

Tomohisa Nakada, Kazuaki Ikejiri, Kei Ogawa, Noriko Hisanaga, Kazuya Maeda and Yuichi Sugiyama, COMPARISON OF UNBOUND INTRACELLULAR-MEDIUM CONCENTRATION RATIOS OF ANIONIC DRUGS IN RAT AND HUMAN HEPATOCYTES, 10th ISSX (2013,Oct., Tokyo)

吉門崇、吉田健太、中田智久、小谷直生、前田和哉、杉山雄一、肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルを用いた解析 - 腸肝循環を考慮した合理的なモデルへの発展- 日本薬剤学会第 28 年会 愛知 2013 年 5 月 23 日～25 日

Maeda K and Sugiyama Y, Prediction of Transporter-mediated DDIs Involving Hepatic Transporters, The 16th International Conference on Drug-Drug Interactions (DDI-2013), Seattle, WA, USA, 2013 年 6 月 24～27 日

吉門崇、吉田健太、前田和哉、杉山雄一、トランスポーターを介した薬物間相互作用予測のための腸肝循環および in vitro 膜透過性を考慮した生理学的薬物速度論モデルの提案、日本薬物動態学会第 28 回年会 東京 2013 年 10 月 9 日～11 日

張煊、前田和哉、楠原洋之、Characterization of uptake mechanism of triptans in hepatocytes、日本薬物動態学会第 28 回年会 東京 2013 年 10 月 9 日～11 日

尾上朋弘、前田和哉、楠原洋之、Quantitative prediction of drug-drug interactions with telaprevir using a physiologically based pharmacokinetic model、日本薬物動態学会第 28 回年会 東京 2013 年 10 月 9 日～11 日

張煊、前田和哉、楠原洋之、肝細胞におけるカチオン性薬物の取り込み機構の解明、第 57 回 日本薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月 26 日

尾上朋弘、前田和哉、楠原洋之、HCV 治療薬における薬物間相互作用の定量的予測法の検討、第 57 回 日本薬学会関東支部大会 東京 2013 年 10 月 26 日

張煊、前田和哉、楠原洋之、肝細胞を用いたトリプタン系薬物の取り込み機構の検討、第 35 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 東京 2013 年 11 月 21～22 日

前田和哉、薬物とトランスポーターの相互作用による薬効・副作用発現の変動とその予測にむけて、第 35 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 東京 2013 年 11 月 21～22 日

和泉沙希、野崎芳胤、小森高文、前田和哉、竹中理、草野一富、吉村勉、楠原洋之、杉山雄一、有機アニオントランスポータ OATP1B1 の基質依存的な阻害特性の差異に関する検討：典型的基質 Estradiol-17 β glucuronide, Estrone-3-sulfate, sulfobromophthalein を用いた比較、第 28 回日本薬物動態学会年会 東京 2013 年 10 月 9 日

野崎芳胤、和泉沙希、小森高文、前田和哉、楠原洋之、杉

山雄一、OATP1B1 を介した薬物間相互作用リスクの適正評価を指向した in vitro 試験に用いるプローブ基質の検討、日本動物実験代替法学会 代 26 回大会 京都 2013 年 12 月 20 日

金森敏幸、須丸公雄、杉浦慎治、佐藤琢、柳川 史樹：培養技術によるヒト細胞の機能誘導、日本動物実験代替法学会第 26 回大会、京都、2013 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当事項なし

腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化 による医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築

独立行政法人 医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部
野村 大成

研究要旨：ヒト組織移植に最適な Super-SCID マウスを用い、平成 25 年度はヒト患者由来がん組織等疾患組織 120 例および正常組織 23 例の移植を行い、38 症例の臨床がん組織の再生可能な形での凍結保存に成功した。移植腫瘍が自然遠隔転移することをマイクロサテライトを用いて確認すると共に、微生物モニタリングも実施し安全性を確認した。これら患者由来の疾患組織に関する、臨床所見、病理所見に加えて、遺伝子変異・発現の変化の調査を開始し、新薬開発における有用性を産学官で検証した。これにより、創薬ニーズに合致した有効性、安全性評価システムの基盤を構築することにより、国民の保健・医療・福祉の向上に役立てる。

研究組織

- (1) 医薬基盤研究所 難病・資源研究部
野村大成、梁 治子、小原有弘、
吉留克英、立花 功
- (2) 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 竹森 洋
- (3) 大阪大学 医学系研究科 野々村祝夫、
奥村明之進
- (4) 新潟大学 医学系研究科 榎本隆之
- (5) 第一三共株式会社 癌研究所 鎌井泰樹
- (6) 株式会社桃谷順天館 山原 年
- (7) 武田薬品工業株式会社 医薬研究本部
改正善彦（平成25年10月まで）
山岡万寿男（平成25年11月以降）

A. 研究目的

Bosma 博士の開発した T 細胞、B 細胞機能の欠如した SCID マウスより IgM, IgG が検出限界以下のものを 20 代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。これにより、これまで生着したことのないヒト悪性腫瘍が急激に増殖し、自然遠隔転移すること（J Rad Res, 1990, Jpn J Cancer Res, 1991, 93）、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること（Carcinogenesis, 1992, Cancer Det, 1997, Cancer Lett, 1998, 2002）、最終的には、ヒト正常臓器・組織の長期間（～3 年）の継代維持に成功した（Cancer Res, 1997, Cancer Lett, 1998；以後 Super-SCID と呼ばれる）。350 回にわたり、腫瘍等ヒト疾患組織の維持を行ったところ移植後の病理組織像、機能、遺伝子発現等はよく維持されている（Mutat Res, 2008）。また、移植ヒト皮膚に太陽紫外線類似光

を照射し、世界で初めて、人工的ヒトがん誘発に成功した（Cancer Res, 1997）。骨髄、免疫細胞（Mutat Res, 2008）、ヒト胎児組織も増殖分化し継代維持でき、この分野で他国の追従を許さず世界をリードし続けている。

また、政策創薬総合研究（平成21～23年度）では、20年前にプログラム凍結保存したヒト頭頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等の再移植再生に成功し、新たにヒト腫瘍277症例の移植、100正常組織、胎児由来組織の継代維持とプログラム凍結保存に努め、総括的ヒト組織維持システム構築の基礎を確立中である。

その成果は、評価委員会においても医薬基盤研究所の特有の研究として評価され、平成24年度より創薬のニーズに合わせ企業も含めた産学官共同研究として、創薬基盤推進研究事業（24年度はマッチング研究）を開始した。24年度は、これまで不足していた腎がん等泌尿器系腫瘍の移植や胸水中からの肺がんの樹立等110例の移植を行った。

25年度は、前年度に引き続き、ヒト臓器・組織移植用Super-SCIDマウスの量産、患者由来の新規原発腫瘍の移植と転移の確認、体液中よりのがんの樹立、継代移植・保存ヒト腫瘍の微生物モニタリング、および、正常ヒト組織の維持を行い、確立された患者由来臨床がん組織PDX（Patient-Derived Xenograft）に関する臨床所見、病理所見に加え、遺伝子変異・発現の変化の調査を開始する（図1）。いずれも我々が20年以上世界をリードしてきた研究の発展を期するものであり、その成果は医薬品等の有効性・安全性評価に用い

