

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390209

研究課題名（和文） 内胚葉幹細胞から作成したクローンブタを用いた遺伝性疾患の再生医療の評価システム

研究課題名（英文） Evaluation system for regenerative medicine of genetic disorders by using cloned pigs established from endoderm somatic stem cells.

研究代表者

遠藤 文夫 (ENDO FUMIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：00176801

研究成果の概要（和文）：本研究では唾液腺から分離培養した内胚葉幹細胞をまず確立し、この細胞から作成したクローンブタを作成した。このクローンブタを用いて遺伝性疾患の細胞移植治療のモデルを作成した。さらに移植に適した肝臓細胞、膵臓内分泌細胞の作成をおこなった。培養液に添加するアミノ酸が幹細胞保存、増殖、分化において重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要（英文）：We first isolated tissue stem cells originated from porcine salivary gland. This clone was used for the generation of cloned pigs. Using this cloned pigs, we established a model system of cell-transplantation for the treatment of liver and pancreatic disorders. We also established a new culture system using various concentrations of amino acids in the medium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：再生医学、移植・再生医療、糖尿病、発生・分化、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の情勢

研究開始時の H2 2 年度前後における再生医療は、褥瘡に対する FGF 製剤の保険収載、熱傷に対する培養皮膚細胞の保険収載、欠損部に対する軟骨培養細胞の応用など再生医療研究から得られた技術が細胞治療の具体的な例が臨床現場で応用されてきた時期であった。我々が取り組んできた肝臓・すい臓を中心とした内胚葉臓器の機能障害においても、臨床への応用が試みられていた。肝臓障

害については、ドイツを中心に肝細胞治療が臨床治験されており、また、すい臓病に関しては糖尿病に対する膵島細胞の移植が開始されていた。特に、わが国でもカナダのアルバータ大学が開発したエドモントンプロトコルが広く実施され、京都大学を中心に実施されていた。このような研究・臨床背景の中で、以下のような課題が早急に解明される必要性に直面していた。

① 移植する細胞をできるだけ成熟した状態へ誘導する必要性。これは安全性にかか

わる問題であり、広く国民が関心をもっていた。

- ② 組織幹細胞の細胞系譜及び分化制御の機序を明らかにする必要性。これは①ともかかわる問題であるが、必要な細胞を誘導するための重要な基礎的研究である。
- ③ 治療の対象となる遺伝性疾患におけるモデルを作成し、治療評価モデルを作成する必要性。
- ④ 疾患モデルを用いて実用的かつ倫理的に受け入れられる治療法を提示する必要性である。そこで、本研究ではこれまでになかった大型動物までも含むモデル系を開発し、遺伝病の細胞治療の検証（有効性、実用性並びに安全性の評価）システムの構築を提案した。

これらの目的、すなわち遺伝病の細胞移植の有効性、実用性ならびに安全性を評価するシステムの構築は、ひいては国家プロジェクトである iPS 細胞の臨床応用に有効な基盤を構築することにつながると考えられた。

(2) 我々の研究室における研究背景

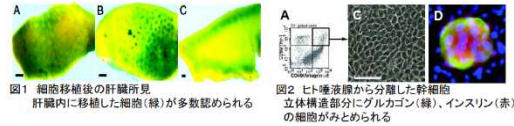
我々の研究室では10年以上にわたり、遺伝性肝臓疾患への再生医療・細胞移植治療の実績があった。この研究の中で、我々は以下の成果をあげていた。

内胚葉幹細胞の分離：本研究室で申請者らは、肝臓細胞、膵臓細胞に分化誘導可能である体性幹細胞の探索を行ってきた。まずラット (Okumura et al. *Hepatology*,2003)において、唾液腺から内胚葉系幹細胞の分離を世界に先駆けて達成した。この細胞が、クローン化された状態から肝臓細胞、膵臓細胞、唾液腺細胞に分化されることを示し、さらに肝臓に移植した細胞が成熟し機能することを明らかにした。次に、マウスの研究において (Hisatomi et al. *Hepatology*,2004)、細胞表面マーカーを活かした幹細胞の分離方法を確立した。これらの移植実験を大型哺乳動物及び将来への人への応用を可能にするための前臨床実験として、ブタ唾液腺からの内胚葉幹細胞の分離を試み、これに成功した (Matsumoto et al. *Cloning Stem Cells*, 2007)。

