なお、基材表面のキャラクタリゼーションは表面接触角および Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) による分析により行った。

(2) 神経細胞への分化

①神経誘導培地による誘導

i) DMEM/F12/ B27 supplement 法

ii) NPMM 培地による誘導

iii) ニューロスフェア培地による誘導

②ヒストン脱アセチル化阻害、DNA 脱メチル化阻害による誘導法

③ハンギングドロップ法による誘導法

(3) 脂肪細胞への分化

美容形成目的で吸引された皮下脂肪からパー

コール法により、脂肪幹細胞リッチ分画を採取した。さらに、CD105 陽性細胞を CD105 MultiSort Kit (ミルテニーバイオテック) を用いて濃縮を行った。10%FBS-M199 培地 (2ng/ml aFGF、5 μ g/ml ヘパリン含) を用いて、培養ディッシュまたは培養フラスコに播種し、37度、5%CO₂ インキュベーターで培養した。細胞密度がコンフルエントになったところで、分化誘導培地 (10%FBS、0.5mM イソブチルメチルキサンチン、0.5 μ M デキサメタゾン、0.125mM インドメタシン、20nM インスリン、1 nM T3) に交換を行った。さらに、毒性試験される薬物は分化誘導培地に置換される時に添加した。

(4) 肝細胞への分化

肝細胞培養培地 (Dexamethasone、FGF4、HGF、等) を培地中に加えて培養を行う。

(5) 骨・軟骨細胞への分化

脂肪幹細胞から骨芽細胞への分化誘導には骨分化誘導メEDIUM (DMEM+10%FBS, Isobutylmethylxanthine [0.5mM], Dexamethasone [1mM], Insulin [10mM], Indomethacin [200mM]) を用いて4週間培養する。骨芽細胞への分化効率はカルシウムCテストワコー (和光純薬工業) を用いて、細胞内カルシウムを測定することによって定量化する。

軟骨細胞への分化誘導はマイクロマス法を用いる。10%胎児牛血清、acidic-FGF、ヘパリンを添加したM199メEDIUM (継代用メEDIUM) 中でコンフルエントまで培養し

た脂肪幹細胞をトリプシン処理した後、500g で10分間遠心処理を行い、細胞のペレットを得る。得られたペレットを15ml遠心チューブに移し、軟骨分化誘導メディウム (DMEM+1% FBS, Insulin[6.25mg/ml], TGF β [110ng/ml], Ascorbate-2-phosphate[50nM]) を添加し3週間培養する。培養後、4%パラフォルムアルデヒドで固定したペレットから定法に従ってパラフィン切片を作製し、Alcianblue染色を行い軟骨への分化効率を定量化する。

3) 分化させた細胞の分子生物学的特性の解析

(1) 免疫染色

分化条件下で培養した細胞を4%パラフォルムアルデヒドで10分間固定し、免疫染色を行った。固定後、PBSで3回洗浄し、0.01%tritonX-PBSで希釈した1次抗体で一晩(4℃)反応させた。続いて、PBSで3回洗浄を行い、0.01%tritonX-PBSで希釈した2次抗体で1時間(室温)反応を行い、PBSで洗浄後、Vectashield (#H-1200Vector) で封入、蛍光顕微鏡で観察を行った。使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである。

・ monoclonal mouse anti- β -tubulin (1:1000 #T-8660 SIGMA)

・ monoclonal mouse anti-Nestin (Rat401) (1:1000 Developmental Studies HybridomaBank University of Iowa)

・ polyclonal rabbit anti-GFAP (1:1000 #Z0334 DAKO)

・ goat anti-Mouse IgG Alexa488 (1:200 #A-11001Molecular probe)

・ goat anti-Rabbit IgG Alexa594 (1:200 #A-11012 Molecular probe)

(2) RT-PCR

分化条件下で培養した細胞を15ml コニカルチューブに回収した。遠心分離後(1000rpm、5分)上清を取り除き、Isogen(#311-02521 Nippon gene)でRNAを抽出し、1-5 μ gRNAからSuperscript III(#18064-014 Invitrogen)を用いてcDNAを調整し、RT-PCRをおこなった。

4) 脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

(1) MTT法による細胞障害性試験

細胞を96ウェル培養プレートに播種(1 x 10⁴ cells /well)し、4日間培養を行う。4日後、培地を分化誘導培地に交換する。7日間分化させた後、1/10容量の5mg/ml MTT溶液を各ウェルに添加して、2時間インキュベートする。上清を捨て、MTT溶解液(0.7%SDS-イソプロパノール)を130 μ l各ウェルに添加する。プレートシェーカーにて15分間震盪させた後、マイクロプレートリーダー(OD540)で測定した。

(2) AdipoRed法による脂質定量

細胞をMTT法同様に播種し、分化させる。200 μ l PBSで細胞を一度洗浄し、200 μ l PBSを各ウェルに添加する。AdipoRed試薬(BioWhittaker)を5 μ l/ウェルで添加し、10分間インキュベートする。マイクロプレートリーダー(励起485nm, 発光535nm)にて蛍光

