

件の至適化を行った。この方法を用いてヒト ES 細胞より肝アルブミン陽性細胞が多く誘導出来る条件を見いだした。

一方、支持細胞を用いない方法として、本事業で開発したsBM を用いた方法により、ヒト ES 細胞より、肝アルブミン陽性細胞の誘導も成功している。その成熟度は支持細胞を用いた方法までは至らないが、支持細胞を用いない方法によるため、今後再生医療的な応用面、および肝分化成熟の分子機構解明に使用できる点において、その意味が大きい。

さらに、埼玉医科大学三谷教授との共同開発によるアルブミン/mKO1 ノックインヒト ES 細胞、およびノックインヒト iPS 細胞の創製により、成熟した細胞の純化・解析が可能になった。今後、この事業で開発したノックインヒト ES 細胞、iPS 細胞を用いて、成熟肝細胞を得るための薬剤スクリーニングに資するモデル細胞として薬剤評価系の構築に使用できる。これにより創製した肝細胞についての応用開発がさらに躍進し、展開出来ると考える。

2. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導技術の開発

大阪大学
共同実施: 日本皮革研究所

生体組織における細胞の増殖と分化は、周囲の環境から提供される様々な情報に基づいて制御されている。この情報の主たる担い手は、周囲の細胞から分泌される液性因子と細胞の足場となる細胞外マトリックスである。細胞外マトリックスは、細胞表面の受容体と結合することにより、それ自身がシグナル分子として機能するだけでなく、様々な液性因子を結合することにより、それらの組織内での分布や濃度勾配の形成に深く関わっている。細胞外マトリックスの分子構成は、細胞ごとに異なっており、同じ細胞であっても発生や分化段階の違いによって変化することが知られている。このような細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスを生体外で再構築することは、ES細胞の分化を選択的に誘導し、また、特定の分化形質を獲得した細胞を安定に維持するために不可欠である。

本課題では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を解明し、それをできるだけ忠実に模倣した人工基底膜を設計・構築することにより、ES細胞を選択的に分化誘導する技術基盤を確立することを目的とする。具体的には、構成的基底膜分子であるラミニンと IV 型コラーゲンを組み合わせたものを第一世代の人工基底膜とし、これに細胞特異的に発現する基底膜分子を組み込んだものを第二世代人工基底膜として、細胞ごとに分子構成を最適化した人工基底膜を用いて、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する基盤技術の開発を行う。なお、(1) 細胞ごとに最適化された基底膜分子構成の解明、(2)ラミニンおよび他の基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の確立は大阪大学で行い、IV型コラーゲンの安定供給系の確立は日本皮革研究所で行う。また、(3)人工基底膜の再構築およびそれを用いたES細胞の選択的分化誘導制御は、大阪大学と日本皮革研究所が共同して実施する。

2. 2. 4. 1 細胞毎に最適化された基底膜分子構成の解明とデータベース化

大阪大学

(1) 事業目的と背景

細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成とその発生および細胞分化に伴う時間空間的制御の全貌を解明するため、発生段階の異なるマウス胎仔および成体マウス組織を用いた基底膜蛋白質の生体内局在解析を行い、ES細胞の分化誘導および分化形質の安定化に有効な基底膜分子構成を解明する。基底膜蛋白質は、これまでに約 50 種が同定されており、中でもラミニン、IV 型コラーゲン、ニドゲン、パールカンはどの基底膜にも含まれる構成的構成分子である。ラミニンと IV 型コラーゲンには、それぞれ 11 種および 6 種の異なるサブユニット鎖があり、ニドゲンには 2 種類のアイソフォームが存在する。どのタイプのラミニン、IV 型コラーゲン、ニドゲンで基底膜が構築されているかは、細胞ごとに異なっている。これら 20 種の主要基底膜分子の他にも、細胞・組織特異的に発現する 30 近い基底膜分子が存在する。事業分担者は、これまでに 44 のマウス基底膜蛋白質に対する抗体を作製し、胎生 16.5 日の胎仔の全身における局在を免疫組織化学的に解析し、その染色結果を画像のまま収録したデータベースを構築している。本課題では、ES細胞の選択的分化誘導制御に有用な基底膜の分子構成を解明することを目的として、胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日、および 12.5～16.5 日のマウス胎仔における全基底膜蛋白質の局在を免疫組織化学的手法により網羅的に解析し、ES細胞の選択的分化誘導制御に必要な発生初期から中期までの基底膜分子構成の時間空間的制御の全貌を解明することを目的とする。

一方、これまでに同定された基底膜分子の他に、未同定の基底膜分子も残されている可能性は高い。細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を解明するためには、このような基底膜分子を新たに同定し、その局在を明らかにする必要がある。本課題では、このような未同定の基底膜分子の候補をゲノム情報に基づいて *in silico* で選別し、その基底膜への局在性を免疫組織化学的に検証する。また、ヒトES細胞の分化に伴う基底膜の分子構成の変化を解析するためには、ヒト基底膜蛋白質の局在解析に利用可能な組織染色適合抗体を整備する必要がある。主要なヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適合抗体を整備するとともに、抗体ごとに組織染色条件の最適化を行う。

(2) 事業内容と目標

発生初期から中期にかけての胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日、12.5～16.5 日のマウス胎仔を対象として、主要基底膜分子 20 種(ラミニンおよび IV 型コラーゲンの全サブユニット鎖、ニドゲン-1 および-2、およびパールカン)の発現部位を免疫組織化学的手法により網羅的に解析する。具体的には、発生段階の異なる ICR マウス胎仔の全身薄切標本をこれまでに調製済みの 20 種の抗体で染色し、発生初期から中期にかけての基底膜分子構成の時間空間的変化の実体を明らかにする。また、胎生 12.5 日、14.5 日の染色標本については、高解像度のデジタル画像に変換後、インターネットで閲覧可能な画像データベース(“マウス基底膜ボディマップ”)に収録する。平成 18 年度は、胎生 5.5～7.5 日および 12.5～14.5 日のマウス胎仔における主要基底膜蛋白質 20 種の局在解析を完了することを目標とした。平成 19 年度～平成 21 年度は、解析の対象を胎生 8.5～

10.5 日のマウス胎仔および成体組織に拡大し、マウス発生のほぼ全過程を通じた主要基底膜蛋白質の発現プロファイルを心臓、肝臓、脳・血管に重点をおいて解明する。胎生 12.5~16.5 日の解析結果は、高解像度のデジタル画像に変換後、画像データのままデータベース化する。また、臓器実質細胞および臓器幹細胞周囲の基底膜分子組成について解析を進める。

これと並行して新規基底膜蛋白質を同定するため、分子量 20 万以上かつ機能未知の分泌性蛋白質をゲノム情報に基づいて抽出し、得られた候補蛋白質の生体内局在部位を免疫組織化学的に検索する。平成 18 年度は、Ensembl データベースの情報に基づいて分子量 20 万以上の機能未知分泌蛋白質を選別し、その中でも優先順位の高いものに関して抗体作製を行うことを目標とした。平成 19 年度は、得られた候補蛋白質の中でも肝臓の類洞に局在する蛋白質、胃や腸の基底膜直下に局在する蛋白質に焦点を絞り、その組換え蛋白質を作製し、生理機能の解明を目指した。また、ヒト基底膜蛋白質の局在解析に必要な抗体の整備を進めるとともに、抗体ごとに組織染色条件の最適化をはかる。平成 18 年度は、これまでに調製済みのヒトラミニン単クローン抗体の組織染色条件を最適化するとともに、ヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適応単クローン抗体のスクリーニング条件を確立することを目指した。平成 19 年度は、その成果を踏まえて、アグリン等のヒト基底膜蛋白質に対する組織染色適合単クローン抗体の取得を目標とした。

(3) 研究成果

① 胎生 12.5 日および 14.5 日胚における基底膜分子構成の解析

ICR マウス胎生 14.5 日胚および 12.5 日胚の全身薄切標本を 11 種のラミニンサブユニット鎖、6 種類の IV 型コラーゲンサブユニット鎖、2 種のニドゲンおよびパールカンに対する抗体でそれぞれ免疫組織染色し、合計 20 種の主要基底膜蛋白質の局在部位を調べた(図1)。得られた染色標本は、500~1,000 の視野に分割して顕微鏡下で連続撮影し、各染色標本の高解像度のデジタル画像を取得した。また、デジタル画像の取得にライン CCD カメラを実

図1:マウス胎仔胚における主要 20 種の基底膜蛋白質の免疫組織染色(胎生 14.5 日胚)

11 種のラミニンサブユニット鎖、6 種の IV 型コラーゲンサブユニット鎖、ニドゲン-1 および-2、パールカンの各抗体の染色結果を示す。これらの染色標本は、胎生 12.5 日および 16.5 日の染色結果とともに高解像デジタル画像として「基底膜ボディマップ」データベースに収録されている。



装した Aperio ScanScope を導入し、染色標本のデジタル画像取得を効率化した。得られた画像は、高解像度のままインターネット上で閲覧可能なデジタルバーチャルスライドに変換し、既に画像データを取得済みの胎生 16.5 日胚の結果と合わせて画像データベース化した。この画像データベースを「基底膜ポディマップ」と呼んでいる。

収集された胎生 12.5～16.5 日胚における主要な基底膜構成分子 20 種の染色結果を基盤とし、必要に応じて特定の臓器の成体組織標本の染色結果も加味して、心臓など特定の臓器における基底膜の分子構成を解析した。

平成 19 年度からは「基底膜ポディマップ」データベースに新たに 15 種類の基底膜蛋白質の情報を追加し(後述の項目⑥を参照)、それらを含む計 34 種類の基底膜蛋白質の発現様式について解析を行った。

(ア)肝臓類洞における基底膜蛋白質の局在解析：肝臓は肝実質細胞と類洞壁内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞などの非実質細胞から構成されている。肝実質細胞は外分泌と内分泌の両方の作用を持ち、そのため肝臓の主な機能は肝実質細胞によって営まれている。肝実質細胞は類洞壁に間質マトリックスを介して接着している。この間質マトリックスには基底膜成分が含まれていることが知られている。マウス胎児および成体の間質マトリックスに含まれる基底膜成分を検討した結果、ラミニン α 1鎖が胎生 12.5 日の肝臓においてのみ検出されるのに対し、 α 4および β 2鎖は成体マウスで検出された。ニドゲンでは、ニドゲン-2 が胎児期において主要な構成成分として検出されたが、成体ではニドゲン-2 は減少し、それに代わってニドゲン-1 の発現が亢進していた。IV 型コラーゲン α 1, α 2鎖およびパールカンはいずれの時期の類洞にも存在していた。

