

図 2

Prostate Cancer

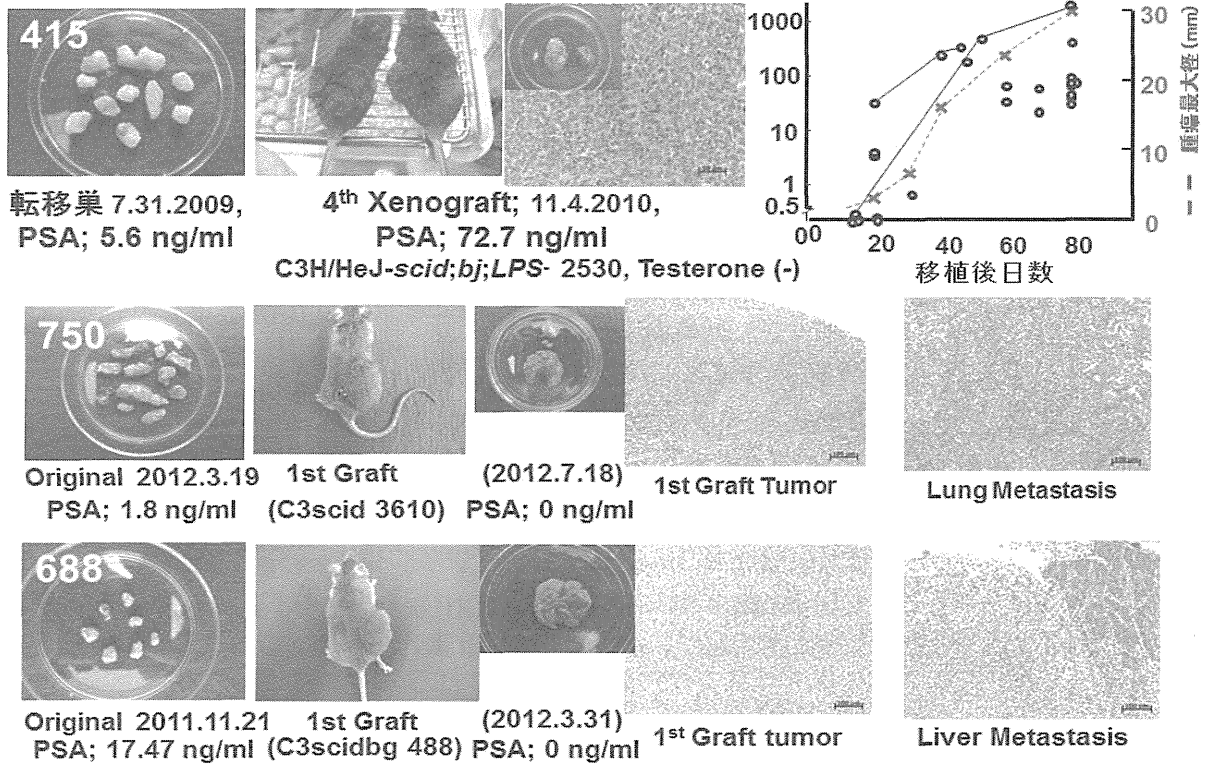
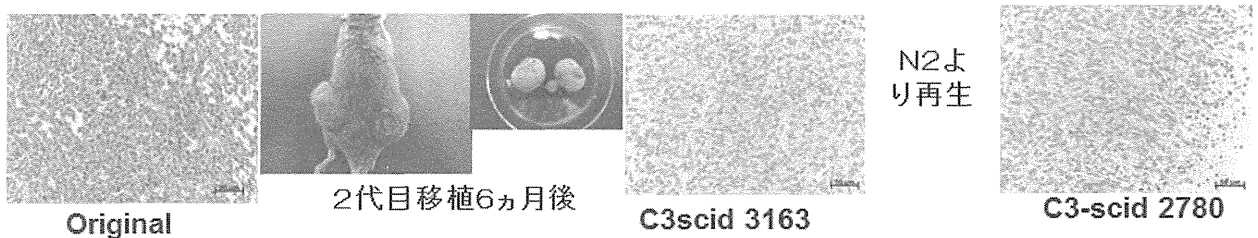
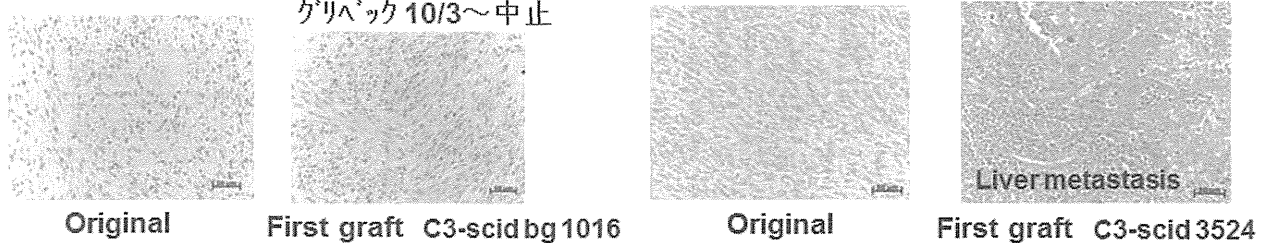


図 3

GIST-544 (肝転移症例) グリベック11月26日から中止 2010.11.30 手術



GIST-517 (直腸GIST) 2011.10.6手術 グリベック 10/3~中止
GIST-738 2012.2.16 手術



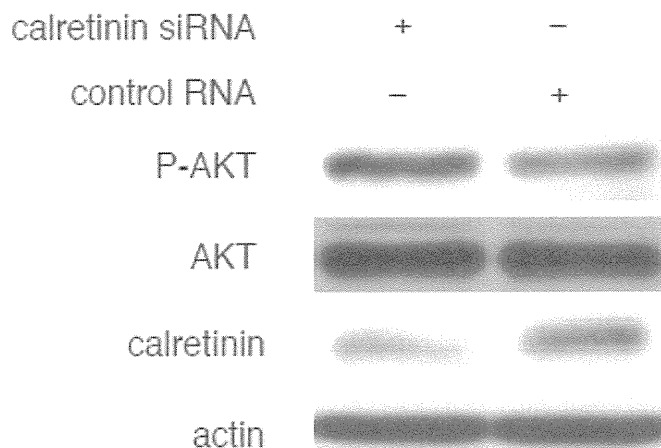


図4. CD9 (+) SCLC 培養株 OS-1 でのカルレティニンノックダウンは、Akt リン酸化を増強する (立花)。

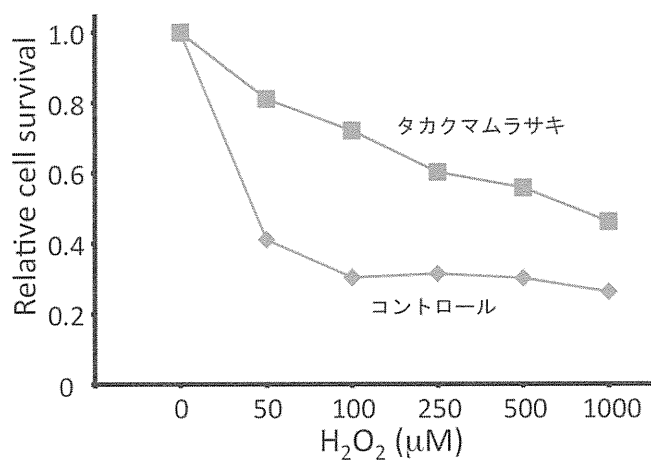


図5 : A549 細胞を利用した抗酸化作用評価。縦軸は生存細胞の比率 (竹森)

