

E. 結論

- 1) 日本人の臍帯由来 HUVEC 細胞や角化細胞の分譲システム網を複数の倫理審査委員会での承認を経て確立し、HS バンクに提供することができた。
- 2) 日本でのヒト試料等の所有権・支配権については、試料等を提供する由来者、それを研究利用する研究者および医療関係者が連携・連帯する中で、研究者の免責だけではなく、由来者の保護につながるオープンエンドの状態を得るためには研究者の責務について考える必要がある。
- 3) 民間企業が日本人ヒト組織を利用する際の倫理的な書類の整備が必要である。
- 4) 組織から得られた細胞の状態が良好ではなく、細胞増殖や正常な 3 次元構造を再現しなかった。組織からの細胞分離方法の課題が明らかになった。
- 5) 上記の理由から、角化細胞を用いて、種々の検討を行ったが、人種差を明らかにするには、個人差も考慮してより多くの試料を用いた検討が必要と判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takezawa T, Aoki S, Oshikata A, Okamoto C, Yamaguchi H, Narisawa Y, Toda S. A novel material of high density collagen fibrils: a collagen xerogel membrane and its application to transplantation in vivo and a culture chamber in vitro. in *The Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials*, Monduzzi Editore International Proceedings Division, MEDIMOND, Italy, 2012, pp. 181-185.
- 2) 増井徹 ヒトを対象とする研究の倫理：ヘルシンキ宣言の改訂の意味するもの「生命科学・医学と法・生命倫理－生命倫理基本法に向けて－」編集：位田隆一/ドナルド・チャルマーズ，印刷中
- 3) Masui, T. The Integrity of Researchers in Japan: Will Enforcement Replace Responsibility? Promoting Research Integrity in a Global Environment, Tony Mayer and Nicholas Steneck, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012
- 4) 増井徹訳、「英国国立がん研究所 研究のための試料と情報：利用方針作成のための雛形」、(National Cancer Research Institute, Sample and Data for Research: Template for Access Policy Development, June 2009) 2011 英日対訳版

2. 学会等発表

- 1) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
- 2) 小島 肇：安全性評価のための in vitro 試験法を確立するために何をなすべきか、日本組織培養学会第 84 回大会、成育医療センター (2011.5)
- 3) 竹澤 俊明「ビトリゲルチャンバーあるいは組織切片を用いて、ヒトに於ける化学物質の ADMET を外挿する培養技術の開発状況」日本組織培養学会第 84 回大会 (国立成育医療研究センター、2011 年 5 月 27 日) 口頭発表；要旨集 p.70-71
- 4) 竹澤 俊明、青木 茂久、岡本 愛、山口 宏之、成澤 寛、戸田 修二「高密度コラーゲン線維の新素材：コラーゲンビトリゲルの乾燥膜と培養チャンバー」第 43 回 日本結合組織学会学術大会 (別府ビーコンプラザ、2011 年 6 月 11 日) 口頭発表；プログラム・抄録集 p.88
- 5) Toshiaki Takezawa, Shigehisa Aoki, Ayumi Oshikata, Chika Okamoto, Hiroyuki Yamaguchi, Yutaka Narisawa, and Shuji Tada. A novel material of high density collagen fibrils: A collagen xerogel membrane with an excellent handling ability prepared by drying a collagen vitrigel membrane on a parafilm and its application to transplantation in vivo and a culture chamber in vitro. 24th European Conference on Biomaterials (ESB DUBLIN 2100) (The Convention Center Dublin, 2011 年 9 月 7 日) ポスター発表；PROGRAM p.831
- 6) 岡本 愛、濱中 祥弘、渡邊 昌俊、竹澤 俊明「コラーゲンビトリゲルの創薬への応用：コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを利用した ADMET 解析に有用な 3 次元培養モデルの構築構想」第 84 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、2011 年 9 月 24 日) ポスター発表；要旨集(CD-ROM)
- 7) 竹澤 俊明「コラーゲンビトリゲル(高密度コラーゲン線維の新素材)の開発とその再生医療、創薬および動物実験代替法の研究分野への応用状況」シンポジウム「ナノ・バイオマテリアルと生化学」第 84 回日本生化学会大会 (国立京都国際会館、2011 年 9 月 24 日) 口頭発表；要旨集(CD-ROM)
- 8) 濱中 祥弘、岡本 愛、渡邊 昌俊、竹澤 俊明「コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト血管内皮組織シートのバリア機能」第 132 回日本薬学会年会 (北海道大学、2012 年 3 月 29 日) ポスター発表；要旨集(CD-ROM)

- 9) 増井徹 「ヒトゲノムの詳細解析研究のもたらすもの—プライバシー、個人情報保護、ゲノム指針改訂、保因者情報—」当該課題の背景について ゲノムテクノロジー164 委員会 第38回勉強会 東京 2012年2月14日
- 10) 増井徹 「ヒトの生物学としての医学研究」BBJELSI 委員会 東京 2011年12月27日
- 11) 増井徹 「疾患バイオリソース・バンク事業の現状と課題」国立精神・神経医療研究センター TMC開所記念講演 2011年11月22日
- 12) Tohru Masui “Observing Biobanks” Biobanks and Patients, Tokyo univ. 2011, 11, 13
- 13) 亀岡洋祐, 高橋一郎, 坂手龍一, ○増井徹 「難治性疾患克服のための難病研究資源バンクの開発研究」 難病研究と創薬 2011, 千里ライフサイエンスセンター 2011年10月16日
- 14) Tohru Masui “On the discussion of the revision of Ethical Guidelines for Human Genome/Gene Analysis Research” The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya 2011, 10, 5
- 15) 増井徹 「研究資源としての「バイオバンク・ジャパン」—研究基盤の持つ意味—」バイオバンクジャパンの全貌—その可能性と未来, 東京 2011年10月2日
- 16) Tohru Masui “What’s mine is my own? What’s mine is yours?” INSERM, Toulouse, France 2011, 9, 15
- 17) 増井徹, 亀岡洋祐 「難治性疾患研究資源バンクの取り組みについて」 理研セミナー 難治性疾患の克服に向けて, 東京国際フォーラム 2011年7月10日
- 18) 増井徹 「副腎資源バンクの今後の展開」 難治性副腎疾患シンポジウム, 東京国際フォーラム 2011年7月2日
- 19) 増井徹, 亀岡洋祐 「難治性疾患克服のための難病研究資源バンクの開発研究」 難病バンクセミナー, 国立保健医療科学院 (和光市) 2011年6月27日
- 20) 増井徹, 小門穂 「病気に立ち向かう—市民と研究者の理解のもとに」 日本組織培養学会第84回大会公開シンポジウム, 国立成育医療研究センター (東京) 2011年5月28日
- 21) 増井徹 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理指針の改訂に臨んで: 課題について」 日本組織培養学会第84回大会, 国立成育医療研究センター (東京) 2011年5月27日
- 22) 増井徹 「バイオバンキング: サンプル収集事業の設計における政策と倫理」 遺伝医学合同学術集会 2011, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 京都大学 2011年5月6日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

小児成長疾患に対するトランスレーショナルリサーチ における技術的基盤の創成

所 属 独立行政法人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 宮戸 健二
研究期間 平成21年4月～平成24年3月

研究要旨 ヒト間葉系細胞が培養条件下で腫瘍化する可能性は現在のところ除外できない。そこで本研究では、間葉系細胞移植法の確立のための基盤的研究として、各種の遺伝子発現、核型解析からの細胞ソースの選別、規格検定法の確立をめざした研究を行った。

研究分担者

- (1) 牧野雄一 旭川医科大学医学部 講師
(2) 富田正浩 株式会社 免疫生物学研究所

A. 研究目的

本研究は、ヒト間葉系細胞から分化誘導させた細胞を培養し、安全かつ倫理的な問題のないドナー細胞を得ることを目的としたものである。本研究で得られた技術を用いることで、必要となった時に保存された自己細胞からドナー細胞が得られ、自己由来の組織を用いた理想的な細胞移植が実現できると考えられる。

間葉系細胞を用いた細胞移植は、臓器移植に代わる新たな治療法として注目されており、一部ではすでに臨床応用が開始されているが、治療法自体の安全性、使用する細胞の特徴と規格、治療結果の評価方法などの問題の未解決な問題が残されている。そこで本研究では、再生医療の効果的かつ安全な実施への応用を目指したヒト間葉系細胞の培養技術・特性解析などの基盤情報整備を行うことを目的として研究を推進する。具体的には、1) 培養法・維持法の標準化、2) 規格化、安全性評価 3) 治療基盤の確立を目標として設定した。本研究の目的は間葉系細胞の移植治療法の確立である。これを実現するための基盤的研究として、ヒト間

