

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：生物資源・創薬モデル動物研究

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・
医療応用に関する基盤技術開発研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川端健二

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・医療応用に関する基盤技術開発研究	-----	1
川端健二		
II. 分担研究報告		
ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理に関する研究	-----	18
水澤 博		
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		

総括研究報告書

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・医療応用に関する基盤技術開発研究

主任研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部・遺伝子導入制御プロジェクト 主任研究員

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞は無限に増殖し、機能細胞へ分化するという特徴を有しており、これら細胞を再生医療へ応用できれば、がん、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞等の致命的疾患に対する極めて有効な治療法になる。しかしながら、ヒト胚由来の ES 細胞を用いることによる倫理的な問題も存在し、本邦ではヒト ES 細胞を用いた研究はわずかとなっており、研究基盤技術として普及しているとはいえない。また、幹細胞の分化制御機構の解明や幹細胞を用いた動物モデルにおける医療への応用実験などは活発に試みられているが、ヒトに応用するうえで必須となってくる幹細胞の品質管理に関する情報は極めて乏しく、国際的な安全性基準が明確に定められていないのが現状である。

そこで本研究では、長期安定的なヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開発を目的として、①ヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の培養環境・培養技術の改良による長期安定培養法の開発、②ヒト ES 細胞凍結保存法の改良（容器・溶液・凍結方法など）、③遺伝子発現解析およびマーカーたんぱく質解析によるヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の未分化状態・機能維持の検討、④ヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の核型解析および染色体プロファイル解析による品質評価法開発を行う。また、⑤ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を再生医療へ応用するうえで必須の技術となる高効率な遺伝子導入法の確立を行い、更に機能遺伝子を導入することで、品質管理された幹細胞の未分化維持法や目的細胞への分化誘導法の確立を目指す。本年度は、ヒト ES 細胞の品質管理における基礎的知見を得ることを目的として、ヒト間葉系幹細胞およびマウス ES 細胞を用い、以下の結果を得た。

- (1) ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子およびがん遺伝子 Bmi-1 を導入した 3 種類の間葉系幹細胞は長期培養後、染色体数にかなりの変動があり、特に 13 番染色体の欠失が各細胞株に共通して観察された。hTERT 遺伝子のみを導入した細胞株は長期培養下でも染色体は安定であった。細胞分化能はいずれの細胞株も保持されていた。また、市販されている間葉系幹細胞に関しても染色体詳細解析を実施し、その有用性を確認した。
- (2) ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させる場合、胚葉体 (EB) とよばれる中間体を介して行われている。本研究では、現存する遺伝子導入ベクターのなかで最も導入効率が優れているアデノウイルス (Ad) ベクターを用いて EB への遺伝子導入効率の最適化を行った。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターを用いることにより効率良く遺伝子導入可能であることが明らかとなった。このベクターを用いて脂肪細胞分化に関与する遺伝子を EB へ導入した結果、従来の方法と比較し高い分化効率を示すことが明らかとなった。以上の結果から、EB への高効率遺伝子導入により、EB から目的の細胞への分化効率を上昇させられることが可能となり、Ad ベクターは ES 細胞の分化能 (品質) を判定する最適なツールとなり得る可能性が示された。

本研究から、ヒト ES 細胞の品質管理においても重要な基礎知見が得られ、再生医療に用いる細胞の品質管理の必要性を確認した。

分担研究者

水澤 博 (独) 医薬基盤研究所
部長

協力研究者

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員

小原有弘 (独) 医薬基盤研究所
研究員

古川智久 (独) 医薬基盤研究所
リサーチレジデント

田代克久 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞を用いた再生医療や移植医療、特に他家移植の実現に向けた基礎研究が欧米で盛んに行われており、難治性疾患の治療法開発が進んでいる。一方、日本国内においてはこれら幹細胞を用いた研究はあまり進んでおらず、研究基盤技術として普及していない。しかしながら、ヒト由来の細胞で無限に増殖し、様々な機能細胞への分化能を有するヒト ES 細胞や間葉系幹細胞への期待は大きく、今後、再生医療や移植医療の実現を目指し、様々な基礎研究が行われることが予想される。

その一方で、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を再生医療へ応用するには、①種々の培養条件による安定性評価、②未分化維持因子の同定ならびに長期培養培地の改良、③高い細胞生存率を維持する細胞凍結保存法の開発、④高効率な遺伝子導入技術の開発、⑤遺伝子導

入による細胞分化制御法の開発、などに関する基礎的検討課題が残されているのが現状である。

そこで、これら幹細胞を用いた生命科学研究の積極的推進支援を目指し、より多くの研究者が高度に品質管理された研究資源を使用し、信頼性の高い研究を行う必要があると考え、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開発を目的として、幹細胞研究の基盤整備を目指した研究を行う。これによって得られる成果は、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を樹立時の機能を保持したまま維持・管理できる技術の開発につながり、また、幹細胞の品質や再生医療に向けた安全性評価にも役立つと考えられ、厚生労働行政に果たす役割は非常に大きいものと考えられる。

また、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を医療応用する上で問題となる免疫拒絶、移植細胞の予期しない増殖、分化制御等の問題を解決するためには遺伝子改変技術を確立することが必須であると考えられ、高効率な外来遺伝子導入法の確立を目指す。これにより、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞の分化が自由に制御可能となり、幹細胞を用いた再生医療における有効性や安全性の向上が見込まれる。

B. 研究方法

B.1 幹細胞染色体の詳細解析

(1) 細胞培養

2種のヒト臍帯血由来間葉系幹細胞、UCBTERT-21 (JCRB1107) および UCB408E6E7 TERT-33 (JCRB1110) ならびに2種のヒト骨髄由来間葉系幹細胞、UE6E7T-3 (JCRB1136) および UBE6T-6 (JCRB1140) は当 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) で保存された細胞を使用した。臍帯血由来間葉系幹細胞株 UCBTERT-21 は hTERT 遺伝子のみで、UCB408E6E7TERT-33 は hTERT と HPV16E6/E7 の組み合わせ遺伝子により不死化したものであり、Plusoid M (Med-Shirotori Co. Japan) 培地で培養した。また、骨髄由来間葉系幹細胞株 UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6E7 遺伝子で、UBE6T-6 は hTERT、HPV16E6、および Bmi-1 遺伝子の組み合わせ導入により不死化したものであり、Poweredby 10 培地 (Med-Shirotori Co. Japan) で培養した。培養開始の細胞密度は 2000 cells/cm² で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った: $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。本実験で培養を開始したときの PDLs は、UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7-3 と UBE6T-6 それぞれ 42, 67, 40 と 56 であった。同様にヒト間葉系幹細胞 hMSC (Cambrex 社より購入) に関しても、MSCBM (間葉系幹細胞培養用培地) と DMEM の2種類の培地で培養を行い経時的観察を行った。