(イ)心筋基底膜の解析：心臓は最も早い時期から働く臓器のひとつである。E12.5 の心臓はすでに 2 心房 2 心室からなる。胎児期の心臓壁は緻密層と肉柱に分けられ、前者は増殖能を持つ細胞、後者は分化した細胞より構成される。肉柱は胎児心臓の拍動を担うが、成体になると緻密層に取り込まれ、その構造は消失する。

緻密層の心筋細胞は IV 型コラーゲン α 1, α 2鎖、ラミニン α 2, α 4, β 2, γ 1鎖、およびニドゲン-1、パールカンを構成的成分として発現していた。ラミニン β 2鎖は胎児期では検出されなかったが、成体では強く発現していた(図2)。一方、ニドゲン-2 は胎児期において強く発現するが、成体では血管にのみ認められ、心筋基底膜での発現は消失していた。これらのことから、胎児および成体心筋基底膜はラミニン β 2鎖とニドゲン-2 の発現パターンにより大きく区別されることがわかった。なお、IV 型コラーゲン α 3, α 4鎖およびラミニン γ 3鎖も成体でのみ発現していたが、その発現部位は乳頭筋に局限していた。一方、肉柱の心筋では緻密層の心筋基底膜構成成分に加え、IV 型コラーゲン α 5, α 6鎖およびラミニン α 5鎖が存在し、発生後期になるにしたがってその発現は亢進していた。これらの基底膜成分はいずれも成体心臓壁には存在しないことから、緻密層型心筋に特徴的な基底膜成分であると考えられる。

以上の結果を踏まえ、心臓壁緻密層の基底膜組成は以下のように推定された。

胎児心筋: IV 型コラーゲン (α 1)²(α 2)、ラミニン-211/221, 411/421、ニドゲン-1, -2、および

パールカン

成体心筋:IV型コラーゲン ($\alpha 1$) 2 ($\alpha 2$)、ラミニン-211, ラミニン-411、ニドゲン-1、パールカン

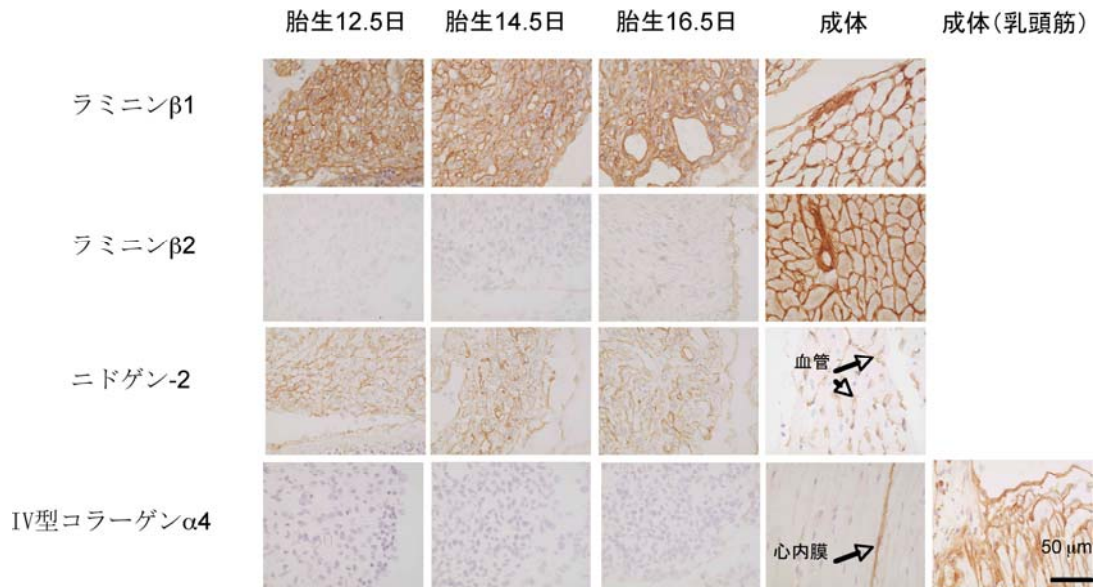


図2:心筋における基底膜分子構成の時空間制御 左心室心筋壁における基底膜蛋白質ラミニン β 1, β 2鎖、ニドゲン-2、IV型コラーゲン α 4鎖の局在部位を胎生12.5日、14.5日、16.5日の胎児および成体マウスで調べた結果を示す。

(ウ)消化管基底膜蛋白質の時空間的発現変化の解析: 原始的な消化管からは肝臓、膵臓、肺等が形成され、消化管自身も発生、分化の過程で前後軸に沿って領域化され上皮細胞の機能的特異化が進む。消化管の領域化には間充織からの作用が関わっていることは古くから分かっているが、そのシグナルを介在すると考えられる基底膜組成の知見はほとんどない。そこで、データベース化した胎生12.5~16.5日の画像情報から、新たにデータベースに収載した計34種類の基底膜蛋白質の消化管上皮細胞直下の発現レベルを、免疫組織染色の染色強度から解析した。調べた消化管の領域は食道、胃(胃底および胃体)、十二指腸、小腸、結腸、直腸である(図3A)。観察結果は染色強度により大きく3段階に分類し、部位ごとの類似性を比較した。12.5日胚消化管では26種類、14.5日胚消化管では28種類、16.5日胚では29種類の蛋白質の発現が認められ、すべての部位で発現しているものと部位特異性が見られるものがあった。

染色強度に基づいたクラスター解析により部位ごとの類似性を検討したところ、12.5日胚では部位による大きな組成の違いは認められなかったが、14.5日胚以降では食道、胃底、直腸からなるグループと胃体、十二指腸、小腸からなるグループに大別されることがわかった(図3Bに16.5日胚の解析結果を示す)。皮膚の基底膜組成も同様に評価し、そのパターンを比較したところ、食道、胃底、直腸のグループは消化管の一部でありながら小腸や胃体のグループよりも皮膚と近い基底膜組成を持つことが明らかとなった。小腸や胃体は腺構造をもつ単層上皮細胞からなる領域だが、食道や胃底は皮膚同様、重層化した上皮細胞で覆われている。これら二つのグループはラミニン α 3、 β 3、 γ 2、18型コラーゲン、MAEGの発現の有無で明確に区別されることがわかった。

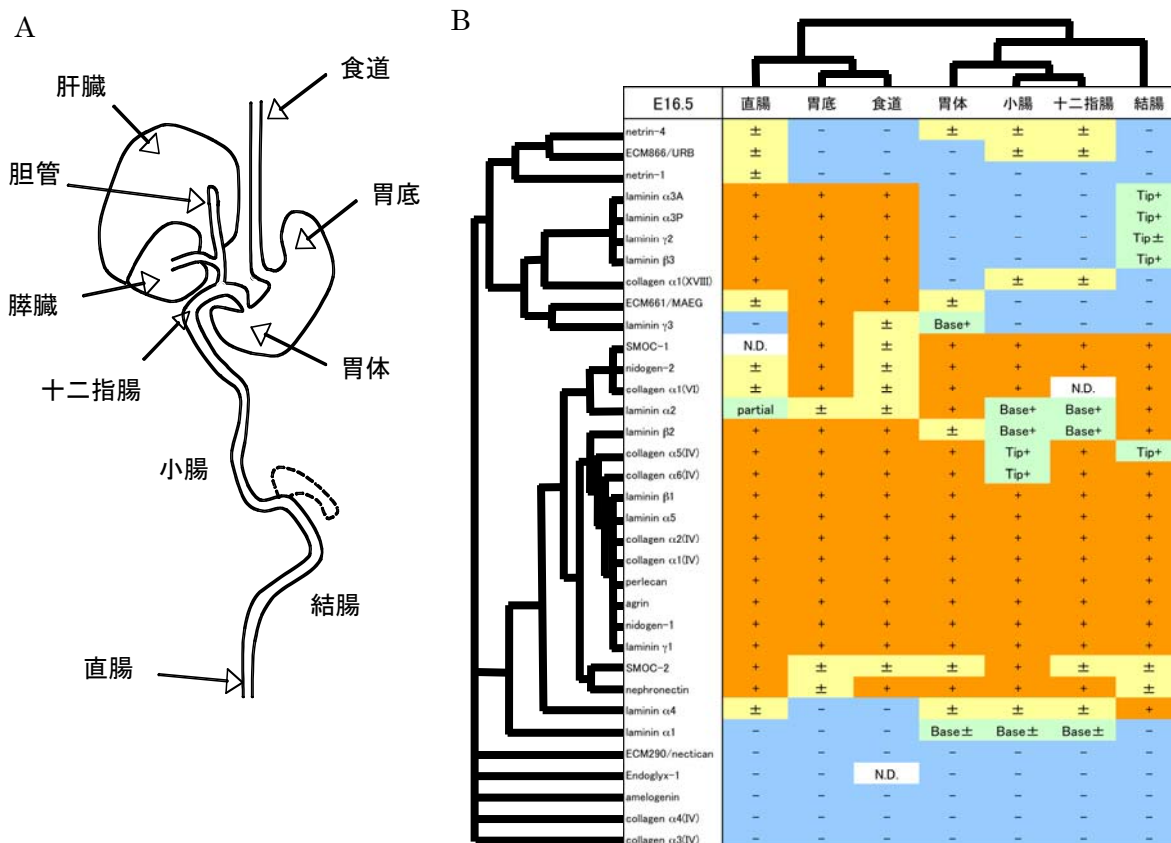


図 3: 消化管の概略図(A)とクラスター解析の結果の一例(B) 消化管の構造の模式図と部位名称を A に、部位ごとの各蛋白質の発現レベルとそれに基づくクラスター解析の結果を B に示す。B では発現パターンから得られた蛋白質組成および部位の類似性をそれぞれ左端、上端にデンドログラムで示してある。基底膜の組成が食道、胃底、直腸のグループと胃体、十二指腸、小腸のグループで大きく異なることがわかる。

基底膜組成の違いを生み出している代表例としてラミニン $\alpha 3$ をとりあげ、その発現パターンを単層上皮と重層上皮の境界部位(胃底と胃体の境界)で調べた(図4)。重層化の細胞マーカーである 2 種類のケラチンと多重染色を行ったところ、重層上皮のマーカーであるケラチン 14 陽性細胞はラミニン $\alpha 3$ を含む基底膜に接しており、一方単層上皮のマーカーであるケラチン 8 陽性細胞はラミニン $\alpha 3$ を含まない基底膜と接していた。この結果は、上皮細胞の形態と基底膜蛋白質の組成の間に明確な相関関係があることを示しており、基底膜の組成が細胞の分化方向の決定、もしくは分化形態の維持に関わる可能性を強く示唆している。

