

今井弘一、田上昭人、草川森士、武田昭二. 生体内の代謝活性を考慮した金属イオンの発生毒性. 第53回日本歯科理工学会学術講演会、4月11日～12日、2009、東京

鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人. Arf交換因子サイトヘジナー2による細胞運動促進機構. 第61回日本細胞生物学会大会、6月2日～4日、2009、名古屋

宮本幸、田上昭人、久永真一、山内淳司. 髄鞘形成に参与する細胞骨格蛋白の新規リン酸化制御. 第32回日本神経科学大会、9月16日～18日、2009、名古屋

草川森士、山内淳司、宮本幸、三部篤、田上昭人. 胚性幹細胞の神経分化過程におけるSSRIの影響. 第32回日本神経科学大会、9月16日～18日、2009、名古屋

鳥居知宏、宮本幸、草川森士、三部篤、山内淳司、田上昭人. 気分障害薬VPAはGadd45a経路を介して神経分化を誘導する. 第32回日本神経科学大会、9月16日～18日、2009、名古屋

山内淳司、鳥居知宏、草川森士、三部篤、宮本幸、田上昭人. 気分障害薬VPAは癌抑制遺伝子NF2を活性化し神経分化を誘導出来る. 第32回日本神経科学大会、9月16日～18日、2009、名古屋
鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人. Paxillin とArf6 交換因子Cytohesin-2は複合体を形成し、脂肪前駆細胞の遊走を制御する. 第82回日本生化学会大会、10月21日～24日、2009、神戸

宮本幸、鳥居知宏、山内淳司、田上昭人. オリゴデンドロサイトの遊走を制御するCdk5の新たな役割. 第82回日本生化学会大会、10月21日～24日、2009、神戸

草川森士、田上昭人. Embryonic stem cell test (EST法)を用いた薬剤の発生毒性評価 - 抗てんかん剤、抗うつ剤の発生毒性評価- 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、11月13日～15日、2009、大阪

草川森士、田上昭人. 胚性幹細胞を用いた薬剤の発生毒性評価. 大西記念小児臨床薬理学会賞講演 第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日～21日、2009、香川県高松市

宮本幸、鳥居知宏、草川森士、中村和昭、三部篤、山内淳司、田上昭人. バルプロ酸はArf/cytohesin経路を介して神経分化過程を制御している. 第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日～21日、2009、香川県高松市
中村和昭、江尻洋子、福田始弘、細田雅也、田上昭人. マイクロ空間を有する細胞培養チップによる小児初代肝細胞を用いた新規肝毒性評価系の検討. 第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日～21日、2009、香川県高松市

三部篤、宮内のり子、山内淳司、田上昭人. ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 阻害薬のデスミン心筋症病態への影響. 第19回日本循環薬理学会、11月27日、2009、京都

中村和昭、丸山のりえ、三部篤、江尻洋子、福田始弘、山崎ヒロシ、田上昭人. マイクロ空間培養プレートを用いた肝毒性評価系の検討. 第24回日本薬物動態学会年会、11月27日～29日、2009、京都

江尻洋子、細田雅也、福田始弘、中村和昭、田上昭人. 創薬スクリーニング用途を目指した新規培養基材の開発. 第24回日本薬物動態学会年会、11月27日～29日、2009、京都

山内淳司、鳥居知宏、草川森士、三部篤、宮本

幸、田上昭人. 気分障害治療薬バルプロ酸による新規誘導遺伝子gadd45aがJNKと細胞斑蛋白質パキシリンのリン酸化を介して神経発生奇形を導く. 第32回日本分子生物学会年会、12月9日～12日、2009、横浜

水谷玲子、山内淳司、草川森士、中村和昭、三部篤、鳥居知宏、宮本幸、田上昭人. Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells. 第32回日本分子生物学会年会、12月9日～12日、2009、横浜

田上昭人 (特別講演) V1R KOマウスにおける耐糖能異常 北里医学会、1月15日、2010、東京

水谷玲子、山内淳司、草川森士、中村和昭、三部篤、鳥居知宏、宮本幸、田上昭人. リチウムによるSorting nexin 3を介した神経突起伸長作用. 第83回日本薬理学会年会 3月16日～18日、2010、大阪

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) 株式会社アーティセルシステムズ 中山洋一

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) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の開発
患者の同意の下、乳がん切除手術時において、正常皮下脂肪組織を採取した。この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Glycerol-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-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も行った(混合SAM技術)。SAM技術により基材表面に導入したカルボキシル基を利用して、細胞培着ペプチド(RGDS)を固定化した。カルボキシル基を水溶性カルボジイミドで活性化した後、異なる濃度のRGDSを添加、カルボキシル基とRGDSを化学結合した。RGDSの表面導入率は、放射標識したRGDSを化学結合させた後、その放射活性を測定することによって求めた。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) 脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析

脂肪幹細胞/脂肪前駆細胞:美容形成外科目的に皮下脂肪吸引されたヒト脂肪組織から、脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)の分離・樹立は、株式会社バイオマスターによって確立された。この脂肪由来幹細胞(脂肪幹細胞)は、各々の分化誘導を行うと肝細胞や神経細胞などの細

胞に分化させることができる多分化能を有している。マウス脂肪前駆細胞(3T3-L1細胞)は、DSファーマバイオメディカル株式会社より購入した。

創傷治癒測定(Wound healing assay)コンフルエントな状態の単層培養細胞にピペット用のチップの先端で引っ掻き傷をつけ、傷をつけた直後(0時間)および10時間後の細胞の様子を顕微鏡で観察した。各々の画像を取得した後、経過時間で観察した細胞の移動距離を測定し、未処理のコントロール群と薬剤添加したサンプル群とを比較検討した。

