

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

細胞工学的手法を用いた中枢神経障害に対する根治的治療法の開発

分担研究者

国立循環病センター研究所 循環動態機能部 脳循環研究室
室長 田口 明彦

兵庫医科大学 医学部
教授 松山 知弘

研究要旨

高齢者要介護者発生原因の約半数が脳血管障害など中枢神経障害であり、これらの疾患に対する新しい治療法の開発は、厚生労働行政にとって極めて重要な課題であるが、脳血管障害に対する単なる神経幹細胞移植では、ほとんど神経幹細胞が生着せずかつ治療効果もほとんどないことが、基礎研究および臨床試験においても明らかにされつつある。我々は中枢神経障害後の血管再生が神経幹細胞の生着および成熟に必須であること、および脳血管再生が内因性神経再生を介して脳神経機能の著明な改善をもたらすことを明らかにしてきた。それらの知見を基に国立循環器病センターにおいて”急性期心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球静脈内投与に関する臨床試験“を平成20年度より開始している(平成19年10月厚労省認可)が本研究ではそれらの研究成果をさらに発展させ、新生血管網を基盤とする幹細胞 niche に神経幹細胞の移植を行い、移植神経幹細胞の生着、成熟および機能を通じて脳神経機能の改善をもたらす治療法の開発を行った。本年度は脳障害後の血管再生と神経幹細胞移植に関して、①血管系細胞の局所移植あるいは血管血球系幹細胞静脈投与による、神経幹細胞 niche となる新生血管が障害部位に誘導できること、②移植神経幹細胞移植の生着・成熟には血管新生を基盤とした幹細胞 niche が必要不可欠であること、③免疫系を中心とした移植神経幹細胞の apoptosis を誘導因子が存在し、それを阻害することにより神経幹細胞生着の生着が飛躍的に高まること、など明らかにしたが、これらの新しい知見は、神経幹細胞移植治療の実現・発展に不可欠な非常に重要な知見であると考えている。

A. 研究目的

現在我が国における要介護3以上のほぼ全介助が必要な者は169万人(5年前と比し約

1.5 倍に増加)であり、そのうち約 1/3 の原因疾患が脳梗塞・脳外傷などの急性中枢神経障害後遺症であるとされている。これらの患者群に対する新しい治療法を開発することは、国民保険医療の向上や介護医療費の軽減とともに、活力ある日本の将来を保つためにも、極めて重要かつ必要不可欠な課題である。神経系幹細胞を用いた様々な研究も積み重ねられてきたが、単なる神経幹細胞移植ではほとんど神経幹細胞が生着せずかつ治療効果もほとんどないことが、様々な基礎研究や米国における脳梗塞患者に対する臨床試験においても明らかにされつつある。

我々は成体 Song Bird 等における生理的な脳神経組織の再生において、神経細胞の移動や分化、成熟は血管新生と平行してプログラムされていることに着目し、血管形成と脳組織再生に焦点を当てて研究を行ってきた。その結果、中枢神経障害後の血管再生が神経幹細胞の移動を促進するだけでなく、その生着および成熟に必須であること、および脳血管再生により誘導された再生神経が脳神経機能の著明な改善をもたらすことを明らかにし、内因性神経再生促進を目的とした”急性期心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球静脈内投与に関する臨床試験“を平成 20 年度より開始している。本研究ではそれらの研究成果をさらに発展させ、新生血管網を基盤とする幹細胞 niche に神経幹細胞の移植を行い、移植神経幹細胞の生着、成熟および機能を通じて脳神経機能の改善をもたらす治療法の開発を目的としており、神経機能向上に適した神経幹細胞の選定と、生着した移植神経幹細胞の分化促進、機能誘導を行い、神経幹細胞移植治療の実現に向けた研究を行うとともに、自己骨髄単核球を使った臨床試験で得られた知見と総合することにより、より安全かつ有効な中枢神経障害治療法の開発を行う。

B. 研究方法

本研究で我々は、血管新生を基盤とした幹細胞 niche への神経幹細胞移植後、移植神経幹細胞の分化過程における apoptosis 誘導因子を阻害することにより、神経幹細胞生着の生着が飛躍的に高まることを明らかにしてきた。本年度は生着した神経幹細胞が障害された脳神経機能向上に寄与させるため、その分化および成熟に関するメカニズムを明らかにすることにより、画期的な治療法の確立につながる知見の探索・獲得を行った。