(3) ヒトへの臨床応用を想定して、大型哺乳動物であるブタを用いた再生医療および細胞移植研究系の確立を試みて、これに成功した。具体的にはいかに示す。

①未分化幹細胞の生存と増殖を支持する細胞のクローン化：ブタ唾液腺から分離した内胚葉幹細胞は非増殖・浮遊状態で分離され、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリクスに接触することにより増殖期を迎える。非増殖期の細胞の生存と接触直後の増殖には液性因子が必須であることが判明している。この液性因子の研究から、この因子を分泌する細胞のクローン化に

成功した。



②再生医学前臨床試験に利用可能なクローンブタの作成と移植実験を実施した。ヒトへの再生医療研究の展開を視野に入れると、ブタはヒトと同じく遺伝的には異質な集団であり、移植実験を実施するには有効な免疫系のコントロールを実施するかあるいはクローン動物を用いた移植が必要となる。そこで、本研究ではクローンブタを作成することを考えた。とくに、唾液腺由来内胚葉幹細胞がクローン作出に優れた条件を備えていることが判明したことから、明治大学農学部生命科学科発生工学研究室（長嶋研究室）との共同実験において、唾液腺細胞を核ドナーとして用いたクローンブタの作成を行った。クローンブタの作成方法は明治大学農学部長嶋らによって開発されたものである

(Kurome M, Ueda H, Tomii R, Naruse K, Nagashima H. Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.* 2006; 15(2):229-40.) その結果効率よくクローンブタが作成できた (Kurome et al submitted for publication)。これまで40頭の以上のクローンブタが作成され、移植実験を実施した。移植実験ではクローン化したブタから調整した内胚葉幹細胞を同じ固体由来の別のクローンブタへ移植した。In vitro で分化した幹細胞を使用し、ブタ皮下、腎臓皮膜下へ移植し、これらの細胞の挙動を観察している。予想通り、クローン化したブタから別のクローン化した固体への移植では移植が成立し、これらの細胞の分化と移植後の細胞機能を観察することを可能にしている。

③また、細胞移植に伴う危険性ならびに有効性を評価する基盤を開発した。このような背景と成果の上に立って、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、以下の項目を主たる目的として実施された。すなわち

(1) ヒトおよびブタ内胚葉系幹細胞の分離、同定方法の確立・安定した保存方法・供給体性の確立を目的とした。これにより、ヒトとほぼ同程度の体重のブタに対する移植に必要な幹細胞の分離、保存、供給のノウハウならびに問題点を明らかにすることを目的とした。

(2) 分離した内胚葉幹細胞の分化調節方法の検討と移植に適した分化細胞の作成を試みた。これにより、iPS 細胞においても問題

視されている未分化細胞の腫瘍化を防ぐ方法の開発ならびに分化技術の開発を試みた。

(3) アミノ酸を中心として低分子化合物を利用したヒトおよびブタ由来前駆細胞の保存技術の確立を試みた。いずれの幹細胞においても液体窒素レベルの低温が必要であり、この保存運搬が臨床応用への重要なステップと考えられる。すなわち、保存技術の発展なくしては、臨床応用は難しく、本研究では保存技術の開発も行うこととした。

(4) ブタにおける移植モデル系の確立の実現のための基盤構築を試みた。これにより、本研究で使用される幹細胞のみならず、iPS細胞を用いた細胞移植研究における臨床応用への基盤形成を目的とした。

