

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：15K15102

研究課題名(和文)「ヒトパピローマウィルスの病理学」に基づいたヒト体性幹細胞の寿命制御

研究課題名(英文)Life control of human somatic stem cells based on "pathology of human papilloma virus"

研究代表者

原 まり子 (HARA, MARIKO)

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・(非)研究員

研究者番号：20727424

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)：ヒト体細胞を用いた再生医療において、十分量の細胞数を得るのは困難である。本研究により、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明らかにし、再生医療に用いる細胞の確保に向けた、要素技術の礎を確立できた。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、細胞を正常なまま寿命延長する方法を開発した。また、多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞(骨髄、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の最終分化させる手段を開発した。

研究成果の概要(英文)：In regenerative medicine using human somatic cells, it is difficult to obtain a sufficient number of cells. This study has clarified the mechanism of cell life prolongation by using mesenchymal stem cells derived from various tissues and established the foundation of elemental technology for securing cells to be used for regenerative medicine. For clinical application, we established a method of cell proliferation proliferation by gene introduction method without cell damage, and developed a method to prolong cell life as normal. In addition, we have developed a means to prolong life span and terminal differentiation to the target tissue for multipotent human-derived mesenchymal stem cells (bone marrow, umbilical cord blood, menstrual blood, peripheral blood, etc.).

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨・関節・筋肉・皮膚 子宮頸がん パピローマ 感染 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

再生医療に関連する法律（「医薬品医療機器法（平成 25 年 10 月）」、「再生医療安全性確保法（平成 25 年 10 月）」、「再生医療推進法（平成 25 年 4 月）」）が相次いで成立し、再生医療を取り巻く法体系が整備されつつある。これらの法律・指針の要求する項目を満たす再生医療製品の実用化に向けた様々な取り組みがなされている。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る。我々も同様のシステムを構築し報告した(PLoS ONE, 3(6):e2407, 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多分化能を有し、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(Mol Biol Cell, 18:1586-94)。この細胞は患者自身の骨髄を使って行うので、拒絶反応の心配がなく、ヒトの ES 細胞のような倫理的問題もない。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り、新たな

細胞材料についての期待が高まっている。

2. 研究の目的

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。本研究において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研究である。

3. 研究の方法

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、p16Ink4a 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した。

< 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 >

現在、臍帯血からの間葉系細胞の strain の樹立さらに寿命延長にも成功しており、細胞の特徴性格づけも明らかにされている。さらに最近の成果として月経血由来間葉系細胞の骨格筋への高率な分化誘導に成功している。この技術を応用して、ヒト正常体細胞を用いた細胞移植治療の際に必要な量の分化可能な細胞数を確保することは医療の現場に於いては大きな利益をもたらす。さらに分化後移植された細

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。具体的にはヒト骨髄間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルスの E6、E7、ポリコウム遺伝子群の 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、細胞の寿命を延長させる。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。我々は AT 患者由来 iPS 細胞を用いて、これらの遺伝子発現メカニズムに対する詳細な検討を実施した。

< 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 >

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ていくが、その中で臨床応用、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開発する。また、遺伝子導入を伴わない寿命延長方法の確立も視野に入れている。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

胞分裂を続けることになる。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。すなわちその目標達成のため細胞培養時に用いる培養液の検討も計画に含めている。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。

4．研究成果

ヒト体細胞を用いた再生医療において、十分量の細胞数を得るのは困難である。本研究により、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明らかにし、再生医療に用いる細胞の確保に向けた、要素技術の礎を確立できた。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、細胞を正常なまま寿命延長する方法を開発した。また、多分化能を有するヒト由来間葉系幹細胞（骨髄、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の最終分化させる手段を開発した。

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ための礎と

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)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

原 まり子 (HARA, MARIKO)

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 研究員

研究者番号：20727424

(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

(3)連携研究者

井上麻由 (INOUE, MAYU)

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 研究員

研究者番号：40596920