本年度は移植後の分化誘導因子の条件設定などとともに生着、成熟そして機能回復が効率よく起こる条件設定およびそれらの根底にあるメカニズムの解明を通して、治療法の開発に直結する知見の獲得を行った。移植神経幹細胞の神経細胞への分化誘導の促進に関しては、in vivo での細胞誘導を行い、脳局所における薬剤投与に関してはすでに脳外科領域で Ommaya reservoir (レザパー)として臨床応用されているが、本研究において神経幹細胞移植周囲に noggin, chordin 等の BMP 受容体阻害因子をマイクロオスモティックポンプを用いて持続的に注入(2 μ l/day)し、グリアへの分化を阻害することにより神経細胞への分化の検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、各施設での動物実験委員会の承認を受けるとともに、実験動物の①苦痛の軽減、②数の削減、③代替法の使用に努めている。

C. 研究結果

本研究において、脳障害後の血管再生と神経幹細胞移植・神経再生に関して、下記の知見を得た。

- ①移植神経幹細胞の生着、生存に関しては免疫系を中心とした細胞死誘導機構が存在し、自己由来神経幹細胞移植においても免疫系の制御が必要不可欠であり、そのコントロールにより移植神経幹細胞の生着率は飛躍的に高くなる(投稿中)。
- ②血管系を中心とした神経幹細胞 niche に関しては、胎生期において観察される血管再生と神経再生の関連と同様に、移植神経幹細胞の足場となる血管内皮シートの同時局所移植あるいは血管血球系幹細胞静脈投与が必要不可欠である(投稿中)。
- ③移植神経幹細胞の分化誘導に関して、レザバーなどの移植神経幹細胞周囲への設置・サイトカインの注入は、局所における炎症の増大や移植神経幹細胞の細胞死を誘導する可能性があり、厳密なコントロールが必要である。
- ④脳梗塞巣においては、側脳室周囲や海馬における神経幹細胞とは異なる障害誘導型神経幹細胞が存在し、それらの神経幹細胞群は脳障害後の細胞治療において非常に有力な神経幹細胞ソースである(European J of Neuroscience in press)
- ⑤脳梗塞患者においても側脳室周囲や海馬における神経幹細胞とは起源が異なると考えられる障害誘導型神経幹細胞が観察されるとともに、脳梗塞後の神経再生および血管再生における経時的变化は脳梗塞モデルでの変化ときわめて類似しており、脳梗塞動物モデルで得られた神経幹細胞移植と血管新生に関する知見が、脳梗塞患者に応用できる可能性が高い(投稿中)。

D. 考察

非常に巧妙かつ複雑に制御されている中枢神経系の機能再生医療の実現には多くの解決すべき課題があるが、本研究で得られた新しい知見は、神経幹細胞移植治療の実現・発展に不可欠な非常に重要な知見であると考えている。

E. 結論

脳神経機能の改善には、傷害された神経回路網の厳密な再生は必ずしも必須ではなく、新生介入ニューロンなどによる既存の神経回路網の再構成でも可能であると考えられてお

り、本研究で得られる移植神経幹細胞の生着、分化および成熟の過程に関する知見は、極めて対象患者数が多い中枢神経障害患者に対する画期的な治療法の確立に必要不可欠であると考えている。中枢神経障害に対する新しい治療法の確立は、すぐには達成することは困難なものの、厚生労働行政および活力ある我が国の将来には非常に重要であり、本研究の成果はそれらに大きく貢献できると考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

田口 明彦

1. 論文発表

Taguchi A. Vascular factors in diabetes and Alzheimer' s disease.

J. Alzheimers Dis. 2009 in press.

Taguchi A., Nakagomi N, Matsuyama T, Kikuchi-Taura A, Yoshikawa H, Kasahara Y, Hirose H, Moriwaki H, Nakagomi T, Soma T, Stern DM, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 2009 ; 29 : 34-38.

Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A., Yoshimasa Y. Decreased circulating CD34 positive cells are associated with the progression of diabetic nephropathy.

Diabetic Medicine. 2009 in press.

Maruyama S, Taguchi A. Iwashima S, Ozaki T, Yasuda K, Kikuchi-Taura A, Soma T, Ishii H, Murohara T, Takahashi H, Kasuga H, Kumada Y, Toriyama T, Ito Y, Kawahara H, Yuzawa Y, Matsuo S. Low circulating CD34-positive cells is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients.

Kidney International. 2008;74:1603-1609.

田口 明彦、脳梗塞の幹細胞治療。

老年期痴呆研究会誌 2009 in press

田口 明彦、成富博章。 神経疾患の再生医療。

神経疾患の最新の治療 2009-2011. 13-15.

田口 明彦。 血管新生療法の現状と今後の展望。

新時代の糖尿病学(4)。2008 ; 66(9) : 345-348.

田口 明彦、森脇 博、成富 博章。

脳血管障害に対する幹細胞治療の開発。 Clinical Neuroscience 2009 ; 112-113.

田口 明彦、成富 博章。 脳梗塞に対する再生医療。

日本医事新報 2008 ; 4396 ; 46-48

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D. M, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 2008;28:445-449.

Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Taura K.A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients.

Diabetes Res Clin Pract. 2008 ;81(3):327-330.

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-taura A, Soma T, Stern. D.M, Yoshikawa H, Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 2008 ; 28 : 1086-1089.

Okada S, Makino H, Ayako Nagumo A, Sugisawa T, Muneya Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.

Diabetes Care. 2008; 31:157-158.

2. 学会発表

The 4th annual IEEE-NIH Life Science Systems and Application (LiSSA' 09), Large-Scale High-Performance Cell Membrane Perforation, with Nanoimprinted Mass Producing Perforator”

Takashi K. Saito, Osamu Suekane, Takanori Akagi, Akihiko Taguchi, Takanori Ichiki, Accepted, 2009. 4. 9.

日本脳卒中学会

『マウス脳梗塞巣由来神経幹細胞の特性』

“Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice.”

中込隆之、齋野織恵、土居明子、藤川昌敏、田片将士、松山知弘、中込奈美、田口明彦、島根, 2009. 3. 20-22.

日本脳卒中学会

『vascular niche が虚血誘導性神経幹細胞増殖に与える影響の検討』

“The effect of vascular niche on ischemia-induced neural stem cells in vitro.”

中込奈美、廣瀬遥香、田口明彦、中込隆之、土居明子、齋野織恵、田片将士、藤川昌敏、松山知弘.

島根, 2009. 3. 20-22.

日本脳卒中学会

『vascular niche が虚血誘導性神経幹細胞生着に与える影響の検討』

The effect of vascular niche on ischemia-induced neural stem cells in vivo.”

中込隆之、藤川昌敏、齋野織恵、土居明子、田片将士、松山知弘、中込奈美、田浦映恵、田口明彦.

島根, 2009. 3. 20-22.

第8回日本再生医療学会

『Vascular niche が脳障害誘導性神経幹細胞生着に与える影響の検討』

中込奈美、中込隆之、藤川昌敏、斎野織恵、土居明子、田片将士、松山知弘、田口明彦。
東京，2009.3.6.

第20回日本脳循環代謝学会総会。

『脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小循環及び神経機能改善効果の検討』

藤川昌敏，中込隆之，中野亜紀子，斎野織恵，松山知弘，中山大輔，廣瀬遥香，田口明彦。
東京，2008.11.6-7.

第20回日本脳循環代謝学会総会。

『脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小血管内皮細胞保護効果の検討』

中野亜紀子，中込隆之，藤川昌敏，斎野織江，松山知弘，中山大輔，田浦映恵，田口明彦。
東京，2008.11.6-7.

第20回日本脳循環代謝学会総会。

『免疫不全が脳梗塞後の組織損傷と修復に与える影響の検討』

斎野織江，中込隆之，金岡伸一，中野亜紀子，田片将士，松山知弘，笠原由紀子，田口明彦。
東京，2008.11.6-7.

NanoBio-seoul 2008.

“Large-Scale High Performance Cell Membrane Perforation, Assisted by Robotics Technologies” ,

T.K. Saito, O. Suekane, T. Akagi, A. Taguchi, T. Ichiki, (Yonsei Biomedical Science and Technology Initiative, Seoul, 2008), Abstract book p.194.

Seoul, Korea, 2008.10.29-30.

第31回 日本高血圧学会総会

「テルミサルタン投与によるPPAR γ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果」

笠原由紀子、田口明彦、中込隆之、松山知弘
札幌，2008.10.9-11.

6th World Stroke Congress.

“Circulating CD34-positive cells provide a marker of progress of vascular type

cognitive impairment.

Taguchi A, Nakagomi N, Kasahara Y, Matsuyama T, Nakagomi T, Naritomi H.
Vienna, Austria. 2008. 9. 24-27.

6th World Stroke Congress.

“Depletion of CD4-positive T lymphocytes enhances neurogenesis with functional recovery after stroke.”

Matsuyama T, Nakagomi T, Saino O, Nakano A, Fujikawa M, Taguchi A.
Vienna, Austria. 2008. 9. 24-27.

6th World Stroke Congress.

“Telmisartan suppresses reperfusion injury in a murine focal cerebral ischemia.

Kasahara Y, Taguchi A, Nakagomi T, Matsuyama, T, Naritomi H.
Vienna, Austria. 2008. 9. 24-27.

2008 年秋季第 69 回応用物理学会学術講演会

齋藤 敬、赤木貴則、田口明彦、一木隆範

「ナノインプリント構造体による光化学細胞膜穿孔法」

名古屋、2008. 9. 8

第 40 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会

『テルミサルタン投与による PPAR γ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果』

笠原由紀子、田口明彦、中込隆之、松山知弘.

つくば、2008. 7. 10-11.