葉系細胞の適切な培養法および分化誘導法の確立を目指した研究を行う。本研究から得られる成果は、再生医療材料の産業化を目指す企業の安全性指針となり、医薬品・医療機器総合機構の審査にも活用され、今後の再生医療実用化促進への大きな牽引力となることが予想される。

B. 研究方法

1) 異種動物成分を排除し、ヒト型成分に特化した培養法・維持法の標準化

われわれは今までに、ヒト間葉系細胞を含む10種類以上の組織を供給源として、多数の間葉系細胞株を樹立してきた。更に数種類の組織に対しても新たな間葉系細胞の分離・培養を行った。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発をめざした。ヒト間葉系細胞の培養維持にはフィーダー細胞は必要ないものの、細胞を増殖させるためには各種の細胞増殖因子添加と、特定の細胞外マトリックスで覆われた培養シャーレを使う必要がある。それらの種類と供給方法、保存方法についても検討を加えた。本研究では、主に遺伝子導入カイコ（以下、トランスジェニックカイコ）を用いて、カイコの幼虫が蛹に変態する際に作る繭に、ヒトI型コラーゲン aI 鎖

を特異的に高発現させることによって精製された高純度のタンパク質（免疫生物学研究所、作製）を用いて研究を行った。

2) 細胞の規格化・安全性評価

得られたヒト間葉系幹細胞に対して、網羅的遺伝子発現解析（Affymetrix 社 GeneChip による解析）ならびにモノクローナル抗体を用いた既知のタンパク質の発現解析を行った。使用するモノクローナル抗体は、ヒト ES 細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/-4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含む。また、新たなモノクローナル抗体作成による新規分子探索も開始した。アポトーシス関連分子についても、既知分子について遺伝子発現解析を行った。

3) 治療基盤の確立

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1) カイコ繭から抽出したヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：フィーダー細胞の培養

ヒト由来のES細胞およびiPS細胞の培養には繊維芽細胞などの細胞をフィーダー細胞として用いない培養システムが開発されているが、そういった培養システムを用いた場合であっても、フィーダー細胞の代用として、ゼラチン処理した細胞培養用シャーレを用いて培養することが、ヒトES細胞やiPS細胞の未分化性および細胞増殖能を維持するためには必要不可欠である。また、現在でも多くの場合は、フィーダー細胞を用いてES細胞やiPS細胞は培養されているのが現状である。

そこでまず、ES細胞およびiPS細胞を用いて培養条件などを検討する前段階として、フィーダー細胞となるヒト繊維芽細胞の培養を行い、その有用性を検討した。具体的には、カイコ繭から精製された凍結乾燥されたヒト I 型コラーゲン α I 鎖（免疫生物学研究所、作製）の細胞培養における細胞の形質維持における有用性を検討した。

フィーダー細胞としては、ヒト皮膚由来繊維芽細胞HSF（KURABO社製）を用いた。細胞培養の状態については、細胞の伸張程度を指標にして、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性を検討した。比較の対象として、市販されている牛胎児由来および豚由来コラーゲンを用いた。結果として、市販されている非ヒト動物由来コラーゲンと比較して、細胞の伸張程度について同等の結果を得ることができ、カイコ由来のヒト I 型コラーゲン α I 鎖がフィーダー細胞の培養に関して有用であることがわかった。

2) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：ES細胞を用いた検討

ここでは、ヒト由来のES細胞と未分化性および多分化能において同等の能力をもっていることが知られているカニクイザル由来ES細胞を用いて検討を行

った。また、フィーダー細胞としてはマウス胎児由来の繊維芽細胞を用い、培養にはヒトI型コラーゲン α I鎖(免疫生物学研究所、作製)でコーティング処理した細胞培養用シャーレを用いた。比較対照として、ブタ由来コラーゲンでコート処理した細胞培養用シャーレを用いた。

カニクイザル由来のES細胞はブタ由来コラーゲンを用いて培養した場合は、良好なコロニーを形成した。一方、ヒトI型コラーゲン α I鎖でコーティング処理した培養用シャーレを用いた場合でも、同様に良好な形態を維持したコロニーが形成された。しかも、20継代以上にわたって形態的に未分化性を維持したままの状態でも良好に培養維持が可能であった。以上の結果は、ヒトI型コラーゲン α I鎖はヒトES細胞の未分化性を維持するのに十分な活性を有していることが予測され、一般的に用いられている非ヒト動物由来コラーゲンと比べても同等の活性を有していることを示唆している。

3) ヒトI型コラーゲン α I鎖の有用性の検討:ES細胞での未分化マーカーの発現解析

形態的には、ヒトI型コラーゲン α I鎖が、従来から用いられている非ヒト動物由来コラーゲン成分(ブタ由来コラーゲン)と比べて、ES細胞の培養維持に対して同等の活性を有していることが示されたことから、更に、ES細胞が未分化な状態に維持されている証拠を提示するために、ES細胞において特異的に発現するタンパク質および糖鎖について検討を行った。検討したのは、未分化性維持において重要な役割を果たしていることが知られている核タンパク質(OCT-3/4、NANOG、SOX2)、未分化な細胞又は胚性幹細胞にのみ存在する表面分子TRA1-81、ヒトES細胞の未分化マーカーの一つで、糖脂質の一種であるSSEA-4である。そこで、それぞれ免疫染色法によって発現を調べた。

結果として、それぞれの因子は、標準化された方

法で培養されたカニクイザル由来のES細胞と、何ら異なることない発現および局在を示すことが確認された。この結果は、ヒトI型コラーゲン α I鎖でコートされた細胞培養シャーレを用いた場合でもES細胞の未分化性が良好に維持されていることを示している。

4) ヒトI型コラーゲン α I鎖の有用性の検討:免疫不全マウスへの移植による多分化能の検討

生体内において、ES細胞が様々な細胞に分化できる多分化能を維持している証拠を提示するため、免疫不全マウスを用いて、さらに検討を行った。多分化能を有していることは、ES細胞を様々な細胞(内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の組織)に分化させることで調べることができる。培養系を用いても、様々な増殖因子、分化因子などを培養液中に添加することによって神経細胞や心筋細胞に分化させることが可能である。しかし、培養条件下では、生体内とは異なるため、生体内に移植した場合の分化能を検討する必要がある。そこで、最も簡便で信頼される方法としては、免疫不全マウスの皮下に細胞を移植する方法がある。免疫不全マウスへの移植によっては、生体内で様々な組織の集合体としてのテラトーマを形成するかどうか、どういった組織が形成されたか、を組織学的に検討することが可能である。ここでは、免疫不全マウスとしてSCIDマウスを用いた検討を行った。

SCIDマウスの皮下にヒトI型コラーゲン α I鎖を用いた細胞培養から得られたカニクイザル由来のES細胞を移植したところ、テラトーマが形成され、内胚葉、中胚葉、外胚葉由来のすべての分化した組織が組織学的に確認された。以上の結果から、カイコ繭から精製されたヒトI型コラーゲン α I鎖でコート処理した細胞培養用シャーレで培養されたカニクイザル由来ES細胞は、従来の非ヒト動物性コラーゲンを用いた培養方法と同等の未分化性が維持され、E

S細胞の多分化性が維持されることを確認することができた。

5) ヒト間葉系細胞の培養における標準化マーカーの開発：遺伝子発現解析

臍帯血・胎盤・子宮内膜・余剰指といった従来は破棄されてきた組織に着目した結果、これらの組織から豊富な分化・増殖能をもった間葉系細胞を得ることができることが我々を含めた最近の研究からわかってきた。そういった廃棄される運命にあった細胞を用

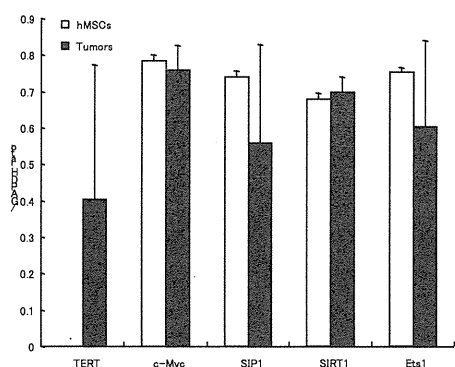


図1 TERTおよびTERT発現調節因子群の発現解析（間葉系細胞と腫瘍細胞での比較）

点で、従来の臓器移植に比べて有利である。しかし、ヒト間葉系細胞が培養工程によって性質を変化させてしまう可能性、更に腫瘍化してしまう可能性については、有用なマーカーおよび検出方法が確立されていないことから、除外できないのが現状である。そこで本研究では、ヒト間葉系細胞の遺伝子発現をリアルタイムqPCR法によって100以上の検体について検討した。

