

ポーターへの阻害効果はタンパク非結合型濃度で説明できると考えられていたが、阻害剤によってはタンパク非結合型濃度だけでなく総濃度が必要となる可能性が考えられた。

○ 肝取り込みトランスポーター阻害活性の基質依存性に関する検討

本検討を通じて使用する基質と阻害剤との組み合わせにより阻害活性に乖離を生じることが示唆された。今回は単一ドナーから調製した肝細胞を使用したことから、異なるヒト凍結肝細胞ロットにおいても同様の結果が得られるか確認する必要がある。また、OATP1B1 発現細胞においても、 $[^3\text{H}]$ PRV を基質として使用した場合に他の典型的基質に比べ  $\text{IC}_{50}$  を高く見積もる傾向にあるか否か検討を要する。

#### 5. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた in vitro 実験の結果からヒト in vivo における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

○ 膜透過過程の評価

各膜透過過程から算出したメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL は、実測値と同等であったことから、これら膜透過過程 CL は適切に評価できていると判断した。また、これら CL が、試験間および細胞ロット間で最大で3倍のばらつきを示すことから、定量的な胆汁排泄 CL を評価する上では、このばらつきを念頭に考察するべきである。Rosuvastatin は in vivo での消失が取り込み律速過程であると報告されているが、SCHH における取り込み CL はメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL と一致しなかった。したがって、律速段階が in vitro と in vivo で異なることが示唆された。

○ rosuvastatin の経時的な胆汁排泄評価

SCHH を用いた rosuvastatin の経時的な細胞内蓄積量は、輸送開始15分までほぼ直線的な上昇が観察されていることから、胆汁排泄 CL に、bile flow の欠損は影響していなかった。

#### 6. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

HepaRG 細胞に関する過去の検討から、有機アニオンの取り込みトランスポーター OATP 類については、OATP1B1 が、ヒト肝細胞の数分の1レベルでは発現していること、また、胆管側膜のトランスポーターについては、比較的発現が維持されていることなどを考えると、HepaRG 細胞において、

sandwich culture 系が組めれば、胆汁排泄過程を HepaRG 細胞を用いて検討できる可能性が考えうる。そこで、本年度は、HepaRG 細胞を用いて、sandwich culture 系を用いた定量的な胆汁排泄の検討を行うための実験系の確立を実施した。最初、ヒト肝細胞と同じプロトコールを用いて実施したが、bile pocket を開放するために、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンを抜いた buffer と接触させた折に、well あたりの蛋白量が減少したことから、viability の低下が疑われた。そこで、Matrigel の量を増やしたところ、2倍程度まで増やすと、viability の低下が  $\text{Ca}^{2+}$  イオン欠乏時にもおこらないことが示唆された。Matrigel の量を増やすほど、viability の改善が見込まれたが、一方で、bile pocket への薬物の排出を定量的に見る際に、比較的脂溶性の高い薬物については、Matrigel への吸着も大きく、非特異的な取り込みを誤ってしてしまう可能性も考えられたことから、できるだけ実験に支障がない程度に Matrigel の量を減らしたいという考えもあったことから、以後は、ヒト肝細胞実験の2倍量の Matrigel を用いて、複数の化合物について、胆管側への薬物の排出実験を実施する予定である。

### E. 結論

#### I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

ヒト CYP 遺伝子を組み込んだアデノウィルスベクターを用いて、HepG2 細胞に CYP タンパク質をより高発現させるために、マイクロスペースプレートと基盤パターン細胞アレイ (Cell-able™) の応用を検討した。マイクロスペースプレートを利用した3次元培養を取り入れることで、従来に比べて高い酵素活性が得られる可能性が示された。一方、基盤パターン細胞アレイでは種々の3次元培養条件下で CYP3A4 活性を発現させて従来の二次元培養法によるそれと比較検討したが、何れの3次元培養条件でも CYP3A4 活性の発現量は二次元培養のそれと同等であった。

薬物代謝酵素/トランスポーターの相互作用評価系の構築を目的とし、CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞の構築、評価を行った。本研究にて作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞は、CYP3A4 及び OATP1B1 の活性を有しており、またそれぞれの輸送及び代謝活性は各阻害剤により阻害された。本細胞系が代謝酵素とトランスポーターの相互作用評価系として有用である可能性が示唆された。

障害肝細胞とマクロファージ系/単球系細胞との細胞間相互作用による肝細胞障害性の増悪を捉

える系を開発する目的で共培養系の実験を試みた。薬物肝障害において障害肝細胞がマクロファージ系細胞等との相互作用を通じ、肝細胞が障害される条件を見い出した。

## II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

ヒト凍結幹細胞を用いて、肝細胞内における非結合型薬物濃度を見積もるための濃縮率を定量的に評価する方法論の構築に着手した。その結果、現時点では、氷冷下と 37°C における肝細胞へのリガンドの定常状態での C/M ratio を評価することが適している可能性が示唆されている。また、トランスポーター阻害剤の阻害能に対する蛋白結合の影響について *in vitro* 実験により検討した結果、阻害剤によりタンパク結合の影響を受ける化合物と受けない化合物が存在する可能性が考えられた。これまでトランスポーターへの阻害効果はタンパク非結合型濃度で説明できると考えられていたが、阻害剤によってはタンパク非結合型濃度だけでなく総濃度が必要となる可能性が考えられた。更に、薬物トランスポーター OATP1B1 の典型的基質について、ヒト肝細胞への取り込みに対する各種阻害剤の阻害活性を検証した結果、同一の阻害剤を用いた場合であっても、使用する基質に依存し阻害活性に乖離を生じることが示唆された。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集を行った。その結果、サンドイッチ培養したヒト凍結肝細胞による薬物の胆汁排泄クリアランス、およびこれを規定する膜透過素過程クリアランスには、試験間および細胞ロット間で最大 3 倍のばらつきが認められた。In vivo の胆汁排泄クリアランスが過小評価される一因として、サンドイッチ培養ヒト凍結肝細胞では、薬物消失の律速段階が *in vivo* と異なることが考えられた。

ヒト初代培養肝細胞の代替系として、HepaRG 細胞について検討を行い、HepaRG 細胞を用いて sandwich culture 系を構築することに成功し、CDF が発する蛍光が bile pocket に蓄積したことから、胆汁排泄に関わる能動輸送を担うトランスポーターが正常に機能していることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kotani N, Maeda K, Watanabe T, Hiramatsu M, Gong LK, Bi YA, Takezawa T, Kusuhara H, Sugiyama Y.

CULTURE PERIOD-DEPENDENT CHANGES IN THE UPTAKE OF TRANSPORTER SUBSTRATES IN SANDWICH-CULTURED RAT AND HUMAN HEPATOCYTES. *Drug Metab Dispos.* 3, 1503-10 (2011)

2) Masanori Nakakariya, Midori Ono, Nobuyuki Amano, Toshiya Moriwaki, Kazuya Maeda, Yuichi Sugiyama

IN VIVO BILIARY CLEARANCE SHOULD BE PREDICTED BY INTRINSIC BILIARY CLEARANCE IN SANDWICH-CULTURED HEPATOCYTES., *Drug Metab Dispos.* manuscript in revision

3) Naoki Kotani, Kazuya Maeda, Yasuyuki Debori and Yuichi Sugiyama

ELUCIDATION OF THE EXPRESSION AND FUNCTION OF DRUG UPTAKE TRANSPORTERS IN HUMAN HEPATOMA DERIVED HEPARG CELLS., 40, 602-609 (2012)

4) Seiichi Ishida

THE EFFECTS OF CYTOSKELETAL STRUCTURE CHANGES INDUCED BY DOCETAXEL ON GENE EXPRESSIONS.: A VIEW FROM DIFFERENT POINT OF DOCETAXEL FUNCTIONS. In "Docetaxel: Composition, Therapeutic Applications and Effects" Nova Scientific Publishers, Inc., accepted for publication