共免疫沈降法:HEK293細胞にタグの付加した目的蛋白質が発現するプラスミドをリン酸カルシウム法およびエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した後、細胞抽出溶液に各々特異性のある抗体とプロテインGセファロースと混ぜ反応させた。その後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで検出した。

3) 脂肪細胞への分化誘導及び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

脂肪幹細胞の分化実験:美容形成外科目的に皮下脂肪吸引されたヒト脂肪組織から、脂肪由来幹細胞(間葉系幹細胞)の分離・樹立は、株式会社バイオマスターによって確立された。この脂肪由来幹細胞(脂肪幹細胞)は、各々の分化誘導を行うと肝細胞や神経細胞などの細胞に分化させることができる多分化能を有している。この細胞に、DMEM培地に1mMデキサメサゾン(Dex)、0.5mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)、10

mg/ml インスリンを加えた分化誘導培地で2日間培養し、その後5mg/ml インスリンのみ加えた分化促進培地で4-7日間培養する。分化を誘導してから4日目頃から脂肪滴を含んだ脂肪細胞が現れ、次第のその数を増やしていく。最終的に、Oil Red 染色法で脂肪滴を染め、陽性細胞の数によって分化効率を評価した。一方、褐色脂肪細胞への分化条件は、白色脂肪細胞の分化培地にさらに30mM レチノイン酸を添加した培地を用い、同条件下で培養した。

共免疫沈降法:HEK293細胞にタグの付加した目的蛋白質が発現するプラスミドをリン酸カルシウム法およびエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した後、細胞抽出溶液に各々特異性のある抗体とプロテインGセファロースと混ぜ反応させた。その後、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで検出した。

(倫理面への配慮)

本研究実施において、対象患者個人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) 脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の開発
脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の確立
125I 標識したタンパク質あるいは TNBS 法を利用して、培養基材表面へのタンパク質の固定化量を調べたところ、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。また、同様の定量方法により、NaOH 処理 PET 基材へのカルボジイミド結合法を利用することで、タンパク質や RGDS が基材表面に化学固定できたことも確認した。コーティングあるいは固定化処理を行っていない元の PET 基材に比べて、コラーゲン、フィブロネクチン、bFGF 固定化により細胞の初期接着数と増殖数は増

加した。この傾向は、2次元と3次元のいずれの基材に対しても認められた。しかしながら、2次元 PET フィルムに比べて、3次元の PET 不織布の方が、細胞の増殖速度が大きくなっていることがわかった。これは増殖するための表面が3次元基材の方が広いためか、あるいは空間的な違いが影響しているのか、いろいろな理由が考えられる。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。しかしながら、細胞の1つ当たりの分化マーカーは、培養基材の種類によらず、ほぼ一定であった。これに対して、脂肪分化は、基材の種類に依存しなかった。次に、表面に固定化された COOH 基を介して細胞接着活性をもつ RGDS を表面に化学固定した。2次元、3次元のいずれの基材に対しても、RGDS 固定化により、細胞の初期接着と増殖は高まった。タンパク質を固定化した基材においても、同じ傾向が見られた。また、コーティングあるいは化学結合などのタンパク質固定化法の違いは細胞の接着と増殖促進には影響を与えなかった。以上のように、2次元および3次元といった基材の立体構造と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。

2) 脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析

SecinH3 が脂肪前駆細胞の遊走を抑制するか否かを検討した。その結果、有意な抑制効果が観察され、これまで報告されている上皮細胞や線維芽細胞だけではなく脂肪前駆細胞の遊走においても Cytohesin ファミリー分子が働いていることが示唆された。近年、細胞遊

走において中心的な役割を果たしているアクチン重合のシグナルが間葉系幹細胞の分化機構と密接に関与していることが報告されていることから、脂肪前駆細胞の Cytohesin を含む遊走機構を明らかにし、幹細胞から脂肪細胞への分化機構との関連性を検討することを目的とした。始めにマウス 3T3-L1 細胞に発現する Cytohesin ファミリーを RT-PCR 法で確認し、主に発現していた Cytohesin-2, -3 およびその基質である Arf1/6 の siRNA を用いて、細胞遊走に与える効果を検討した。これら種々の siRNA を組み合わせた実験結果により Cytohesin-2/Arf6 経路が関与することが示唆され、さらに創傷によって遊走を誘引させると Arf6 が活性化されていた。次に、遊走時における Cytohesin-2 の局在を検討するために細胞接着斑のマーカである Paxillin および vinculin あるいは F-actin と共染色し定量化した結果、Paxillin と細胞膜に $64.4\% \pm 3.9\%$ 、細胞接着斑に $13.3\% \pm 1.4\%$ の共局在を観察した。以上の共免疫染色の結果やこれまで当研究部で行われた結果などから Cytohesin-2 と Paxillin が相互作用する可能性が高いことが考えられたため、これら蛋白質の相互作用を共免疫沈降法により検討した。3T3-L1 細胞の内在性での結合および 293T 細胞における過剰発現の系においても両蛋白質の結合を検出することができ、さらに詳細にドメイン間の相互作用を検討した結果、in vivo あるいは in vitro において Cytohesin-2 の pleckstrin homology (PH) ドメインと C 末端領域の塩基性アミノ酸に富む領域 (以下 PH+b ドメイン) と Paxillin の LIM2 ドメインと相互作用するこ

