

## 新しい結核治療ワクチンの開発研究（ヒトの結核感染に最も類似のカニクイザル・モデルを用いた）

所属 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター  
研究者 岡田 全司

### 研究要旨

1. 結核治療ワクチン（HVJ-E/HSP65+IL-12DNAにAg85A+Ag85B+MPB51 DNAを加えた）はサルで強力な結核治療効果を示した。
2. このワクチンにGra DNAを組み合わせた群は1年間長期治療効果（50%）を発揮した。

### 研究分担者

- (1) 大阪大学大学院医学系研究科分子治療学 金田安史
- (2) ジェノメディア株式会社 中島俊洋
- (3) 金沢大学感染免疫 吉田栄人
- (4) 浜松医科大学感染症学 小出幸夫
- (5) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野 大原直也
- (6) 大阪大学医学系研究科感染免疫医学講座 竹田潔
- (7) 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 鈴木克洋
- (8) ヲオルト・ウッド研究所 Esterlina Virtudes Tan
- (9) ヲオルト・ウッド研究所 Paul Saunderson

### A. 研究目的

1. BCGワクチンは成人の結核に無効（WHO表明）であり、日本でも平成17年4月より小・中学生・成人で定期BCG接種は中止（改正結核予防法）。結核（20億人結核感染者、800万人発症/年、200万人死亡/年、日本で潜伏感染4千万人）は世界最大感染症の一つ。その再興、多剤耐性結核（特にXDR-TBやS・S多剤耐性結核）の多数発症が世界中で大問題。新しい結核ワクチンの開発は緊急を要し、極めて社会的必要性の高い研究。世界的な切望。したがって、新結核治療ワクチン及び有効な新結核予防ワクチンの創製を行うことを目的。  
多剤耐性結核は莫大な医療費用。有効な治療法なし。新しい結核ワクチン・治療薬の開発が必須であり、結核治療ワクチン・予防ワクチンの創製を目的。
2. 新しい結核ワクチンのためのアジュバント

型DDSを開発し、その免疫活性化機構を解明する。我々が開発したHVJ envelope vector (HVJ-E)はセンダイウイルスを不活性化した遺伝子導入ベクターで遺伝子や蛋白質を様々な細胞に導入できる。このHVJ-Eに免疫活性化能があることが見出され、アジュバント型DDSとして機能することが示唆された。そこでHVJ-Eのもつ免疫活性化能を解明し、有効な結核ワクチンのキャリアーとして将来臨床応用に進むための準備を整える。さらに免疫活性化能の増強ための高機能化を進める。

3. 自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、自然免疫系の活性化を利用した新規ワクチンの開発への基盤を提供することを目的。
4. DNA ワクチンは、マウス、ラットなどげっ歯類の小動物や、ウサギなど中動物による薬効評価では有効性が認められており、実際に動物用ワクチンとして複数の品目が販売されている。一方、現在までにヒト用のDNAワクチンの実用化は実現されていない状況である。その理由としては、ヒトでは免疫活性化に必要な用量が高いため製造コストの問題や、モデル動物とヒトでの間で病態と免疫活性化メカニズムの種差などが考えられる。

そこで、本研究では、ヒト成人結核に対する予防用・治療用DNAワクチンを開発する事を目的として、ヒトの病態に最も近いとされ、免疫活性化メカニズムも類似しているカニクイザルの結核感染モデルを利用して新規結核DNAワクチンの評価を実施する事で、開発上の課題とされている種差や製造コス

トの課題を解決する事を目的として研究を実施した。

- より効果的な抗結核ワクチン樹立を目的として、本研究では、①結核防御抗原であるMPB51/MPT51分子を標的とした新しいDNAワクチンの手法の確立と、②潜伏期の結核菌に対する免疫応答を惹起できる結核防御抗原の同定を試みた。
- リコンビナントBCGを始めに接種するワクチンとして用い、後にDNAワクチンを含んだHVJエンベロープを用いることを目指している。

## B. 研究方法

- 我々は画期的なHsp65+IL-12 DNAワクチンを開発した。ヒトへの臨床応用にはヒトの結核感染に最も類似したモデルのカニクイザル (Nature Med. 1996年に共同研究者Tan博士が発表) を用いた研究が必須であり、カニクイザルを用いて結核治療ワクチン・予防ワクチンの開発を行った。
- しかしながら、サルの実験では強毒結核菌が使われ、広大なABSL3レベル動物実験室を必要とし、本邦で実施できる研究所は皆無。したがって、外国の研究機関 (レオナルド・ウッド研究所：最大かつ唯一のカニクイザル大規模長期結核実験施設) との国際共同研究が必須であり、レオナルド・ウッド研究所と共同研究で行った。
- カニクイザルの感染系：  
5×10<sup>2</sup>個の強毒ヒト型結核菌を気管内注入し、その後、ワクチン治療投与を行った。約1年間経過観察し、結核治療効果を  
(1)血沈(2)胸部X線(3)体重(4)PPD皮内反応(5)末梢血リンパ球増殖反応(6)免疫反応 (リンパ球培養上清中のIFN-γ、IL-2、IL-6等サイトカイン産生) を測定して評価した。
- マウスの結核感染系：  
(1)DBA/1マウスに結核菌H37RV株 (ヒト型強毒株) 1×10<sup>3</sup>/マウスとなるようにエアゾル・チャンバーを用いて経気道感染させた。感染後6回治療ワクチンを投与し、30~60日後に肺臓・肝臓・脾臓の結核菌数 (CFU) を7H11寒天培地を用い測定した。キラーT活性、サイトカイン産生、T細胞増殖反応でもワクチン効果を解析した。  
(2)結核予防ワクチン効果は、BALB/cマウスを用いた。(岡田 Vaccine 2009, 2007, 2005)
- HVJ (Hemagglutinating virus of Japan; Sendai virus) を紫外線で不活性化して複製能をなくしたHVJ envelope (HVJ-E) を

様々な免疫担当細胞に作用させ、その免疫活性化機構を解明する。そのために骨髄由来の樹状細胞の成熟化やサイトカイン、ケモカインの誘導能とそのシグナル経路を明らかにする。Toll-like receptorの関与の有無を調べるためMyd88/TRIFのダブルノックアウト細胞の樹状細胞を用いる。そのために必要なHVJ-Eのコンポーネントを明らかにする。

- カニクイザルの結核感染モデルに、DDS兼アジュバントであるHVJ-Eに封入した治療用遺伝子を発現するプラスミドをDNAワクチンとして、単一遺伝子のみを発現する単価ワクチン、或いは治療用遺伝子を適切に組み合わせた多価ワクチンとして投与が実施された。試験は、レオナルドウッドメモリアル研究所内にあるP3レベルのサル感染施設で実施された。  
評価試験に必要なDDS兼アジュバントであるHVJ-Eについては、これまでに確立したGMP製造関連の手順書手順書に従ってGMP製造施設内で製造を実施した。そのため、バイアル内での無菌凍結乾燥による製剤化に必要なHVJ-E原薬をGMP製造した。  
保存安定性は、国際的なガイドラインで規定された安定性評価ガイドラインに従ってバイオ医薬の凍結乾燥品で通常想定される冷蔵保存条件 (5度) で最長で21ヶ月保存までの長期安定性試験を実施することで実証した。
- 新規分子融合型DNAワクチンの開発  
1) 新規ワクチン技術の開発：①MPB51/MPT51とHSP70の融合蛋白をコードする遺伝子または②MPB51/MPT51蛋白質を封入した糖鎖被覆リポソーム (oligomannose-coated liposome, OML) で免疫したマウスの脾臓細胞を、既に同定したMPB51/MPT51由来抗原ペプチドで刺激し、IFN-γ産生を指標にして抗原特異的なT細胞応答を検討した。  
2) DosR蛋白質の抗原性の検討：結核菌が潜伏期特異的に発現するDosR蛋白質の抗原性を、DNAで免疫したマウスの脾臓細胞および結核患者/潜伏感染者/健常者の末梢血単核球を組換え蛋白質で刺激し、マウスではELISA、ヒトではELISPOTによりIFN-γ産生を指標にして抗原特異的なT細胞応答を検討した。

(倫理面への配慮)

- 当院は本邦の呼吸器疾患 (結核を含む) の中心施設として、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設を束ねている。したがっ

て、倫理委員会は院外委員 5 名及び各方面の医療従事者（事務系の人も含む）の院内委員 5 名により構成され、倫理面には十分な配慮をしている。

2. 新規ワクチン（DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチン）等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに関する文面も記載されている。
3. DNA ワクチンの臨床応用は、各国の倫理委員会や組換え DNA 安全委員会の承認を得てから施行する。
4. 治験届の提出と GCP に基づき実施する。
5. 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。3R (Replacement, Refinement, Reduction) の原則に基づき動物実験委員会で承認された動物実験を行う。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験規定及び大阪大学大学院医学系研究科動物実験規定に従って動物実験を行う。
6. 本研究を行うにあたり、ジェノメディア株式会社は、研究所の所在地である独立行政法人産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換え DNA 実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行う。
7. また、ヒト生体由来細胞を材料として扱う場合は特に、ヒト試料解析研究倫理審査委員会を下記のような目的により社内に設け、問題が無い事が確認されてから実験を行う。

（ヒト試料解析研究倫理審査委員会の目的）  
研究倫理審査委員会はジェノメディア株式会社の研究所で研究、実験もしくは実習に従事するすべての者が自ら行なう、「ヒト生体由来細胞を材料」として用いるヒト試料解析研究について、「ヘルシンキ宣言」（2000年エジンバラ改訂）の主旨に沿い倫理面から審査を行い、評価することを目的とする。  
実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保している。以上のように、本研究は倫理面の配慮を十分に考慮したうえで実施される。  
レオナルド・ウッド研究所及においても上記と同様、倫理委員会や動物実験委員会の承認を得、倫理面の配慮及び実験動物に対する愛護上の配慮が十分なされている。