られ、新薬開発を促進する。それにより国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献するのを目的とする。

B. 研究方法

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持と薬剤およびヒト組織に合わせた系統の作製・量産； それぞれのヒト組織、試験医薬品に合った組み合わせをまとめるとともに、新たに *op* 遺伝子の導入を行い、マクロファージ機能欠損 SCID マウスを開発する（野村、研究協力者：医薬基盤研究所・足立、小浦）。それぞれのヒト組織、試験医薬品に適した SCID マウスを基盤研にて選別し目的にあったものを民間企業等で使用できるようにする（野村、鎌井、改正-山岡、山原、研究協力者：アステラス製薬・遠城）。
2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植； 24 年度計画を継続し、新規移植した原発腫瘍、転移組織、特に、複数の前立腺がんの継代維持と転移モデルの作製、卵巣がんの発生機序解析、新たに成功した GIST の継代維持とマーカー遺伝子の検索を行う（野村、立花、吉留、足立、野々村、榎本、研究協力者；大阪大学・辻村、医薬基盤研究所・坂巻、鳥、松宮）。また、非手術的臨床がん組織保存法として、CTC、胸水等からの樹立を試みる（野村、榎本）。
3. 前立腺肥大は、高齢男性の半数近くに発生し、QOL を低下させる難治性疾患である。ヒト前立腺肥大組織の継代維持を行うとともに、男性ホルモン依存性、免疫染色による機能の調査等を行い薬効評価系を樹立し、有用性を評価する（野村、野々村、松宮、辻村）。
4. 移植保存ヒト腫瘍の微生物モニタリングを行い、安全に使用できるようにする（小原、梁、野村）
5. ヒト正常成人組織・胎児組織の長期維持； 継代維持が可能になったヒト胎児由来組織（脂肪、皮膚他）の資源保存を継続して行う（野村、足立、榎本）。ヒト皮膚組織、特に胎児皮膚組織についてはマイクロアレイを用い遺伝子発現を解析する（野村、梁、竹森）。皮膚細胞を利用して、がん細胞における未分化性と実際の未分化・分化の違いを見分けるためのマーカー同定を行う（竹森、山原）。研究施設および移植技術の関係から、移植皮膚による研究を医薬

基盤研究所にて行う。

6. データベース化に向けての移植組織の継代維持による形態・機能および遺伝子変異・発現の変化の調査； 継代維持、再生可能なプログラム凍結保存されたヒト腫瘍等疾患組織について、臓器・組織別、臨床・病理分類にそった臨床所見、病理病態所見に加え、PCR 解析、マイクロアレイを用いた遺伝子変異・発現の変化等調査を開始する。これにより、生きたヒト腫瘍等疾患組織を用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムにつなげる（野村、梁、竹森、吉留、奥村、野々村、榎本、立花、足立、鎌井、改正-山岡、遠城）。

7. 患者由来がん組織移植モデルを用いて既存医薬品等抗腫瘍活性を評価し、本システムの有用性を試みる（野村、野々村、鎌井、改正-山岡、遠城、辻村、足立）。

8. 研究の総括（野村）。

（倫理面への配慮）

- 1) 手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（承認番号：8、代表・野村）、12週未満胎児組織に対しては、「ヒト胎児組織維持SCIDマウスを用いた医薬品等評価システムの開発」（承認番号：9、代表・野村）の2課題で、倫理委員会の承認を得ている。手術時等で採取されるヒト組織の譲渡に関しては、医療機関（大阪大学医学部附属病院、隈病院、神戸海星病院、平松クリニック、大阪警察病院、大阪中央病院）、骨髓細胞については、医薬基盤研究所、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受け、厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、匿名化の上、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除に関して、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

また、大学等および企業研究所との所外共同研究についても、医薬基盤研究所理事長の承認のもとに実施できるよう倫理委員会の承認を得ている（承認番号：8、代表・野村）。

- 2) 動物実験に関しては、課題「ヒト組織維持SCIDマウスを用いた環境因子および医薬品等先端医療評価システムの確立」（承認番号：

DS18-086R13、代表・野村)により、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究を行っている。

C. 研究結果

本研究課題について、当初研究計画・方法どおり実施した。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；

C. B17-*scid* [原種] 由来の C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* マウスを常備し、*bg^l*、*lps* 導入等を行い、25 年度に C3H/HeJ/N0s-*scid*; *bg^l*; *LPS*、C3H/HeJ/N0s-*scid*; *bg^l*; *LPS* *lps* を近交化した(野村、足立)。また、単に拒絶反応を起こさないだけでなく、薬剤等の代謝活性化が出来ないマウス系統があることより、薬剤およびヒト腫瘍に適切な SCID マウスを用意した。それぞれのヒト組織、試験医薬品に適した SCID マウスを企業研究者に使用しやすいようにした(野村、足立)。25 年度は、さらにマクロファージ機能をなくすため、*op* 遺伝子の導入を試みた。*Osteopetrosis* 遺伝子は劣性ホモで発症し、弱く、発育不全があるため交尾・出産は不可能であるので、IVF を行い Super-SCID マウスバックグラウンドに *op* 遺伝子の導入を行い、生存を得た。近交化を行う(野村、小浦)。

2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；

平成 22-23 年度に新規ヒト腫瘍 277 症例を、平成 24 年度には新規ヒト腫瘍 110 症例、25 年度には 120 症例移植した(図 2)(野村、吉留、立花、野々村、榎本、奥村、足立、辻村、鳥坂巻、松宮)。

移植したヒト組織の殆どは維持されるが、3-4 ヶ月で消失する例が少数例でみられた。SCID マウスへの継代移植を行い 2-3 代継代しても増殖の遅いもの(継代移植後 6-8 ヶ月たっても腫瘍が大きにならない)は中止し、6 ヶ月以内に大きな腫瘍を形成するものを選び順次プログラムフリーザーにて再生可能な形で凍結保存した。図 2 に、現在再生可能な形で永久凍結保存できている各臓器がんの症例数を記載した。肺がん 28、膵がん 8、胃がん 7、大腸がん 8、腎がん・膀胱がん等泌尿器各腫瘍 13 例などである。今まで移植が極めて困難であったヒト前立腺がんについても適切な SCID マウスに移植することにより 24 年度に報告したとおり 3 症例が SCID マウス皮下で増殖するようになり、継代維持に成功した。第 1 例では、マウス血中

のヒト PSA 濃度が増加し、雌マウスに移植しても全く増殖せず(野村、足立)、移植マウスの去勢により消失する(改正・山岡、野村)。ホルモン感受性前立腺がんは前臨床試験には格好の PDX である。新たに樹立した前立腺がん 2 症例は第 1 例と異なりいずれも PSA を分泌しておらず、ホルモン抵抗性症例である。