とが明らかになった。一方、Paxillin の siRNA 処理によるノックダウン効果で、細胞遊走の抑制および Cytohesin-2 の局在が変化し Arf6 に対する GEF 活性も低下したことから、細胞遊走時における Cytohesin-2 の局在は Paxillin により制御されていることが明らかとなった。さらにこれらの分子間相互作用の結論から、これらの Paxillin の LIM2 ドメインおよび Cytohesin-2 の PH+b ドメインを過剰発現させると活性化 Arf6 量を低下させるドミナントネガティブとして働き、脂肪前駆細胞の遊走を抑制するかを検討した結果、著しい抑制効果が観察された。これらの分子間相互作用が細胞遊走の制御に重要な働きをすることが示唆された。以上の結果より Paxillin は Cytohesin-2 に対して細胞接着斑/細胞膜でプラットフォームとして働き、酵素活性および細胞内局在に寄与していることが示唆された。

3) 脂肪細胞への分化誘導及び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

本研究では、レチノイン酸添加による褐色脂肪細胞の分化誘導機構について検討した。

始めに、褐色脂肪細胞への分化過程において発現変動する遺伝子の同定を試みた結果、当研究部門で研究対象としている蛋白質である Arf (ADP-ribosylation factor) のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) であり、細胞遊走を司るシグナル伝達に関与する Cytohesin ファミリー (特に Cytohesin-2/ARNO) の発現上昇が認められた。一方、これまで当研究部で行われた結果や

バイオインフォマティクスを用いた蛋白質構造予測などからCytohesin-2と α -アクチニンファミリーが相互作用する可能性が高いことが考えられた。アクチニンは、アクチン結合蛋白質であり細胞の形態変化を調節することが主な機能として一般的に知られているが、近年細胞内質での局在の他に核移行や転写因子と相互白湯することも明らかにされており、細胞の分化などへの関与も示唆されている。そこで、脂肪幹細胞から白色および褐色脂肪細胞におけるactinin-1の発現変化を検討したが、いずれも有意な変化は見られなかった。

次に蛋白質の相互作用によってその機能する可能性を考え共免疫沈降法により両蛋白質が結合するか否かを検討した。結果、293T細胞における過剰発現の系において両蛋白質の結合を検出することができた。

これらの結果より、Cytohesin-2とactinin-1は、互いに相互作用して活性化あるいは不活性化し細胞内シグナルを調節していることが示唆された。今後は、内在性のCytohesin-2およびactinin-1が、レチノイン酸誘導による分化過程において常に結合しているのかあるいは分化誘導によってはじめて結合するのかを検討する予定である。さらに、actininファミリーは、細胞分化時においてレチノイン酸添加によってレチノイル化されることがありその翻訳後修飾が分化に重要な役割をはたしていることが報告されているために我々の実験系においてもこの修飾が必要であるかなども検討する。

一方、Cytohesin-2とactinin-1の細胞内局在を検討するために、各々蛍光蛋白質(GFP, RFP)を付加させたプラスミドを脂肪幹細胞にエレクト

ロポレーション法にて遺伝子導入後に観察した結果、両蛋白質とも細胞膜あるいは細胞接着斑に局在した。またその局在は細胞遊走時に顕著に見られたことから、これら蛋白質は主に細胞極性に深く関与することが示唆された。

D. 考察

脂肪由来幹細胞からの分化誘導法の開発については、同じ素材を用いて、2次元と3次元などの立体構造が違う基材を作製、その構造の違いが細胞の増殖、分化に影響を与えることを調べた研究は、これまでには、ほとんど報告されていない。今回の研究から、基材の立体構造が細胞の増殖と分化に影響を与え、細胞増殖が、2次元基材に比べて、3次元基材の方がよいことがわかった。さらに、このことが、成体幹細胞を用いて確認された例はほとんどない。これまでに、私たちは通常のline化された細胞や正常細胞に対しても、同じような検討を行っている。これらの結果と今回の結果を比べると、基材の立体構造が細胞の接着と増殖に与える影響に関しては、幹細胞も通常の正常細胞と同様の挙動をとることがわかった。細胞の挙動は、細胞の栄養液と接着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立体構造により影響されることが示された。加えて、基板表面を細胞接着性をもつタンパク質で修飾することによって、細胞の接着と増殖が高まることがわかった。さらに、このタンパク質修飾による促進効果は2次元や3次元などの基材の立体構造に関係なく、同じであることも確認できた。

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。

脂肪幹細胞/脂肪細胞の機能解析については、本研究結果から、Cytohesin-2はArf6を介して脂肪幹細胞/脂肪前駆細胞の細胞遊走を制御することが明らかとなり、さらに細胞接着因子であるPaxillinとの相互作用によりその細胞内局在および活性が調節されていることが明らかとなった。このことからCytohesin-2/Arf6シグナル伝達経路を介する細胞内極性の消失が間葉系幹細胞である脂肪幹細胞を分化の方向へと向かわせることが示唆された。

脂肪細胞への分化誘導及び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・薬物の評価に関しては、脂肪幹細胞からレチノイン酸誘導による褐色脂肪細胞への分化・増殖機構の一部がCytohesin-2を介していることが示唆された。本研究により今後この系を用いた薬

物のスクリーニングのアウトプット因子として利用できる可能性がある。

E. 結論

1) PET素材からなる2次元と3次元の細胞培養基材を調製、それらに対するヒト脂肪由来幹細胞の接着、増殖、および骨分化、脂肪分化について調べた。その結果、2次元に比べて、3次元基材における細胞接着、増殖が高まっていることがわかった。しかしながら、分化に関しては、期待していたほどに立体構造の影響は小さくなく、基材による違いはほとんど見られなかった。細胞接着性タンパク質による基材表面の修飾による細胞接着促進も2次元と3次元基材の間では大きな違いは認められなかった。表面性質が細胞の増殖と分化に与える影響について、細胞内シグナルレベルでの解析を加え、細胞挙動の違いについて解析を行う予定である。また、分化に影響すると考えられる生物由来リガント、例えば、細胞接着シグナルペプチドなどを用いて、その基材表面への固定化密度などが細胞の増殖や分化に与える効果について調べていく。