3. その他

第 41 回大阪大学未来医療セミナー

田口 明彦. 『脳血管障害に対する細胞治療とその未来』

大阪、2008. 7

第 17 回近畿老年期痴呆研究会

田口 明彦. 『脳梗塞の幹細胞治療』

大阪、2008. 7

第 22 回老年期痴呆研究会

田口 明彦.

『急性期心原性脳塞栓患者に対する自己骨髄単核球静脈投与に関する臨床試験』
東京, 2008. 7.

日本医科大学医学会第 18 回公開シンポジウム

田口 明彦. 『骨髄細胞を用いた 脳血管障害に対する治療法の開発』
東京, 2008. 6.

第 9 回循環器再生医療研究会

田口 明彦. 『脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療』
東京. 2008. 5.

松山 知弘

1. 論文発表

Taguchi, A., Matsuyama, T., Nakagomi, T., Shimizu, Y., Fukunaga, R., Tatsumi, Y., Yoshikawa, H., Kikuchi-Taura, A., Soma, T., Moriwaki, H., Nagatsuka, K., Stern, D., Naritomi, H. (2008) Circulating CD34-Positive cells provides a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28:445-449.

Yoshihara, T., Taguchi, A., Matsuyama, T., Shimizu, Y., Kikuchi-Taura, A., Soma, T.M., Stern, D.M., Yoshikawa, H., Kasahara, Y., Moriwaki, H., Nagatsuka, K., Naritomi, H. (2008) Increase in circulating CD34-Positive cells in patients with angiographic evidence of Moyamoya-like vessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 28:1086-1089.

Taguchi, A., Nakagomi, N., Matsuyama, T., Kikuchi-Taura, A., Yoshikawa, H., Kasahara, Y., Hirose, H., Moriwaki, H., Nakagomi, T., Soma, T., Stern, D.M., Naritomi, H. (2009) Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 29:34-38.

2. 学会発表

Taguchi, A., Nakagomi, N., Kasahara, Y., Matsuyama, T., Nakagomi, T., Naritomi, H. (2008) Circulating CD34-positive cells provide a marker of progress of vascular type cognitive impairment. 6th World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

Matsuyama, T., Nakagomi, T., Saino, O., Nakano, A., Fujikawa, M., Taguchi, A. (2008) Depletion of CD4-positive T lymphocytes enhances neurogenesis with functional

recovery after stroke. 6th World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

Kasahara, Y., Taguchi, A., Nakagomi, T., Matsuyama, T., Naritomi, H. (2008) Telmisartan suppresses reperfusion injury in a murine focal cerebral ischemia. 6th World Stroke Congress, 9.24-27, Vienna, Austria.

中山大輔, 田口明彦, 植田初江, 盛英三, 松山知弘 (2008) 脳梗塞患者における血管新生、神経再生に関する経時的検討. 第33回日本脳卒中学会総会, 3.20-22, 京都.

藤川昌敏, 中込隆之, 中野亜紀子, 斉野織恵, 松山知弘, 中山大輔, 廣瀬遥香, 田口明彦 (2008) 脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小循環及び神経機能改善効果の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

中野亜紀子, 中込隆之, 藤川昌敏, 斉野織江, 松山知弘, 中山大輔, 田浦映恵, 田口明彦 (2008) 脳梗塞後における骨髄単核球投与の脳微小血管内皮細胞保護効果の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

斉野織江, 中込隆之, 金岡伸一, 中野亜紀子, 田片将士, 松山知弘, 笠原由紀子, 田口明彦 (2008) 免疫不全が脳梗塞後の組織損傷と修復に与える影響の検討. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 11.6-7, 東京.

笠原由紀子, 中込隆之, 松山知弘, 田口明彦 (2008) テルミサルタン投与による PPAR γ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果. 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 7.10-11. つくば.

笠原由紀子, 田口明彦, 中込隆之, 松山知弘 (2008) テルミサルタン投与による PPAR γ 作用を介した脳虚血再灌流障害抑制効果. 第31回日本高血圧学会総会. 10.9-10. 札幌.

3. その他

Matsuyama, T. (2008) A role of immune cells in post-stroke neurogenesis. Special Seminar, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, Le Gros Clark Building, University of Oxford, 10.1., Oxford, UK.

松山知弘 (2008) A role of immune cells in post-stroke neurogenesis. 4th SSSR, 12.23, 東京.

松山知弘 (2008) 脳卒中の神経再生免疫療法. 第10回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ, 9.5-6, 宮崎.

松山知弘 (2008) 脳卒中の再生医療. 大阪大学医学部保健学科講義, 6.18, 吹田.