を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究実施において、対象患者個人個人のプライバシーをはじめと人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）を徹底する。

採取された脂肪組織を本研究に用いることは、湘南美容外科クリニック、株式会社バイオマスター並びに国立成育医療センターの倫理審査委員会にて承認が得られている（国立成育医療センター倫理審査委員会：平成18年7月31日承認、株式会社バイオマスター倫理審査委員会：平成18年5月9日承認）。湘南美容外科クリニックにおいて主治医からインフォームドコンセントを受け同意を得た後に提供された脂肪組織を用いる。提供して頂く組織は、美容形成目的に皮下脂肪吸引を行った方から提供されるものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。脂肪組織は湘南美容外科クリニックにて匿名化された後に株式会社バイオマスターへ運搬され、脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）分離の処理を行う。株式会社バイオマスターと国立成育医療センターにおいては、連結不可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れる。本研究は、平成10年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行する。

レンチウイルスの使用にあたっては、遺伝子組み換え実験の規制に関する関連法を遵守する。

C. 研究成果

1) 患者皮下脂肪より脂肪組織の吸引手術・吸引された脂肪組織の保存・脂肪由来幹細胞（間葉系幹細胞）の分離・保存・バンキング

(1) 脂肪由来幹細胞の分離と培養

ヒト吸引脂肪は脂肪部分と廃液部分に分けることができる（図1a）。これまでは脂肪部分からのみ接着細胞が分離されていたが、廃液部分からも細胞が分離された。脂肪部分から分離される細胞（PLA細胞）と廃液部分から分離される細胞（LAF細胞）をM199(10%FBS)で培養すると、共に高い増殖能を示した（図1b）。

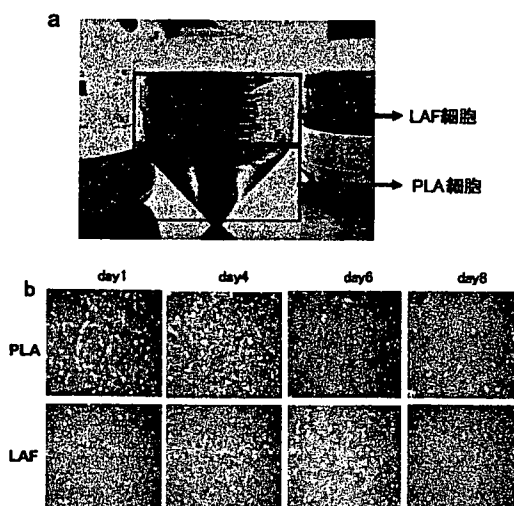


図1 a: ヒト吸引脂肪。b: M199で培養したPLAとLAF。

(2) 分化誘導

分離したPLAについて多分化能の確認を行なうため分化誘導を行なった。脂肪はオイルレッドO染色、骨はフォンコッサ染色で確認したところ、それぞれの細胞へ分化したことが確認された。また軟骨はマイクロマス培養

を行なったところ、軟骨様細胞塊が確認された(図2)。組織染色において細胞塊内部に軟骨組織が形成されていた。



図2 脂肪(左)、骨(中)、軟骨(右)に分化誘導したPLA

(3) 表面抗原解析

PLA細胞とLAF細胞は形態的に非常に似ており、また共に強い増殖能と多分化能を持つことが分かった吸引脂肪から分離される細胞には血液由来の細胞や血管由来の細胞が混在しているが、その中で脂肪由来幹細胞はCD34を発現している。さらにCD34陽性細胞はCD45陽性と陰性に2分され、CD34+/CD45-細胞のみが接着増殖することが分かった。CD34は様々な未分化細胞のマーカーとされているが、一般的に幹細胞を未分化のまま維持することは困難である。脂肪由来幹細胞は比較的長期間培養することができるが、その間の表面抗原の変化を解析した(図3)。CD34陽性細胞はPLA、LAF共に分離直後は50%前後の細胞で陽性であるが継代と共に減少した。減少の程度はサンプル間で、また培地によって差が認められたが、3継代後には20%以下に減少することが分かった。間葉系マーカーとされるCD105は分離直後から7継代まで90%前後の高い陽性率を維持していた。

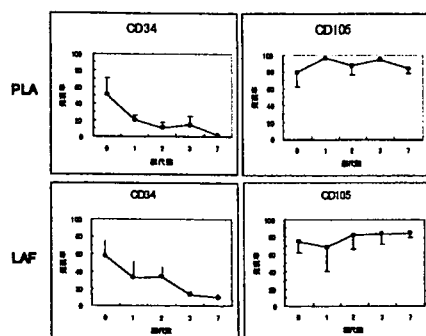


図3 継代によるPLA(上)とLAF(下)の表面マーカーの推移。

(4) 凍結保存

ヒト組織由来の細胞は、増殖や分化などに個人差があることが想定される。これまでの報告で、一般的な細胞の特徴に対して詳細に解析された例は無いが、薬剤耐性などについてはいくつかの報告がある。本研究で解析した細胞においても、分離直後の細胞増殖や分化誘導効率は、必ずしも一定ではなかった。検体間の違いを解析し、標準的な細胞を選別するためには複数の細胞を確保することが必要であるためバンキングを行なった。8検体の吸引脂肪組織から9種類の細胞を保存した(表)。