2) ヒト脂肪幹細胞から成熟脂肪細胞への分化過程において、発現上昇するCytohesin-2はその上流分子にPaxillin、その下流分子にArf6さらにはアクチン重合などのシグナル伝達経路を介して細胞遊走を制御することが本研究により明らかにすることができた。前年度の成果である「SecinH3添加は、脂肪細胞への分化を促進させる。」との結果と組み合わせると、これまで報告されてきた間葉系幹細胞の運動性を阻害すると分化速度および分

化効率が上昇するという結果を支持する結果である。また今回我々が見出した新たなシグナル伝達経路は、これまで報告されてきた分子の上流に位置することが推察されることから、分化誘導のインプットシグナルを受ける受容体あるいは膜貫通型蛋白質の同定へ一歩近づいたのではないかと考えている。一方、我々は幹細胞だけではなくあらゆる細胞の形態を維持する張力を制御するアクチン重合を調節する最も重要な因子の一つである分子と Cytohesin-2 とを直接的に関連付けられる新たな実験結果が得られており、Cytohesin-2 が分化においてより中心的な役割を果たしている可能性がある。我々の仮説である「Cytohesin を活性化する因子やそれを制御するメカニズムを明らかにすることによって、肥満の抑制さらには過剰な脂肪組織の構築を抑制できる」つまり Cytohesin-2 を活性化状態にすることで脂肪組織内に存在する脂肪幹細胞/前駆細胞を未分化な状態に保つことができると考え、Cytohesin-2 を活性化させるメタボリックシンドローム薬剤あるいは食品開発に提唱を促す。今後は、Cytohesin-2 活性化因子の探索やこの分子機構が脂肪幹細胞だけではなく iPS 細胞や F9 テラトーマ細胞など他の未分化な細胞などにも関与するかなどを検討する必要がある。このような新規薬剤を用いた薬物毒性試験にヒト組織由来幹細胞を用いることはこれまで様々なシグナル機構を見出す一つの有用な手段に成り得ることが期待される。

3) レチノイン酸誘導における脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞の分化過程において、発現上

昇する Cytohesin はアクチン結合蛋白質である actinin-1 と結合することが本研究において明らかになり、前年度の成果である「効率的な褐色脂肪細胞への分化条件の検討」との結果と組み合わせると、レチノイン酸誘導による分化機構において新たなシグナル伝達経路を同定することができた。また、Cytohesin-2 と actinin-1 は、actinin-1 が持つカルシウム結合モチーフによりカルシウム濃度依存的に相互作用した。レチノイン酸投与により一時的にカルシウム濃度が増加することが知られていることから、この分子機構はレチノイン酸によって Cytohesin の発現上昇とセカンドメッセンジャーであるカルシウム濃度変化によって actinin-1 と結合しアクチンなどの細胞骨格調節機構に働き、幹細胞から褐色脂肪細胞へ分化促進させることが推察できる。一方、両蛋白質は各々4種のアイソフォームが存在し、その相同性も比較的高い。従って、本研究で用いた以外の分子同士が相互作用する可能性が極めて高い。特に actinin-4 は、アクチンと共に核内に進入し転写因子と相互作用することで転写調節し分化に深く関与していることが報告されていることから、他の分子同士の相互作用についても検討し、脂肪幹細胞の分化に限らず、レチノイン酸誘導を受ける他の細胞の分化機構にも応用できると考えている。今後さらに褐色脂肪細胞への分化効率を上げる実験系を確立し、脂肪幹細胞から褐色脂肪細胞の分化に影響を及ぼす薬物毒性評価試験の改良を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiroyama M, Fujiwara Y, Nakamura K, Aoyagi T, Mizutani R, Sanbe A, Tasaki R, Tanoue A. Altered lipid metabolism in vasopressin V1B receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2009; 602: 455-461.
2. Imai K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima M. An Attempt to Cell Recovery Factor in the Cell Differentiation Culture with the Embryonic Stem Cell Test (EST). *Journal of Oral Tissue Engineering.* 2009; 6 (3): 152-158.
3. Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced Vascular Contractility in Alpha1-Adrenergic Receptor-Deficient Mice. *Life Sci.* 2009 May 22; 84(21-22): 713-8.
4. Yamauchi J, Miyamoto Y, Torii T, Mizutani R, Nakamura K, Sanbe A, Koide H, Kusakawa S, Tanoue A. Valproic acid-inducible Arl14D and cytohesin-2/ARNO, acting through the downstream Arf6, regulate neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Exp Cell Res.* 2009 Jul 15; 315(12): 2043-52.
5. Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Protective effect of geranylgeranylacetone via enhancement of HSP B8 induction in desmin-related cardiomyopathy. *PLoS One.* 2009; 4(4): e5351
6. Nakamura K, Aoyagi T, Hiroyama M, Kusakawa S, Mizutani R, Sanbe A, Yamauchi J, Kamohara M, Momose K, Tanoue A. Both V1A and V1B vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol.* 2009 Jun 24; 613(1-3): 182-8.
7. Mizutani R, Yamauchi J, Kusakawa S, Nakamura K, Sanbe A, Torii T, Miyamoto Y, Tanoue A. Sorting nexin 3, a protein up-regulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Cellular Signalling.* 2009 Nov; 21(11): 1586-94.
8. Aoyagi T, Kusakawa S, Sanbe A, Hiroyama M, Fujiwara Y, Yamauchi J, Tanoue A. Enhanced effect of neuropeptide Y on food intake caused by blockade of the V1A vasopressin receptor. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov 10; 622(1-3): 32-6.
9. Sanbe A, Mizutani R, Miyauchi N, Yamauchi J, Nagase T, Yamamura KI, Tanoue A. Inhibitory Effects of Cigarette Smoke Extract on Neural Crest Migration occur through suppression of R-spondin1 expression via Aryl Hydrocarbon Receptor. *Naunyn Schmedebergs Arch Pharmacol.* 2009 Dec; 380(6):569-76. Epub 2009 Sep 19.
10. Imai K, Suese K, Kusakawa S, Tanoue A, Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima M. Comparison of the Cell Differentiation Level of Mouse iPS Cells and ES-D3 C

ells Using the Embryonic Stem Cell Test (EST) Protocol Attempting to Develop a New in Vitro Embryotoxicity Test Method. *Journal of Oral Tissue Engineering*. 2009; 7(1):38-43