### 2. 学会発表

1) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一

肝腫瘍由来不死化細胞株 HepaRG 細胞における薬物の取り込みトランスポーターの発現・機能解析、日本薬剤学会 第 26 年会 (2011.5)

2) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一

肝腫瘍由来不死化細胞株 HepaRG 細胞における薬物トランスポーターの機能解析、第 19 回肝病態生理研究会 (2011.6)

3) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一

薬物の取り込みトランスポーターの輸送能力の評価系としての HepaRG 細胞の有用性の検討、第 6 回トランスポーター研究会年会 (2011.6)

4) Seiichi Ishida

DEVELOPMENT OF IN VITRO TOXICITY TESTS USING HEPATOCYTE DIFFERENTIATED FROM HUMAN IPS CELLS., 2011 In Vitro Biology Meeting (2011, 6)

5) Naoki Kotani, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama

EFFECT OF CULTURE PERIOD ON THE UPTAKE ACTIVITY OF TRANSPORTER SUBSTRATES IN SANDWICH-CULTURED RAT AND HUMAN HEPATOCYTES、International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, (2011. 6)

6) 石田 誠一

iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用—その展望と課題—、第1回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会(2011, 9,)

7) Kazuya Maeda

THE USE OF HEPATOCYTE CELL MODELS TO INVESTIGATE DRUG UPTAKE TRANSPORTERS, HepaRG Workshop 2011 (2011. 9)

8) Takashi Kubo, Tamaki Hori, Yukie Kuroda, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Anne Corlu, Fabrice Morel, Shogo Ozawa, Yuko Sekino, Seiichi Ishida

ROLE OF GENOMIC DNA METHYLATION DURING THE HEPATIC MATURATION OF HepaRG HUMAN HEPATOCYTE BIPOTENT PROGENITORS、第26回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)

9) Miki Fujishima, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, Shinichi Ninomiya, Koichi Yoshinari, Yasushi Yamazoe, Momoko Sunouchi, Kenichi Nakazawa, Seiichi Ishida

THE USEFULNESS OF CYP3A4/OATP1B1-DOUBLE EXPRESSING CELLS FOR EVALUATION OF HUMAN

PHARMACOKINETICS、第26回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)

10) 前田和哉、小谷直生、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一

ヒト肝腫瘍由来 HepaRG 細胞における取り込みトランスポーターの発現および機能解析、第26回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)

11) 青山晋輔、前田和哉、安達弥永、伊藤清美、杉山雄一

グリベンクラミド、レバグリニドおよびナテグリニドのヒトヘパトサイトへの取り込みに対する OATP トランスポーターの寄与について、第26回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)

12) Masanori Nakakariya, Midori Ono, Nobuyuki Amano, Toshiya Moriwaki, Kazuya Maeda, Yuichi Sugiyama

IN VIVO BILIARY CLEARANCE SHOULD BE PREDICTED BY INTRINSIC BILIARY CLEARANCE IN SANDWICH-CULTURED HEPATOCYTES、第26回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)

13) 石田誠一

ヒト iPS 由来肝細胞を用いた in vitro 毒性試験の開発、日本環境変異学会 MMS 研究会第59回定例会 (2011, 11)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 心不全に対する再生医療と人工心臓の複合戦略 — CD29<sup>high</sup>, CD34<sup>low</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞による 臨床研究と基盤研究—

所 属 (独)国立成育医療研究センター  
生殖・細胞医療研究部  
研究者代表者 梅澤 明弘  
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、特に CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に着目し細胞生物学的観点から基盤研究を推進することにより科学的な礎を築き、厚生労働省「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に基づくモデルを提示する。研究全期間を通じて研究代表者および分担研究者が相互に協力し、それぞれ基盤技術の検証を行った。

### 分担研究者

- |                            |       |
|----------------------------|-------|
| (1) 慶應義塾大学医学部              | 三好俊一郎 |
| (2) 京都府立医科大学               | 五條 理志 |
| (3) 大阪大学医学部                | 斎藤 充弘 |
| (4) 福井大学医学部                | 宮本 薫  |
| (5) 株式会社カルディオ              | 石田 智咲 |
| (6) 株式会社 GP バイオサイエンス       | 山田 雅雄 |
| (7) 株式会社ジェイ・エム・エス          | 鈴木 康二 |
| (8) 株式会社カネカ                | 櫻井 裕士 |
| (9) セルテスコメディカルエンジニアリング株式会社 | 藤沢 章  |
| (10) コアフロント株式会社            | 西岡 秀展 |
| (11) 株式会社ミラキュア             | 松崎 正晴 |
| (12) 株式会社アスクレップ            | 梅田 光朗 |

### A. 研究目的

新生児の約 1%は何らかの心臓疾患を有している。小児心臓外科の進歩により、適切な時期に適切な手術を行うことで、先天性心疾患を有する患児の予後は著しく向上した。しかし、術後心不全はある一定の確率で生じること、心筋症や慢性呼吸器疾患の合併症としての心不全は、心臓のポンプ失調が心筋の不可逆的な障害に至る場合が少なくない。これらの疾患の終末期には、薬剤・手術を含めた介入は十分な効果を示さない。世界的には小児用補助人工心臓 (DeBakey および Berlin Heart) は 1992 年頃より実用化が始まっているものの、成人よりも更に限られた施設での使用がなされているのみであり、成人の重症心不全に関する治療戦略から考えると、小児における選択可能な治療法の少なさは著しい。本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することが必要であると考え、特に、CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に注

目し前臨床研究を推進することにより、臨床研究に対する礎を築き上げることを目標に置くものである。多くの子供たちを病から救うことのみならず、子供たちを育む世代の人々に安心を与える。

### B. 研究方法

0

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のパリテーション (梅澤、山田、櫻井)

組換え体蛋白質 (キメラ蛋白質) を作用させた CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 細胞の増殖能の増加、寿命の延長、分化誘導を行う。

#### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略 (梅澤、宮本、三好、石田)

精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞治療の基盤を確立する。

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発 (鈴木、梅澤)

ヒト血清分離システムを用いて CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に最適な培養システムの構築を行う。特に血清中の PDGF によって生じる MAPK/p16ink4a を介した細胞周期ブレーキングシステムの解明とその対策を行う。

#### 小動物による有効性・安全性の検討 (梅澤、五條)

免疫不全マウスにて心筋内への直接注入と大動脈基部への選択的経冠状動脈の投与に近い状態の 2 つを行い、その優劣を比較検討する。病態としては、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルでの急性期と慢性期の 2 つの相における効果を検討する。また、ヒト骨髄細胞を免疫不全動物に移植し、長期間の経過観察の下、その造腫瘍性、生体内動態を経時的に観察することで安全性試験を

行う。

### 大動物による前臨床研究（三好、五條、梅澤、西岡）

小動物での実験結果をふまえて、大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行う。疾患設定も冠動脈結紮による心筋梗塞とし、急性期と慢性期の両方で細胞移植の効果を判定する。ドナー細胞としては骨髄細胞を単離して実験に供する。

### 施設バリデーション項目の検討（齋藤、藤沢、松崎）

施設バリデーションは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせる。本研究プロジェクトにおいては、心筋再生医療に用いる製造管理・品質管理・衛生管理に合致したSOP（標準作業手順書）の構築と品質管理基準の明確化を行う。

（倫理面への配慮）

### 国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては、対象となるヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238 平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 350、平成 21 年 12 月承認、受付番号 403、平成 22 年 7 月承認）。（<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>）

それぞれの組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、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るため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

本課題では、各分担研究者所属の施設により、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行う。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行う。すなわち動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行う。