(2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセミドを加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。

次に 0.075M・KC1 低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、17 番染色体に特異的なプローブ (XCP13 - kit - FITC、XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH) を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24Xcyte-MetaSystems' 24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH) で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

(3) CGH アレイ解析 (Macrogen 社)

サンプル DNA は約 1×10^6 個の細胞から isolation kit (Amersham BioSciences, UK) と Spin Column (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。標準 DNA (Promega Co. USA) と試験 DNA はそれぞれ Cy3 または Cy5 (BioPrimer DNA Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識し、Cot-1 DNA とエタノールで共沈殿し、ハイブリダイゼーションキット (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH7) に溶かした。75°C 10 分処理で DNA を変性したのち、BAC Array (MAC ArrayTM Karyo 4000 Component, Macrogen Co., USA) で 42°C、48-72 時間ハイブリダイゼーションした。50% formamide - 2x SSC (pH 7.0) で 50°C、15 分間、2x SSC - 0.1% SDS で 50°C、15 分間洗浄し、100 mM sodium phosphate buffer (0.1% Nonidet P-40 (pH 8) を含む)

で洗浄したのち各スポットの蛍光量を GenePix4000A (Axon Instruments, USA) で測定し、MacViewer (Macrogen Instruments, USA) を用いてデータを解析した。

(4) CGH アレイ解析 (アジレント社)

サンプル DNA は約 5×10^6 個の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。2 種類の DNA 試料は、それぞれ Alexa FluorR 3 または Alexa FluorR 5 (BioPrime® Total Genomic Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識した。標識した DNA と Cot-1 DNA をハイブリダイゼーション溶液 (10 x Blocking Agent, 2 x Hybridization Buffer) に溶かした。95 °C 3 分処理で DNA を変性したのち、37 °C 30 分インキュベーションした。CGH マイクロアレイスライド (Human Genome CGH 244A Oligo Microarray kit, Agilent Co., Japan) にアプライし、65 °C 40 時間ハイブリダイゼーションした。Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 1 で室温、5 分間、Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 2 で 37 °C、1 分間洗浄したのち各スポットの蛍光量を DNA Microarray Scanner (Agilent Co., Japan) で測定し、Agilent Feature Extraction (Agilent Co., Japan) を用いてデータを解析した。

(5) 分化能の測定

脂肪細胞への分化能を測定するため、カバースリップの上に培養した各細胞を誘導培地 (hMSC Differentiation BulletKit - Adipogenic ; PT-3004, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA)、神経細胞への誘導には NPMM Bullet kit (NPMMTM BulletKit

(B3209, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA) を用いた。骨芽脂肪への分化誘導には 0.1 μ M dexamethasone (Sigma Chemical Co., USA), 50 μ g/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., USA) と 10 mM β -glycerophosphate (Sigma Chemical Co., USA) を Plusoid-M 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) 培地または Poweredby10 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) に入れ、2-4 週間培養した。phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、4% paraformaldehyde で固定した。

脂肪細胞は Oil Red-O (Sigma Chemical Co., USA) 染色し、骨芽細胞には 0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate および 0.25 mg/ml Fast violet LB salt で alkaline phosphatase 染色した。神経細胞の観察には、パラフォルムアルデヒドとメタノール固定したのち、anti-III β tubulin 抗体 (Sigma Chemical Co. USA) または anti-neurofilament antibody NF-200 (Sigma Chemical Co., USA) と Texas Red-anti -mouse IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) で免疫染色した。

B.2 Ad ベクターを用いた ES 細胞の脂肪細胞への高効率分化

(1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作成は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作成した。それぞれのマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。ま

た、pHMCA5 のマルチクローニング部位に green fluorescent protein (GFP) 、 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ 1) 、 PPAR γ 2 、 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) 遺伝子を挿入した pHMCA-GFP、pHMCA-PPAR γ 1、pHMCA-PPAR γ 2、pHMCA-C/EBP α を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVLacZ1 、 pAdHM4-CALacZ1 、 pAdHM4-EFLacZ1 、及び GFP、PPAR γ 1、PPAR γ 2、C/EBP α 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CAGFP 、 pAdHM4-CAPPAR γ 1 、 pAdHM4-CAPPAR γ 2、pAdHM4-CAC/EBP α を得た。作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、及び GFP、PPAR γ 1、PPAR γ 2、C/EBP α 発現 Ad ベクター Ad-CA-GFP、Ad-CA-PPAR γ 1、Ad-CA-PPAR γ 2、Ad-CA-C/EBP α を得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック社) を用いて測定した。

(2) ES 細胞の培養、胚様体 (EB) の作製
E14 マウス ES 細胞 (ES 細胞) は leukemia inhibitory factor (LIF) 含有培地にてフィーダー細胞 (embryonic fibroblast) 上、またはゼラチンコートしたプレートで培養し、2-3 日ごとに継代した。EB は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000 cells/30 μ l で附着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間 LIF を除いた培地で培養することにより作製した。

(3) LacZ アッセイ

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態、3000VP/cell で LacZ 発現 Ad ベクター、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ を作用させ、2 日後に X-gal 染色を行った。

(3) GFP 発現解析

EB に対して Ad-CA-GFP を 10000VP/cell の濃度で感染させ、2 日後に GFP の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、EB をトリプシンでシングルセルにしてフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞の割合を調べた。Ad ベクターを連続で作用させる場合は、Day0、2、5 の 3 点で 10,000 VP/cell の濃度で各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。なお、脂肪細胞へ分化誘導するときも同様に 3 点で遺伝子導入を行った。