11. Wang X, Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, Ito T, Yanase H, Momota Y, Tsujimoto G, Tanoue A, Nimura T, Kawatani M. Urothelial $\alpha 1D$ receptor is predominantly involved in the adrenergic facilitation of micturition reflex. *Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS)*. 2009 Sep; 1: S10-S14.

12. Ishizuka Y, Abe H, Tanoue A, Kannan H, Ishida Y. Involvement of vasopressin V1b receptor in anti-anxiety action of SSRI and SNRI in mice. *Neurosci Res*. 2009 Nov 12. In press. [Epub ahead of print]

13. Oikawa R, Hosoda C, Nasa Y, Daichiro T, Tanoue A, Tsujimoto G, Takagi N, Tanonaka K, Takeo S. Decreased Susceptibility to Salt-induced Hypertension in Subtotally Nephrectomized Mice Lacking the Vasopressin V1a Receptor. *Cardiovasc Res*. 2010 Jan 29. [Epub ahead of print]

Inoue S, Iida Y, Otani Y, Hirano Y, Tabata Y. Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients of RGD peptide. *Journal of Biomaterials Science*, 20, 495-510(2009)

Sachiko Inoue, Masaaki Imamura, Yoshiaki H

irano, and Yasuhiko Tabata. Adhesion and proliferation of human adipo-stromal cells on two- or three dimensional poly(ethylene terephthalate) substrates with or without RGD immobilization. *Journal of Biomaterials Science*, 20, 721-736(2009)

2. 学会発表

1) 国際学会

1) Tanoue A. Analysis of AVP functions via V1a and V1b receptors with knockout mice. Japan-Mexico Work-Shop. Feb.25-27, 2009, Mexico City, Mexico.

2) Miyamoto Y, Torii T, Tanoue A, Yamauchi J. Control of oligodendrocyte migration and differentiation through the novel phosphorylation mechanism. Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology. Aug.19-23, Gyeongju, S.Korea, 2009. (国際神経化学学会大会 髄鞘部会、慶州、韓国)

3) Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Torii T, Tanoue A. The key role of Dock7 exchange factor in NRG1-induced Schwann cell migration. Ninth Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology. Aug.19-23, Gyeongju, S.Korea, 2009. (国際神経化学学会大会 髄鞘部会、慶州、韓国)

4) Nakamura K, Aoyagi T, Hiroyama M, Kusakawa S, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Deficiency of vasopressin V1A and V1B receptors results in impaired glucose tolerance. WCNH 2009 第8回国際下垂体後葉ホルモン会議、9月4日-8日、2009、小倉(北九州国際会議場)

5) Torii T, Miyamoto Y, Sanbe A, Tanoue A, Yamauchi J. Cytohesin-2/ARNO, through its interaction with paxillin, regulates preadipocyte migration. International Symposium on Cell Signaling ~Principles and functions~. 11月18日~19日、2009、つくば (筑波大学総合研究棟D)

6) Sanbe A, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanoue A. Impairment of tubulin deacetylation can enhance heart disease in desmin-related cardiomyopathy. The 26th Annual Meeting of ISHR Japanese Section (第26回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会), 12月4日~5日、2009、札幌 (北海道大学 学術交流会館)

2) 国内学会

1) 今井弘一、田上昭人、草川森士、武田昭二. 生体内の代謝活性を考慮した金属イオンの発生毒性. 第53回日本歯科理工学会学術講演会、4月11日~12日、2009、東京

2) 鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人. Arf交換因子サイトヘジナー2による細胞運動促進機構. 第61回日本細胞生物学会大会、6月2日~4日、2009、名古屋

3) 宮本幸、田上昭人、久永真一、山内淳司. 髄鞘形成に参与する細胞骨格蛋白の新規リン酸化制御. 第32回日本神経科学大会、9月16日~18日、2009、名古屋

4) 草川森士、山内淳司、宮本幸、三部篤、田上昭人. 胚性幹細胞の神経分化過程におけるSSR Iの影響. 第32回日本神経科学大会、9月16日~18日、2009、名古屋

5) 鳥居知宏、宮本幸、草川森士、三部篤、山内

淳司、田上昭人. 気分障害薬VPAはGadd45a経路を介して神経分化を誘導する. 第32回日本神経科学大会、9月16日~18日、2009、名古屋

6) 山内淳司、鳥居知宏、草川森士、三部篤、宮本幸、田上昭人. 気分障害薬VPAは癌抑制遺伝子NF2を活性化し神経分化を誘導出来る. 第32回日本神経科学大会、9月16日~18日、2009、名古屋

7) 鳥居知宏、宮本幸、三部篤、山内淳司、田上昭人. Paxillin とArf6 交換因子Cytohesin-2は複合体を形成し、脂肪前駆細胞の遊走を制御する. 第82回日本生化学会大会、10月21日~24日、2009、神戸

8) 宮本幸、鳥居知宏、山内淳司、田上昭人. オリゴデンドロサイトの遊走を制御するCdk5の新たな役割. 第82回日本生化学会大会、10月21日~24日、2009、神戸