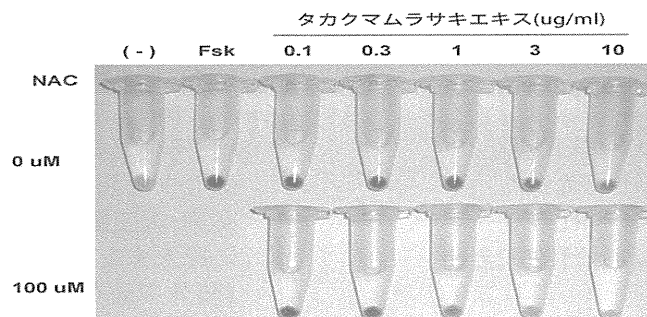


図6 N B16 メラノーマ細胞を用いメラニン合成能を評価 -アセチルシステイン (NAC) とタカクマムラサキエキスの組み合わせでメラニン合成を抑制できる。メラニン合成はフォルスコリン (Fsk) で誘導した (山原、竹森)。

心不全に対する再生医療と人工心臓による統合治療戦略

—CD29^{high}, CD34^{low}, c-kit⁺, CD140a⁺細胞の由来としての体性幹細胞 (胎盤・骨髄) とヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) の有効性比較

(独) 国立成育医療研究センター

再生医療センター

梅澤 明弘

研究要旨 先天性心疾患を有する患児の予後は著しく向上したが、術後および合併症による心不全に対する選択可能な治療法は少ない。このような現状の中で、本研究では厚生労働省「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、薬剤・人工臓器とともに再生医療を集学的に投入する。特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来する CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に注目し細胞医療の基盤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。世界的には、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。本研究により、胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来する CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞を用いた再生医療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世界に先駆けて獲得する。臨床実績及び薬事法上のバックグラウンドを有している本研究チームによる小児心不全に対する治療戦略は、厚生労働省の指針に基づく再生医療の一つのモデルとなる。小児重症心不全患者への治療を念頭に置き、細胞医療における基盤研究を推進する。CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に対して、Premature senescence を阻害することで、ストレスフリーな細胞の増殖を実現する。特に、試験管内におけるシグナル伝達系に注目し、科学的なエビデンスを提示する。また、生体においては小動物のみならず大動物に対する研究を初年度から行い、おもに心機能の指標 (BNP、Swan-Ganz カテーテルデータ、圧-容量曲線) の主要項目を抽出する。国立成育医療研究センターにおいて、ヒト細胞に関し倫理審査委員会の承認を既に受けている。また、それぞれの施設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。

研究分担者

五條 理志	京都府立医科大学
宮本 薫	福井大学医学部
豊田 雅士	(地独) 東京都健康長寿医療センター
阿藤 大志	株式会社カルディオ
柏木(石田) 智咲	株式会社カルディオ
鈴木 康二	株式会社ジェイ・エム・エス
櫻井 裕士	株式会社カネカ
藤澤 章	セルテスコメディカルエンジニアリング株式会社
西岡 秀展	コアフロント株式会社
松崎 正晴	株式会社ミラキュア
加賀谷 伸治	株式会社 NRL ファーマ
増田 憲二郎	ファーマバイオ株式会社

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、特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来する CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 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

1. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞のバリデーショ

- ・組換え体蛋白質（キメラ蛋白質）を作用させた CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞の増殖能の増加、寿命の延長、分化誘導を行った。

2. 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

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 移植実験を行った。

3. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

ヒト血清分離システムを用いて CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に最適な培養システムの構築を行った。

4. 小動物による有効性・安全性の検討

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した。

5. 大動物による前臨床研究

大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行った

6. 施設バリデーショ

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った。

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センターにおいて、ヒト細胞に関し倫理審査委員会の承認を既に受けている。また、それぞれの施設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。

C. 研究結果

1. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞のバリデーショ

間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、糖鎖分析などにより網羅的に分析し、複数精製した。さらに、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同

定し、骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法を確立した。

2. 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

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 移植実験を行った。

3. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

血清中の PDGF によって生じる MAPK/p16^{ink4a} 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についての検討を行った。

4. 小動物による有効性・安全性の検討

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した。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った。

5. 大動物による前臨床研究

大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行った。疾患設定は、小動物と同様に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した。ドナー細胞としては骨髄細胞を単離して実験に供した。

6. 施設バリデーショ

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い、施設バリデーショは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせた。

D. 考察

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に関する研究班において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は重要な課題であり、再生医療のドラッグデザインにおけるモデルケースとなる。

F. 研究発表

論文発表

1. Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep.* 2:930, 2012.
2. Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open.* 1(7):640-747, 2012.
3. Ju Y, Mizutani T, Imamichi Y, Yazawa T, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Umezawa A, Kangawa K, Miyamoto K. Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology.* 153(11):5522-5534, 2012.
4. Nishijima Y, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Sugiyama T, Miyazawa M, Muramatsu T, Nakamura K, Narimatsu H, Umezawa A, Mikami M. Glycan profiling of endometrial cancers using lectin microarray. *Genes Cells.* 17(10):826-836, 2012.
5. Lu H, Kawazoe N, Kitajima T, Myoken Y, Tomita M, Umezawa A, Chen G, Ito Y. Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity. *Biomaterials.* 33(26):6140-6146, 2012.
6. Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther.* 14(3):R136, 2012.
7. Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res.* 30(12):1915-1922, 2012.
8. Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of CRX, RX and NEUROD. *PLoS One.* 7(4):e35611, 2012.
9. Furuya M, Okuda M, Usui H, Takenouchi T, Kami D, Nozawa A, Shozu M, Umezawa A, Takahashi T, Aoki I. Expression of angiotensin II receptor-like 1 in the placentas of pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynecol Pathol.* 31(3):227-235, 2012.
10. 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.
11. 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 Reprogram.* 14(2):171-185, 2012.
12. 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.
13. Zhang J, Dong J, Gu H, Yu S, Zhang X, Gou Y, Xu W, Burd A, Huang L, Miyado K, Huang Y, Chan HC. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *J Invest Dermatol.* 132(1):226-36, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

再生医療技術を駆使した、生活習慣病（虚血性疾患、肥満、糖尿病、高脂血症）の新規病態モデルの開発と創薬研究

国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部
佐伯 久美子

研究要旨

ヒトの病気の病態メカニズムの研究に際しては、疾患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 *in vitro* の実験系では、培養に伴う細胞の形質変化のために病態を正しく反映するモデルの構築は容易ではない。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、生活習慣病の病態生理を正しく反映できる新規の培養細胞モデル系を構築して創薬研究を展開する。