## C. 結果

### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のバリデーション

ブタの骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、全骨髄播種法と比べて、分離デバイスを用いると、骨片等の夾雑物を除去でき、良好な増殖傾向を示した。続いて、同手法を用い、ヒト骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、分離の前処理法以外は問題なく、細胞の分離効率も高かった。

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングの有用性と評価を行った。バイオリソースとして成育医療研究センターで樹立した種々の組織由来間葉系細胞を用い、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングを行った。結果、解析に用いた細胞の特性に基づき、再生医療に必要な簡便かつ高感度の細胞選別技術を開発した。

### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

心筋形成因子の同定と、その *in vitro* における解析のため、モデルシステムとして間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入して細胞分化を誘導し、標的遺伝子である StAR 遺伝子近傍の染色体構造変化を解析し、分化誘導に伴い、histone eviction やループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測された。

### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

ヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを用いて調製したヒト血清の細胞増殖効果は FBS と同等以上であり、ヒト血清は細胞の形態に影響を与えなかった。

### 小動物による有効性・安全性の検討

大動物での実験を念頭に、マウスにおいて冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作製した。急性期ならび慢性期における心機能の評価は、心エコー検査により行った。その結果、コントロール群（偽手術群）と比較して心機能の低下を認めた。本結果をもとに細胞移植実験プロトコールの構築を作成した。

### 大動物による前臨床研究

イヌ実験より、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。

ブタ 16 頭に対して虚血モデルの作製を行い、細胞移植を想定した 4 週後まで耐術したのは 9 頭であった。心機能は虚血モデル作製前の心機能指標の一つである LVEF が  $69.1 \pm 11.3\%$  から虚血作製 4 週間後 LVEF が  $47.1 \pm 6.4\%$  と、平均 22.0% の低下を認めた。病理組織学的評価では、後下壁を

中心に心筋の線維化と壁の菲薄化を認めた。本結果から、ブタの慢性虚血モデルを安定して作製できる基盤を構築できた。

### 施設バリデーション項目の検討

CPC 内における、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養工程について、施設バリデーションを行い、GMP グレードで行う体制が少しずつではあるが、構築することができた。

### D. 考察

本研究では、再生医療において、薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することを目的として研究を進めている。研究代表者および分担研究者が相互に協力し、産官学連携のもと、骨髄細胞に注目し、前臨床研究およびその周辺技術について研究を行った。

大動物およびヒト骨髄から骨髄細胞を分離するための分離デバイスの開発とその機能の評価した。全骨髄播種法と比較すると、分離デバイスの利用は、夾雑物（骨片、血球等）を簡単に除去することができ、得られた細胞は多少のロスはあるが、初期培養の増殖効率および全細胞数で比較すると、分離デバイスの優位性が確認された。また、再生医療用途のクオリティーが高い培地を作成するために、患者の自己血清の使用を前提とした血清分離技術の開発が必要不可欠である。そこで、我々は、安全性が高く、効率がよいヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを開発することに成功した。

心筋形成因子を用いた細胞治療戦略として、間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導メカニズムを探るため、そのモデルシステムとして転写因子 SF-1 を導入して細胞分化を誘導し、その際の染色体構造の変化を解析した。特に、分化誘導に伴い、histone eviction やループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測される。

骨髄細胞の有効性・安全性を検証するために、心筋内への細胞移植実験における投与方法を検討した。直接注入法はすでに臨床で行われているが、最良な方法であるかの客観的なデータは十分とはいえない。投与方法の検討には、適切な実験系の構築は欠かすことはできないが、小動物、大動物を通しての検証ははまだ構築されていない。今回大動物実験を並行して進めることを前提として、マウスモデルによる安定したモデル実験系の構築を進めた。その結果として、冠動脈結紮による急性期ならに慢性期心筋梗塞モデルを構築し、その評価系を確立できた。

また、イヌによる心筋梗塞モデルとして、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘

導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。家畜ブタによる慢性心筋虚血モデルの作成では、心機能 LVEF にして平均 22.0%の低下を認め、慢性心不全モデルとして本モデルが適切であることが示唆された。病理組織学的検討で後下壁の心筋線維化と心室壁の菲薄化を認めており、心機能面だけでなく、病理組織学的にも心筋虚血モデルの有用性が証明された。

施設バリデーション項目の検討および臨床研究における標準作業手順書の作成として、本年度は、骨髄から細胞を採取、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養を行うとともに、施設の衛生状態、機器の起動状態、標準作業手順書を作成し、追記、修正および今後の課題を検討した。

### E. 結論

再生医療の臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日厚生労働省）により枠組みが示されている。薬事法においては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成 12 年 12 月 26 日付け医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知）をもとに検討され、2008 年に示された「ヒト（自己）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」ならびに「ヒト（同種）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」を遵守する必要がある。これらの指針・ガイドラインに対する見直しは、厚生労働省医政局研究開発振興課によるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会が進められている。また、薬事法の下では、ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保のあり方の見直しが進められている。このように、臨床研究あるいは治験という枠組みが存在しているなかで、世界における治験の実施状況を見ると、再生医療は広範な対象疾患へ適応されており、40 社近い企業により 100 件程度の治験が実施されている。技術が成熟しておらずビジネス上のリスクがある再生医療分野において、本研究は産業界の要素技術を活用することで、再生医療の一つのモデルを構築することになる。特に細胞移植の機能改善効果のメカニズム・投与細胞数・投与方法・ドナー細胞のマーキングプロトコルの開発、ホストのプレコンディショニングに関する基盤情報を獲得することにより、Cell Processing Center の運用において十分なバックグラウンドを有している本研究チームが再生医療の日本のリーダーとして重要な役割を果たすことができる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. 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. *Cell Rerogram*. 2012 (in press).

Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 3(2):8, 2012.

Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 7(1):e29677, 2012.

Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs*. 14(3):171-177, 2011.

Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs*. 14(3):215-222, 2011.

Isshiki H, Sato K, Horiuchi K, Tsutsumi S, Kano M, Ikegami H, Abe H, Umezawa A, Aburatani H, Toyama Y. Gene expression profiling of mouse growth plate cartilage by laser microdissection and microarray analysis. *J Orthop Sci*. 16(5):670-672, 2011.

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells*. 29(9):1405-1414, 2011.

Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Rerogram*. 13(4):361-370, 2011.

Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A.  $\beta$ -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep*. 1:68, 2011.

Nakamura A, Miyado K, Takezawa Y, Ohnami N, Sato M, Ono C, Harada Y, Yoshida K, Kawano N, Kanai S, Miyado M, Umezawa A. Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects. *Biochem Biophys Res Commun*. 410(2):351-357, 2011.

Hankowski KE, Hamazaki T, Umezawa A, Terada N. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest*. 91(7):972-977, 2011.

Saito S, Onuma Y, Ito Y, Tateno H, Toyoda M, Hidenori A, Nishino K, Chikazawa E, Fukawatase Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Shimma Y, Umezawa A, Hirabayashi J, Horimoto K, Asashima M. Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC Syst Biol*. 5 Suppl 1:S17, 2011.

Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 286(23):20345-20353, 2011.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem Rev*. 111(5):3021-3035, 2011.

Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci*. 62(2):98-106, 2011.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 7(5):e1002085, 2011.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched

in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 11:22, 2011.

Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol.* 336(1-2):127-132, 2011.

Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.

Sato T, Iso Y, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama S, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest.* 91(4):553-564, 2011.

Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells.* 16(1):1-11, 2011.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Chem Rev.* dx.doi.org/10.1021/cr1003612, 2011.

Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Nakamizo H, Segawa K, Tsukada Y, Ogawa S, Umezawa A. Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. *Stem Cells.* DOI: 10.1002/stem.573, 2010.

Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol.* doi:10.1016/j.mce.2010.11.025, 2010.

Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K,

Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. *Mol Ther.* 19(2):400-407, 2011.