ヒト間葉系細胞だけでなく、細胞が腫瘍化する場合は、まず最初に不死化する。その際に染色体の末端構造（テロメア）を伸張させることにより、染色体の末端領域からの変性を防ぐことが必須である。

テロメアを伸張させる酵素として、TERTが知られている。そこで、TERTとその発現調節因子について特に着目した。今回、発現を検討した遺伝子は（1）染色体末端伸長因子および細胞不死化の中心的因子であるテロメラーゼであるテロメラーゼ（以下、TE

RT）とその発現制御因子（c-Myc、Ets1、SIP1、SIRT1&2）、（2）酸素応答性転写因子HIF-1とHIF3 α および制御因子であるHts2、PIN1、（3）癌抑制遺伝子p53、（4）細胞の寿命制御因子p16INK4A、（5）胚性幹細胞（ES細胞）やiPS細胞の未分化性維持に重要なOct3/4およびKlf4、（6）内部コントロールとして、

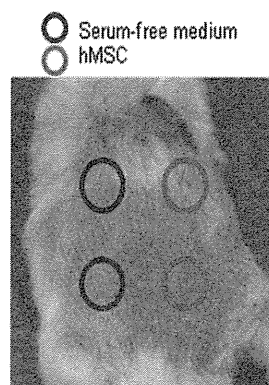


図2 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

細胞を用いることは、ドナーに侵襲をとまわずに細胞医療が行われる

点で、従来の臓器移植に比べて有利である。しかし、ヒト間葉系細胞が培養工程によって性質を変化させてしまう可能性、更に腫瘍化してしまう可能性については、有用なマーカーおよび検出方法が確立されていないことから、除外できないのが現状である。そこで本研究では、ヒト間葉系細胞の遺伝子発現をリアルタイムqPCR法によって100以上の検体について検討した。

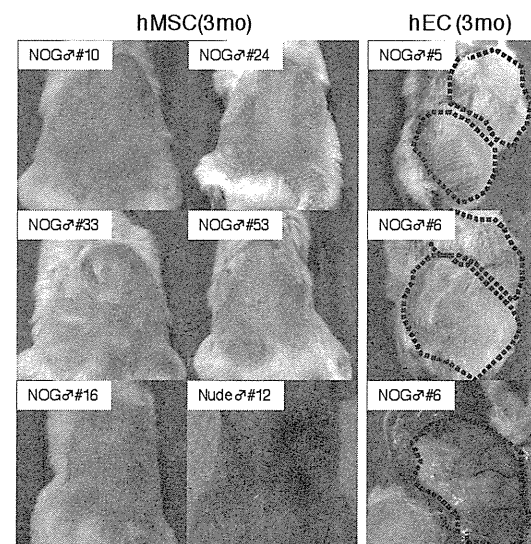


図3 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

β -actinとGAPDH、である。

検討を行ったサンプル数は骨髄由来の間葉系細胞、臍帯由来の間葉系細胞、更に小児由来の間葉系細胞、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞、TERT遺

伝子発現ベクターを導入したヒト間葉系細胞であ

った。

遺伝子発現を調べた結果、TERTは、発現量に差はあるものの、すべての陽性コントロール（腫瘍細胞）で発現が確認され、TERT関連遺伝子（Ets, c-Myc, Sir2, SIP1）もまた、TERTの発現量に関わらず何れの細胞でも同レベルの発現を確認した（図1）。一方、ヒ

ト間葉系細胞では、すべての細胞でTERTの発現が検出感度以下であった(図1)。TERT関連遺伝子(Ets, c-Myc, Sir2, SIP1)については、陽性コントロールと同様に、TERTの発現に関わらず何れの細胞でも同程度の発現を確認した(図1)。継代によるTERT遺伝子の発現の変化は認められなかった。更に、TERTcDNAを組み込んだプラスミドを用いて検出感度を算出したところ、今回用いた方法では細胞に含まれる20コピーのTERT転産物を検出できることがわかった。以上の結果は、ヒト間葉系細胞にはTERTの転写産物が19コピー以下であることを示しており、TERT遺伝子が発現していないことを示している。TERTの転写産物が検出されないことは予想外であったが、腫瘍化に

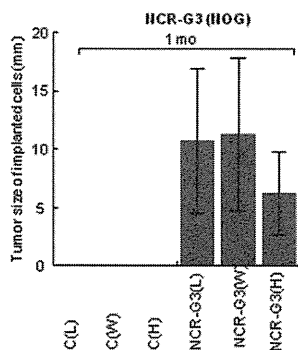


図4 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

NK4Aは、ヒト間葉系細胞でも、腫瘍細胞でも、同程度の発現が検出された。また、ES細胞などの未分化維持に必要なOct3/4とKlf4については、検出限界を超えて弱く発現しているヒト間葉系細胞も認められたが、細胞ソース、継代数との関連性は認められなかった。それに対して酸素応答性転写因子の一つであるHIF1はどの細胞でも発現が確認されたが、HIF3 α はTERTと同様に、ヒト間葉系細胞では発現が検出感度以下であった。一方腫瘍細胞では発現は認められた。この点も、HIF3 α とTERTの発現は同様の傾向を示した。

先立つ細胞の不死化の指標として、ヒト間葉系細胞ではTERTの発現の有無が有力な指標になることが示された。

TERTとその制御因子以外の遺伝子についても有用な結果が得られた。p53やp16I

以上のことから、TERTとHIF3 α の2つの遺伝子の発現の有無がヒト間葉系細胞の腫瘍化に先立つ不死化の有力な指標になることがわかった。すなわち、遺伝子発現についての検討を行った結果、細胞の培養

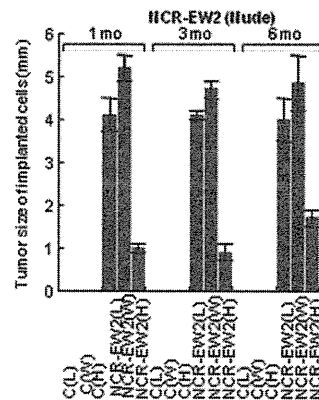


図5 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

工程での腫瘍化の懸念を排除できるようなマーカー遺伝子の候補、具体的には、正常細胞ではリアルタイムqPCRによって発現が確認できず、腫瘍化に伴う細胞の生理的変化に応

じて発現が認められるようになるヒト遺伝子を、少なくとも2つ(TERTとHIF3 α)、同定することができた(特許出願中)。

6) ヒト間葉系細胞の有用性の検討: 免疫不全マウスへの移植による造腫瘍性の検討

次に、ヒト間葉系細胞の造腫瘍性について、ヒト間葉系細胞を2種類の免疫不全マウス(NOGマウス、Nudeマウス)へ移植後、1カ月、3カ月、6カ月経過した時点での腫瘍サイズを測定した。移植に用いた細胞は、骨髄由来の間葉系細胞、小児由来の間葉系細胞、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞(NCR-G1, G3, G4, NCR-EW2)、TERT遺伝子発現ベクターを導入した間葉系細胞株(UE6E7T-11, UE7T-13)であった。

方法としては免疫不全マウスの背側の皮下に陰性コントロールとしてそれぞれ2か所に血清無添加培地(左側)とヒト間葉系細胞(右側、 5×10^6 個)をマトリジェルと共に移植した(図2、3)。

結果として、陽性コントロールとして用いた小児腫瘍由来 NCR-EW2 細胞を移植した NOG マウスは 1 週間程度で死んでしまい十分に評価できなかったが (図 4)、ヌードマウスでは、移植後 1 カ月経過した時点で腫瘍形成が確認できた (図 5)。以上の結果は実験系が成立しており、腫瘍形成の評価が可能であることを示している。

一方、ヒト間葉系細胞を移植したヌードマウスでは、異常な免疫反応が誘導されることによって移植部位に細胞の塊が形成されたものの (1 カ月後)、その後、消失した (3 カ月、6 カ月後) (図 6)。

また、TERT 発現ベクターを導入したヒト細胞 (UEBE6E7T) を移植した NOG マウスでは、6 カ月経過した時点で腫瘍形成が確認された (図 7)。この結果は、TERT を発現させただけでも腫瘍形成につながることを示しているが、マウスでの 6 カ月はヒトの 20 年間に相当するため、腫瘍化する可能性は限りなく低いことを示している。これに対して、NOG マウスでは、ヒト間葉系細胞による腫瘍形成