9) 草川森士、田上昭人. Embryonic stem cell test (EST法) を用いた薬剤の発生毒性評価 — 抗てんかん剤, 抗うつ剤の発生毒性評価— 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会、11月13日~15日、2009、大阪

10) 草川森士、田上昭人. 胚性幹細胞を用いた薬剤の発生毒性評価. 大西記念小児臨床薬理学会賞講演 第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日~21日、2009、香川県高松市

11) 宮本幸、鳥居知宏、草川森士、中村和昭、三部篤、山内淳司、田上昭人. パルプロ酸はArf/cytohesin経路を介して神経分化過程を制御している. 第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日~21日、2009、香川県高松市

12) 中村和昭、江尻洋子、福田始弘、細田雅也、田上昭人. マイクロ空間を有する細胞培養チップ

プによる小児初代肝細胞を用いた新規肝毒性評価系の検討。第36回日本小児臨床薬理学会学術集会、11月20日～21日、2009、香川県高松市

13) 三部篤、宮内のり子、山内淳司、田上昭人。

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC) 阻害薬のデスミン心筋症病態への影響。第19回日本循環薬理学会、11月27日、2009、京都

14) 中村和昭、丸山のりえ、三部篤、江尻洋子、福田始弘、山崎ヒロシ、田上昭人。マイクロ空間培養プレートを用いた肝毒性評価系の検討。

第24回日本薬物動態学会年会、11月27日～29日、2009、京都

15) 江尻洋子、細田雅也、福田始弘、中村和昭、田上昭人。創薬スクリーニング用途を目指した新規培養基材の開発。第24回日本薬物動態学会年会、11月27日～29日、2009、京都

16) 山内淳司、鳥居知宏、草川森士、三部篤、宮本幸、田上昭人。気分障害治療薬バルプロ酸による新規誘導遺伝子gadd45aがJNKと細胞斑蛋白質パキシリンのリン酸化を介して神経発生奇形を導く。第32回日本分子生物学会年会、12月9日～12日、2009、横浜

17) 水谷玲子、山内淳司、草川森士、中村和昭、三部篤、鳥居知宏、宮本幸、田上昭人。Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells。第32回日本分子生物学会年会、12月9日～12日、2009、横浜

18) 田上昭人(特別講演) V1R KOマウスにおける耐糖能異常 北里医学会、1月15日、2010、東京

19) 水谷玲子、山内淳司、草川森士、中村和昭、

三部篤、鳥居知宏、宮本幸、田上昭人。リチウムによるSorting nexin 3を介した神経突起伸長作用。第83回日本薬理学会年会 3月16日～18日、2010、大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

小児成長疾患に対するトランスレーショナルリサーチ における技術的基盤の創成

所 属 国立成育医療センター研究所
生殖・細胞医療研究部 生殖細胞機能研究室
研究者 宮戸健二

研究要旨

申請者らのグループは間葉系幹細胞の研究分野において世界をリードしてきた。間葉系幹細胞の維持および可塑性の分子基盤を明確にすることを旨とし、汎用性を意識した上で、その評価・検証のための新規材料を用いたナノバイオ・トレースシステムの構築までを視野に入れた本申請課題は世界に先んじたユニークなものである。さらに、CD9という膜蛋白質が幹細胞の未分化状態を反映する表面マーカーとして有用であることを示してきた。国立成育医療センターでは、倫理委員会にて承認された各種のヒト組織より幹細胞を30種類以上樹立した。

患者が安心して治療を受けられるためには、どのような安全性検査が必要不可欠か、その評価基準はどこにあるのかを合理的・科学的に明示することは極めて重要な課題である。また、将来、ヒトにおける細胞移植が治療として行われる際には、ドナー細胞の品質を保証するシステムを構築することで、わが国における再生医療の推進が社会の信頼を得、国民の合意形成に役立つと確信している。

A. 研究者

牧野雄一 旭川医科大学医学部 講師
富田正浩 株式会社ネオシルク 代表取締役社長
杉田一憲 株式会社ラボ 代表取締役社長

B. 研究目的

再生医療や細胞治療における我が国の細胞培養・操作技術は、基礎科学分野において国際的な競争力を保持しており、基礎研究や臨床研究においても多くの臨床実績と有効性が認められている。しかしながら、これらの製品の産業化は極めて難航しており、既に多くの患者がその恩恵を享受している欧米を含む諸外国に大きく遅れをとっている。移植材料の有効性評価基準や品質管理基準について、安全

性に関わる細菌等の感染や細胞癌化といった問題点は、すべての細胞に共通した課題である。本研究では移植材料の安全性に対する科学的根拠、特に腫瘍化の引き金となる細胞の形質変化についての評価基準を確立する。本研究課題で得られた成果は、再生医療材料の産業化を目指す企業の安全性指針となり、医薬品・医療機器総合機構の審査にも活用され、今後の再生医療実用化促進への大きな牽引力となる。

本研究は、ヒト間葉系幹細胞から誘導・分化させた細胞を培養し、安全かつ倫理的な問題のないドナー心筋細胞を得ることを目的としたものである。本研究で得られた技術を用いることで、必

要となった時に保存された自己細胞からドナー細胞が得られ、自己由来の組織を用いた理想的な細胞移植が実現できる。

間葉系細胞を用いた心筋細胞移植は新たな治療法として注目を集めており、一部ではすでに臨床応用が開始されているが、治療法自体の安全性、使用する細胞の特徴と規格、治療結果の評価方法などの問題の解決は急務である。そこで、本研究では、再生医療の効果的かつ安全な実施への応用を目指したヒト間葉系幹細胞の培養技術・特徴解析などの基盤情報整備を行うことを目的として研究を推進する。具体的には、1) 培養法・維持法の標準化、2) 規格化、安全性評価 3) 治療基盤の確立を3年間の目標として設定する。