## C. 研究結果

1. DNA ワクチン (HVJ-エンベロープ (E) /Hsp65 DNA+IL-12DNA) の結核治療ワクチンの有効性評価：

(1) カニクイザルを用いた HVJ-E/Hsp65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの結核治療効果。アジュバント効果を解明した。サイトカイン (IL-2 等) を介したワクチンによる結核免疫増強作用を発見した。

①興味深い下記、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの治療メカニズムが解明された。すなわち、このワクチンで治療したサル末梢血リンパ球を HSP65 抗原や PPD 抗原で 3 日間刺激して、その培養上清中の IL-2 を測定した。その結果 IL-2 の産生がコントロール群 (生食) 末梢血リンパ球刺激群より著明に増強された。またコントロール群の死亡サルでは IL-2 の産生が極めて低かった。すなわち IL-2 産生とワクチン効果・生存は相関が認められた。

②HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン治療群では、5 頭中 5 頭 100% の生存を示した。コントロール群の生食投与群は 60% (5 頭中 3 頭) の生存率であった。すなわち、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは著明な結核治療ワクチン効果を発揮した。(岡田 Vaccine 2009)

③この HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン治療により血沈の改善効果、体重増加効果、免疫反応の増強 (①PPD、結核死菌 H37Ra 及び HSP65 蛋白に対するワクチン治療カニクイザル末梢血リンパ球増殖反応増強効果、ならびに IFN- $\gamma$  産生増強効果) が認められた。

④さらに、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンに結核免疫を強く誘導する Ag85B DNA + Ag85A DNA を追加した、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNA ワクチンを作製した。このワクチンで治療したカニクイザルは 5 頭中 5 頭生存 (100% 生存) を示した。一方、コントロール群の生食投与群では 4 頭中 2 頭 (50%) の生存率であった。HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNA ワクチン治療群は、血沈の改善効果、体重増加効果、HSP65 蛋白に対する末梢血リンパ球の増殖増強反応が認められた。

(2) 今までのワクチンより強力な結核治療ワクチンを開発する為にサルの系で、この HVJ-E/Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチン (Hsp65 ワクチンと略す) に HVJ-E/Ag85A DNA+Ag85B DNA +MPT51DNA ワクチン (Ag85A ワクチンと略す) (小出・吉田作製) + HVJ-E/Granulysin (Gra) DNA ワクチン (Gra ワク

チンと略す)を組み合わせて治療効果を解析した。(各群4頭、合計16頭)

結核治療効果を

(1)血沈(2)胸部X線(3)体重(4)PPD皮内反応(5)末梢血リンパ球増殖反応(6)免疫反応(リンパ球培養上清中のIFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6等サイトカイン産生)を測定して評価した。

臨床応用を考えpVAX:カナマイシン耐性ベクターを用いた。

G1 Graワクチン

G2 Hsp65ワクチン+ Ag85Aワクチン

G3 Hsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン

G4 コントロール(生食投与群)

①結核菌気道感染28週後において、G2群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では4頭中3頭生存(生存率75%)であり、Tリンパ球の増殖増強を示した。一方G4群のコントロール群では4頭中1頭生存(生存率25%)であった。すなわち、G2群のワクチンは極めて著明な結核治療効果を示した。

②結核菌チャレンジ1年間(365日)の経過ではG1のGraワクチン群が1頭生存。G3群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では2頭生存し、Graワクチンは1年近い生存率向上に大きく寄与することが示唆された。(図2)

③Graワクチン単独群及びGraワクチン+HSP65ワクチン併用群で1年間生存したサルの肺臓の病理組織ではgranuloma形成が認められ、これがワクチン効果と関連する可能性が示された。

(3)新しい結核ワクチンを用いた結核に対する治療ワクチン開発:

マウスの系でリコンビナントgranulysin、リコンビナントSLPI(secretory leukocyte protease inhibitor)、リコンビナントトリポカリン2、HSP65DNA+IL-12DNAを組み合わせ検討した。その結果、リコンビナントSLPIでも結核治療ワクチン効果を明らかにした。(岡田、竹田)。

(4)INHとHVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンとの相乗的治療効果:INHとHVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはINH(Isoniazid)と相乗的治療効果を示した。BALB/cマウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンとINH(Isoniazid)の併用治療群ではINH単独投

与群やワクチン単独投与群に比較して肺臓の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。

2. 世界に先駆けて、Gra蛋白ワクチン、及びGra DNAワクチンの結核治療効果を発見(岡田 Human Vaccine 出版中)

3. ワクチン手法の最適化の検討:

臨床応用を見据えた研究として、動物モデル(マウス)でのワクチン効果を指標に、投与方法・部位(筋肉、皮下、吸入、鼻腔内)、投与間隔・量・回数等検討した。

HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNA治療ワクチンの皮内投与(i. d.)、皮下投与(s. c.)、及び筋肉内投与(i. m.)による結核治療効果をマウスのエアロゾル感染の系を用いて解析した。マウスはDBA/1マウスを用いた。1000CFU/マウスのH37Rvヒト型結核菌をMcMurrayが開発したaerosol chamberを用いて、マウスに気道感染させた。感染後6回ワクチンを治療投与した。感染1ヶ月後の肺臓・脾臓・肝臓の結核菌数を測定した。その結果、皮内(i. d.)投与ワクチン治療群では皮下(s. c.)投与ワクチン治療群やi. m.投与ワクチン治療群より、脾臓内の結核菌数の有意な減少が認められた。すなわち皮内投与が最も強力な治療ワクチン効果を発揮することが示された。

4. Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンが強力(BCGより1万倍強力)な結核予防ワクチン効果を得た、プライム-ブースター法の投与間隔・量を検討し、最適な条件を検討中であり、臨床応用を計画する予定。(マウス)

5. マウス骨髄由来樹状細胞(DC)にHVJ-Eを作用させるとケモカインCXCL10が分泌され、生体内においては、これによってNK細胞の浸潤を引き起こした。またDCからInterferon- $\alpha$ ,  $\beta$ の分泌を促し、これがNK細胞のType I interferon受容体に感知され、Jak-Stat経路の活性化がおり、Inteferon- $\gamma$ が産生され、CTLが活性化された。またIL-6の分泌を誘導し、これにより局所で制御性T細胞の誘導を抑制した。HVJ-Eは樹状細胞を成熟化する能力を持っており、これはlive HVJとほぼ同等の能力であった。実際にはCD40, CD80, CD83, CD86, CXCR4, CCR7などの成熟化のマーカーの発現が、HVJ-Eとlive HVJの用量依存的にほぼ同等に上昇することが確認された。以上のようなサイトカイン、ケモカイン誘導及び樹状細胞の成熟化はMyd88/TRIFのダブルノックアウトマウスの樹状細胞でもおこることが確認された。樹状細胞からのCXCL10, Interferon- $\alpha$ ,  $\beta$ の産生や成熟化にはHVJ-Eと細胞との融合が

必要であり、HVJ-Eに含まれるゲノムRNA断片が細胞内核酸受容体のRIG-Iに認識され、そのシグナルがMAVSに伝わりIRF-3, -7, NF- $\kappa$ Bを活性化することにより惹起されることがsiRNAを用いた実験から明らかになった。一方樹状細胞からのIL-6産生は、融合には依存しなかった。HVJ-Eの表面の蛋白F, HNを分離して、それぞれを有するリポソームを作って樹状細胞にかけるとF-liposomeのみIL-6が誘導された。一方、糖鎖を除去したF蛋白をもつHVJ-EではIL-6が誘導されなかった。このIL-6産生はNF- $\kappa$ Bの阻害剤で抑制され、またPI3K, Akt, SYKの各阻害剤でも抑制効果が認められた。

次に、生体内では、HVJ-Eの投与によりどのように獲得免疫系が賦活されるかについて免疫学的に再構築したSCIDマウスを用いた実験を施行した。SCIDマウスにCD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の両方を移植した場合のみInteferon- $\gamma$ を分泌するCD8<sup>+</sup>細胞数の有意な増加を認め、CTLの産生はCD4<sup>+</sup>細胞依存的であることが確認された。

6. GST融合ESAT-6タンパク質をマクロファージ細胞株RAW264.7の細胞溶解液と混合し、ESAT-6に会合する分子をGSTプルダウン法によりスクリーニングし、会合する候補分子としてLAMP-1を同定した。さらに、ESAT-6をマクロファージに発現させるとLAMP-1の発現が抑制されることを見出した。また、AIM2, GBP family, HAS1, HAS3遺伝子のノックアウトマウスを作製し、結核菌の気道感染を行った。その結果、AIM2欠損マウスは正常マウスに比べて、有意に感受性が高くなることを見出した。
- ESAT-6による病原性発揮機構として、ESAT-6がLAMP-1に会合し、貪食胞の成熟をブロックしている可能性が示唆された。また、細胞内DNAセンサーのAIM2が結核感染防御に重要な役割を担っていることが明らかになった。
7. ヒトの結核感染に最も類似とされているカニクイザルのモデルで、治療効果を向上させるためのアジュバント兼デリバリーシステムとしてHVJ-Eを用いてDNAワクチンの評価が実施された。その結果、有効性の高いDNAワクチンとなる事を示唆するデータが取得された。

プラスミドを成分とするDNAワクチンは、TLR (Toll like receptor) を介する自然免疫を活性化することが示唆されている。一方HVJ-Eは、TLRとは異なるRIG-I (retinoic acid