Sample ID	PLA/LAF	passage	本数
070927	PLA	0	12
	LAF	0	2
071017	LAF	0	4
071112	PLA	0	14
071115	PLA	0	20
071119	PLA	0	20
071120	PLA	0	20
071130	PLA	0	20
080221	PLA	0	3

表 凍結保存細胞一覧

2) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立(骨・軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、骨格筋細胞、内胚葉系細胞など)および細胞の分子生物学的特性の解析

(1) 培養方法の開発

培養シャーレ上へのタンパク質のコーティング後の吸着量を調べたところ、その吸着量から算出して、それぞれのタンパク質が基材上

を十分均一にコーティングできていることを確認した。作製された PET フィルム表面の接触角と ESCA 測定結果から、アルカンチオール SAM 技術により、表面が予想通り、負電荷、正電荷、親水性、疎水性へと変化していることがわかった。表面の接触角が 60-80° の基材上でのヒト脂肪由来幹細胞の接着と増殖が、それ以外の接触角をもつ基材に比べて、高くなっていた。コラーゲン、フィブロネクチン固定化により細胞の接着と増殖数は増加した。骨分化について調べた結果、細胞の増殖が高まるとともに、ALP 活性とカルシウム沈着量は増加した。細胞の 1 つ当りのそれらの分化マーカーの培養基材の種類によらず、ほぼ一定となった。脂肪分化は、基材の種類に依存しなかった。アルカンチオール SAM 技術により作製した電荷および親水疎水性の異なる表面をもつ基材上で、ヒト脂肪由来幹細胞を培養したところ、メチル基や水酸基に比較して、カルボキシル基およびアミノ基をもつ表面で細胞の増殖性が高まった。水酸基とカルボキシル基、あるいは水酸基とアミノ基の混合 SAM 技術を利用することによって、それぞれの化学官能基の表面含率の異なる基材を作製した。この基材上での細胞培養においても、カルボキシル基とアミノ基との含率の増加とともに、細胞の増殖が高まった。このように、基材表面の性質がヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、分化挙動に影響を与えることがわかった。

D. 考察

アルカンチオール SAM 技術により簡単に基材表面の化学修飾することができた。さらに、2 種類のアルカンチオールの仕込み量を変えて

反応することで、基材表面の化学組成を変化させることも可能であった。表面分析により、化学組成が変化できることも確認でき、アルカンチオール SAM 技術が材料設計方法として優れていることがわかった。基材表面の物理化学的性質が、細胞の接着と増殖に影響を与えることはこれまでも報告されている。しかしながら、成体幹細胞を用いて研究された例はほとんどない。今回の結果から、基材表面の物理化学的性質の細胞の接着と増殖に与える影響に関して、幹細胞も通常の正常細胞と同じ挙動をとることがわかった。細胞の挙動は、細胞の栄養液と細胞の基材との両方から影響をうけることが予想される。今回の結果でも、骨分化、脂肪分化挙動が基材の性質により影響されることが示された。通常、細胞の増殖と分化は、細胞の表面レセプターにリガントが結合、その刺激が細胞内に伝わり、細胞内シグナルが動くことで開始されるといわれている。そこで、まず、その初期ステップであるリガントタンパク質の基材表面への吸着挙動について調べた。フィブロネクチン、ビトロネクチンなどの吸着を評価したところ、予想に反して、基材による吸着量の違いは認められなかった。吸着量が同じであっても、吸着したリガンドタンパク分子の変性度合いが違えば、細胞表面レセプターとの相互作用と、それに引き続く細胞内シグナル伝導パターンの違いがもたらされるであろう。その結果として、分化挙動の違いが現われたと考えられる。

(2) 神経細胞

①神経誘導培地による誘導

i) DMEM/F12/ B27 supplement 法

DMEM/F12 (#11330-032 GIBCO), B27 supplement (1:50 #17504-044 GIBCO)を用いて分化誘導を行った。この培養法によりスフェロイド様の細胞塊や紡錘形の細胞が出現した。ニューロンの分化マーカーである TuJ1 陽性の細胞がスフェロイド中に観察された。

ii) NPMM 培地による誘導

ヒト脂肪幹細胞の神経細胞への分化法を構築する目的で、神経前駆細胞の神経成熟細胞への分化に用いられる CAMBREX 社の NPMM 培地および NPDM 培地を用いて検討を行った。これらの培地はいずれも無血清であり、NPMM 培地は EGF および FGF が、NPDM 培地はそれらの代わりに BDNF が含まれている。NPMM 培地により分化誘導刺激を行ったヒト脂肪幹細胞は、分化誘導直後の細胞形態の変化、すなわち細胞が細くなる現象が認められ、分化誘導 1 4 日目では神経分化マーカーである p75 の発現上昇が確認された。しかしながら顕微鏡観察下において軸索の発生は認められなかった。さらに NPMM 培地による分化誘導は神経分化マーカーの発現上昇に加えて脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ 2 の発現を導いた。一方で NPDM 培地による分化誘導では細胞の形態変化や p75 の発現は確認されなかった。以上の結果からヒト脂肪幹細胞に神経分化誘導には EGF および FGF が必要であることが明らかとなった。今後 NPMM 培地による長期間の分化誘導や他の神経分化マーカーを用いて神経分化の程度の変化を詳細に検討する必要があると