本年度は、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。我々の褐色脂肪細胞分化誘導系は、動物由来成分を可能な限り排除した無フィーダー無血清で、分化誘導の効率も高く（90%以上）、安定に大量培養を行うことも可能であった。我々の作成した褐色脂肪細胞はその分化経路に関する基盤的検討や分化系細胞内の刺激伝達経路の分子解析から、筋肉に近い発生過程から得られる古典的で正統派の褐色脂肪細胞で、脂質代謝、糖代謝に対する強力な改善能を有し、その分子機構の一部も本年度の研究で解明された。さらに、褐色脂肪細胞特異的細胞表面マーカーの探索も開始された。

一方、様々の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検討し、ヒト初代培養血管内皮細胞、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞、など、血管内皮細胞の種類によって異なる特徴を明らかにした。

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技術部
木籾古 孝行、浅井 康行
- (3) 株式会社医学生物学研究所技術生産本部
技術開発部
久原 基樹
- (4) 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
- (5) 多摩川精機株式会社
バイオエレクトロニクス研究所
羽生 尚弘
- (6) 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
- (7) 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

ヒト疾患モデルとして、これまでに動物モデル（遺伝子改変マウス等）やヒト検体（初代培養細胞）を用いて研究がなされてきた。しかし、いまだに適切な動物モデルが得られていないケースも少なくない。例えば、加齢に伴って血管が狭窄する現象は哺乳類で広く観察されるが、マウスやサルを含めたヒト以外の動物ではこの変化は血管内皮細胞の増殖によって起こる。一方、ヒトにおける血管狭窄は血管平滑筋細胞の増殖が原因であるため、ヒトの加齢性血管狭窄の病態を正しく再現する動物モデルの作製は原理的に不可能である。一方、ヒト初代培養細胞を用いた研究では、細胞の樹立過程（酵素処理による細胞分散等）で不可避免的に被る形質変化のために、生体環境を正しく反映するモデルの作製は極めて困難である。特に生体ホメオスタシス維持に関わるような「繊細かつ高次の細胞機能」の再現はほぼ不可能である。例えば、ヒト初代培養内皮細胞を用いた血管構造維持の研究では生体状況とは異なる結果が得られ

ている。即ち、臨床経験や摘出血管を用いた実験からは、ヒト成体)で内皮細胞は平滑筋細胞の増殖を抑制していることが強く示唆されているにも関わらず、ヒト初代培養内皮細胞を用いた実験では内皮細胞は平滑筋増殖を促進するという結果が得られている。我々はこの理由を、ヒト初代培養内皮細胞が被った機能変調のために正常なヒト生体環境を再現することはできず、むしろ「加齢等で見られる変性環境」を模倣していると考えた。そして、ヒト ES/iPS 細胞から作製した「フレッシュな高機能性血管内皮細胞」を用いることで、正常ヒト生体環境を正しく再現するシステムの開発に成功した。動脈狭窄は日本人死因の上位を占める虚血性心疾患や脳血管障害の原因として重要であり、ヒト加齢性血管狭窄の研究は日本を含めた先進諸国における健康寿命延長の鍵となる。

ヒト疾患モデル研究の障壁として、ヒト検体そのものが入手不能なケースがあり、その例として「褐色脂肪細胞」が挙げられる。褐色脂肪細胞はエネルギー消費性/熱産生性の脂肪細胞であり、肥満や生活習慣病の治療開発に向けて世界的に大きな注目を集めている。しかしヒト検体の入手は極めて困難である。それは PET/CT (ポジトロン断層法と CT を組み合わせた検査で癌検診等に施行される) という被爆の大きな検査を要するためにボランティアを得にくいこと、褐色脂肪細胞の活性の高い若年層に対してこのような検査を行うことへの倫理的問題、検体採取に伴う有害事象 (将来的な肥満/生活習慣病の発症リスクの増大の懸念) が未評価であることなどから、少なくとも日本においては研究使用に十分なヒト検体入手することは不可能である。しかも、マウスにおいてすら機能を保持したまま十分量の成熟褐色脂肪細胞を得ることは困難である。これに対して、申請者はヒト ES/iPS 細胞から高純度に高機能性褐色脂肪細胞を作製することに成功した。

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、KhES-5) 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)) 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 Artery Endothelial Cells, HCAEC) 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。

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。

2. センダイウイルスベクターを駆使したヒト iPS 細胞の樹立

新生児皮膚由来線維芽細胞 BJ、HUVEC からヒト iPS 細胞の樹立を行った。山中 4 因子を搭載したセンダイウイルス (SeV) ベクター (SeV18+OCT3/4/TSΔF, SeV18+SOX2/TSΔF, SeV18+KLF4/TSΔF, SeVHNLc-MYC/TS15ΔF) を MOI3 にて感染させて、6 日間培養した後に X 線照射した MEF 上で FGF 存在下で培養した。培養過程で出現するヒト ES 細胞用のコロニーをマイクロピペットでつり上げて引き続き MEF 上で培養した。SeV ベクターと導入遺伝子は継代培養により著明に希釈され最終的には高温培養によって消失した。得られた SeV ベクターによるヒト iPS 細胞は SSEA4、Oct3/4、Nanog などの多能性幹細胞特異的のマーカーを発現していた。

3. 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 morphogenic 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

した箇所には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。

4. ヒトES・iPS細胞の褐色脂肪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8日間スフェア(sphere)形成させた。分化培養液は、牛胎児血清を含まない無血清培地である点が血管内皮細胞への分化誘導プロトコールとの最大の違いである。添加したサイトカインは血管内皮細胞への分化誘導プロトコールと同様に血液細胞分化誘導に使用されることが多いもので、6種類のサイトカイン・増殖因子

(insulin-like growth factor II (IGF-II), vascular endothelila growth factor (VEGF), bone morphogenic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 6 (IL-6))から成り立つ。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。添加したサイトカイン・増殖因子は一部異なる6種類である(insulin-like growth factor II (IGF-II), vascular endothelila growth factor (VEGF), bone morphogenic protein 7 (BMP-7), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 6 (IL-6))。数日の平面培養で、スフェアが着地した箇所において褐色脂肪細胞が分化誘導された。

5. 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、FACSCalibur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。

6. RT-PCR

褐色脂肪細胞分化の同定のために、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。また一部の実験においては定量的RT-PCRも行った。褐色脂肪細胞マーカーとしては、PRDM16、UCP-1、pgc1 α 、cide-A、cyt-c、elovl3、ppar α 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。

用いた。

7. ウェスタンブロッティング

褐色脂肪細胞分化の同定のために、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。

8. 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。

9. 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96穴プレートにて行った。

10. 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。

11. 抗体作成

ヒト褐色脂肪細胞に対するモノクローナル抗体の作成を行った。今年度は、マウスへのfoot pad法による免疫、免疫終了後のPEG法による細胞融合、抗体産生細胞の1次スクリーニング、までを行った。具体的には以下の如くである。初回免疫でマウス左足に抗体が反応しないことが望ましいヒト白色脂肪細胞を免疫してから、以降、右足にヒト褐色脂肪細胞を免疫するサブトラクション免疫方法を実施した。ヒト褐色脂肪細胞を6回免疫後、右足近傍のリンパ節を摘出してマウスミエローマと融合させた。得られたハイブリドーマ培養上清について、ヒト褐色脂肪細胞を固定化したプレートとヒト白色脂肪細胞を固定化したプレートに反応させ、蛍光標識抗体で検出した。スクリーニング法の前検討として上記プレートをもちいて、免疫マウスから得た血清を蛍光染色法により反応性を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者検体は使用しないし、臨床研究もない。また、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいっさい含まれない。動物実験を行う際には、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して定められた当機関の当該規定を責任

