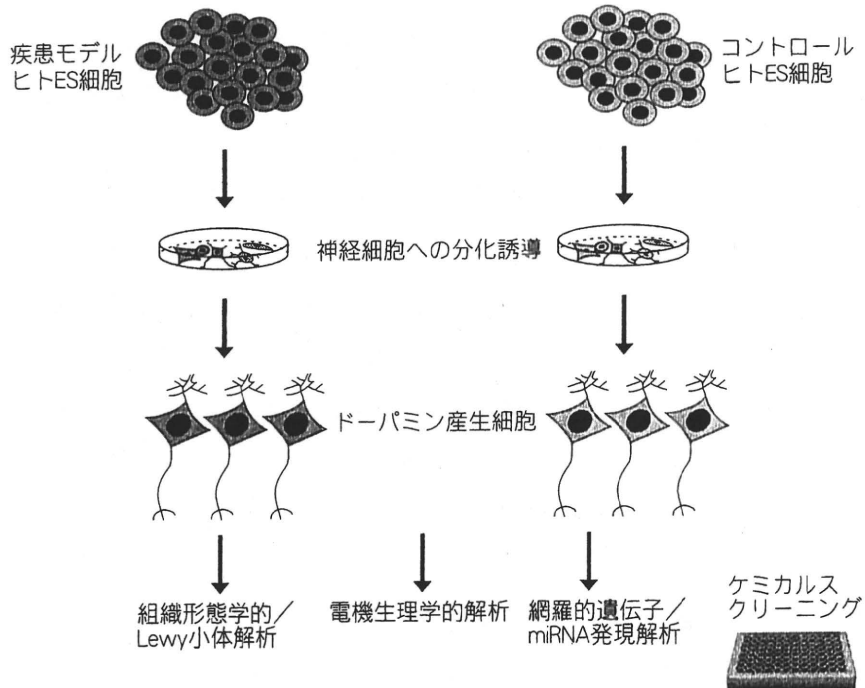


疾患の病態や病因メカニズムの解析には、さまざまな研究システムが構築されている。*in vivo* 解析系では、多くの場合、実験動物マウスが用いられている。一方、ヒトサンプルを対象とすると細胞培養系に限られる。ES細胞は *in vitro* 系でヒト胚発生の再現性に優れており、遺伝子改変操作も可能であることからヒト疾患モデル系として非常に有用である。着床前診断(PGD)で診断された単一遺伝子疾患由来のES細胞もすでに樹立されており、難治疾患の貴重な解析系である(文献1)の図1(改変)。

図1 ヒト疾患の実験モデル系



パーキンソン病モデルヒトES細胞から標的細胞であるドーパミン産生細胞を分化誘導する。ヒトES細胞からは、豊富に細胞が得られるため種々の解析系に十分な細胞が獲得できる。神経特異的なマーカを導入すれば経時的な追跡も明確に行える。ケミカルスクリーニング等の創薬開発にも応用できる。

図2 疾患モデルヒトES細胞による解析(パーキンソン病)

る⁵⁾。したがって、ES細胞は初期発生・分化過程や器官形成過程における遺伝子変異の影響を解析できる幹細胞である。ES細胞は無限に細胞増殖可能であり、生化学的および分子生物学的分析には非常に有用である。1998年にヒトES細胞の樹立が報告され⁶⁾、10年経過したが、マウスES細胞で培われてきた遺伝子改変操作技術もヒトES細胞で応用されるようになってきた。特定の分子をターゲットにして人工的に疾患モデルを作製することが可能であり、着床前診断(PGD)を受けた胚からES細胞を樹立し疾患モデルES細胞を作製することも可能である。

2.3 ヒトES細胞とマウスES細胞疾患モデル

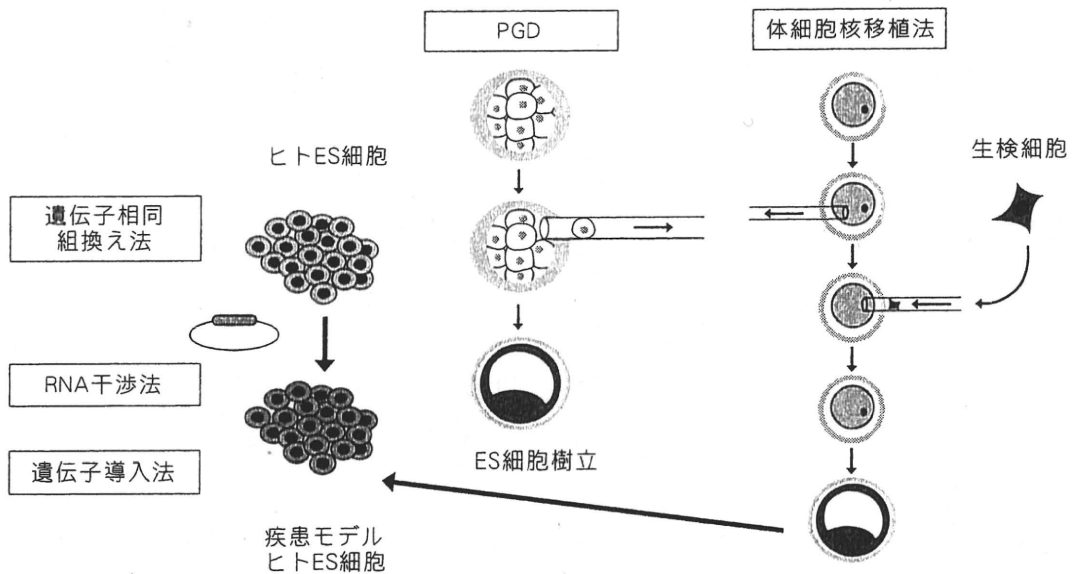
ヒト疾患を動物細胞を用いるよりヒト細胞を用いて研究する利点はヒトと動物間の生化学的、代謝レベルおよび遺伝学的な相異がある点にある。ヒト生命科学の推進に大きく貢献している実験動物マウスでも器官や臓器の増殖、サイズや解剖学的にもヒトとは異なる。ヒトES細胞とマウスES細胞も遺伝子発現や働く遺伝子パスウェイにおいても大きく異なることが報告されている⁷⁾。疾患によってはヒトでの表現型をマウスで示すことができないものも存在する⁷⁾。たとえば筋緊張性ジストロフィー(Myotonic Dystrophy)や脆弱性X症候群(Fragile X)等のような伸張したトリプレットリピート病(the unstable triplet repeat expansion disorders)やヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT1)遺伝子の変異により引き起こされるレッシュ・ナイハン症候群はマウスモデルが存在していない。尿酸の代謝酵素であるHPRT1が働かなく、尿酸が過剰に産生され痛風様症状、腎尿管系結石や精神運動発達遅滞を伴う疾患である。マウス等のげっ歯類ではHPRTの変異が存在しても別代謝経路により代謝されるため尿酸が蓄積しない⁸⁾。マウスが適切な疾患モデルとならないような場合、ヒト疾患に対応する新たな実験モデル系が必要である。生検組織より細胞株を樹立しそのような疾患モデルとして研究対象にしてきたが、体細胞のため限られた細胞寿命があり、特定の細胞のみになり汎用性がない。一方、ヒト細胞株に変異を導入する方法で疾患モデル細胞作製することも可能であり、細胞周期、細胞死のような細胞レベルでの生命現象を探求し疾患メカニズムや創薬開発の系として用いられている⁹⁾。しかし、変異を導入された細胞はすでにトランスフォーム細胞であり、元来の疾患起因細胞とは性質が異なる。加えて、動物試験で全く問題がなく極めて安全な薬とされたが、ヒトで胎児への催奇形性が認められたサリドマイドのような薬剤が存在する。ヒトES細胞の未分化性性質を持つ細胞から分化していく過程は、子宮内の初期発生過程をある程度模倣しているとすれば、これまで妊娠期間中に服用する薬の胎児への影響を検定する非常に貴重な細胞系となる。