考えられた。

iii) ニューロスフェア培地による誘導

ニューロスフェア培地での誘導により浮遊した細胞塊が観察された。形成されるまでに要した日数が 2 日と非常に短く、神経系で見られるニューロスフェアとは異なりアグリゲーションであると考えられる。

この細胞塊を接着状態にして神経誘導培地で 7 日間培養したところ、細胞塊から突起状の構造がのびてくる像が観察された。また細胞塊は抗 TuJ1 抗体陽性であった。

②、③ヒストン脱アセチル化阻害、DNA 脱メチル化阻害による誘導法

神経誘導培地、ヒストン脱アセチル化酵素阻害培地、DNA 脱メチル化阻害培地によって Nestin の発現が上昇した。B27 supplement だけを添加した神経誘導培地のみでも Nestin の発現は上昇していたが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害培地および DNA 脱メチル化阻害培地によってより多く発現が誘導されていた。p75 の発現は通常の継代培地での培養時の方が、B27 supplement によって神経誘導したときよりも高かった。

③ハンギングドロップ法による誘導法

ハンギングドロップ法によりニューロスフェア様の細胞塊が形成された。この細胞塊を用いて中枢神経系のニューロスフェア培地で継代使用としたところ、細胞塊は浮遊した状態では継代することが出来ず培養ディッシュに接着した。接着した細胞からは突起様の構造がみられたため、培地中に神経突起の伸長を

促進する NGF を添加しさらに培養を続けた。
この細胞で免疫染色をおこなったところ TuJ1
の弱い発現が観察されが、形態的には中枢神
経系由来のニューロンとは異なっていた。

(3) 脂肪細胞への分化

美容形成目的で吸引された皮下脂肪からパー
コール法により、脂肪幹細胞リッチ分画を採
取した。さらに、CD105 陽性細胞を CD105
MuitiSort Kit (ミルテニーバイオテック)を用
いて濃縮を行った。10%FBS-M199 培地 (2ng/ml
aFGF、5 μ g/ml ヘパリン含) を用いて、培養
ディッシュまたは培養フラスコに播種し、3
7度、5%CO₂ インキュベーターで培養した。
細胞密度がコンフルエントになったところで、
分化誘導培地 (10%FBS、0.5mM イソブチルメ
チルキサンチン、0.5 μ M デキサメタゾン、
0.125mM インドメタシン、20nM インスリン、
1 nM T3) に交換を行った。さらに、毒性試験
される薬物は分化誘導培地に置換される時に
添加した。

(4) 肝細胞への分化

分離樹立した脂肪幹細胞を CD105 による選別
後培養を行った。肝細胞培養培地
(Dexamethasone、FGF4、HGF、等) にて約 4
週間培養後細胞でのアルブミンの発現につい
て RT-PCR 法にて確認したところ発現が
確認された。

(5) 骨・軟骨細胞への分化

脂肪幹細胞を骨分化誘導培地
(DMEM+10%FBS、Isobutylmethylxanthine
[0.5mM]、Dexamethasone [1mM]、Insulin

[10mM]、Indomethacin [200mM]) を用いて 4
週間培養行った。細胞内カルシウムが確認さ
れ、骨芽細胞に分化していることが確認され
た。

軟骨細胞への分化誘導はマイクロマス法を用
いた。分化した細胞での Alcianblue 染色を行
ったところ、軟骨への分化が確認された。

3) 分化した細胞の分子生物学的特性の解析

(1) 各種誘導法による神経系分化マーカーの
変化

①神経細胞

各誘導培地で 6 日間、神経分化誘導をおこな
った際の分化マーカーの変化を RT-PCR で調べた。
分化誘導培地 2 (DMEM/F12+B27) で誘導した際、
形態的には神経系への誘導は見られなかったが、
RNA レベルでの神経系のマーカーの発現は増加
していた。ニューロスフェア法による誘導では、
浮遊した細胞群とディッシュに接着する細胞群
が見られたが、接着細胞群で神経系のマーカー
を発現していた。

②脂肪細胞

1. RT-PCR 解析により、分化過程の脂肪細胞の分
化マーカーおよび各受容体の発現を調べた。ア
ンジオテンシノーゲン、AGTR1、PPAR γ 2、V1a 受
容体、V1b 受容体、アディポネクチン、ホルモン
感受性リパーゼ (HSL)、リポ蛋白質リパーゼ (LP
L)、OCT3/4 が増加。レプチン、PAI-1 が減少。SS
EA1 は変化なし。GLUT4、レニン、AGTR2、レジス
チン、Rex1、UCP1 は検出されなかった。