を持って遵守した。

ヒトES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11月9日に、ヒトES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ES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734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11月24日に文部科学大臣の確認を得た（18諸文科振第743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12月18日に文部科学大臣の確認を受けた（19国文科振第26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11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ES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6491号）。

褐色脂肪細胞の作成計画（使用計画の名称「ヒトES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ヒトES・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、位相差顕微鏡画像上で細かい脂肪滴を有しており、これが脂肪滴であることは、Oil red O染色によって確認した。また、電子顕微鏡による検討では、細胞質の広い範囲に褐色脂肪細胞に特徴的な梯子状に発達したクリステを持つミトコンドリアが多数分布していることを確認した。通常のPCR、定量PCRによって重要な褐色脂肪細胞特異的分子であるPRDM16、UCP1の発現を確認した。その他の様々の褐色脂肪細胞特異的分子（PGC1A、CIDEA、CYC1、ELOVL3、PPARA）の発現も確認する一方で、白色脂肪細胞特異的分子（PSAT1、

EDNRA）が発現していないことも確認した。さらに、蛋白レベルで（免疫染色により）UCP1がミトコンドリアに局在することも確認するとともに、UCP1陽性細胞が全分化細胞の90%以上に達していることが確認でき、極めて高効率の分化誘導系であることが確認された。

次に、分化誘導された細胞が褐色脂肪細胞特有の機能を有するか否かを検討した。まず、イソプロテノールによってβアドレナリン受容体を刺激することにより、細胞内のPRDM16、UCP1の発現が増加することを確認した上で、マウス皮下移植した分化細胞が同様の刺激によって発熱することを確認した。また、分化細胞は酸素消費が白色脂肪細胞と比べて顕著であり、マイトストレステストにより特徴的なパターンを示し、βアドレナリン受容体を刺激することにより増強することも確認した。

次に、分化細胞が代謝系に与える様々の作用に関して、マウスのin vivoの系を駆使して詳細に検討した。まず、分化細胞の移植によってマウスの空腹時の血中中性脂肪の濃度が低下することを確認した上で、オリーブオイル負荷試験を行い、負荷後の血中中性脂肪の濃度の上昇を移植した分化細胞が抑制することを明らかにした。次に糖代謝に対する影響を検討した。分化細胞の移植によって、空腹時血糖のみならずブドウ糖負荷後の血糖の上昇も低下した。一方、白色脂肪細胞は食後の血糖の上昇を増幅する作用を有することが明らかになったが、同時に分化細胞が存在すると白色脂肪細胞のこのような好ましくない作用が軽減されることも確認した。以上より、分化細胞は極めて高機能で代謝系を改善する好ましい作用を有する褐色脂肪細胞であると考えられた。

次に、我々のヒトES/iPS細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導の経路やサイトカインの必要性について検討した。骨格筋の分化課程で発現するMYF5、PAX3、PAX7などが発現しており、pericyteのマーカであるNG2、PDGFRBは発現しておらず、筋肉に近い発生過程をたどっていると考えられた。また、paraxial mesodermのマーカであるPDGFRAが発現してlateral plate mesodermのマーカであるVEGFR2は発現せず、筋肉に近い発生経路であることが確認された。また、それぞれのサイトカイン・増殖因子の役割に関しては、BMP7がBMP4よりも重要であること、4種類の造血系のサイトカイン・増殖因子（vascular endothelial growth factor（VEGF）、stem cell factor（SCF）、Flt3 ligand（Flt3-L）、interleukin 6（IL-6））はどれも必須で、VEGFが無いと全く分化が進まないこと、SCF、Flt3-L、IL-6のいずれが欠けてもlateral plate mesodermや白色脂肪細胞

胞への分化が起きてしまうことが確認された。

以上のような成果を元に、ヒト ES/iPS 細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導して、そこから分泌される糖代謝改善因子を探索するプロジェクトを開始した。手法としては、マイクロアレー解析と馴化培地の検討である。マイクロアレー解析に関しては、ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞とヒト白色脂肪細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、前者に特徴的に発現する分泌蛋白コード遺伝子として 8 個の遺伝子の抽出に成功した (ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞で高発現する遺伝子 4640 個→うち分泌蛋白コード遺伝子 334 個→うちマウス個体でも「褐色脂肪組織>白色脂肪組織」の発現を示した遺伝子 25 個→マウス全臓器で比較して特に褐色脂肪組織で発現が特に顕著な遺伝子 8 個)。現在は、上記の 8 個の候補遺伝子のリコンビナント蛋白の作製に向けて準備中である (ホ乳類細胞を用いたリコンビナント蛋白合成システムである FreeStyle MAX Expression System (Life Technology 社製) を検討中))。馴化培地の検討においては、培地ブドウ糖依存性インスリン分泌能を保持する唯一の膵β細胞株である MIN-6 細胞にヒト ES 細胞由来褐色脂肪細胞馴化培地を添加し、高ブドウ糖負荷時のインスリン分泌能の変化を酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) で測定したところ、MIN-6 細胞におけるブドウ糖濃度依存性インスリン分泌能がヒト ES 細胞由来褐色脂肪細胞馴化培地の添加により上昇した。

今回、造血因子を含むサイトカインカクテルがヒト ES/iPS 細胞から褐色脂肪細胞を誘導することを明らかにした。また、造血の場である骨髄には脂肪細胞が多数存在して、骨髄の造血微小環境において何らかの役割を發揮している可能性が指摘されている。そこで我々は次に、今回の系において分化誘導されたヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞が、造血を支持するストローマ細胞都市的能するか否かを検討した。まず、ヒト造血前駆細胞 (臍帯血中の CD34 陽性細胞) をヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞とともに共培養して造血細胞が増加するか否かを NOG マウスの *in vivo* の系を駆使して検討した。その結果、マウス体内でのキメラ率は、共培養によって有意に増加することを観察した。さらに我々は、ヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞が、IL-3、GM-CSF、G-CSF などの白血球を増加させる造血因子を産生していることも確認した。このような現象の生体内での普遍性に関してマウスの *in vivo* の系によって確認するために、5-FU による骨髄抑制の系に対するイソプロテノールの造血促進効果を検討した。その結果、イソプロテノール添加によりマウス

の骨髄における白血球系の造血が促進されることが明らかとなった。そこでさらに、ヒトでの骨髄中の褐色脂肪細胞の存在の可能性を探るために、ヒト骨髄単核球における PRDM16、UCP1 の発現を PCR にて検討し、発現を確認することができた。以上のデータを総合すると、ヒト骨髄中にも褐色脂肪細胞が存在して造血微小環境を形成して、ストローマ細胞として貢献していることが示唆される。

