

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 5 月 21 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590269
 研究課題名（和文） 化学遺伝学研究法を用いたヒト ES 細胞の未分化維持・分化制御機構の
 解明
 研究課題名（英文） Chemical genomics approach to human embryonic stem cell-self renewal
 研究代表者
 川瀬 栄八郎（ Eihachiro Kawase ）
 京都大学・再生医科学研究所・講師
 研究者番号：70402790

研究成果の概要（和文）：

化学遺伝学研究法を用いて、ある種の類似化学構造をもった神経伝達物質拮抗剤はヒト ES 細胞の未分化維持・増殖に効果があることを見出した。これらの化合物を用いることでヒト ES 細胞の未分化維持・増殖に不可欠な役割を果たしていると考えられている bFGF を培地中に添加することなく、ヒト ES 細胞の長期培養が可能になった。長期培養後も細胞は未分化状態を示し、正常染色体であり、多分化能を有していた。

研究成果の概要（英文）：

Human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent cells have the potential to provide an unlimited source of tissues for regenerative medicine. For this purpose, development of defined/xeno-free culture systems under feeder-free conditions is essential for the expansion of hESCs. Most defined/xeno-free media for the culture of hESCs contain basic fibroblast growth factor (bFGF). Therefore, bFGF is thought to have an almost essential role for the expansion of hESCs in an undifferentiated state. Here, we report identification of small molecules, some of which were neurotransmitter antagonists (trimipramine and ethopropazine), which promote long-term hESC self-renewal without bFGF in the medium. The hESCs maintained high expression levels of pluripotency markers, had a normal karyotype after 20 passages, and could differentiate into all three germ layers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 医科学一般

キーワード：ヒト ES 細胞 化合物ライブラリ 未分化維持 分化制御

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞は、体を構成する全ての細胞種に分化する能力及び多分化能を保持したまま、培養下で無制限に増殖できる株細胞である。このよう

な特性から、将来ヒト ES 細胞を用いた再生医療への展開が期待されている。また、ヒト体細胞から iPS 細胞という ES 細胞と極めて似た性質を持つ細胞の作出法も見出されている。しかしながら、

再生医療を賄うのに必要な正常ヒト ES/iPS 細胞 (以下 ES 細胞と統一して表現する)を大量にどう調達するか、またその分子的基盤を含めて今後明らかにしていく必要があった。また、ヒト ES 細胞は通常フィーダー細胞上で培養を行っており、フィーダー細胞を用いない培養法の開発が分子的基盤を理解するためにも、応用的にも重要であることが認識されていた。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では chemical genetics(化学遺伝学 研究法)あるいは chemical genomics によるアプローチを用いたヒト ES 細胞の分子制御機構の理解を目指しており、本研究期間ではそのための土台づくりまでを目標とする。
- (2) 本研究期間では、ヒト ES 細胞の未分化増殖に効果に関する研究を中心に行う。
- (3) 本研究で見出したヒト未分化増殖に効果のある化合物(ヒット化合物)の中に構造的な類似性が見出すことができれば、本研究の発展に向けて大きな土台となる。
- (4) 本研究で見出されたヒット化合物がヒト ES 細胞の未分化増殖にほとんど不可欠な役割を果たしている bFGF に比べてどの程度の性能があるかについての検討を行う。

3. 研究の方法

- (1) ヒト ES 細胞の未分化維持に不可欠な役割をしていることが知られている OCT4 遺伝子のプロモータ領域に GFP をレポーターとしてつなげたベクター遺伝子を導入したヒト ES 細胞株を樹立した。
- (2) そしてこの細胞株で GFP の蛍光強度が、ヒト ES 細胞の分化・未分化状態と強い正の相関を示しており、High Content Analysis (HCA) によって、さらに細胞の形態などの要素を加味し、未分化・分化状態をより厳密な評価をすることにも成功した。
- (3) HCA を行う化合物ライブラリとしては多様性があり、細胞薬理活性のある Prestwick Library を用いた。
- (4) スクリーニング培地にはヒト ES 細胞の未分化増殖にほとんど不可欠な役割を果たしている bFGF を含まない培地を基本培地として用いた。この培地に 100 ng/ml bFGF を添加することでヒト ES 細胞がフィーダー細胞無しに維持培養できることが既に発表されている。
- (5) この化合物を用いて長期培養したヒト ES 細胞の未分化状態は細胞の形態、未分化表面抗原マーカーの発現、未分化マーカー遺伝子の発現と分化マーカーの発現抑制について sqRT-PCR と抗体免疫染色により行った。
- (6) この化合物を用いて長期培養したヒト ES 細胞での染色体の正常性について G-バンド染色を行うことにより検討を行った。