C. 研究方法

1) 異種動物成分を排除した培養法・維持法の標準化 我々は、ヒトより作成したヒト間質細胞を間葉系幹細胞の供給源とする10種類以上をヒト間葉系幹細胞として得ている。初年度に、数例に対して新たな間質細胞の分離・培養を行う。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を目指す。なお、ヒト幹細胞の培養維持にはフィーダー細胞との共培養が必須であり、その種類と供給方法、維持方法についても検討を加える必要がある。各種のヒト組織から採取した線維芽細胞をこれに充て培養補助能の検討も同時に開始する。

2) 細胞の規格化・安全性評価 得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (Affymetrix社 GeneChipによる解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行う。使用するモノクローナル抗体は、ヒトES細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、

TRA1、Oct-3/-4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含む。また、新たなモノクローナル抗体作成による新規分子探索も開始する。アポトーシス関連分子については既知分子について発現様式を整理する。

3) 治療基盤の確立 ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムの開発ならびに他の幹細胞による分化形質発現システムを通じた情報収集を行う。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物 (NOD/SCID/IL-2 受容体 γ -/-) への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始する。(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系幹細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮して研究を行っている。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所実験動物指針に準拠して研究を実施する。

D. 結果

1) 成育疾患に対するヒト間葉系幹細胞の有用性の検討 臍帯血・胎盤・子宮内膜・余剰指といった従来は破棄されてきた組織に着目した結果、これらの組織から豊富な分化・増殖能をもった間葉系細胞を得ることができた。本研究では、ドナーは侵襲を伴わずに細胞医療に用いることが可能な細胞を得ることができる点で有利である。さらに、遺伝子発現についての検討を行った結果、細胞の培養工程での腫瘍化の懸念を排除できるような遺伝子の候補、具体的には、正常細胞では定量RT-PCRによっ

て発現が確認できず、腫瘍化に伴う細胞の生理的変化に応じて発現が認められるようになるヒト遺伝子を、少なくとも2つ、同定することができた。細胞の造腫瘍性に関しては、2種類の免疫不全マウス (Nu/Nu、NOG) への移植を行い、造腫瘍性、分化傾向を明らかにすることができた点から、移植に際しての最小限の負担で細胞を得ることができるソースとしての有用性を確立した。

2) 成育疾患に対する再生医療の前臨床研究

HIF-3 α 、IPASは、それぞれ独立した第1エクソンを有する。IPASの第1エクソン (エクソン1a) はHIF-3 α の第1エクソン (エクソン1) の約6kb上流に位置することからIPASのprimary transcriptの生成には独自のプロモーターが関与している可能性が高い。IPAS遺伝子転写開始点の上流約5kbにわたるプロモーターを単離、断片化後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、低酸素下培養細胞におけるプロモーター活性の解析を行い、IPASプロモーターが低酸素により活性化されることを明らかにした。かかるプロモーターの低酸素依存性活性化は、HIF-1 α の発現およびプロモーター内のHIF-1結合配列に依存し、さらに同配列へのHIF-1の結合に依存していた。HIF-3 α プロモーターには低酸素誘導性は認められず、かかるプロモーターの選択的活性化はIPAS/HIF-3 α 発現制御における重要な基本メカニズムの一つと思われた。

IPAS型mRNA生成に関わるIPAS特異的スプライシングは低酸素条件下でのみ認められる。低酸素下飼育マウスの臓器由来核抽出液中にIPASに特異的なエクソンの3' スプライシング部位に結合する蛋白質が存在し、質量分析の結果、既知のRNA結合蛋白p75であることが判明した (未発表)。P75の発現プラスミド、SiRNAを用いて細胞内発現量を変化させるシステムを樹立し解析した結果、

p75は低酸素依存性にIPAS pre mRNAに結合し、IPAS特異的エクソン含有を促進するタンパク質であることが判明した。かかるタンパク質p75のSiRNA導入により、低酸素誘導性遺伝子発現が増強したことから、p75によるIPAS発現調節が生体の低酸応答制御に直結する可能性が示唆された。

HIF-3 α 特異的エクソンの3' スプライシング部位選択は、正常酸素分圧下で積極的に行われている事が判明した。例えば、スプライシングエンハンサー配列を付与したin vitroスプライシング解析では、正常酸素分圧下において、HIF-3 α 特異的なエクソン4の3' 側スプライシング部位の選択が高効率で行われていた。これに対し、IPAS特異的エクソン4aの3' 側スプライシング部位選択は、エンハンサーの付与によっても正常酸素分圧下では効率化しなかった。これらの部位選択効率の差異のメカニズムは解明できていないが、HIF-3 α およびIPASの当該スプライシング部位近傍のイントロン配列にそれぞれ55kDa、37kDaのRNA結合蛋白質が結合する事が関与する可能性を示す知見が得られている。

3) 間葉系細胞を用いた組織再生材料の開発

凍結乾燥されたヒトI型コラーゲンa1鎖の細胞培養における細胞の形質維持における有用性を検討した。対象で行っている標準化された方法での細胞の形態および遺伝子発現と何ら異なることなく、20継代以上にわたって良好に培養維持が可能であった。また、免疫不全マウスへの移植にも問題は確認できなかった。

E. 考察

1) 成育疾患に対するヒト間葉系細胞の有用性の検討 細胞移植治療における細胞ソースとして胎盤・臍帯血・月経血・子宮内膜といった組織由来の間葉系幹細胞を用いる試みは、大変ユニークなも