-inducible gene-I) を介するシグナルを活性化する事が明らかとなっている。そのため、結核感染に対するDNAワクチンのアジュバントとして、TLRとは異なるシグナルを活性化し、有効性を増強すると考えられる。HVJ-Eにより、DNAワクチンの開発上の課題が解決されれば、本研究で開発している結核ワクチンに加え、種々の感染症に対するワクチン開発の促進が期待出来る。

本研究で使用したHVJ-Eは、GLP試験で安全性が確保されたバンクシステムで生産され、4種類のGMPレベルのカラムクロマトグラフィシステムによる精製を行い、臨床用ワクチンとして長期間安定性が確保できるよう凍結乾燥製剤化を行った。HVJ-Eの製造は、GMP基準の手順書に従ってGMP製造施設内で実施し、工程・設備のそれぞれをGMPレベルで管理出来ることが実証された。

臨床開発を進めるためには、長期安定性を実証する必要がある。そこで、本研究ではHVJ-Eの凍結乾燥製剤について長期保存安定性を検討した。医薬品製造にも使用できるガラスバイアル内で凍結乾燥したHVJ-Eを、通常想定される保存条件である冷蔵保存 (5度) で21ヶ月間保存して後に、品質の劣化が認められない事を検討した結果、凍結乾燥製剤は、21ヶ月冷蔵で保存した後も活性劣化は認められない事が明らかとなった。

8. HSP65, MPT51, Ag85B各遺伝子を導入したHVJ-Env作製用プラスミドベクターを構築した。COS-7細胞に導入した各遺伝子が細胞膜表面に発現していることを確認した。
9. 1) 新規ワクチン技術の開発: ①HSP70をMPB51/MPT51と融合させることにより、抗原特異的なCD4<sup>+</sup> T細胞応答の増強が見られた。また、その免疫増強活性はC末端側のペプチド結合ドメインに存在した。我々は既にMacrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ とMPB51/MPT51融合させ、抗原特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞応答を増強するワクチン技術を開発しており、両者の併用により、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞応答を同時に増強ができる可能性が広がった。②OMLに封入したMPB51/MPT51蛋白質で免疫したマウスでは、抗原特異的なTh1型の抗体産生が誘導できたが、抗原特異的T細胞の誘導はできず、修飾糖鎖構造の改変やアジュバントの併用など、さらなる検討が必要と考えられた。
- 2) DosR蛋白質の抗原性の検討: 現在までにDosR蛋白質48種類中32種について検討を終

えた。マウスではC57BL/6で9種類、BALB/cで12種類、両系統で7種類 (Rv0079、Rv1998c、Rv2031c、Rv2032、Rv2623、RV2624、Rv3132c) の抗原がT細胞応答を誘導できた。ヒトでは、本蛋白質群に対するT細胞応答の多くが、結核患者や健康者に比べ、潜伏感染者で亢進していた。中でも、Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133cでは統計学的にも有意差が得られた。一方、Rv2031cのように結核患者でより強い応答を示すものもあった。Rv2031cがヒトおよびマウスで免疫原性を示すことは既に外国のグループから報告されているが、本研究により日本人にも有望な抗原であることが確認された。また、潜伏感染患者で強い免疫応答を示した4種類の抗原群は、潜伏期結核菌の制御を目的としたワクチンの標的抗原として有望と考えられる。

10. 新規結核ワクチンとしてのプライムブースター法に用いるリコンビナントBCGワクチンの開発を目指し、チミジル酸合成酵素が持つ酵素活性を応用した、安定性の良いBCGの宿主-ベクター系を新たに構築した。

#### D. 考察

1. ヒトの結核感染に最も類似したモデルのカニクイザルを用い、Nature Med(1996)に発表した、レオナルド・ウッド研究所Babie Tan博士及びPaul Saunderson所長らとHVJ-E/エンベロープ(E)/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンの治療効果を解析した。
  - (1) 臨床応用を考えpVAX：カナマイシン耐性ベクターを使用。これにHSP65 DNAとヒトIL-12 DNAの二つのDNAを導入した、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAを作製した。
  - (2) カニクイザルを用いたHVJ-E/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療効果。アジュバント効果を解明した。サイトカイン(IL-2等)を介したワクチンによる結核免疫増強作用を発見した。
    - ①興味深い下記、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンの治療メカニズムが解明された。すなわち、このワクチンで治療したサル末梢血リンパ球をHSP65抗原やPPD抗原で3日間刺激して、その培養上清中のIL-2を測定した。その結果IL-2の産生がコントロール群(生食)末梢血リンパ球刺激群より著明に増強された。またコントロール群の死亡サルではIL-2の産生が極めて低かった。すなわちIL-2産生とワクチン効果・生存は相関が認められた。
  - (3) したがって、より免疫力を高めるためMPT51

DNAを加え、さらに結核菌殺傷効果による治療ワクチン効果を示すHVJ-E/granulysin DNAワクチンを組み込んだ。HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNA + granulysin DNAワクチンは極めて強力な治療ワクチンとなることが期待された。

すなわち、①結核菌気道感染28週間後において、G2群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では4頭中3頭生存(生存率75%)であり、Tリンパ球の増殖増強を示した。一方G4群のコントロール群では4頭中1頭生存(生存率25%)であった。すなわち、G2群のワクチンは極めて著明な結核治療効果を示した。

②結核菌チャレンジ1年(365日)後ではG1のGraワクチン群が1頭生存。G3群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では2頭生存し、Graワクチンは1年近い生存率向上に大きく寄与することが示唆された。

- (4) ワクチン皮下投与が結核治療効果を得て大きな進捗を得た。

- (5) 化学療法剤INHと治療ワクチンを併用投与して、相乗的結核治療効果を発揮した結果は、臨床応用を考えると当研究計画を十分に達成した。

2. 当平成23年度ヒューマン・サイエンス政策創薬総合研究・国際共同研究(岡田班)班会議は、平成24年2月14日(火)に国立病院機構近畿中央胸部疾患センター研修棟で開催した。会議では最先端の研究、活発な討論がなされ、実り多い班会議となった。

3. ノックアウトマウスの樹状細胞を用いた解析からHVJ-Eのサイトカイン誘導能は、既存のTLR非依存性の経路によるシグナル伝達を示唆された。特に樹状細胞からのType I interferonの産生がNK細胞からのInteferon- $\gamma$ の産生を促し、これがCTLを誘導する機構は、抗結核免疫の誘導を可能にすることが示唆される。一方HVJ-EのF蛋白の糖鎖が樹状細胞を活性化してIL-6分泌を促して局所での制御性T細胞の抑制とそれに伴う、エフェクターT細胞の活性化の可能性が示唆され、抗結核免疫の増強の可能性も示唆された。

4. 自然免疫系による結核感染防御機構の解析により、病原性因子ESAT-6による自然免疫応答回避機構を明らかにし、細胞内DNAセンサーのAIM2による結核感染における重要性を明らかにできたことにより、今後これら分子を標的とした結核治療ワクチン開発に向け

た分子基盤を提供できたものと思われる。

5. 1) 達成度について

DNAワクチン開発上の課題である種差の問題と用量低減の問題を、カニクイザルの結核感染モデルでの評価実施と新規アジュバント兼DDSであるHVJ-Eの使用により、それぞれ解決した。製造コストについても、冷蔵で長期間安定である事を明らかとし、冷凍保存より輸送と保管コストを低減する結果を得た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

従来国内では、基礎研究の成果が、治療薬や治療技術の開発に繋がりにくい事が問題視されていた。本研究開発のように、基礎研究と臨床面で優れた「官」と、創薬開発推進の面で優れた「民」が、共同体性で新規ワクチンの開発に成功すれば、今後国内で独創的な新規医薬品の開発を促進するために必要とされている官民共同のオープンイノベーションによる創薬開発のモデルとなる。

3) 今後の展望について

臨床応用を目標に開発を進める。特に臨床体制が充実している国立病院機構との協力体制で臨床応用を進める事で、官民共同開発のモデルケースを目指したい。

6. バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウィルスベクターである。

7. 1) 達成度

ワクチン技術の開発については、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞応答を増強できる技術を各々確立し得た。DosR蛋白質の抗原性のスクリーニングについては、期間内に48抗原中32抗原に留まった。これは一部の結核菌の蛋白質が大腸菌等で非常に発現しにくいことに起因する。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

本研究成果は結核に対するサブユニット・ワクチンの開発に有意義な情報を提供しており、全世界の結核の潜伏感染者の数を考慮すると、国際的および社会的に非常に重要であると考えられる。官民共同研究による成果は未だ得られていないが、今回同定した新規抗原を用いたワクチン開発等において、将来、非常に大きな意義を持つと期待できる。

3) 今後の展望

候補抗原を用いたワクチンの効果を、マウス(およびモルモット)で検討し、さらに霊長類およびヒトへの応用の可能性を探索する。

E. 結論

1. より強力な結核治療ワクチンを開発するために、サルの系でHVJ-E/Ag85B+Ag85A+MPB51 DNAワクチン及びHVJ-E/Gra DNAワクチンを組み合わせ相乗的治療効果を解析した。

①結核菌気道感染28週後において、G2群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では4頭中3頭生存(生存率75%)であり、Tリンパ球の増殖増強を示した。一方G4群のコントロール群では4頭中1頭生存(生存率25%)であった。すなわち、G2群のワクチンは極めて著明な結核治療効果を示した。

②結核菌チャレンジ1年間(365日)後ではG1のGraワクチン群が1頭生存。G3群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では2頭生存し、Graワクチンは1年近い生存率向上に大きく寄与することが示唆された。

