

平成21年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学 理事長 殿
近畿大学 学長 殿

1. 研究者名 細井 美彦
2. 課題番号 KD-03
3. 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
4. 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に、組織幹細胞、ES細胞、iPS細胞を用いた幹細胞研究および再生医療の基盤的知見の獲得を目指す。

上記研究を包括的に行う事で、近年加速度的に研究が進められる本領域における基礎研究・臨床研究基盤の即時的な更新と、本学発の知見、技術の発信を狙う。

主にマウス、カニクイザル、ウサギ、ウシに由来するES細胞、組織幹細胞を材料とし、

(1)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

(2)カニクイザルES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

(3)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

(4)滑膜幹細胞を用いた軟骨細胞の分化誘導方法の開発

の4テーマを並行して実施してきた。

本年度よりヒトiPS細胞を導入したため、以降『(2)カニクイザルES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』を『(2)ヒトiPS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』に変更して実施することとした。

平成20年度に記載した次年度計画には

(1)培養環境によって未分化関連遺伝子がどのように変化するかを、マイクロアレイを用いて検討する。また、未分化維持シグナル経路に関わる阻害剤を使用し、生じる変化を観察する。

(2)21年度は、ヒトiPS細胞の導入を検討している。早期に導入が認められた場合、より応用に近いヒトiPS細胞を用いて間葉系幹細胞の分化誘導を検討するという方針に変更する。

(3)幹細胞を実際に軟骨全層欠損モデルに移植し、組織学的な解析を行う。また、22年度に向けて、ウサギES細胞をつかった軟骨細胞の分化誘導に関する研究を開始する。

(4)21年度は、臨床応用に向けた研究として、移植を介した安全生試験に着手する。

を挙げていたが、(1)に関しては、組織幹細胞との共通性について検討を行う事で、たとえば分化誘導などに有用な情報を得ることを目指すこととした。また、(3)に関しては既に一定の成果を得られたため、次段階であるウサギ多能性幹細胞を用いた検討に取りかかることとした。

上記の事項をもとに、平成21年度には

(1-1)マウス単為発生胚由来ES細胞の樹立と分化誘導および多能性の評価

(1-2)組織幹細胞の未分化性維持に最適な培養条件の検討

(1-3)カニクイザルES細胞の多能性に関する検討

(2-1)マウスiPS細胞を用いた間葉系幹細胞の分化誘導系の開発

(2-2)ヒトiPS細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導

(3-1)ウサギES細胞の樹立と評価、分化誘導

に関する研究を行った。

5. 研究の経過

平成 21 年度に実施した研究に関して、

(1-1)マウス単為発生胚由来 ES 細胞の樹立と分化誘導および多能性の評価

前年度に樹立したマウス単為発生胚由来 ES 細胞(PgES 細胞)を用いて、神経細胞、心筋細胞、肝細胞を分化誘導する研究を実施した。また、PgES 細胞を、異なるミトコンドリア型を有する初期胚にインジェクションしキメラマウスを作製、各臓器での分布を観察した。その結果、PgES 細胞がほとんどの臓器に分配されており、成体マウスでも維持されていることを明らかにした。これまで、PgES 細胞の臓器形成への寄与能力は不明であったが、本研究で PgES 細胞の幅広い能力が明らかとなった。本研究成果は第 9 回日本再生医療学会で発表するとともに、学術誌 *Theriogenology* に掲載された。本研究項目については、前年度と合わせ、学会発表 2 件、海外原著論文 2 報への報告をもって終了した。

(1-2)組織幹細胞の未分化性維持に最適な培養条件の検索

本プロジェクトは、幹細胞研究における基盤的な知見を集積し、これをもとに有用な技術開発に結びつけることを目指している。現在、臨床応用が検討されている幹細胞種として、組織幹細胞がある。組織幹細胞は ES 細胞、iPS 細胞よりも安全性が高いが、一方で優れた培養系が開発されていないという欠点もある。本年度は、組織幹細胞を研究材料に加え、前年度から使用してきた多能性幹細胞と比較検討する中で、最適な培養条件の検索をおこなった。本年度は ES 細胞、iPS 細胞の培養に使用している培養液を組織幹細胞に使用すると、ごく一部の細胞が多能性様の形質を示すことを明らかとした。本研究成果は、学術誌 *Stem Cells and Development* に掲載された。今後、さらに詳細な検討を加え、幹細胞の維持や多能性の誘導に結びつく因子の解明を目指す。

(1-3)カニクイザル ES 細胞の多能性に関する研究

カニクイザル ES 細胞はヒト ES 細胞、iPS 細胞の能力を推測する上で非常に有用な材料である。しかし、キメラ動物の作製が困難であるために、多能性の証明が困難である。本年度は、カニクイザル ES 細胞からの生殖細胞分化誘導を研究項目に加え、霊長類の多能性幹細胞が生殖細胞形成を生じる程の多能性を有しているのかを検討した。その結果、自律的分化により生殖細胞形成シグナルが認められる事、白血病細胞阻害因子(LIF)の添加により生殖細胞形成率を上昇させることが明らかとなった。