3 ゲノム操作によるヒト ES 細胞疾患モデル(図3)

ヒト ES 細胞へ外来遺伝子を導入する方法としてトランスフェクション法やインフェクション法がすでに報告されている^{10),11)}。ヒトの遺伝子変異による疾患では大きく分けて遺伝子の機能欠損型(loss of function mutation)あるいは機能獲得型(gain of function mutation)がある。機能獲得型ではタンパク質の機能異常のため疾患に至る。そのようなモデルでは変異遺伝子の導入により再現できる可能性がある。しかし、多くの疾患では機能欠損型の変異により引き起こされる。機能低下を目的に遺伝子変異を導入する方法がいくつかあるが、大まかに、ランダムに導入する法を使用するかターゲティング法がある。ランダムに導入する場合でも導入部位でのポジションエフェクト等による外来遺伝子不活性化の影響が少ない BAC を用いた遺伝子導入法も報告されている^{12),13)}。

3.1 遺伝子相同組換え法¹⁴⁾

マウス ES 細胞による遺伝子ターゲティング法の確立は、遺伝子機能の解析精度を格段に高め、今日の生命科学における我々の基礎知識を大いに深めてきた。ヒト ES 細胞では、非常に残念ながら、マウス ES 細胞での遺伝子改変に関する技術や知見がそっくりそのままヒト ES 細



正常胚より樹立したヒト ES 細胞に対して、疾患誘導変異を遺伝子ターゲティング法により導入する。遺伝子相同組換え法の他に、BAC を導入したりレンチ、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入やより大きな外来遺伝子を導入できるバキュロウイルスベクターを用いる方法が開発されている。PGD で診断を受けた遺伝性疾患の胚や患者からの生検による体細胞核移植(NT)法により胚盤胞を作製し新たに疾患モデル ES 細胞を樹立するアプローチがある。しかし、ヒト NT 法による ES 細胞樹立の報告はない。

図3 疾患モデルヒト ES 細胞の作製

胞へ反映させることはできなかった。最近になってようやくヒト ES 細胞での遺伝子ターゲティング法の応用が可能となってきた。分子レベルでのより詳細な解析が可能となってはじめて幹細胞制御メカニズム、分化動態そして再生医学や創薬への応用展開が可能となると思われる。

ヒト ES 細胞樹立を最初に報告した米国ウイスコンシン大学のグループがヒト ES 細胞による遺伝子相同組換え法をはじめて報告し¹⁵⁾、他のグループも HPRT1 遺伝子の変異をレッシュ・ナイハン症候群のモデルヒト ES 細胞の樹立を報告している¹⁶⁾。X 染色体上にある遺伝子に起因する疾患では、XY 染色体を有する ES 細胞の片側アリル(X 染色体)だけをターゲティングするだけで疾患モデル ES 細胞が獲得可能である。しかし、マウス ES 細胞を用いた遺伝子組換え方法および効率を残念ながらそのままヒト ES 細胞へあてはまることはできない。組換え効率が極めて低く、組換えがうまくいった細胞のクローン化の困難性、細胞増殖スピードがマウス ES 細胞に比し 3 倍以上遅いため全体の手技はマウスより時間が多くかかる等、ヒト ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティング法の大きな足かせとなっていた。ヒト ES 細胞を単離した場合、細胞死が高率に誘導されるなどヒト ES 細胞培養そのものに遺伝子マニピュレーションを非効率的にさせている要因があったが、最近、Sasai らは Rho-associated kinase(ROCK) inhibitor、Y-27632 がヒト ES 細胞の細胞単離時の細胞死を抑制し、クローニング効率を飛躍的に向上することを報告した¹⁷⁾。Y-27632 の使用により飛躍的にヒト ES 細胞による遺伝子ターゲティング法での生存効率を上げた¹⁴⁾。特定遺伝子座への遺伝子導入により有用なヒト ES 細胞の作製に成功した報告もある。血液・血管系細胞の形成過程で起こる発生異常は胚・胎児致死あるいは重篤な疾患を引き起こすが、脊椎動物の造血形成、中胚葉系細胞からヘマンジオブラストそして造血、血管形成へ発生・分化が進む 1 次造血は着床直後の胚発生で極めて初期から起こるとされていて、ヒトでは研究アプローチが極めて困難であった。Stanley らは内・中胚葉初期の分化マーカーである MIXL1 遺伝子に対して、ヒト ES 細胞での遺伝子ターゲティングを行い GFP レポーター遺伝子を導入したヒト ES 細胞によるヒト 1 次造血解析システムを構築している¹⁸⁾。

ヒト ES 細胞での遺伝学的な性質および機能の理解を深めることが今後の遺伝子改変操作技術の進歩に不可欠である。最近、この点に関して極めて興味深い進展が報告された。

●ファージ C31 インテグレース

Thyagarajan らはゲノムの特定配列を認識して染色体修飾を行うことのできる、バクテリアファージ C31 インテグレースを用いてヒト ES 細胞で非常に安定的に導入遺伝子が制御される遺伝子改変システムを構築した¹⁹⁾。

●ジンクフィンガーヌクレアーゼ

カスタマイズした DNA 切断酵素、ジンクフィンガーヌクレアーゼとインテグラーゼ欠損レンチウイルスベクター(IDLV)を組み合わせることでヒト ES 細胞のターゲット部位に遺伝子導入を報告している²⁰⁾。ジンクフィンガーヌクレアーゼはゲノムの特定部位を切り出す作用があ