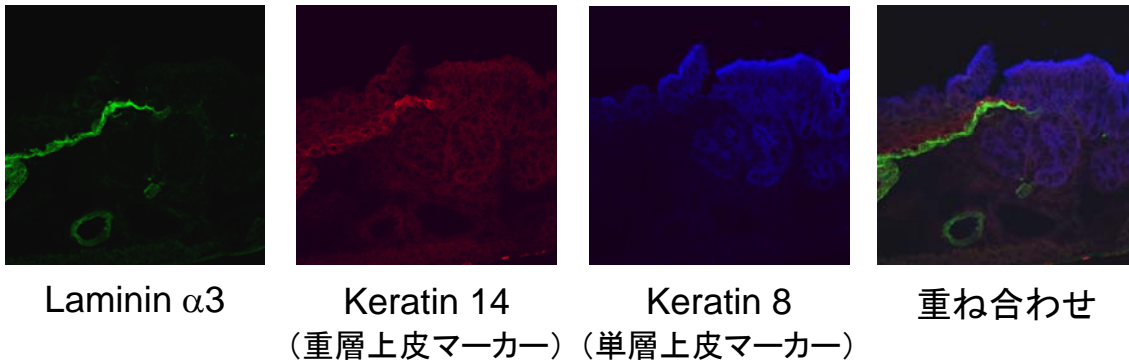


図 4: ラミニン $\alpha 3$ と単層および重層上皮細胞のマーカーとの三重染色 新生児マウスの胃底と胃体の境界部を写真下に示す蛋白質に対する抗体で染色した。右端に 3 種類の染色像をすべて重ね合わせた結果を示す。重層上皮細胞はラミニン $\alpha 3$ を含む基底膜上でのみ観察された。

(エ) 毛細血管における基底膜蛋白質の局在解析: 血管系の内壁は、心臓とつながる大血管から末梢の毛細血管まで連続した内皮細胞のシートで覆われており、内皮細胞はさらに基底膜によって裏打ちされている。毛細血管内皮細胞は均一でなく、組織ごとに特殊化した機能を持つことが知られている。すなわち、中枢神経系では血液脳関門として知られる強固なバリア機能を持ち、逆に腎系球体の血管は物質の輸送や濾過機能のために有窓の血管壁になっている。毛細血管の機能の違いが基底膜の組成の違いに反映されているかどうかを確認するため、マウス発生過程における脳内と皮下の毛細血管の基底膜蛋白質のプロファイリングをおこなった。その結果、12.5 日胚から 16.5 日胚まで両組織の毛細血管に共通して発現している蛋白質としてラミニン $\alpha 4$ など 15 種類が同定された。一方、WARP は脳内の毛細血管では 12.5 日胚から発現が確認できたのに対して、皮下では 16.5 日胚以降でしか検出できなかった(図5)。すなわち、中枢神経系の毛細血管基底膜では早い時期から WARP が局在し、他の末梢臓器の毛細血管の基底膜とは区別化されていることがわかった。この組成の違いが血液脳関門の形成と関係があるのか、ノックアウトマウスの解析等で明らかにできる可能性がある。

また、成体脳では毛細血管の先端は一部フラクトンと呼ばれる超微細な線維状構造をとり、脳室下帯の上皮細胞層近くに存在する神経幹細胞の足場を構築している、という報告がある。このフラクトン構造は、神経幹細胞のニッチとして機能しているという可能性がある。フラクトンの構成成分として、IV 型コラーゲン $\alpha 1, \alpha 2$ 鎖、パールカン、ニドゲン 1、ラミニン $\beta 1, \gamma 1$ 鎖がこれまでに報告されている。成体マウス脳の染色結果を詳細に調べた結果、ラミニン $\alpha 3B, \alpha 5, \beta 2$ 鎖、アグリリン、SMOC-1、XVIII 型コラーゲン、ネフロネクチンがフラクトンに局在することが明らかになった。一方、フラク톤は毛細血管の先端から伸びている構造にもかかわらず、ラミニン $\alpha 4$ などいくつかの血管基底膜に特徴的な蛋白質は検出されなかった(図6)。

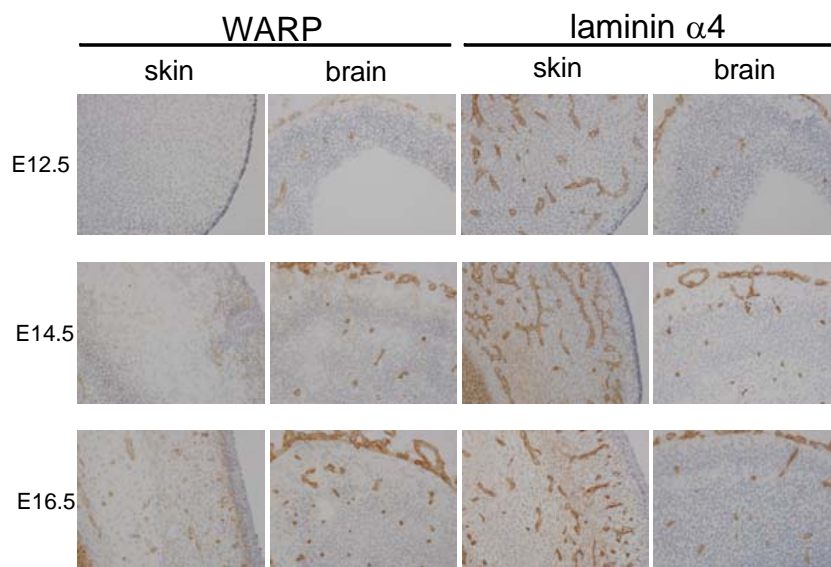


図 5 : 胎生期脳と皮膚の毛細血管における WARP とラミニン $\alpha 4$ の発現 胚性 12.5 ~ 16.5 日胚の脳と皮膚における WARP とラミニン $\alpha 4$ の染色像を示す。

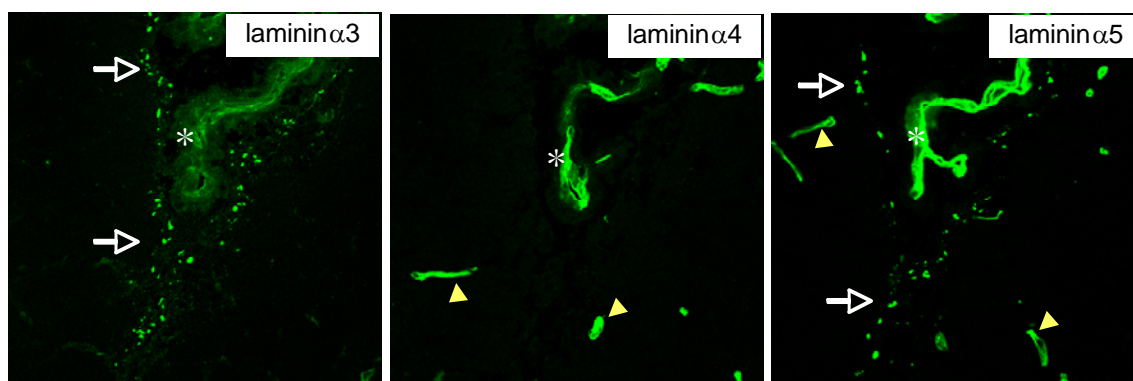


図 6 : 成体脳の側脳室周囲に見られるフラクトン構造の組織染色画像 成体脳の矢状凍結切片(側脳室周辺)を各ラミニンアイソフォーム抗体で染色した。脳室内に脈絡叢(*)が認められる。脳室周辺にはラミニン $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖を含む毛細血管基底膜が認められ(黄色矢頭)、上皮細胞周囲にラミニン $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 鎖を含むフラクトン構造が見られる(白矢印の微細構造)。

② 胎生 5.5~7.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 5.5 日のマウス胎仔は円筒胚とよばれる細長い袋状の形態を示し、先端側からは胎仔本体が形成され(胚領域)、基部側から羊膜など胎仔周辺の組織が発生する(胚外領域)。胚領域の内側はエピブラスト層、外側は臓側内胚葉層で構成されており、これらの細胞層の間には基底膜が存在する。この基底膜は、中胚葉形成が始まる胎生 6.5 日胚では陥入部(原始線条)で部分的に消失する。胎生 7.5 日では胚全体にわたって中胚葉層が形成されるとともに、外胚葉層では予定神経領域が分化するなど、領域特異化がおこる。しかし、どの発生段階で基底膜組成の特異化が起こるかは未だ明らかとなっていない。これら不明の点に関する情報を収集し、ES 細胞の選択的

分化誘導に必要な基底膜環境の実体を解明するため、エピブラスト層の成立、中胚葉形成、三胚葉の成立と領域特異化、および胚と胚外組織との対比に着目して、代表的な基底膜蛋白質 20 種の胎生 5.5～7.5 日胚における分布を解析した。

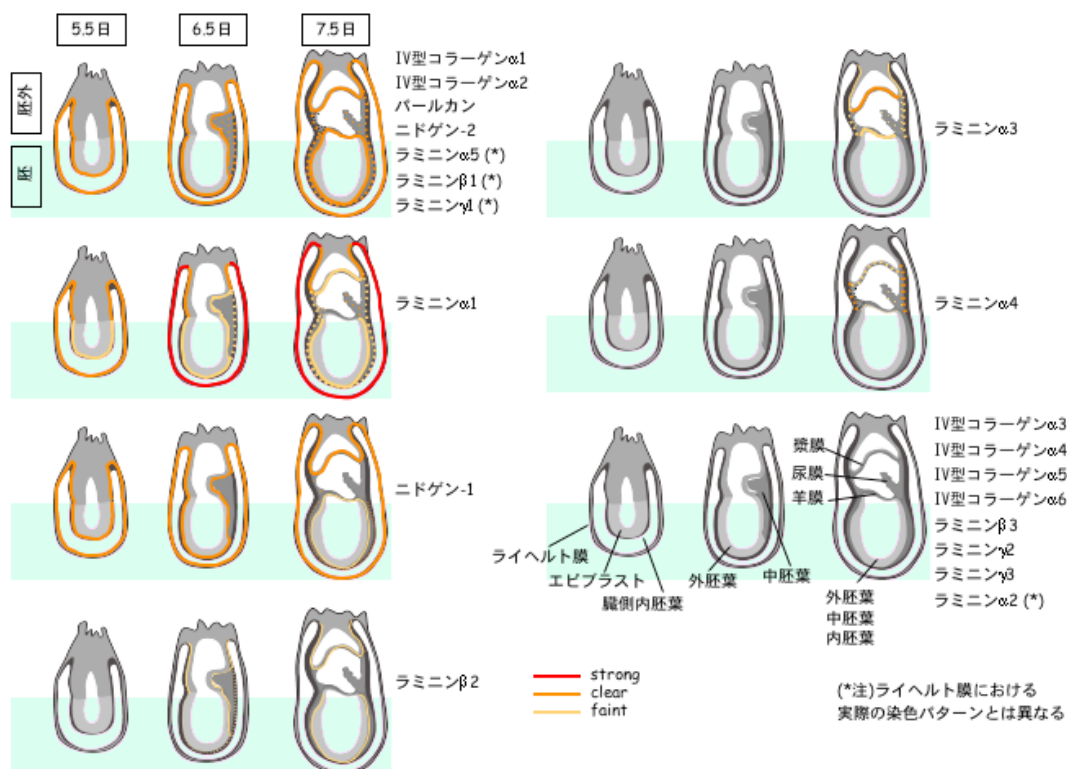


図7: マウス初期胚における基底膜蛋白質の分布 胎生 5.5～7.5 日の胚の矢状断面の模式図と、各種基底膜蛋白質の分布様式を模式的に示した。赤、橙、黄色の線は免疫染色の強度を示す。図の左上にあげた 7 種類の蛋白質は、基底膜様の構造が存在する領域ではほぼ一様に局在が見られた(ライヘルト膜は除く)。一方、右下にあげた 8 種類の蛋白質は初期胚での特異的な染色は認められなかった。

