

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10036

研究課題名（和文）美容形成外科における再生医療の隘路解消のためのヒト体性幹細胞の寿命制御

研究課題名（英文）Controlling the lifespan of human somatic stem cells to solve regenerative medicine bottlenecks in aesthetic plastic surgery

研究代表者

飛田 護邦（Tobita, Morikuni）

順天堂大学・革新的医療技術開発研究センター・先任准教授

研究者番号：10599038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：同種細胞を用いた再生医療を多くの患者に提供するためには、医療に应用可能な細胞を十分量確保することが必要である。また供給される細胞は、より正常に近くかつ安全な状態で臨床の場に提供されることが要求される。そこで有限とされている細胞寿命を延長させ必要十分な細胞数を確保することで、これら課題の解決策を探索することが本取組の目標である。本研究ではヒトパピローマウイルス由来のE6、E7遺伝子、hTERTをウイルスベクター、PTDタンパク、RNA干渉法を用いて将来の再生医療のヒト細胞ソースである多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞や実質臓器を構成するヒト体細胞の機能を損なわずに寿命延長させる方策を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寿命延長遺伝子は腫瘍原性が低く、さらに培養条件の詳細な検討により機能を保持したままの寿命延長が可能と考えられる。このような方法による種々のヒト体細胞の寿命延長、増殖法は初めての試みであり独創的であり、種々の寿命延長ヒト体細胞は細胞移植治療のための細胞ソースのみならず、ハイブリッド型人工臓器の開発やハイスループット系の薬物スクリーニングなどの研究開発にも応用可能であると考えられる。このように本研究は、法体系が整備されつつある細胞移植による再生医療を一般的な医療にすることを目指した斬新性・チャレンジ性の極めて高い取組である。

研究成果の概要（英文）：In order to provide regenerative medicine using allogeneic cells to a large number of patients, it is necessary to secure a sufficient number of cells that can be applied to medical treatment. In addition, the supplied cells must be provided to the clinical field in a safe and in a more normal state. The goal of this project is to find a solution to these problems by extending the lifespan of cells, which is considered to be finite, and by securing the necessary and sufficient number of cells. In this study, we investigated ways to extend the lifespan of human-derived mesenchymal stem cells with pluripotency, which are the human cell source for future regenerative medicine, and human somatic cells that constitute the parenchymal organs, without impairing their functions by using the E6 and E7 genes derived from human papillomavirus, hTERT, viral vectors, PTD protein and RNA interference methods.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト体性幹細胞 細胞培養法 細胞の寿命制御

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄バンクおよび臍帯血バンクで保存されている細胞、および自己の細胞を実際に臨床に応用する際、ドナー細胞数の不足の問題に直面することが現在の段階で予想されている。多くの患者に再生医療を提供するためには、医療に応用可能な細胞が十分な量確保されることが課題となる。そのためには供給される細胞がより正常に近い状態、かつ安全な細胞を臨床の場に提供することが要求される。そのため有限とされている細胞の寿命をコントロールして、寿命を延長させ、必要十分な細胞数を確保する必要がある。

骨髄には成体幹細胞である造血幹細胞を始め、間葉系幹細胞、成体多能性幹細胞等の様々な幹細胞が存在している。これらの細胞は難病、生活習慣病の幹細胞治療において自己の細胞を用いることが可能なため、最も利用価値の高い幹細胞として世界中で研究が盛んであり、本研究の研究者らも、同様のシステムを構築し報告した (Kami D, Shiojima I. *et al.* PLoS ONE, Zhu W, Shiojima I. *et al.* Nature)。さらにこれらの細胞の移植法として経静脈投与より骨髄内移植法が可能であることが近年報告されている。

本研究の中心である間葉系幹細胞は、ES細胞に近い多分化能、骨、軟骨、脂肪、心臓、神経、肝臓、骨格筋などに分化する能力を持っていることが分かってきた (Cui C, Terai M *et al.* Mol Biol Cell)。この細胞は患者自身の骨髄を用いるため拒絶反応の心配がなく、倫理的問題も少ない。しかしながら、骨髄間葉系幹細胞は、現在までの方法では必要な量の細胞数を得るには至らず、広範な欠損に対する再建や骨粗鬆症、慢性関節リウマチに代表される自己の骨再生能の低下した患者に対する治療法としての限界がある。臍帯血、末梢血由来の間葉系幹細胞、造血幹細胞についても同様の状況である。近年、幹細胞生物学領域の基礎研究において造血幹細胞、間葉系幹細胞、成体多能性幹細胞のバイオロジーは徐々に明らかにされてきており、細胞数の問題は遺伝子導入により解決し得る可能性がある (Terai M *et al.* Mol Biol Cell)。その際、分化能も維持することも可能であるものの、導入する遺伝子の種類によっては染色体異常の報告が散見される (Mori T *et al.* Mol Cell Biol)。