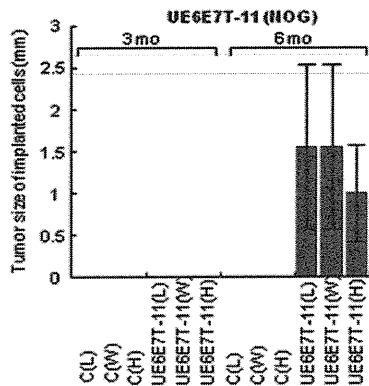


図7 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

ヒト間葉系細胞は腫瘍化する可能性が極めて低い細胞であることがわかった。また、たとえ TERT 遺伝子が発現したとしても、腫瘍化には非常に長い時間が必要であることも示された。

7) 低酸素応答性転写因子 HIF の新たな活性化機構

RNA干渉法を用いて作成したHIF-1aノックダウンC2C12筋管細胞 (Δ HIF C2C12筋管細胞)において、インスリンによる insulin receptor substrate-1 (IRS-1)、Akt/protein kinase B のリン酸化は、野生型のC2C12筋管細胞と同等に観察された。しかしながら、インスリン作用の指標であるインスリン依存性ブドウ糖取り込みは野生型細胞に比べ著明に減少していた。HIF-1aヘテロノックアウトマウスより摘出した骨格筋のインスリン依存性糖取り込みも、同様に野生型マウスに比べ減弱しており、組織・臓器レベルでのインスリン作用調節においてもHIF-1aが重要であることが示されたといえる。インスリンは IRS-1、PI3キナーゼを含む細胞内のリン酸化経路の活性化を介して、糖輸送担体 GLUT4 を細胞表面に移行させ細胞内にブドウ糖を取り込むが、 Δ HIF C2C12筋管細胞では GLUT4 の細胞膜移行が障害されていた。骨格筋細胞では、GLUT4 は潜在的に細胞質の小胞内に存在する。GLUT4 含有細胞質内小胞は、Rab-GTPase-activating protein (GAP) 活性を有する Akt substrate of 160kD (AS160) の作用により、定常状態では GDP 結合型となっており、細胞質内に留まっている。Akt により AS160 がリン酸化されると AS160 の Rab-GAP 活性が減弱し、GLUT4 含有細胞質内小胞は GTP 結合型となり細胞膜へ移行、融合し GLUT4 が細胞膜上に表出する。

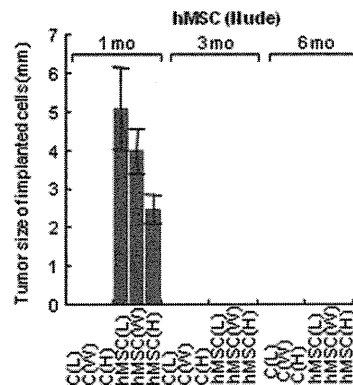


図6 ヒト間葉系細胞の免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能の検討

Δ HIF C2C12 筋管細胞では、インスリン刺激による AS160 のリン酸化が強く抑制されていた。す

なわち、PI3キナーゼの下流においてHIF-1 α はAktによる基質リン酸化の制御に関わる可能性を示す。

AktによるAS160リン酸化は、PI3キナーゼのみならずAMP-activated protein kinase (AMPK) によっても誘導される。

5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) は、AMPKを活性化しAS160リン酸化を誘導する薬剤であるが、 Δ HIF C2C12筋管細胞では、AICARによるAS160のリン酸化も抑制されることが判明し、やはりHIF-1 α がAkt基質のリン酸化反応の制御に関わることを示している。

一方、恒常的活性型HIF-1 α (CAHIF) を安定発現した筋管細胞 (CAHIF C2C12筋管細胞) では、正常酸素分圧下においても血管内皮増殖因子 (VEGF) をはじめとするHIF-1標的遺伝子発現が認められる。このCAHIF C2C12筋管細胞では、インスリン非存在下においてもAS160のリン酸化が認められた。さらに、Fe (II) のキレート作用を有する2,2'-dipyridyl (DP) は低酸素環境模倣剤として正常酸素分圧下でHIF-1 α を活性するが、DP処理により内因性HIF-1 α 発現を増強させた筋管細胞において、インスリン非存在下にAS160のリン酸化が観察された。

すなわち、骨格筋におけるHIF-1 α の活性化はAS160のリン酸化を促進することが示された。興味深いことに、インスリンは骨格筋細胞のHIF-1 α 発現を増強させる。シクロヘキシミドを用いた解析から、インスリンは蛋白質翻訳のレベルでHIF-1 α の発現を増強させた。

D. 考察

本研究の成果として、TERT 遺伝子の発現の有無はヒト間葉系細胞の腫瘍形成に向けた形質変化に関する有力な指標となることが示された。更に、免疫不全マウスの検討から、ヒト間葉系細胞は腫

瘍化する可能性が極めて低い細胞であることが明らかになった。また、染色異常を起こしたヒト間葉系細胞であつても腫瘍化しないことも示すことができた。

また、TERT 遺伝子だけでなく、酸素応答性転写因子である HIF3 α も細胞の不死化の有力な指標となることが明らかになったことから、ヒト間葉系細胞を細胞医療に用いる際に問題となっている細胞の腫瘍化については、その前段階である細胞の不死化の指標が、本研究の成果として同定されたことになる。

E. 結論

細胞移植治療における細胞ソースとして胎盤・臍帯血・月経血・子宮内膜といった組織由来の間葉系幹細胞を用いる試みは、大変ユニークなものである。その採取・樹立においてドナーへの侵襲がないため倫理的問題点が少なく、採取におけるコストが低いことは大きな利点である。これらの細胞ソースの特性を明らかにすることで、より安価で高品質な細胞供給体制の構築が可能となり、再生医療の実現化に向けて大きく前進することができる。本研究の成果として、細胞医療の実現に不可欠な結果を出すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, Fujita Y, Honjo J, Shimizu N, Makino Y, Haneda M. Tubular Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes Is Prevented by Metformin: A Possible Role of HIF-1 α ; Expression and Oxygen Metabolism. *Diabetes*. 60:981-992, 2011.

2) Isoe T, Makino Y, Mizumoto K, Sakagami H, Fujita Y, Honjo J, Takiyama Y, Itoh H, Haneda M. High glucose activates HIF-1-mediated signal

transduction via carbohydrate response element binding protein in glomerular mesangial cells

Kidney Int. 78: 48-59, 2010.

3) 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 were immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation Res.* 106:1613-23, 2010.

4) 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.* 34:280-8, 2010.

5) 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.* 106:860-70, 2010.

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

7) Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by

induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*, 221(2):335-42 (2009)

2. 学会発表 該当なし。

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

名称：細胞の造腫瘍性試験方法及び腫瘍マーカー

発明者：宮戸健二、梅澤明弘

出願番号：特願 2010-215828

3. その他 該当なし。

小児成長疾患に対するトランスレーショナルリサーチ における技術的基盤の創成

所 属 独立行政法人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 宮戸 健二

研究要旨 ヒト間葉系細胞が培養条件下で腫瘍化する可能性は現在のところ除外できない。そこで本研究では、間葉系細胞移植法の確立のための基盤的研究として、各種の遺伝子発現、核型解析からの細胞ソースの選別、規格検定法の確立をめざした研究を行った。

研究分担者

- (1) 牧野雄一 旭川医科大学医学部 講師
(2) 富田正浩 株式会社 免疫生物学研究所

A. 研究目的

本研究の目的は間葉系細胞の移植治療法の確立である。これを実現するための基盤的研究として、ヒト間葉系細胞の培養・分化誘導法の確立を目指した研究を行う。本研究から得られる成果は、再生医療材料の産業化を目指す企業の安全性指針となり、医薬品・医療機器総合機構の審査にも活用され、今後の再生医療実用化促進への大きな牽引力となることが予想される。

本研究は、ヒト間葉系細胞から誘導・分化させた細胞を培養し、安全かつ倫理的な問題のないドナー細胞を得ることを目的としたものである。本研究で得られた技術を用いることで、必要となった時に保存された自己細胞からドナー細胞が得られ、自己由来の組織を用いた理想的な細胞移植が実現できると考えられる。

間葉系細胞を用いた細胞移植は新たな治療法として注目を集めており、一部ではすでに臨床応用が開始されているが、治療法自体の安全性、使用する細胞の特徴と規格、治療結果の評価方法などの問題の解決は急務である。そこで、本研究では、再生医療の効果的かつ安全な実施への応用を