これら5つの項目について計画をたてて研究を開始した。

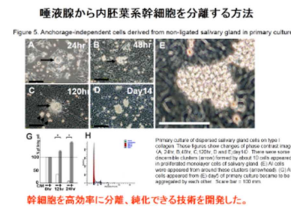
3. 研究の方法

(1) ヒトおよびブタ内胚葉系幹細胞の分離、同定方法の確立・安定供給体性の確立においては、これまで本研究代表者らが達成してきた成果、すなわちマウス・ラットの唾液腺組織に存在する内胚葉系幹細胞を同定し、分離、培養の方法(Okumura et al, Hepatology 2003, Hisatomi et al Hepatology 2004)をさらに発展させて用いた。これらの研究では、マウス及びラット唾液腺の主排泄導管を結紮し、唾液腺組織の炎症を誘発することで組織幹細胞に増殖を促し、幹細胞を同定・分離したが、ヒトへの応用を想定した場合、主排泄導管の結紮は現実的でなく、正常唾液腺組織からの幹・前駆細胞の同定、分離の必要があった。そこでまずヒトへの応用を想定し、ブタの唾液腺を用いた正常唾液腺組織からの幹・前駆細胞の分離を正常唾液腺から可能とした

(Matsumoto et al. Cloning Stem Cells. 2007;9(2):176-90)。

(2) ヒトおよびブタ由来前駆細胞の保存技術の確立(遠藤、中村、松本) 継代数10以上の長期継代が可能となる細胞を保存し、さらにその性質について検討する。研究過程では、得られたヒト由来前駆細胞を代表的な5種類の細胞保存液に凍結保存する。凍結は、バイセルを用いて行う。現時点で既に、5種のヒト細胞を分離し、保存して

いる。保存した細胞は、経時的に再融解し、以下の点を検証する。すなわち、表面マーカー、細胞内部抗原、特異的な遺伝子発現(HNF, AFP, PDX-1, Ngn, NeuroD, など)、分化誘導後の変化についてフローサイトメトリー法、免疫蛍光抗体染色法及びリアルタイムPCRを用いて検証する。



(3) アミノ酸を中心として低分子化合物を利用したヒトおよびブタ由来前駆細胞の保存技術の確立、

この研究では、培地に含まれるアミノ酸について、一つ一つのアミノ酸の除去、あるいは増加の影響について検討した。特に必須アミノ酸の1アミノ酸除去培地に用いた幹細胞の培養について検討を加えた。

分離した内胚葉幹細胞の分化調節方法の検討と移植に適した分化細胞の作成においては、①幹細胞維持に適切な細胞外マトリクス(ECM)の同定するためにLaminin, type I collagen, type IV collagen, poly-D lysine, fibronectin, gelatinを用いて幹細胞の培養条件の検討をおこなった。また②実用化を目指してFBSを含まない無血清培養法を確立することをめざした。③内胚葉系にcommitmentした前駆細胞を培養する方法を確立するためにフローサイトメトリー法を用いた細胞解析を用いた。

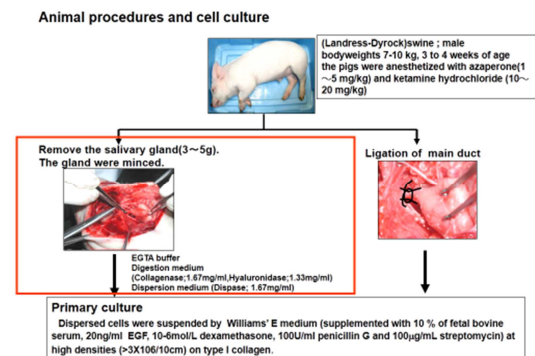
(4) 多種の臓器からの内胚葉系に分化可能な幹・前駆細胞の分離と移植技術の確立、唾液腺以外の臓器からの細胞の採取について検討した。

正常唾液腺から得られた幹細胞はマウス及びラット唾液腺組織由来前駆細胞と同様にCD49f+/laminin+, c-kit陽性及びThy-1陽性という特徴があり、その性質を生かして、ヒトにおける内胚葉幹細胞の同定と分離方法の確立を試みた。

(5) ブタにおける移植モデル系の確立の実現のための実験を実施、

ブタにおける移植モデル系の確立(遠藤、中村、松本、山本)

ブタ胚は明治大学農学部生命科学科発生工学研究室にて作成しており、明治大学農学部施設で仔ブタの出産までのフォローが可能である。分離したブタ唾液腺由来幹細胞は、既にクローンブタの作成に使用され、唾液腺由来内胚葉幹細胞核を移植したクローンブ