(7) この化合物を用いて長期培養したヒト ES 細胞の多分化能は、培養下での分化誘導とテラトーマ形成により検討を行った。

4. 研究成果

- (1) ヒト ES 細胞の未分化・分化状態に対する化合物の効果を、より客観的に数値化により評価する系の構築に成功した。
- (2) さらに細胞の形態などの要素を加味し、未分化・分化状態をより厳密な評価をすることにも成功した。これにより多種の化合物をスクリーニングできるハイスループットスクリーニング(HTS)への発展が可能となった。
- (3) (1)(2)の成果を分子生物学会、再生医療学会などで、発表を行い、非常に好評であった。またランチョンセミナーで招待講演に招かれた。
- (4) 多様性があり、細胞薬理活性が知られている約1000化合物についてスクリーニングを行い、効果のある18種類の化合物を見出すことに成功した。
- (5) 18種化合物の内、5種類が構造的な類似性と機能的類似性(神経伝達物質の拮抗剤)があることを見出し、さらに、この中の2種の化合物を用いて詳細な検討を行った。
- (6) ヒトES細胞3株を用い、その内2株について、培地中にbFGFを添加することなく長期間培養維持が可能であることが確認できた。
- (7) 長期間培養後も形態的には未分化状態を維持しており、細胞表面抗原やRNAの発現パターンからも未分化維持増殖を維持していた。
- (8) 正常な染色体を有していること、また三胚葉への分化能についても確認できた。
- (9) 本研究成果は国際誌Biochemical and Biophysical Research Communications 434, 710-716. (DOI:10.1016/j.bbrc.2013.03.061)に掲載された。
- (10) 本研究に関連した研究成果として、共同研究などを通じて多くの発表をすることができた。

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6件)

- (1) Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N. and Kawase, E (2013). "Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal." **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 434,710-716. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.061. 査読有
- (2) Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K. and Kawase, E. (2012). "Recombinant E8 fragments of human laminin isoforms support long-term culture of human pluripotent stem cells under defined and xeno-free culture conditions." **Nature Communications** 13, 1236. DOI: 10.1038/ncomms2243. 査読有
- (3) Aizawa, E., Hirabayashi, Y., Iwanaga, Y.,

Suzuki, K., Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K., Wada, T., Tooi, N., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K. (2012). "Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-Dependent Adenoviral Vectors." **Molecular Therapy** 20 (2) 424-431. (2012.2). DOI: 10.1038/mt.2011.266. 査読有

(4) Yamauchi, K., Sumi, T., Minami, I., Otsuji, T.G., Kawase, E., Nakatsuji, N., Suemori, H. (2010). "Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by β -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs." **Genes to Cells** 15 (12), 1216-1227. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01455.x. 査読有

(5) Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S. -Y., Nakatsuji N. and Kawase, E. (2010). "Role of *SOX2* in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells." **Genes to Cells** 15 (5), 455-469. 査読有

(6) Sakurai, K., Shimoji, M., Tahimic, CGT., Aiba, K., Kawase, E., Hasegawa, K., Amagai, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. (2010). "Efficient system to integrate functional genes into a defined locus in human embryonic stem cell lines." **Nucleic Acids Res.**, 38 (7), e76. 査読有

〔学会発表〕 (計 12 件)

(1) 宮崎隆道、二木杉子、末盛博文、山田雅司、川崎美和、林麻利亜、熊谷英明、中辻憲夫、関口清俊、川瀬栄八郎：ラミニン E8 フラグメントを用いたヒト ES/iPS 細胞の単一分散培養法 第 12 回日本再生医療学会総会 (横浜、2013. 3. 23)

