

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：32821

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21592351

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

研究課題名(英文) Standardization of stem cells for practical application

研究代表者

寺井 政憲 (Terai, Masanori)

東京有明医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70359917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト由来間葉系幹細胞の安全性の担保を染色体解析とテロメア解析からアプローチした。ヒトiPS細胞は臨床応用にはあと少しといった段階であるが、将来は臨床応用されることが期待されている。iPS細胞は間葉系幹細胞同様、患者自身の細胞を使って作られるので、拒絶反応の心配がなく、倫理的問題もない。しかしながらiPS細胞は樹立されたクローンによっては染色体異常が存在し、テロメアが短縮していることが明らかになった。テロメアに短縮が認められないiPS細胞のクローンには染色体異常は認められなかった。ヒトiPS細胞、間葉系幹細胞は臨床応用に向けて、一細胞レベルで染色体異常の問題などを詳細に解析する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and mesenchymal stem cells have pluripotent ability to differentiate into bone, cartilage, fat, heart, nerve, liver and skeletal muscle. These stem cells derived from autologous cells have high potential value for stem cell-based therapies for incurable or lifestyle-related diseases. We have already reported that telomeres of the established iPSCs derived from human amnion and fetal lung fibroblasts (MRC-5) were significantly longer than those of the parental cells, and that the telomere extension rates varied quite significantly among the clones without chromosomal instability, although the telomeres of other iPSCs derived from MRC-5 became shorter as the number of passages increased, along with chromosomal abnormalities from an early stage. In the future, with a view to clinical application, there will be a need to analyze in detail problems such as chromosomal abnormalities in both mesenchymal stem cells and human iPSCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：再生医学 病理学 遺伝子 ウイルス 組織・細胞 テロメア iPS細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

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

2. 研究の目的

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的としている。これは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が供給されることを目的としていることを意味している。ヒト間葉系幹細胞、iPS細胞は自身の細胞を使用するため倫理的問題、免疫拒絶反応はないが、作成に際して用いたウイルスによる遺伝子導入による染色体異常や腫瘍形成の問題が残されている。ヒト体細胞を用いた再生医療の研究においても、必要量の、かつ染色体異常がない安全な細胞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。本研究は種々の組織由来のiPS細胞、間葉系幹細胞について一細胞ごとに細胞の染色体異常の詳細を明らかにしていく。将来的にはダメージのある細胞をより簡便にスクリーニングし、臨床応用へ向けて正常かつ安全な細胞を分量確保する方法を開発する。将来の臨床応用へ向けて、細胞治療に用いる細胞の確保に際し、腫瘍化や染色体異常等を伴わない正常かつ安全な細胞を分量確保する方法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。

3. 研究の方法

ヒトパピローマウイルスの系を使い、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はすでに確立されている。その系を用いて細胞をできるだけ正常なまま寿命延長することができる。細胞の寿命を腫瘍化させずに延長させる実験系を用いて行う。さらに既に確立されている一細胞ごとのテロメア測定技術を使った quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH)法により、多分化能を有するiPS細胞およびヒト由来間葉系幹細胞(骨髄、臍帯血、月経血、末梢血など)についてテロメア動態、染色体異常を検証する。この方法は一細胞ごとにテロメアに特異的なプローブと染色体の中心に位置するセントロメアに特異的なプローブを用いて

fluorescence in situ hybridization (FISH)法で染色し、蛍光顕微鏡で観察できるようにする方法である。テロメアは、2009年のノーベル生理学医学賞受賞者の研究対象である。テロメアとは染色体末端に存在し、染色体を保護する役割を担っており、培養細胞では細胞分裂を重ねるとともに短縮することが知られている。細胞の老化に伴ってテロメアが短縮すると染色体が不安定となり、細胞分裂の停止、細胞の不死化やがん化など様々な変異が起こりやすくなることがわかっている。テロメアは各染色体の末端に存在する6塩基の繰り返し配列である。次に、最終分化させた細胞について検証する。次に、iPS細胞作成に際してウイルスを用いた遺伝子導入に変わる手段によって作製されたiPS細胞についても比較検証する。

さらにその過程で、分化条件や培養条件の詳細な検討を含めることにより安全性と機能を保持したままの細胞治療のための供給を可能にしていく。種々の組織由来の間葉系幹細胞を用いて一細胞ごとのテロメアの機構の詳細を明らかにしていく過程において、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安定な方法、さらに細胞をできるだけ正常かつ安定なまま供給する方法の開発につながる。それは定常状態すなわち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。