4. 特許登録

特許第4064569号

発明の名称 小胞輸送蛋白ミントの測定法

特許権者 独立行政法人科学技術振興機構

発明者 松山知弘, 岡本昌也, 杉田 實

平成20年1月11日

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

医療実用を念頭においた胚性幹(ES)細胞の内因性必要十分条件の検討

分担研究者

(株)ニコン・新事業開発本部・契約社員、
理化学研究所・客員研究員、埼玉医科大学・受入研究員、広島大学・非常勤講師
加藤 英政

国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 脳循環研究室 室長
田口 明彦

研究協力者

国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 脳循環研究室
廣瀬 遥香

研究要旨

ES細胞の医療応用にはまだまだ道のりがある。これは、最近特に注目されているiPS細胞にも当然影響してくる話である。ES・iPS細胞ともに、移植した際にはテラトーマを形成し、それがこれらの医療応用を強く妨げている感がある。我々は、この問題を細胞内因性と外因性要因に分けて考え、昨年度は特に移植環境下における細胞外因性要因の検討を行った。今回は、これに引き続き、細胞移植医療の成否に関わる可能性の強い細胞内因的な要因を探り、従来の幹細胞の未分化評価方法に「不備」を見だし、より安全かつ加工のしやすい幹細胞の必要十分条件を新たに提案した。

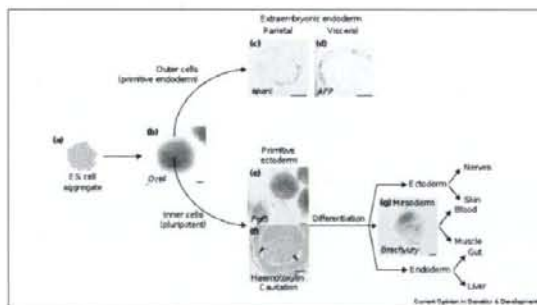
A. 研究目的

今年度の医科学分野における話題は、山中グループのiPS細胞が席卷した感がある。事実この細胞は、「個人」の細胞を脱分化させて、医療に応用可能な幹細胞を創出させる点で非常に大きな発見であった。しかし忘れてはならないのは、これら未分化・分化多能な細胞は以前からよく知られているものの、その臨床応用に関してはそれほど目立った進展が報告されていないことである。このような中、我々は昨年度の報告において、マウスES細胞を用いて特定の神経細胞を選択誘導し、それをマウスに移植するなどしてその有用性を検討して来た。その際問題となったのは、一見、培養皿内では十分な分化が認められる場合でも、一度移植すると、検知感度以下の残留未分化細胞が、移植環境にてその腫瘍原

性を再燃し、テラトーマを形成する点であった。このことは同時に、医療応用を考える上で、これまでのES細胞をはじめとする幹細胞の評価方法に不十分な点があったことを意味している。つまり、従来の評価方法は、いくつかの遺伝子・タンパクマーカーにて、その存在をもって自動的に未分化であることを了承していたに過ぎないのである。このような考えは、現在盛んに行われているiPS細胞を樹立する過程でも問題となってきた。この作成過程で用いる山中因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)の発現の有無だけからは、実は分化に適した幹細胞であるかどうかは判断できない。一例としては、現に山中グループも、これら因子を強制発現させた細胞から、さらにNanog(←それ自体の強制発現はiPS細胞誘導には必須ではない!)を強く発現している細胞を選択して来てはじめて、より厳密な意味での未分化性評価方法であるgermline transmissionが可能であったことを報告している。

これらを総合的に鑑みて、医療応用のためには、幹細胞の「医科学的再定義」が必要であることに気づいた。換言すれば、ある幹細胞を規定の分化培養方法にて目的の医用細胞に変換した後に、その細胞の分化効率をもってretrospectiveに幹細胞の「基底状態(ground state)」を考えるという方法である。この汎用的な提案をテストすべく、今回我々は、マウスES細胞を用いて、異なる2つの培養方法に供し、それらを同時進行的に神経系細胞へと分化させたのち、その分化誘導行程全般に関してステージ特異的遺伝子マーカーの発現動態を観察した。この結果を踏まえて、今後の再生医療実現に有用であると考えられる、ES細胞由来細胞移植における細胞内因性・外因性必要十分条件を提案する。

B. 研究方法



今回の実験をデザインする上で用いた考え方を、左図を用いて概説する。一般的にマウスES細胞は、blastocyst期のinner cell mass(左図でいうところのinner cells)に同等と考えられている。その後、マウス胎仔内では、これらの細胞は胎仔本体を形成するprimitive ectodermと、

