

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15103

研究課題名(和文) ヒト新規全能性幹細胞(スーパーステムセル)創製と病理特性解析データベースの構築

研究課題名(英文) Creation of human novel totipotent stem cells (Superstem cell) and construction of pathological characteristics analysis database

研究代表者

中澤 温子 (NAKAZAWA, ATSUKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・病理診断部・(非)研究員

研究者番号：90227736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：奇形腫形成を評価を行う本研究では、生体バイオマーカー評価による細胞安全性と有効性を示すことができた。また、本研究により、日本発のスーパーステムセル病理組織学的検定システムを体内表現型と種々の遺伝子型の相関といった形式で世界へ発信できた。本研究は今後の適切な新型多能性幹細胞研究の先駆けとなるものであり、また、再生医療の臨床応用に向けた世界をリードする研究であった。

研究成果の概要(英文)：In this study evaluating teratoma formation, it was possible to show cell safety and effectiveness by evaluation of biomarker biomarkers. In addition, this study was able to transmit the superstem cell pathologic histology test system from Japan to the world in a form such as correlation between in vivo phenotype and various genotypes. This research is a pioneer of suitable new pluripotent stem cell research in the future and was the world leading research for clinical application of regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：移植病理 奇形腫(テラトーマ) 再生医療 特性解析

## 1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞(Embryonic Stem cells: ES 細胞)は、正常な染色体核型を保ちながら無制限に増殖でき、かつ分化多能性を持つ多能性幹細胞である。実験動物マウスで 1981 年に初めて報告され、1998 年にヒト ES 細胞の樹立が報告された。ヒト ES 細胞は、発生分化にかかる基礎研究への応用のみならず、薬剤や治療法開発など医学・薬学研究や細胞治療などの再生医療への応用が期待されている。また、均質な細胞集団として大量培養が可能であり、これをバンキングすることにより長期安定して供給することが可能となる。このことは特に、大量の機能細胞を必要とする細胞移植医療への応用において重要な要素となると考えられる。2010 年には、ヒト ES 細胞を用いた臨床試験が米国で始まった。2010 年 10 月に、米国の Geron 社による世界で初めてのヒト ES 細胞から分化・作製されたオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む GRNOPC1 を、患者の脊髄損傷を受けた部位に直接注入することにより脊髄神経機能の回復を促す治療法に対する第 1 相臨床試験が始まった。更に、同じく米国の ACT 社によるスタルガルト病と加齢黄斑変性症の 2 つの網膜変性疾患に対するヒト ES 細胞を用いた第 1/2 相臨床試験の治験許可申請(IND)が FDA により承認され、2014 年 10 月に有効性にかかる報告がなされた(Lancet, 2014)。そのような状況の中で、われわれは文部科学省「ヒト ES 細胞の樹立及び分配に関する指針」に従い、体外受精胚を用いてヒト ES 細胞を樹立した。体内動態を含めた奇形腫形成能を検討し、特に悪性化の観点から長期移植系にて奇形腫の形態変化を解析し、発表してきたところである。また、ヒト iPS 細胞に対しても同様の解析を行い、

造腫瘍性に関する新たな視点を展開してきた。一方、これらの多能性及び造腫瘍性に関し、ゲノム改変の立場から進めるには細胞の出現を待たなくてはならない状況である。このような観点から開発されてきた、日本国内において複数以上の施設より公表されてきている新規ヒト多能性幹細胞として開発された新型細胞に対して世界に先駆けて奇形腫(テラトーマ)に関する特性解析を行い、その有用性を明確にする。

## 2. 研究の目的

ヒト ES 細胞の培養維持はマウス ES 細胞に比して、きわめて困難であることが知られている。米国 NIH に登録されていたヒト ES 細胞ラインの 70%以上の細胞ラインが実際には分配不可能となっており、その最たる理由は未分化培養維持が困難になったためであった。国立成育医療研究センターでは、カスタムメイド cDNA アレイ作成・解析装置を保有し、遺伝子発現解析研究を推進し、一流国際誌に発表した(Fukawatase, et al. Sci Rep, 2014; Nishino, Umezawa, et al. PLoS Genetics, 2011)。また、体細胞のみならず、生殖細胞の分子メカニズムの研究においても成果を上げている(Kawano, Umezawa, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014.)。これらの成果を生かして既存の細胞株マイクロアレイデータをヒト ES 細胞未分化維持に働く遺伝子発現を中心にクラスタリング解析を行った結果、最初のふるい分けができることが強く示唆されている(Ichida JK, Umezawa, et al. Nat Chem Biol, 2014)。各組織別や同組織のなかで解剖学的部位別の非常にユニークな遺伝子発現データを蓄積し、我々が挙げた未分化維持に働く遺伝子発現パターンに影響を与えているか奇形

腫の特性を世界に先駆け検定する

### 3. 研究の方法

1. 毒性病理及び造腫瘍性(テラトーマ)を検証するための基準に則った細胞の製造採取・樹立した新型細胞バンクの徹底的な解析を行い、取り違え及びクロスコンタミネーションの防止対策を明確にする。具体的には、Short Tandem Repeat による検証を行う。ヒト新型細胞株の品質の均質性および安定性を保持するため、形態学的評価、多分化能を同定してその基準を設定するとともに、品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を決定する。

2. 病理学的検証にかかるヒト多能性幹細胞特性

- a. 細胞純度、
- b. HLA タイピング、
- c. 核型、
- d. 細胞増殖特性。

上記の特性とヒト新型細胞による未熟奇形腫を病理組織学的に解析することで、遺伝子型と表現型、具体的には病理組織像の連関を明確にする。

3. 免疫不全動物を用いた病理組織学的動態解析

ヒト新型細胞による奇形腫以外の悪性腫瘍、すなわち胎児性癌細胞ほか癌、その親細胞 (TIG 細胞)である間葉系細胞に由来する肉腫の形成ができないかを検討することも肝要となる。免疫不全動物は、ヌードマウス、SCID マウス、NOG マウスを主に利用し、病理学的評価に関しては、解析期間は、3 ヶ月から寿命までを期間とする。移植する細胞数は、10<sup>6</sup> から 10<sup>9</sup> とする。細胞の品質検査における CGH によるゲノム安定性評価、染色体核型解析との相関を

同時に検討し、考察する。

### 4. 研究成果

新型幹細胞による特性解析を加速して実現していくために、幹細胞品質評価は国際標準化も視野に細胞が有する各種情報を検定し、in vivo における解析を早急に行う必要がある。幹細胞の網羅的解析データを分化指向性や造腫瘍性等も含めた全方向性情報を整備することで、世界でも例のない幹細胞の実用化多様性に対応できる幹細胞統合メガデータベースに貢献できた。新型多能性幹細胞は、有用性が非常に期待される一方で、表裏一体としてある性質が造腫瘍性や分化能を管理する技術基盤の整備と品質評価と安心・安全な製造管理技術の構築が重要となる。奇形腫形成の評価を行う本研究では、生体バイオマーカー評価による細胞安全性と有効性を示すことができた。また、本研究により、日本発のスーパーステムセル病理組織学的検定システムを体内表現型と種々の遺伝子型の相関といった形式で世界へ発信できた。本研究は今後の適切な新型多能性幹細胞研究の先駆けとなるものであり、また、再生医療の臨床応用に向けた世界をリードする研究であった。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中澤温子 (NAKAZAWA, ATSUKO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター

－ 病理診断部

非常勤研究員

研究者番号：90227736

(2)研究分担者

梅澤明弘 (UMEZAWA, AKIHIRO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター

－ 再生医療センター センター長

研究者番号：70213486