目指したヒト間葉系細胞の培養技術・特徴解析などの基盤情報整備を行うことを目的として研究を推進する。具体的には、1) 培養法・維持法の標準化、2) 規格化、安全性評価 3) 治療基盤の確立を目標として設定した。

B. 研究方法

1) 異種動物成分を排除し、ヒト型成分に特化した培養法・維持法の標準化

われわれは今までに、ヒト間葉系細胞を含む10種類以上の組織を供給源として、多数の間葉系細胞株を樹立してきた。そこで、更に数種類の組織に対しても新たな間葉系細胞の分離・培養を行った。その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発をめざした。ヒト間葉系細胞の培養維持にはフィーダー細胞は必要ないものの、細胞を増殖させるためには各種の細胞増殖因子添加と、特定の細胞外マトリックスで覆われた培養シャーレを使う必要がある。それらの種類と供給方法、保存方法についても検討を加えた。

2) 細胞の規格化・安全性評価

得られたヒト間葉系幹細胞に対して、網羅的遺伝子発現解析 (Affymetrix 社 GeneChip による解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知のタンパク質の発現解析を行った。使用するモノク

ローナル抗体は、ヒト ES 細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/-4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含む。また、新たなモノクローナル抗体作成による新規分子探索も開始した。アポトーシス関連分子についても、既知分子について遺伝子発現解析を行った。

3) 治療基盤の確立

本研究課題では、ヒト間葉系細胞の分化能検定システムの開発ならびに他の幹細胞による分化形質発現システムを通じた情報収集を行った。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物 (NOD/SCID/IL-2 受容体 $\gamma^{-/-}$) への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) カイコ繭から抽出したヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討：フィーダー細胞の培養

コラーゲンはヘリックス構造を有するタンパク質で医学や化粧品などの領域で使用されており、人体には毒性がないことが示されている。また、ES 細胞や iPS 細胞の培養に使用されるゼラチンはコラーゲン線維を熱変性させた状態のものであり、それらの細胞培養には必要不可欠であ

る。現在、一般に市販されているゼラチンはウシ胎児やブタ由来の非ヒト動物性コラーゲンを熱変性させたもので、非ヒト動物成分が含まれているため、基礎研究用の細胞培養には問題がないものの、細胞医療などの臨床応用に用いる際には、ヒトの体内に入った場合に免疫原となる可能性があることから、非ヒト動物成分を含まないゼラチンの開発が必要である。そこで本研究では、カイコを用いてヒトのコラーゲン線維の作製を行い、ヒト細胞の培養における適正を検討した。

免疫生物研究所 (株) は遺伝子導入カイコ (トランスジェニックカイコ) を独自に開発し、カイコ卵子に特定のタンパク質発現ベクターをマイクロインジェクションによって導入することにより、ヒトを含めた様々な生物種のタンパク質を発現するカイコ系統の樹立に成功している。カイコで組換えタンパク質を作製する利点として、カイコ繭に特異的に外来性タンパク質を発現させることによって、PBS 緩衝液に一昼夜浸すだけで、カイコ由来の成分を含まない高純度のタンパク質を簡便に精製できる点が挙げられる。さらに、転写のトランスアクチベーター発現ベクターと同時に外来性タンパク質発現ベクターをカイコに導入することにより、繭で大量に組換えタンパク質を作製することができるようになった。そこで本研究に先だって、免疫生物学研究所 (株) においてヒト I 型コラーゲン α I 鎖を繭に特異的に発現するトランスジェニックカイコを作製した。

カイコ繭に発現させたヒト I 型コラーゲン α I 鎖を CBB 染色と Western blot 解析により検討したところ、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の発現を確認した。次に、トランスアクチベーター発現ベクターを同時に導入したカイコ系統を作製したところ、目的のタンパク質の発現が増加することを確認した。そこで、トランスジェニックカイコの繭を一昼夜 PBS 緩衝液に浸すことによってタンパク質の精製を行ったところ、カイコ成分を含ま

ない高純度のヒト I 型コラーゲン α I 鎖を精製することに成功した。

ES 細胞および iPS 細胞の培養にはフィーダー細胞を用いないシステムも開発されているが、その場合でもゼラチン処理した培養用シャーレを用いる必要がある。また、現在でも多くの場合はフィーダー細胞を用いて ES 細胞や iPS 細胞は培養されている。そこで、ES 細胞および iPS 細胞を用いて培養条件などを検討する前段階として、フィーダー細胞となるヒト繊維芽細胞の培養を行い、その有用性を検討した。具体的には、カイコ繭から精製された凍結乾燥されたヒト I 型コラーゲン α I 鎖の細胞培養における細胞の形質維持における有用性を検討した。そこで、市販されているヒト皮膚由来繊維芽細胞 HSF (KURABO 社製) を用いて、細胞の伸張程度を指標にして、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性を検討した。比較の対象として、市販されている牛胎児由来および豚由来コラーゲンを用いた。

結果として、市販されている非ヒト動物由来コラーゲンに比べて、カイコ繭から精製したヒト I 型コラーゲン α I 鎖は低濃度の場合、細胞の伸張が劣る結果が出たものの、比較的高濃度 (5mg/ml) で用いた場合は従来から用いられているコラーゲンと同等の結果を得ることができた。以上の結果は、フィーダー細胞の培養には全く問題ないことを示している。

2) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討 : ES 細胞を用いた検討

ここでは、ヒト由来の ES 細胞と未分化性および多分化能において同等の能力をもっていると考えられているカニクイザル由来 ES 細胞を用いて検討を行った。また、フィーダー細胞としてはマウス胎児由来の繊維芽細胞を用い、培養にはヒト I 型コラーゲン α I 鎖でコーティング処理した培養用シャーレを用いた。比較の対照として、ブ

タ由来コラーゲンでコート処理した培養用シャーレを用いた。

カニクイザル由来の ES 細胞はブタ由来コラーゲンを用いて培養した場合は、良好なコロニーを形成した。一方、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖でコーティング処理した培養用シャーレを用いた場合でも、同様に良好な形態を維持したコロニーが形成された。しかも、20 継代以上にわたって形態的に未分化性を維持したままの状態的良好に培養維持が可能であった。以上の結果は、ヒト I 型コラーゲン α I 鎖はヒト ES 細胞の未分化性を維持するのに十分な活性を有しており、一般的に用いられている非ヒト動物由来コラーゲンと比べて同等の活性を有していることを示している。

形態的には、従来から用いられている非ヒト動物由来コラーゲン成分と同等の活性を有していることが示されたことから、更に、ES 細胞が未分化な状態に維持されていること証拠を提示するために、ES 細胞において特異的に発現するタンパク質および糖鎖について検討を行った。検討したのは (1) 未分化性維持において重要な役割を果たしていることが知られている核タンパク質 OCT-3/4、NANOG、SOX2、(2) 未分化な細胞又は胚性幹細胞にのみ存在する表面分子 TRA1-81、(3) ヒト ES 細胞の未分化マーカーの一つで、糖脂質の一種である SSEA-4、である。それぞれ免疫染色法によって発現を調べた。

結果として、標準化された方法で培養されたカニクイザル由来の ES 細胞と、何ら異なることない発現および局在を示すことが確認された。この結果は、ES 細胞の未分化性が良好に維持されていることを示している。

3) ヒト I 型コラーゲン α I 鎖の有用性の検討 : 免疫不全マウスへの移植による多分化能の検討

続いて、ES 細胞が様々な細胞に分化できる多

分化能を維持している証拠を提示するため、免疫不全マウスを用いて、更に検討を行った。多分化能を有していることは、ES細胞を様々な細胞（内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の組織）に分化させることで調べることができる。培養系を用いても、様々な増殖因子、分化因子などを培養液中に添加することによって神経細胞や心筋細胞に分化させることができるが、最も簡便で信頼される方法としては、免疫不全マウスの皮下に細胞を移植して、(1) 生体内でテラトーマを形成するかどうか、(2) どういった組織が形成されたか、を組織学的に検討する方法がある。ここでは、免疫不全マウスとして SCID マウスを用いた検討を行った。

結果として、SCID マウスの皮下にヒト I 型コラーゲン α I 鎖を用いた細胞培養から得られたカニクイザル由来の ES 細胞を移植したところ、テラトーマが形成され、内胚葉、中胚葉、外胚葉由来のすべての分化した組織が組織学的に確認された。以上のことから、カイコ繭から精製されたヒト I 型コラーゲン α I 鎖をコート処理した培養用シャーレで細胞培養されたカニクイザル由来の ES 細胞は、細胞培養によって、従来の非ヒト動物性コラーゲンを用いた培養方法と同等に未分化性が維持され、多分化性を有していることが確認できた。