4. 研究成果

ヒト由来間葉系幹細胞の安全性の担保を染色体解析とテロメア解析からアプローチした。ヒトiPS細胞は臨床応用にはあと少しといった段階であるが、将来は臨床応用されることが期待されている。iPS細胞は間葉系幹細胞同様、患者自身の細胞を使って作られるので、拒絶反応の心配がなく、倫理的問題もない。しかしながらiPS細胞は樹立されたクローンによっては染色体異常が存在し、テロメアが短縮していることが明らかになった。テロメアに短縮が認められないiPS細胞のクローンには染色体異常は認められなかった。ヒトiPS細胞、間葉系幹細胞は臨床応用に向けて、一細胞レベルで染色体異常の問題などを詳細に解析する必要がある。

この研究に関連して、心筋の幹細胞の存在の可能性を示唆する研究成果を発表した。病理解剖を行った530人の患者から心筋のDNAを抽出し、サザンブロット法を用いてテロメア長を測定した結果、心筋のテロメアは加齢によって短縮することを証明した。さらに、テロメア長のデータを死因別(がん、心疾患、それ以外の疾患)に比較した結果、死因が心疾患の患者の心重量は、がんやそれ以外の疾患の患者と比較して増加していた。さらに、死因が心疾患である患者の心筋のテロメアはがんの患者様と比較すると短縮していた。

(1)加齢に伴い心筋のテロメアは短縮すること、(2)心疾患により心臓の重量は増加すること、(3)死因が心疾患の心筋のテロメアは、がんと比較して短縮していることが明らかにされた。心筋のテロメアの測定を通じて、心筋の幹細胞の存在の可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Terai M, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue & Cell* 査読あり 45号6巻 2013年 407-413

Terai M. Standardization of Stem Cells for Practical Application. *Annals of Clinical Pathology* 査読あり 1号1巻 2013年 1002

Terai M, Izumiya-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Sawabe M, Arai T, Fujiwara M, Ishii A, Nakamura K, Takubo K. Association of telomere shortening in myocardium with heart weight gain and cause of death. *Scientific reports* 査読あり 3号 2013年 2401

Aida J, Yokoyama A, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Terai M, Poon S, Matsuura M, Fujiwara M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere shortening in the esophagus of Japanese alcoholics: relationships with chromoendoscopic findings, ALDH2 and ADH1B genotypes and smoking history. *PLoS one* 査読あり 8号 2013年 e63860

Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, Terai M, Suzuki H, Umezawa A. Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the non-immunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 査読あり 20巻 2011年 235-244

寺井政憲, 梅澤明弘 再生医療の将来と産婦人科 5.間葉系幹細胞の老化 産科と婦人科 査読なし 76号10巻 2009年 1196-1202

Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara

T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A. CCN3 and bone marrow cells. *Journal of cell communication and signaling* 査読あり 3巻 2009年 135-145

[学会発表](計7件)

寺井政憲, 仲村賢一, 泉山-下村七生貴, 石川直, 相田順子, 田久保海誉
心疾患による心重量増加と心筋のテロメア短縮の関連について
第13回日本再生医療学会総会(京都)
2014年3月5日

寺井政憲, 仲村賢一, 泉山-下村七生貴, 石川直, 豊田雅士, 相田順子, 田久保海誉
iPS細胞のテロメアは長くなるか、短くなるか?
第13回日本再生医療学会総会(京都)
2014年3月4日

寺井政憲, 仲村賢一, 泉山-下村七生貴, 石川直, 豊田雅士, 相田順子, 田久保海誉
iPS細胞のテロメアは長くなるか、短くなるか?
第25回高遠分子細胞生物学シンポジウム(比叡山延暦寺会館)
2013年8月29日

石川直, 仲村賢一, 泉山-下村七生貴, 相田順子, 寺井政憲, 豊田雅士, 田久保海誉
iPS細胞化によるリプログラミング過程でのテロメア動態のQ-FISH法による解析
第102回日本病理学会総会(札幌)
2013年6月7日

Ishikawa N, Nakamura K, Shimomura-Izumiya N, Terai M, Toyoda M and Takubo K.
Telomeres of human induced pluripotent stem cells are elongated during reprogramming, but show inter-clonal differences in extension rate.
CiRA International Symposium 2013(京都)
2013年3月11日

Terai M, Ishikawa N, Toyoda M, Aida J and Takubo K.
Chromosomal instability could be induced by telomere shortening although established iPSCs maintain telomerase activity.
CiRA International Symposium 2013(京都)
2013年3月11日

寺井政憲
間葉系幹細胞は再生医療の場で主役となり

うる貴重な細胞ソースである（シンポジウム
招待講演）
第 30 回日本アフェレシス学会（札幌）
2009 年 9 月 11 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

寺井 政憲（Terai, Masanori）
東京有明医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70359917

(2)研究分担者

梅澤 明弘（Umezawa, Akihiro）
独立行政法人国立成育医療研究センター研
究所・再生医療センター生殖・細胞医療研究
部・部長
研究者番号：70213486