(4) 脂肪細胞への分化誘導

ハンギングドロップを 2 日間行って EB を形成させ、続いて 3 日間 all-*trans*-retinoic acid (RA) 含有培地で培養した。その後 RA を除いた培地で 2 日浮遊培養して、7 日目にゼラチンコートした 12 穴プレートに 4EB/well で播種した。上記に記したように、Day0、2、5 の 3 点で EB に対して Ad ベクター (Ad-CA-LacZ、Ad-CA-PPAR γ 1、Ad-CA-PPAR γ 2、Ad-CA-C/EBP α) を 10000VP/cell の濃度で作用させ、播種後は液性因子 (100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine 、 100nM insulin 、 0.1 μ M dexametasone 、 2nM triiodothyronine) を加えた培地、または加えていない培地で培養した。

(5) オイルレッド O 染色、GPDH アッセイ
脂肪細胞への分化を細胞内の脂質の量と GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性を測定することにより

評価した。12 穴プレートに播種して 12 日、24 日培養した細胞を回収し、セルガレージ社の Lipid Assay kit、及び GPDH Assay kit を用いて細胞内の脂質の量、及び GPDH 活性を測定した。更に細胞内の脂質に結合したオイルレッド O を 100%イソプロパノールで抽出し、OD540 nm を測定することにより、取り込まれたオイルレッド O の量を定量した。また、バイオラッド社の Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて回収した蛋白量を定量し、GPDH 活性を補正した。

(6) RT-PCR

12 穴プレートに播種し、分化誘導培地で 24 日培養した細胞から、total RNA を抽出し、インビトロジェン社の SuperScript Reverse Transcriptase II を用いて cDNA を合成した。その後、PCR により PPAR γ (PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の両方を検出)、C/EBP α 、aP2、adiponectin、leptin、LacZ、GAPDH の各遺伝子発現を調べた。PCR プライマーは以下のものを用いた。PPAR γ (F): 5' -CCC TGG CAA AGC ATT TGT AT-3'、PPAR γ (R): 5' -AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT-3'、C/EBP α (F): 5' -CGC TGG TGA TCA AAC AAG AG-3'、C/EBP α (R) 5' -GTC ACT GGT CAA CTC CAG CA-3'、aP2 (F) 5' -TGG AAG CTT GTC TCC AGT GA-3'、aP2 (R) 5' -ACA CAT TCC ACC ACC AGC TT-3'、adiponectin (F) 5' -GTT GCA AGC TCT CCT GTT CC-3'、adiponectin (R) 5' -GCT TCT CCA GGC TCT CCT TT-3'、leptin (F) 5' -TGA CAC CAA AAC CCT CAT CA-3'、leptin (R) 5' -CTC AAA GCC ACC ACC TCT GT-3'、LacZ (F): 5' -GTC GTT TTA CAA CGT CGT GA-3'、LacZ (R): 5' -GGA ACA AAC GGC GGA TTG AC-3'、GAPDH (F): 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'、GAPDH (R): 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

C. 研究結果

C.1 幹細胞染色体の詳細解析

(1) ヒト間葉系幹細胞の長期培養過程での染色体数の変化

研究に用いた不死化間葉系幹細胞において染色体数の異常が観察され、特に長期培養するとその頻度が高くなった。培養開始直後は全ての細胞株の染色体数モードは 46 本 (2n) であった。UCBTERT-21 細胞は PDL 133 にも及ぶ長期培養後でも染色体数は安定であったが、一方、UBE6T-6 および UE6E7T-3 細胞には染色体数の変化がみられた。PDL 62 の UE6E7T-3 は 90% の細胞が 46 本の染色体をもっていたが、PDL 147 では染色体欠失により 44 本になった細胞が 43% 観察された。UBE6T-6 細胞でも同様に染色体数の減少が見られた。UCB408E6E7TERT-33 細胞もまた染色体数が不安定で、4 倍体に近い細胞集団の増加が認められた。これらの結果から、UE6E7T-3, UBE6T-6 および UCB408E6E7TERT-33 細胞の染色体数は長期培養でかなり変動するが、UCBTERT-21 にはその傾向が見られないことが示された。

次に、染色体の不安定性を調べるために、FISH 法、CGH 法による解析を行った。PDL 52 の UCBTERT-21 細胞の mFISH 分析の結果は正常な核型を示した。UBE6T-6 細胞は 43-45 本の染色体数を示し、13, 16 and 19 番染色体の欠失が検出された。UCB408E6E7TERT-33 細胞も不均一な染色体構成を示した。mFISH 分析の結果から UCBTERT-21 細胞以外は共通して 13 番染色体の欠失が示されたが、この結果は 13 と 17 番染色体のプローブを用いた pFISH 分析によっても確かめられた。UCBTERT-21 細胞では約 97% の細胞が 2 コピーの 13 番染色体をもっていることから、染色

体構成が安定であることを示した。UE6E7T-3 と UBE6T-6 細胞の染色体数は 43-45 本であり、UE6E7T-3 の 76% が、UBE6T-6 の 86% が 13 番染色体を一本だけ持っていた。同様に、UCB408E6E7TERT-33 細胞は 70% が 3 本の 13 番染色体を持った near-tetraploid であった。

さらに FISH 法により観察された染色体 13 番の欠失が CGH アレイ法によって確かめられた。長期培養において、UCBTERT-21 細胞では培養の初期および後期において共に変化が認められなかった。UBE6T-6 と UCB408E6E7TERT-33 細胞の培養初期に 13 番染色体が欠失していたことを FISH 法で認めたが、CGH 法からはさらに 4 番、9 番、16 番染色体も欠失していることを認めた。UE6E7T-3 については、PDL 78 から PDL 101 の間で 16 番染色体の欠失も観られたが、特に特徴的なことはこれら 3 種類の細胞株に共通して 13 番染色体の欠失が観られたことである。これらのデータは FISH 分析の結果と一致した。またより詳細な解析が可能なアジレント社製アレイ CGH 解析においても同様の結果が認められ、再現性の有る非常に貴重なデータが得られた。