7) ヒト間葉系細胞の培養における標準化マーカーの開発：遺伝子発現解析

臍帯血・胎盤・子宮内膜・余剰指といった従来は破棄されてきた組織に着目した結果、これらの組織から豊富な分化・増殖能をもった間葉系細胞を得ることができることが我々を含めた最近の研究からわかってきた。そういった廃棄される運命にあった細胞を用いることは、ドナーに侵襲を伴わずに細胞医療に用いることが可能な細胞を得ることができる点で有利である。しかし、ヒト間葉系細胞が培養工程によって変性する可能性、更に腫瘍化してしまう可

能性については除外できないのが現状である。そこで、本研究では、ヒト間葉系細胞の遺伝子発現をリアルタイムqPCR法によって多検体（100検体以上）について検討した。

今回、発現を検討した遺伝子は (1) 染色体末端伸長因子および細胞不死化の中心的因子であるテロメラーゼであるテロメラーゼ（以下、TERT）とその発現制御因子（c-Myc、Ets 1、SIP1、SIRT1&2）、(2) 酸素応答性転写因子HIF-1とHIF3 α および制御因子であるHts2、PIN1、(3) 癌抑制遺伝子p53、(4) 細胞の寿命制御因子p16INK4A、(5) 胚性幹細胞（ES細胞）やiPS細胞の未分化性維持に重要なOct3/4およびKlf4、(6) 内部コントロールとして、 β -actin とGAPDH、である。

ヒト間葉系細胞だけでなく、細胞が腫瘍化する場合は、先立って不死化する必要があり、その際に染色体の末端構造（テロメア）を伸張させることにより、染色体の末端領域からの変性を防ぐことが必須である。テロメアを伸張させる酵素として、TERTが知られている。そこで、TERTとその発現調節因子について特に着目した。検討を行ったサンプル数は骨髓由来の間葉系細胞、臍帯由来の間葉系細胞、更に小児由来の間葉系細胞、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞、TERT遺伝子発現ベクターを導入したヒト間葉系細胞であった。

遺伝子発現を調べた結果として、TERTは、発現量に差はあるものの、すべての陽性コントロール（腫瘍細胞）で発現が確認され、TERT関連遺伝子（Ets, c-Myc, Sir2, SIP1）もまた、TERTの発現量に関わらず何れの細胞でも同程度の発現を確認した。一方、ヒト間葉系細胞では、すべての細胞でTERTの発現が検出感度以下であった。TERT関連遺伝子（Ets, c-Myc, Sir2, SIP1）については、陽性コントロールと同様に、TERTの発現に関わらず何れの細胞でも同程度の発現を確認した。また、継代によるTERT遺伝子の発現の上昇は認められなかった。更に、TERTcDNAを組み込んだプラスミドを用いて検出感度を算出したところ、

今回用いた方法では細胞に含まれる20コピーのTERT転産物を検出できることがわかった。以上の結果は、ヒト間葉系細胞にはTERTの転写産物が19コピー以下であることを示しており、TERT遺伝子が発現していないことを示している。TERTの転写産物が検出されないことは予想外であったが、腫瘍化に先立つ細胞の不死化の指標として、ヒト間葉系細胞ではTERTの発現の有無が有力な指標になることが示された。

TERTとその制御因子以外の遺伝子についても有用な結果が得られた。p53やp16INK4Aは、ヒト間葉系細胞でも、腫瘍細胞でも、同程度の発現が検出された。また、ES細胞などの未分化維持に必要なOct3/4とKlf4については、検出限界を超えて弱く発現しているヒト間葉系細胞も認められたが、細胞ソース、継代数との関連性は認められなかった。それに対して酸素応答性転写因子の一つであるHIF1はどの細胞でも発現が確認されたが、HIF3 α はTERTと同様に、ヒト間葉系細胞では発現が検出感度以下であった。一方腫瘍細胞では発現は認められた。この点も、HIF3 α とTERTの発現は同様の傾向を示した。

以上のことから、TERTとHIF3 α の2つの遺伝子の発現の有無がヒト間葉系細胞の腫瘍化に先立つ不死化の有力な指標になることがわかった。すなわち、遺伝子発現についての検討を行った結果、細胞の培養工程での腫瘍化の懸念を排除できるようなマーカー遺伝子の候補、具体的には、正常細胞ではリアルタイムqPCRによって発現が確認できず、腫瘍化に伴う細胞の生理的変化に応じて発現が認められるようになるヒト遺伝子を、少なくとも2つ(TERTとHIF3 α)、同定することができた(特許出願中)。

8) ヒト間葉系細胞の有用性の検討：免疫不全マウスへの移植による造腫瘍性の検討

次に、ヒト間葉系細胞の造腫瘍性について、ヒト間葉系細胞を2種類の免疫不全マウス(NOGマウス、Nudeマウス)へ移植後、1カ月、3カ月、6カ月経過した時点での腫瘍サイズを測定した。移

植に用いた細胞は、骨髄由来の間葉系細胞、小児由来の間葉系細胞、陽性コントロールとして小児由来の腫瘍細胞(NCR-G1, G3, G4, NCR-EW2)、TERT遺伝子発現ベクターを導入した間葉系細胞株(UE6E7T-11, UE7T-13)であった。

方法としては免疫不全マウスの背側の皮下に陰性コントロールとしてそれぞれ2か所に血清無添加培地(左側)とヒト間葉系細胞(右側、 5×10^6 個)をマトリジェルと共に移植した。

結果として、陽性コントロールとして用いた小児腫瘍由来NCR-EW2細胞を移植したNOGマウスは1週間程度で死んでしまい十分に評価できなかったが、ヌードマウスでは、移植後1カ月経過した時点で腫瘍形成が確認できた。以上の結果は実験系が成立しており、腫瘍形成の評価が可能であることを示している。

一方、ヒト間葉系細胞を移植したヌードマウスでは、異常な免疫反応が誘導されることによって移植部位に細胞の塊が形成されたものの(1カ月後)、その後、消失した(3カ月、6カ月後)。

また、TERT発現ベクターを導入したヒト細胞(UEBE6E7T)を移植したNOGマウスでは、6カ月経過した時点で腫瘍形成が確認された。この結果は、TERTを発現させただけでも腫瘍形成につながることを示しているが、マウスでの6カ月はヒトの20年間に相当するため、腫瘍化する可能性は限りなく低いことを示している。これに対して、NOGマウスでは、ヒト間葉系細胞による腫瘍形成は6カ月経過時点まで観察できなかった。

以上の結果から、ヒト間葉系細胞は腫瘍化する可能性が極めて低い細胞であることがわかった。また、たとえTERT遺伝子が発現したとしても、腫瘍化には非常に長い時間が必要であることも示された。

9) 低酸素応答性転写因子 HIF の新たな活性化機構

RNA干渉法を用いて作成したHIF-1aノックダウンC2C12筋管細胞(Δ HIF C2C12筋管細胞)において、インスリンによる insulin receptor substrate-1(IRS-1)、Akt/protein kinase Bのリン酸化は、野生型のC2C12筋管細胞と同等に観察された。しかしながら、インスリン作用の指標であるインスリン依存性ブドウ糖取り込みは野生型細胞に比べ著明に減少していた。HIF-1aヘテロノックアウトマウスより摘出した骨格筋のインスリン依存性糖取り込みも、同様に野生型マウスに比べ減弱しており、組織・臓器レベルでのインスリン作用調節においてもHIF-1aが重要であることが示されたといえる。インスリンはIRS-1、PI3キナーゼを含む細胞内のリン酸化経路の活性化を介して、糖輸送担体GLUT4を細胞表面に移行させ細胞内にブドウ糖を取り込むが、 Δ HIF C2C12筋管細胞ではGLUT4の細胞膜移行が障害されていた。骨格筋細胞では、GLUT4は潜在的に細胞質の小胞内に存在する。GLUT4含有細胞質内小胞は、Rab-GTPase-activating protein (GAP) 活性を有するAkt substrate of 160kD (AS160)の作用により、定常状態ではGDP結合型となっており、細胞質内に留まっている。AktによりAS160がリン酸化されるとAS160のRab-GAP活性が減弱し、GLUT4含有細胞質内小胞はGTP結合型となり細胞膜へ移行、融合しGLUT4が細胞膜上に表出する。