胎盤の一部となるprimitive endodermへと分化していく。このように、primitive ectodermはinner cellsに比べて、分化多能性が低い細胞である。したがって、一般にはこれらprimitive ectodermはpluripotent細胞とは考えない。しかし重要なことは、これらprimitive ectodermにおいても、現行のマウスES細胞の未分化性を評価する上で用いられるマーカーが発現している点である。つまり、現在認められている「未分化マーカー」では、これらinner cellsとprimitive ectodermの区別はつかない。しかし、上図でも示されているように、primitive ectodermでは*Fgf5*が発現していることが知られている。そこで我々は、この発現をES細胞の「医科学的分化マーカー」として考え、本実験においてそ

の発現動態に特に注目して、ES 細胞培地の評価に用いた。

C. 研究結果

ES 細胞から神経系細胞を誘導する方法は、加藤らが独自に開発した分化プロトコル (*Stem cells*, 24: 1908-1913, 2006) に準じ行った。本培養分化誘導プロトコルにおいては、大きく分けてウシ血清 (FBS) 含有培地を用いた培養条件から無血清培養への順化培養、神経系分化誘導用サイトカイン添加培養の工程に分けられる。このとき無血清培養とは、一般的に動物細胞培養に用いられるウシ血清の代わりに、血清代替品として市販されている混合液を添加した培地 (または調整済み培地) を用いることを言う。無血清条件で培養することは、本分化誘導プロトコルにおいて神経系細胞の誘導に必須であるだけでなく、人獣共通感染症の問題などの観点から誘導神経系細胞の医用利用の障壁となりうるウシ血清使用のリスクを低減する意味でも重要である。

無血清培養に用いるこの混合液であるが、各メーカーから様々な種類が発売されており、その組成はまちまちである。前述の分化誘導プロトコルでは高効率で神経系に誘導できることが確認されているが、一般に ES 細胞はその培養条件の差異が培養結果に大きく影響することが知られているため、この混合液によっても誘導した神経系細胞の性質が異なる可能性が考えられた。

そこで、本研究では無血清培養に用いる血清代替混合液を KNOCKOUT™SR (Gibco, 10828)、ESF-C (Nipro, 2003-05) の 2 種類用意し、それ以外の条件をすべて揃えて分化誘導培養、細胞の品質評価を行った。

具体的には、まず ES 細胞をフィーダー細胞 (MEF) 上で維持培養している状態から、無フィーダー・無血清状態に至るまで「適応培養」を施す。すなわち、継代を繰り返すことにより培養皿中の MEF 密度を減らすとともに、用いる培地に含まれる 15% ウシ血清含有培地を段階的に代替物に置き換えていくことで、5 回の継代の後にはフィーダー・血清ともに僅少とする操作である。このとき、血清代替混合液として用いたのが、15% KNOCKOUT™SR 含有 DMEM 培地または ESF-C である。次に適応培養により完全に無血清状態になった未分化 ES 細胞を神経分化誘導用に調整された培地 (CDM) に懸濁し、8 日間の浮遊培養を行う。前半の 4 日間は CDM にポリビニルアルコールを添加した培地を用い、後半は PVA 不含有の培地を用いる。なお、培養期間中、細胞を酵素的に解離処理することで、より選択的に神経系への分化を促した。

各培養段階における遺伝子発現をモニタするために、⑦血清添加維持培養中、④適応培養 4 日目 (FBS : KSR or ESF = 1 : 1)、⑦適応培養終了時、⑤神経系誘導培養 8 日目、の細胞より RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

① ES 細胞の無血清培養の条件検討

KNOCKOUT[™]SR 添加 DMEM 培地を用いた条件 (以下 KSR) と ESF・C 培地を用いた条件 (以下 ESF) で、細胞の増殖速度、コロニーの形成率、細胞・コロニーの形態に、大きな差異はなかった。具体的には、どちらの培養条件でも細胞の増殖は無血清培養への順化後に最も遅くなり、その後無血清培養が続くにつれ再び早くなるという傾向を持った。

このとき、僅かではあるが培養条件の変化にスピードの点でより敏感であったのは ESF であり、KSR の方が培養初期の血清条件の影響をより長く保持し続ける可能性が考えられた。また、無血清培養がひと月ほどの長期になると、特に ESF で扁平な線維芽状でコロニー形成しない分化細胞らしきものの割合がかなり増えたことが確認できた。このことから、長期にわたる無血清培養には ESF よりも KSR の方が適していることが考えられた。これらの結果もやはり培養条件の差異が培養結果に影響を及ぼすことを示唆するが、本研究の主旨と外れるのでこれ以上の言及は差し控える。