2. マウスで結核治療効果を示したHVJ-E/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンはカニクイザルでも強力な結核治療効果を発揮した。臨床応用へ向けてのプロジェクトが進展した。①HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン治療群では、5頭中5頭100%の生存を示した。コントロール群の生食投与群は60%(5頭中3頭)の生存率であった。すなわち、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは著明な結核治療ワクチン効果を発揮した。(岡田 Vaccine 2009) ②さらに、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンに結核免疫を強く誘導するAg85B DNA + Ag85A DNAを追加した、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNAワクチンを作製した。このワクチンで治療したカニクイザルは5頭中5頭生存(100%生存)を示した。一方、コントロール群の生食投与群では4頭中2頭(50%)の生存率であった。

3. ワクチン皮内投与が結核治療効果を得て大きな進捗を得た。化学療法剤INHと治療ワクチンを併用投与して、相乗的結核治療効果を発揮した結果は、臨床応用を考えると当研究計画を十分に達成した。

4. SLPIワクチン及びGranulysinワクチンはマウスで結核治療効果を示した。結核菌病原因子ESAT-6による自然免疫応答回避機構を明らかにした。またAIM2の結核感染防御における重要性を明らかにした。

5. HVJ-EはCTL, NK細胞の活性化とともに、制御性T細胞も局所で抑制できる。不活性化ウイルスに多彩な免疫活性化機能があることを証明したのはHVJ-Eが初めてである。さらにHVJ-E

は本来DDSとして開発されたように、遺伝子や蛋白質を培養細胞や生体組織に高効率で導入できる。したがって治療のための抗原を封入し、これを抗原提示細胞に導入するとともに、ベクター自身の免疫活性化作用でその抗原に対する宿主免疫を様々経路から活性化できる。また必要に応じて機能を高めるための遺伝子や蛋白質も同時に封入できるので、免疫活性化機能を増強することができる。以上のような視点から判断すればHVJ-Eは免疫治療剤としては他に並ぶものがない存在であり、これを用いることにより高い有効性をもつ日本発の結核ワクチンの開発が期待できる。

6. DNA ワクチンを開発する上で課題となっている動物モデルとの種差を解決するためにカニクイザルの結核感染モデルによるワクチン作用の評価のために、アジュバント兼DDSであるHVJ-EのGMP製造・供給を完了した。また、今後の臨床応用に向け、GMP製造工程の信頼性を実証した。また、臨床応用に必要な長期安定性を検討するために、製造したHVJ-Eを冷蔵条件で長期間(21ヶ月)保存して劣化の有無を検討した。その結果、凍結乾燥による安定化により、冷蔵条件で21ヶ月の安定性を実証した。
7. HVJ-Envワクチンおよび組換えバキュロウイルスワクチンを作製し、動物実験の準備が整った。今後、プロトタイプワクチンの改良を行っていく上で、ワクチン候補抗原バリエーションが広がる。組み合わせにより動物実験における個体差を最小限に抑え、有効なワクチン開発につながると期待される。
8. より強力な抗結核サブユニット・ワクチンの開発を目指して、①ワクチン技術の開発と②潜伏期結核菌を標的としたワクチンの候補抗原の検索を平行して遂行し、以下の成果を得た。

HSP70のC末端側をMPB51/MPT51に融合させることにより、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞応答を効率良く誘導できるワクチン技術を開発した。潜伏期の結核菌が特異的に発現するDosR蛋白質の抗原性をヒトおよびマウスで検討した。これまでに32種類について検討した結果、Rv2031がヒトおよびマウスで強い抗原性をもつことが確認できた。また、結核患者や健康者に比べ、Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c等に対する免疫応答が潜伏感染者で亢進していることが明らかとなり、これらの抗原が潜伏期の結核菌を標的としたワクチンの候補抗原として有望と考えられた。

樹状細胞を標的とした新規免疫法として、HSP70のペプチド結合ドメインを利用した分子融合ワクチンを開発した。

32種類のDosR regulon抗原の免疫原性を2系統のマウスで検討し、C57BL/6とBALB/cの両系統でT細胞応答を誘導できる抗原を7種類同定した。中でもRv3132cは両系統でT細胞応答/抗体産生の両方を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, E. C. Dela Cruz, E. V. Tan, R. M. Abalos, J. A. Burgos, Saunderson P, Sakatani M: Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. *Human Vaccines*. 7:60-67, 2011
- ② Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, E. C. Dela Cruz, Tan EV, R. M. Abalos, J. A. Burgos, Saunderson P, Sakatani M.: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. *Human Vaccines*. 2011;7:108-114
- ③ Masaji Okada, Yoko Kita, Toshihiro Nakajima, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Tetsuji Nagasawa, Yasufumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yuki Sekine, Yoshikazu Inoue, David N. McMurray, Mitsunori Sakatani. Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. *Clin. Devel. Immunol*. 2011:ID 549281
- ④ 岡田全司. 感染・炎症・免疫 新たな結核ワクチン. 46-51, 2011

### 2. 学会発表

- ① Okada M. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Gordon Research Conferences, 3-8 Jul,



2011, Lucca, Italy.

- ② Okada M. A novel therapeutic and prophylactic vaccines against tuberculosis by the activation of CTL in monkey models and murine models. Phacilitate vaccine forum, 19-21 Sep, 2011, Singapore.
- ③ M Okada, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccines against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2-4 Oct, 2011, Seattle, USA.
- ④ M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. Novel therapeutic vaccines against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. 42th IUATLD (The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov, 2011, Lille, France.
- ⑤ Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nakajima T, Kaneda Y, E V. Tan, P Saunderson, Hayashi S. NOVEL VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS AND DIFFERENTIATION OF CTL. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conferences. US-JAPAN Cooperative Medical Science. 124-128, 2011
- ⑥ 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 林清二, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発と免疫機構解析. 結核 86 巻 3 号 Page385 (2011. 03)
- ⑦ 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 林清二. 新しい結核治療ワクチンの開発 (SCID-PBL/hu マウスと DBA/1 マウスを用いた). 結核 86 巻 3 号 Page384 (2011. 03)
- ⑧ 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 吉田栄人, 中島俊洋, 林清二, 金田安史, E. V. Tan, E. C. Dela Cruz, Paul Saunderson, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発と免疫機構解析. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会. 2011 年 4 月 22・23 日, 東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- ① 岡田全司, 高森靖, 小川一行, 永田欽也  
「感染症治療剤 15K granulysin」 WO  
03/070268 A1

2002年

- ② 岡田全司, 吉田栄人, 中島俊洋, 松本真  
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65  
DNA+IL-12 DNA」  
整理番号: MED-A0504  
受付番号: 50501768464  
特許番号: 特願2005-280379  
提出日: 2005年9月27日  
発明の名称: DNAワクチン組成物  
2005年
- ③ 岡田全司, 高森靖, 安井正文  
「感染症治療剤15K granulysin」  
特許取得2008年7月4日  
特許4149713号  
2008年

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

図1

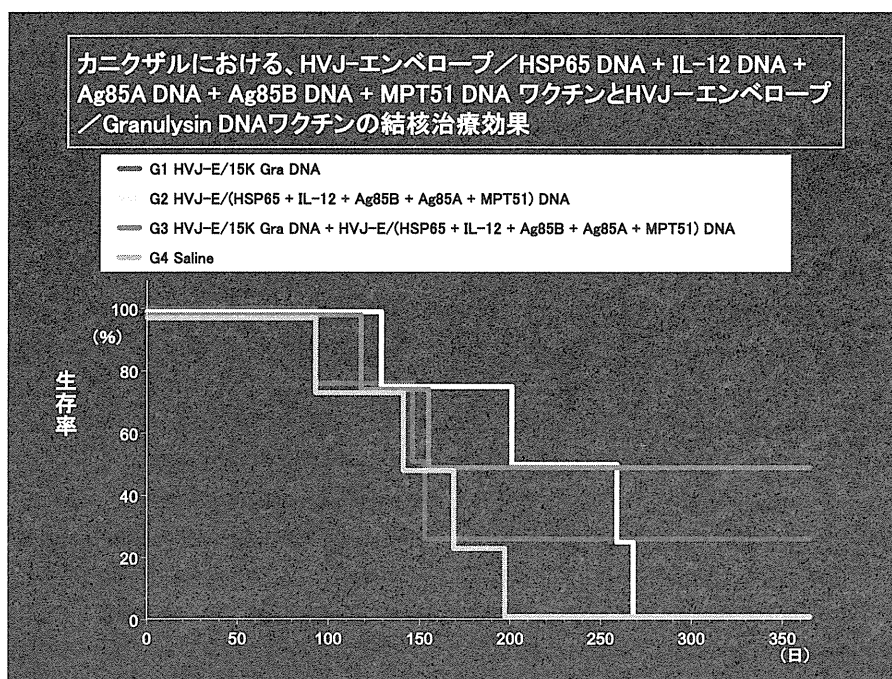


表 1

剖検・病理組織所見

Grp	PRNo.	Lung lesions	Visceral organs	Others
1	7924 D	Bil, bronchopn; consolidation	Liver, spleen, R&L kidneys	Thoracic vertebra
	9967 A	Bil, pneumonia; consolidation	Esophagus, pericardium, heart, thyroid, R&L kidneys.	Cervical vertebra, pelvic cavity Psoas muscle
	5921 G	Bil, bronchopn; consolidation	Diaphragm, liver, spleen, R&L kidneys	NONE
	8406 B	Right upper lobe; 2 granulomas	NONE	NONE
2	9552 A	Bil, bronchopn; consolidation	Diaphragm, liver, spleen, R&L kidneys, pancreas, peritoneum	Lower mandible, rt rib (osteomyelitis)
	9917 A	Bil, pn; consolidation; cavitation	Spleen, Rt kidney	Rib
	8484 D	Bil; rt bronchopn w/consolidation; left miliary	Liver, Left Kidney	NONE
	4832 H	Bil, pn; consolidation; adhesions	Trachea, diaphragm, liver, spleen, R&L kidneys, near the urinary bladder	Aortic arch & near abdominal aorta
3	8316 C	Bil, pneumonia; cavitation	Pericardium, diaphragm, liver, spleen, pancreas, rt kidney, urinary bladder	Skin ulcer, ant neck; rt popliteal area; 10th ICS & rib; rt 7th-8th rib, thoracic & lumbar vertebrae (osteomyelitis)
	10140 A	Bil, bronchopneumonia	Diaphragm, liver, R&L kidneys	Rib (osteomyelitis)
	9401 A	Rt lung, discrete granulomas	Liver	NONE
	8667 A	Bil, discrete granulomas	Pericardium, liver	NONE
4	5667 G	Bil, rt bronchopn; left miliary	Diaphragm, liver, spleen, left kidney,	Rt rib; thoracic vert (osteomyelitis)
	9033 A	Bil, rt pn w/ consolidation, adhesions, cavitation; left miliary	Diaphragm, liver, spleen	Sternum, rib
	7531 F	Bil, bronchopn w/ consolidation, adhesions, cavitation	Trachea, pericardium, diaphragm, liver, spleen,	Intercostal space; rt 2nd rib (osteomyelitis)
	10474 A	Bil, rt bronchopn; left miliary	Pericardium, diaphragm, liver,	Thoracic vertebra (osteomyelitis)