また、ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞を用いて、ヒト褐色脂肪細胞表面特異的マーカーを探索するプロジェクトを開始した。手法としては、マイクロアレー解析とヒト褐色脂肪細胞特異的抗体作成である。マイクロアレー解析に関しては、ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞とヒト白色脂肪細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、前者に特徴的に発現する膜蛋白コード遺伝子として 3-5 個の遺伝子の抽出に成功した (ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞で高発現する遺伝子→うちマウス個体でも褐色脂肪組織での発現が顕著な遺伝子→うちヒト個体で発現が低い遺伝子)。ヒト褐色脂肪細胞特異的抗体作成に関しては、マウスへの foot pad 法による免疫 (免疫原: ネガティブ細胞: ヒト間葉系幹細胞由来白色脂肪細胞、ポジティブ細胞: ヒト ES 細胞由来褐色脂肪細胞。右足裏にネガティブ細胞、左足底にポジティブ細胞を 7 回免疫) を行った。その後、免疫したマウスから、チェック採血を行い、ヒト褐色脂肪細胞、ヒト白色脂肪細胞、各細胞を固定化したプレートに反応させて、当該スクリーニング方法がワークすることを確認した。その後、3 匹からリンパ節を回収、ミエロマ細胞との PEG 法による細胞融合を実施し、96wellプレート 5 枚に播種した。HAT セレクションにより得られたハイブリドーマ細胞の培養上清について、各細胞を固定化したプレートを用いて蛍光免疫染色法によるスクリーニングを実施した。結果、ヒト白色脂肪細胞よりヒト褐色脂肪細胞に強く反応しているサンプルが 36 サンプル確認できた。(ヒト褐色脂肪細胞とヒト白色脂肪細胞に同程度反応しているサンプルは 28 サンプル得られた。) これらのハイブリドーマ細胞について、培養上清の回収、凍結細胞の作製を行った。

その他、iPS 細胞安全性確保のためのゲノムに遺伝子の取り込まれないセンダイウイルスベクターによるヒト iPS 細胞の株数の確保、未分化維持培養において MEF を排除した無フィーダー培養、作成されたヒト褐色脂肪細胞の普及のための冷凍冷蔵技術の開発、などを行った。とりわけ、スフェア (sphere) の浮遊した段階で A 社の細胞冬眠剤を用いて冷蔵庫内で保存し、2 日

後に分化培地を用いて培養再開したところ、ほぼ全ての細胞で多胞性脂肪滴の存在が確認され、さらに、UCP1 および PRDM16 の発現も確認され、冷蔵条件での輸送が可能となった。

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I、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC、ヒト冠状動脈内皮細胞、HCAEC)、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I、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC、ヒト冠状動脈内皮細胞、HCAEC)はいずれも、HUVECを用いた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、ヒト血管内皮前駆細胞(ヒト骨髄から分離した物)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。ただし、ドナーによっては、接触培養においてもヒト平滑筋細胞の増殖を促進する場合も認められた。

ヒトES細胞(KhES-1、KhES-3、KhES-5)から分化誘導した血管内皮細胞は、いずれの細胞株においても、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。しかしながら、このような増殖抑制作用は継代とともに消失してしまうことが確認された。

ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞では、結果は様々であった。まず、レトロウイルスベクターで作成したヒトiPS細胞((京都大学由来株(201B7、253G1)、国立成育医療研究センター由来株(#25))においては、201B7株のみが接触培養における増殖抑制作用を発揮したが、この細胞株も含めて、継代とともに増殖促進作用が増強される傾向にあった。一方、センダイウイルスベクターによって樹立されたヒトiPS細胞の場合は、接触培養における顕著な増殖抑制作用が観察され、継代しても減弱しないことが確認された。

③ヒトES細胞やヒトiPS細胞の大量培養法の開発

ヒトES/iPS細胞の大量培養を実現させるための手法検討として、本研究では浮遊培養法を検討した。接着培養法ではディッシュ底面積以上に細胞は増殖できないが、浮遊培養法では細胞増殖はディッシュ底面積に依存しないことからより効率的な培養が可能になるものと考えられている。浮遊培養法の検討にあたっては接着培養時に培地交換は2回/週、継代は1回/週を達成し、毎日の培地交換が必要な従来培地に比べて低コスト化を達成した培地を使用したが、浮遊培養法においても培地交換は2回/週、継代は1回/週で培養が可能であることが明らかとなった。浮遊培養法で培養したヒトiPS細胞は1/2から1/3のスプリットレシオで継代が可能であり、アルカリフォスファターゼ活性を示したことから、未分化性を維持したまま増殖可能であることが示唆された。これにより、安価な培地を使用して大量にヒトiPS細胞を調製できる浮遊培養法での培養方法を見出すことができた。

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る。

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。

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。

本年度においては、やや基盤的な検討ではあるが、我々の褐色脂肪細胞分化誘導の経路やサイトカインの必要性について検討した。その結果、我々の分化誘導系は、中胚葉の中でも paraxial mesoderm という骨格筋に近い発生過程を経ていることが明らかとなった。また、4種類の造血系のサイトカイン・増殖因子 (vascular endothelial growth factor (VEGF), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 6 (IL-6)) はどれも必須で、VEGF が無いと全く分化が進まないこと、SCF, Flt3-L, IL-6 のいずれが欠けても別の中胚葉系 (lateral plate mesoderm) や白色脂肪細胞への分化が起きてしまうことが確認された。従って、このような面からも、我々の作成した褐色脂肪細胞は、正統派で古典的な「真の」褐色脂肪細胞であることが裏付けられ、機能の面で強力であることと合致する結果となった。

また、ヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞から分泌される糖代謝改善因子を探索するプロジェクトを開始し、マイクロアレーを駆使して遺伝子 8 個に絞り込むことに成功した。現在は、上記の 8 個の候補遺伝子のリコンビナント蛋白の作製に向けて準備中である。また、ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞の馴化培地の検討においては、膵β細胞株である MIN-6 細胞におけるブドウ糖濃度依存性インスリン分泌能を増強させる活性を見いだした。以上のような研究成果からは、褐色脂肪細胞の有する代謝改善液性因子が得られる可能性が高く、そのものが治療薬となり得る可能性を示唆している。

今回、造血因子を含むサイトカインカクテルがヒト ES/iPS 細胞から褐色脂肪細胞を誘導することを明らかにした。また、造血の場である骨髄には脂肪細胞が多数存在して、骨髄の造血微小環境においてストローマとしての役割を發揮している可能性が指摘されているが、今回、分化誘導されたヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞が、実際に、造血を支持するストローマ細胞で、造血因子を産生していることを明らかにした。さらに、イソプロテレノール添加によりマウスの骨髄における白血球系の造血が促進されることも明らかにした。ちなみに、ヒト生体内での褐色脂肪細胞を検出できる PET 検査において、骨髄にも寒冷刺激でブドウ糖を取り込む細胞が存在することが明らかになっている。ヒト骨髄単核球における

PRDM16、UCP1 の発現を PCR にて確認することができたことも考慮すると、ヒト骨髄中にも褐色脂肪細胞が存在して造血微小環境を形成して、ストローマ細胞として貢献していることが強く示唆される。

本年度から、ヒト褐色脂肪細胞表面特異的マーカーを探索するプロジェクトを開始した。手法としては、マイクロアレー解析とヒト褐色脂肪細胞特異的抗体作成である。マイクロアレー解析に関しては、ヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞とヒト白色脂肪細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、前者に特徴的に発現する膜蛋白コード遺伝子として 3-5 個の遺伝子の抽出に成功した。ヒト褐色脂肪細胞特異的抗体作成に関しては、マウスへの foot pad 法による免疫を行い、現在は、ハイブリドーマ培養上清中の 1 次スクリーニングを推進中である。褐色脂肪細胞の特異的なマーカーに関しては、転写因子などの細胞内分子しか知られていないが、今回の研究により FACS にも使用可能な細胞表面マーカーやそれに対するモノクローナル抗体が得られるものと期待できる。