(2) 不死化間葉系幹細胞の分化能

間葉系幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞や脂肪細胞に分化することができるし、ときには神経様細胞に分化したりすることが可能であり、すなわち多分化能を持っていると報告されている。今回用いた 4 種類の細胞株を適切な誘導培地で 2 ~ 4 週間培養した。特に、UE6E7T-3 細胞は他の細胞よりも脂肪細胞へ分化する能力が強い。骨芽細胞への分化能の一番強いのは UCB408E6E7 TERT-33 細胞であった。UBE6T-6 細胞は形態学的、マーカー遺

伝子発現において神経様細胞への分化を示した。誘導培地で 28 日間培養後、III- β -tubulin 抗体、または neurofilament NF-200 抗体による蛍光染色すると神経突起様構造が観察された。一方、誘導培地で処理する前の UBE6T-6 細胞ではこのような構造は見られなかった。

(3) hMSC の詳細解析

Cambrex 社より購入したヒト間葉系幹細胞を継代培養により長期培養維持した後、長期培養の前後での染色体解析を実施した。また、その際用いる培地による影響を検討するため、MSCBM (間葉系幹細胞培養用培地) と DMEM の 2 種類の培地で培養を行いその比較を行った。その結果どちらの培地の場合においても、増殖速度に違いは見られたものの (DMEM で培養すると増殖速度が落ちる)、mFISH の染色体写真には異常が観察されなかった。

C.2 Ad ベクターを用いた ES 細胞の脂肪細胞への高効率分化

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。そこでまず、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを探索するため、プロモーターの異なる LacZ 発現 Ad ベクター (Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ) を Day5 の EB に作用させて検討を行った。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターが最も効率良く遺伝子導入可能であることが明らかとなった (Fig. 1)。そこで次に EB の内部においても外来遺伝子が発現しているかどうかを検討するため、GFP 発現 Ad ベクター Ad-CA-GFP を

Day5 の EB に作用させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP の発現を解析した結果、GFP の発現は EB の周縁部でのみ観察された (Fig. 2A, middle)。また、GFP 陽性細胞の割合も約 25%であった (Fig. 2B, middle)。この結果から、EB を構成している細胞が物理的な障害となるために、Ad ベクターが EB 内部へ侵入できないことが考えられた。そこで、EB の内部で外来遺伝子を発現させるために、Day0、2、5 の 3 点で Ad ベクターを作用させることとした (triple transduction)。Ad-CA-GFP を 3 点で作用させることにより、EB の内部においても GFP の発現が認められ、GFP 陽性細胞の割合も有意に上昇した (Fig. 2A and 2B, bottom)。以上の結果から、CA プロモーターを有した Ad ベクターによる triple transduction は EB の内部で外来遺伝子を発現させるのに有効であることが明らかとなった。

次に、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、EB から標的とする細胞への分化効率を上昇させられるかどうかについて検討した。核内受容体 PPAR γ は脂肪細胞分化のマスター遺伝子として知られており、PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の 2 つのアイソタイプが存在している。また、C/EBP α は脂肪細胞分化及び脂肪細胞の成熟化に重要な転写因子として知られている。そこで、CA プロモーターを有し、PPAR γ 1、PPAR γ 2、C/EBP α の遺伝子を発現するそれぞれの Ad ベクターを EB へ作用させたときの分化効率について検討を行った。上述したように 3 点で Ad ベクターによる遺伝子導入を行い、インスリンなどの液性因子存在下で培養して脂肪細胞分化の指標となる GPDH 活性を測定した結果、従来の液性因子のみを加えた群や LacZ 遺伝子導入群と比較し、PPAR γ (PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の両方) 遺伝子を導入した群において GPDH 活性の優位な上昇が認められた (Fig. 3A)。また、オイルレッド O 染色

を行った結果から、Ad ベクターにより PPAR γ 遺伝子をした細胞は、コントロール群と比較し、細胞内に多くの脂質を蓄積していることが明らかとなった (Fig. 3B)。さらに半定量的 RT-PCR 法により PPAR γ 、C/EBP α 、aP2、アディポネクチンなどの脂肪細胞分化のマーカー遺伝子の発現量を解析した結果、PPAR γ 遺伝子 (PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の両方) を導入した群においては、全ての遺伝子の発現上昇が確認された (Fig. 3C)。また Ad ベクターの発現が続いているかどうかを検討するため、LacZ mRNA の発現を RT-PCR 法で解析した結果、プレートに播種してから 24 日後においては、その発現はほとんど確認されなかった (Fig. 3C)。以上の結果から、PPAR γ 遺伝子または C/EBP α 遺伝子導入群でみられる、PPAR γ 、C/EBP α mRNA の多くは Ad ベクターによる発現ではなく、内因性の発現であることが示唆された。

さらに、Ad ベクターを用いた EB への遺伝子導入により、液性因子を加えない条件においても分化効率の改善が認められるかどうか検討した。GPDH 活性を測定することにより分化効率を評価した結果、液性因子存在下における GPDH 活性のレベルには至らなかったが、PPAR γ 遺伝子または C/EBP α 遺伝子を導入することで、GPDH 活性の上昇がみられ、脂肪細胞分化を促進させられることが示された (Fig. 4)。以上の結果から、液性因子の存在に関わらず、Ad ベクターにより脂肪細胞分化に関与する遺伝子を導入することで、EB から脂肪細胞への分化効率を上昇させることが可能であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、遺伝子を導入したヒト臍帯血、骨髄間葉系幹細胞が *in vitro* 培養で遺伝子型、表現型にどのような変化を示すかを解析し明らかにした。本研究で使用した4細胞株 (UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7T-3, UBE6T-6) のうち、hTERTのみで不死化した細胞株 UCBTERT-21 は細胞周期の制御に深く関わる p53/p21 や pRB/p16^{INKA} 経路の変異なしに寿命を相当のばすことができた。しかしながら、同じ遺伝子 hTERT で不死化したヒトケラチノサイトは延命したが、pRB/p16^{INKA} 経路の不活性化や p16 発現の downregulation が見られることが報告されている。これらのことから細胞のタイプによって不死化にはテロメア以外のバリエーションが存在する可能性が示された。

