

平成 22 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	多能性幹細胞を中心とした再生医療の基盤的研究	
研究者所属・氏名	研究代表者：細井 美彦 共同研究者：福田 寛二、三谷 匡、朝田 滋貴、寺村 岳士	

1. 研究目的・内容

本研究では、幹細胞を用いた再生医療の関連技術の開発を目的とし、組織幹細胞を用いた基礎再生医療基礎研究と、多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) を用いた幹細胞および再生医療の基盤的研究を行った。幹細胞研究においては、組織幹細胞研究と多能性幹細胞研究は専門性を異にするために別個の研究テーマとして取り扱われることが多いが、本研究においては共同研究グループを構成し包括的なテーマとして実施することを特徴とする。これにより、近年加速度的に研究が進められる本領域においてより効率的に新規性の高い知見を得るとともに本学発の技術開発を目指した。

2. 研究経過及び成果

本研究プロジェクトでは、生物理工学部、医学部の学部間連携により再生医療分野において新しい知見や方法論を見出すことを目指した。また、合同セミナーや大学院生の研修 (生物理工学部から大学院生複数名を高度先端総合医療センター再生医療部にて短期間受け入れる) を実施し、合目的性と優れた専門性をもつ大学院生の育成を目的とした。

具体的な研究テーマをして

- (1)滑膜幹細胞を用いた軟骨細胞の分化誘導方法の開発
- (2)マウス ES 細胞、カニクイザル ES 細胞を用いた、幹細胞の未分化性維持に関する研究
- (3)霊長類多能性幹細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導と、誘導因子、特異的マーカーの探索
- (4)ウサギ組織幹細胞あるいは ES 細胞からの軟骨組織、神経幹細胞の誘導と、障害モデルへの移植を実施し、期間内に下記のとおり複数の成果を得た。

(1)の研究テーマについては、臨床応用を目指したより効果的な幹細胞抽出方法および培養方法の開発を目指した。本研究においてはまずウシ MP 関節滑膜組織をモデルとして研究を実施した。その結果、DNA 結合性色素 Hoechst33342 の細胞内取り込み量の違いを利用して幹細胞画分を効率よく分離できること、また同法で得られた幹細胞が優れた増殖能力と分化多能性を有していることを見出した (Teramura et al. BMC Musculoskelet Disord 2008)。しかし、ウサギやマウスなど他動物での再現が困難であること、加齢など個体のバックグラウンドによって量と質が不安定になるという欠点が明らかとなった。一方、発展研究として実施したマウス新生児脳組織から幹細胞を分離する研究において、高い未分化性と多能性を有する画分の存在を発見し、原著論文として報告した (Takehara et al. Stem Cells Dev 2009)。これらの成果は、組織幹細胞の限界と可能性を同時に示唆するものであり、今後、ヒト臨床検体での実施を進めるとともに本法の改良が必要であると考えている。

研究(2)については、本研究プロジェクトにおいて基礎的情報を提供するテーマと位置づけた。ES 細胞の未分化性を安定的に維持するような分子の探索は、幹細胞を完全合成培地で培養する可能性を示唆し、より感染リスクの低い再生医療用細胞の提供につながる。このような分子は幹細胞全般に共通して有用である可能性があることから、現在培養が困難な組織幹細胞の培養系の改良にもつながる可能性がある。本研究では、特徴的な遺伝的背景をもつ複数の ES 細胞を作製し、その性質を詳細に検討することにより、未分化に関わる分子機構の考察を行った。具体的には、雌雄片親性のゲノムを有する ES 細胞を樹立し、分化能力、未分化性とメチル化状態を観察した。その結果、雌雄単為発生胚由来 ES 細胞が正常胚由来 ES 細胞と同等の分化能力を有することが明らかとなり (Onodera et al. Theriogenology 2010)、加えて雄性単為発生胚由来 ES 細胞では未分化維持に関わる遺伝子の一つであ