のである。その採取・樹立においてドナーへの侵襲がないため倫理的問題点が少なく、採取におけるコストが低いことは大きな利点である。これらの細胞ソースの特性を明らかにすることで、より安価で高品質な細胞供給体制の構築が可能となり、再生医療の実現化に向けて大きく前進することができる。本研究の成果は細胞医療の実現には不可欠な研究である。

2) 成育疾患に対する再生医療の前臨床研究

低酸素応答性転写因子の研究は、細胞腫瘍化に先立つ細胞の形質変化として、普遍的に起こる細胞応答を検出できる可能性があり、胎盤・臍帯血・月経血・子宮内膜といった組織由来の間葉系幹細胞をソースとした細胞医療に大いに貢献できると考えている。各種の細胞種の樹立においてドナーへの侵襲がなく、倫理的問題点が少なく、検査に要する時間が少なく、コストが低い検査方法を確立することは大きな利点である。これらの細胞ソースの特性を明らかにし、自動培養装置との組み合わせによりことにより、安価で高品質な細胞供給体制の構築が可能となり、再生医療の実現化に向けて大きく前進することができる。

2) 成育疾患に対する再生医療の前臨床研究

HIF-3 α /IPASの発現制御の一部は低酸素依存性プロモーターと酸素分圧非依存性のプロモーターの使い分けによりなされていた。さらに、HIF-3 α /IPAS RNAのスプライシング部位選択に酸素分圧依存性のメカニズムが関与することが示された。

3) 間葉系細胞を用いた組織再生材料の開発

良質に精製されたヒトI型コラーゲン α I鎖を用いた細胞培養から、細胞の形質が長期にわたって保持できることが確認でき、今後、再生医療における細胞移植医療における培養システムを

構成する重要な要素となりうることが確認できた。

F. 結論

HIF-3 α /IPASの発現制御の一部は低酸素依存性プロモーターと酸素分圧非依存性のプロモーターの使い分けによりなされていた。さらに、HIF-3 α /IPAS RNAのスプライシング部位選択に酸素分圧依存性のメカニズムが関与することが示された。正常細胞では定量RT-PCRによって発現が確認できず、腫瘍化に伴う細胞の生理的变化に応じて発現が認められるようになるヒト遺伝子を、少なくとも2つ、同定することができた。さらに、凍結乾燥されたヒトI型コラーゲン α I鎖の細胞培養における細胞の形質維持における安全性を検証することができた。細胞医療における材料としての有用性を提示することができた。

G. 研究発表

論文発表

Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, **Miyado K**, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 78(2-3):137-42. 2009

Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, **Miyado K**, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*. 221(2):335-42. 2009

学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

若手研究者奨励研究

先天性副腎低形成症に対する治療法の開発

所属 国立国際医療センター研究所 室長
研究者 千田 大

研究要旨

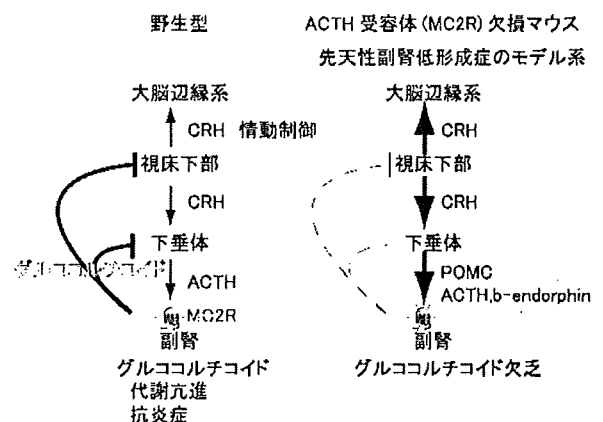
先天性副腎低形成症は、難治性疾患克服総合研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」の中で、研究が進められている。根治不可能で、治療が遅れば生命の危険にさらされる。ACTH 受容体は、先天性副腎低形成症の原因遺伝子のひとつであり、研究代表者は、世界に先駆けて ACTH 受容体 (MC2R) KO マウスを作成、解析し、先天性副腎低形成症モデルとして有用であることを示してきた。本研究では、モデルマウスの解析を通して、先天性副腎低形成症の治療法を開発することを目的として、MC2R KO マウスの病態解明と治療法を開発を進める。

A 研究目的

副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査によると、副腎酵素欠損症の患者は、全体で 5 年間に 1,462 例で、その内の多く (87%) が 21-水酸化酵素欠損症であり、先天性副腎低形成症の推定患者数は 7% である。先天性副腎低形成症の多くは、副腎の発生・分化に関わる転写因子の異常によるものであり、その他、家族性グルココルチコイド欠乏症 (ACTH 受容体遺伝子異常、MRAP 異常) がある。先天性副腎低形成症は、根治不可能であり、急性副腎不全の発症時には、グルココルチコイドとミネラルコルチコイドの速やかな補充と、水分・塩分・糖分の補給が必要であり、治療が遅れば生命にかかわる病気である。また、先天性副腎低形成症の疫学調査によると、グルココルチコイドの補充による治療を受けている患者の QOL は、必ずしも良くない。

研究代表者は、世界に先駆けて、ACTH 受容体 (MC2R) 遺伝子改変マウス (MC2R KO) を作成、解析してきた。ACTH 受容体は、家族性グルココルチコイド欠損症の原因遺伝子として知られており、MC2R KO マウスは、家族性グルココルチコイド欠損症と同様に、低グルココルチ

コイド、高 ACTH、低血糖を示し、モデルマウスとして有用であることを示して来た (Chida et al. PNAS 2007, MCE 2009)。本研究では、MC2R KO の解析を通して先天性副腎低形成症の病態を明らかにし、患者さんの QOL を高めるために有用な治療法を開発を目的として、研究開発を進める。



B 研究方法

副腎皮質機能低下症では、1、免疫異常、貧