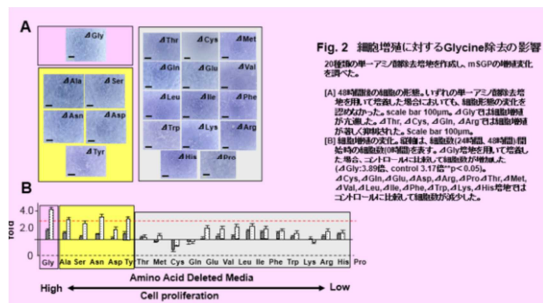
タが20頭以上誕生している (Kurome Endo et al. Cloning Stem Cells. 2008, Kurome, Endo et al J Reprod Dev. 2008)。これらの相互移植可能なブタコロニーを用いて移植実験を行った。

4. 研究成果

主な成果

我々は、ブタのみならずヒトにおいても細胞移植応用可能である幹細胞を分離した。この分離は再現性があり、安定的に採取可能であった。また、現実的な細胞移植応用を想定して、移植に必要な技術の開発に取り組んだ。その結果、未熟な幹細胞を短期間に安定的に採取する方法を見出した。

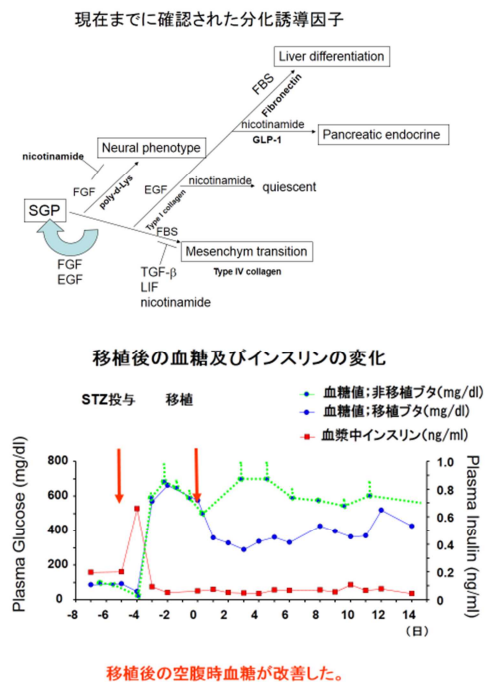
さらに、この細胞を用いて、保存試験、安全性試験を行った。その結果、幹細胞の保存に適した保存条件ならびに保存液の条件を見出すことができた。また、移植細胞の安全性を高めるために、分化誘導の効率を上げる基盤作成を試みた。具体的には、20種類のアミノ酸の影響を観察した。その結果、グリシンなどいくつかの非必須アミノ酸が幹細胞の分化増殖に影響を与えることを見出した (Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells. Nakamura Y. et al. Cell Tissue Res. 2009 May;336(2):203-12.)。また、メチオニンが幹細胞の維持には重要であることも見出し



た。これらの研究を進展させることで、安全な幹細胞の増殖効率の改善方法や分化誘導の方向性の毛低などが達成されると期待される。また、細胞の分化効率を上げるための細胞外マトリクスを見出し、内肺葉系に運命付けられた細胞の維持にはコラーゲンIが適しており、分化誘導にはFibronectinが適していることが示された。

肝臓および膵臓へ分化させた幹細胞を本来の標的臓器である肝臓あるいは膵臓へ移植する実験をおこなった。さらに、臨床応用を目指した移植評価系の基盤開発の目的で、ストレプトゾトシンを用いた糖尿病ブタを作成し、これにたいして移植実験をおこなった。この糖尿病ブタでは膵島が破壊され、高血糖

を示す。このブタに対して、膵島ベータ細胞へ分化させた内胚葉幹細胞を門脈から肝臓内へ移植し、この血糖を改善させた。



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10件)