Umezawa A, Gorham JD. Dueling models in head and neck tumor formation. *Lab Invest.* 90(11):1546-1548, 2010.

Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 20(2):235-244, 2011.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.* 5(9):e13017, 2010.

Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 401(3):480-486, 2010.

Miyagawa Y, Okita H, Hiroshima M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Eng Part A.* 17(3-4):513-521, 2011.

Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69(9):973-985, 2010.

Wang S, Kawashima N, Sakamoto K, Katsube K, Umezawa A, Suda H. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(1):39-45, 2010.

Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. *Curr Med Chem.* 17(28):3245-3252, 2010.

Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, Oki M, Umezawa A, Miyamoto K. Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J Biol Chem.*



285(36):28240-28251, 2010.

Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. **Biotechnol Bioeng.** 106(6):860-870, 2010.

Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. **Circ Res.** 106(10):1613-1623, 2010.

Ikegami Y, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. **Artif Organs.** 34(4):280-288, 2010.

Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. **Am J Pathol.** 176(4):1973-1982, 2010.

Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. **J Cell Physiol.** 223(3):695-702, 2010.

Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. **J. Biol. Chem.** 285(36), 28240-28251, 2010.

Yazawa, T., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. **Mol. Endocrinol.** 24(3), 485-496, 2010.

Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. **Mol. Cell. Endocrinol.** 336, 127-132, 2011.

上大介、五條理志、梅澤明弘：心筋再生医療の現状 - 細胞移植療法を用いた再生医療-. **Heart view** 14 (6):116-120, 2010.

五條理志、許俊鋭：(シリーズ) 再生医学のいま-基礎研究から臨床への展開に向けて- 44- 細胞移植：心臓病における臨床応用への潮流。治療, 92(12): 2793-2799, 2010

五條理志、豊田雅士、梅澤明弘：組織工学と再生医療、人工臓器 39(3), 202-207, 2010

五條理志、上大介：(特集) 臨床工学技士が知っておきたい人工臓器と再生医療の展望：心臓における再生医療, **Clinical Engineering**, 22(1): 9-14, 2011.

学会発表

第10回再生心臓血管外科治療研究会 2011.02.23.

「ブタ慢性心筋虚血モデルへの同種ブタ羊膜由来細胞移植」

第10回日本再生医療学会 2011.03.01. 「ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種ブタ羊膜由来細胞移植」

Miyamoto, K.: Mechanism of stem cell differentiation into steroidogenic lineage. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

Miyamoto, K., Mizutani, T., Yazawa, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium. Adrenal growth and development. 2010, 6, 16-18, San Diego.

水谷哲也、宮本 薫：卵巣における転写制御とエピジェネティクス. 第55回日本生殖医学会. 卵巣機能に関する基礎研究の進歩. 最近の知見から. 2010, 11, 11-12, 徳島.

矢澤隆志：卵巣ステロイドホルモン合成に関連する遺伝子発現調節機構の新知見. 第15回日本生殖内分分泌学会学術集会. 卵巣機能調節における新知見. 2010, 11, 20-21, 千里.

宮本 薫：卵巣：ステロイド・転写調節など. 岡山大学研究開発委員会 第4ワーキング主催シンポジウム分野・領域を超えた内分泌学・生殖内分泌学の研究ネットワークへ「少子化社会からの脱却をめざした分子内分泌標的制御とその応用」. 2010, 12, 11, 岡山.

一般演題 (口頭発表・ポスター発表)

Mizutani, T., Yazawa, T., Uesaka, M., Inaoka, Y., Ju, Y., Okada, R., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel enhancer region in the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

Yazawa, T., Miyamoto, K.: PGC-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. 14th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 27-30, Kyoto.

水谷哲也、矢澤隆志、具 云峰、今道力敬、松村健大、河邊真也、松浦かおる、上木康衣、梅澤明弘、宮本 薫：ヒト StAR 遺伝子の新たな転写調節機構. 日本生化学会北陸支部第28回大会. 2010, 5, 29, 福井.

Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: LRH-1

regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium 2010, 6, 16-18, San Diego.

Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Imamichi, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of SF-1-mediated transcription of the human steroidogenic acute regulatory protein gene by chromatin-loop formation. The 92th Annual Meeting & Expo 2010, 6, 19-22, San Diego.

Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. The 92th Annual Meeting & Expo 2010, 6, 19-22, San Diego.

矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫.: 卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子・PGC-1 $\alpha$ の機能. 日本動物学会中部支部大会 2010. 2010, 7, 25, 岐阜.

矢澤隆志, 河邊真也, 稲岡齊彦, 岡田令子, 水谷哲也, 今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫.: 卵巣・顆粒膜細胞におけるアンドロジェンの作用. 日本動物学会第 81 回大会. 2010, 9, 23-25, 東京.

水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫.: クロマチン構造変換を介した StAR の新たな転写調節メカニズム. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸.

矢澤隆志, 稲岡齊彦, 岡田令子, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 山崎由希子, 宇佐美陽子, 栗林真悠, 梅澤明弘, 宮本 薫.: PGC-1 $\alpha$  は SF-1 と LRH-1 のコアクチベーターとしてプロジェステロン産生を促進する. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010. 2010, 12, 7-10, 神戸.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 心不全に対する再生医療と人工心臓の複合戦略 — CD29<sup>high</sup>, CD34<sup>low</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞による 臨床研究と基盤研究—

所属 (独)国立成育医療研究センター  
生殖・細胞医療研究部  
研究代表者 梅澤 明弘

**研究要旨** 先天性心疾患を有する患児の予後は向上したが、術後および合併症による心不全に対する治療法の少なさは著しく、その治療法の開発には薬剤・人工臓器とともに再生医療を集学的に投入することが必要である。本研究では、特に CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に着目し細胞生物学的観点から基盤研究を推進することにより科学的な礎を築き、厚生労働省「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に基づくモデルを提示する。昨年度に引き続き、研究代表者および分担研究者が相互に協力し、それぞれ基盤技術の検証を行った。

### 分担研究者

- |                                |       |
|--------------------------------|-------|
| (1) 慶應義塾大学医学部                  | 三好俊一郎 |
| (2) 京都府立医科大学                   | 五條 理志 |
| (3) 大阪大学医学部                    | 斎藤 充弘 |
| (4) 福井大学医学部                    | 宮本 薫  |
| (5) 株式会社カルディオ                  | 石田 智咲 |
| (6) 株式会社 GP バイオサイエンス           | 山田 雅雄 |
| (7) 株式会社ジェイ・エム・エス              | 鈴木 康二 |
| (8) 株式会社カネカ                    | 櫻井 裕士 |
| (9) セルテスコメディカルエンジニアリング<br>株式会社 | 藤沢 章  |
| (10) コアフロント株式会社                | 西岡 秀展 |
| (11) 株式会社ミラキュア                 | 松崎 正晴 |

### A. 研究目的

新生児の約 1%は何らかの心臓疾患を有している。小児心臓外科の進歩により、適切な時期に適切な手術を行うことで、先天性心疾患を有する患児の予後は著しく向上した。しかし、術後心不全はある一定の確率で生じること、心筋症や慢性呼吸器疾患の合併症としての心不全は、心臓のポンプ失調が心筋の不可逆的な障害に至る場合が少なくない。これらの疾患の終末期には、薬剤・手術を含めた介入は十分な効果を示さない。世界的には小児用補助人工心臓 (DeBakey および Berlin Heart) は 1992 年頃より実用化が始まっているものの、成人よりも更に限られた施設での使用がなされているのみであり、成人の重症心不全に関する治療戦略から考えると、小児における選択可能な治療法の少なさは著しい。本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することが必要であると考え、特に、CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に注

目し前臨床研究を推進することにより、臨床研究に対する礎を築き上げることを目標に置くものである。多くの子供たちを病から救うことのみならず、子供たちを育む世代の人々に安心を与える。