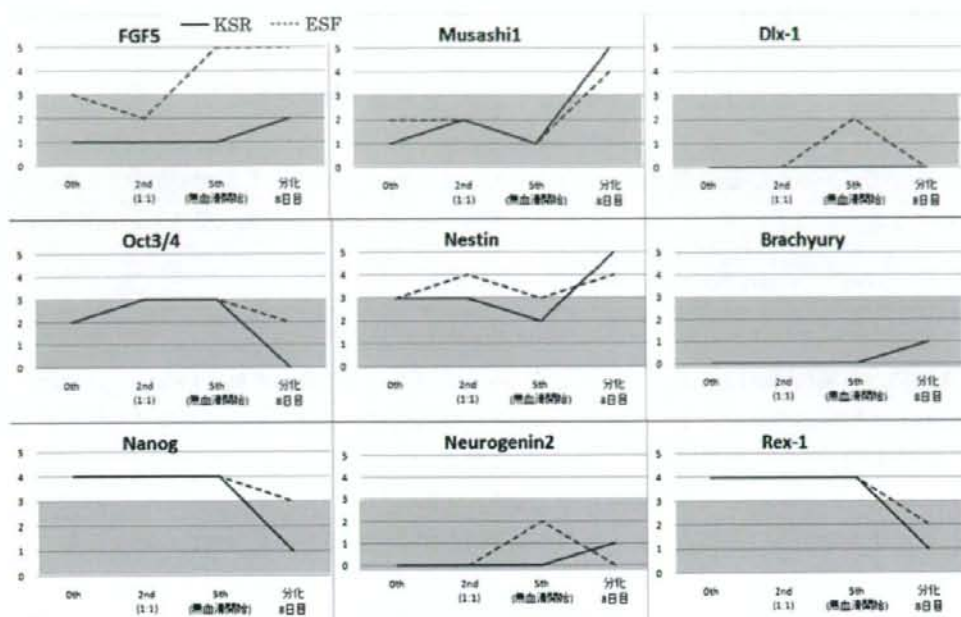
② 神経分化誘導前後における遺伝子発現の経時的関連

分化誘導前後における細胞の状態を評価するために、未分化マーカー、神経系マーカーとして知られる遺伝子の各培養段階での発現を比較した。

その結果、どの遺伝子も適応培養中には 2 つの条件間で比較的似た発現をしているのに対して、分化誘導培養後には発現に相違が見られた。培地中に血清代替液を含まない分化誘導培養後にこのような差異が生じたという結果は、前培養中の条件がその後の細胞の状態に大きく影響していることの再確認となった。(適応培養中は LIF などの因子が、強く遺伝子の発現を制御していて培地の影響が表れにくい可能性が考えられた。)

特に、Oct3/4、Nanog、Rex-1 といった幹細胞に特異的な遺伝子に注目すると、適応培養中は高いまま維持されているのに対して分化誘導後に発現が低下するという同様のパターンを示していた。この時 KSR と比較して ESF ではこれらの遺伝子の分化後の発現低下が緩慢であった。より多く細胞内に残存している未分化な性質が、分化誘導後に顕在化したと考えられる。

ここで、他の遺伝子と比較して FGF5 の発現は明らかに異なった傾向を持っていた。すなわち、FGF5 の発現は培養期間を通して ESF において高発現で、特に完全に神経誘導培養に移行した後で顕著であった。



D. 考察

一般的な幹細胞の同定方法は、いくつかの抗原の発現の有無で判断される。これまで、ES細胞を除いたほとんどの場合において、その抗原が発現していないとならない positive markersに加えて、その抗原が発現してはならない、つまり「欠格事項」としての negative markersの組み合わせが真の幹細胞の同定には不可欠である。これに比べ、ES細胞の「条件」としては、Oct4、Sox2、Rex-1およびNanogが同一細胞の核に存在すれば、それを十分とする向きが多かった。しかし、今回の我々の結果から、これらの criteriaのみでは、その細胞が果たして医療に適しているのかどうか見分けがつかないことが判明した。特に、分化誘導前は、これらの positive markers (Oct4、Nanog、Rex-1) の発現に差異が認められないにもかかわらず、神経分化誘導後にはこれらの遺伝子発現の残留量に明確な差が認められることと、神経分化の効率にも明らかな違いがあった。これら未分化細胞の残留は、移植した際、腫瘍を誘発する可能性を多分に保持しており(昨年度の報告書参照)、実際医療応用するには当然排除されなければならない。

これらの結果は、ES細胞のみに当てはまる限定的なものではないことは明らかである。iPS細胞も、その「理想像」はES細胞であり、ES細胞と長所短所を共有する。特に最新の研究成果では、このiPS細胞が(ES細胞に比べて)さらに極めて多様な「基底状態」を呈することが知られてきた。これらの問題に直面してはじめて、「幹細胞はどうあるべきか?」という根本的な問題が議論されはじめた感がある。これは、実際にこれら多様な初期条件にあるiPS細胞から、特定の細胞を分化誘導しようとする試みが予想以上に難しいことに