4) 脂肪由来幹細胞及び幹細胞から分

化する細胞における培養系を用いた薬物毒性評価系の確立・薬物の評価

(1) MTT 法による細胞障害性試験

バソプレッシンとアンギオテンシンは低濃度で若干の細胞障害性を示したが、高濃度では細胞障害性を有さなかった。また、高濃度では脂肪細胞での脂肪蓄積を抑制した。オランザピンは50 μ Mまで細胞障害性を示さなかったが、0.001 μ Mの低濃度以上で脂肪細胞での脂肪蓄積を抑制した。一方、リトナビルは50 μ Mで細胞障害性を示し、0.001 μ Mの低濃度以上で脂肪細胞での脂肪蓄積を抑制した。

D. 考察

ヒト脂肪由来幹細胞を用いて、分化の過程における遺伝子の発現を解析し多くの遺伝子の量的変化を観察することが出来た。また、4種類の薬物の脂肪蓄積に対する影響を見ることにより、4種類全ての薬剤が濃度依存的に脂肪蓄積を阻害することが明らかになった。今後、それらの薬剤の遺伝子発現に対する影響を調べることにより、その薬剤の脂肪細胞分化に対する作用を評価する必要がある。今回、われわれはヒト細胞を用いることにより、ヒト特異的かつ感受性の高い試験を行なうことが出来た。この方法をさらに進めて行くことにより、種差の問題を克服し、動物実験を補完する薬物毒性試験の新たな代替法となることが期待される。

E. 結論

美容形成目的に脂肪吸引手術を受けた患者脂肪組織より、脂肪幹細胞の分離保存を行った。分

子した脂肪幹細胞から様々な分化誘導法を用いて神経細胞、肝細胞、脂肪細胞、骨・軟骨細胞への分化誘導を行った。脂肪幹細胞から脂肪細胞への分化は、短期間に安定した誘導が可能と考えられたため、この分化誘導系を用いてバソプレッシンとアンギオテンシン、オランザピン、リトナビールの影響について観察したところ、リトナビルは50 μ Mで細胞障害性を示し、0.001 μ Mの低濃度以上で脂肪細胞での脂肪蓄積を抑制することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 村部麻由、山内淳司、藤原葉子、三部篤、田上昭人、マウス胚性幹細胞分化誘導系を用いたバルプロ酸による発生毒性解析 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007)
- 2) 山内淳司、宮本 幸、藤原葉子、三部 篤、村部麻由、田上昭人、バルプロ酸による新規誘導遺伝子 Gadd45a による神経分化作用の解析 日本小児臨床薬理学会雑誌 印刷中 (2007)
- 3) Koshimizu TA, Tanoue A, Tsujimoto G. Clinical implications from studies of alpha1 adrenergic receptor knockout mice. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(8):1107-1112.
- 4) Hiroyama M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Birumachi J, Shigematsu Y, Kiwaki K, Tasaki R, Endo F, Tanoue A. Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol.* 2007; 21:247-258.

- 5) Murabe M, Yamauchi Y, Fujiwara F, Hiroyama M, Sanbe A, Tanoue A. A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 352:164-169.
- 6) Sanbe A, Yamauchi J, Miyamoto Y, Kitagawa Y, Murabe M, Tanoue A. Interruption of CryAB-amyloid oligomer formation by HSP22. *J Biol Chem.* 2007; 282: 555-563.
- 7) Fujiwara Y, Hiroyama M, Sanbe A, Yamauchi J, Tsujimoto G, Tanoue A. Mutual regulation of vasopressin- and oxytocin-induced glucagon secretion in V1b vasopressin receptor knockout mice. *J Endocrinol.* 2007; 192(2): 361-369.
- 8) Miyamoto Y, Yamauchi J, Sanbe A, Tanoue A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine-nucleotide exchanger, has dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. *Exp Cell Res.* 2007; 313(4): 791-804.
- 9) Oikawa R, Nasa Y, Ishii R, Kuwaki T, Tanoue A, Tsujimoto G, Takeo S. Vasopressin V1A receptor enhances baroreflex via the central component of the reflex arc. *Eur J Pharmacol.* 2007; 558(1-3): 144-150.
- 10) Hiroyama M, Wang S, Aoyagi T, Oikawa R, Sanbe A, Takeo S, Tanoue A. Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V_{1A} receptor in neonatal mice. *Eur J Pharmacol.* 2007; 559(2-3): 89-97.
- 11) Egashira N, Tanoue A, Matsuda T, Koushi E, Harada S, Takano Y, Tsujimoto G, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav Brain Res.* 2007; 178(1): 123-127.
- 12) Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, Miyamoto Y, Hiroyama M, Sanbe A, Tanoue A. Estimation of the embryotoxic effect of CBZ using an ES cell differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356:739-744.
- 13) Faber J, Szymeczek C, Cotecchia S, Thomas S, Tanoue A, Tsujimoto G, Zhang H. Alpha 1-Adrenoceptor-Dependent Vascular Hypertrophy and Remodeling in Murine Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(5): H2316-23.
- 14) Aoyagi T, Birumachi J, Hiroyama M, Fujiwara Y, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 2007;148: 2075-2084.
- 15) Yamauchi J, Miyamoto Y, Murabe M, Fujiwara Y, Sanbe A, Fujita Y, Murase S, Tanoue A. Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate Paxillin in N1E-115 n