り、次世代のより安全な遺伝子治療法に高く評価されているが、IDLVを用いることにより組換えを効率良く行うことを可能にしている。

●ヒト ROSA26 遺伝子座

マウス Rosa26 遺伝子座は導入遺伝子がポジションイフェクトを受けにくく遺伝子のサイレンシングが出ないため、細胞の分化状態にかかわらず遺伝子の発現を制御できるということからマウス ES 細胞での遺伝子改変操作に汎用されてきた。Keller らは、ヒトでも ROSA26 遺伝子座が確認され、ヒト ES 細胞を用いたヒト ROSA26 遺伝子座における遺伝子改変操作の有用性が報告された²¹⁾。ヒト ROSA26 遺伝子座は分化動態にかかわらず、マウス同様常にサイレンシングを受けておらず、広範な遺伝子改変操作が可能である。つまり、疾患モデル作製のための機能欠損型、機能獲得型や細胞の発生・分化動向を追跡することがより簡便になる。

3.2 RNA 干渉法

すでに遺伝子機能解析ツールとして *in vivo* および *in vitro* でもさまざまな実験系に汎用されている RNA 干渉法であるが、ヒト ES 細胞でも遺伝子機能ノックダウン法に有用であることが示されてきた²²⁾。ヒト ES 細胞による疾患モデル作製にも応用可能である。RNA 干渉法では導入される遺伝子座に無関係であり、導入効率の点では遺伝子相同組換え法より優れている。しかし、遺伝子のノックアウトではなくノックダウン法なので完全に遺伝子発現を抑制することはない。さらに、疾患モデルであればなおさら非特異的なゲノムへの影響であるオフターゲット効果を慎重に検討する必要がある。

4 ゲノム操作によらないヒト ES 細胞疾患モデル

疾患患者由来細胞からの ES 細胞樹立が考えられる。体細胞核移植(NT)法による胚と PGD 胚からのヒト ES 細胞の作製である(表1)。

4.1 体細胞核移植法による作製

マウス疾患モデルを用いた NT 法による疾患 ES 細胞樹立と遺伝子ターゲティング法による治療までの一連のストラテジーが示されている²³⁾。ヒト NT 法による ES 細胞の樹立は、現在米国およびイギリスの一部の機関で行われているが、ヒト NT-ES 細胞樹立の報告はなされていない。ヒト NT 法では、マウス卵子で起こるリプログラミング機構とはまた異なるヒト卵子(あるいは受精卵)のリプログラミング機構が存在し、それに合わせた技術的な革新が必要である²⁴⁾。

表 1 PGD の対象となった症例

遺伝性疾患	検査数
Cystic Fibrosis	69
β -thalassaemia	53
β -thalassaemia + HLA	8
Spinal muscular atrophy	29
Sickle-cell anaemia	9
Huntington disease	90
Huntington disease exclusion	8
Myotonic dystrophy type1	67
Adenomatous polyposis coli	9
Marfan syndrome	8
Duchenne muscular dystrophy	17
Becker muscular dystrophy	4
Haemophilia	14
Fragile-X syndrome	27
Others	104
Total	516

ヨーロッパ生殖医学会(ESHRE)がまとめた単一遺伝子疾患に対する臨床的な PGD 症例数(期間は 2003 年 1 ~12 月 : 2006 年 ESHRE 報告)

4.2 着床前診断胚を用いた作製²⁵⁾

人為的に遺伝子改変 ES 細胞を作製する以外に、特定遺伝子の変異を持つ胚より作製して疾患モデルヒト ES 細胞を作製することが可能である。着床前期胚の一部の細胞を用いて遺伝子診断が行われている。PGD では、遺伝性疾患が高い確率(25~50%)で子に起こる可能性のある疾患が対象となり、体外受精(あるいは顕微授精)で得られた胚の 3 日目胚から 1 または 2 個の割球を採取し PCR 法および FISH 法によって診断し問題がなかった胚を胚盤胞期で移植する。日本では、PGD は(社)日本産科婦人科学会でその適応が審査され施行されているが、ごくわずかな症例しか行われておらず、現実的に不可能である。欧米では年間に数百例の PGD が行われており、診断可能な疾患は 200 以上に及ぶ²⁶⁾。対象疾患となるものは脆弱 X 症候群、ドゥシャン型筋ジストロフィー症、嚢胞性線維症、副腎白質ジストロフィーなどで行われている。ヨーロッパ生殖医学会が 2003 年に行われた PGD の症例数と疾患を報告している²⁷⁾(表 2)。脆弱 X 症候群の PGD を受けた胚から ES 細胞が樹立され、その詳細なジェネティックおよびエピジェネティック解析の結果が報告されている²⁸⁾。脆弱 X 症候群は遺伝性の精神発達障害を来す病気で、罹患率が 1,500~2,500 人に 1 人と比較的頻度の高い疾患である。X 染色体上にある、脳の発達に重要な FMR1 遺伝子の伸張した CGG トリプレットリピートにより正常なタンパク質が合成されなくなり、最終的に FMR1 の機能低下が起こり症状を呈する。CGG トリプレットリピートと FMR1 の機能低下にはエピジェネティックな制御機構が働いているが、マウスでは有効な実験モデル系が存在していなかった。脆弱 X 症候群ヒト ES 細胞疾患モデルでは、着床後早期に起

表2 これまで樹立されたヒト ES 細胞疾患モデル

遺伝子ターゲティング法	報告
Lesh-Nyhan syndrome	文献 15) 文献 16)
PGD	
Fragile X syndrome	文献 28)
Adrenoleukodystrophy	文献 29)
Duchenne muscular dystrophy	文献 29)
Becker muscular dystrophy	文献 29)
Fanconi anemia	文献 29)
Complementation group A	文献 29)
Huntington disease	文献 29)
Marfan syndrome	文献 29)
Myotonic dystrophy	文献 29)
Neurofibromatosis type1	文献 29)
Thalassaemia	文献 29)
Cystic Fibrosis δ F508	文献 30)
Myotonic dystrophy type1	文献 31)
Hemophilia A	文献 31)
Cystic Fibrosis 405+1G	文献 31)

こる神経系構築を反映した ES 細胞分化とともに FMR1 遺伝子プロモータ領域の DNA メチル化やヒストン修飾、FMR1 遺伝子の発現が低下することなど脆弱 X 症候群のメカニズムを解明するための重要な知見が得られている。この系は、他のトリプレットリピート病でもみられるヒト細胞を用いたトリプレットコードと遺伝子発現抑制のメカニズム解明にも極めて貴重な細胞培養系である。

