

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6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：2009～2011

課題番号：21659092

研究課題名（和文） ヒト胚性幹（ES）細胞を生かすことができる  
ヒトフィーダー単離システムの創成研究課題名（英文） Establishment of human cells as feeder cells  
of human embryonic stem cells

研究代表者

梅澤 明弘（UMEZAWA AKIHIRO）

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 部長

研究者番号：70213486

研究成果の概要（和文）：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。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 細胞を用いて数多くのヒト細胞株を検定し、ふるい分けを行った。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い、分化指向性に関する検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Human embryonic stem (ES) cells are difficult to be cultivated in vitro, compared with murine ES cells. In contrast, human embryonal carcinoma (EC) cells can easily be cultivated, compared with human ES cells. In this study, we evaluated human EC cell lines to investigate which human cells can be used as feeder cells. We set specification of human feeder cells in terms of maintenance of human ES cells and preservation of pluripotency. We determined human cell types that are capable of being feeder cells and indeed established human feeder cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	0	600,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：成育医学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹(ES)細胞は、①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、②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（Kami D, Umezawa A, Plos ONE, 2008）。この2つの特性を利用して、ES 細胞を糖尿病や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

することが大きく期待されている。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-グリコシルノイラ

ミン酸という糖鎖の発現が認められた。N-グリコシルノイラミン酸は、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する必要がある。そこで、異種由来物質を排除した完全ヒト型ES細胞培養システムの構築は急務である。

## 2. 研究の目的

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。具体的には、1. ヒト周産期及び成育期より得られる組織から細胞株樹立、2. 遺伝子発現解析による解剖学的部位別細胞株の規格化、3. 候補細胞ラインのフィーダー細胞化、4. 候補フィーダー細胞を用いたEC細胞と霊長類（カニクイサル）ES細胞未分化維持検定、5. 完全ヒト型ES細胞培養システム構築への橋渡し研究となり、これらのヒトフィーダー細胞を異種排除した完全ヒト型ヒトES細胞樹立培養システムへ応用していく。

## 3. 研究の方法

### (1) フィーダー細胞株の樹立

すでに周産期及び成育期の組織より様々な細胞株を樹立培養してきているが、これまでの当研究部の成果によりヒト成育期の一部の組織が幹細胞と非常に良好にマッチングしていることを突きとめてきており、更に同じ組織内においても部位の違いにより遺伝子発現パターンなど分子レベルで違いがあることがわかってきた。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。

### (2) 遺伝子発現解析による解剖学的部位別細胞株の規格化

我々は、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。

### (3) 細胞のES細胞仕様フィーダー化と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以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) 霊長類（カニクイサル）ES細胞による検定

カニクイサルES細胞は、細胞の機能、培養方法等ヒトES細胞に非常に近似している。我々は、田辺三菱製薬 先端医学研究所の協力を受けカニクイサルES細胞（CMK-6, EGFP-CMK-6）の培養を行っている。1～3で選択できたヒトフィーダー細胞をカニクイサルES細胞培養により最終的に未分化維持性への働きを検定していく。最終段階として、ヒトフィーダー細胞とヒトES細胞を良好に維持する細胞株として汎用されているマウス胎児線維芽細胞（MEF）とヒトES細胞用フィーダー細胞として報告のあるヒト包皮細胞株（HFF ; #Detroit 511）とで遺伝子発現解析及びタンパク質発現解析を行っていく。更に、1～3でのネガティブ作用とされたヒト細胞株を用いて、カニクイサルES細胞に対し強力に分化誘導効果も検討することで、将来の細胞移植療法において効率的な分化誘導システムに対し貴重な基盤データとなる。

## 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 細胞を用いて数多くのヒト細胞株を検定し、ふるい分けを行った。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た。国立成育医療研究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。本研究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。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して有用な成果となった。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となった。

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

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・  
生殖・細胞医療研究部・部長  
研究者番号：70213486

### (2) 研究分担者

藤本 純一郎 (FUJIMOTO JUNICHIRO)  
国立成育医療センター(研究所)・副所長  
研究者番号：60175578  
(H21)

秦 順一 (HATA JUNICHI)  
国立成育医療センター(研究所)・名誉総長  
研究者番号：90051614  
(H21)

豊田 雅士 (TOYODA MASASHI)  
(地独) 東京都健康長寿医療センター・研  
究副部長  
研究者番号：50392486  
(H23)