Δ HIF C2C12筋管細胞では、インスリン刺激によるAS160のリン酸化が強く抑制されていた。すなわち、PI3キナーゼの下流においてHIF-1aはAktによる基質リン酸化の制御に関わる可能性を示す。

AktによるAS160リン酸化は、PI3キナーゼのみならずAMP-activated protein kinase (AMPK)によっても誘導される。

5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) は、AMPKを活性化し

AS160リン酸化を誘導する薬剤であるが、 Δ HIF C2C12筋管細胞では、AICARによるAS160のリン酸化も抑制されることが判明し、やはりHIF-1aがAkt基質のリン酸化反応の制御に関わることを示している。

一方、恒常的活性型HIF-1a(CAHIF)を安定発現した筋管細胞(CAHIF C2C12筋管細胞)では、正常酸素分圧下においても血管内皮増殖因子(VEGF)をはじめとするHIF-1標的遺伝子発現が認められる。このCAHIF C2C12筋管細胞では、インスリン非存在下においてもAS160のリン酸化が認められた。さらに、Fe(II)のキレート作用を有する2,2'-dipyridyl (DP)は低酸素環境模倣剤として正常酸素分圧下でHIF-1aを活性するが、DP処理により内因性HIF-1a発現を増強させた筋管細胞において、インスリン非存在下にAS160のリン酸化が観察された。

すなわち、骨格筋におけるHIF-1aの活性化はAS160のリン酸化を促進することが示された。

興味深いことに、インスリンは骨格筋細胞のHIF-1a発現を増強させる。シクロヘキシミドを用いた解析から、インスリンは蛋白質翻訳のレベルでHIF-1aの発現を増強させた。

D. 考察

従来は、非ヒト動物性成分を含んだ培養用試薬で細胞培養が行われてきたが、少しずつではあるが、ヒト成分を用いた細胞培養が可能になってきた。本研究もそういった研究の一つと位置づけられ、トランスジェニックカイコを用いてヒトのタンパク質成分を作製することの有用性を示すことができた。細胞の伸張性には従来の成分に比べてやや劣る点があるものの、ES細胞の未分化性が十分に保たれていることから、実用可能であると考えられる。

本研究の成果として、TERT 遺伝子の発現の有無

はヒト間葉系細胞の腫瘍形成に向けた形質変化に関する有力な指標となることが示された。更に、免疫不全マウスの検討から、ヒト間葉系細胞は腫瘍化する可能性が極めて低い細胞であることが明らかになった。また、染色異常を起こしたヒト間葉系細胞であっても腫瘍化しないことも示すことができた。

また、TERT 遺伝子だけでなく、酸素応答性転写因子である HIF3 α も細胞の不死化の有力な指標となることが明らかになったことから、ヒト間葉系細胞を細胞医療に用いる際に問題となっている細胞の腫瘍化については、その前段階である細胞の不死化の指標が、本研究の成果として同定されたことになる。

E. 結論

細胞移植治療における細胞ソースとして胎盤・臍帯血・月経血・子宮内膜といった組織由来の間葉系幹細胞を用いる試みは、大変ユニークなものである。その採取・樹立においてドナーへの侵襲がないため倫理的問題点が少なく、採取におけるコストが低いことは大きな利点である。これらの細胞ソースの特性を明らかにすることで、より安価で高品質な細胞供給体制の構築が可能となり、再生医療の実現化に向けて大きく前進することができる。本研究の成果として、細胞医療の実現に不可欠な結果を出すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takeda Y, Fujita Y, Takiyama Y, Yanagimachi T, Honjo J, Makino Y, Haneda M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition protects mice from streptozotocin-induced diabetes in association with reduced beta cell death and alpha cell proliferation *Diabetologia* 55:404-412, 2012

2. 学会発表

該当なし

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

新規ステロール制御の代謝改善による次世代の 動脈硬化予防治療薬の開発に関する基礎的研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
研究者 最上知子

研究期間 : 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

低 HDL 血症は冠動脈疾患の危険を大きく増大するが、HDL を直接上昇する薬は未だ無い。本研究では「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製のために、HDL の形成と機能の、ステロール/胆汁酸による制御を解明した。①HDL 産生トランスポーター ABCA1 について、最重要のヒト肝型バリエーションとコレステロールによる転写制御、ならびに新規の翻訳後調節機構の発見、②炎症関連の食作用への ABCA7 と HDL の関与、③HDL を低下する高トリグリセリド血症・高血糖について、胆汁酸/コレステロールによる低下機序に新知見を得るとともに、エネルギー消費促進受容体 TGR5 の選択的リガンドを創製した。

研究分担者

- (1) 田辺三菱製薬(株)薬理研究所
塩谷正治、島田浩志、川端(杉本)佳奈美
長崎正明
- (2) 興和(株)東京創薬研究所
山崎裕之、土肥武、浅沼章宗、田辺宗平
- (3) サントリーホールディングス株式会社 諏訪芳秀
- (4) 名古屋市立大学大学院医学研究科
横山信治、堂前純子
- (5) 広島国際大学薬学部 宇根瑞穂
- (6) 昭和大学薬学部 板部洋之

A. 研究目的

低 HDL 血症は日本人の 10～20%に認められ、LDL が正常値でも冠動脈疾患の危険を大きく増大するが、HDL を直接上昇する薬は開発されていない。本研究では①HDL 形成に最重要の肝 ABCA1 トランスポーターのヒト肝型転写制御と翻訳後発現調節、②HDL と炎症(関連分子 ABCA7 と食作用)、③HDL を低下する高トリグリセリド血症・高血糖に着目し、ステロール/胆汁酸による制御を明らかにして「HDL 上昇」を核とした予防・治療薬創製に貢献する。

[1] HDL コレステロール低下は動脈硬化の危険因子であり、メタボリックシンドロームの他因子と重複するとリスクは相乗的に高まる。HDL 上昇には HDL 欠損症の原因遺伝子 ABCA1 が最有力の標的であり、研究代表者らは、血中 HDL の 8 割を生産する肝の ABCA1 が肝特異的な転写制御を受けることをラット

で見いだした。ヒト遺伝子では独自の制御が予想されることから、本研究では、①ヒト肝型転写制御システム、②翻訳後調節(ABCA1 タンパク分解)、③ ABCA1 のリン酸化による機能制御を明らかにし、ABCA1 発現を促進する食品成分を探索する。

[2] HDL は全身性炎症で肝に発現する SAA を血中で運搬するほか、炎症抑制作用が報告されている。慢性炎症反応は動脈硬化の発症進展の因子として注目され、ABCA1 が形成する SAA-HDL や食作用はその重要な修飾因子となり得る。ABCA1 と相同性の高い関連分子 ABCA7 が食作用を制御する発見に基づき、本研究では細胞コレステロールや HDL による制御について解析する。

[3] HDL は末梢から肝にコレステロールを運び、胆汁酸への転換を促す。胆汁酸は核内受容体 FXR および GPCR/TGR5 のリガンドとしてコレステロール、糖・エネルギー代謝を改善する。高トリグリセリド血症・高血糖は HDL を低下させることから、胆汁酸の改善効果について、①糖尿病モデルマウスでの腸管ホルモン分泌を介した作用機序を検証し、②腸管ホルモン分泌促進作用を有する GPCR/TGR5 の高選択的リガンドを創製する。また③コレステロール/胆汁酸上昇によるトリグリセリド低下の機序を、トリグリセリド合成酵素 Lipin の発現制御に着目して明らかにする。④コレステロール蓄積と利用の制御を脂肪滴に着目して解明する。

本研究により、「ステロールによる制御」の視点から各病態の制御が明らかにされれば、HDL 改善を起点にメタボリックシンドロームの重複リスクを低減する治

療薬の実現性が高まると期待される。

B. 研究方法

B-1 HDL 産生の促進

ヒト肝特異的な ABCA1 mRNA バリエントを探索し、その役割を siRNA ノックダウンにより解析するとともに、遺伝子転写制御領域を同定した。また肝型 ABCA1 発現制御を in vivo で評価するラットモデルを構築した。ABCA1 の翻訳後発現調節は翻訳停止後のタンパク安定性から解析した。食品成分から RXR/LXR 作動性の ABCA1・ABCG1 発現促進因子をマクロファージ系細胞で探索した。

B-2 HDL と炎症

炎症性タンパク SAA の体内挙動やアミロイド蓄積における ABCA1 の役割、ABCA7 の細胞食作用での役割を、それぞれのノックアウトマウスや細胞を用いて解析した。