5 疾患モデルの課題

ヒト ES 細胞は高い多分化能性を持ち、種々の疾患モデルへ対応可能となるが、そこには安定した手法で、効率の良いターゲット細胞への分化誘導法が必要となる。ES 細胞からの分化誘導は①胚様体(EB)の形成、②特定の細胞外基質も用いた 2D 培養系、③間葉系支持細胞を用いた共培養システム、等の分化誘導系最適化をはかる。ES 細胞による疾患モデル構築は、幹細胞生物学と発生生物学を基盤にしたアプローチであり、初期発生過程の組織細胞学と分子レベルでの解明が必須である。ES 細胞から分化誘導が可能な細胞でのアプローチが、疾患モデルの対象となる。逆にいえば、分化誘導効率の低い、再現性の不確かな細胞を標的とした疾患モデルは、たとえ PGD 胚より ES 細胞が樹立されたとしても全体の実験系はなかなか成立しにくいことになる。数多ある難治疾患に対応する標的細胞、組織は異なっており目指す細胞への分化誘導系の確立は必須である。

ヒト ES 細胞の樹立から 10 年が経過しヒト ES 細胞を用いた胚発生メカニズムの理解はますます深まっており¹⁾、ヒト ES 細胞による病態解明へ向けた研究の展開がより進むと考えられる。

6 今後の可能性

ヒト ES 細胞による疾患モデル解析システムは、変性疾患等でこれまでの研究アプローチが限られた、特に適切なヒトサンプルが使用不可能であった疾患へのアプローチの仕方を変える可能性が大きい。病気を引き起こす原因となる細胞が生み出される過程を再現でき、疾患を培養ディッシュ内で再現可能である。適切な細胞株が確立できれば、数年以内に世界中で疾患特異的細胞を用いた研究展開が可能となり得る。それだけでなく、この解析系は環境因子を研究する新たなアプローチ法を獲得できることになるかもしれない。たとえば、喫煙は肺ガンとの因果関係があるようにこのヒト疾患モデル系を応用すれば糖尿病、アルツハイマー、パーキンソン病などの発症および進行、抑制等に作用する物質の影響を解析することができる。長期的視野で病気の進行を止めたり、抑制する薬剤を作り出す系として非常に有効なツールとなり得る。疾患が診断されたときの観察では、病態は理解できるが、その病態がどのように引き起こされてきたか、特に特定の遺伝子変異が原因と判明していない疾患においては、複数の細胞株を樹立する必要があるだろう。望むべくは、体外培養系で全ての異なる細胞株で同様な変性を示せば、細胞間でのバリエーションに合わせた治療戦略を選択できるかもしれない。

参考・引用文献

- 1) T. Dvash : *Pediatr Res.*, **60**, p.111(2006).
- 2) 阿久津英憲 : 医学のあゆみ, **223**, p.497(2007).
- 3) J.A. Thomson : *Science*, **282**, p.1145(1998).
- 4) F.P. Di Giorgio : *Nat. Neurosci.*, **10**, p.608(2007).
- 5) T. Dvash, N. Benvenisty : *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, **18**, p.929(2004).
- 6) M. Rao : *Dev. Biol.*, **275**, p.269(2004).
- 7) I.F. Ben-Num : *Mol. Cellular Endocrinol.*, **252**, p.154(2006).
- 8) M.A. Bedell : *Genes Dev.*, **11**, p.11(1997).
- 9) K. Zeh : *Assay Drug Dev.*, **1**, p.755(2003).
- 10) T.P. Zwaka : *Human Stem Cells*, Wiley, p.357(2007).
- 11) S.R. Braam : *Nat. Methods*, **5**, p.389(2008).
- 12) E. Salero, M.E. Hatten : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, p.2997(2007).
- 13) A.J. Washkowitz, D.A. Shaywitz : *Human Stem Cells*, Wiley, p.377(2007).

- 14) R.P. Davis : *Nat. Protoc.*, **3**, p.1550(2008).
- 15) T.P. Zwaka : *Nat. Biotechnol.*, **21** p.319(2003).
- 16) A. Urbach : *Stem Cells*, **22**, p.635(2004).
- 17) K. Watanabe : *Nat. Biotechnol.*, **25**, p.681(2007).
- 18) R.P. Davis : *Blood*, **111**, p.1876(2008).
- 19) B. Thyagarajan : *Stem Cells*, **26**, p.119(2008).
- 20) A. Lombardo : *Nat. Biotechnol.*, **25**, p.1298(2007).
- 21) S. Irion : *Nat. Biotechnol.*, **25**, p.1477(2007).
- 22) H. Zaehres : *Stem Cells*, **23**, p.299(2005).
- 23) W.M. 3rd Rideout : *Cell*, **109**, p.17(2002).
- 24) D. Egli : *Nat. Rev. Mol Cell Biol.*, **9**, p.505(2008).
- 25) D. Ben-Tosef : *Mol Cell Endocrinol.*, **282**, p.153(2008).
- 26) E. Fragouli : *J. Assist Reprod Genet*, **24**, p.201(2007).
- 27) K.D. Sermon : *Hum. Reprod*, **22**, p.323(2007).
- 28) R. Eiges : *Cell Stem Cell*, **1**, p568(2007).
- 29) Y. Verlinsky : *Reprod Biomed Online*, **10**, p.105(2005).
- 30) S.J. Pickring : *Reprod Biomed Online*, **10**, p.390(2005).
- 31) T. Turetsky : *Hum. Reprod.*, **23**, p.46(2008).



Characteristics of stem cells based on expression profile of molecular markers

Shihori Tanabe, Yoji Sato and Kazuhiro Suzuki

Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science, Tokyo, Japan

ABSTRACT

In recent years, the information of stem cells has been accumulated as the research progressed. It is important to understand their characteristics for proper application of stem cells in cellular therapy. The common feature of stem cells can be described as their capacity for self-renewal and differentiation. Stem cells do, however, have different features that characterize each species of stem cells, such as mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, neural stem cells, embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Moreover, cancer stem cells have recently been shown to play an important role in cancer, which suggests the possibility of targeting cancer stem cells for its treatment. This review describes the characteristics of stem cells to provide a better understanding of the unique features

of these cells represented by the term of 'stemness'.

1. INTRODUCTION

Stem cells have the unique capacity for self-renewal and multilineage differentiation (1). Recent research has revealed detailed features of stem cells, which provide us with the key to understanding the origin of the cell. This article reviews recent perspectives in the stem cell research.