(ア)胎生 5.5 日胚の解析結果: 胎生 5.5 日では円筒胚を構成する二層の細胞層の間に連続的な基底膜が存在する。円筒胚の先端側(エピブラストが存在する胚領域)と基部側(胚外領域)の基底膜の組成に着目して解析を行った。20 種の基底膜蛋白質のうち、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-1、ニドゲン-2、パールカンは円筒胚の基底膜の全体にわたって明瞭な局在が認められた(図7)。一方、ラミニン $\alpha 1$ は胚外領域では明瞭な基底膜様の染色がみとめられたものの、胚領域ではその免疫染色シグナルは非常に弱く、エピブラストの基底膜には比較的わずかしか存在しないことが示唆された。他のラミニンサブユニットおよび IV 型コラーゲンサブユニットの抗体では円筒胚の基底膜の染色は認められなかった。

(イ)胎生 6.5 日胚の解析結果：胎生 6.5 日では胚の外胚葉の尾側から中胚葉細胞が分化し、陥入を開始する。胎生 5.5 日と同様に、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-1、ニドゲン-2、パールカンは原腸陥入部を除く外胚葉の全体にわたって明瞭な基底膜様の染色が認められた(図7)。また、ニドゲン-1 およびパールカンの一部の切片では、頭側の基底膜で特に強い染色が認められた。尾側の原腸陥入部では基底膜様の染色が途切れており、基底膜構造そのものが消失していた。胚外領域においても上記 8 種類の基底膜蛋白質はほぼ一様に局在が認められた。ラミニン $\beta 2$ については、外胚葉層全体にわたってごく弱い基底膜様の染色が認められ、内胚葉層では特異的な染色は認められなかった。ラミニン $\alpha 1$ の染色シグナルは胚外領域の外胚葉基底膜では明瞭に認められたのに対し、胚領域では弱く、存在量が相対的に少ないことが示された。他のラミニンサブユニットおよび IV 型コラーゲンサブユニットの抗体では、胚・胚外領域ともに基底膜の染色は認められなかった。

(ウ)胎生 7.5 日胚の解析結果：胎生 7.5 日の胚領域において、外・中・内胚葉それぞれの基底膜蛋白局在の比較、細胞の領域特異化に伴う基底膜組成の変化について着目し、解析した。ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは胚領域の外胚葉では明瞭な基底膜様の染色が、内胚葉では断片的な染色が認められた(図7および図8)。ラミニン $\alpha 1$ も、比較的染色シグナルが弱いものの、同様の染色パターンを示した。また、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは中胚葉層でも細胞間に断片的な染色が認められた。ラミニン $\beta 2$ は外胚葉でのみ、ごく弱い基底膜様の染色が認められた。一方、外胚葉基底膜におけるニドゲン-1 の染色は、胎生 6.5 日までの染色強度に比して非常に弱くなっていることが見いだされた。ニドゲン-2 が胎生 5.5~7.5 日のどの時期の胚でも連続的で明瞭な基底膜様の染色パターンを示すのに対し、ニドゲン-1 は胎生 6.5 日から 7.5 日への発達過程で外胚葉基底膜における存在量が減少するのではないかと考えられる。他のラミニンおよび IV 型コラーゲンのサブユニット鎖の抗体では、胚領域における特異的な染色は認められなかった。

胎生 7.5 日の胚外領域では、胚周辺の膜組織となる羊膜、尿膜、漿膜、およびそれらの膜に仕切られた胚体外体腔、外胎盤腔が形成される。羊膜は外胚葉性細胞層と中胚葉性細胞層で形成されており、それらの細胞層の間に存在する基底膜構造にはラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンを局在することが示された。この羊膜の基底膜様構造は胚領域の基底膜と連続しており、上記 7 種類の基底膜蛋白質については、その染色強度は胚領域と羊膜の間で顕著な差異はなかった。胚基底膜で弱い染色がみられたラミニン $\alpha 1$ は羊膜においては染色が認められなかった。それに対し、羊膜におけるニドゲン-1 の染色は胚の基底膜よりも強く、明瞭な染色パターンが認められた。また、胚の基底膜で染色が認められなかったラミニン $\alpha 3$ も羊膜には存在することが示された。さらに、ラミニン $\alpha 4$ は胚の基底膜では染色が認められないものの、尿膜や胚体外体腔の中胚葉由来組織では明瞭な染色シグナルが認められた。

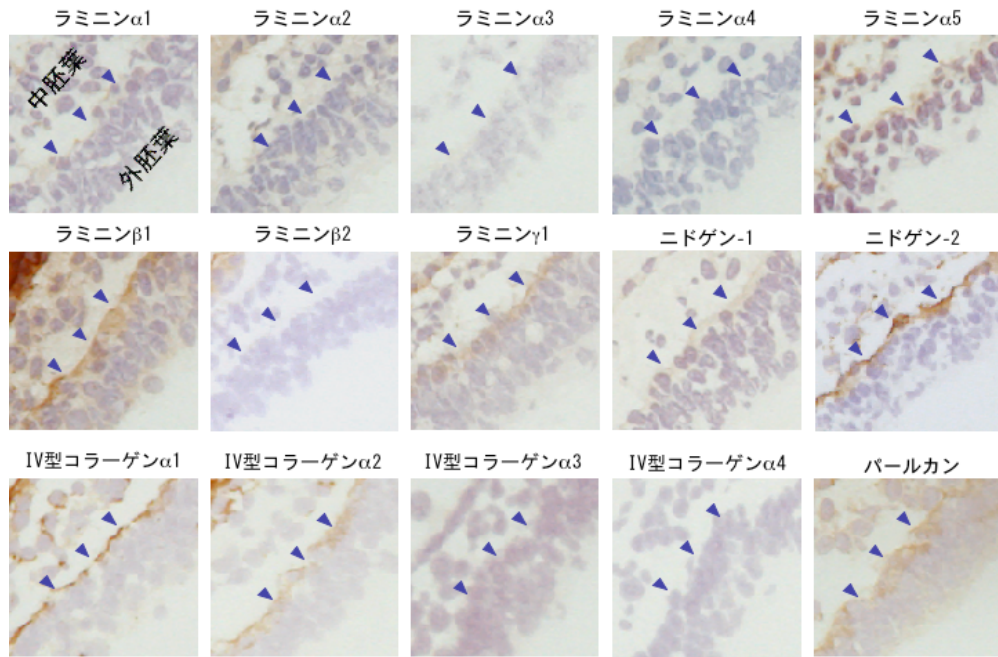


図 8: 胎生 7.5 日胚の外胚葉基底膜における基底膜蛋白質の分布 免疫組織染色の結果の一例として、代表的な 15 種類の基底膜蛋白質について、胎生 7.5 日胚の外胚葉基底膜(矢尻)における染色像を示した。

以上の結果をまとめると、ラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 、IV 型コラーゲン・ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、ニドゲン-2、パールカンは、胎生 5.5 日から 7.5 日のすべての段階において基底膜様構造が存在する部位にはほぼ一様に分布し、これらが初期胚基底膜の基本的な構成因子であることが示唆された(表1)。ラミニン $\alpha 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、および IV 型コラーゲン $\alpha 3 \sim \alpha 6$ は解析した胚のいずれの組織でも特異的な染色が認められなかった。一方、胚外領域においては胎生 5.5 日、6.5 日でラミニン $\alpha 1$ が胚領域よりも強い染色シグナルが認められた。胎生 7.5 日の羊膜ではラミニン $\alpha 3$ 、尿膜ではラミニン $\alpha 4$ の特異染色が認められたが、両者とも胚の基底膜では染色が認められなかった。

		IV型コラーゲン ^{α1}	IV型コラーゲン ^{α2}	ハールカン	ニドゼン-2	ラミニン ^{α5}	ラミニン ^{β1}	ラミニン ^{γ1}	ラミニン ^{α1}	ニドゼン-1	ラミニン ^{β2}	ラミニン ^{α2}	ラミニン ^{α3β3}	ラミニン ^{α4}	ラミニン ^{β3}	ラミニン ^{γ2}	ラミニン ^{β3}	IV型コラーゲン ^{α3}	IV型コラーゲン ^{α4}	IV型コラーゲン ^{α5}	IV型コラーゲン ^{α6}			
7.5日胚	胚領域	外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
		中胚葉	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	+/+	+/+	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
	胚外領域	羊膜	++	++	++	++	++	++	++	-	+	-	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		尿膜	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		外体腔壁	++	++	++	++	++	++	++	+/+	-	+/+	-	(+)	++	-	-	-	-	-	-	+/+	-	
		精膜	++	++	++	++	++	++	++	(+)	++	+	-	+/+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	
		外胎盤腔壁	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+/+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ライヘルト膜	++	++	++	++	+/+	+++	++	+++	++	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	-	+/+	
	6.5日胚	胚領域	外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	+/+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			原始総糸	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+/+	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
中胚葉			(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
胚外領域		外胚葉 (基底膜)	++	++	++	++	++	++	++	+/+	++	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		内胚葉 (基底膜)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		中胚葉	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ライヘルト膜	++	++	++	++	+/+	+++	++	+++	++	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	-	+/+	
5.5日胚		胚領域 (エピブラスト) 基底膜	++	++	++	++	++	++	+	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		胚外領域基底膜	++	++	++	++	++	++	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ライヘルト膜	++	++	++	+	+/+	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