## ヒト細胞(初代培養細胞、ES/iPS 由来分化細胞)を用いた生活習慣病(肥満、糖尿病、血管障害)に関する新規病態モデル系の構築と創薬への展開

所 属 国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部  
研究代表者 佐伯 久美子  
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

### 研究要旨

本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病の新規モデルを構築して創薬研究を展開した。成果としては、ヒト血管内皮細胞の培養系を駆使して糖毒性（高血糖負荷時の細胞障害）のアクセー系を安定化させることに成功し、活性酸素の関与、内皮細胞の種類による活性酸素産生機構の違い、治療標的となりうる候補分子の存在、等を明らかにした。また、ヒト血管内皮細胞の平滑筋細胞の増殖に対する効果を接触培養と非接触培養の系により解明し、幹細胞から誘導した新鮮な血管内皮細胞の膜分子によると思われる増殖抑制作用を解析し、さらに、網羅的発現解析により利源分子を1つに絞りこむことができた。その他、ヒトES・iPS細胞から十分な成熟機能を有する肝細胞を作成して、毒性試験や創薬などに応用できる可能性を示した。さらに、この系には、胆管上皮細胞と肝芽細胞も存在することを明らかにした。さらに、世界に先駆けて、ヒトES・iPS細胞から褐色脂肪細胞を作成することにも成功し、今後の大きな発展が期待される

### 研究分担者

- (1) 独立行政法人国立国際医療研究センター  
研究所糖尿病研究センター代謝疾患研究部  
安田 和基
- (2) 株式会社リプロセル  
浅井 康行
- (3) ディナベック株式会社事業開発本部  
細胞治療・再生医療ユニット  
佐伯 晃一
- (4) 多摩川精機株式会社東京バイオ開発センター  
羽生 尚弘
- (5) 富山大学大学院医学薬学研究部  
内科学第一講座  
戸邊 一之
- (6) 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学  
岩間 厚志

### A. 研究目的

従来はヒト疾患モデルとして動物モデルの開発に力が注がれてきたが、適切な動物モデルが得られていないケースも多い。一方、ヒト初代細胞を用いた実験系では、培養に伴う形質変化のために病態生理を正しく反映するモデルの構築は必ずしも容易でない。本研究ではこれらの問題に対して、用いるヒト初代細胞のラインアップを増やすとともに、ヒト

ES/iPS細胞やヒト成体由来前駆細胞から作製した分化細胞を取り入れることで、病態生理を正しく反映できる細胞モデルを構築して創薬研究を展開する。

本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病（糖尿病・メタボリック症候群・肥満・虚血性疾患・血管障害、など）の新規モデルを構築して創薬研究を展開する。

### B. 研究方法

#### 1. 細胞など研究材料

ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上で培養した。その他さまざまなヒト正常細胞（株）を購入して用いた。

#### 2. ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞の血管内皮細胞への分化誘導プロトコール

前半が浮遊培養、後半が接着培養からなる2段階無フィーダー培養で6種類の造血系のサイトカインを添加した。

#### 3. ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞の肝細

## 胞への分化誘導プロトコール

発生学の治験に基づき無フィーダー無血清5段階培養で、全過程が接着培養である。

### 4. ヒト iPS 細胞の褐色脂肪細胞への分化誘導プロトコール

前半の浮遊培養、後半の接着培養からなる2段階培養法であるが、特許申請準備中にて、その内容の詳細は記載しない。

### 5. 細胞内 reactive oxygen species (ROS) の測定

蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes) を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン) により測定した。

### 6. ヒト血管内皮細胞によるヒト平滑筋細胞への増殖抑制作用の測定

放射線照射したヒト血管内皮細胞を蛍光色素 CFSE で標識した後に培養皿に播種し、その上に CFSE とは異なる波長の蛍光色素 PKH-26 で標識したヒト大動脈平滑筋細胞を播種した。4日後に細胞を回収し、FACS Calibur を用いて細胞の蛍光強度を測定して (PKH-26 陽性細胞 (ヒト大動脈平滑筋細胞) を gating して)、PKH-26 の分裂に伴う蛍光強度減少を ModFit™ ソフトウェアで解析し、ヒト大動脈平滑筋細胞の平均分裂回数を算出した。

### 7. 索状構造形成能のアッセイ

EGM-2 (Cambrex) 培地(2%FBS)で培養24時間後に倒立顕微鏡 IX-70 (オリンパス) により観察を行った。

### 8. RT-PCR

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー遺伝子の発現の確認のために、既報の手法により RT-PCR を行った。一部の実験においては定量的 RT-PCR も行った。

### 9. ウェスタンブロッティング

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー蛋白の発現の確認のために、既報の手法によりウェスタンブロッティングを行った。

### 10. グリコーゲン貯留能測定

細胞内グリコーゲンは PAS 染色により同定した。

### 11. ICG 取込能測定

ICG 取込と放出は、30分間での取込と6時間

での放出により既報の方法で検定した。

### 12. cytochrome P450 (Cyp) 3A4 活性測定

cyp3A4 活性の測定は、p450-Glo™ CYP3A4 Assay kit (プロメガ) を用いて測定した。

### 13. 電子顕微鏡による解析

既報の固定法、包埋法、切片作成法ののちに、日立製作所製電子顕微鏡による撮影を行った。

### 14. 肝毒性疾患

D ガラクトサミン添加による肝毒試験と PGE1 による治療モデル実験を行った。

### 15. 酸素消費

培養細胞の酸素消費は、XF96 Extracellular Flux Analyzer (シーホースバイオサイエンス社) を用いて測定した。

### 16. 温度測定

ヒト細胞を移植したマウスの温度測定は、Therm GEAR G120/G100 (NEC社) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞の使用に際しては、文部科学大臣の確認を得るか、もしくは、文部科学大臣へ届け出た。

## C. 研究結果

### ①初代培養ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病合併症モデル系の確立 (糖毒性による in vitro 細小血管障害系の開発) とその分子機構解析

糖毒性の検定のために、血管内皮細胞を normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 30 mM) の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した。その結果、何れの内皮細胞においても high glucose で高い値を得ることができた。このような高ブドウ糖濃度による細胞内 ROS の増加に関しては、その由来に関してミトコンドリアであるという説と細胞膜の NADPH オキシダーゼであるという2種類の学説が存在する。そこで、我々の観察した細胞内 ROS がこれらのいずれであるかを明らかにするために、それぞれの阻害剤での検討を行った。その結果、その由来に関して3つの型に分類できることが判明した。すなわち、A型 (ミトコンドリア由来) : HAEC、B型 (NADPH オキシダーゼ由来) : HUVEC、HMVEC、HGVEC、C型 (両方由来) : HCAEC、と

いう結果となった。さらに、これらの系において cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行ったところ、B型内皮細胞で減少あるいは増加し、A型内皮細胞で変化しない複数の分子の絞り込みに成功した。これらの遺伝子は、C型内皮で変化するかしないかにより、NADPHオキシダーゼの制御分子（3候補分子）、もしくは、ミトコンドリア電子伝達系の制御分子（15候補分子）と考えられた。

## ②ヒト血管内皮細胞(ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む)によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響

ヒト血管内皮細胞は、本来はその外側に位置する平滑筋細胞の増殖を抑制して正常な血管構造を保っているが、何らかの変性・変質によりその正常な機能を失い平滑筋の増殖をコントロールできなくなり、血管狭窄・動脈硬化を行き起こすと考えられる。初代培養ヒト血管内皮細胞（HUVEC、HMVEC、HAEC）はいずれも、過去の報告に有るように、ヒト平滑筋細胞に対する本来の増殖抑制効果を失い、増殖促進作用を有した。一方、ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、接触培養においては有意な増殖抑制作用を示した。なお、ヒトiPS細胞（レトロウイルスベクターで樹立）から分化誘導した血管内皮細胞は増殖促進作用を示したが、ヒトiPS細胞（センダイウイルスベクターで樹立）から分化誘導した血管内皮細胞は増殖抑制作用を示した。また、ヒト血管内皮前駆細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、増殖抑制作用を示した。ただし、増殖抑制を示す系でも内皮細胞の継代老化で示さなくなることがあった。以上のような系を用いて、cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行った結果、平滑筋増殖抑制作用を有する血管内皮細胞においてのみ発現が低下している遺伝子が1つ同定され、RT-PCR、ウェスタンブロッティング、免疫染色でも確認された。