本年度の研究においては、ゲノムに遺伝子の取り込まれないセンダイウイルスベクターによるヒト iPS 細胞の株数の確保、未分化維持培養において MEF を排除した無フィーダー培養、作成されたヒト褐色脂肪細胞の普及のための冷凍冷蔵技術の開発、などを行うことにより、この細胞の研究への応用、医療への応用につながるような技術開発も大きく推進した。このような地道な技術改善は、画期的な学術的発見とともに、地味ではあるが重要な研究であると考えられる。

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。例えば、動脈硬化などの血管狭窄症においては、まず内皮細胞が変性・脱落し、その後に血管平滑筋細胞が過剰増殖することで血管内腔が狭くなると考えられる。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發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。

E. 結論

本年度は、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。我々の褐色脂肪細胞分化誘導系は、動物由来成分を可能な限り排除した無フィーダー無血清で、分化誘導の効率も高く、安定に大量培養を行うことも可能であった。また、我々の作成した褐色脂肪細胞は筋肉に近い発生過程から得られる古典的で正統派の褐色脂肪細胞で、脂質代謝、糖代謝に対する強力な改善能を有していた、さらに、褐色脂肪細胞特異的細胞表面マーカーの探索も開始された。

一方、様々の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を駆使して検討し、ヒト初代培養血管内皮細胞、ヒトES細胞由来血管内皮細胞、ヒトiPS細胞由来血管内皮細胞、など、血管内皮細胞の種類によって異なる特徴を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishio M, Saeki Ko, Saeki Ku, et al.: Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. Cell Metab 16:394-406, 2012.
2. 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 Rerogram 14:171-185, 2012.

2. 学会発表

1. 佐伯久美子、他：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の作製。第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月、横浜。
2. 佐伯久美子、他：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の作製。第11回日本再生医療学会総会、2012年6月、横浜。
3. 佐伯久美子、他：血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制の機序：動脈狭窄症の新規治療開発に向けて。第11回日本再生医療学会総会、2012年6月、横浜。
4. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: Brown adipocyte differentiation of human pluripotent stem cells without genetic manipulation. The 10th Annual Meeting International Society of Stem Cell Research, June 2012, Yokohama, Japan.
5. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation. 第17回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2012年8月、大阪。
6. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation. Benzene Symposium, August 2012, Copenhagen, Denmark.
7. 佐伯久美子、他：ヒトES/iPS細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導。第33回日本肥満学会、2012年10月、京都。
8. 佐伯晃一、佐伯久美子、他：ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月、福岡。
9. 佐伯久美子、佐伯晃一、安田和基、戸辺一之、他：ヒト多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞の造血ストロマ機能の評価。第12回日本再生医療学会総会、2013年3月、横浜。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法及び細胞療法、内科療法
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
PCT/JP2012/61212

平成24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

発明の名称：霊長類動物胚性幹細胞の培養及
び継代方法、並びにその分化誘導方法
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、佐伯晃一、
中原正子、中村直子、過足芳子、松山さと子、
米田麻子

出願人：独立行政法人国立国際医療研究セン
ター、田辺三菱株式会社

特許第 5067949 号

平成24年 8月24日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小児の網脈絡膜の微細構造の把握に関する研究

国立成育医療研究センター 眼科・細胞医療研究室

東 範行

研究要旨 広画角眼底カメラと長波長光干渉断層計を用いて、小児の眼底疾患の微細構造を検討した。全身麻酔下で最高度の画像を取得することができ、硝子体、網膜、脈絡膜、視神経の観察のための条件を設定した。200例を超える疾患の検査を行い、未熟児網膜症や先天異常を含むほぼ全ての眼底疾患を観察し、その病態を明らかにする方法が整った。

研究分担者

- (1)近畿大学 日下俊次
- (2)株式会社トプコンメディカルジャパン 大塚徹
- (3)株式会社日本ルミナス 谷本晴男

A. 研究目的

小児の失明・重篤な視覚障害の原因の過半数は眼底疾患で、未熟児網膜症が約40%、先天異常が50%を占める。他に、感染症や腫瘍も視力を脅かす疾患である。その疾患の種類はきわめて多いが、原因や病態が明らかでないものも多い。近年、画像技術の発達により、無侵襲な生体観察検査法が開発された。本研究では、この分野で最新鋭技術をもつ企業と共同で、眼底疾患の構造を詳細に把握し、原因や病態の解明、進行防止、治療開発に資する知見を得ることを目的とする。

小児の眼底疾患は、早期に発見し、治療と視力訓練を行えば、有用な視力が期待できるものもある。視力が期待できないものでは、早期にリハビリテーションを行い、社会参画を促す必要がある。しかし、就学前は眼科検診が行われなため発見が遅れる点が問題であるばかりか、原因や病態が明らかでないものも多い。早期発見・早期治療が重要であることを鑑みれば、原因、病態の解明は極めて速やかに行われるべき課題である。小児では、眼底を広範囲に撮影、血管造影を行える検査装置が開発され、画像取得の改善が行われている。成人の網膜疾患においては、光干渉断層計による無侵襲な生体観察検査によって、病態把握が広く行われている。これに長波長を用いた新規技術を用いれば、網膜のみならず脈絡膜・視神経まで観察できる。両方の新規技術を用いれば、眼底の水平、垂直方向、3次元の微細構造を観察することができる。従来は検眼

鏡による観察や簡易写真撮影しかできず、未知な点が多い小児疾患に展開することによって、新たな原因・病態に関する知見を多く得ることができる。国立成育医療センターでは、これら難治性眼底疾患の診断・治療のために全国各地より患者を受け入れており、その症例数は随一であるので、その特性を生かして効率よく広範囲にわたった研究が展開できる。

本研究を遂行することで、これまで不明であったさまざまな小児の眼底疾患の原因や病態は解明されれば、早期発見・診断早期治療を図ることができ、成人と異なって視覚発達期で可塑性をもつ小児では、飛躍的な成果を期待できる。さらに、進行防止や新規治療開発への道筋が整えば、患児たちのQOLが飛躍的に向上する。視覚障害において、残存視力を向上させ、早期に社会参加を可能とすることは、少子時代の医療、福祉問題の解決に大きく寄与することができる。

B. 研究方法

1. 安定した眼底検査システムの構築

全身麻酔等を用いて、系統かつ効率の良い検査プロトコルを作成する。検査の種類としては、通常の眼底カメラに加えて、広画角眼底カメラによるカラー眼底撮影と蛍光眼底造影、網膜の微細構造観察のための光干渉断層計測(OCT; 手持ちOCTと長波長OCT)を行う。