++ positive, strong
++ positive, clear, continuous
+ positive, faint, (partly or fragmented)
+/- ambiguous
- undetectable

表1: マウス初期胚における基底膜蛋白質の分布(まとめ) マウス初期胚の各組織における基底膜蛋白質の免疫染色の結果を染色強度に基づいてまとめた。記号[+++]および[++]は連続的で明瞭な基底膜様染色が観察されたもの、[+]は非常に薄いの特異的な染色と認められるもの、[(+)]は染色が断片的であるもの、[+/-]はバックグラウンドが高い等の理由で特異的な染色があるかどうか判断できないもの、[-]は特異染色が観察されなかったものを示す。連続的な基底膜で部位によって染色強度に差がみとめられるものは[+~++]のように表記した。

③ 胎生 8.5~10.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 8.5~10.5 日は主要な臓器・器官形成の初期段階にあたり、活発な細胞増殖・分化を伴ったダイナミックな形態変化がおこる。胎生 8.5 日胚では神経管、心臓、消化管(前腸)の形成が始まり、さらに前腸からは肝臓前駆細胞の分化が起こる。胎生 10.5 日になると、中枢神経系では神経管

の分化と脳胞の発達、心臓においては左右心房・心室の形成が見られる。消化管は食道、胃、腸管の領域ごとに分化が進み、食道付近からは気管が分岐して肺原基が形成される。前腸から分化した肝臓前駆細胞は、消化管から間充織へと移動しながら増殖し、間充織細胞と混じり合った状態の肝臓原基となる。それ以外にも胎生 10.5 日胚では体幹部の筋節、前後肢芽、間充織や中枢神経系中での末梢血管の形成が見られる。この時期の基底膜蛋白質の変化を解析することで、器官形成期における細胞周囲の環境の変化を明らかにし、さらに胎生 5.5~7.5 日、12.5~16.5 日の解析結果と合わせてマウス発生期を通じた基底膜組成の総体的な理解に資するため、胎生 8.5、10.5 日胚の基底膜蛋白質分布について免疫組織化学的な解析を行った。その結果、これらの器官形成に伴って基底膜の組成もダイナミックに変化し、多様化(器官ごとに多様化するだけでなく、特定の基底膜に含まれる蛋白の種類も増加)することが示された。以下に代表的な器官(中枢神経、心臓・血管、消化管)ごとの解析結果を示す。

(ア) 中枢神経系(神経管)の発生における基底膜組成の変化: 胎生 7.5 日胚で外胚葉細胞層から分化した神経外胚葉は、正中軸の左右で隆起して背側で融合し、表皮外胚葉から分離して神経管を形成する。このとき、外胚葉細胞層の基底膜も神経領域と表皮領域に分離する。神経管の形成は胎生 8.5 日胚の体幹部から始まって胎生 10.5 日までに完了し、さらに内部での神経細胞分化が進行する。この間の基底膜組成の変化を解析したところ、まず神経管と表皮外胚葉で基底膜組成の明らかな変化が見られ、さらに神経管の分化に伴って基底膜構成成分の多様化と背側・腹側基底膜の組成の変化が明らかとなった。図9にその概要を示す。

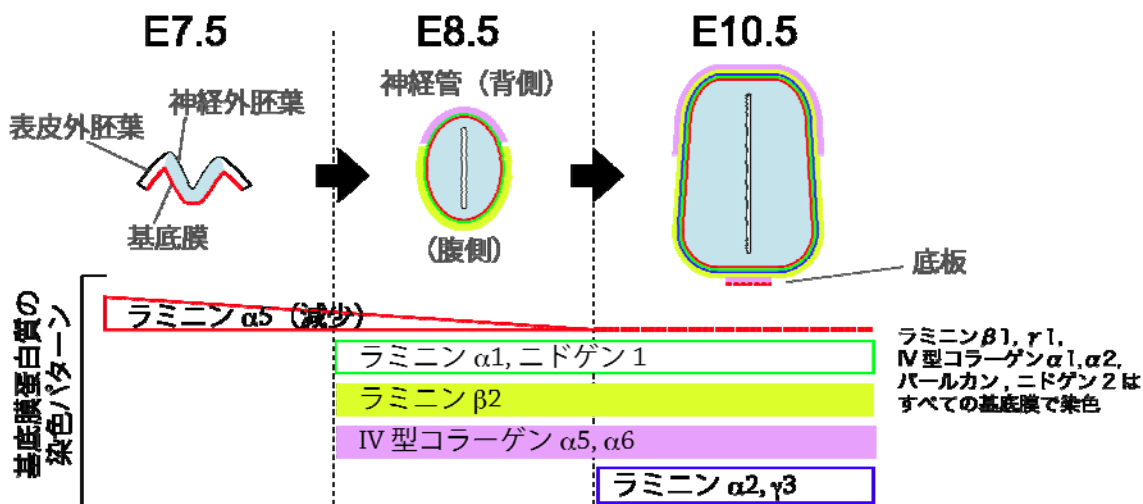


図9: 神経管発生過程における基底膜組成の変化 胎生 7.5 日の外胚葉基底膜の組成はほぼ一様であるが、胎生 8.5~10.5 日では段階的に新たな基底膜蛋白質の染色が認められるようになった。さらに胎生 10.5 日においては IV 型コラーゲン $\alpha 5, \alpha 6$ は神経管背側に、ラミニン $\alpha 5$ は底板に限局した発現パターンも見られた。

特徴的な変化として、(i) 胎生 7.5 日胚の外胚葉の基底膜ではラミニン $\alpha 5$ が多く存在するが、神経管形成後の基底膜ではラミニン $\alpha 5$ が次第に減少し、入れ替わるようにラミニン $\alpha 1$ のシグナル

が上昇した。ラミニン $\alpha 5$ の局在は、胎生 10.5 日では神経管底板のみに限局された。(ii) ラミニン $\beta 2$ は胎生 8.5 日の神経管では腹側の基底膜で新たに染色が見られ、胎生 10.5 日になると神経管基底膜全体に一様に局在が認められた。(iii) 胎生 10.5 日では新たにラミニン $\alpha 2$ 、 $\gamma 3$ の発現も見られた。(iv) IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ は胎生 8.5~10.5 日にかけて、神経管背側に限局した発現が見られた。

(イ) 初期心臓形成および血管系の形成・発達における基底膜組成の比較：心臓は胎生 7.5 日以降に頭側の中胚葉層から形成される。胎生 8.5 日では屈曲した管状の構造(心筒)をとり、部位ごとに将来の心房・心室領域へと分化する。胎生 10.5 日では左右の心房・心室が形態的に明らかに区別できるが、内部の中隔はまだ形成されない。基底膜は胎生 8.5 日の心筒では壁の内膜側に、胎生 10.5 日では壁の心筋細胞層を挟んだ内膜側と外膜側にそれぞれ形成される(図10)。

解析の結果、胎生 8.5 日の心筒内膜の基底膜では、基本的な構成蛋白質に加えてラミニン $\alpha 4$ の強い染色が見られ、他にラミニン $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ の染色も確認された。わずかながら IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ の染色も検出された。これらの基底膜蛋白質の局在は心筒全体でほぼ一様で、心房・心室領域に対応するような明瞭な差は見られなかった。

胎生 10.5 日心臓の基底膜については、心房と心室領域で組成の違いが見られた。また、心筋細胞層を挟んだ内膜側と外膜側の基底膜での組成の違いも明らかとなった。心房と心室の比較では、ラミニン $\alpha 5$ の染色が心房の基底膜では明瞭だが、心室ではほとんど染色が認められなかった。一方でラミニン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ は心房で比較的明瞭な染色が見られ、心室では染色がほとんど見られなかった。内膜・外膜の違いに関しては、内膜側の基底膜は胎生 8.5 日と同様にラミニン $\alpha 4$ の強い染色が見られたのに対し、外膜側基底膜では、ラミニン $\alpha 4$ の染色がほとんど認められなかった。結果の概要を表 2 に示す。

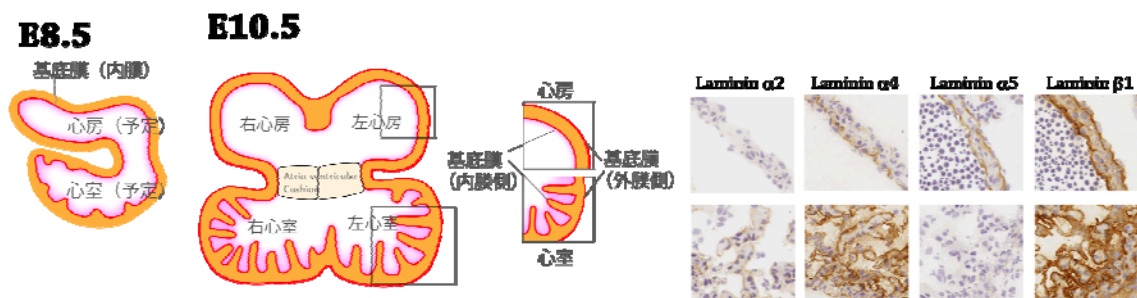


図 10: 胎生 8.5~10.5 日の心臓の断面模式図と基底膜蛋白質の局在 胎生 8.5 日の心臓(E8.5)は屈曲した筒状で、心筋細胞層(橙色)の内側に基底膜が形成される(赤いライン)。胎生 10.5 日(E10.5)では左右の心房・心室の形態が明瞭になり、基底膜は内膜側に加えて外膜側に新たに形成される(赤いライン)。図の右に胎生 10.5 日の心房(上段)、心室(下段)における代表的な基底膜蛋白質の染色パターンを示した。ラミニン $\alpha 2$ は心室領域のみ、ラミニン $\alpha 5$ は心房領域のみに局在することが示された。ラミニン $\alpha 4$ は内膜側基底膜だけに存在し、外膜側は染まらなかった。ラミニン $\beta 1$ などの構成的な基底膜蛋白質はすべての基底膜で染色が認められた。

心臓内膜側(内皮)の基底膜は血管内皮に共通した特徴をもつと考えられたため、胎生 8.5 日、10.5 日胚の血管基底膜との比較を行った(表2)。胎生 10.5 日胚の背側大動脈ではラミニン $\alpha 4$ の強い染色が見られ、それ以外の蛋白質についても心臓内皮の基底膜に比較的近い構成であることが明らかとなった。一方、肢芽間充織などに形成された末梢の血管の基底膜では、ラミニン $\alpha 4$ 以外のラミニンサブユニット($\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ など)の染色がほとんど認められず、心内膜や大動脈の基底膜に対して比較的単純な組成になっていることが示唆された。