1) CTC；

ヒト前立腺がんは、骨転移(血行性転移)を起こしやすいことより、CTC(Circulating Tumor Cell)からの作製を行った。高値の PSA を伴う症例で、末梢血の皮下、腹腔内注入を行ったが成功しなかった(野村、野々村)。しかし、体液からのがん細胞の検出法として、肺がん患者 5 例からの胸水を Super-SCID マウスに移植した。全て立体構造をもつ腺がんを形成した(野村)。

榎本は、手術時採取した卵巣がん(高悪性度漿液性腺がん)組織および腹水サンプルよりがん細胞を抽出し、血清を含まない浮遊培養系を用いて細胞培養を施行した。同条件下にてスフェロイド細胞と呼ばれる特有形態を持つ細胞の安定増殖に成功した。同細胞の免疫不全マウスへの移植により患者検体と同様の組織形態を呈する腫瘍の形成(造腫瘍能)や Nanog・Sox2 などの幹細胞因子の発現ならびに in vitro における分化能などのがん幹細胞性質を持つ細胞集団である事を確認している。

現在、卵巣漿液性腺がん由来スフェロイド細胞を用い、卵巣がん幹細胞の新規制御因子の検索を進行中である。加えて、がん種間におけるがん幹細胞性質の共通性・差異を見出す事を目的に子宮体がん・子宮頸がん由来のスフェロイド細胞培養を開始している。

2) がんの浸潤、転移のフォロー；

最近の基礎的腫瘍学の進歩により、がん細胞の悪性度の増強と転移能の獲得には、がん細胞の上皮間葉移行(Epidermal Mesenchymal Transition, EMT)という現象が大きな役割を果たしており、その機序には様々なサイトカインの関与が明らかにされてきた。これらのサイトカインの供給源は、がん細胞そのものだけでなく間質の繊維芽細胞も関わっていると考えられている。

奥村は、肺がん細胞株から分泌される TGF β と IL6 が繊維芽細胞を活性化すること、活性化された繊維芽細胞が肺がん細胞に EMT を強く誘発して転移能を獲得させること、また動物実験においても、活性化された肺がん細胞を活性

化された繊維芽細胞とともに静脈投与することにより、転移巣形成が増強されることを明らかにした。さらに上記の減少が抗 IL6 受容体抗体によって阻害されることも明らかにした。これらの結果は、肺がんの組織内の間質の繊維芽細胞の機能を示唆するものであり、間質の機能の抑制ががん転移の制御につながり、がん治療の成績向上に貢献することを示すものである。テトラスパニン CD9 と CD81 のダブルノックアウトマウスは、マクロファージの活性化により、肺気腫、骨粗鬆症など、老化フェノタイプを自然発症する。マクロファージの CD9 と CD81 発現を増強させる既存薬をスクリーニングしたところ、スタチンに CD9/CD81 発現増強効果作用があることが見出された（立花）。

ヒト組織、マウス組織を正確に識別する普遍的な手技として、梁がマイクロサテライト解析法により迅速、客観的に識別する手段を確立している。ヒト腫瘍は SCID マウス体内で増殖し、自然遠隔転移する。移植マウス体内で原発巣外の場所に発生した腫瘍が、ヒト由来の転移巣であるか、マウスの組織であるかを迅速、正確に判定する必要がある。開発したマイクロサテライト解析法により、胃がん、肺がん等 12 種のヒトの初代または継代移植がんの転移組織、計 205 片の由来を調べた。ヒト腫瘍の転移は、正常マウス組織へのヒト腫瘍の混入であるから、殆どはヒト・マウス組織が混在する。（167；81%）、マウス由来のみおよびヒト由来が少/微量は、38 片（19%）であった。転移巣の組織混合比は、それらの原発巣とほぼ同比であった。転移と思われた組織でマウスのみと判定された組織が 6 片（3%）あった（梁、野村、坂巻、足立）。

ヒト乳がんは、図 2 にも示した通り、SCID マウスに移植しても、急速な増殖は認めがたく、マウス内での自然遠隔転移も起こりにくい（野村、吉留）。吉留は、臨床的に転移を迅速に検出手技として、One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) 法の開発・導入時の症例の予後を追跡し、保険適応後の臨床応用における OSNA 法の有用性を検討した。OSNA 法を併用した詳細な SLN 転移検索により微小転移を診断できた。原発巣を Super-SCID に移植し、継代を試みている。リンパ節への微小転移の状況と移植片からの転移状況とを検討し、実際の臨床経過における長期予後評価に有用であるか検討する方針である（吉留、野村）。

3. ヒト前立腺肥大組織（BPH）を Super-SCID マウスに移植し 6 ヶ月経過した組織をアンドロゲンレセプター（AR）と PSA 染色を行い、機能的な前立腺組織であることを確認した（図 3）。デュタステライド投与群は非投与群に比べ、2 ヶ月目から Ki67 染色陽性率が低下した。また、COX2 陽性細胞率が有意に低下した（図 4）。

タダラフィル投与群は、非投与群に比べ、2 ヶ月目から Ki67 染色陽性率が低下し、同時に eNOS 陽性率が上昇した。

4. 継代、維持、保存ヒト腫瘍の微生物モニタリング；

ヒト臨床がん組織の移植に際しては、マイコプラズマ、肝炎抗原/抗体、成人 T 細胞白血病、HIV、梅毒反応陰性症例の組織のみ医薬基盤研究所動物実験施設に導入している。Super-SCID マウスに移植、継代維持、保存を行っているヒト組織について、使用上の安全のため、ウィルス検査を小原が実施した。24 年度 41 検体のウィルススクリーニング検査を実施し、EB ウィルス陽性検体が 27 検出された。25 年度は 31 検体のウィルススクリーニング検査を実施し、24 年度に同じく、EB ウィルス陽性検体が 18 検出された。EB ウィルスはヘルペスウィルス科に属するウィルスの一種であり、ヒトヘルペスウィルス 4 型（human herpesvirus 4、HHV-4）ともいう、2 本鎖 DNA を持つウィルスである。ヒトが一度感染すると終生潜伏感染するものであり、日本人においては 90% が抗体を保有しているとされている。24、25 年度の結果をまとめると、腫瘍等ヒト疾患組織由来試料 72 検体中 45 検体において EB ウィルスが検出されたが、これは検査試料内に微量に存在する B 細胞における EB ウィルスの感染を高感度に検出していると考えられ、非常に高感度なウィルス検査系が確立できた（図 5）。

5. ヒト正常成人組織・胎児組織の長期維持：

25 年度は 23 例の正常ヒト肺組織の移植を行った。臓器移植における虚血再灌流傷害の克服は移植患者の予後を規定する重要な課題であり、ヒト組織をマウスへ移植する技術へも応用できる。生薬エキスなどに含まれる成分には、食品酸化防止剤として使用されているものもあり、それらの中には、抗酸化シグナル Nrf2 を活性化するものが存在する。そこで、生薬成分のうち、Nrf2 を活性化し酸化ストレスに対する保護効果を発揮させる成分を探索し、その成分を 2 種のカラムクロマト