- euroblastoma cells. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 1886-1896.
- 16) Hiroshima H, Aoyagi T, Fujiwara Y, Oshikawa S, Sanbe A, Endo F, Tanoue A. Hypertension in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intrahepatic blood volume. *J Physiol.* 2007; 581:1183-92.
- 17) Hosoda C, Hiroshima M, Sanbe A, Birumachi J, Kitamura T, Cotecchia S, Simpson P C, Tsujimoto G, Tanoue A. Blockade of both α_{1A} - and α_{1B} -adrenergic receptor-subtype signaling is required to inhibit neointimal formation in the mouse femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H514-9.
- 18) Birumachi JI, Hiroshima M, Fujiwara Y, Aoyagi T, Sanbe A, Tanoue A. Impaired arginine-vasopressin-induced aldosterone release from adrenal gland cells in mice lacking the vasopressin V_{1A} receptor. *Eur J Pharmacol.* 2007; 566: 226-230.
- 19) Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha-1 adrenoceptor is required for normal male sexual function. *Br J Pharmacol.* 2007; 152: 332-340.
- 20) Daikoku R, Kunitake T, Kato K, Tanoue A, Tsujimoto G, Kannan H. Body water balance and body temperature in vasopressin V(1b) receptor knockout mice. *Auton Neurosci.* 2007; 136: 58-62.
- 21) Fujiwara Y, Hiroshima H, Sanbe A, Aoyagi T, Birumachi J, Tsujimoto G, Tanoue A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *J Physiol.* 2007; 584: 235-244.
- 22) Miyamoto Y, Yamauchi J, Chan JR, Okada A, Tomooka Y, Hisanaga SI, Tanoue A. Cyclin-dependent kinase 5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 24): 4355-66.
- 23) Tsunematsu T, Fu LY, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol AN. Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in the orexin/hypocretin neurons- implication for water homeostasis. *J Neurosci.* 2008; 28(1): 228-38.
- 24) Egami T, Egami K, Tanoue A. Study of antibody titers after measles vaccination: Fever within seven days of vaccination and efficacy of booster doses. *Archives of Disease in Childhood.* In press.
- 25) Yamauchi J, Miyamoto Y, Chan JR, Tanoue A. Phosphorylation of the exchange factor Dock7 by the neuregulin receptor ErbB2 regulates Schwann cell migration. *J Cell Biol.* In press.
- 26) Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Yamauchi

i J, Endo T, Mizutani R, Takeo S, Tsujimoto G, Tanoue A. Alcohol preference in mice lacking the Avpr1a vasopressin receptor. *American Journal of Physiology*. In press.

2. 学会発表

1) 国際学会

Hiroshima M, Aoyagi T, Fujiwara Y, Sanbe A, Tanoue A. Hyperammonemia in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intracellular blood volume. World congress on Neurohypophysial hormones, Sept. 18-22, Regensburg, (Germany), 2007.

Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Yamauchi J, Takeo S, Tsujimoto G, Tanoue A. Alcohol preference in mice lacking the V1a vasopressin receptor. World congress on Neurohypophysial hormones, Sept. 18-22, Regensburg, (Germany), 2007.

Sanbe A, Takagi N, Fujiwara Y, Aoyagi T, Yamauchi J, Takeo S, Tanoue A. Vasopressin V1a receptor can regulate alcohol preference in mice. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Kusakawa S, Tanoue A. JNK phosphorylation of paxillin, acting through the Rac1 and Cdc42 signaling

cascade, mediates neurite outgrowth. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

Miyamoto Y, Yamauchi J, Sanbe A, Tanoue A. Dock6, a Dock-C subfamily guanine-nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. Nov. 4-7, San Diego, California. (U.S.A.), 2007.

2) 国内学会

藤原葉子、三部篤、田中芳夫、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 アルファー1A-、1B- および 1D- アドレナリン受容体トリプルノックアウトマウスの血管収縮反応 第80回日本薬理学会年会、3月14日-16日、2007、名古屋

青柳利紀、田上昭人 Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. 第80回日本薬理学会年会、3月14日-16日、2007、名古屋

宮本幸、山内淳司、三部篤、田上昭人 TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1 leading to activation induction of neurite outgrowth. 第80回日本薬理学会年会、3月14日-16日、2007、名古屋

三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 Alteration of male

sexual function in alpha1A-, 1B- and 1D-adrenergic receptor triple knockout mouse. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

廣山眞巳、青柳利紀、藤原葉子、美留町潤一、Yosuke Shigematsu, Kohji Kiwaki, Ryuji Tasaki, 遠藤文夫、田上昭人 Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. 第80回日本薬理学会年会、3月14日～16日、2007、名古屋

田上昭人 (講演) ES細胞等による薬剤毒性試験法の開発 ヒューマンサイエンス基礎研究講習会 6月13日東京

三部篤、田中芳夫、藤原葉子、山内淳司、小池勝夫、辻本豪三、田上昭人 α 1アドレナリン受容体欠損マウスの雄性生殖機能 第49回日本平滑筋学会総会、7月4日～6日、2007、奈良(橿原市)