## ③ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞の分化誘導系の確立と創薬、毒性試験への展開

ヒトiPS/ES細胞を分化誘導後、様々の肝臓マーカーを発現する肝細胞の分化誘導に成功した。その発現レベルは、既存の肝細胞（株）に比較して十分であり、分化誘導のレベルは高いと考えられた。さらに、ICG取込能、グリコーゲン蓄積、Cyp3A4活性等の成熟肝機能も十分に発現していた。また、肝細胞のみならず胆管上皮細胞の誘導にも成功し、肝障害・胆管障害の系を確立した。これらの成果は英文国際学術誌に論文として受理

され印刷中である。

## ④ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導

世界で初めて、ヒトES/iPS細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導する手法を開発した。しかも、用いたサイトカインは赤血球などの造血細胞を誘導する時のプロトコルを改変した手法で、造血系のサイトカインが褐色脂肪細胞の作成に必須であるという予想外の結果となった。作成された褐色脂肪細胞は、細かい脂肪滴、豊富なミトコンドリア、特異的な分子（PRDM16、UCP1）の発現など、この細胞の特徴を全て備えていた。分化過程においては、沿軸中胚葉のマーカー（PDGFR $\alpha$ ）と骨格筋のマーカー（Myf5）を発現し、従来の発生学の知見と合致していた。作成された褐色脂肪細胞は、酸素消費が活発で、移植マウスにおいて $\beta$ -刺激剤依存的に発熱し、中性脂肪を低下させる効果と耐糖能を改善させる作用を併せ持ち、エネルギーを消費してメタボを改善させる善玉脂肪細胞としての機能を十分に備えていた。

## D. 考察

本研究においては、実験動物モデルに頼らず、あくまでヒト細胞の簡便な培養系を駆使して、疾患の病態モデルの確立、治療法の開発や創薬に応用できる系の展開、高品質の細胞移植材料につながる技術開発、等を目指して研究を進めた。

本研究で標的とする疾患はがん以外の最重要疾患、即ち代謝関連の生活習慣病全般である。肥満、糖尿病、代謝関連肝障害、などが含まれる。このような標的疾患の研究のためには、脂肪細胞、肝細胞などが重要であるが、入手の困難さなどから、現状ではその利用極めて制限されている。このような状況を打破して、十分な細胞を駆使して研究を強力に推進するために、さまざまなモデル細胞を系を確立してヒトでの研究を強力に推進できるものと考えられる。

糖尿病の予後を決定するもっと重要な要素は合併症であり、患者のQOLに深刻な影響を及ぼす。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その成果に基づく先駆的治療が開発されれば、糖尿病の予後は格段に改善する。近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）が合併症につながるという考え方である。本研究においてはこのような観点から、ヒトの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のための *in vitro*

の解析システムを構築して高血糖による血管内皮細胞傷害の機序を解明して、治療法開発や診断マーカー開発につなげる。

血管は内腔を裏打ちする血管内皮細胞とそれを取りまく血管平滑筋細胞から構成される。様々な臨床的知見等から、血管内皮細胞が血管平滑筋細胞の増殖を抑制しながら血管構造の安定化に寄与していると考えられている。このように、生体内では血管内皮細胞が血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果を発揮していることは確実と思われるにも関わらず、これまでのヒト初代培養血管内皮細胞を用いた実験系では血管平滑筋細胞の増殖抑制作用は検出されず、むしろ血管内皮細胞は可溶性因子を介して血管平滑筋細胞の増殖を促進することが示されてきた。一般に「初代培養細胞」においては、生体内での機能がその継代培養過程で喪失される場合があることはよく知られている。即ち、血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が検出されなかった原因として、実験に用いられたヒト初代培養血管内皮細胞ではすでにその機能が喪失していたことが想定される。そこで我々は、ヒト初代培養血管内皮細胞の代わりに、霊長類（サル、ヒト）ES細胞から作製された血管内皮細胞、ならびに末梢血単球由来血管内皮前駆細胞から作製された血管内皮細胞を用いて実験を行うことにより本来の増殖抑制作用が検出できたのではないかと考えられる。

本研究においては、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から成熟機能を有するヒト肝細胞を誘導することに成功した。このような肝細胞は、薬剤毒性試験など応用が期待できる他に、糖尿病の重要病態であるインスリン抵抗性の研究に貢献しうるものと考えられる。また、我々の肝臓作成培養系では、胆管上皮細胞とその前駆細胞も同時に誘導されることが確認された。肝障害のみならず、胆管上皮細胞の疾患や障害も临床上重要であり、我々の培養の応用範囲が大きく広がったものと考えられる。

脂肪細胞には、脂肪をため込みメタボへと進む悪玉の白色脂肪細胞の他に、エネルギーを消費して発熱し、寒冷刺激に対応して脂肪や糖を消費する善玉と呼ぶべき褐色脂肪細胞が存在する。このような善玉の褐色脂肪細胞がマウスなどの小動物に存在することは古くから知られているが、ヒトを始めとする大型動物にも存在することが近年明らかにされ、注目されている。このような特殊な脂肪細胞は、白色脂肪細胞と異なり、体内の奥深く（例えば椎体脇）など得ることが困難な部位に局在し、研究がほとんど行われていない。本研究によってヒトES細胞やヒトiPS細胞からヒト

褐色脂肪細胞が分化誘導できれば、細胞移植療法のための細胞作成という観点のみならず、メタボリックシンドロムの創薬にも貢献できる貴重な細胞材料の創出という展開も想定され、代謝性疾患の医療に幅広く応用されうるものと考えられる。

## E. 結論

ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病合併症モデル系の確立（糖毒性による*in vitro*細小血管障害系の開発）、ヒト血管内皮細胞によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響の解析、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞、褐色脂肪細胞の分化誘導系の確立、等を推進し、顕著な成果を上げることができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Gokoh M, Yasuda K, Saeki Ku, et al.: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. *Cellular Reprogramming* 13:361-370, 2011.
2. Saeki Ku. A Feeder-Free Culture Method for the High Efficiency Production of Subculturable Vascular Endothelial Cells from Human Embryonic Stem Cells. Lineage-Specific Differentiation of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Methods and Protocol (Chapter 20) edited by Kaiming Ye; Sha Jin; Heather Tanner. Springer Protocols Handbook series, Humana Press, Springer Science and Business, LLC, USA.
3. Nakamura N, Saeki Ku, Saeki Ko, et al: Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cellular Reprogram* 14:171-185, 2012.

### 2. 学会発表

1. Nakamura N, Yasuda K, Saeki Ku, et al.: Tissue-specific involvements of mitochondrial electron transport chain in the hyperglycemia-induced superoxide overproduction in human vascular endothelial cells. The 7th Conference of Asia Society for Mitochondrial Research and Medicine, December 2010, Fukuoka, Japan.

2. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: A feeder-free and serum-free production of multi-functional mature hepatocytes with electron microscopically valid morphologies: towards an establishment of the global standard for human ES/iPS-based drug discovery tools. 9th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2011, Toronto, Ontario, Canada.
3. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: A novel system for the evaluation of vascular endothel-mediated smooth muscle growth inhibition: towards development of novel therapeutics for arteriostenosis. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.
4. Saeki Ku, et al.: Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.
5. 佐伯久美子、他：薬物代謝研究に使用可能なヒトESおよびiPS細胞由来肝細胞の作成。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。
6. 佐伯久美子、他：無フィーダー・無血清環境でのヒトES細胞からの赤血球および造血ストロマ細胞の作製。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。
7. 佐伯久美子、他：Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. シンポジウム「褐色脂肪細胞の新展開」、2011年6月、札幌。
8. 佐伯久美子：動脈狭窄に対する創薬標的分子同定ならびにオーダーメイド医療開発に向けた細胞モデルの開発。第2回創薬イノベーションフォーラム、2011年7月、東京。

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法並びに細胞療法的使用  
 発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護  
 出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社  
 特願2011-100218  
 平成23年 4月27日

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法  
 発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護  
 出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社  
 PCT/JP2012/052007  
 平成24年 1月31日

2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法  
 発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護  
 出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社  
 特願2011-019103  
 平成23年 1月31日

## ヒト細胞(初代培養細胞、ES/iPS 由来分化細胞)を用いた生活習慣病(肥満、糖尿病、血管障害)に関する新規病態モデル系の構築と創薬への展開

所 属 国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部  
研究代表者 佐伯 久美子

### 研究要旨

本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病の新規モデルを構築して創薬研究を展開することを目的とする。本年度は、ヒト血管内皮細胞の培養系を駆使して糖毒性(高血糖負荷時の細胞障害)のアッセー系を安定化させることに成功し、活性酸素の関与、内皮細胞の種類による活性酸素産生機構の違い、治療標的となりうる候補分子の存在、等を明らかにした。また、ヒト血管内皮細胞の平滑筋細胞の増殖に対する効果を接触培養と非接触培養の系により解明し、幹細胞から誘導した新鮮な血管内皮細胞の膜分子によると思われる増殖抑制作用を解析し、さらに、網羅的発現解析により利源分子を1つに絞りこむことができた。その他、ヒトES・iPS細胞から十分な成熟機能を有する肝細胞を作成して、毒性試験や創薬などに応用できる可能性を示した。さらに、この系には、胆管上皮細胞と肝芽細胞も存在することを明らかにした。さらに、世界に先駆けて、ヒトES・iPS細胞から褐色脂肪細胞を作成することにも成功し、今後の大きな発展が期待される。

### 研究分担者

- (1) 独立行政法人国立国際医療研究センター  
研究所糖尿病研究センター代謝疾患研究部  
安田 和基
- (2) 株式会社リプロセル  
浅井 康行
- (3) ディナバック株式会社事業開発本部  
細胞治療・再生医療ユニット  
佐伯 晃一
- (4) 多摩川精機株式会社東京バイオ開発センター  
羽生 尚弘
- (5) 富山大学大学院医学薬学研究部  
内科学第一講座  
戸邊 一之
- (6) 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学  
岩間 厚志