グラフィーで濃縮し結晶化法で純度を高める大量精製法を確立した。精製成分を1週間マウスに摂取させ、マウスから摘出した肺では、損傷が1時間遅れて発現することが明らかとなった。手術では摘出より移植まで約1時間要することより、この技術は、ヒト摘出腫瘍組織のマウスへの移植の成功率向上にも役立つものと思われる(図6)。

6. データベース化に向けての移植組織の継代維持による形態・機能および遺伝子変異・発現の変化の調査；

臨床所見に加え、継代維持凍結組織の病理学的検索、遺伝子変異の検索、およびマイクロアレイを用いた遺伝子発現レベルでの解析を開始した(野村、梁、吉留、立花、野々村、榎本、奥村、足立、坂巻、鳥、松宮)。

鎌井は、種々のがん種由来のヒト腫瘍担がんマウスを用いて腫瘍増殖速度等の特性を確認した。さらに、本プロジェクトで樹立された担がんモデルマウス由来の腫瘍での遺伝子あるいはタンパクの発現プロファイリングにより、臨床のがん組織で特異的に発現が亢進していることが報告されている複数の分子が、当該モデルにおいても高発現していることが確認され、これら分子を標的とする抗がん剤の評価に有用であることが示唆された。これらのモデルで新規薬剤の評価を開始した。

改正-山岡は前述の如く、前立腺がん415からDNAを抽出し、TruSeq Cancer Panelにて48遺伝子の変異を確認したところ、Met遺伝子において1181A>G(Asn394>Ser)、1124A>G(Asn375>Ser)の変異を見いだした。TP53においても変異箇所が確認されたが、機能的な影響を受ける変異ではなかった。前立腺がん3例と肺腺がん5例についても遺伝子変異と発現異常を確認中である(野村、梁)。新たに樹立した前立腺がん2症例では、GeneChipを用いたマイクロアレイ解析で、2症例ともにTNFRSF21(tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21)の発現が欠損していること(野村、足立、梁)を24年度に報告した。

7. ヒト臨床腫瘍を有するSCIDマウスを用いて抗腫瘍活性を評価し、本システムの有意性を検証した。改正-山岡は、ヒト前立腺腫瘍株の有用性を検証した。医薬基盤研究所から提供された前立腺腫瘍株#415は継代したあとの生着は良好であった(現在3代まで継代済み)。この前立腺腫瘍株はホルモン依存性の特徴を有し

ており、現在市販されている培養細胞株で免疫不全動物に移植して腫瘍を形成するホルモン依存性前立腺癌細胞株は少ないため、ホルモン薬の開発に有用な臨床腫瘍株であると考えられる。一方、去勢後退縮した腫瘍に関しては経過観察を続けたが再増殖はみられなかった。前述の如く鎌井は腭がん等を用いて既存の抗がん剤で、野村は前立腺がん415を用い抑制効果を観察している。また、これまでGISTは移植、継代維持保存が困難であったが、比較的早く増殖する6症例のGIST原発巣の凍結保存が成功し企業等でも有用性評価が可能となった(野村、吉留、足立)。

ヒトがん以外に、良性前立腺肥大組織も長期間継代維持が可能になっている(野村、足立)。前述のごとく、新しい薬剤であるタダラフィルとデュタステライドの前立腺組織への影響を、Super-SCIDマウスモデルで検討したところ、両剤とも、前立腺増殖を抑制することが確認され、NOやPGの関与も推測された(図4)。前立腺肥大症に対する治療効果判定に有効であり、期待できるものであることが分かった(野村、足立、野々村、辻村)。

D. 考察

本研究は、ヒト組織長期維持・保存・データベース化により医薬品等の有効性、安全性評価システムを構築し、創薬研究基盤技術の確立を目指している。25年度だけでも38症例の患者由来の臨床がん移植モデルPDXを作製し、臨床所見、病理所見に加え、小数例ながら遺伝子変異、発現の変化を調査できた。また前立腺肥大組織も加えて民間企業との共同研究を行いPDXの有用性を示すことが出来た。PDXは臨床がんの特性をよく示すものである一方、がんはheterogeneityが強く各組織腫瘍当たり10種以上のPDXを作成する必要がある。今後、更なる基盤の充実が必要である。これにより、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性評価を推進し、創薬の最前線において世界をリードできるものと考えている。

E. 結論

腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化による医薬品等の有効性、安全性評価システムを構築する基盤として、25年度は、ヒト臨床がん組織等移植に最適のSCIDマウスに臨床がん組織120例、正常組織23例の移植を新たに行った。1年間で、38症例のヒト

がん組織が継代維持、再生可能な形で凍結保存できた。移植ヒトがん組織は、SCID マウス体内で自然遠隔転移することもマイクロサテライト法で確認でき、臨床がんの転移モデルとしても優れていることを証明できた。また、移植ヒトがん組織の微生物モニタリングにより EB ウィルス以外の感染がなく安心して使用できることを証明した。前立腺がん、肺がん、膵がん等、まだ限られた例であるが、臨床所見、病理所見に加え、遺伝子変異・発現の変化をプロファイルした。患者由来の臨床腫瘍 PDX は、臨床がんの特性をよく反映しており、創薬研究に有用であることが示された。前立腺肥大組織の長期保存と薬効試験にも成功し、臓器移植の重大な問題である摘出ヒト正常組織の保存法の開発も行った。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masao Iwamori, Yuriko Iwamori, Satoshi Matsumoto, Shigeki Adachi and Taisei Nomura. Enhanced expression of fucosyl GA1 in the digestive tract of immune-deficient scid, nude and IgR (-/-) mice. *J. Biochem.* 154(6):541-549, 2013.
2. Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. *PLoS One*, 8(1):e54122, 2013.
3. Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L. Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *Int J Cancer*, 132: 2510-2519, 2013.
4. Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Kerrigan L, Reid YA, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch C, Masters JR, Nakamura Y, Nims RW, Storts DR, Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. 52(10): 986-8, 2013.
5. Horibe I, Satoh Y, Shiota Y, Kumagai A, Horike N, Takemori H, Uesato S, Sugie S, Obata K, Kawahara H, Nagaoka Y. Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells. *J Nat Med*. 67: 705-10, 2013.
6. Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nat Commun*. 4:1685, 2013
7. Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY. LKB1 tumor suppressor and salt-inducible kinases negatively regulate human T-cell leukemia virus type 1 transcription. *Retrovirology*. 10: 40, 2013.
8. Yu J, Hu X, Yang Z, Takemori H, Li Y, Zheng H, Hong S, Liao Q, Wen X. Salt-inducible kinase 1 is involved in high glucose-induced mesangial cell proliferation mediated by the ALK5 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 32: 151-157, 2013.
9. Hatano K, Yamaguchi S, Nimura K, Murakami K, Nagahara A, Fujita K, Uemura M, Nakai Y, Tsuchiya M, Nakayama M, Nonomura N, Kaneda Y. Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive signaling of CXCR4, ERK1/2 and c-Myc. *Mol Cancer Res.*,11(9): 1088-100, 2013.
10. Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. *Int J Urol*. 20(2):150-60 2013.
11. Nishimura K, Nonomura N, Hashine K, Kanayama HO, Ozono S, Miura T, Miki T, Kakehi Y, Arai Y, Ogawa O, Fujita R, Nonomura K, Mizokami A, Hoshi S, Akaza H. Prolonged treatment with three-weekly docetaxel plus daily prednisolone for metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicenter, phase II, open-label, non-comparative, extension study in Japan. *Int J Clin Oncol*. 18(2): 306-313, 2013.
12. Hatano K, Nishimura K, Nakai Y, Yoshida T, Sato M, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A,