2. 眼底検査の条件設定

眼底検査における広画角眼底撮影やOCTなど、眼底全体を網羅する検査の条件設定を行う。

3. 未熟児網膜症、先天異常の初期病変の検査疾患における、一時期の臨床像を詳細に検討する各疾患で、20例以上のデータ集積を目指す。

4. 未熟児網膜症や網膜剥離等、手術治療を行った場合の経過観察

1年間にわたって、治療を行った症例に関して、その病態の変化を観察する。

5. データ解析

得られたデータについて、疾患ごとに、網膜細胞密度や形態の変化を解析し、原因や病態を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる眼底写真撮影、光断層干渉検査などの医療機器の基本形態は、いずれも厚生労働省で認可され、その検査行為は医療保険によってまかなわれているので、倫理的問題はない。ただし、新規の技術を開発し、これを応用する場合は、倫理委員会に申請し、その審議、決定のもとに施行する。

C. 研究結果

1. 安定した眼底検査システムの構築

外来、病棟における覚醒下でも十分な撮影ができたが、ことに全身麻酔下では、すべての症例で、安定して検査を行い、眼底のほぼ全体のデータ取得ができた(図 1)。OCT では通常の外来では不可能な 96 枚加算画像を、安定して取得できた。

2. 眼底検査の条件設定

広画角のカラー眼底撮影および蛍光眼底造影の条件設定、OCT の眼底深達度と画像加算の条件設定を行った。これによって、水平面では眼底全体のパノラマ化(図 2)、垂直面では硝子体、網膜、脈絡膜、視神経いずれの深達度においてもが可能となり(図 3)、さらに 3 次元での再構築画像を作ることも可能となった(図 4)。

3. 未熟児網膜症、先天異常の初期病変の検査

各疾患で、200 例以上のデータを集積できた。

4. 未熟児網膜症や網膜剥離等、手術治療を行った場合の経過観察

手術治療を行った 55 症例に関して、その病態の変化を観察した。

5. 画像解析

疾患ごとに、眼底像や血管の変化を解析した。未熟児網膜症 10 例では、血管増殖の活動性、網膜の障害状況がわかり、光凝固や硝子体手術による鎮静化が明らかになった(図 5)。家族性滲出性硝子体網膜症 3 例でも、同様に血管増殖の活動性と手術による鎮静化が明らかであった。さらにほとんど全ての種類の眼底疾患で、病変の範囲と程度の把握に有用であった。

眼底撮影

OCT

側臥位



仰臥位



図 1 全身麻酔下での検査

カラー眼底撮影像



蛍光眼底造影像

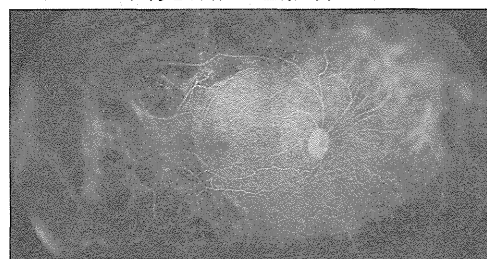


図 2 広画角撮影による眼底のパノラマ化

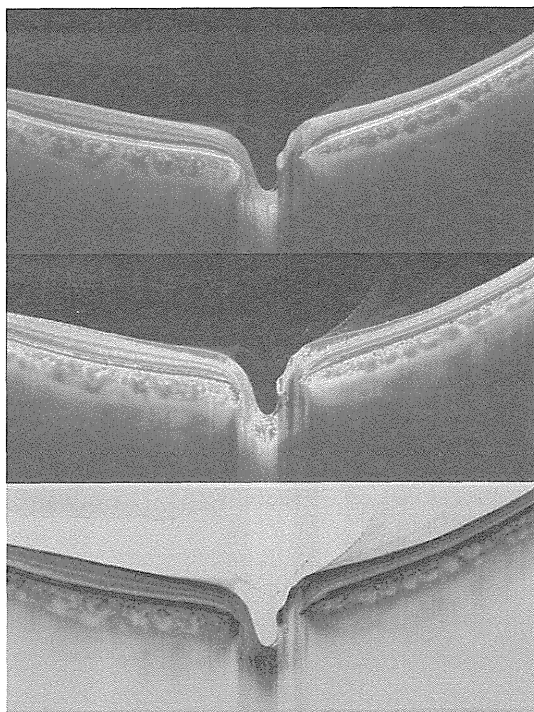


図 3 硝子体、網膜、脈絡膜、視神経の
広範囲を網羅する鮮明な OCT 画像

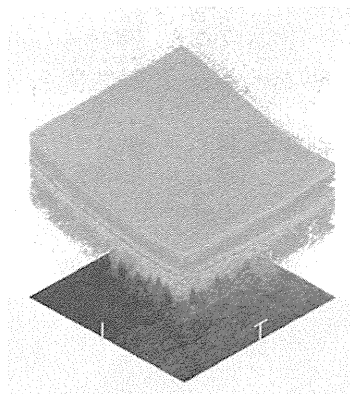


図 4 網膜と脈絡膜の 3 次元構築画像

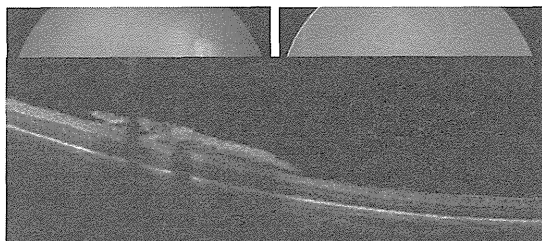


図 5 未熟児網膜症発芽病変の広画角像、
蛍光眼底造影、OCT（光干渉断層計）

D. 考察

広画角眼底カメラは、130 度の撮影画角をもち、従来の 30~80 度の機器と異なり、広範囲の写真撮影ができる。さらに、接触型なので、従来の機器よりも周辺部まで眼底を撮影できる。小児では未熟児であっても眼底のほぼ全域を撮影でき、これを合成してパノラマ化すれば、眼底水平面での全体像を記録が可能となった。一方で、長波長光干渉断層計は、深達度が高いために、網膜のみならず、脈絡膜、強膜、時には眼球外組織まで描出できる。小児においても全身麻酔下では、最高度の画像を取得することができることが明らかとなった。今回設定した硝子体、網膜、脈絡膜、視神経の観察のための条件設定をおこなうことにより、眼底の垂直面でも微細構造を光学顕微鏡レベルで観察することが可能となった。さらに、これを 3 次元画像に再構築すれば、従来の方法では得られなかった眼底疾患の病態を明らかにすることができる。

既に 200 例を超えるさまざまな疾患で検査を行っており、その画像解析を進めている。今後は、この検査プロトコルを十分に活用して、さまざまな疾患の病態を解明する予定である。

E. 結論

広画角眼底カメラと長波長光干渉断層計を用いて、小児の眼底疾患の微細構造を検討した。全身麻酔下で最高度の画像を取得することができ、硝子体、網膜、脈絡膜、視神経の観察のための条件を設定し、病態を観察し、その病態を明らかにする方法が整った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima M, Hotta Y. Two Novel Mutations in the *EYS* Gene Are Possible Major Causes of Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa in the Japanese Population. *PLoS One*. 2012;7(2):e31036.
2. Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. *Am J Ophthalmol* 2012;153(1):81-87.
3. Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of

- microphthalmia in Japan. *Jpn J Ophthalmol*. 2012; 56:198-202
4. Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(3):514-518.
 5. Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea*. 2012; 31:293-298.
 6. Yokoi T, Toriyama N, Yamane T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Development of a Premacular Vitreous Pocket. *Arch Ophthalmol* 2013 in press.
 7. Azuma N, Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2013 in press.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