		ラミニン $\alpha 1$	ラミニン $\alpha 2$	ラミニン $\alpha 3$	ラミニン $\alpha 4$	ラミニン $\alpha 5$	ラミニン $\alpha 6$	ラミニン $\beta 1$	ラミニン $\beta 2$	ペリレキシン	ヘパリン硫酸	ヒアルロン酸	プロテオグリカン	フィブロネクチン	ヘパリン	ヒアルロン酸	ペリレキシン	ヘパリン	ヒアルロン酸	ペリレキシン	ヘパリン	ヒアルロン酸	ペリレキシン	ヘパリン	ヒアルロン酸
E8.5	心臓(内皮)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10.5	心臓(内皮)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	(+)	(+)	(+)	+/-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	心臓(外膜)	++	++	++	++	++	++	++	(+)	++	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	心室(内皮)	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+/-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	心室(外膜)	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+/-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	背側大動脈	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+/-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
末梢血管	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

++ 染色あり(強)

+ 染色あり(弱)

+/- 不明瞭

- 染色なし

表2: 胎生 8.5~10.5 日の心臓・血管系の基底膜組成の比較

(ウ)消化管および肝臓・胚の形成における基底膜組成: 消化管は胎生 7.5 日以降に内胚葉層から形成される。胎生 8.5~10.5 日の消化管基底膜は他の組織に比べてラミニン $\alpha 5$ の染色が強く、ラミニン-511 が主要なラミニンアイソフォームであることが示された。さらに胎生 10.5 日の消化管基底膜では局所的にラミニン $\alpha 2$ 、IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ の染色が認められ、消化管の領域によって基底膜組成の変化が現れていることが見出された(図11)。

肝臓は消化管から派生する器官で、胎生 8.5 日では前腸から肝臓原基となる上皮組織の出芽がみられる(肝芽; 図11B, E8.5)。この時期、肝芽の細胞ではすでに肝臓分化マーカーの発現が見られるが、肝芽領域の基底膜組成は消化管の他の領域との違いは見られなかった。胎生 10.5 日の肝臓原基では、ラミニン $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ を含む基底膜蛋白質の断片的な染色が見られ(図11B)、そのパターンは血管内皮マーカーである PECAM1 と類似していた。ただし他の組織の血管基底膜にみられるラミニン $\alpha 4$ は、検出されなかった。このことから、発生初期の肝臓内部では肝芽細胞周囲および未熟な類洞において特殊な基底膜環境が存在することが示唆された。

肺は胸部の消化管腹側から上皮が突出して形成される。E10.5 の肺原基基底膜にはラミニン-332 が局在し、さらにラミニン $\gamma 3$ や IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ など、他の組織の基底膜とは顕著に異なった多様性の高い蛋白質構成であることが明らかとなった。

A		ラミニンβ1	コラーゲン(NV)α1	コラーゲン(NV)α2	ニトロシエン-1	ニトロシエン-2	パールカン	ラミニンα5	ラミニンγ1	ラミニンα1	ラミニンα3	ラミニンβ2	コラーゲン(NV)α5	コラーゲン(NV)α6	ラミニンβ3	ラミニンγ2	ラミニンγ3	ラミニンα2	ラミニンα4	コラーゲン(NV)α3	コラーゲン(NV)α4	
		E8.5	消化管内胚葉	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10.5	消化管内胚葉	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
E10.5	肝臓	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10.5	肺	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-

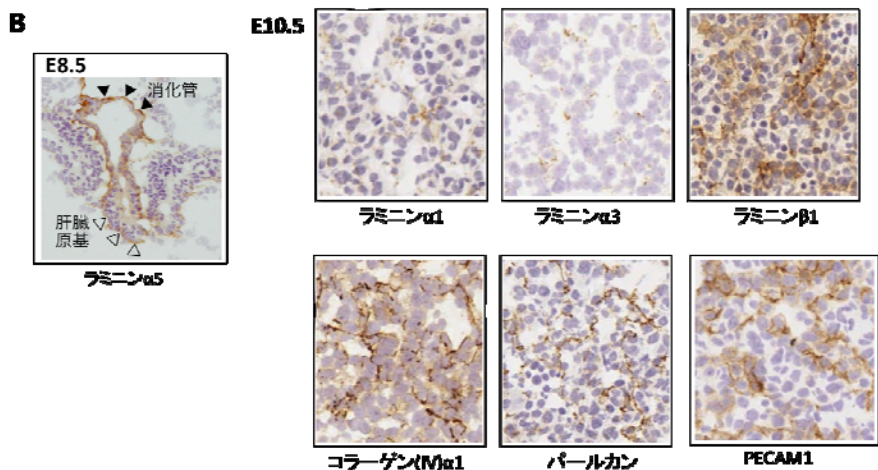


図 11: 胎生 8.5～10.5 日の消化管および形成初期の肝臓・肺の基底膜蛋白質組成 (A) 胎生 8.5、10.5 日の基底膜組成の概要。消化管内胚葉ではラミニンα5 の発現が高く、肝臓や胚ではさらに特徴的な組成が見られた。(B)形成初期の肝臓における代表的な基底膜蛋白質の分布。胎生 8.5 日(E8.5)では消化管から肝臓原基が出芽する際に基底膜がその周囲に存在する様子が見られた。胎生 10.5 日では肝臓の内部に基底膜蛋白質の染色が認められ、その分布パターンは血管マーカーである PECAM1 の分布と類似していた。

④ 新規基底膜蛋白質の探索とその生体内局在解析

Ensembl データベース (<http://www.ensembl.org/info/about/index.html>) に収録されている約 65,000 のマウスおよびヒトのゲノム情報を母集団として、分子量 20 万以上の蛋白質をコードする遺伝子を抽出し、その中から分泌性の細胞外蛋白質をコードすると判断されるものを N 末端シグナルペプチドの有無およびそれ以外の膜結合ドメインの有無を基準としてさらに抽出した。コードする蛋白質の分子量が 20 万以上という条件を設定したのは、細胞外マトリックス蛋白質の中には分子量 10 万以上のものが多く、未同定の新規細胞外マトリックス蛋白質の多くはより分子量の大きい巨大蛋白質である可能性が高いと考えられるからである。また、細胞外マトリックス蛋白質の多くは分泌蛋白質であり、N 末端に分泌シグナルを持つ一方で、それ以外の膜貫通ドメインは持たないと予想される。N 末端分泌シグナルの有無は PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) により、その他の膜結合ドメインの有無は SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) によりそれ

ぞれ検索した。

これらの検索の結果、分子量 20 万以上かつ分泌性蛋白質の候補から既知の細胞外マトリックス蛋白質および機能が同定済みの蛋白質を除くと、7 個の新規細胞外マトリックス蛋白質の候補遺伝子が同定された。この結果を踏まえ、さらに分子量の閾値を 15 万として再度 *in silico* の検索を行った結果、あらたに 5 個の新規細胞外マトリックス蛋白質候補遺伝子が得られた。これらの候補遺伝子の中から、特に Arg-Gly-Asp (RGD) 配列をもつ候補蛋白質 (ECM-N001, ECM-N002) および特徴的な Sushi ドメインの繰り返し構造を持つ ECM-N003、フィブロネクチン III 型モジュールを複数もつ ECM-N008 を最優先候補蛋白質としてさらに免疫組織染色による *in vivo* スクリーニングを行うこととした。

ECM-N001 と ECM-N002 については、それぞれ2つの独立した抗原ペプチド(分子量 20,000～70,000)を大腸菌あるいはヒト由来細胞 293F を用いて発現・調製し、これらのうち1つずつを家兎に免疫して抗血清を得た。抗体は抗原ペプチドを不溶化したカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた抗体を用いてマウス組織の染色性を検討した結果、ECM-N002 抗体が新生仔の腎臓の血管様構造および成体肝臓の類洞様構造を染色することが判明した(図12)。これらの結果は、ECM-N002 が腎臓や肝類洞に局在する新規基底膜蛋白質である可能性を強く示唆している。

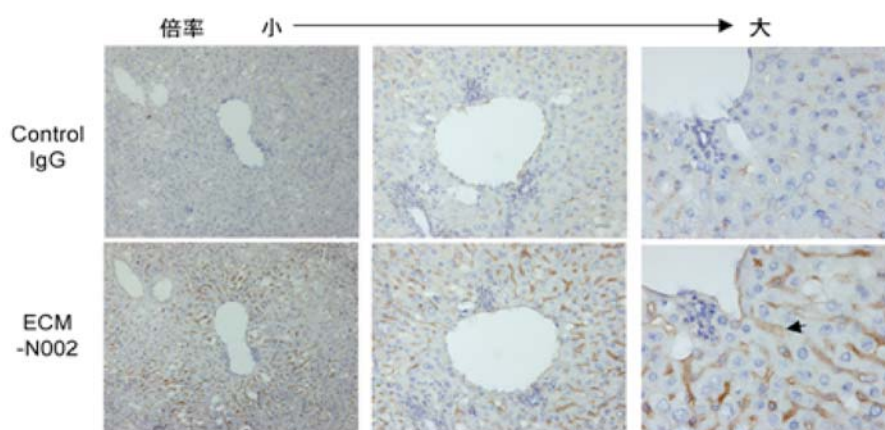


図 12: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N002 の組織局在解析 マウス成体肝臓の染色。

左から右にかけて門脈周囲の拡大染色像を示す。類洞様構造が染色された(矢印)。

平成 19 年度は ECM-N003 についても同様に抗原を調製し、家兎に免疫して抗血清を得て、抗体を精製した。得られた抗体を用いてマウス組織の染色性を検討した結果、ECM-N003 抗体が胎仔肺の間質領域、胃・小腸の粘膜固有層など、基底膜直下にある細胞外領域を染色することが判明した(図13)。また ECM-N003 蛋白質を精製して細胞接着活性を調べたところ、 $\beta 1$ インテグリンを介した細胞接着活性を示すことが明らかとなった(図14)。これらの結果は、ECM-N003 が基底膜近傍に存在する細胞接着性の細胞外マトリックス蛋白質であることを示している。