一方、ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子や Bmi-1 がん遺伝子と hTERT を用いて不死化した細胞株 UCB408E6E7TERT-33 (臍帯血由来)、UE6E7T-3 や UBE6T-6 (骨髄由来) は不死化したものの長期培養を続けると、染色体数に大きな変化を示した。UCB408E6E7TERT-33 細胞は培養初期には diploid (2n) であるが、培養期間が長くなるにつれて、tetraploid (4n) と tetraploid より少し少ない異数体 aneuploid (4n-1~5) になる。同じようなパターンが UE6E7T-3 や UBE6T-6 でも観察された。最近、ヒト N/TERT-1 ケラチノサイトや HeLa 細胞の *in vitro* 実験で、異数体 aneuploid が形成される前に tetraploid の形成があり、それは分裂期に2つの娘細胞の不分離によるという nondisjunction 説が報告されたが、古くからヒトがん細胞でも高頻度で tetraploid が観察されている。Aneuploid の UCB408E6E7

TERT-33 細胞の染色体構成を CGH 解析や 13 番染色体と 17 番染色体プローブを用いた pFISH で調べた結果は見事に細胞あたり 17 番染色体が 4 本、13 番染色体が 3 本であることが明らかになった。さらに驚いたことは、17 番染色体は正常であるのに 13 番染色体の 1 本の欠失が diploid UE6E7T-3 や UBE6T-6 両細胞の 70~80% で観察されたことである。これらの 3 細胞株に共通してみられるこの現象から、この培養条件でこれらの細胞株が増殖していくためには 13 番染色体の欠失が重要であったことが示されている。特定染色体の欠失によるカリオタイプ変異はヒト ES 細胞でも報告されている。これまで染色体異数体は tetraploid から形成されるという主張が強かったが、本研究から tetraploid を経由せず、diploid からでも形成されるという異数体形成機構の新たな事実が示された。

tetraploid 形成なしに起こる異数体形成機構は不明であるが、中心体が重要な役割をしている可能性が高い。正常細胞や UCBTERT-21 細胞では、中心体が細胞あたり 1~2 個しかないものが、この 3 細胞株では 3~10 個も存在するものが細胞の 12~35% にもおよび、この問題は次の機会に明らかにしたいと考えている。

細胞治療で最も重要な問題は移植する細胞の質的要素である。間葉系幹細胞が今日再生医療面で大きな期待を受けているのは、他の組織幹細胞ではみられないいろいろな他組織への分化能を持っているからである。この研究で用いた細胞株は臍帯血と骨髄由来の幹細胞であるが、*in vitro* の限られた条件下でも骨細胞、脂肪細胞、神経細胞への分化能を保持していた。遺伝子を導入してもその分化能を維持していた。さらに市販されてい

るヒト間葉系幹細胞に関しても、長期培養における染色体異常解析を行ったが、培地の違いによりその増殖速度に影響を与えることは明らかになったが、長期培養による染色体異常は観察されなかった。今後アレイ CGH による染色体のより詳細な解析を試み、より微細な染色体変化を、より簡便に解析する評価系開発を目指す。

また、ES 細胞の品質を判定する良い指標になると考えられる幹細胞の分化能の検討についても遺伝子導入を用いて行った。ES 細胞を *in vitro* で分化させる過程において、中間体として EB を形成することが一般的に行われている。そこで本研究では EB への遺伝子導入効率をプロモーターの異なる Ad ベクターを用いて検討した。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターが最も遺伝子導入効率に優れていることを明らかにした。CA プロモーターは多くの細胞・組織において外来遺伝子を強く発現させることができるプロモーターとして知られており、未熟な細胞においてもその活性は高いことが多くのグループから報告されている。EB は ES 細胞の集合体であり、未熟な細胞であると考えられるため、EB で高い遺伝子発現を得るには CA プロモーターが適していたことが考えられる。また、Day0 からの Ad ベクターの連続作用が EB の内部でも外来遺伝子を発現させるには有効であることを明らかにした。本研究ではこの手法を用いて、Ad ベクターにより EB に機能遺伝子を導入し、実際に目的の細胞への分化効率を改善できるかどうかについて検討した。その結果、脂肪細胞分化に関与する PPAR γ 遺伝子を導入することにより、液性因子の存在に関わらず EB から脂肪細胞への分化効率を上昇させることに成功した。た

だし、液性因子を作用させなかった場合、高い分化効率は得られなかったため、効率の良い脂肪細胞分化を達成するには PPAR γ 遺伝子の導入と液性因子のコンビネーションが重要であると考えられた。以上の結果から、我々が最適化した EB への遺伝子導入法を用いることにより、EB から目的の細胞への分化効率を促進させられることが明らかとなり、現在、骨芽細胞等のその他の細胞種についても実験を進めており、これにより一層の幹細胞の品質管理が可能になると期待される。

E. 結論

(1) hTERT を導入した臍帯血由来間葉系幹細胞は 133PDL という長期培養でもカリオタイプに変化は見られず、分化能も保持していた。この結果は再生医療に必要とする細胞の *in vitro* 増幅の一步前進になる。一方、がん遺伝子導入細胞株は 13 番染色体 1 本の特異的欠失を伴うが、間葉系細胞本来の分可能は保持していた。これらのことから、これらの細胞株はがん細胞のような染色体不安定性の解析や脂肪細胞、骨細胞を含めた多組織への分可能の研究には最適の材料である。

今後、細胞治療がますます盛んになるが、ES 細胞だけではなく、組織幹細胞でも移植に必要な細胞量の確保には *in vitro* 増幅が不可欠である。そのためには他細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックと同じように、移植された組織の悪性変異を防ぐためにもカリオタイプの検査は品質管理の重要な項目に加えなければならないことをこの研究は警告している。

(2) ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させる場合、EB とよばれる中間体を介して行われているため、本研究では Ad ベクターを用いて EB への遺伝子導入効率の最適化を行った。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターを用いることにより効率良く遺伝子導入可能であることが明らかとなった。さらに、EB の内部で外来遺伝子を発現させるには Day0 からの Ad ベクターの連続作用が有効であった。このベクター及び遺伝子導入法を用いて脂肪細胞分化に関与する遺伝子を EB へ導入した結果、従来の方法と比較よりも高い分化効率を示した。以上より、EB への高効率遺伝子導入により、EB から標的の細胞へ