- Uemura M, Oka D, Nakayama M, Takayama H, Shimizu K, Meguro N, Tanigawa T, Yamaguchi S, Tsujimura A, Nonomura N. Weekly low-dose docetaxel combined with estramustine and dexamethasone for Japanese patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Int J Clin Oncol*. 18(4): 704-710, 2013.
13. Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M., ulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 96:425-433, 2013.
 14. Funaki.S, Sawabata N, Abulaiti A, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M., Significance of tumour vessel invasion in determining the morphology of isolated tumour cells in the pulmonary vein in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, 43:1126-1130, 2013.
 15. Nojiri T, Inoue M, Maeda H, Takeuchi Y, Sawabata N, Shintani Y, Yamamoto K, Okumura M., Low-dose human atrial natriuretic peptide for the prevention of postoperative cardiopulmonary complications in chronic obstructive pulmonary disease patients undergoing lung cancer surgery. *Eur J Cardiothoracic Surg*. 44:98-103, 2013..
 16. Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Okumura M., Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer*, 82:204-213, 2013.
 17. Kawase A, Yoshida J, Miyaoka E, Asamura H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Visceral pleural invasion classification in non-small-cell lung cancer in the 7th edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer: validation analysis based on a large-scale nationwide database. *J Thorac Oncol*,8:606-611, 2013.
 18. Watanabe S, Asamura H, Miyaoka E, Okumura M, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Results of T4 surgical cases in the Japanese Lung Cancer Registry Study: should mediastinal fat tissue invasion really be included in the T4 category? *J Thorac Oncol*, 8:759-764, 2013.
 19. Yoshino, K. Enomoto, T. Fujita, M. Ueda, Y. Kimura, T. Kobayashi, E. Tsutsui, T. Kimura, T., Salvage chemotherapy for recurrent or persistent clear cell carcinoma of the ovary: asingle-institution experience for a series of 20 patients, *Int J Clin Oncol*, 18(1), 148-53, 2013.
 20. Ueda, Y. Miyatake, T. Nagamatsu, M. Yamasaki, M. Nishio, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Tsutsui, T. Enomoto, T. Kimura, T., A phase II study of a combination chemotherapy using docetaxel and irinotecan for TC-refractory or TC-resistant ovarian carcinomas (GOGO-OV2 Study) and for primary clear or mucinous ovarian carcinomas (GOGO-OV3 Study), *Eur J Obstet Gyn R B*, 170(1),259-63, 2013.
 21. Miyatake, T. Ueda, Y. Morimoto, A. Enomoto, T. Nishida, S. Shirakata, T. Oka, Y. Tsuboi, A.Oji, Y. Hosen, N. Nakatsuka, S. Morita, S. Skamoto, J. Sugiyama, H. Kimura, T., WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial, *J Cancer Res Clin*, 139(3), 457-63, 2013.
 22. Hiramatsu, K. Ueda, Y. Yoshino, K. Fujita, M. Morii, E. Enomoto, T. Kimura, T., Conization using Shimodaira-Taniguchi procedure for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix, *Eur J Obstet Gyn R B*, 168(2):218-21, DOI: 10.1016/j.ejogrb. [Epub ahead of print], 2013.
 23. Yokoyama, T. Yoshino, K. Ueda, Y. Enomoto, T., Association between Endometriosis and Ovarian Cancer: A Review of Epidemiologic, Pathologic, Genetic, and Clinical Data, Endometriosis: Risk Factors, Symptoms and Management, Pub.Date:2013-3rd Quarter, 2013,
 24. Ueda, Y. Enomoto, T. Matsuzaki, S. Kobayashi, E. Kimura, T. Yoshino, K. Fujita, M. Tsutsui, T. Kimura, T., Taxane-sensitivity of ovarian carcinomas previously treated with paclitaxel and carboplatin, *Cancer Chemoth Pharm*, 71(6):1411-6 ,2013

2. 学会発表

1. Nomura T. Opening lecture, Direct effects of radiation and chemicals on human tissue maintained in super-SCID mice. 11th Int. Conference on Environmental Mutagens. Proceedings. Page 45-46. Cataratas do Iguassu São Paulo, Brazil. Nov. 3-8, 2013.
2. Hiroshi Kiuchi, Akira Tsujimura, Testuya Soda, Kentaro Takezawa, Hidenobu Okuda, Shinichiro Fukuhara, Tetsuya Takao, Yasushi Miyagawa, Norio Nonomura, Sigeaki Adachi, Taisei Nomura. Inhibitory effects of Tadalafil on prostate cell growth; a study using a novel human benign prostatic hyperplasia xenografts in super-SCID mice. International Continence Society Annual Meeting (Aug. 30, 2013)
3. 吉留克英。細胞診・OSNA 法を併用した詳細なセンチネルリンパ節転移転移診断の有用性。第 21 回日本乳癌学会総会、浜松市、2013 年 7 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得：
 - 1) 特願 2013-094995「カスパーゼ 1 活性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及びカスパーゼ 1 活性化阻害剤の評価方法」竹森 洋、佐野坂真人、伊東祐美、瀧野裕之、川原信夫（独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館）
 - 2) 特願 2013-135040「プレロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」妻木範行、竹森 洋、瀧野裕之、川原信夫（国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所）
2. 実用新案登録：