2. FEATURES OF STEM CELLS

A. Mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells, a type of somatic stem cells derived from tissues such as bone marrow, can differentiate into osteogenic cells, chondrogenic cells and adipogenic cells (2). In recent years, mesenchymal stem cells have been used in cellular therapy or

Address correspondence to: Shihori Tanabe, Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan., E-mail: stanabe@nihs.go.jp

immunotherapy to reconstitute tissue or to prevent an immune response in transplantation by exploiting their capacity for differentiation or their immunosuppressive feature (3). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell culture is positive for CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124 and negative for CD34 and CD45 (2). Mesenchymal stem cells are also characterized by the positive expression of Sca1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD106 and are found to be negative for CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD19, CD79, CD31 and HLA-DR (4). It has also been reported that mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood and bone marrow are positive for CD29, CD44, CD105, CD73 and HLA-A, -B and -C and negative for CD31, CD34, CD45 and HLA-DR (5). Furthermore, it has been described that bone marrow mesenchymal stem cells express the following phenotype: CD34, CD44, CD45, c-Kit, and major histocompatibility complex class I and II negative; Flk-1, Sca-1 and Thy-1 at low levels and CD13 and stage-specific antigen I (SSEA-I) at high levels (6). On the other hand, flow cytometry analyses of stem cells derived from connective tissue have shown that the cells stain positively for CD34 and CD90 and negatively for CD3, CD4, CD8, CD11c, CD33, CD36, CD38, CD45, CD117, Glycophorin-A and HLA-DR II (7). Overall, mesenchymal stem cells derived from bone marrow may be commonly characterized by positive expression for CD29, CD44, and other molecules.

B. Hematopoietic stem cells

Hematopoietic stem cells differentiate into the blood cell lineage, including T cells, B cells, NK cells, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes. The hematopoietic stem cells as well as other types of stem cells have the capability to self-renew. The cells are usually found in the bone marrow, cord blood and peripheral blood. Human hematopoietic stem cell culture is positive for CD34 and CD90 and negative for Lin and CD38 (8,9,10). For mouse hematopoietic stem cells, Kit (c-Kit), Sca1, CD34 and Slamf1 are known as positive markers, whereas Lin and Flt3 (Flk2) are negative markers. The combination or expression of surface markers for hematopoietic stem cells changes as the cells develop and differentiate into the several types of multipotent or oligopotent progenitor cells. It is known that the expression level of Flt3 increases, whereas that of Slamf1 decreases as mouse hematopoietic stem cells differentiate into progenitor cells. In the human hematopoietic cell lineage, the expression of CD38 increases in progenitor cells (8). It is also suggested that the surrounding microenvironment (niche) is important for supporting stem cells including hematopoietic stem cells (11). Myc (c-myc) and Mycn (N-myc) activities are reported as key factors for hematopoietic stem-cell function including proliferation, differentiation, and survival (12).

C. Neural stem cells

Neural stem cells are positive for glial

fibrillary acidic protein (GFAP), Musashi, Nestin, PDGFR α and CD133, and have the ability to differentiate into neurons and oligodendrocytes (13,14). GFAP is also a marker of astrocytes, suggesting that the neural stem cells are somewhat related to astrocytes (15). The cells are isolated from the subventricular zone or the hippocampus in the brain. It was recently reported that Sox2-positive neural stem cells in the adult hippocampus are multipotent and can self-renew, whereas Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis, indicating the physiological significance of Sox2 for the stemness of neural stem cells (14,16). Therefore, Sox2 may be useful as a marker of neural stem cells.

D. Embryonic stem cells

Embryonic stem cells are pluripotent cells derived from the inner cell mass of a blastocyst, an early stage embryo. Wide varieties of embryonic stem cell lines have been characterized (17,18), and some of the key genes for maintaining the undifferentiated state and pluripotency have been described as *POU5F1 (OCT4)*, *NANOG*, *SOX2*, and others such as *ZFP42 (REX1)*, *UTF1*, *GDF3*, *FOXD3*, *TRET*, *FGF4* (19,20,21,22). The assessment of several human embryonic stem cell lines has established SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, *POU5F1 (OCT4)* and *NANOG* as common markers for human embryonic stem cells (23). It is also suggested that *GJA1* is a marker for the undifferentiated state of human embryonic stem cells (24). A report

on gene expression in human embryonic stem cells and human embryonic carcinoma cells showed that *POU5F1 (OCT4)* is upregulated in both types of cells, as compared to control samples including both somatic cell lines and normal testis (25).

E. Induced pluripotent stem cells

Induced pluripotent stem cells are another type of pluripotent stem cells, which are artificially reprogrammed from non-pluripotent cells and resemble human embryonic stem cells in phenotypic features. The retroviral introduction of *Pou5f1 (Oct3/4)*, *Sox2*, *Myc (c-myc)* and *Klf4* was reported to develop mouse induced pluripotent stem cells (26). The expression of a set of factors, namely *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *KLF4* and *MYC (c-Myc)* or the set of *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *NANOG* and *LIN28* was shown to induce reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells by retroviral transduction (27,28). More recently, valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, was found to enable reprogramming of primary human fibroblasts with only two factors, *Oct4* and *Sox2*, without the need for the oncogenes *c-Myc* or *Klf4* (29). Reprogramming of liver and stomach cells (30) and generation of mouse-induced pluripotent stem cells without viral vectors (31) or retroviral integration (32) have also been reported.

3. PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF STEM CELLS

A. Proliferation of stem cells

It is known that, with increasing passages of mesenchymal stem cells in culture, the proliferation rate and the capacity for differentiation decrease (33). These changes are associated with expression of several genes. For example, the expression of nephroblastoma overexpressed gene and EPH receptor A5 in human bone marrow mesenchymal stem cells is increased in late stage of cultures, whereas the expression of runt-related transcription factor 2 and necdin homolog (mouse) is decreased (34). Genome change in the cells also occurs in some cases; however, it is not well known whether this phenomenon is universal.

Mouse hematopoietic stem cells are known to proliferate in relatively slow cell cycle kinetics compared to multipotent progenitors *in vivo* (35). The gene expression pattern of hematopoietic stem cells also differs in the proliferating state *in vivo* (36). An analysis of *Foxo3a*^{"/} mice showed that *Foxo3a* is important in maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells, although the proliferation of the cells was not affected by *Foxo3a* deletion (37). Human embryonic stem cells can be usually cultured more than 30 to 50 passages (22). It has been shown that human embryonic stem cells require feeder cells to grow and are negative for SSEA-1. Although mouse embryonic stem cell growth is also feeder-cell dependent, mouse cells do express SSEA-1 (38). LIF (leukemia inhibitory factor) is known to be an important factor for maintaining the self-renewal capacity of mouse embryonic stem cells. The morphology of mouse embryonic stem cells

is relatively diverse, whereas human embryonic stem cells are round with sharp boundaries. The expression of SSEA-4 and vimentin is specific for human embryonic stem cells (39). It has also been reported that a retinoblastoma protein is important for the proliferation of monolayer cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (40).