- 1) Lee D, Oka T, Hunter B, Robinson A, Papp S, Nakamura K, Srisakuldee W, Nickel BE, Light PE, Dyck JRB, Lopaschuk GD, Kardami E, Opas M, and Michalak M Calreticulin induces dilated cardiomyopathy. Plos One (2013 in press), 査読あり
- 2) Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection. (2013 in press), 査読あり
- 3) Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y, Yazaki M, Sakurai A, Endo F, Fukushima Y, Ikeda S p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. Eur J Neurol (2013 in press) 査読あり
- 4) Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S Newborn

- screening for Fabry disease in Japan: Prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J. Hum. Genet.* (2013 in press) 査読あり
- 5) S. matsumoto, Fumio Endo. Amino acids metabolism, inborn errors of amino acid metabolism, *Amino Acids* (2013 In press) 査読あり
 - 6) Ohya Y, Okajima H, Honda M, Hayashida S, Suda H, Matsumoto S, Lee KJ, Yamamoto H, Takeichi T, Mitsubuchi Y, Asonuma K, Endo F, Inomata Y. Re-evaluation of the indications for liver transplantation in Wilson's disease based on the outcomes of patients referred to a transplant center. *Pediatr Transplant.* 2013 Jun;17(4):369-737 査読あり
 - 7) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet.* 2013 May;58(5):285-92. 査読あり
 - 8) Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hirose M, Shinzato K, Hattori K, Nakamura K, Matsumoto T, Endo F, Kohno S. Identification of a novel mutation and prevalence study for fabry disease in Japanese dialysis patients. *Ren Fail.* 34, 566-570 (2012)、査読あり
 - 9) Katsuren K, Nakamura K, Ohta T. Effect of body mass index-z score on adverse levels of cardiovascular disease risk factors. *Pediatr Int.* 54, 200-204 (2012)、査読あり
 - 10) Mochida T, Tanaka T, Shiraki Y, Tajiri H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Okamoto M, Endo F. Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in diabetes mellitus. *Mol Genet Metab.* 103(4):406-9, 2011. 査読あり
- [学会発表] (計 5 件)
- 1) Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo. Newborn Screening in Japan. The 10th Asia-Pacific Conference on Human Genetics 2012. 12. 6-8, Kuala Lumpur, Malaysia
 - 2) Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo. Screening for Fabry Disease in Japan. 2012 Joint Conference of Medical Genetics, Genomics & Korean LSD Symposium. 2012. 11. 23 Seoul, Korea
 - 3) 中村公俊; 熊本市小児生活習慣病予防検診の現状～小児生活習慣病専門医の立場から 第 43 回全国学校保健・学校医大会シンポジウム 子どもたちの生活習慣病予防 平成 24 年 11 月 10 日 ホテル日航熊本、熊本市
 - 4) Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo. Overview of Japan Newborn Screening Experience for Pompe Disease 14th Asia LSD Symposium, 2012. 10. 20, Beijing China.
 - 5) Shirou Matsumoto, Kiyoko Hattori, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. A patient of Gaucher's disease type 2 with recurrent ARDS. The 4th International Forum for Lysosomal Storage Disease & 17th Japanese Society for. Lysosomal Disease. Tokyo Prince Hotel, Oct 5 2012.
 - 6) Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo. Screening for Fabry Disease in Japan. 4th International Forum for Lysosomal Storage Disease, 2012. 10. 5 Tokyo Prince Hotel.
 - 7) Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo Screening for Lysosomal Storage Disorders. The 18 th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Hotel Kumamoto Terrsa, 2012. 6. 30
- [図書] (計 3 件)
- 1) 松本志郎、遠藤文夫 著書; 先天代謝異常症ガイドブック、診断と治療社、2013 年 8 月出版予定
 - 2) 松本志郎、遠藤文夫、著書; 先天代謝異常症候群上巻、日本臨牀、p230-p233、2012
 - 3) 松本志郎、遠藤文夫、著書; 最先端医療の進歩、膝島再生医療の現状、小児科診療、p89-p94, 2012.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
遠藤 文夫 (ENDO FUMIO)
熊本大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号: 00176801
 - (2) 研究分担者
中村 公俊 (NAKAMURA KIMITOSHI)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30336234
- 松本 志郎 (MATSUMOTO SHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70467992