の分化効率を上昇させられることが明らかとなり、Ad ベクターは幹細胞の分化能（品質）を判定する良いツールになり得るものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, in press.
- 2) 川端健二；各種幹細胞への高効率遺伝子導入法の開発とその応用；**Drug Delivery System**、22、668-669 (2007)
- 3) 川端健二、櫻井文教、水口裕之；改良型アデノウイルスベクターを用いた各種幹細胞への遺伝子デリバリー；**Drug Delivery System**、22、148-154 (2007)

2. 学会発表

- 1) 田代克久、川端健二、櫻井晴奈、倉知慎之輔、櫻井文教、中川晋作、早川堯夫、山西弘一、水口裕之；アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立；遺伝子デリバリー研究会第7回シンポジウム、2007年5月、東京
- 2) 田代克久、井野麻美、川端健二、櫻井晴奈、櫻井文教、山西弘一、水口裕之；ファイバー改変型アデノウイルスベクターを用いたマウス間葉系幹細胞の骨芽細胞分化；日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

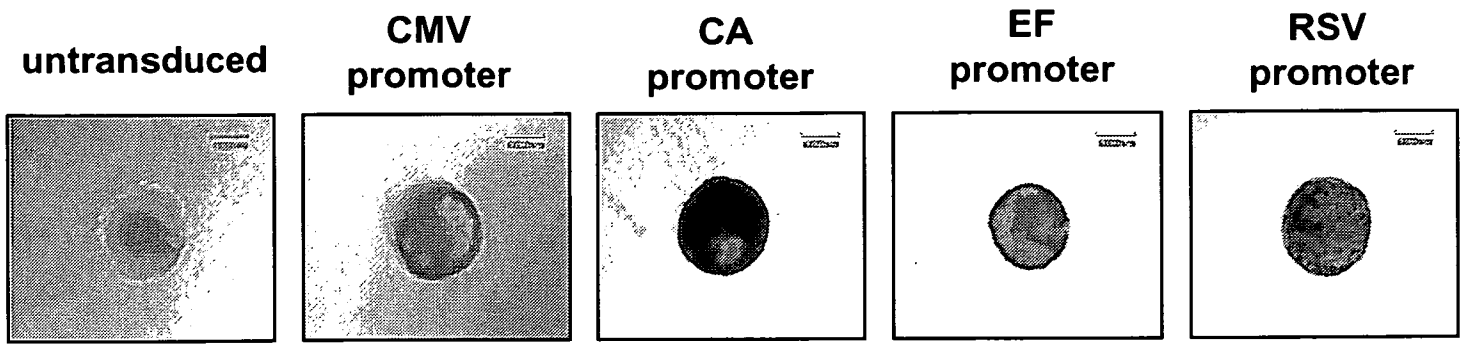


Fig. 1 Ad vector-mediated transduction efficiency in EBs as determined using various types of promoters. 5d-EBs were transduced with Ad vectors at 3,000 VP/cell for 2 days. After 48 hr, X-gal staining was performed. Similar results of X-gal staining were obtained in five independent experiments. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, human elongation factor-1 α ; 5d-EBs, five-day-cultured EBs

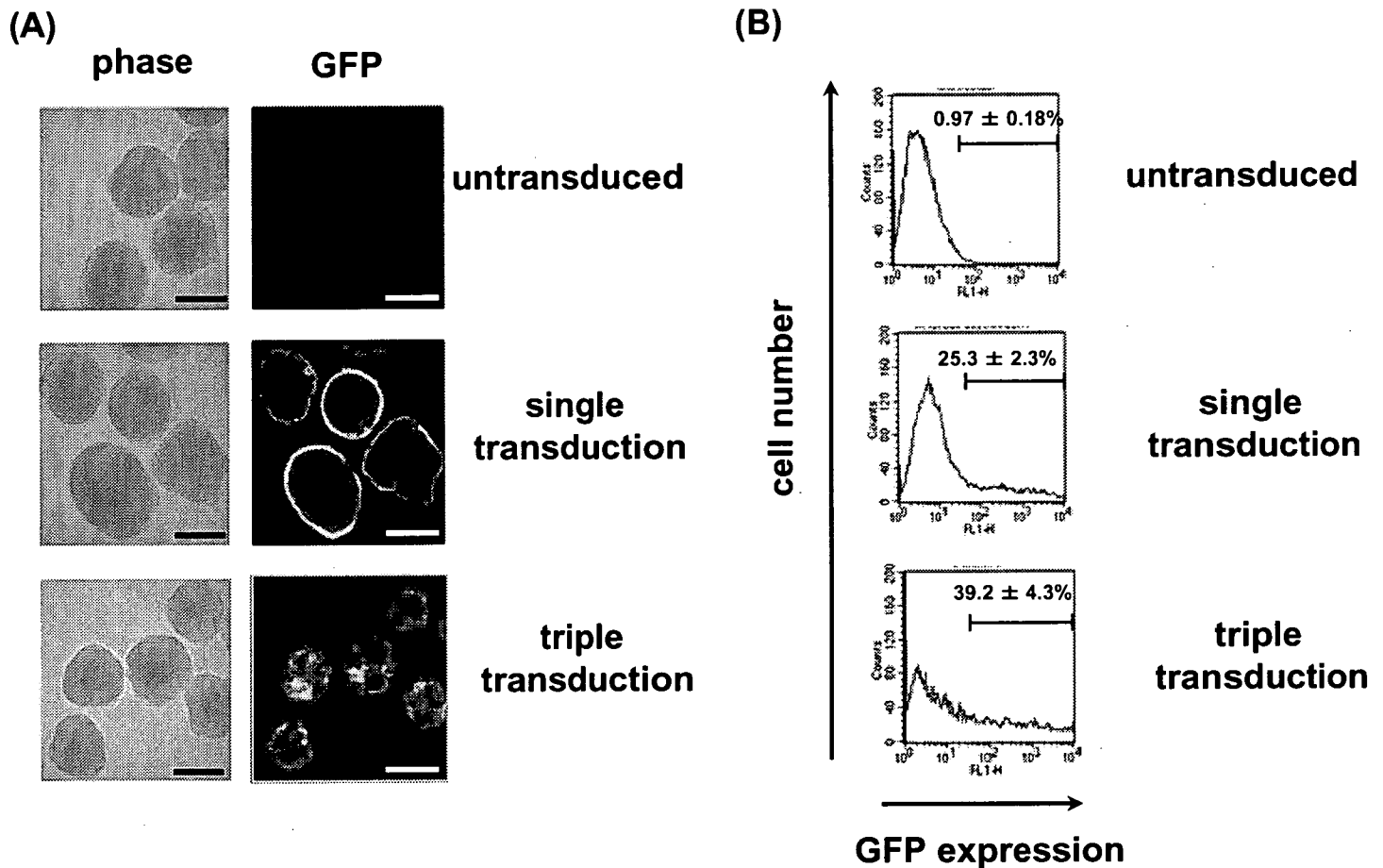


Fig. 2 Optimization of gene transfer into EB by Ad vector.