このように、ヒト体細胞を用いた再生医療の研究において、必要十分量の細胞数を得るのは困難であり、再現性を確認するのも一般に困難である。そこで、本研究では種々の組織由来の間葉系幹細胞を用いて細胞寿命延長の機構の詳細を明らかにし、さらに臨床応用へ向けて細胞にダメージを伴わない遺伝子導入法による細胞延命増殖の方法を確立し、細胞をできるだけ正常なまま寿命延長する方法の開発に着手する。

具体的には、目的達成のために PTD (protein-transduction domain) タンパクを使ったテロメラーゼの活性化や、RNA 干渉法による p16/RB 経路の不活化などを検討する。多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞 (骨髄、脂肪、臍帯血、月経血、末梢血など) については、寿命延長ならびに目的とする組織へ最終分化させる手段を開発する。さらに皮膚、眼、歯牙組織、骨、軟骨、肝臓などの実質臓器については構成組織、成分ごとの細胞の培養法、増殖法を確立し、膵  $\beta$  細胞などの内分泌細胞については機能を損なわずに細胞数を確保することを目標とする。もちろん細胞数の確保に際し、腫瘍化や染色体異常等を伴わないこと、さらに現在実験段階において行なっているウイルスを用いた遺伝子導入に変わる手段を開発することで細胞移植による再生医療の安全性を保証し、多くの患者に再生医療を臨床応用可能な段階へ医療全体、社会全体を導いていく。

## 2. 研究の目的

本研究は細胞治療に用いる臨床応用可能な細胞のソースの開発を目指す。すなわち、正常な細胞が正常なまま機能を損なうことなく、安定で安全な細胞を医療の現場に必要な分量供給できるようにすることを目的としている。増殖の機能を失った組織あるいは器官を細胞移植によって修復しようとする再生医学にとって、細胞数の確保は必要不可欠である。比較的細胞を増やすことが容易とされている骨髄間質細胞や神経幹細胞においても、ある分裂回数後に増殖を止めてしまうため、将来における移植医療でのドナーの細胞数不足が危惧されている。その細胞不足の解消にあたり、細胞の寿命をコントロールすることで延長させ、さらに腫瘍化せず、より正常に近い状態、かつ安全な細胞を臨床の場に提供できる細胞の数を確保することを目的とした研究である。

そのため、本研究では、ヒトパピローマウイルス (HPV) 由来の E6E7 遺伝子、hTERT (ヒ

トテロメラーゼ逆転写酵素) をウイルスベクター、PTD タンパク、RNA 干渉法を用いて将来の再生医療のヒト細胞ソースである多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞や実質臓器を構成するヒト体細胞の機能を損なわずに寿命延長させることを目標にする。これらの寿命延長遺伝子は腫瘍原性が低く、さらに培養条件の詳細な検討により機能を保持したままの寿命延長が可能と考えられる。このような方法による種々のヒト体細胞の寿命延長、増殖法はまったくの初めての試みであり、本研究の独創的な点である。またこのようにして得られた種々の寿命延長ヒト体細胞は細胞移植治療のための細胞ソースのみならず、ハイブリッド型人工臓器の開発やハイスループット系の薬物スクリーニングなどの研究開発にも応用可能であると考えられる。さらに将来的には遺伝子導入によらない自己体細胞に傷を付けることなく無限増殖させることを目指している。この研究の特色及び細胞の寿命延長、制御の研究は独創的と考えられ、法体系が整備されつつある細胞移植による再生医療、一般的な医療にすることをめざした斬新性・チャレンジ性の極めて高い取組である。

### 3. 研究の方法

#### 1) ヒトパピローマウイルスを実験系に使ったヒト体性幹細胞の寿命延長

ヒト間葉系幹細胞の寿命を腫瘍化させずに延長させる実験系の確立に着手した。目的を達成するため、ヒトパピローマウイルスの系を使用することとした。ヒトパピローマウイルスの部分構造遺伝子である E6 はテロメラーゼを活性化し、p53 を分解誘導することによりアポトーシス、G1 arrest を回避することができる。ヒトパピローマウイルスの E7 は RB ファミリー (RB, p107, p130) と結合して、p16 Ink4a 増加に伴ってリン酸化が阻害された Rb をリン酸化して E2F 放出を可能にして細胞を不死化する。具体的にはヒト間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルスの E6、E7、ポリコーム遺伝子群の Bmi-1 および hTERT のコンストラクトをレトロウイルスにより遺伝子導入し、寿命を延長させることを検討した。