### B. 研究方法

昨年度に引き続き研究を実施した。  
CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のパリテーション (梅澤、山田、櫻井)  
組換え体蛋白質 (キメラ蛋白質) を作用させた CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 細胞の増殖能の増加、寿命の延長、分化誘導を行う。

### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略 (梅澤、宮本、三好、石田)

精製した心筋誘導因子により心筋細胞に分化させた骨髄間葉系細胞や、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行い、心筋細胞治療の基盤を確立する。

### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発 (鈴木、梅澤)

ヒト血清分離システムを用いて CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に最適な培養システムの構築を行う。特に血清中の PDGF によって生じる MAPK/p16ink4a を介した細胞周期ブレーキングシステムの解明とその対策を行う。

### 小動物による有効性・安全性の検討 (梅澤、五條)

免疫不全マウスにて心筋内への直接注入と大動脈基部への選択的経冠状動脈の投与に近い状態の2つを行い、その優劣を比較検討する。病態としては、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルでの急性期と慢性期の2つの相における効果を検討

する。また、ヒト骨髄細胞を免疫不全動物に移植し、長期間の経過観察の下、その造腫瘍性、生体内動態を経時的に観察することで安全性試験を行う。

#### 大動物による前臨床研究（三好、五條、梅澤、西岡）

小動物での実験結果をふまえて、大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行う。疾患設定も冠動脈結紮による心筋梗塞とし、急性期と慢性期の両方で細胞移植の効果を判定する。ドナー細胞としては骨髄細胞を単離して実験に供する。

#### 施設バリデーション項目の検討（齋藤、藤沢、松崎）

施設バリデーションは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせる。本研究プロジェクトにおいては、心筋再生医療に用いる製造管理・品質管理・衛生管理に合致したSOP（標準作業手順書）の構築と品質管理基準の明確化を行う。

#### （倫理面への配慮）

#### 国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては、対象となるヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238 平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 350、平成 21 年 12 月承認、受付番号 403、平成 22 年 7 月承認）。（<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>）

それぞれの組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、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るため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

本課題では、各分担研究者所属の施設により、ヒト由来細胞ならびに実験動物を用いた研究を行う。ヒト由来組織の採取にあたっては、研究機関における倫理委員会に研究計画を申請し承認を得ている。また動物実験については当該動物実験指針に準拠して研究を行う。すなわち動物実験計画を申請し承認を得ており、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物の使用は目的に合致した最小限にとどめ、苦痛を与えない等の倫理的な配慮を行う。

## C. 結果

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞のバリデーション

ブタの骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、全骨髄播種法と比べて、分離デバイスを用いると、骨片等の夾雑物を除去でき、良好な増殖傾向を示した。続いて、同手法を用い、ヒト骨髄から骨髄細胞を分離した。結果、分離の前処理法以外は問題なく、細胞の分離効率も高かった。

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングの有用性と評価を行った。バイオリソースとして成育医療研究センターで樹立した種々の組織由来間葉系細胞を用い、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングを行った。結果、解析に用いた細胞の特性に基づき、再生医療に必要な簡便かつ高感度の細胞選別技術を開発した。

#### 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

心筋形成因子の同定と、その *in vitro* における解析のため、モデルシステムとして間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入して細胞分化を誘導し、標的遺伝子である StAR 遺伝子近傍の染色体構造変化を解析し、分化誘導に伴い、histone eviction やループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測された。

#### CD29<sup>high</sup> CD34<sup>low</sup> c-kit<sup>+</sup> CD140a<sup>+</sup> 骨髄細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

ヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを用いて調製したヒト血清の細胞増殖効果は FBS と同等以上であり、ヒト血清は細胞の形態に影響を与えなかった。

#### 小動物による有効性・安全性の検討

大動物での実験を念頭に、マウスにおいて冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作製した。急性期ならび慢性期における心機能の評価は、心エコー検査により行った。その結果、コントロール群（偽手術群）と比較して心機能の低下を認めた。本結果をもとに細胞移植実験プロトコルの構築を作成した。

#### 大動物による前臨床研究

イヌ実験より、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。

ブタ 16 頭に対して虚血モデルの作製を行い、細胞移植を想定した 4 週間まで耐術したのは 9 頭であった。心機能は虚血モデル作製前の心機能指

標の一つである LVEF が  $69.1 \pm 11.3\%$  から虚血作製 4 週間後 LVEF が  $47.1 \pm 6.4\%$  と、平均  $22.0\%$  の低下を認めた。病理組織学的評価では、後下壁を中心に心筋の線維化と壁の菲薄化を認めた。本結果から、ブタの慢性虚血モデルを安定して作製できる基盤を構築できた。

### 施設バリデーション項目の検討

CPC 内における、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養工程について、施設バリデーションを行い、GMP グレードで行う体制が少しずつではあるが、構築することができた。

### D. 考察

本研究では、再生医療において、薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することを目的として研究を進めている。研究代表者および分担研究者が相互に協力し、産官学連携のもと、骨髄細胞に注目し、前臨床研究およびその周辺技術について研究を行った。

大動物およびヒト骨髄から骨髄細胞を分離するための分離デバイスの開発とその機能の評価した。全骨髄播種法と比較すると、分離デバイスの利用は、夾雑物（骨片、血球等）を簡単に除去することができ、得られた細胞は多少のロスはあるが、初期培養の増殖効率および全細胞数で比較すると、分離デバイスの優位性が確認された。また、再生医療用途のクオリティーが高い培地を作成するために、患者の自己血清の使用を前提とした血清分離技術の開発が必要不可欠である。そこで、我々は、安全性が高く、効率がよいヒト血清調製用閉鎖系分離デバイスを開発することに成功した。

心筋形成因子を用いた細胞治療戦略として、間葉系幹細胞から心筋細胞への分化誘導メカニズムを探るため、そのモデルシステムとして転写因子 SF-1 を導入して細胞分化を誘導し、その際の染色体構造の変化を解析した。特に、分化誘導に伴い、histone eviction やループ構造の形成など様々な染色体構造の変化が生じていることを明らかにした。これらの変化が転写因子導入による幹細胞分化の本質を担っていると推測される。

骨髄細胞の有効性・安全性を検証するために、心筋内への細胞移植実験における投与方法を検討した。直接注入法はすでに臨床で行われているが、最良な方法であるかの客観的なデータは十分とはいえない。投与方法の検討には、適切な実験系の構築は欠かすことはできないが、小動物、大動物を通しての検証ははまだ構築されていない。今回大動物実験を並行して進めることを前提として、マウスモデルによる安定したモデル実験系の構築を進めた。その結果として、冠動脈結紮による急性期ならに慢性期心筋梗塞モデルを構築し、その評価系を確立できた。

また、イヌによる心筋梗塞モデルとして、ピオグリタゾン前処置、骨髄間葉系幹細胞は、心筋誘導効率が極めて高く、さらに移植による心機能改善効果、心筋梗塞縮小効果がある事が判明した。家畜ブタによる慢性心筋虚血モデルの作成では、心機能 LVEF にして平均  $22.0\%$  の低下を認め、慢性心不全モデルとして本モデルが適切であることが示唆された。病理組織学的検討で後下壁の心筋線維化と心室壁の菲薄化を認めており、心機能面だけでなく、病理組織学的にも心筋虚血モデルの有用性が証明された。

施設バリデーション項目の検討および臨床研究における標準作業手順書の作成として、本年度は、骨髄から細胞を採取、自己血清を用いた細胞分離・調製、培養を行うとともに、施設の衛生状態、機器の起動状態、標準作業手順書を作成し、追記、修正および今後の課題を検討した。