EBs were transduced with 10,000 VP/cell of Ad-CA-GFP by single transduction (A, B; middle) or triple transduction (A, B; bottom). On day 7, (A) confocal microscopic analysis and (B) flow cytometric analysis were performed. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=5). Untransduced EBs are represented as a negative control (A, B; top). Scale bar indicates 300 μ m.

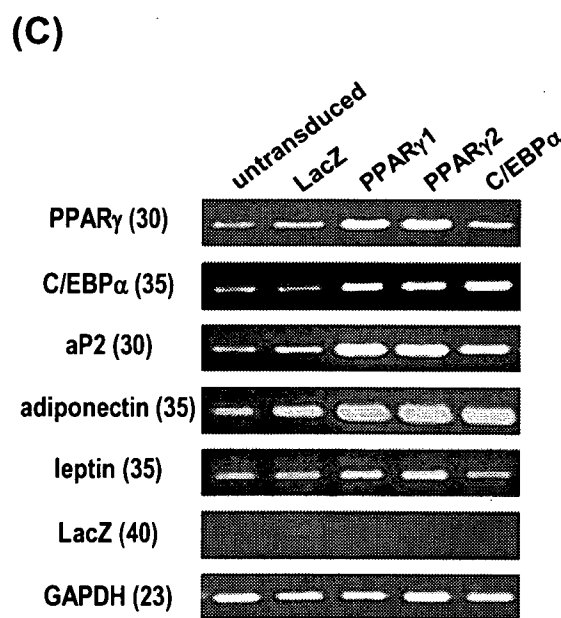
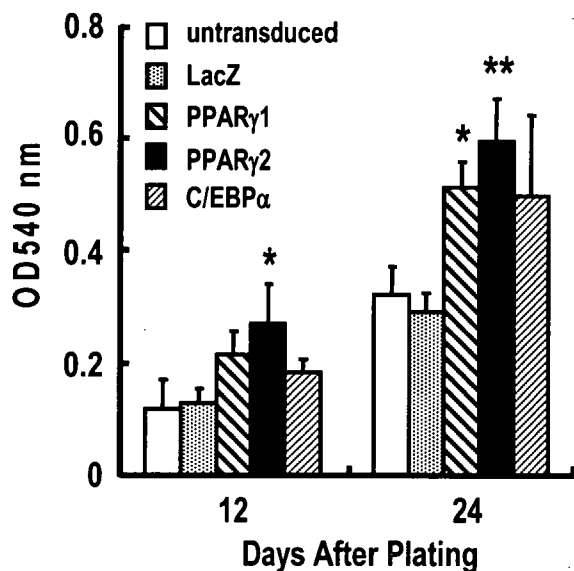
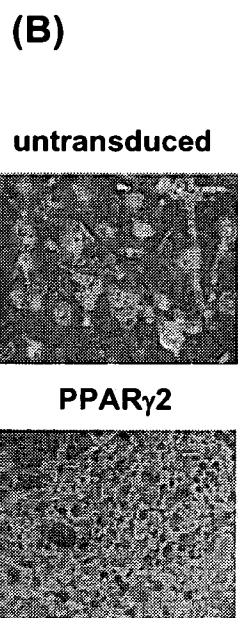
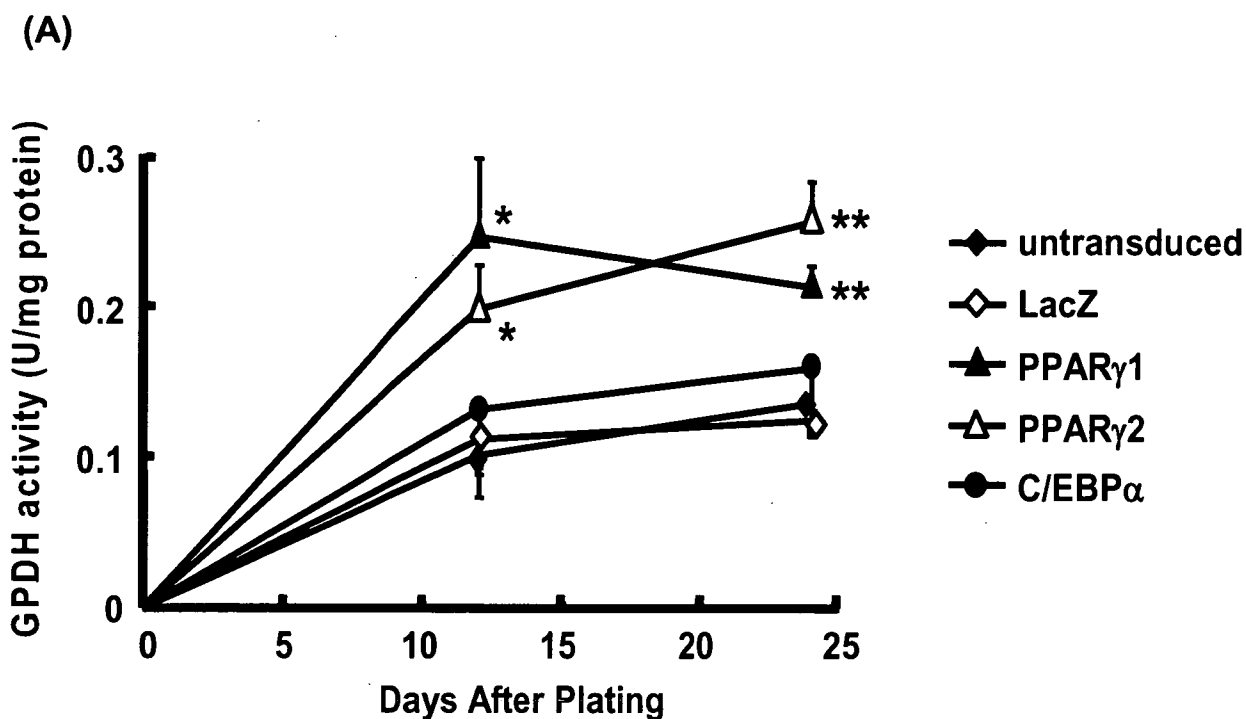


Fig. 3 Efficient adipocyte differentiation from EBs by Ad vector-mediated PPAR γ gene transfer.

EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ, -PPAR γ 1, -PPAR γ 2, or -C/EBP α . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, EBs were cultured for 24 days with adipogenic supplements. On days 12 and 24 after cultivation, (A) GPDH activity in the cell was measured. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=4). (B) Lipid accumulation was detected by Oil-red O staining at day 24 in the untransduced cells (left, top) or PPAR γ 2-expressing cells (left, bottom). Scale bar indicates 60 μ m. After staining with Oil-red O, stained lipid was extracted and the absorbance at 540 nm was measured (right). The data are expressed as mean \pm S.D. (n=4). (C) The expression of PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, leptin, and GAPDH was measured by semi-quantitative RT-PCR. The primer for PPAR γ amplified both PPAR γ 1 and PPAR γ 2. Cycle number is indicated in parentheses. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively, as compared with untransduced EBs. Abbreviations: GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein alpha.

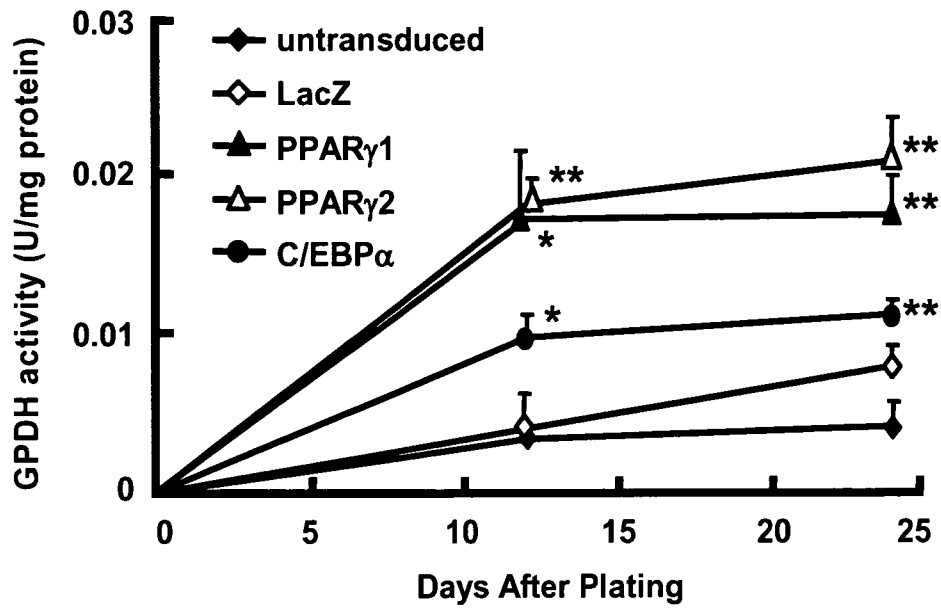


Fig. 4 Ad vector-mediated transduction into EBs promotes adipogenesis in the absence of adipogenic supplements. EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of each Ad vector, and then GPDH activity was measured after cultivated in differentiation medium without adipogenic supplements. The data are expressed as mean \pm S.D. (n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively, as compared with untransduced EBs.

分担研究報告書

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理に関する研究

分担研究者 水澤 博

独立行政法人 医薬基盤研究所

生物資源研究部部長

ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞の品質を確保し再生医療へ応用することを目的として、長期安定培養法の開発、核型解析、ならびに染色体プロファイル解析を用いた細胞の品質評価法の開発を行った。再生医療に用いる幹細胞は、治療に必要な細胞数を確保するために細胞の増殖能が必要となる。しかしながら、試験管内での幹細胞の増殖過程においてはがん化などの染色体異常が生じることが考えられ、そのリスク回避が非常に重要になる。これらのリスクを的確に評価し、安全性を担保するため様々な細胞評価法開発が行われているが、我々は染色体の詳細解析法による再生医療に用いる細胞のリスク評価の可能性に関して検討を行った。最初にモデル細胞として、ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT)、ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子、がん遺伝子 Bmi-1 などの導入により長期増殖能をもつヒト骨髄、臍帯血由来間葉系幹細胞を用い、それらの長期継代培養による染色体の安定性を DAPI 染色法、FISH 法、CGH アレイ法により経時的に調べ、同時に細胞の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化能も検討した。E6/E7 および Bmi-1 遺伝子を導入した 3 種類の細胞株は長期培養後、染色体数にかなりの変動があり、特に 13 番染色体の欠失が各細胞株に共通して観察された。hTERT 遺伝子のみを導入した細胞株は長期培養下でも染色体は安定であった。細胞分化能はいずれの細胞株も保持されていた。また、市販されている間葉系幹細胞についても染色体詳細解析を実施し、その有用性を確認した。本研究から、ヒト ES 細胞の品質管理においても重要な基礎知見が得られ、再生医療に用いる細胞の品質管理の必要性を確認した。

A. 研究目的

ES 細胞、iPS 細胞、ならびに間葉系幹細胞は無限に増殖し、機能細胞へ分化するという特徴を有しており、これら細胞を再生医療へ応用できれば、がん、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞等の致死性疾患に対する極めて有効な治療法になる。しかしながら、ヒト胚由来の ES 細胞を用いることによる倫理的な問題も存在し、本邦ではヒト ES 細胞を用いた研究はわずかとなっており、研

究基盤技術として普及しているとはいえない。また、幹細胞の分化制御機構の解明や幹細胞を用いた動物モデルにおける医療への応用実験などは活発に試みられているが、ヒトに応用するうえで必須となってくる幹細胞の品質管理に関する情報は極めて乏しく、国際的な安全性基準が明確に定められていないのが現状である。そこで本研究では、長期安定的なヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開