該当なし
3. その他：

該当なし

図 1

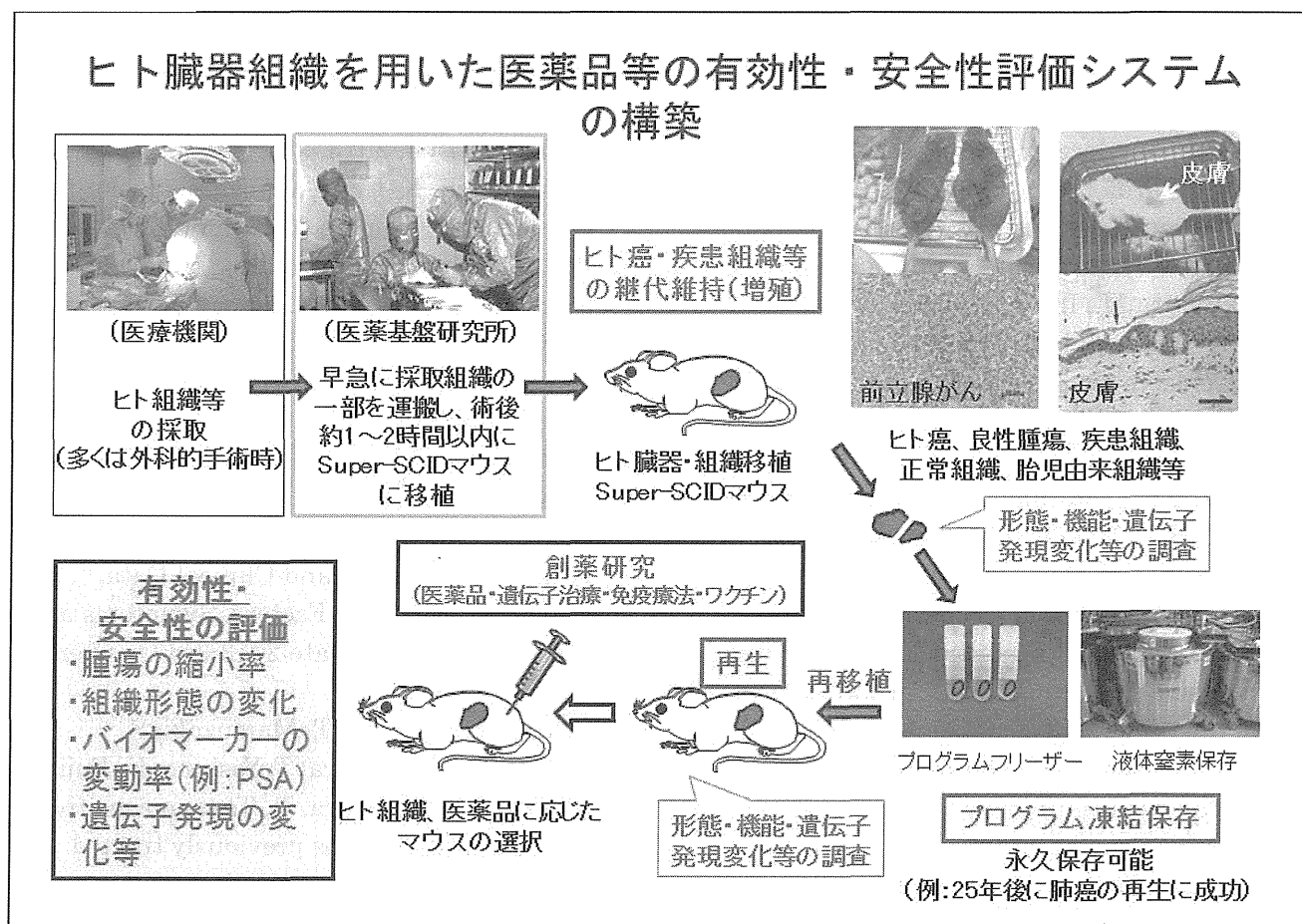


図 2

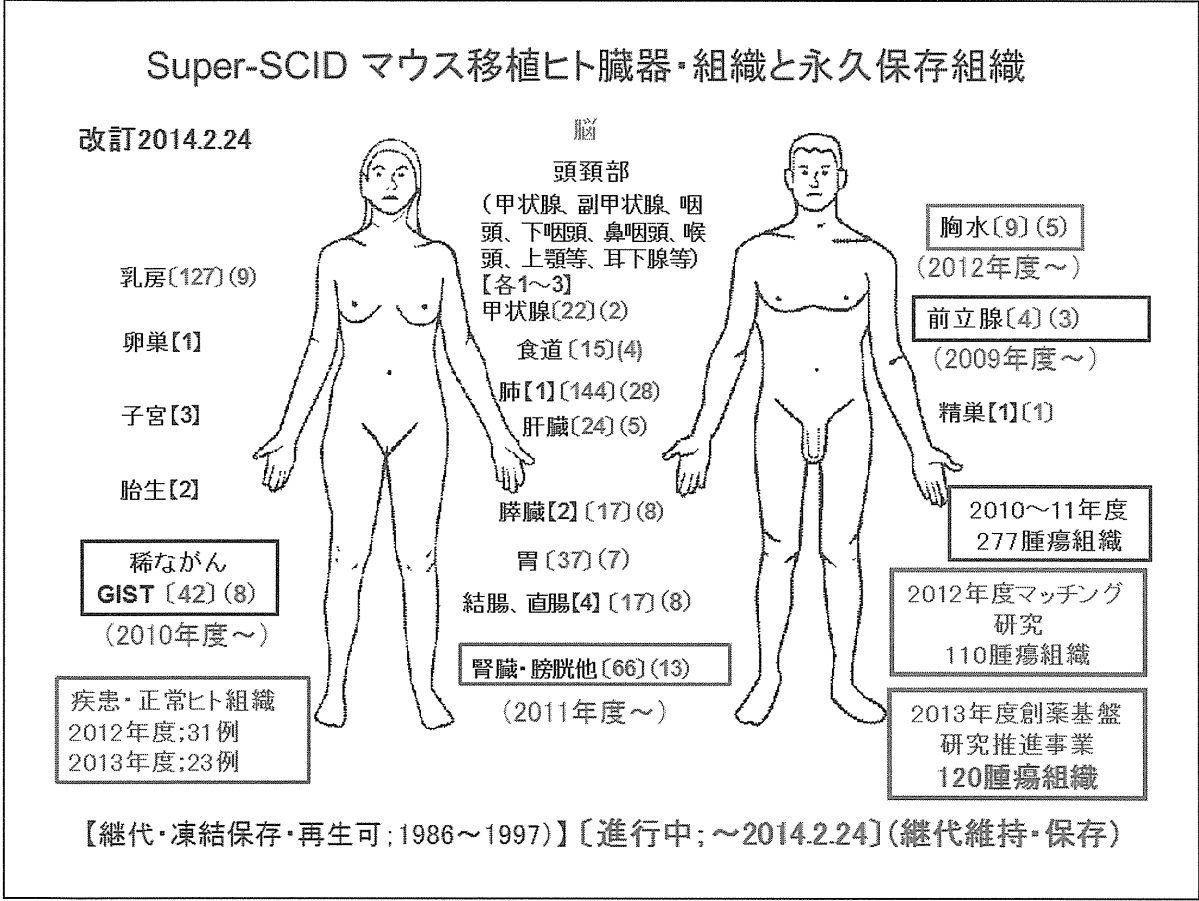


図 3 ヒト前立腺肥大組織の移植後 6 カ月のアンドロゲンレセプター (AR) と PSA 染色

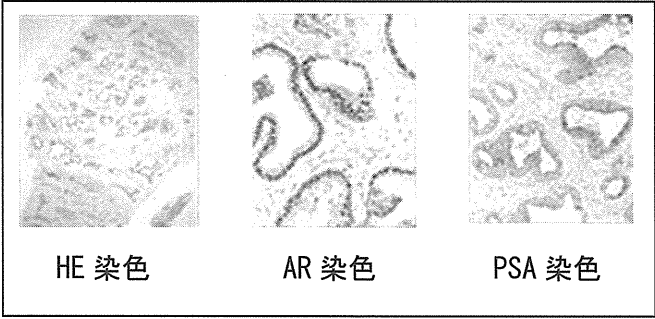


図 4 デュタステライド投与による 2、6 カ月目の Ki67 染色陽性とアポトーシス陽性細胞率

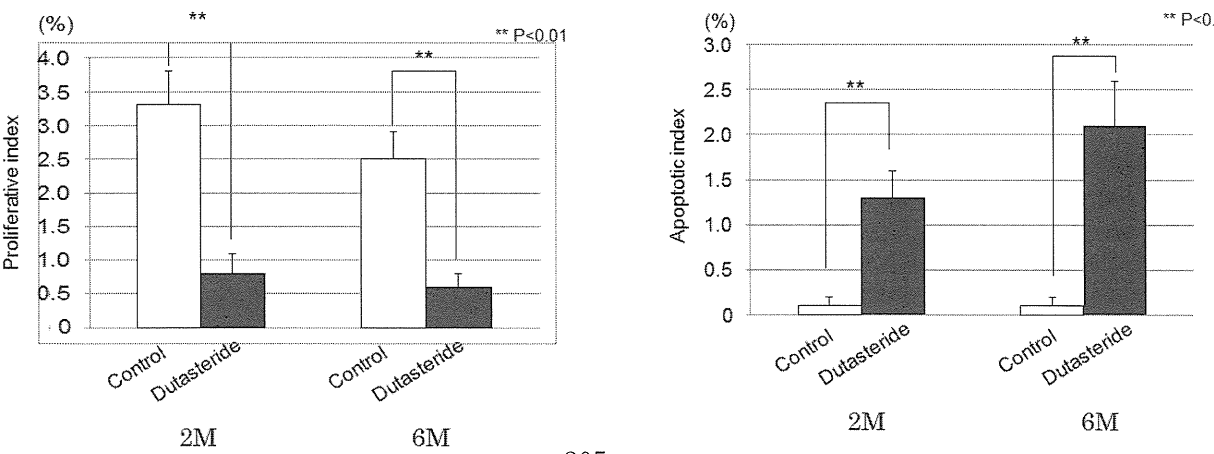


図 5 維代、維持、保存ヒト腫瘍の微生物モニタリング

〇ウイルススクリーニング検査

<方法>: 簡便・迅速・高感度なスクリーニング試験

TaqManプローブを用いたマルチプレックスリアルタイムPCR法で、96ウェルプレート2枚で検査試料8種におけるDNAウイルス10種・RNAウイルス10種を検査可能

品質管理に最適な簡便・迅速・高感度なスクリーニング検査の確立

DNA viruses	RNA viruses
CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, <u>HPV18</u>	HAV, HCV, HDV, HEV, HGV, HTLV-1, HTLV-2, HIV-1, HIV-2, <u>XMRV</u>

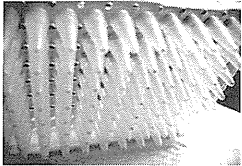
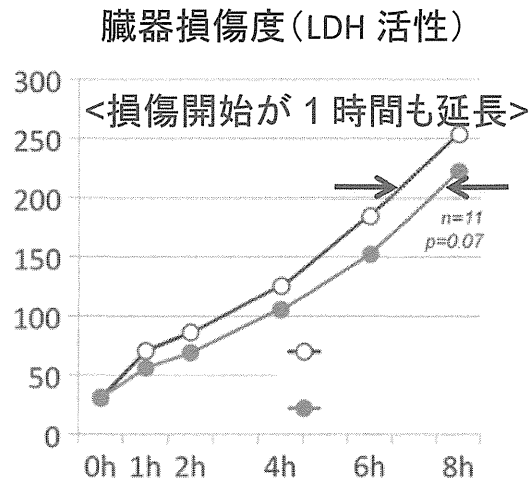


図 6 生薬成分 A を摂取させたマウスの肺摘出後の損傷抑制効果



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

独立行政法人国立成育医療研究センター
梅澤 明弘

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した。

研究組織

(独)国立成育医療研究センター	梅澤 明弘
京都府立医科大学	五條 理志
福井大学医学部	宮本 薫
(地独)東京都健康長寿医療センター	豊田 雅士
株式会社カルディオ	阿藤 大志
ジェイ・エム・エス株式会社	田中 聖真
株式会社カネカ	前田 博巳
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
コアフロント株式会社	西岡 秀展
株式会社ミラキュア	松崎 正晴
株式会社 NRL ファーマ	加賀谷 伸治
ファーマバイオ株式会社	増田 憲二郎

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的投与に近い状態の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）における心不全モデルを作製し、細胞移植実験による効果について検討を行った

6. 施設バリデーション項目の検討

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。

A. 研究目的

本研究では心不全に対する再生医療を、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。

B. 研究方法

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

遺伝子発現解析結果から得られた情報をもとに、臨床研究に対応する組換え体蛋白質（キメラ蛋白質）を作用させ、CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞の増殖能の検討を行い、寿命の延長、心筋分化誘導による細胞機能の評価を行った。