起因している。我々は、2年間の研究成果として、この疑問に対して一つの解答を提供できたと考えている。

今後は、より確実な安全方策を検討する上で、移植後も継続的に残存する未分化な細胞を選択的に排除できるような方法を引き続き研究する必要がある。これには、たとえば、加藤が埼玉医科大学との共同研究で行ったような、未分化細胞だけで細胞増殖・生存を規定するような分子メカニズムの、より深い理解が必要であろう（「論文発表」の項参照）。

E. 結論

幹細胞の医療応用への期待が今年ほど沸騰した年は記憶にない。しかし、その期待とは裏腹に、現実の医療行政面では、実質的な解決法はまだ提示されていない。我々は、これらの問題に取り組んできたが、これまでに得た情報を総合して1つの解答を提案したい。それは、分化多能性幹細胞の基底状態に関連して、従来言われている Oct4+/Sox2+/Nanog+ という必要条件に、Fgf5-/SPARC-* などの十分条件を加えて幹細胞の「質」を判断することにより、より安全で加工しやすい幹細胞の品質管理条件を規定するものである。

*注：ES細胞の基底状態が、初期の胎盤系細胞マーカーである SPARC の陰性にも依存し、その後の神経分化誘導にも影響する結果は、加藤が理化学研究所・バイオリソースセンターの清澤秀孔博士と行っている共同研究によるものである（論文作成中）。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

“Differential requirement for nucleostemin in ES cell and neural stem cell viability.”
Jun Nomura, Masayoshi Maruyama, Miyuki Katano, Hidemasa Kato, Jiaying Zhang, Shinji Masui, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Masazumi Nishimoto, and Akihiko Okuda
Stem Cells. 2009; *in press*

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

軟骨細胞三次元培養におけるグリコサミノグリカン関連糖の添加効果
(グリコサミノグリカン関連糖を利用した脱分化抑制培養法の検討)

分担研究者
北海道大学工学部
高木睦

研究要旨

軟骨細胞の二次元培養において、GAG 関連糖の添加やコーティングは軟骨細胞の脱分化を抑制する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

軟骨は自己修復能力の非常に乏しい組織であるため、重度の軟骨欠損に対する治療手段の一つとして、患者自身の軟骨小片から分離した軟骨細胞を体外で増殖させて移植する再生治療 (Carticel™) が有効であると考えられている。しかしディッシュを用いた二次元培養で軟骨細胞を増殖させると、軟骨細胞が繊維芽様細胞へと脱分化するという問題があるため、脱分化させずに軟骨細胞を増殖させる技術の開発が必要とされている。これまでに当研究室では、軟骨組織に含まれるコンドロイチン硫酸 C を構成する単糖である D-グルクロン酸 (GlcA) や N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を、軟骨細胞の三次元培養で添加することによって、軟骨組織特有の細胞外マトリックスである II 型コラーゲンの mRNA 量が增大することを明らかにしている。そこで本研究では、軟骨細胞に対する GAG 関連糖の脱分化抑制効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

3, 4, 5-tris-dodecyloxy-benzyl-N-acetylglucosamide (TDOB-GlcNAc) や 3, 4, 5-tris-dodecyloxy-benzyl-galactoside (TDOB-Gal) を予めコーティング (0.33 nmol/cm²) したポリスチレンディッシュにブタ初代軟骨細胞を播種し (1.0×10⁴ cells/cm²)、GlcA 又は GalNAc を添加 (50 mg/l) した 10%FCS 含有 MEM 培地を用いて 37℃、5%CO₂ 雰囲気下で静置培養した。この際、1 週間毎に全量培地交換し、細胞がプレコンフルエントに達したら継代した。細胞密度をトリパンブルー染色法で、II 型コラーゲン蓄積を免疫染色法

で分析した。また、倒立位相差顕微鏡で得られた細胞画像を基にして、画像解析ソフト (ImageJ ver. 1. 41) を用いて細胞の円形度を算出した。

C. 研究結果

GlcA や GalNAc を添加して培養した軟骨細胞は、1 回継代後 約 4 週間で細胞形態に変化が見られ、糖無添加の培養に比べて、細胞の円形度と多角形度が高くなり、II 型コラーゲン免疫染色でもより強く染色された。また、TDOB-GlcNAc や TDOB-Gal をコートしたディッシュ上で 3 週間培養した軟骨細胞も、コーティング無しのディッシュでの培養に比べて、細胞の円形度と多角形度が高くなり、II 型コラーゲン免疫染色でも強く染色された。

D. 考察

GAG 関連糖の添加やコーティングが軟骨細胞の脱分化を抑制する作用機作を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

軟骨細胞の二次元培養において、GlcA や GalNAc の添加及び TDOB-GlcNAc や TDOB-Gal のコーティングが軟骨細胞の脱分化を抑制する可能性があると考えられた。

F. 学会発表

なし