(2) Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Itsunari Minami, Maiko Tomioka, Takayuki Kondo, Ting-Fang Kuo, Hiroshi Endo, Haruhisa Inoue, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Yoshinori Kawazoe, Kazuhiro Aiba, Koh Nagata, Eihachiro Kawase, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Shinya Yamanaka, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda, and Motonari Uesugi. Fluorescent Chemical Probes for Human Stem Cells. 2013 Cira International Symposium (Kyoto, 2013, 3.11)

(3) Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa Taniguchi,

Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi, Eihachiro Kawase. RECOMBINANT HUMAN LAMININ E8 FRAGMENTS (LM-E8s) SUPPORT THE EFFICIENT ADHESION AND EXPANSION OF DISSOCIATED HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS UNDER DEFINED AND XENO-FREE CONDITION. 2012 World Stem Cell Summit (West Palm Beach, USA, 2012.12.3).

(4) Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa Taniguchi, Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi, Eihachiro Kawase. Recombinant E8 fragments of human laminin isoforms support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition. 10th International Society for Stem Cell Research (Yokohama, 2012.6.15).

(5) Takada, Kei, Hirai, Masako, Kawase, Eihachiro, Hamao, Mari, Kashigi, Fumi, Suemori, Hirofumi, Nakatsuji, Norio, Takahashi, Tsuneo A. Manufacturing and banking of clinical-grade human embryonic stem cell lines in a GMP facility. 10th International Society for Stem Cell Research (Yokohama, 2012.6.15).

(6) Kawase E., Applications of scalable culture system for clinical-grade undifferentiated human embryonic stem cells. Wednesday Industry Symposia, 10th International Society for Stem Cell Research (Yokohama, 2012.6.13).

(7) Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Eihachiro Kawase, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda, Shinya Yamanaka, Motonari Uesugi. Fluorescent chemical probes for human stem cells. AIMECS11 8th AFMC International Medical Chemistry Symposium. (Tokyo, 2011, 11, 29).

(8) Suzuki, K., Hirabayashi, Y., Aizawa, E., Iwanaga, Y., Tokumitsu, A., Sakurai, K., Shimoji, M., Aiba, K., Wada, T., Tooi, N., Kawase, E. Suemori, H., Nakatsuji, N. and Mitani, K. Homologous Recombination in human pluripotent stem cells using helper-dependent adenovirus vectors. 9th

International Society for Stem Cell Research (Toronto, Canada, 2011, 6, 17).

(9) 熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄八郎：ヒト ES 細胞の未分化維持因子の探索を目的とした High content analysis (HCA)、第 10 回日本再生医療学会総会(東京、2011. 03. 1)

(10) 山内香織、角智行、南一成、尾辻智美、川瀬栄八郎、中辻憲夫、末盛博文：β-catenin の活性化および BMP シグナルの抑制による原条前側領域の形成を經由したヒト ES 細胞から心筋細胞への分化、第 33 回日本分子生物学会 (神戸、2010. 12. 10)

(11) 熊谷英明、末盛博文、上杉志成、中辻憲夫、川瀬栄八郎：High Content Analysis (HCA) によるヒト ES 細胞の未分化維持因子の探索、第 33 回日本分子生物学会 (神戸、2010. 12. 9)

(12) Ko Mitani, Kaoru Mitsui, Keiichiro Suzuki, Emi Aizawa, Haruka Shiiba, Eihachiro Kawase, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji. Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. 第 16 回日本遺伝子治療学会 (栃木、2010.7.1)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 川瀬栄八郎、宮崎隆道、関口清俊 実験医学 4 月号 (カレントトピックス) 「ラミニン ES を用いた安全で効率的なヒト多能性幹細胞培養法の開発」 31、918-922 (2013)

(2) Adachi, K., Suemori, H., Nakatsuji N. and Kawase, E. "The role of *SOX2* in maintaining pluripotency and differentiation of human embryonic stem cells." In "Stem Cells in Clinic and Research" pp. 169-184 (Ed. Ali Gholamrezanezhad) (InTech). ISBN: 978-953-307-797-0 (2011).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

細胞接着タンパクを用い安全・高効率なヒトES/iPS細胞の培養法を開発

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pr/2012/12/05-nr.html>

細胞接着タンパクを用い、安全・高効率なヒトES/iPS細胞の培養法を開発

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121205_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川瀬 栄八郎 (Eihachiro Kawase)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号：70402790

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし