

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 31 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：15K15398

研究課題名(和文)先天性代謝異常症に対するヒトES細胞を用いた再生医療システムの実現化

研究課題名(英文) Realization of regenerative medical system using human ES cells for congenital metabolic disorders

研究代表者

巽 国子 (TATUMI, KUNIKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：10534860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞とフィーダー細胞のマッチングにおいて、フィーダー細胞由来の解剖学的部位にまで詳細に検討した報告は未だない。加えて、ヒトES細胞を再生医療へ応用するためには、異物を排除したヒトES細胞培養システムの構築は必須である。ヒトES細胞の未分化性を保つフィーダー細胞検定システムを構築することは異種由来物質を排除した培養システムの大きな一翼を担うことになる。

研究成果の概要(英文)：In matching of stem cells and feeder cells, there is no detailed study on anatomical sites derived from feeder cells. In order to apply human ES cells to regenerative medicine, it is indispensable to construct a human ES cell culture system that eliminates foreign matter. Constructing a feeder cell assay system that keeps undifferentiated state of human ES cells plays a major role in the culture system excluding heterologous derived substances.

研究分野：医歯薬学

キーワード：システム科学 ES細胞 フィーダー細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞培養ではフィーダー細胞を用いて培養を行う。現在用いられている培養液中にはウシ胎児血清（或いはウシ胎児血清代替物）を用い、フィーダー細胞は多くの場合マウス胎児の細胞を用いている。最近、このような異種由来のものを含む環境下で培養維持されたヒト ES 細胞の表面に N-グリコリルノイラミン酸という糖鎖の発現が認められた。N-グリコリルノイラミン酸は、通常ヒト細胞では存在せず、人体において異質な糖鎖として免疫系が反応し、この糖鎖を発現している細胞は“異物”として排除される。将来の再生医療として臨床応用を見据えた場合、現在のヒト ES 細胞培養システムは、再生医療対応型へ改善されなくてはならない。我々はこれまで、成育期の様々なヒト組織からフィーダー細胞を樹立し、ヒト胚性癌(ES)細胞と霊長類 ES 細胞を代替応用してヒト ES 細胞未分化維持能を詳細に検定するシステムを構築してきている。本邦ではヒト ES 細胞が慎重に運用され容易に利用できない環境にあるが、国立成育医療研究センターではヒト ES 細胞樹立計画が文部科学大臣の確認を受けている。本申請によりヒト ES 細胞代替細胞で適切なヒトフィーダー細胞を選定していくシステムが構築できれば、その有用性は極めて高く、臨床応用が期待されている再生医療の大きな礎となる。

ヒト ES 細胞の培養維持はマウス ES 細胞に比し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、その最たる事由は未分化培養維持が困難になったためであった。一方、胎児性がん細胞（EC

細胞）はヒト ES 細胞やカニクイサル ES 細胞培養に比べ容易に培養することができる。本研究においては EC 細胞をもちいて数多くのヒト細胞株を検定し、ふるい分けをする。有力な候補細胞株はカニクイサル ES 細胞により詳細な解析を加え、有用なフィーダー細胞の規格設定を行っていく。国立成育医療センターでは成育バイオリソースとして現在数百の細胞株を保有している。それらはヒト由来細胞として大変貴重な研究資源である。この研究手法には ES 細胞用フィーダー細胞を選択する他に、ネガティブデータに着目することも大変重要な意義がある。我々の先行実験において、ある種の細胞株は EC 細胞及び ES 細胞を強烈に一定の方向性をもって分化させる傾向があることを見出した(図)。つまり本研究ではネガティブな結果も大変貴重な ES 細胞分化研究のデータとなる。ヒト成育期由来組織からなる成育バイオリソースは、世界的に見ても希少な細胞及び組織を提供しており、それより派生する本研究は世界的にも注目すべき研究成果を発信できると確信している。

2. 研究の目的

ヒト胚性幹(ES)細胞は、体を構成するすべての細胞へと分化できる多能性を保持し、増殖し続けることができる極めてユニークな細胞である。本研究の目的は、この2つの特性を利用して、ES 細胞を型糖尿病や若年性パーキンソン病などに対する細胞移植療法の細胞供給源として使用することである。本研究に供される検体については、国立成育医療研究センター倫理委員会において倫理審査を受け、既に承認を受けてお

り、適切なインフォームドコンセント手続きを経て組織を得ている。具体的には、胎盤、臍帯、羊膜などの胎児付属物や手術検体として得られる骨・軟骨組織などである。これらの細胞リソースを活用し、ヒト細胞由来のフィーダー細胞を樹立し、異種由来成分を排除した、全く新しい ES 細胞の培養システムを構築する。本研究により、日本発のヒト ES 細胞用フィーダー細胞と完全ヒト型 ES 細胞検定システムを世界へ発信することが可能となる。本研究は今後の適切なヒト ES 細胞研究の先駆けとなるものであり、また、安全で有効性の高い再生医療の臨床応用の実現に向けた、世界をリードするチャレンジ性の高い極めて斬新な研究である。

3. 研究の方法

1. フィーダー細胞株の樹立

本研究では解剖学的な組織形態の別に分離した各組織から細胞ラインを樹立する。更に、フィーダー細胞株を樹立する過程で現在使用している牛胎児血清を除去した異種由来物を排除した培養環境でのフィーダー細胞樹立を目指す。我々は、カスタムメイド cDNA アレイ作成・解析装置及び次世代シーケンサーを保有し、遺伝子発現解析研究を推進している。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。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細胞株の特性を検定する。幹細胞とフィーダー細胞のマッチングにおいて、フィーダー細胞由来の解剖学的部位にまで詳細に検討した報告はい

まだない。本研究は今後の適切なヒト ES 細胞研究の先導となる知見を提供できる。

2. 細胞の ES 細胞仕様フィーダー化とヒト ES 細胞及び EC 細胞培養

ES 細胞の培養には分裂を停止させたフィーダー細胞(フィーダー化)が必要である。マウス ES 細胞培養の際に我々が作成しているフィーダー細胞には、X 線照射を施している。これまで我々が行った X 線照射線量の条件設定実験より、ヒトフィーダー細胞化には 30Gy (1.0Gy/min X 30min; HITACHI MBR-1520A-TWZ)線量の照射を行う。ヒト EC 細胞である EC 細胞は未分化性を保ちつつ培養維持が ES 細胞より容易である。EC 細胞は遺伝子発現パターンとコロニー形態がヒト ES 細胞に近似している。未分化維持に必要な遺伝子群の発現が広く認められる細胞(黒が多い)と、対象に発現が低い細胞(白が多い)とをフィーダー化し EC 細胞を比較培養した結果、発現が低い細胞での EC 細胞は培養開始後数日内に多くのコロニーで分化傾向が認められた一方で、未分化寄与に働くと思われたフィーダー細胞では良好なコロニー形態を保ち培養維持されていた。

4. 研究成果

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。本研究では、カスタムメイド cDNA アレイ作成・解析装置及び Affymetrix 社 GeneChip システムを用いて、遺伝子発現解析研究を推進した。また、体細胞のみならず、生殖細胞膜融合の分子メカニズムの研究においても成果を上げた。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た。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細胞株の特性を検定した。幹細胞とフィーダー細胞のマッチングにおいて、フィーダー細胞由来の解剖学的部位にまで詳細に検討した報告は未だない。加えて、ヒト ES 細胞を再生医療へ応用するためには、異物を排除したヒト ES 細胞培養システムの構築は必須である。ヒト ES 細胞の未分化性を保つフィーダー細胞検定システムを構築することは異種由来物質を排除した培養システムの大きな一翼を担うことになる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 国子 (TATUMI, KUNIKO)

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター研究所細胞医療研究部 研究員

研究者番号：10534860

(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研究所再生医療センター センター長

研究者番号：7021386