る Igf2 の発現亢進に伴い未分化性および腫瘍形成性が上昇していることが明らかとなった (Teramura et al. J Reprod Dev 2009)。本研究成果は、多能性幹細胞の未分化性維持機構と腫瘍形成性について非常に意義深い知見を提供することとなった。

また、2010 年度にはマウス ES 細胞からエピプラスト幹細胞を誘導することに成功し、同時にエピプラスト状態を維持するために必要な因子を同定した。本研究成果は現在、原著論文として米国専門誌に投稿中である。本研究成果は、ヒト型多能性幹細胞とマウス型多能性幹細胞の発生学的地位について重要な示唆を与えるものであり、新しい幹細胞制御法の開発に結びつく成果であった。

(3)については、カニクイザル ES 細胞の樹立、培養に関する研究および始原生殖細胞の誘導を実施することで、霊長類 ES 細胞における万能性の評価について検討を加えた。また、平成 20 年度よりヒト iPS 細胞を導入し、間葉系幹細胞の分化誘導を実施した。本研究において、Rho-ROCK 阻害剤である Y27632 の使用により霊長類 ES 細胞の取り扱いが容易になること (Takehara et al. Mol Hum Reprod 2008)、また、同法で維持した ES 細胞では生殖細胞への分化能力を含む多能性が維持されていることが明らかとなった (Fukunaga et al. Cell Reprogram 2010)。カニクイザル ES 細胞に関する研究で得たノウハウや手法を元にヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた間葉系幹細胞の分化実験を行い、間葉系幹細胞様細胞が出現する際には上皮-間葉転換に類似した現象が生じていること、これにより得られた細胞は紡錘系を維持し、CD105 や CD271 といった間葉系幹細胞マーカーを発現していることを確認した (寺村ら、第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会)。また、より高品質な間葉系幹細胞をより簡便に分化誘導することを目的に、免疫不全マウスの体内でヒト iPS 細胞を間葉系幹細胞に分化させこれを取り出す方法の開発を行った (特願 2010-274147)。同研究の成果はプレスリリースされ、主要雑誌を含む多数のメディアに取り上げられた。

(4)は、体外で誘導した間葉系幹細胞が実際に体内での再生現象に有効に寄与出来るかどうかを検討する上で重要なテーマであった。本研究において、酸素濃度が間葉系幹細胞の分化および純化に極めて重要な役割を有していることを初めて見出し、また同法で誘導した間葉系幹細胞が大腿骨軟骨全層欠損モデルにおける軟骨再生に寄与することを明らかにした。本研究の成果は現在、原著論文として米国専門誌に投稿中である。本研究成果はヒト型多能性幹細胞を用いた再生医療のモデル研究として極めて新規性の高い知見であり、今後の再生医療基礎研究に重要な情報を提供するものであると考えられる。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究プロジェクトでは、幹細胞の新しい制御方法や培養方法の開発に直接結びつく重要な知見を複数得ることができた。また、本プロジェクトを通して ES 細胞樹立技術、iPS 細胞作製技術をはじめとする重要な技術の開発と発展が得られた。本研究の最終目標は新規の再生医療技術の開発であり、今後はヒト臨床検体やヒト多能性幹細胞を用いたより実践的な改良が必要である。また、2010 年度から新たに開始したヒト型多能性幹細胞とマウス型多能性幹細胞の相違点に関する研究からは、おそらくこれまでの研究成果をヒトに応用する上で欠かすことのできない情報が得られると考えられる。そのため、今後はヒト細胞での応用研究と、比較研究の充実が必須であると考えている。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
BMC Musculoskelet Disord	雑誌	2008 Jun
Mol Hum Reprod	雑誌	2008 Nov
J Reprod Dev	雑誌	2009 Jun
Stem Cells Dev	雑誌	2009 Dec
Theriogenology	雑誌	2010 Jul
Cell Reprogram	雑誌	2010 Jun
Cell Reprogram	雑誌	2010 Aug
第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会	口頭 (シンポジウム)	2009 年 11 月 5 日
第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会	口頭 (パネルディスカッション)	2010 年 10 月 15 日