### E. 結論

再生医療の臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日厚生労働省）により枠組みが示されている。薬事法においては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成 12 年 12 月 26 日付け医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知）をもとに検討され、2008 年に示された「ヒト（自己）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」ならびに「ヒト（同種）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」を遵守する必要がある。これらの指針・ガイドラインに対する見直しは、厚生労働省医政局研究開発振興課によるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会で進められている。また、薬事法の下では、ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保のあり方の見直しが進められている。このように、臨床研究あるいは治験という枠組みが存在しているなかで、世界における治験の実施状況をみると、再生医療は広範な対象疾患へ適応されており、40 社近い企業により 100 件程度の治験が実施されている。技術が成熟しておらずビジネス上のリスクがある再生医療分野において、本研究は産業界の要素技術を活用することで、再生医療の一つのモデルを構築することになる。特に細胞移植の機能改善効果のメカニズム・投与細胞数・投与方法・ドナー細胞のマーキングプロトコルの開発、ホストのプレコンディショニングに関する基盤情報を獲得することにより、Cell Processing Center の運用において十分なバックグラウンドを有している本研究チームが再生医療の日本のリーダーとして重要な役割を果たす

ことができる。

#### F. 研究発表

- Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. 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. *Cell Rerogram*. 2012 (in press).
- Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 3(2):8, 2012.
- Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One*. 7(1):e29677, 2012.
- Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs*. 14(3):171-177, 2011.
- Kami D, Takeda S, Makino H, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs*. 14(3):215-222, 2011.
- Isshiki H, Sato K, Horiuchi K, Tsutsumi S, Kano M, Ikegami H, Abe H, Umezawa A, Aburatani H, Toyama Y. Gene expression profiling of mouse growth plate cartilage by laser microdissection and microarray analysis. *J Orthop Sci*. 16(5):670-672, 2011.
- Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells*. 29(9):1405-1414, 2011.
- Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Rerogram*. 13(4):361-370, 2011.
- Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A.  $\beta$ -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep*. 1:68, 2011.
- Nakamura A, Miyado K, Takezawa Y, Ohnami N, Sato M, Ono C, Harada Y, Yoshida K, Kawano N, Kanai S, Miyado M, Umezawa A. Innate immune system still works at diapause, a physiological state of dormancy in insects. *Biochem Biophys Res Commun*. 410(2):351-357, 2011.
- Hankowski KE, Hamazaki T, Umezawa A, Terada N. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest*. 91(7):972-977, 2011.
- Saito S, Onuma Y, Ito Y, Tateno H, Toyoda M, Hidenori A, Nishino K, Chikazawa E, Fukawatase Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Shimma Y, Umezawa A, Hirabayashi J, Horimoto K, Asashima M. Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC Syst Biol*. 5 Suppl 1:S17, 2011.
- Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 286(23):20345-20353, 2011.
- Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem Rev*. 111(5):3021-3035, 2011.
- Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Mitsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci*. 62(2):98-106, 2011.
- Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H,

Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 7(5):e1002085, 2011.

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol.* 11:22, 2011.

Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol.* 336(1-2):127-132, 2011.

Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.

Sato T, Iso Y, Uyama T, Kawachi K, Wakabayashi K, Omori Y, Soda T, Shoji M, Koba S, Yokoyama S, Fukuda N, Saito S, Katagiri T, Kobayashi Y, Takeyama Y, Umezawa A, Suzuki H. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest.* 91(4):553-564, 2011.

## 総説

- 1) 水谷哲也, 宮本 薫: ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質 StAR の新たな転写調節機構. *生化学.* 83(5), 388-391, 2011.
- 2) 水谷哲也, 宮本 薫: クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16, 27-29, 2011.
- 3) 矢澤隆志, 梅澤明弘, 宮本 薫: 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16,

5-8, 2011.

- 4) 宮本 薫: 卵胞発育とエピジェネティクス—StAR 遺伝子を中心として—. 特集 卵と卵胞の発育・成熟, 卵胞の発育と成熟(4).

## HORMONE FRONTIER IN

GYNECOLOGY. 18(4), 55-60, 2011.

- 5) 矢澤隆志, 宮本 薫: 万能細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の創出. *医学のあゆみ.* 239(14), 1445-1450, 2011.

## 原著

- 1) Soneda, S., Yazawa, T., Fukami, M., Adachi, M., Mizota, M., Fujieda, K., Miyamoto, K., Ogata, T.: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: Identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding sites. *J Clin Endocrin Metab.* 96(11), 1881-1887, 2011.
- 2) Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., Oki, M.: Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes & Genetic Systems* 86, 305-314, 2011.

## 1.学会発表

## シンポジウム

- 1) 宮本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写因子とその調節機構. 第84回日本内分泌学会学術集会. 教育講演 9. 2011, 4, 21-23, 神戸. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 87(1), 140, 2011.
- 2) 矢澤隆志: 幹細胞を用いたステロイドホルモン産生機構の解明. 平成23年度日本動物学会中部支部大会. 公開シンポジウム 1: 生殖

- とステロイドホルモン. 2011, 7, 30-31, 福井市, 抄録集, 13, 2011.
- 3) 矢澤隆志: 幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第 29 回内分泌代謝学サマナーセミナー. 第 7 回内分泌学会若手発表. 2011, 7, 7-9, 仙台市.
  - 4) 矢澤隆志: ステロイドホルモン産生の分子機構の解明. 平成 23 年度動物学会奨励賞受賞講演. 日本動物学会第 82 回旭川大会. 2011, 9, 21-23, 旭川. 予稿集, 24, 2011.
  - 5) 水谷哲也: 卵巣におけるクロマチン構造変換を介した転写調節機構. 第 16 回日本生殖内分泌学会学術集会. 性腺における新たな転写制御とエピジェネティクス. 2011, 11, 19, 東京都. 抄録集, 18, 2011.
- 一般演題 (口頭発表・ポスター発表)
- 1) Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of steroidogenic-related genes by SF-1 through its dependent alternations of chromatin structure. *Experimental Biology* 2011. 2011, 4, 9-13, Washington, DC.
  - 2) 水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1 によるクロマチン構造変換を介した新たな転写調節機構. 第 84 回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸. 日本生殖内分泌学会雑誌. 87(1), 282, 2011.
  - 3) 矢澤隆志, 稲岡齊彦, 河邊真也, 水谷哲也, 今道力敬, 梅澤明弘, 宮本 薫: ES 細胞からのステロイドホルモン産生細胞への分化誘導. 第 84 回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸. 日本生殖内分泌学会雑誌. 87(1), 283, 2011.
  - 4) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 小亀浩一, 寒川賢治, 宮本 薫: 転写因子 SF-1 の新たな標的遺伝子の同定. 第 84 回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸. 日本生殖内分泌学会雑誌. 87(1), 329, 2011.
  - 5) 具 云峰, 水谷哲也, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: 新たな SF-1 標的遺伝子 ALAS の転写調節とステロイドホルモン産生に対する役割. 第 84 回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸. 日本生殖内分泌学会雑誌. 87(1), 330, 2011.
  - 6) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 赤木好男, 宮本 薫: 転写因子 SF-1 による GSTA3 の転写調節について. 第 84 回日本内分泌学会学術集会. 2011, 4, 21-23, 神戸. 日本生殖内分泌学会雑誌. 87(1), 360, 2011.
  - 7) 菅野真史, 矢澤隆志, 河邊真也, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 藤枝重治, 宮本 薫: ES 細胞特異的 LRH1 の発現調節機構の解析. 平成 23 年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31, 福井市, 抄録集, 17, 2011.
  - 8) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: 転写因子 LRH-1 の卵巣特異的転写調節機構. 平成 23 年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31, 福井市, 抄録集, 40, 2011.
  - 9) 宇佐美陽子, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 山崎由希子, 水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮本 薫: 電子伝達体 p450 オキシドレダクターゼの転写調節機構. 平成 23 年度日本動物学会中部支部大会. 2011, 7, 30-31, 福井市, 抄録集, 39, 2011.
  - 10) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: ヒト



顆粒膜細胞由来 KGN 細胞における FDAX1  
および FDXR 遺伝子の転写制御機構. 第 16  
回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11, 19,  
東京都. 抄録集, 26, 2011.