山内淳司、宮本幸、三部篤、Eric M. Shooter、田上昭人 神経栄養因子-3によるシュワン細胞の遊走はRas-Tiam1-Rac1経路を必要とする 第30回日本神経科学大会、9月10日～12日、2007、横浜

宮本幸、山内淳司、三部篤、William C. Mobley、田上昭人 BDNFによるcortical ニューロンの突起伸張はTiam1のチロシンリン酸化を必要とする 第30回日本神経科学大会、9月10日～12日、2007、横浜

藤田裕子、廣山眞巳、三部篤、田上昭人 神経幹細胞を用いたアルコールの中樞神経系初期形成に及ぼす毒性評価 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

宮本幸、草川森士、三部篤、山内淳司、田上昭人 パルプロ酸による神経分化作用に関する新規誘導遺伝子NF2の同定 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

草川森士、田上昭人 マウスES細胞を用いたSSR Iの安全性評価試験の確立とその応用 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

水谷玲子、三部篤、田上昭人 タバコ主流煙抽出物はAryl hydrocarbon receptorを介して神経堤細胞遊走を抑制する 第34回日本小児臨床薬理学会、11月16日～17日、2007、熊本

山内淳司、宮本幸、三部篤、草川森士、田上昭人 新規交換因子 Dock6による神経突起誘導：その下流シグナル伝達経路 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜

宮本幸、草川森士、山内淳司、田上昭人 新規交換因子 Dock6による神経突起誘導 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜

草川森士、宮本幸、藤原葉子、三部篤、小出寛、

山内淳司、田上昭人 マウスES細胞を用いたSSR
Iの安全性評価試験の確立とその応用 第30回
日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大
会 合同大会、12月11日～15日、2007、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

所属 国立成育医療センター研究所

生殖医療研究部

研究者

阿久津 英憲

研究要旨: 本研究では、再生医療の供給組織として期待されている羊膜組織の幅広い汎用性を獲得するために、これまで開発してきた保存性にすぐれた乾燥羊膜を臨床効果の機序の解明を図るとともに実用化し臨床応用することを目指す。

分担研究者

- (1) 富山大学医学部 二階堂敏雄、清水忠道、齋藤滋、遠藤俊郎、北側清隆
- (2) 東亜薬品(株) 笹間敏男
- (3) 日東メディック(株) 野村出
- (4) (株) サクラ精機 荒川雅彦
- (5) ネオシルク(株) 富田正浩

A. 研究目的

近年再生医療の現場では、生体材料として、免疫抑制因子を発現し共移植された他組織をも拒絶反応から回避させる羊膜の使用が試みられている。しかしながら、その使用は保存器(-80度)がある場所に制限され、約3ヶ月の短い使用期限を過ぎると破棄されるという問題を伴う。そこで本研究は、移植に適した羊膜本来の性格を維持しつつ室温での長期保存ができ、扱い易く広く応用されうる機能再生医療材料として乾燥羊膜を開発し臨床応用することを目的とする。我々は既に、独自の乾燥方法を開発し、室温にて年単位で保存可能な乾燥羊膜を作製した(特許申請中)。本研究ではまず、生物材料としての構造解析(物性)、張力、保水性などの機能解析(数値化)を行い膜の特性を明確にする。羊膜移植は眼科領域で行われているがその効果を説明する機序は未知な部分が多い。本研究においては専門性の高い各科と共同研究し乾燥羊膜の臨床応用範囲を広げかつその治療効果をもたらす機序を解析する。まず、乾燥羊膜の創傷被覆剤としての適材性を示し、上皮化促進、瘢痕形成抑制

に関わる因子を明かした。これは現在有効な治療法のないケロイド性瘢痕の予防に₁がると期待される。また広範な創傷にも対応できる為、急速な高齢化に伴い増加している褥瘡や糖尿病による慢性瘡傷にも有効に利用されうる。現在創傷被覆剤の市場は少なくとも100億円以上ありニーズは極めて高い。眼科では角結膜上皮の土台として羊膜が用いられてきた。我々は、更に乾燥羊膜に薬剤を浸透させ、ドラッグデリバリー基材としての利用を確立する。また、日本では年間2万件の硬膜移植が行われているが完璧な人工硬膜材がない。乾燥羊膜の硬膜補填材としての可能性を検討する。羊膜の組織親和性、癒着予防効果を利用しつつ高分子マトリクスにて強度、収縮性を補填する。と同時に癒着予防の責任因子を明らかにする。更に、細胞外基質成分にも着目し、本研究では、再生医療へ対応した幹細胞培養システムの構築に向け組換えヒト蛋白質を新規に作成し、その幹細胞特に、霊長類ES細胞の長期にわたる特性保持について解析を行う。

B. 研究方法

1) 乾燥羊膜作成

適切なインフォームド・コンセント手続きのもと帝王切開で摘出された胎盤から羊膜を得る。採取羊膜組織を両面シリコン樹脂加工耐油紙上に広げ、マイクロ波、遠赤外線、空気圧を操作する装置により乾燥羊膜(Hyper-Dry 乾燥羊膜)を作製し本研究に供する。