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。

(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ン

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。さらに臨床応用にむけたキメラタンパク質の増殖等に与える活性を評価し、心筋分化特性を維持するための最適な条件を見いだした。

2. 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

同定した心筋誘導因子による分化誘導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。分化誘導なしの骨髄間葉系細胞移植実験と比較してその効果を比較した。しかし組織への移植細胞の生着率の向上の課題改善が必要であることがわかり、イメージング技術による生着細胞の動態を明らかにすることを進めた。

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。増殖能低下につながるいくつかの候補因子を見だし、各因子を除外もしくは阻害因子を活性化するための血清分離を進め、一定の効果を見いだす方法を見いだした。

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 つの相においての効果を検討した。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。ここでは特に組織学的な評価を試みた。幹細胞移植における安全性や有効性は、入れた細胞の組織内動態を明らかにすることにある。投与手法の違いによる細胞の動態についてはおおむね心筋組織に収束する傾向を認めた。さらに周囲組織や他の組織での細胞動態について詳細な検討を進めた。

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同種移植を前提としてブタ由来の骨髄および胎盤組織由来細胞を単離して実験に供した。ブタ由来の細胞がヒト間葉系細胞に相当するかを検証し、その上で動物への移植実験を実施した。大動物心筋梗塞モデルを安定的作製の技術を確立したとともに、機能評価項目の抽出を行った。その結果、移植した間葉系細胞の一定程度の生着が確認され、それが心筋へと分化していることが示された。さらに機能的に新機能を改善効果が認められた。

6. 施設バリデーション項目の検討

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た。

D. 考察

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。特に心不全に対する細胞移植の心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。その意味で本実験における、由来成分がはっきりした因子での細胞評価や大動物モデルにおける評価系の確立は臨床研

究を進める上で大きな利点となっていくものと思われる。

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が、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おり、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、本研究は再生医療の一つのモデルを構築することになる。

F. 研究発表

論文発表

Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D. Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin. *Mol Cell*. 53(2):290-300, 2014.