B. Differentiation of stem cells

The features of stem cells that distinguish them in different species include direction for differentiation and gene expression. In osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, the expression of *ID4*, *CRYAB* and *SORT1* are altered (41). Embryonic stem cells have the capacity for multilineage differentiation, such as ectoderm, mesoderm and endoderm. The differentiation is induced by transfer of the cells from fibroblast feeder layers, which maintain stemness of embryonic stem cells, to suspension culture (42,43). It was reported that neuronal differentiation is induced with FGF-2 and medium conditioned by HepG2 (44). Furthermore, induced pluripotent stem cells generated from patients with amyotrophic lateral sclerosis are reported to be differentiated into motor neurons (45). Gene expression in human embryonic stem cells is altered during differentiation. *NODAL*, *LEFTY A*, *LEFTY B* and *PITX2* are described as marker genes for the differentiation of embryoid bodies, which are multicellular aggregates of differentiated and undifferentiated cells (46). Genes such as *Hex* or *Hnf6/Oc-1* play an important role

during the differentiation of liver and pancreas from their progenitors (47).

4. CANCER STEM CELLS

A. Factors distinguishing cancer stem cells from normal stem cells

Recent research implicates the involvement of cancer stem cells in cancer. Cancer stem cells share features with normal stem cells. The differences in their features, however, are under investigation. Even though the origin of cancer stem cells is not well understood, several suggestions related to their microenvironment (niche) have been proposed: [1] niche around normal stem cells allows cancer stem cells to grow, [2] cancer stem cells arise from normal stem cells that adopt an alternative niche and [3] niche-independent cancer stem cells arise from normal stem cells or [4] cancer stem cells arise from progenitor cells (48). It has been shown that embryonic stem cell-like gene sets including Sox2, c-Myc, Dnmt1, Cbx3, Hdac1 and Yy1 are activated in human epithelial cancers, and c-Myc increases the fraction of tumour-initiating cells in primary human keratinocytes transformed by Ras and I κ B α (49).

B. Cancer stem cells in cancer

The population of cancer stem cells in cancer is very rare. Cancer stem cells are defined as cells with stem cell features that have the capacity of tumourigenesis in immunodeficient mice (50,51). Research on human embryonal carcinoma cells, which are the stem cells of teratocarcinomas, has shown that these cells express SSEA-3,

SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81, similar to human embryonic stem cells (38,52,53). To identify cancer stem cells from solid tumours, cells are sorted with surface markers. CD133 and CD44, which are markers for stem cells, are often used as surface markers to identify cancer stem cells from tumours. In one report, the CD133⁺ subpopulation from human brain tumours was shown to be tumourigenic, whereas the CD133⁻ subpopulation did not have tumour-initiation capability (54). Cancer stem cells are also known to exist in the side population fraction (55,56,57). In addition, breast cancer cells with the CD44⁺CD24^{low} phenotype have a higher tumourigenic capacity as compared to other populations of cancer cells, and the gene sets expressed in the CD44⁺CD24^{low} population are related to metastasis-free survival and overall survival (58).

5. CONCLUSION

In conclusion, stem cells, which have the capacity for self-renewal and differentiation, show various profiles in gene expression. Each kind of stem cell has unique aspects, but they also share common features. Recent research advances have added to our knowledge of the role of cancer stem cells in cancer based on the concept of cancer stem cell niche.

REFERENCES

1. Weissman, I. L. *Cell*, **100**, 157-168 (2000)
2. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck,

- S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. Marshak, D. R. *Science*, **284**, 143-147 (1999)
3. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H.-U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L., Le Blanc, K. *Transplantation*, **81**, 1390-1397 (2006)
4. Kumar, S., Chanda, D., Ponnazhagan, S. *Gene Ther.*, **15**, 711-715 (2008)
5. Tsai, M., Hwang, S., Chen, K., Lee, Y., Hsu, L., Chang, Y., Wang, C., Peng, H., Chang, Y., Chao, A., Chang, S., Lee, K., Wang, T., Wang, H., Soong, Y. *Stem Cells*, **25**, 2511-2523 (2007)
6. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M. *Nature*, **418**, 41-49 (2002)
7. Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A., Black, A. C. *Anat. Rec.*, **264**, 51-62 (2001)
8. Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L. *Am. J. Pathol.*, **169**, 338-346 (2006)
9. Majeti, R., Park, C. Y., Weissman, I. L. *Cell Stem Cell*, **1**, 635-645 (2007)
10. Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M., Peault, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 2804-2808 (1992)
11. Walker, M. R., Patel, K. K., Stappenbeck, T. S. *J. Pathol.*, **217**, 169-180 (2009)
12. Laurenti, E., Vamum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P., MacDonald, H. R., Eisenman, R. N., Bernstein, I. D., Trumpp, A. *Cell Stem Cell*, **3**, 611-624 (2008)
13. Yadirgi, G., Marino, S. *J. Pathol.*, **217**, 242-253 (2009)
14. Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., Gage, F. H. *Cell Stem Cell*, **1**, 515-528 (2007)
15. Gage, F. H. *Science*, **287**, 1433-1438 (2000)
16. Ferri, A. L. M., Cavallaro, M., Braidà, D., Cristofano, A. D., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S., Nicolis, S. K. *Development*, **131**, 3805-3819 (2004)
17. The International Stem Cell Initiative *Nat. Biotech.*, **25**, 803-816 (2007)
18. The Steering Committee of the International Stem Cell Initiative *Nat. Biotech.*, **23**, 795-797 (2005)
19. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. *Cell*, **95**, 379-391 (1998)
20. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. *Cell*, **113**, 643-655 (2003)
21. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. *Cell*, **113**, 631-642 (2003)
22. Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., Schulz, T. C. *Stem*