B-3 コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御

2 型糖尿病モデルの KKAY マウスを用いて高脂肪食およびコール酸投与の血中代謝パラメーター、腸管ホルモン、肝脂肪酸代謝への影響を解析した。胆汁酸の合成・排出を制御する FXR とエネルギー消費を刺激する G 蛋白共役受容体(GPCR)/TGR5 の内因性リガンド胆汁酸の構造活性を検討し、TGR5/ FXR 選択性発現に必要な構造要因を検討した。血中コレステロール上昇により変動する肝脂質代謝遺伝子を見いだし機序を解析するとともに、コレステロールを蓄積利用するモデルとして、ステロイド産生細胞の脂肪滴に着目して解析した。

(倫理面への配慮) 当研究においては、ヒト組織由来の材料は全て連結不可能匿名化された市販品を使用し、倫理上の問題はないと考える。動物の取り扱い「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」等、各研究機関の指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づき実験を行った。

C. 研究成果

C-1 ABCA1 発現機能の制御による HDL 産生促進

(1) ABCA1 翻訳後発現調節および機能制御: ABCA1 は半減期の短いタンパクであり、分解速度がタンパク発現量に大きく影響する。ABCA1 分解制御の新しい機構として、①ピタバスタチンが PPAR α 活性化を介し ABCA1 タンパク分解を抑制する、新しい

ABCA1 発現上昇機構を発見した。(Maejima, *J Pharmacol Sci*, 2011)。②アポ A-I は ABCA1 の細胞外ドメインに結合して細胞内から輸送された脂質とともに HDL を形成する。アポ A-I が ABCA1 タンパク分解を抑制するシグナルが、ABCA1 の C-末端領域とグアニンヌクレオチド交換因子との相互作用により伝達されることを明らかにした (Okuhira, *J Biol Chem*, 2010)。③カルモジュリンがカルシウム依存性に ABCA1 の PEST 配列近傍に結合し、ABCA1 の分解を抑制して ABCA1 活性と HDL 産生を増加する機構を明らかにした (Iwamoto, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 2010)。④インスリン抵抗性/高インスリン血症は動脈硬化性疾患の危険因子であり、低 HDL 血症を伴う頻度が高い。インスリンが受容体を介して ABCA1 を直接リン酸化し、HDL 産生速度を低下する機序を見出した (Nonomura et al., *Atherosclerosis*, 2011)。

(2) ABCA1 遺伝子転写制御:①抗動脈硬化性リポタンパク HDL の 8 割は肝 ABCA1 が生産する。ヒト肝に特異的な転写産物 L3 型を発見し、このバリエントが HDL 産生に大きく寄与することを特異的 siRNA ノックダウンにより示した。またコレステロール低下による発現促進を担うプロモーター・エンハンサー領域を同定した (特願 2010-159674)。②末梢細胞の ABCA1 は細胞内のコレステロール放出の役割が提唱されている。核内受容体 RXR 作動性の末梢 ABCA1 転写促進因子の食品成分からの探索を進め、大麦由来のビール成分、およびホップ由来成分を 2 次評価へ向けて選出した。③内分泌攪乱物質トリブチルスズが RXR を介して HDL 産生を促進する活性を見いだした (Cui, *Biochem Pharmacol*, 2011)。

C-2 HDL と炎症

ABCA1 関連分子 ABCA7 は細胞の食作用を正に制御する。ABCA7 の発現は細胞コレステロールが減少すると転写因子 SREBP2 を介して上昇する。スタチンを投与すると、マクロファージによるビーズや菌体、死細胞の食食が昂進すること、さらにこの現象は ABCA7 増加に依存することをノックダウン細胞や欠損マウスで証明した (Tanaka, *Atherosclerosis*, 2011)。また HDL はそのアポリポタンパク成分が ABCA7 を分解から保護し、食作用を促進することを明らかにした (Tanaka, *J Lipid Res*, 2010)。炎症性タンパク serum amyloid A (SAA) は肝で産生され ABCA1 により HDL 粒子として血中に放出される。慢性炎症時に沈着する AA アミロイドと ABCA1 の関係を解析した。

C-3 胆汁酸とその受容体によるコレステロール・エネルギー代謝制御

コレステロール/胆汁酸による糖・脂質代謝制御について、①高コレステロール/胆汁酸マウスモデルでは血中トリグリセリドの低下とともに、トリグリセリド合成の鍵酵素 Lipin-1/-2 の低下が認められること、胆汁酸が Lipin-1 発現を抑制することを見いだした (Obama, *PLoS ONE*, 2011)。②糖尿病モデル KKAY マウスでは、胆汁酸(コール酸)が顕著な血中トリグリセリド・脂肪酸低下作用を示す。コール酸は胃腸管ホルモン分泌を介するよりはむしろ直接肝の脂肪酸合成系(不飽和化や側鎖延長)に影響し、代謝性疾患改善につながる可能性が示された。③親水性胆汁酸ウルソデオキシコール酸を母核とした構造展開により、FXR を活性することなくエネルギー消費促進受容体 GPCR/TGR5 への選択性を高める構造と活性の関係を明らかにし、7β位にメチル基を導入し TGR5 の選択的リガンドを創製した (Iguchi, *J Lipid Res*, 2010; Iguchi, *Biol Pharm Bull*, 2010)。また胆汁酸類似のトリテルペノイドの構造と活性の関係を解析した。

D. 考察

HDL は末梢の血管壁細胞からコレステロールを引き出して肝に輸送し、胆汁酸への転換と体外排出を促すことが、動脈硬化の抑制につながると理解されている。また HDL と炎症抑制との関係も示唆されている。本研究では(1)HDL 形成トランスポーター ABCA1 の転写制御および翻訳後発現調節(タンパク分解制御)、(2)炎症性タンパク SAA や細胞食作用と HDL の関係に着目して解析を進めた。その結果、ABCA1 の翻訳後制御や機能制御の新しい機序に多くの知見を得た。さらに、HDL の 8 割を産生する肝について、ヒト独自の転写産物とステロールに応答する転写制御領域を見いだした。新たに発見したヒト肝型 ABCA1 バリエントの機能や転写制御の全容を明らかにし、細胞や in vivo での評価モデルを構築できれば創薬に直接貢献できると考えられる。

また炎症に深く関わる細胞食作用が ABCA7 を介してコレステロールにより制御されることを発見し、SAA によるアミロイドーシスと HDL の関係を解析した。慢性炎症性疾患としての動脈硬化発症進展の機序を SAA-HDL アミロイドーシスや食作用活性化での ABCA7 の役割を基点に解明できれば、新たな予防治療戦略に寄与することになる。今後、in vivo での評価をより拡充して行うことにより、より実現性の高い成

果が得られると考えられる。

コレステロールは肝で胆汁酸に転換される。胆汁酸は核内転写因子の FXR や細胞表面の GPCR である TGR5 を介して血糖やエネルギー代謝の改善作用を示すことが知られる。本研究では、腸管ホルモンや脂肪酸生合成に着目した機序解明を行うとともに、胆汁酸を母核とする TGR5 の選択的リガンドを創製した。またコレステロール・胆汁酸による lipin 発現抑制による新たなトリグリセリド低下機構を明らかにした。

本研究により、HDL 産生、炎症、糖・中性脂質代謝について「ステロール/胆汁酸」による新たな制御が明らかにされた。今後、共通した制御薬物の創製により、メタボリックシンドロームの重複リスクを低減する治療薬の実現性が高まると期待される。

E. 結論

HDL 形成トランスポーター ABCA1 の翻訳後発現調節と機能制御の新しい機構を見いだすとともに、最重要の肝についてはヒト肝特異的な ABCA1 転写産物と制御領域を発見した。炎症関連の食作用に ABCA7 と HDL が深く関与すること、胆汁酸が lipin-1 や GPCR/TGR5-腸管ホルモンを介してトリグリセリドを低下する機序に新知見を得るとともに、TGR5 選択的リガンドを創製した。

F. 研究発表

論文発表

1. Maejima T, Sugano T, Yamazaki H, Yoshinaka Y, Doi T, Tanabe S, Nishimaki-Mogami T. Pitavastatin Increases ABCA1 Expression by Dual Mechanisms: SREBP2-Driven Transcriptional Activation and PPARα- Dependent Protein Stabilization but Without Activating LXR in Rat Hepatoma McARH7777 Cells. *J Pharmacol Sci.* (2011) 116: 107-115
2. Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXRalpha/RXR. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 819-824
3. Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada JI, Naito M, Nishimaki-Mogami T. Binding of PDZ- RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and