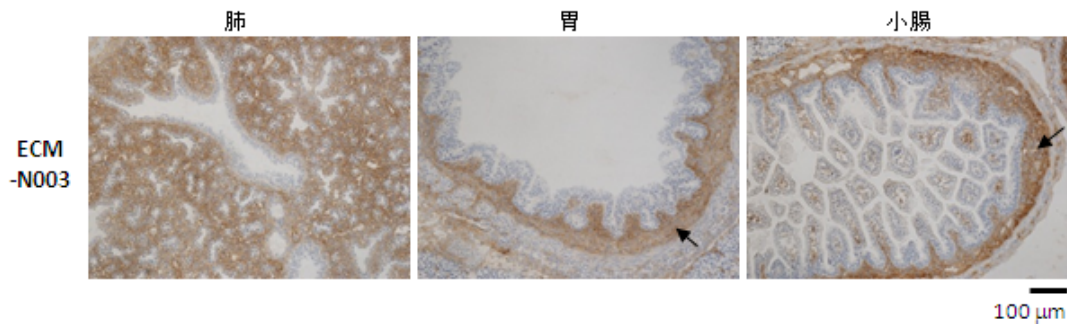


図 13: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N003 の組織局在解析 マウス胎生 16.5 胚の肺・胃・小腸の染色像。肺の間質、胃・小腸の粘膜固有層(矢印)が染色された。

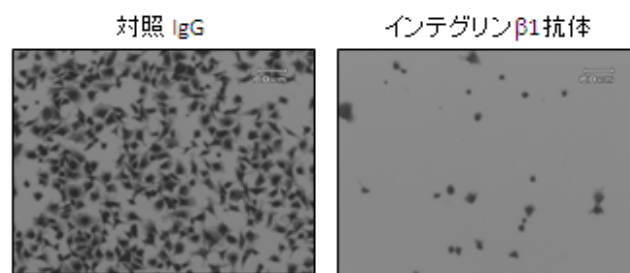


図 14: 新規基底膜候補蛋白質 ECM-N003 の細胞接着活性およびその $\beta 1$ インテグリン依存性 精製 ECM-N003 ($3 \mu\text{g/ml}$) をコートした基質上にヒト横紋筋肉腫由来細胞 RD を播種し、インテグリン $\beta 1$ 阻害抗体(AIIB2)(右)あるいは対照 IgG(左)の存在下で 37°C 、30 分間インキュベートした。図は非接着細胞を除去した後の基質に接着した細胞を示す。ECM-N003 への細胞接着はインテグリン $\beta 1$ に対する抗体で強く阻害される。

⑤ ヒト基底膜ボディマップ解析の技術基盤の整備

ヒト ES 細胞の選択的分化誘導制御に有用な人工基底膜を設計するためには、ヒト臓器の基底膜分子構成を解析することが必要であり、そのための技術基盤の整備は不可欠である。事業分担者は、9 種類のラミニンサブユニット鎖に対する単クローン抗体を既に作製済みであり、6種の IV 型コラーゲンに対する組織染色適応抗体は国内の研究者より入手可能である。その他のヒト基底膜蛋白質に関しても免疫組織染色に必要な抗体を整備するため、市販抗体の有無とその組織染色適合性、ドメイン構造に基づく抗原蛋白質の設計の容易さ、および組織発現の特異性などの情報を考慮して、ラミニン $\beta 2$ 鎖、アグリン、ネフロネクチンを新規抗体作製の最優先候補とした。ラミニン $\beta 2$ 鎖に関しては、組換えヒトラミニン-221 を抗原としてラットを免疫し、腸骨リンパ節より調製したリンパ球をマウスミエローマ細胞 Sp2 と融合後、ヒトラミニン-221 ($\alpha 2\beta 2\gamma 1$) 陽性/ヒトラミニン-211 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) 陰性のハイブリドーマを選択した。さらに、凍結ヒト小腸組織標本に対する基底膜染色性陽性クローンを選択し、最終的に2個の組織染色適応抗体を分離することに成功した。アグリンとネフロネクチンについては、免疫原として用いる組換え蛋白質をヒト 293F細胞での発現系を用いて発現・精製した。

ヒト基底膜蛋白質に対する新規抗体の作製と並行して、既に作製済みのヒトラミン抗体を用いたヒト組織の染色条件の最適化を行った。ヒト組織標本の場合は、多くがパラフィン包埋標本であるため、パラフィン包埋ヒト組織切片を標準標本として、7種類のヒトラミン抗体の染色条件を(i)各種プロテアーゼによる抗原賦活化処理、(ii)抗体濃度、(iii)二次抗体試薬の観点から最適化した。抗原賦活化処理にあたっては、主に2種類のプロテアーゼ(Protease XXIV, Protease XIV)を検討し、7種類中5種類の抗体(抗ラミン $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$ 抗体)で、Protease XIV処理(0.25 mg/ml, 室温 30分)を行うことによりパラフィン包埋組織切片において明確な染色が得られることを見いだした。

平成19年度～20年度においては、項目2.2.5.2で確立した基底膜蛋白質の発現系を用い、組換えアグリンおよびニドゲン-2蛋白質を抗原とした単クローン抗体の作成を進め、得られた抗体の組織染色条件の最適化を行った。その結果、Protease XIV処理を行ったパラフィン包埋ヒト組織切片を染色することができるアグリン抗体(#112-2)、ニドゲン-2抗体(#121-1)を得ることに成功した(図15)。

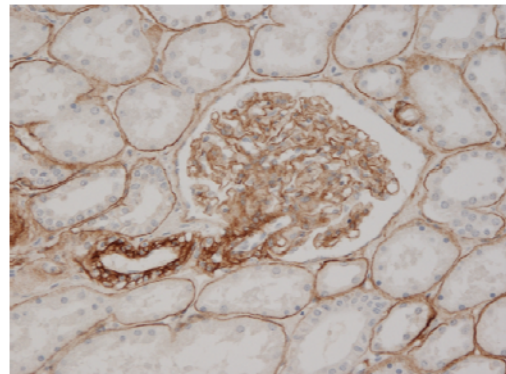


図15: アグリン抗体による組織染色。パラフィン包埋ヒト腎臓組織切片を、プロテアーゼ XIV 処理を行った後、アグリン抗体で染色した。

⑥ マウスボディマップデータベースのホームページの作成とその公開

平成18年度までに公開した胎生12.5、14.5、16.5日胚における主要20種の基底膜蛋白質の全身高解像免疫組織染色像に加えて、新たに基底膜蛋白質15種類と基底膜周辺に局在する細胞外マトリックス蛋白質6種類の画像を取得し、マウスボディマップデータベースに追加して公開した(<http://www.matrixome.com/hpbeta/>)。追加した基底膜蛋白質は、XVIII型コラーゲン、アグリン、ネトリン1、ネトリン4、ネフロネクチン、パピリン、Fras1、QBRICK/Frem1、エンドグリックス1、SMOC-1、アメロジェニンと機能未知のMAEG、WARP、URB、SMOC-2の計15種類の基底膜蛋白質である。また、追加した基底膜関連蛋白質はレプレカン、ポドカン、VI型コラーゲン、フィブリリン1、フィブリリン2、 β ig-H3の6種類である。すべて胎生12.5、14.5、16.5日胚の画像を掲載した。これにより、臓器形成時の41種類の細胞外マトリックス蛋白質の経時的な発現変動を、細胞レベルの解像度で解析することが可能となった。これらの情報は、インターネット上で公開しているデータベースから入手可能である。

⑦ 幹細胞の可視化とそのニッチの解析

マウスボディマップデータベースで用いた免疫組織染色と画像取得の手法は、成体臓器や病態モデルマウスにも応用可能であり、特定の細胞を標識する技術と組み合わせることで、当該細胞の周囲にどのような基底膜成分が存在するかを解析することができる。そこで、成体幹細胞を可視化し、その周囲の環境(幹細胞ニッチ)の解析に向けた技術の確立に取り組んだ。成体幹細胞はほとんど増殖しないため、一度染色体に取り込まれた標識は長期間維持される(図16)。この性

質を利用して、皮膚や小腸の幹細胞を検出する方法が確立されているが、他の臓器においてもこの方法が有効かどうかはまだ十分に検証されていない。

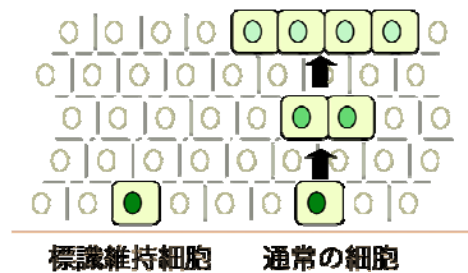
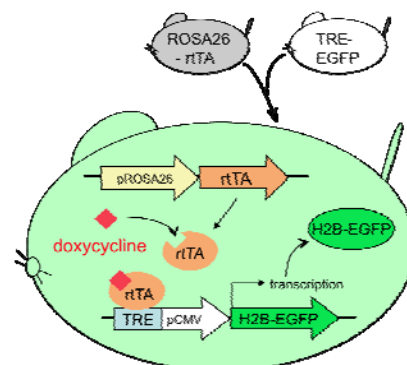


図 16: 標識維持細胞と組織幹細胞 一過的に DNA に標識を入れて一定期間おくと、増殖・分化が活発な細胞では標識が増殖に伴って希釈され消失していく。しかし、標識後に分裂を停止した細胞、あるいは増殖がきわめて遅い細胞ではその標識が維持され、“標識維持細胞”と言われる。幹細胞は通常の細胞よりも細胞分裂の頻度が低いため、標識維持細胞は幹細胞の一種と考えられている。

幹細胞を可視化するための標識方法として、5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU)を用いる場合と、誘導型 EGFP 融合ヒストン 2B (H2B-EGFP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いる場合でそれぞれ条件検討を行い、心臓や肝臓で幹細胞が検出できるかどうかを調べた。

BrdU は染色体の塩基対中にチミジンの類縁体として取り込まれ、特異抗体で検出可能である。凍結組織切片で検出するための条件検討を行い、反応特異性を示す市販抗体、組織の変性条件(2N HCl で 20 分)を決め、マウスへの BrdU の投与量(50 μ g/g body weight)と投与時期(生後 3 日目から 1 日 2 回 3 日間)の条件を決定した。BrdU 投与後 24 週経過した肝臓では、次に述べる H2B-EGFP で標識した場合と同様の標識維持細胞が検出できた。しかし、この変性処理条件では、基底膜蛋白質との二重染色は難しいことがわかった。

H2B-EGFP は発現すると染色体クロマチン構造に取り込まれ、融合させた EGFP の



rTA : reverse tetracycline-controlled transactivator 逆テトラサイクリン依存性転写調節因子
 pROSA26 : ROSA26 locus promoter(全身で遺伝子発現を誘導する)
 doxycycline : tetracycline の誘導剤(tetracycline より活性が高い)
 TRE : tetracycline-responsive element: テトラサイクリン応答領域
 pCMV : Cytomegalovirus promoter
 H2B-EGFP : histone H2B-enhanced green fluorescent protein(核局在型EGFP)