- 11) 具 云峰, 水谷哲也, 今道力敬, 松村健大, 矢  
澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: ヘム  
合成律速因子 ALAS1 の新たな転写調節機構  
と機能解析. 第 16 回日本生殖内分泌学会学  
術集会. 2011, 11, 19, 東京都. 抄録集, 30,  
2011.
- 12) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢  
澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 稲谷 大, 赤木  
好男, 宮本 薫: ステロイドホルモン産生細胞  
における GSTA3 の転写調節について. 第 16  
回日本生殖内分泌学会学術集会. 2011, 11, 19,  
東京都. 抄録集, 31, 2011.
- 13) 河邊真也, 矢澤隆志, 菅野真史, 宇佐美陽子,  
水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮  
本 薫: 卵巣顆粒膜細胞における転写因子  
LRH-1 の転写調節機構. 第 36 回日本比較内分  
泌学会大会. 2011, 11, 23-26, 東京.
- 14) 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宇佐美陽子,  
水谷哲也, 今道力敬, 具 云峰, 松村健大, 宮  
本 薫: 排卵におけるアンドロジェンの役割.  
第 36 回日本比較内分泌学会大会.  
2011, 11, 23-25 東京.
- 15) 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 松村健大, 矢  
澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 梅澤明弘, 宮本  
薫: 転写因子 SF-1 による FDX1 および FDXR  
の転写制御. 第 34 回日本分子生物学会年会.  
2011, 12, 13-16, 横浜.
- 16) 松村健大, 今道力敬, 水谷哲也, 具 云峰, 矢  
澤隆志, 菅野真史, 河邊真也, 梅澤明弘, 稲谷  
大, 赤木好男, 宮本 薫: Glutathione  
S-transferase A3(GSTA3) プロモーター領  
域における転写制御. 第 34 回日本分子生物  
学会年会. 2011, 12, 13-16, 横浜.
- 17) Ju, Y., Mizuani, T., Imamichi, Y.,  
Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S.,  
Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.:

Delta-aminolevulinate synthase 1(ALAS1)  
is a novel steroidogenic factor-1 (SF-1)  
target gene important for steroidogenesis.  
第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12,  
13-16, 横浜.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得 (出願中)

特願 2011-284430 (H23. 12. 26)  
体外受精におけるヒト成熟卵子マーカー

## 多能性幹細胞の新規的培養空間創出による幹細胞医薬研究の底上げ

所 属 国立成育医療研究センター研究所  
生殖・医療研究部幹細胞・生殖学術研究室  
研究代表者 阿久津英憲  
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

### 研究要旨

現在、幹細胞による医療応用は体外での培養が主体となっている。さらには、ヒトES細胞やiPS細胞などのヒト多能性幹細胞は、その創出から体外培養系が母体となり、産業応用でも安定的に性質を保持して維持することは基盤技術として重要である。しかし、ES細胞などの幹細胞研究から、現在標準化されている2D培養システムでの限界（ゲノムの不安定性誘因や分化誘導細胞の幼若性による不完全な機能獲得などの問題点）が明白になってきた。そのため細胞培養環境の領域は、次世代医療を確かで安全な品質を付加していくために重要な基盤研究領域である。本研究課題では、新たな細胞培養空間の開発を基盤とするが、マイクロデバイス開発のような高度な先端的ナノテクノロジーからのアプローチではなく、より細胞の生命活動の観点に立ち細胞コミュニケーションと足場の研究を展開する。すなわち、本研究成果を効率的に、時間的にもより早く社会へ還元するために従来の汎用されている細胞培養システムの基盤を応用することで経済的にも技術的にも汎用性を高めたヒトiPS細胞研究を行う。本研究事業を各委託研究との枠組みから4つの項目（1. 安全性の高いヒトiPS細胞創出、2. 幹細胞性質の保持とゲノム安定化の足場の開発、3. iPS細胞のゲノム安定性の解析、4. 分化誘導に優れた足場の開発）に分け研究を遂行し、全体としてはシナジスティックに進め成育医療研究センター（主任研究者：阿久津）がハブとして機能し本プロジェクトを遂行する。

### 研究分担者

#### 分担研究者

- |                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| (1) (財) 癌研究会 癌研究所     | 原 英二            |
| (2) 横浜市立大学医学部         | 梁 明秀            |
| (3) 慶應大学医学部           | 浜谷敏生            |
| (4) 大日本印刷(株) 研究開発センター | 土屋勝則            |
| (5) 日油(株) 筑波研究所       | 山田 智            |
| (6) (株) DNA チップ研究所    | 的場 亮            |
| (7) ライフテクノロジーズジャパン(株) | 小柳智義            |
| (8) (株) セルシード         | 渡邊広也            |
| (9) ユニーテック(株)         | 新井貴博            |
| (10) 東京医科歯科大学         | 西村栄美（平成22年度で終了） |

### A. 研究目的

本研究では、独自のマイクロファブリケーション技術を用いてiPS細胞研究へ応用しスケーラブル細胞培養デバイス構築を目指す。加えて、液性細胞外基質として生体適合性ポリマーも含めたヒト多能性幹細胞の新規的培養空間の創出を行う。

#### 【厚生科学研究における必要性・重要性】

本研究に係る研究者らがこれまで進めて来た系幹細胞に関するゲノム安定性や細胞の規格化等是指針策定に関して重要なエビデンスを供給し、政策医療の

一躍を担ってきた。

#### 【国内・国外における研究状況及び研究計画の新規性・獨創性】

マイクロファブリケーション技術の基盤研究をヒトiPS細胞へ応用し、汎用性のあるスケーラブルな培養デバイスと開発し、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた新規的培養システムを構築し、iPS細胞等多能性幹細胞研究の医薬研究基盤底上げと促進に貢献する。

#### 【明らかにすること】

細胞を活かす・保護する・増やす・(機能を)保つための体外培養環境での評価と改善は次世代医薬研究の基盤となる。細胞の足場の観点から新規的培養空間の創出と足場がポイントとなる疾患の病因メカニズム解明を行う。そのために必要なステップとして、1) 安全性の高いヒト iPS 細胞創出、2) iPS 細胞間応答の明確化、3) ゲノム安定化を維持する培養環境の開発、4) 細胞が主体となるマイクロファブリケーション技術の展開と生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発、を行い医薬研究の底上げをする。

## B. 研究方法

### 安全性の高いヒト iPS 細胞の創出

本研究では、ゲノム導入されず、さらに細胞質内でも増殖しないバキュロウイルスベクターを使用することを iPS 細胞樹立に検討してきた。動物由来成分を排除した条件(ゼノフリー)条件で、iPS 細胞樹立を達成するために、下記の lipofectamine2000, Neon, Baculovirus (以上、life technologie)を用いた。ゼノフリー培養条件は、StemPro MSC XF( life technologies) を用いてヒト初代培養細胞株(Yub1896)を培養した。リプログラミング因子である 4 つの転写因子、Klf4、Oct4、Sox2、c-Myc を組み込んだベクターを構築し Oct4-Klf4-Sox2-cMyc となるシステムで細胞への導入実験を行う。(成育、ライフテクノロジーズ、癌研究所)

### 幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術を応用して細胞の足場の創成を行い、テンプレートに依存したヒト iPS 細胞の細胞応答性を解明する。2D デバイスのパターンニング開発をから新規的な足場を創成する。(成育、大日本印刷、日油) 生体適合材料として 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)の低吸着性に着目し細胞間応答に基づく液性細胞外基質としての MPC 研究開発からヒト iPS 細胞の性質を制御する培養空間を作成する。(成育、日油、大日本印刷)