2) 乾燥羊膜特性解析

光学顕微鏡にて羊膜生組織と他の加工羊

膜組織とを詳細な形態的解析を行う。

3) 乾燥羊膜タンパク質解析

乾燥羊膜よりタンパク質を抽出し、ウェスタン・ブロッティング法にて α 1-antitrypsin と OCT3/4 の発現解析を行う。生物材料としての構造解析 (物性)、張力、保水性解析を行う。

4) 糖鎖高分子の開発と糖鎖ポリマーで イッシュでの細胞培養

これまで、糖鎖として用いてきたラクトビオン酸は、ポリマーに誘導された際、肝臓の実質細胞上のアシアロ糖タンパク質レセプターとのみ相互作用し、肝細胞を特異的に相互作用させる。より純度の高いラクトビオン酸作成法を検討しポリスチレン誘導体型糖鎖ポリマーを合成する。ヒト株化細胞である CHO 細胞、B16 細胞、NIH3T3 細胞、HepG2 細胞を用いてマトリックスのキーマテリアルとなる新たに合成した糖鎖ポリマーによる細胞培養を行う。血清は添加せず、37°C、5%CO₂ インキュベーターにて所定の時間培養し、細胞の形態と増殖程度を位相差顕微鏡にて観察した。これら細胞の 70%コンフルエント培養系に、各ポリマーの 0.1W/V% 溶液を添加し、細胞に対する毒性評価を行う。

5) ヒト乾燥羊膜による創傷治癒効果

作成した乾燥羊膜をマウスの創傷部位へ移植を行った。マウスをペントバルビタールで麻酔後、皮下に達する直径 5mm の傷をデルマパンチで作成した。あらかじめシリコンカルチャーに乾燥羊膜を接着剤で添付したものを接着剤と絹糸による縫合で創傷部位に固定し、4 日目及び 7 日目の組織を組織学的に観察する。採取した組織をパラフィン包埋後、薄切切片をアザン染色し、光学顕微鏡による観察を行う。更に、画像解析システム (MataMorph) により上皮長を測定し、定量・生物検定を行った。

6) 新規組替えヒトヒト I 型コラーゲン a1 鎖の作成法開発

組替えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の産生

(株)ネオシルクでは組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を中部絹糸腺で合成し、その組換え a1 鎖を含む絹糸を吐くトランスジェニックカイコ COL1A1 を作成システムを開発してきた。バキュロウイルス由来転写活性因子の COL1A1 カイコへの導入、およびトランスジェニックカイコのホモ接合体化によって、組換え a1 鎖合成量を増加させ、得られた繭から、効率性の高い組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を抽

出・精製法を検討し、精製した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を市販の天然コラーゲンおよびゼラチンと比較を行う。

a) BmNPV 由来転写調節因子 IE1 の導入と トランスジェニックカイコの確立

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を中部絹糸腺で合成するトランスジェニックカイコ COL1A1 において、バキュロウイルス BmNPV 由来の転写調節因子 IE1 を発現させ、ハイブリッドトランスジェニックカイコ COL1A1/IE1 を作出する。COL1A1 カイコ成虫蛾からゲノム DNA を抽出し、トランスポゾンによる遺伝子挿入部位の周辺のゲノム配列を BIO S&T 社 APAGene Transgene Locator Kit を用いた asymmetrical PCR 法によって決定し、その塩基配列をもとにホモ体、ヘテロ体判別のためのオリゴヌクレオチド DNA を調製し PCR にて遺伝子型の識別を行うことにより、ホモ接合体を選別を行う。このようにして、ホモ接合体トランスジェニックカイコ (COL1A1/IE1) 2 を得て、このカイコの継代飼育を続け、繭を回収する。

b) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖の合成 量の確認

得られたトランスジェニックカイコ (COL1A1/IE1)2 の繭中の組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を SDS-PAGE によって確認を行う。

画像解析ソフト ImageJ によって組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖由来バンドのデンスィトメトリーの定量を行い、数値化を行う。組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を繭から抽出し、不純物を除去・精製後得られた組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖を回収した沈殿は 0.5M NaCl/0.5 M CH₃COOH 60 ml に再溶解し、10 L の水に対して透析を 3 回、計 18 時間、4°C で行う。透析後、回収した組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖溶液は 0.22 μ m フィルターによるろ過滅菌を行った後、凍結乾燥したものを獲得する。

c) 組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖と市 販コラーゲンあるいはゼラチンとの比較

・CD スペクトルの測定

組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖、市販コラーゲン ((株)高研 AteloCell I-PC)、市販コラーゲンを 50°C で 10 分間熱処理したもの、および市販ゼラチン (Sigma 社 bovine type A gelatin) を 100 mg/ml の濃度で 0.1 M CH₃COOH にて調製し、それぞれの遠紫外域 (195-250 nm) の 4°C における円二色性分散スペクトルを計測した。また、組換えヒト I 型コラーゲン a1 鎖と