- Cells Dev.*, **13**, 585-596 (2004)
23. Allegrucci, C., Young, L. E. *Hum. Reprod. Update*, **13**, 103-120 (2007)
24. Bhattacharya, B., Miura, T., Brandenberger, R., Mejido, J., Luo, Y., Yang, A. X., Joshi, B. H., Ginis, I., Thies, R. S., Amit, M., Lyons, I., Condie, B. G., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M. S., Puri, R. K. *Blood*, **103**, 2956-2964 (2004)
25. Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O., Thomson, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 13350-13355 (2003)
26. Takahashi, K., Yamanaka, S. *Cell*, **126**, 663-676 (2006)
27. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. *Cell*, **131**, 861-872 (2007)
28. Park, I., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., Daley, G. Q. *Nature*, **451**, 141-147 (2008)
29. Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., Melton, D. A. *Nat. Biotech.*, **26**, 1269-1275 (2008)
30. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. *Science*, **321**, 699-702 (2008)
31. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. *Science*, **322**, 949-953 (2008)
32. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K. *Science*, **322**, 945-949 (2008)
33. Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B. *BMC Cell Biol.*, **7**, 14 (2006)
34. Tanabe, S., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Nagao, T., Yamaguchi, T. *J. Biochem.*, **144**, 399-408 (2008)
35. Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., Weissman, I. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 3120-3125 (1999)
36. Nygren, J. M., Bryder, D., *PLoS ONE*, **3**, e3710 (2008)
37. Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A. *Cell Stem Cell*, **1**, 101-112 (2007)
38. Pera, M. F., Reubinoff, B., Trounson, A. *J. Cell Sci.*, **113**, 5-10 (2000)
39. Ginis, I., Luo, Y., Miura, T., Thies, S., Brandenberger, R., Gerech-Nir, S., Amit, M., Hoke, A., Carpenter, M. K., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M. S. *Dev. Biol.*, **269**, 360-380 (2004)
40. Yamanaka, S., Zahanich, I., Wersto, R. P., Boheler, K. R. *PLoS ONE*, **3**, e3896 (2008)
41. Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.-H., Trajanoski, Z. *BMC Genomics*, **8**, 70 (2007)
42. Odorico, J. S., Kaufman, D. S., Thomson, J. A. *Stem Cells*, **19**, 193-204 (2001)
43. Trounson, A. *Endocr. Rev.*, **27**, 208-219 (2006)
44. Schulz, T. C., Palmarini, G. M., Noggle, S. A., Weiler, D. A., Mitalipova, M. M.,

- Condie, B. G. *BMC Neurosci.*, **4**, 27 (2003)
45. Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., Eggen, K. *Science*, **321**, 1218-1221 (2008)
46. Dvash, T., Mayshar, Y., Darr, H., McElhaney, M., Barker, D., Yanuka, O., Kotkow, K. J., Rubin, L. L., Benvenisty, N., Eiges, R. *Hum. Reprod.*, **19**, 2875-2883 (2004)
47. Zaret, K. S., Grompe, M. *Science*, **322**, 1490-1494 (2008)
48. Clarke, M. F., Fuller, M. *Cell*, **124**, 1111-1115 (2006)
49. Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., Chang, H. Y. *Cell Stem Cell*, **2**, 333-344 (2008)
50. Eaves, C. J. *Nature*, **456**, 581-582 (2008)
51. Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., Morrison, S. J. *Nature*, **456**, 593-599 (2008)
52. Andrews, P. W. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 405-417 (2002)
53. Andrews, P. W., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Damjanov, I., Gokhale, P., Draper, J. S. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1526-1530 (2005)
54. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., Dirks, P. B. *Nature*, **432**, 396-401 (2004)
55. Miki J., Rhim J. S. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **11**, 32-39 (2008)
56. Harris, M. A., Yang, H., Low, B. E., Mukherje, J., Guha, A., Bronson, R. T., Shultz, L. D., Israel, M. A., Yun, K. *Cancer Res.*, **68**, 10051-10059 (2008)
57. Wu C., Alman, B. A. *Cancer Lett.*, **268**, 1-9 (2008)
58. Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K., Clarke, M. F. *N. Engl. J. Med.*, **356**, 217-226 (2007)

4. 医療応用に適したES細胞培養システム

高田 圭, 末盛博文

ヒトES細胞は多能性を保持しながら無制限に増殖できる幹細胞であり、その医療応用にはES細胞から作製した機能細胞を移植に用いるなど、多くの可能性が検討されている。ヒトES細胞を細胞移植医療に利用するには、一定の品質管理がなされた細胞が安定的に供給されるようなシステムの構築が不可欠であり、ES細胞の同種移植であることを前提としたバンキングが必須である。そのために、われわれは医療応用に使用しうるレベルのヒトES細胞のバンキングに向けた開発研究を行っている。医療応用のためのヒトES細胞株の品質管理に対する要件は、他の株細胞の医療利用の場合と大きく変わりはないと考えられる。われわれが構築しているヒトES細胞の臨床対応の品質管理システムは、培養条件が同様であるヒトiPS細胞にもそのまま適用できるだろう。

はじめに

ヒトES細胞株は多能性をもつ株細胞であり、多くの種類の細胞を作製し、さまざまな用途で使うことができると考えられる。また、均質な細胞集団として大量培養が可能であり、これをバンキングすることにより長期安定して供給することが可能となる。このことは特に、大量の機能細胞を必要とする細胞移植医療

への応用において重要な要素となると考えられる。

一方、急速に研究が進んでいるiPS細胞も類似の性質をもつが、ヒトES細胞と比較した場合、その樹立に遺伝子導入などの品質に影響を与えうる高度な加工操作が必要という問題がある。逆に、ES細胞はヒト凍結余剰胚を使用することから、ヒトES細胞が必ず同種移植として使用されるということを意味し、自己細胞の利用が可能であるiPS細胞で回避可能な拒絶反応の間

【キーワード&略語】

ヒトES細胞, バンキング, GMP, cell processing center

CPC: cell processing center (細胞プロセッシングセンター)

GCP: Good Clinical Practice (医薬品の臨床試験の実施基準)

GMP: Good Manufacturing Practice (医薬品

等の品質管理基準)

IND: investigational new drug (治験薬)

ISCBI: International Stem Cell Banking Initiative

ISCF: International Stem Cell Forum

Culture system of human ES cells for clinical use

Kei Takada¹⁾/Hirofumi Suemori²⁾: Laboratory of Cell Processing, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University¹⁾/Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University²⁾ (京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター細胞プロセッシング研究領域¹⁾/京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター霊長類胚性幹細胞研究領域²⁾)

表1 「未分化ES細胞のバンキング」における品質の基準

文部科学省
・ヒトES細胞指針
厚生労働省
・ヒト（他家）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針
・臓器移植関連法規
・医薬品GMP/GCP
・幹細胞臨床研究指針
・異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針
21CFR Part 1271 アメリカ, FDA
・HCT/P

GMP : Good Manufacturing Practice (医薬品等の品質管理基準), GCP : Good Clinical Practice (医薬品の臨床試験の実施基準)

題が常に存在する。いずれの細胞も医療応用へ向けての研究が進められているが、まず臨床応用に間近に迫っていると考えられるヒトES細胞のバンキングによる細胞供給体制の構築を進めることが重要である。

本稿では、ヒトES細胞の培養に際しての医療応用に向けた技術的要件を中心に述べる。

1 世界のヒトES細胞の医療応用、バンキングの現状

現在、わが国ではKhES1～5の5株のヒトES細胞が樹立されている¹⁾。この5株は基礎研究のために国内の研究機関で使用されている。これまで、国内では樹立機関としては京都大学再生医科学研究所のみであったが、2007年から国立成育医療センターが樹立を開始している。