### A. 研究目的

従来はヒト疾患モデルとして動物モデルの開発に力が注がれてきたが、適切な動物モデルが得られていないケースも多い。一方、ヒト初代細胞を用いた実験系では、培養に伴う形質変化のために病態生理を正しく反映するモデルの構築は必ずしも容易でない。本研究ではこれらの問題に対して、用いるヒト初代細胞のラインアップを増やすとともに、ヒト

ES/iPS細胞やヒト成体由来前駆細胞から作製した分化細胞を取り入れることで、病態生理を正しく反映できる細胞モデルを構築して創薬研究を展開する。

既に我々は、ヒト初代血管内皮細胞のラインアップを増やすことで、高ブドウ糖負荷による血管内皮細胞での活性酸素の産生機序に関して、それまで指摘されなかった「組織特異性」が存在することを見出した。そして糖尿病性血管障害と一口に言ってもその種類(微小血管障害および大血管障害)に応じて適切なモデルを構築する必要性を世界に先駆けて示した。また、ヒトES細胞から純粋に血管内皮細胞を作製する技術を確認しており(Nakahara et al., Cloning Stem Cells 2009)、初代血管内皮細胞では表出不能であった「血管平滑筋細胞の増殖抑制効果」を世界で初めて表出することに成功した(特願2009-248406)。これらの知見は血管平滑筋細胞の過剰増殖が原因である虚血性疾患の病態を考える上で極めて重要であると考えられる。

糖尿病や生活習慣病の病態の解明には、肝臓と脂肪組織が極めて重要である。これらの組織は、肥満やインスリン抵抗性等における重要な役割を果たすことが知られている。また、脂肪細胞にはエネルギーを蓄えて肥満の元になる白色脂肪細胞の他に、熱を発してエネルギーを消費する褐色脂肪細胞という「善玉」の脂肪細胞があることが知られており、齧歯類などの小動物ではその存在が



よく知られている。近年、ヒトにもこの「善玉」脂肪細胞が存在することが報告されて以来、ヒトでの役割やその利用法が注目されている。

我々は既に、ヒト iPS 細胞の褐色脂肪細胞分化誘導に取り組み、褐色脂肪細胞のコミットメントに必須な転写因子 PRDM16 の発現誘導に成功している。この技術を発展させて褐色脂肪細胞の大量生産が可能になると、肥満やインスリン抵抗性の病態を考える上で重要でありながらヒト検体の採取が不可能であった褐色脂肪細胞の創薬研究が世界で初めて可能となる。

肝臓は、上記のような栄養素の代謝という面のみではなく、解毒作用などの薬物代謝という面でも重要な臓器である。従って、創薬や薬剤の副作用の検定にはヒト肝細胞が必須であるが、現在の供給体制は不十分である。また、肝臓の機能が廃絶する肝硬変、先天性代謝異常などの重篤な肝機能障害における移植材料としての肝細胞も望まれているが、やはり十分な供給とはほど遠い状況である。この点においても、我々はヒト iPS 細胞からの肝細胞の誘導に成功している。

以上、本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病（糖尿病・メタボリック症候群・肥満・虚血性疾患・血管障害、など）の新規モデルを構築して創薬研究を展開する。

## B. 研究方法

### 1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞（murine embryonic fibroblasts, MEF）はマイトマイシンC（MMC）処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒトES細胞（KhES-1、KhES-3）ならびにヒトiPS細胞（京都大学由来株（201B7、253G1）、成育医療センター由来株（#25、#40））は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上で培養した。コロニーの大きさやディッシュ上でのコロニー密度に注意し、継代時の剥離はトリプシンとコラゲナーゼを用いた。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC）、ヒト微小血管内皮細胞（Human MicroVascular Endothelial Cells、HMVEC）、ヒト大動脈内皮細胞（Human Aortic Endothelial Cells、HAEC）、ヒト冠状動脈内皮細胞（Human Coronary Arterial Endothelial Cells、HCAEC）、ヒト（腎）糸球体血管内皮細胞（Human（Renal）Glomerular Vascular Endothelial Cells、HGVEC）は、大日本住友製薬株式会社もしくは

ロンザグループ社から購入した。

HepG2細胞、HepaRG細胞は、それぞれ、DS PHARMA BIOMEDICAL、（財）ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、BIOPREDIC INTERNATIONAL（仲介業者（株）ケーエーシー）から購入した。

ヒト白色脂肪細胞は、市販の分化誘導培地を用いてヒト間葉系幹細胞から分化誘導した。ヒト間葉系幹細胞は、ロンザグループ社から購入した。

臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）由来のヒトiPS細胞は、山中4因子を搭載したセンダイウイルスベクター（ディナベック社より購入）を用いて樹立した。

### 2. ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞の血管内皮細胞への分化誘導プロトコール

未分化ヒトES細胞もしくは未分化ヒトiPS細胞をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed社のHydro cellを用いて3日間スフェア（sphere）形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子（vascular endothelial growth factor（VEGF）、bone morphogenetic protein 4（BMP-4）、stem cell factor（SCF）、Flt3 ligand（Flt3-L）、interleukin 3（IL-3）、interleukin 6（IL-6））を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子は同様の6種類である。2週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所に嚢状構造物が形成され、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。

### 3. ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞の肝細胞への分化誘導プロトコール

分化誘導に先立って、未分化ヒトES細胞もしくは未分化ヒトiPS細胞をマトリゲル上で2継代培養してMEFの影響の排除をはかった。その後は一貫してマトリゲル方で無フィーダー培養した。また、培養過程で牛胎児血清は使用せず無血清培養である。我々の肝細胞への分化誘導法は発生学の治験に基づき5段階培養である。第1段階では、100 ng/ml Activin A + 25 ng/ml Wnt 3A存在下で24時間培養し、第2段階では100 ng/ml Activin Aのみ存在下で更に24時間培養した。この最初の2段階をあわせて内胚葉分化誘導のための第一相と呼ぶ。次の第3段階は10 ng/ml FGF-2、20 ng/ml BMP-4、200 ng/ml Shh存在下での5日間の分化誘導で、先の第一相（内胚葉誘導）に続く第2相（肝分化開始）である。次の第4段階は、第3段階とやや類似の培養条件で20 ng/ml HGF、10 ng/ml FGF-2、20 ng/ml BMP-4

存在下での肝成熟分化誘導の初期段階で、5日間の培養ある。最後の第5段階は10 ng/ml OncostatinM、0.1  $\mu$  M dexamethasone による肝成熟段階で、5 - 15日間の培養期間を要する。第4段階と第5段階をあわせて第3相(肝成熟分化)と呼ぶ。

#### 4. ヒト iPS 細胞の褐色脂肪細胞への分化誘導プロトコール

前半の浮遊培養、後半の接着培養からなる2段階培養法であるが、特許申請準備中にて、その内容の詳細は記載しない。

#### 5. 細胞内 reactive oxygen species (ROS) の測定

5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6、ヒト腎微小血管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、細胞内の活性酸素種、ROS は蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes) を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン) により測定した。FACS buffer (5% FBS, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , PBS) に懸濁した細胞  $5 \times 10^5$  個に終濃度 200  $\mu$ M の DCFH-DA を添加、蛍光 FL-1 (励起波長 480 nm / 蛍光波長 530 nm) を測定し、mean の値を算出した。

#### 6. ヒト血管内皮細胞によるヒト平滑筋細胞への増殖抑制作用の測定

放射線照射したヒト血管内皮細胞を蛍光色素 CFSE で標識した後に培養皿に播種し、その上に CFSE とは異なる波長の蛍光色素 PKH-26 で標識したヒト大動脈平滑筋細胞を播種した。4日後に細胞を回収し、FACS Calibur を用いて細胞の蛍光強度を測定して (PKH-26 陽性細胞 (ヒト大動脈平滑筋細胞) を gating して)、PKH-26 の分裂に伴う蛍光強度減少を ModFit™ ソフトウェアで解析し、ヒト大動脈平滑筋細胞の平均分裂回数を算出した。

#### 7. 索状構造形成能のアッセイ

5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 5、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、

ヒト大動脈内皮細胞は day 7、ヒト腎微小血管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、Cord formation assay を行った。24穴プレートに 100  $\mu$ l の Matrigel (BD Biosciences) を 30分コートし、内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞は  $5 \times 10^4$  個、ヒト微小血管内皮細胞は  $6 \times 10^4$  個、ヒト大動脈内皮細胞は  $2.5 \times 10^4$  個、ヒト腎微小血管内皮細胞は  $6 \times 10^4$  個) をまき、5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EGM-2 (Cambrex) 培地 (2% FBS) で培養 24 時間後に倒立顕微鏡 IX-70 (オリンパス) により観察を行った。

#### 8. RT-PCR

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー遺伝子の発現の確認のために、既報の手法により RT-PCR を行った。肝分化マーカーとしては、 $\alpha$ -フェトプロテイン、アルブミン、AAT ( $\alpha$ -1 antitrypsin)、HNF4  $\alpha$ 、TAT (tyrosine aminotransferase)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4)、TDO2 (tryptophan 2, 3-dioxygenase) 等を用いた。褐色脂肪細胞マーカーとしては、PRDM16、UCP-1、pgc1  $\alpha$ 、cide-A、cyt-c、elovl3、ppar  $\alpha$  等を用いた。褐色脂肪細胞の分化過程の解析としては、myf5、pax3、pax7、ng2、pdgfrb、pdgfra、vegfr2、等を用いた。