### iPS 細胞のゲノム安定性の解析

ヒト iPS 細胞培養環境が in vivo 分化動態に与える影響の検討

ヒト iPS 細胞培養の要素が免疫不全マウスへ移植した後の分化動態に与える影響を解析する。これまでの前実験的にゼノフリー培養により分化効率が上がることを見出してきた。本研究では、移植前の培養環境が in vivo での分化動態に及ぼす影響を検討する。移植後継時的に観察しサンプル回収後、組織化学的解析により分化状態を解析する。酵素なしでも継代可能となるナノインテリジェント表面をもつ培養ディッシュでヒト iPS 細胞の培養維持性を検討する。ヒト iPS 細胞をナノインテリジェント器材で少なくとも 5 継代培養維持

を試み、培養細胞の性質評価を行う。(成育、ユニテック、セルシード、癌研究所、横浜市立大学、DNA チップ研、慶應大学)

### 分化誘導に優れた足場の開発

分化誘導を制御するテンプレート開発を行う。分化制御の質は、構築できる分化細胞がどれだけ均一なものを遺伝子発現やタンパク質レベルの特異的マーカー解析により行う。均一性に関しては、70%以上の効率で目的分化細胞が獲得できることを目指す。(成育、日油、大日本印刷)  
(実験動物に対する動物愛護上の配慮)

各参画機関の動物実験の指針を遵守し、動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに実施する。と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。

国立成育医療センター研究所動物実験規程

<http://www.nch.go.jp/anim/animalkitei.htm>

国立成育医療センター動物実験に関する指針

<http://www.nch.go.jp/anim/animalshishin.htm>

(倫理面への配慮)

### ヒト細胞に対する倫理面への配慮-iPS 細胞の樹立に用いるヒト細胞

国立成育医療研究センター研究所においては、ヒト細胞に関し、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する。

国立成育医療研究センター倫理審査委員会

<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>

## C. 研究結果及び考察

### 安全性の高いヒト iPS 細胞の創出

検討したほぼ全ての導入方法に関して、ゼノフリー環境下での遺伝子導入は極めて困難であった。Lentiviral system と Baculovirus が遺伝子導入が可能であった。しかし、BacMam-OKSM では細胞内への遺伝子導入効率が非常に低く、体細胞のリプログラミングを引き起こすことはできないことから、今後様々な応用性が検討されることから、遺伝子導入ベクター並びに装置に関しても、そのプロトコールも含め検討する必要がある。

### 幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術により作成した丸パッチパターン化培養基板での細胞外マトリックス相互性を解析した結果、極めて良好に未分化性が維持できる条件を見出した。さらに、マイクロファブリケーション技術により作成した丸パッチパターン化培養基板での細胞外マトリックス相互性を解析し

た。パターン化培養器材を応用することにより、特定の分化誘導に対して指向性を誘導できることを見出ししてきた。リビジュアを使用することによって、EB 作成が安定的に行うことが可能であった。樹立したヒト多能性幹細胞で三胚葉分化を支持する有用なデバイス基盤となることが示された。

#### iPS 細胞のゲノム安定性の解析

国立成育医療研究センターで樹立したヒト iPS 細胞を用いて、免疫不全マウス皮下へ移植し 8 週間後に腫瘍発生を確認後組織解析を行った。外胚葉・内胚葉・中胚葉の各組織へ分化していることが細胞形態的および免疫組織染色により確認ができた。今後の課題としては、移植後奇形腫形成過程において時間軸でみて未熟組織成分の割合がどの程度低下していくのか、その割合には三胚葉間で指向性があるのかを検討する必要がある。種々のナノインテリジェントディッシュの継代酵素フリー培養を検討した結果、良好に培養出来ることを見出した。細胞株間による若干の反応性の差があることも判明し、グローバルな培養方法を開発していくリード的な要素を見出すことができた。

#### 分化誘導に優れた足場の開発

細胞が主体となる生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発特に、分化移行環境では、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた底面加工非接着系培養プレートにより、これまで胚様体形成分化誘導が不安定であったヒト iPS 細胞が安定的に効率よく胚様体形成が可能となり、網膜色素上皮や消化管組織等へ再現性をもって分化組織を構築することができた。

#### D. 考察

広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入でき、しかもゲノムインテグレーションフリーのバキュロウイルスシステムを基盤とした新しい遺伝子導入ベクター

(BacMam)を開発してきた。BacMam-EGFP によるヒト初代細胞株に対して行った GFP 遺伝子導入実験では、非常に効率に遺伝子を導入することが可能であり、導入された遺伝子は GFP の発色によりタンパク質レベルにおいて機能的に働くことが強く示唆された。一方、ヒト iPS 細胞の樹立に必要なリプログラミングファクター

(Oct4-Klf4-Sox2-cMyc)を組み込んだ

BacMam-OKSM の導入実験では、リプログラミング化を引き起こすことは不可能であった (H22 年度報告)。ゼノフリー下での今度進展する培養技術に対応する遺伝子導入法の開発を進める必要がある。

ヒト iPS 細胞は適切な細胞外マトリックスを選択することによりフィーダー細胞フリーで未分化

維持をすることが可能であった。ファブリケーション技術により細胞接着域を制御することで空間への細胞増殖を誘導することが示唆された。多能性幹細胞は、その極めてユニークな性質から基礎生命科学のみならず、再生医療、創薬、薬剤毒性検定等次世代の医療としても大いに期待されている。しかし、現在世界的に標準化されている方法においては改善されるべきポイントが存在する。1) 2D 培養システムでの幹細胞ゲノム不安定性、2) 分化誘導細胞の不完全な機能獲得、3) 異種由来物の因子した培養システム、であり幹細胞の実用化を促進するためには早急に対応しなければならない。本研究は、細胞外マトリックスとしてマイクロファブリケーション技術による上記 1) 及び 2) に対する効果的な scaffolds の開発を行い、より簡便な幹細胞デバイスを提供することにより幹細胞研究の底上げに貢献する。

ヒト ES 細胞と iPS 細胞を区別する遺伝子発現群が存在する。遺伝子発現とヒト多能性幹細胞の性質を比較検討することで、性質を予測する分子マーカー等の開発研究の基盤データとする。さらに、iPS 細胞は由来する細胞毎に遺伝子発現グループが分けられる。iPS 細胞のリプログラミングに由来細胞のエピジェネティック状態を一部残すことが示唆され、今後遺伝子発現に加えエピジェネティック制御と幹細胞性質を関連させることでヒト多能性幹細胞性質を決定付ける分子メカニズムを明らかにしていく。

ヒト iPS 細胞の応用には、長期培養工程が必須であり、造腫瘍性とも密接に関連する細胞のゲノム安定性は品質管理の最重要項目の 1 つである。今回、クローン間で細胞のゲノム・エピゲノム情報の維持に必要な細胞周期チェックポイント機構の作動状態が多少異なることが示された。このことは、iPS 細胞を今後医療応用する際には、作成した iPS 細胞の中から細胞周期チェックポイント機構がより完全な状態で保たれている細胞クローンを選択することが必要であることを強く示唆している。今後より高品質の iPS 細胞を選択する方法の開発が必要になってくると予想される。

#### E. 結論

樹立の段階から幹細胞の安全性及び品質を確保することは重要であり、iPS 細胞に関してはゲノム変異を伴わないことは幹細胞の安全性に大きく影響を与える。ゲノムインテグレーションフリーのバキュロウイルスシステムを基盤とした新しい遺伝子導入ベクターとして、複数因子の塩基配列を組み込んだエピソームベクターを含めたゲノムインテグレーションフリーの遺伝子導入法の開発の必要性がある。

マイクロファブリケーション技術により細胞