医療応用については、すでに臨床グレードのES細胞を樹立したとの報告を行っている国がある他²⁾、米国では、ヒトES細胞最初の臨床試験として、Geron社が脊椎損傷を適用疾患とした臨床試験を'09年1月より開始している。8月に中断されたものの、この際の手続きとしては通常の医薬品の臨床試験と同様に治験薬 (investigational new drug : IND) としてのアプリケーションの構築を目指している。同グループにヒトES細胞株を提供しているWiCell社では、医薬品GMPグレードのヒトES細胞バンキングを'09年7月より開始している (<http://www.wicell.org/>)。この他、イギリスなどで医療応用を目指したヒトES細胞のバンキングの準備がなされている。

しかしながら、各国でES細胞研究にかかわる規制の

あり方が異なることなどから、国際的なES細胞研究や株の譲渡などのルールは整備されているとは言えない状況である。

この状況を改善するべく、現在各国の幹細胞研究機関によるISCF (International Stem Cell Forum) においては、すでに知られている各国間のヒトES細胞の比較プロジェクト³⁾に加え、ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative) を設置、主に研究用途でのヒトES細胞のバンキングに関するガイダンスの策定を行い、'08年10月にその初版が公表された (http://www.stemcellforum.org/forum_initiatives/international_stem_cell_banking_initiative.cfm)。さらに、将来的にはこのガイダンスを医療応用にも使用できるレベルに引き上げることを目標として、現在もガイダンスの改定作業が行われている。

2 ヒトES細胞の医療応用の条件

医療応用に向けたヒトES細胞の培養システムの基本的な目標は「未分化ES細胞のバンキング」であり、これは医薬品で言うところの中間体の製造工程とみなされる。このため、最終的な製品となる、分化細胞としての品質の保証には、分化制御を行う臨床側との役割分担が必要になると考えられる。最終的な品質は、バンキングに際しても表1の基準に準拠、あるいは参考に進めてゆくことと思われる。

しかしながら、現時点でこれらの指針、基準では、培養ヒトES細胞のような「中間体」については、明確な基準が設けられていない。欧米においてもヒトES細胞の特質に応じた規制類は現時点では存在しない⁴⁾。

**表2 ヒト ES 細胞の品質における
技術的な留意点**

- ①培養課程での細胞の均一性，異常細胞の許容度の設定
- ②ロットの定義，適切な管理体制の構築
- ③長期間培養による品質変化の管理，再現性の確保，染色体異常のリスク管理，検出手法の確立
- ④遺伝子操作株の安定性，リスク管理
- ⑤動物由来成分の排除あるいは感染リスク管理

また，ヒト ES 細胞のバンキング，医療応用に際して固有の課題としては考慮しなければならない点に，樹立に用いられる胚の取り扱いがあげられる。現在，ヒト ES 細胞株の樹立に使用している凍結余剰胚は，不妊治療の際に余剰となり，廃棄が決定されたものについてのみ使用がなされており，品質の観点から考えると，凍結胚そのものは自己由来体細胞と同じく品質基準は求めることができない。そこで樹立操作時あるいは樹立後のバンキングの段階で品質を担保することが合理的であると考えられる。しかし，表1の参考基準においては，樹立時に関する基準は存在しないため，今後検討が必要になると考えられる。

3 ヒト ES 細胞の医療応用に必要な 技術的条件

1) 品質について技術的に考慮すべき点

技術的な観点から見たヒト ES 細胞の品質については，表2にあげたような項目について考慮する必要がある。これらは基本的にこれまで幹細胞指針において取り扱われてきたヒト由来細胞と変わらない。

ヒト ES 細胞の医療応用に際して，最も高い技術上のハードルは，異種感染リスクに対応するための，培地および培養基質からの動物由来成分の排除，あるいは感染性因子の混入リスクの管理である。

2) 合成培地の品質管理

血清などの規格化が困難な成分を排除し，品質管理可能な原材料からつくられたいわゆる合成培地は，近年数多くの培地が開発，販売されるようになっており，これらをまとめたものを表3に示す。

現在，先に掲げた ISCF において，各国の ES 細胞株の比較プロジェクトに続く形で，世界各国の ES 細胞株を用いたこれら合成培地の評価試験を検討中である。

このように完全合成培地については，一定の製品が得られつつあるが，培養基質についてはほぼマウス

Tumor 由来のマトリゲルに依存する状況であり，今後の技術進展が待たれる。一方，完全合成培地，基質を用いずに，動物由来成分を除去する方法として，ヒト由来の血清やフィーダー細胞のような成分を用いる手法が考えられ，表3においてもヒト由来フィーダー細胞株を用いる手法が提案されている。しかしながら，これらはヒト ES 細胞とは由来が異なることから，同種幹細胞移植と同レベルの厳密なドナー管理，適切なフィーダー細胞の除去技術，検証手段の確立が必須である。特にヒト ES 細胞とヒト由来フィーダー細胞について，ドナー管理が二重になることは，マウスフィーダー細胞などの異種細胞を用いるよりも医療応用のハードルが高くなることが懸念される。

したがって，これら完全合成培地，基質の開発を待たず，従来のマウスフィーダー細胞，ウシ胎児血清 (fetal calf serum : FCS) などを用いた従来の技術での培養でも，すでにマウス 3T3 細胞をフィーダー細胞とする自家培養皮膚が実用化されていることを考慮すると，適切な感染リスク管理，低減策が可能であれば，医療応用に使用することに大きな問題はないと考えられる。実際，先にあげた米 Geron 社の臨床試験では，ヒト ES 細胞の培養自体は既存のフィーダー細胞，FCS を用いた培養法が採用されている。

4 ヒト ES 細胞の医療応用に対する京都 大学の取り組み

京都大学では，'05 年より臨床目的に使用しうるヒト ES 細胞の作製を目指した体制の構築を行っている。

この目的のために同大学再生医科学研究所では細胞プロセッシング研究領域を設立，'06 年日本初のヒト ES 細胞専用の細胞プロセッシングセンター (cell processing center : CPC) ※1 を設置，その後文部科学省の確認を経て，'07 年後期よりヒト ES 細胞の樹立施設として，既存 ES 細胞株をリソースとした培養試験を開始している。CPC にはクラス 100 の細胞処理環境として，細胞処理室 I 系統と，培養システムであるアイソ

※1 細胞プロセッシングセンター

細胞プロセッシングセンター，細胞の調製，培養，加工，保存などの工程を行うための専用施設。環境，機器の常時モニタリングを行い，細胞培養過程のトレーサビリティの品質管理を行う。