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 126(Pt 23):5391-5399, 2013.

Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, Shihara D, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination- and Replication-Mediated Rearrangements Leading to CYP19A1 Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*. 98(12):E2013-2021, 2013.

Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 45(6):407-413, 2013.

Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes. *Liver Transpl*. doi: 10.1002/lt.23800 (in press, 2013).

Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 11:108, 2013.

Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M. De novo Frameshift Mutation in Fibroblast Growth Factor 8 in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency. *Horm Res Paediatr*. (in press, 2013).

Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol*. 13(1):102, 2013.

Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsushashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Am J Hum Genet*. 93(5):945-56, 2013.

Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol Cell Biol*. 33(22):4434-4447, 2013.

Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 4(1):2, 2013.

Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 438(4):753-759, 2013.

Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K. Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J*. 27(8):3198-3208, 2013.

Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method. *Drug Metab Pharmacokinet*. (in press, 2013).

Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis

in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One*. 8(5):e63265, 2013.

Higuchi A, Ling QD, Chang Y, Hsu ST, Umezawa A. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem Rev*. 113(5):3297-3328, 2013.

Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet*. 14:32, 2013.

Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Matsumura T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Shimada M, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 369(1-2):42-51, 2013.

Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med*. 2(4):265-273, 2013.

Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Androgen/Androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 369, 42-51, 2013.

Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370, 1-10, 2013

Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K. : A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154(4), 1648-1660, 2013. Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y.: Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154(8), 2870-2880, 2013.

Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K. : Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *The FASEB Journal* 27(8), 3198-3208, 2013.

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

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場合も多い。また、ヒト培養細胞を用いた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しない場合も多い。本研究ではこれらの問題に対して、主にヒト ES/iPS 細胞等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。本年度はヒト ES/iPS 細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導する手法を更に安定化させて、応用研究を行った。用いた手法は造血細胞を誘導する時のプロトコルを改変した手法である。我々の褐色脂肪細胞分化誘導系は、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。我々の作成した褐色脂肪細胞は、筋肉に近い発生過程を経ている古典的・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、その機能についての分子機構の研究が進捗した。さらに、褐色脂肪細胞特異的細胞表面マーカーが一部明らかになった。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とその分子機構を明らかにした。

- 研究組織
- (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
 - (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) ディナベック株式会社事業本部
細胞工学事業部
佐伯 晃一
 - (5) 多摩川精機株式会社
バイオトロニクス研究所
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を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 細胞から高純度の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Hydrocell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囊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 E S・i P S 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 E S 細胞もしくは未分化ヒト i P S 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 endothelial 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 endothelial 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。

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 9 6 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、Thermo GEAR G120/G100 (NEC 社) を用いて行った。

11. 抗体作成

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白色脂肪細胞を免疫したあと、右足に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。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、褐色脂肪細胞を固定化したプレートと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。上記評価により褐色脂肪細胞陽性、白色脂肪細胞陰性のものとして 36 サンプルが確認された。これらのサンプルについて性質の近い細胞株を用いた特異性確認作業を行った。

(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、研究はいつさい含まれない。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）。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

我々は、造血細胞を誘導する時のプロトコルを改変した手法を駆使して、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プロトコルを開発した。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、また、電子顕微鏡による検討では、細胞質の広い範囲に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。

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。

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。

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（VEGF、SCF、Flt3-L、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や白色脂肪細胞への分化が起きてしまうことが確認された。

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発揮している可能性が指摘されている。そこで我々は、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として機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。

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、本年度は主にヒト褐色脂肪細胞特異的抗体作成を行った。

マウスへの foot pad 法による免疫（免疫原：ネガティブ細胞：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）を行い、その後、免疫マウスリンパ節細胞とミエローマ細胞を PEG 法により細胞融合、培養上清の 1 次スクリーニング（ハイブリドーマの培養上清をサンプリングし、Cell ELISA、FCM、細胞染色等を実施）を行った。その結果、褐色脂肪細胞に対してのみ陽性の培養上製、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞のいずれも陽性の培養上製が存在し、染色性についても、核、核周辺、細胞質、細胞外膜、など様々のパターンが認められた。また、免疫したマウスから、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞を固定化したプレートを用いた蛍光染色法を実施し、褐色脂肪細胞に強く反応しているものとして 36 サンプルを選抜した。これらのハイブリドーマ細胞由来培養上清を用いて、①褐色脂肪細胞と未分化ヒト iPS 細胞、間葉系幹細胞に対する反応性確認。②褐色脂肪細胞と性質の近い HUVEC、HepG2 等の細胞に対する交差性確認試験（蛍光染色法）を行った。結果、褐色脂肪細胞（あるいは、褐色脂肪細胞と未分化ヒト iPS 細胞）に対する特異性の高いサンプルが、14 種確認できた。また、マイクロアレー解析によりヒト ES/iPS 細胞由来褐色脂肪細胞特異的とされた膜蛋白コード遺伝子（4 個の遺伝子）について、市販抗体を用いた解析を行ったところ、2 種類の分子において

褐色脂肪細胞特異的発現の可能性が示された。

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、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、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。一方、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。

本年度はその他に、各種のヒト血管内皮細胞のマイクロアレー解析や蛋白発現解析、遺伝子阻害実験などにより、平滑筋増殖促進作用を有する内皮細胞の老化現象を明らかにし、更に、そのような現象に関わる分子の同定に成功した。

③ iPS 細胞の樹立における基礎検討

合成 RNA との組み合わせで iPS 細胞樹立効率を上昇させることが報告された methyl-CpG binding domain protein 3 (MBD3) の siRNA を用いて MBD3 ノックダウン併用による iPS 細胞樹立効率の評価を行った。ヒト BJ 細胞に蛍光標識 siRNA を導入したところ導入効率は 96%以上、MBD3 の siRNA を導入し、ウェスタンブロットにより MBD3 のノックダウンを確認した。SeV ベクターを感染させた BJ 細胞に MBD3 の siRNA を導入したところ、アルカリホスファターゼ染色による iPS 細胞のコロニー出現効率の上昇は観察されなかった。

その他、ヒト末梢血由来の単核球細胞からも同様に iPS 細胞のコロニーが得られた。また、C57BL/6N マウス胎仔線維芽細胞より iPS 細胞の誘導を検討したところ、2 週間程度でマウス ES 細胞様のコロニーが得られた。

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を除く重要疾患、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、脂肪細胞がきわめて重要であるが、入手の困難さなどから、現状ではその利用が大きく制限されている。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

まのモデル細胞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ー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。

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発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。

本年度は、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が大きく進展した。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。こうした技術を応用すれば、体内の褐色脂肪細胞の局在を画像化でき、現状では RI 検査によるブドウ糖の取り込みによってのみ画像化できる褐色脂肪細