本研究成果は学術誌 *Cellular Reprogramming* に受理され、掲載予定である。なお本研究項目については学会発表 2 件、海外原著論文 1 報への報告をもって終了した。

(1-4)未分化維持、分化傾倒に関わる経路の阻害剤を用いたマウス ES 細胞樹立系の開発

近交系マウス ES 細胞は、疾患モデルマウス、遺伝子改変マウスの作製に欠かす事ができない材料である。しかし、マウス系統によっては ES 細胞の樹立は困難であり、現在の培養系では不十分である。本研究では、マウス ES 細胞の分化傾倒を促進するシグナル因子である MEK/Erk、GSK3b に対する阻害剤を用いて樹立効率の向上を検討した。両阻害剤の混合添加により、通常 3%程度の BALB/cA 系統マウス ES 細胞の樹立効率が 100%にまで上昇した。樹立した ES 細胞は多分化能と未分化性を備えた、従来の ES 細胞と遜色のない細胞株であることが確認され、本法の有用性が確認された。本研究成果は第 9 回日本再生医療学会にて発表した。

(2-1)マウス iPS 細胞を用いた間葉系幹細胞の分化方法の開発

前年度から実施してきた研究である。本年度は、さらに効率的のよい誘導方法の開発に加え、誘導した細胞の特性を株化細胞と比較する研究を実施した。本研究により、マウス iPS 細胞から誘導した間葉系幹細胞が軟骨、脂肪、骨に分化誘導する能力を有し、さらに、誘導した軟骨細胞の基質産生能力は、株化軟骨細胞に匹敵する事が明らかとなった。本研究成果は第 9 回日本再生医療学会、第 23 回日本軟骨代謝学会にて発表するとともに、学術誌 *Cellular Reprogramming* に受理され、掲載予定である。

(2-2)ヒト iPS 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導

本年度より、ヒト iPS 細胞を導入した。そのため、前年度より行ってきたカニクイザル ES 細胞を用いた検討を中止し、以降の分化誘導実験には全てヒト iPS 細胞を使用することとした。前年度から本年度にかけて開発した、マウス iPS 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導方法を一部改良して使用したところ、ヒト iPS 細胞からも間葉系幹細胞の分化誘導が可能であることが明らかとなった。本研究成果は、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会(シンポジウム)、第 9 回日本再生医療学会、第 23 回日本軟骨代謝学会にて発表した。ヒト iPS 細胞から特定の分化誘導系によって間葉系幹細胞を分化誘導するという試みはこれまでに無く、本研究成果が初めての報告となった。

(3-1)ウサギ ES 細胞の樹立と評価、分化誘導

前年度、ウサギにおいて組織幹細胞を移植し、組織再生を評価する系の構築を行った。本研究プロジェクトは多能性幹細胞の臨床応用の可能性を検討することを目的の一つとして掲げており、本年度

はウサギモデルへの移植を目指したウサギ ES 細胞の樹立と最適培養条件の設定および分化誘導の予備的検討をおこなった。ウサギの ES 細胞は国内外でも樹立できる施設が非常に少ないが、我々の研究グループではこれを効率よく樹立し、安定的に培養・維持する系の開発に成功した。分化誘導に関しては現在最適条件を検討中である。本年度の研究成果は、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会（シンポジウム）、第 9 回日本再生医療学会にて発表するとともに、学術誌 BMC Cell Biology に投稿中である。

6. 本研究と関連した今後の研究計画

本プロジェクトにおける各研究テーマ

- (1)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
- (2)ヒト iPS 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
- (3)ウサギ多能性幹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
- (4)滑膜幹細胞を用いた軟骨細胞の分化誘導方法の開発

に関して、以下の目標を設定し、研究を遂行する。

平成 22 年度は計画最終年度である。そこで、本来の目的である「幹細胞を用いた再生医療の基礎研究と ES 細胞、iPS 細胞を用いた幹細胞研究、再生医療の基盤技術の開発」に直結する項目として、

- (1)培養環境によって未分化関連遺伝子の発現に関する検討に加え、
- (2)ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞を分化誘導する方法の開発、および誘導した細胞の特性解析と、
- (3)ウサギ ES 細胞からヒト iPS 細胞と同様の方法で間葉系幹細胞を誘導し、軟骨全層欠損モデルに移植するという安全性試験を重点的に実施する。

7. 成果の発表

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)	添付(済・未)
第 9 回日本再生医療学会	口頭(計 4 演題)	平成 22 年 3 月 18, 19 日	添付(済・未)
Cellular Reprogramming	雑誌(計 2 報)	印刷中	添付(済・未)
Therigenology	雑誌(計 1 報)	印刷中	添付(済・未)
第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会	口頭(計 1 演題)	平成 20 年 11 月 5, 6 日	添付(済・未)
第 23 回日本軟骨代謝学会	口頭(計 1 演題)	平成 22 年 4 月 2, 3 日	添付(済・未)
Stem Cells and Development	雑誌(計 1 報)	平成 21 年 12 月	添付(済・未)

※現時点において別刷または著書等の現物が添付できない場合は、発表され次第すみやかに提出してください。