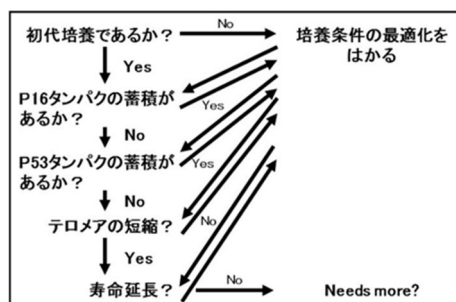
細胞寿命の制御に関わる経路として大きく二つが考えられており、一つはテロメアの短縮に伴い、ataxia telangiectasia mutated (ATM) が活性化され、それに伴って ATM の下流に位置する癌抑制遺伝子としてよく知られている p53、さらに下流の p21 も活性化され、さらに p21 はサイクリン D を不活性化して、RB のリン酸化 (活性化) が阻害されて、細胞は増殖しなくなることが古くから知られている。これは細胞寿命制御に関わる一つの経路として「テロメア/p53 経路」と呼ばれている。もう一つは INK4 ファミリーの一つである p16 タンパクの蓄積によりサイクリン D が不活性化され、上で述べたテロメア/p53 経路同様、RB のリン酸化 (活性化) が阻害されて、細胞は増殖しなくなることが近年明らかにされており、これは「p16/RB 経路」と細胞寿命制御に関わるもう一つの経路として重要と考えられている。

#### 2) ヒト体性幹細胞の寿命延長のための遺伝子導入手段、培地の研究

ヒト組織由来間葉系幹細胞を用いて細胞寿命延長の機構の詳細を明らかにしていく中で、臨床応用、細胞治療に十分な量の安全で品質の均質な細胞提供に向けて RNA 干渉法、PTD タンパクによる細胞延命増殖の方法、さらに細胞をできるだけ正常なまま寿命延長する方法を検討した。本取組では、将来的に遺伝子導入を伴わない方法の確立も視野に入れており、これは細胞を培養というストレスに打ち勝って、細胞が定常状態すなわち DNA 複製時においてもテロメアの長さを維持し、かつ遺伝子発現も定常化したままで細胞分裂を続けさせることを意味している。そのためにはテロメア短縮を除いたストレスの本態を解明し、ストレスフリーの状態を作り出すことも本研究において検討した。すなわち細胞培養時に用いる培養液の比較検討を実施した。細胞の寿命制御機構の詳細を分子生物学的に解明し、さらにその機構を制御するためには分子生物学的なアプローチがメインであるが、細胞にとって培養ストレスの軽減による細胞の寿命制御は臨床応用の段階においても一番安全で均質で効果的で経済的であると考えている。

#### 3) ヒト体性幹細胞の寿命延長のルーチン化

現時点において理論的に考えられ、可能なヒト正常体細胞の寿命延長のプロトコールのフローチャートを図に示す。現時点において可能な寿命制御のプロトコールであり、このプロトコールをさらに発展させて遺伝子導入により染色体を傷付けることなく自己の各臓器の体性幹細胞を無限増殖させることを目標とし、培養条件の最適化を図りながら、寿命延長を検討した。



#### 4)細胞治療の効果の病理学的解析と評価システムの確立

上述の成果から得られた細胞を用い、細胞治療の応用に関する動物実験に取り組む。その中で寿命制御された細胞による細胞治療の効果の病理学的解析および評価システムの開発に関しても進めていく。

#### 4. 研究成果

同種細胞を用いた再生医療を多くの患者に提供するためには、医療に応用可能な細胞を十分量確保することが必要である。また供給される細胞は、より正常に近くかつ安全な状態で臨床の場に提供されることが要求される。そこで有限とされている細胞の寿命をコントロールして寿命を延長させ、必要十分な細胞数を確保することで、これら課題の解決策を探索することが本取組の最終目標であり、本研究の目的は、細胞の寿命を制御・延長させ、腫瘍化せず、安全な細胞を確保することである。

現時点において明らかにされている細胞寿命の制御に関わる経路は大きく二つが考えられており、一つはテロメアの短縮に伴い、ATMが活性化され、それに伴ってATMの下流に位置する癌抑制遺伝子としてよく知られているp53、さらに下流のp21も活性化され、さらにp21はサイクリンDを不活性化して、RBのリン酸化（活性化）が阻害されて、細胞は増殖しなくなることが古くから知られている。

本研究ではHPV由来のE6E7遺伝子、hTERTをウイルスベクター、PTDタンパク、RNA干渉法を用いて多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞や実質臓器を構成するヒト体細胞の機能を損なわずに寿命延長させる方策を探索した。また間葉系幹細胞を用いて寿命延長の機構の詳細を明らかにしていく中で、細胞培養時に用いる培養液及び培養条件の検討を実施した。成果として、ヒト組織由来間葉系幹細胞を初代培養時から継代し、培養していく過程において、培地成分を含めた培養条件の最適化を図ることができた。

一方で、これらの最適化された培養条件を用いて作製された細胞の動物移植実験を完了するには至らず、引き続き、寿命制御された細胞のin vivo評価を継続し、分化誘導後に移植された細胞が生体内でうまく機能するかどうか、腫瘍化しないかどうかの安全性、有効性を詳細に検討するとともに、細胞のDNA複製時においてもテロメアの長さを維持し、かつ遺伝子発現も定常化したままで細胞分裂を続けていくためには、テロメア短縮を除いたストレスの本態を解明することが重要であると考えられた。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梅澤 明弘  (Umezawa Akihiro)  (70213486)	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・再生医療センター長   (82612)	
研究分担者	水野 博司  (Mizuno Hiroshi)  (80343606)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関