創薬技術・戦略に関する調査研究

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
研究企画部
井口 富夫

研究要旨：「創薬基盤強化の新機軸を探る - オープン・イノベーション、バイオマーカーを中心に -」をテーマに、欧米各国の製薬企業、研究機関、及びライフサイエンス関連行政機関等を訪問し、欧米各国における最新の医薬品産業の動向を把握するとともに、創薬に関連する科学・技術の進展と先端的医療技術開発の現状等を調査、分析した。

A. 研究目的

「創薬基盤強化の新機軸を探る - オープン・イノベーション、バイオマーカーを中心に -」をテーマに、欧米各国の製薬企業、研究機関、及びライフサイエンス関連行政機関等を訪問し、欧米各国における最新の医薬品産業の動向を把握するとともに、創薬に関連する科学・技術の進展と先端的医療技術開発の現状等を把握することにより、我が国の医療体制の整備ならびに製薬企業をはじめとした研究機関の研究開発推進に寄与することを目的とする。本年度は、以下の4点に絞って調査を行った。

- 1) 大手・中堅製薬企業の経営・R&D 戦略及びアライアンス戦略
- 2) オミックス研究及びその基盤技術の動向と個別化医療進展への影響
- 3) 創薬オープン・イノベーションの現状と課題
- 4) バイオマーカーの活用状況とコンパニオン診断薬 (CDx) の将来展望

B. 研究方法

(調査参加企業の募集)

HS 財団情報委員会の下に、国外調査ワーキンググループ (WG) を組織し、HS 財団の会員企業から調査参加企業を募集した。

(訪問先の決定)

研究目的に合致する欧米の規制当局、中堅企業、公的研究機関を調査し WG で決定した。

中堅製薬企業の経営・R&D 戦略の継続調査では、特に、グローバルな知名度が非常に高いとは言えないものの自国市場で確固たる地位を築いている企業、特定領域・分野でグローバルに実績を伸ばしている企業等を

訪問することとした。

(参加企業)

第一三共、味の素、武田、大鵬薬品

C. 研究結果

(訪問日および訪問機関・企業)

平成 24 年 10 月 15 日(月)~10 月 26 日(金)

No.	訪問日	訪問機関・企業	訪問都市
01	10月15日 (月)	Alcon	Fort Worth
02	10月16日 (火)	MD Anderson Cancer Center	Houston
03	10月17日 (水)	Endo Health Solutions Inc.	Chadds Ford
04	10月18日 (木)	Novartis Institutes for BioMedical Research	Cambridge
05	10月18日 (木)	Galenea	Cambridge
06	10月19日 (金)	National Institutes of Health (NIH)	Bethesda
07	10月22日 (月)	Dako Denmark A/S	Glostrup
08	10月22日 (月)	International PharmaScience Center, Ferring Pharmaceuticals A/S	Copenhagen
09	10月23日 (火)	Stockholm Uppsala 地区のライフサイ エンス関連機関	Stockholm
10	10月24日 (水)	Neu ² Consortium	Hamburg
11	10月24日 (水)	European ScreeningPort	Hamburg
12	10月24日 (水)	Evotec AG	Hamburg
13	10月25日 (木)	Max Planck Institutes of Psychiatry (MPIP)	Munich

14	10月25日 (木)	The Munich Biotech Cluster	Martinsried
15	10月26日 (金)	GlaxoSmithKline PLC (GSK)	London
16	10月26日 (金)	European Medicines Agency (EMA)	London
17	10月26日 (金)	Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA)	London
18	10月26日 (金)	UK Trade & Investment (UKTI)	London

(各訪問先で入手した情報)

1) Alcon

- R&D 部門の従業員は 2,000 人を上回る。予算額は数年前に米国 National Eye Institute を抜き、眼科研究領域で世界最大となった (約 800M 米ドル)。
- 売却益等を除く Alcon の半期売上げは、2010 年 8 月の Novartis による株式買収後に 11% 伸長した。
- 最新の R&D 戦略は、パイプライン戦略、組織戦略、文化の 3 つの部分からなる。
- 眼科領域で科学的に理解された疾患を対象領域とし、ニーズと解決方法を調査している。
- 探索研究段階、確証を持って進めるフルスケール開発の段階、製品サポートの段階に区切ってプロジェクトを運営する。
- R&D は新規製品開発をリードする部門と、基盤機能を持つ中核的研究拠点から構成される。各ビジネスフランチャイズと連動して運営され、リソースはプロジェクトベースで配分される。
- 各機能の専門家が“コアチーム”として集合し、プロジェクトを運営・推進する。
- 創薬研究は、Novartis の主管であり、関連組織は Novartis の研究所に統合された。創薬のボトルネックは標的の同定にあると考えている。Novartis の強みである化合物ライブラリー、遺伝子療法や生物工学の領域に期待している。
- 年間 2,000 を超える企業とコンタクトがある。ミーティングやフォーラム (投資会社カンファレンスを含む)、ウェブ等で調査し、戦略にマッチして技術的に優れた企業を選択して提携している。

2) MD Anderson Cancer Center (MDACC)

(1) IACS

- IACS は、アカデミックな基礎研究と医薬品研究開発のギャップを埋めるために、MDACC が自らの研究成果を企業的成果にまで育てる (Industrialize) ことを目的に設立された。
- 人材も製薬企業出身の研究者や専門家を中心に登用されている。
- Context-Specific Genetic Screen と呼ばれる手法で、がん選択的に効果がある標的分子の同定を行う。これは特定のがん遺伝子やがん抑制遺伝子に対し、遺伝子異常がある状況下 (Context Specific) でだけ阻害をすると抗腫瘍効果が得られる標的分子を、ゲノム全体から同定する手法である。従って、正常細胞への副作用が非常に低い分子標的薬開発が期待できる。
- IACS では標的分子に対して、リード化合物同定及び修飾、更に前臨床試験実施までを行うことができ、製薬企業のような機能を有している。
- このような組織 (IACS) を設立したのは、従来の基礎研究や学術論文発表を主眼とする体制から、今後は新規医薬品を創製していくことを、MDACC の最も重要な役割と位置付けたためである。

(2) Moon Shots Program

- Moon Shots Program では、1960 年代に、米国が月に行くと言言することにより偉業を成し遂げたように、まず非常に難易度の高い目標を設定し、その達成のために何をすべきかとの発想で研究を推進している。現段階で 6 プロジェクト (急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、悪性黒色腫、肺癌、前立腺癌、乳癌と卵巣癌) にて同プログラムが進行中である。
- トリプルネガティブ乳癌とハイグレード漿液性卵巣癌では、①5 年生存率を改善すること、②フロントラインの治療体系を改善し薬剤・医療の開発を行うこと、③初年度に非常に有望な治療薬の治験を開始すること、④早期に非常に悪性の乳癌を検出するイメージング技術を確認すること、⑤薬剤耐性メカニズムを解明し長期に効果がある治療法を同定することの 5 点を目標に掲げている。
- 今後は、遺伝子の変異パターンで層別化し、がん腫横断的に本プログラムを推進する。
- 全プログラムにおいて、がん研究で最も困難な生存率改善という目標値が設置されている。