#### 9. 定量的 RT-PCR

一部の実験においては定量的 RT-PCR も行った。肝分化マーカーとしては、TAT (tyrosine aminotransferase)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4)、TDO2 (tryptophan 2, 3-dioxygenase) を用いた。

#### 10. ウェスタンブロッティング

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー蛋白の発現の確認のために、既報の手法によりウェスタンブロッティングを行った。2次抗体と発色は ECL キットを用いた。肝マーカーとしては、 $\alpha$ -フェトプロテイン、アルブミン、AAT ( $\alpha$ -1 antitrypsin)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4) を用いた。

#### 11. グリコーゲン貯留能測定

細胞内グリコーゲンは PAS 染色により同定した。具体的には、1% periodic acid と Schiff reagent ②より染色し、カウンターステインは hematoxylin を用いた。

#### 12. ICG 取込能測定

ICG 取込と放出は、30 分間での取込と 6 時間での放出により既報の方法で検定した。

### 1 3. cytochrome P450 (Cyp) 3A4 活性測定

cyp3A4 活性の測定は、p450-GloTM CYP3A4 Assay kit (プロメガ)を用いて測定した。活性の薬剤誘導は、dexamethasone (50  $\mu$ M) もしくは rifampicin (100  $\mu$ M) による 16 時間処理により測定した。

### 1 4. 電子顕微鏡による解析

既報の固定法、包埋法、切片作成法ののちに、日立製作所製電子顕微鏡による撮影を行った。

### 1 5. 肝毒性疾患

D ガラクトサミン添加による肝毒試験と PGE1 による治療モデル実験を行った。

### 1 6. 酸素消費

培養細胞の酸素消費は、XF96 Extracellular Flux Analyzer (シーホースバイオサイエンス社)を用いて測定した。本測定のために、分化誘導培養はシーホースバイオサイエンス社特製 9 6 穴プレートにて行った。

### 1 7. 温度測定

ヒト細胞を移植したマウスの温度測定は、Therm GEAR G120/G100 (NEC 社)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

## ヒト E S 細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成 17 年 1 月 9 日に、ヒト E S 細胞の使用計画 (血液細胞と血管内皮細胞の作成計画、使用計画の名称「ヒト E S 細胞の無フィーダー、無血清環境を駆使した新しい未分化維持増殖培養法ならびに血液細胞血管内皮細胞分化制御系の開発」) の文部科学大臣の確認を初めて受けた (17 諸文科振第 7 3 4 号)。その後、研究者の追加・削除と研究業績の変更、使用期間と使用の方法の変更、使用機関の基準に関する説明の変更についても平成 18 年 1 月 24 日に文部科学大臣の確認を得た (18 諸文科振第 7 4 3 号)。さらにその後、文部科学省指針の改定に伴う変更と使用の方法の変更についても平成 19 年 1 月 28 日に文部科学大臣の確認を受けた (19 国文科振第 2 6 号)。さらにその後、研究者の追加・削除について平成 20 年 3 月 1 日、10 月 27 日に文部科学省に届け出た。さらにその後、使用の期間

の変更、ヒト E S 細胞株の変更について平成 21 年 7 月 13 日に文部科学大臣の確認を得た (21 諸文科振第 6 4 9 1 号)。

肝細胞の作成計画 (使用計画の名称「ヒト E S 細胞の無フィーダー・無血清条件での新しい肝細胞分化誘導系の開発」) に関しては、平成 22 年 4 月 7 日に文部科学大臣に届け出て研究を開始した。

褐色脂肪細胞の作成計画 (使用計画の名称「ヒト E S 細胞の無フィーダー・無血清条件での褐色脂肪細胞分化誘導系の開発」) に関しては、平成 23 年 6 月に文部科学大臣に届け出て研究を開始した。

## C. 研究結果

### ①初代培養ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病合併症モデル系の確立 (糖毒性による *in vitro* 細小血管障害系の開発) とその分子機構解析

糖毒性の検定のために、血管内皮細胞を normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 30 mM) の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した。その結果、何れの内皮細胞においても high glucose で高い値を得ることができた。このような高ブドウ糖濃度による細胞内 ROS の増加に関しては、その由来に関してミトコンドリアであるという説と細胞膜の NADPH オキシダーゼであるという 2 種類の学説が存在する。そこで、我々の観察した細胞内 ROS がこれらのいずれであるかを明らかにするために、それぞれの阻害剤での検討を行った。その結果、その由来に関して 3 つの型に分類できることが判明した。すなわち、A 型 (ミトコンドリア由来) : HAEC、B 型 (NADPH オキシダーゼ由来) : HUVEC、HMVEC、HGVEC、C 型 (両方由来) : HCAEC、という結果となった。さらに、これらの系において cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行ったところ、B 型内皮細胞で減少あるいは増加し、A 型内皮細胞で変化しない複数の分子の絞り込みに成功した。これらの遺伝子は、C 型内皮で変化するかしないかにより、NADPH オキシダーゼの制御分子 (3 候補分子)、もしくは、ミトコンドリア電子伝達系の制御分子 (15 候補分子) と考えられた。

### ②ヒト E S 細胞やヒト i P S 細胞から分化誘導した血管内皮細胞における高ブドウ糖毒性関連活性酸素産生

次に我々は、ヒト E S 細胞やヒト i P S 細胞から分化誘導した血管内皮細胞における高ブドウ糖負荷による活性酸素産生を検討した。培養条件は、

初代培養ヒト血管内皮細胞の場合と同様に、normal glucose (NG : 5.5 mM)と high glucose (HG : 30 mM)の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS)を測定した。

その結果、高ブドウ糖負荷により、ヒトES細胞ならびにヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞のいずれにおいても、細胞内ROSの上昇が認められた。

初代培養ヒト血管内皮細胞の場合と同様に、上昇した細胞内ROSがミトコンドリア由来か、NADPH オキシダーゼ由来かを検討するために、ミトコンドリア阻害剤 (CCCP, TTFA) と NADPH オキシダーゼ阻害剤 (Apocynin) を用いた実験を行った。その結果、ヒトES細胞由来血管内皮細胞においては、NADPH オキシダーゼの関与が、ヒトiPS細胞由来血管内皮細胞においては、NADPH オキシダーゼとミトコンドリアの両方の関与が示唆された。

### ③ヒト血管内皮細胞(ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む)によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響

ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞、初代培養ヒト血管内皮細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞1、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC)、ヒト血管内皮前駆細胞から分化誘導した血管内皮細胞等を用いて、ヒト平滑筋細胞の増殖に対する影響を、接触培養と非接触培養の両方において検討した。

その結果、初代培養ヒト血管内皮細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞1、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC)はいずれも、過去の報告に有るように、ヒト平滑筋細胞に対する増殖促進作用を有し、この作用は接触培養、非接触培養のいずれに系でも確認された。

一方、ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、非接触培養においては軽度のヒト平滑筋細胞増殖促進作用を示したが、接触培養においては有意な増殖抑制作用を示した。なお、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞はいずれも、接触培養、非接触培養を問わず増殖促進作用を示した。

最後に、ヒト血管内皮前駆細胞(ヒト末梢血から分離した物)から分化誘導した血管内皮細胞は、ヒト平滑筋細胞の増殖を非接触培養においては促進したが、接触培養においては抑制した。

以上のような系を用いて、cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行った結果、平

滑筋増殖抑制作用を有する血管内皮細胞においてのみ発現が低下している遺伝子が1つ同定され、RT-PCR、ウェスタンブロットリング、免疫染色でも確認された。

### ④ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞の分化誘導系の確立と創薬、毒性試験への展開

発生学の知見に基づく無フィーダー無血清3相5段階培養法を駆使して、創薬、毒性試験に使用できる肝細胞の作成を目指して研究を進めた。

ヒトiPS細胞を分化誘導後1週間以内に $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ -FT)、albumine (Alb)、 $\alpha$ -1 antitrypsin (AAT)、などの肝細胞マーカーの遺伝子発現がRT-PCRにて検出され、その後、tyrosine aminotransferase (TAT)、cytochrome P450 3A4 (Cyp3A4)、tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO2)などのマーカーが検出された。tyrosine aminotransferase (TAT)、cytochrome P450 3A4 (Cyp3A4)、tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO2)に関しては定量的RT-PCRによって分化誘導開始後2週間ぐらいで顕著に増加することが確認された。その発現レベルは、既存の肝(癌)細胞(株)に比較して十分であり、分化誘導のレベルは高いと考えられた。

次に、全てのヒトiPS細胞ならびにヒトES細胞を用いて、蛋白レベルの検討を行ったところ、 $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ -FT)、albumine (Alb)、 $\alpha$ -1 antitrypsin (AAT)、cytochrome P450 3A4 (Cyp3A4)が分化誘導後に増加することが確認された。その発現レベルは、既存の肝(癌)細胞(株)に比較して十分であり、分化誘導のレベルは高いと考えられた。

次に、我々の誘導系においてヒトiPS細胞ならびにヒトES細胞から誘導された肝細胞様の細胞が、十分な成熟肝細胞機能を保有しているかを明らかにするために、ICG取込能、グリコーゲン蓄積、Cyp3A4活性を検討した。その結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞は十分なICG取込と6時間後の放出を行うことができた。また、グリコーゲン蓄積能において、80%程度の分化細胞がグリコーゲンを細胞内に保有しており、極めて効率の分化であることが示された。更に、分化細胞は極めて高いCyp3A4活性を有していることも確認された。以上のいずれの機能に関しても、対象として用いられたヒト正常肝細胞や肝がん細胞と比較して、同等かそれ以上の機能であることが確認された。

本年度においては、我々の誘導系においてヒトiPS細胞ならびにヒトES細胞から誘導された肝細胞様の細胞の毒性試験を行った。分化細胞にDガラクトサミンを添加して培養上清中に肝酵素