図 17: EGFP 発現誘導システムを利用した標識維持細胞の検出方法 ROSA26 プロモーター下で rTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) を発現するトランスジェニックマウスと、TRE (tetracycline responsive element) の下流で histone H2B-EGFP を発現するマウスのかけ合わせにより両方の遺伝子を持つマウスを得る。そのマウスは、ドキシサイクリンの投与に依存して全身に H2B-EGFP の発現が誘導される。数日間ドキシサイクリンを投与することにより、一時的に EGFP の発現誘導を行い、DNA に標識をする。その後、一定期間放置すると、通常細胞では標識が希釈されるが、分裂・増殖頻度が低い幹細胞では標識が維持されるので、EGFP の蛍光により検出することが可能である。

蛍光シグナルにより検出できる。そのため、染色や変性等の操作をせずに標識維持細胞を検出可能である。H2B-EGFP 遺伝子の発現はドキシサイクリンにより活性化される転写因子 (rtTA) により制御されており、一定期間だけ発現させることで染色体を標識することができる(図17)。H2B-EGFP を誘導するためのドキシサイクリン投与条件を検討し、出産時から1週間、母体に2 mg/ml の濃度で飲用水として与えることで、全身性に H2B-EGFP が発現することを確認した。標識蛍光強度を経時的に観察し、投与終了後6~12週の時点で、肝臓等で標識維持細胞が集団として特定の部位に存在していることが確認できた。肝臓では、それらは胆管上皮細胞の一部として存在していることがわかった(図18)。これらの結果は H2B-EGFP の標識方法を用いることで、これまで難しいと考えられていた肝臓や心臓などの臓器でも幹細胞を標識維持細胞として簡便に検出できる可能性を示唆している。この方法では基底膜蛋白質との二重染色を行うことで、成体幹細胞のニッチを解析することが可能である。

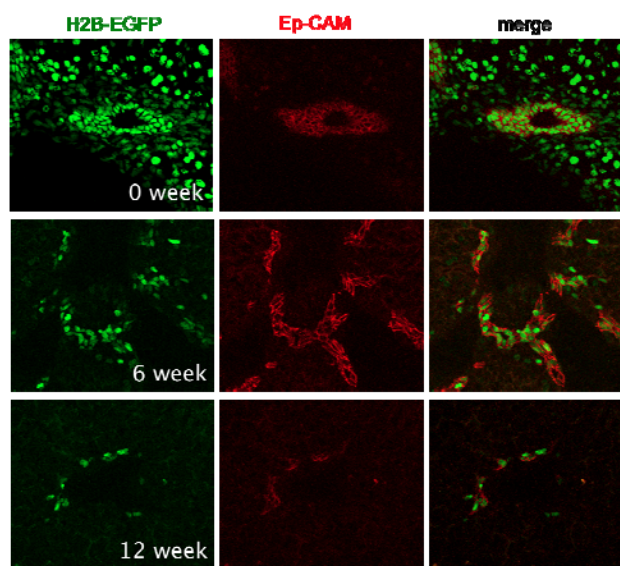


図18: EGFP ラベルマウス肝臓における標識維持細胞と幹細胞マーカー Ep-CAM の局在 薬剤による EGFP 発現誘導直後から12週後の肝臓で、EGFP 発現細胞と Ep-CAM 発現細胞は一致している。

(4) 目標の達成度と意義

① 胎生12.5日および14.5日胚における基底膜分子構成の解析

中間評価までの目標とした主要基底膜蛋白質20種の抗体による染色を完了し、得られた染色標本は高解像度のデジタル画像に変換後、インターネットで閲覧可能な画像データベース(基底膜ポディマップ)に収録した。また、肝臓類洞、心筋、脳内血管については、胎生12.5~16.5日の基底膜分子構成を成体マウスの当該器官の基底膜分子構成と比較検討し、成体器官で選択的に発現する基底膜分子を特定することに成功した。ここで得られた情報は、ES細胞から心筋細胞、肝臓実質細胞、脳血管内皮細胞を分化誘導させるためのロードマップとなるばかりでなく、成体臓器に存在する組織幹細胞の培養・維持に適した培養基質の設計においても大きな役割を果たすと期待される。これらの成果は当初の目標を十分に達成している。

平成19年度~平成21年度には、さらに21種類の蛋白質の画像データを収集し、そのうち34種類の基底膜蛋白質の消化管および毛細血管での局在解析を行った。追加した基底膜蛋白質の

ほとんどが、時期や部位特異的に発現する分子であり、器官形成過程ごとの基底膜蛋白質の組成の違いを理解する上で非常に有用である。解析の結果、消化管上皮細胞が重層化するかどうかという形態の違いが基底膜組成の違いと相関していること、脳内と末梢組織で毛細血管周囲の基底膜組成が違うことなどを明らかにした。さらに成体脳の解析を行い、神経幹細胞の足場を提供していると最近報告されたフラクトン構造の構成成分を明らかにした。これらの解析結果は、ES細胞から目的臓器の機能を持つ細胞へと分化させる際の培養基質の開発に有益な情報を与えるものである。研究期間を通して、心臓、肝臓、脳での特徴的な構造における基底膜蛋白質の組成を明らかにしており、これらの成果は本課題の目標を十分達成していると考えられる。

② 胎生 5.5 日～7.5 日胚における基底膜分子構成の解析

胎生 5.5～7.5 日胚についても、目標とした主要基底膜 20 種の抗体による染色を完了し、三胚葉分化がおこる発生初期の胚および胚外領域の基底膜分子構成の全体像を解明することに成功した。特に、胎生 5.5 日～7.5 日にかけて、ラミニン-511, IV 型コラーゲン $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 鎖、ニドゲン-2、パールカンが構成的に発現していること、一方、胚外領域では羊膜と尿膜でラミニン $\alpha 3$ と $\alpha 4$ がそれぞれ特異的に発現することを明らかにしたことは大きな成果である。これらの結果は、多数のラミニンアイソフォームの中でもラミニン-511 が胚発生における中核分子として機能していることを示しており、ES細胞の培養・維持および初期分化誘導においてラミニン-511 が培養基質として有用であることを示唆している。実際、京都大学再生医科学研究所との共同研究において、ラミニン-511 がES細胞の培養機材として利用可能であることを示す予備的結果が得られている。以上の成果は、当初の目標を十分に達成していると考えられる。

③ 胎生 8.5～10.5 日胚における基底膜分子構成の解析

マウス胚で主要な器官形成が始まる胎生 8.5～10.5 日において、上記と同様に主要基底膜蛋白質 20 種類の局在解析を完了した。これにより、器官形成期には基底膜の蛋白質組成もダイナミックに変化する様子が明らかとなった。基底膜組成の変化は細胞周囲の微小環境の変化をもたらすものであり、器官形成に伴う細胞分化や組織構築において基底膜組成のカスタマイズが大きな意味を持つことを示している。ES細胞から特定の細胞の分化を誘導するにあたって、その細胞に適した基質を用いることの重要性は近年広く認識されるようになってきている。器官形成初期の細胞は *in vitro* 分化誘導の過程にある細胞に相当し、その基質を選択する上で本研究で得られた知見は非常に有用なものといえる。

④ 新規基底膜蛋白質の探索とその生体内局在解析

当初予定していた分子量 20 万以上の蛋白質に加えて、分子量 15 万以上の蛋白質まで範囲を広げて候補蛋白質のスクリーニングを行い、12 個の機能未知分泌蛋白質の候補遺伝子を抽出することに成功した。その中には、インテグリン認識モチーフである Arg-Gly-Asp 配列を含むものが 2 個含まれており、その両方について組換え蛋白質を抗原として家兎抗血清を調製した。その一つである ECM-N002 抗体は、肝臓の類洞および腎臓の毛細血管様構造を選択的に染色することから、ECM-N002 は類洞を含む一部の毛細血管に特異的に発現する基底膜分子である可能性が

示唆された。類洞特異的に発現する細胞外マトリックス蛋白質はこれまで報告されておらず、ECM-N002 は肝実質細胞の培養や人工肝臓の構築に有用な培養基質の開発に大きな手がかりを与えるものと期待される。また、胃・小腸の基底膜直下に局在するインテグリンリガンド ECM-N003 を新たに同定した。しかし、新規の基底膜蛋白質の同定には至らず、本課題は平成 19 年度末で中止とした。

⑤ ヒト基底膜ボディマップ解析の技術基盤の整備

これまでに作製済みのラミニン抗体を中心にパラフィン包埋ヒト組織標本の染色条件の最適化を行い、protease XIV による前処理が抗原賦活化に有効であることを明らかにした。また、組織適応抗体のスクリーニングにこの前処理を採用し、ヒトラミニン $\beta 2$ 鎖に対する組織染色適応性単クローン抗体を 2 クローン分離することに成功した。ヒトアグリニンおよびヒトニドゲン-2 に対する免疫組織化学適合抗体の作製にも成功した。これらの成果は当初の目標を十分に達成している。ヒトを対象として基底膜蛋白質の局在解析は、ヒト組織標本の入手が限られているため、パラフィン包埋組織標本の利用が不可避であり、抗原賦活化条件の最適化は技術的に重要な課題である。この点で着実な進捗があったことの意義は大きい。

⑥ マウスボディマップデータベースのホームページの作成とその公開

中間報告時点で 20 種類、さらにそれ以降 21 種類の基底膜あるいはその近傍に局在する蛋白質の胎生 12.5 日、14.5 日および 16.5 日胚の局在を示す画像データをマウス基底膜ボディマップに収録した。基底膜蛋白質の種類はこれまでに約 50 種類が同定されているが、今回の成果はその 8 割近くの発現情報を提供するものである。当初の「網羅的解析に使えるデータベースを公開する」という目的を十分に達成している。これだけの数の染色結果を同じフォーマットで比較できる例は他になく、基底膜分子の発現パターンを評価する際のスタンダードとなり得る重要な成果である。また、基礎研究から医療応用まで世界中のさまざまな研究者がこのデータベースを利用することで、情報交流の場となることが期待される。それにより、異分野との多角的な共同研究が生まれる土壌となりうる。

⑦ 幹細胞の可視化とそのニッチの解析

成体幹細胞の特徴の一つである細胞分裂をほとんどしない、という性質を利用して、EGFP 融合ヒストン蛋白質で全身性に幹細胞を可視化することに道筋をつけた。この技術と我々がすでに確立している基底膜蛋白質の抗体シリーズを併用して組織染色を行うことで、成体幹細胞周囲の基底膜の分子の実体を解明することが可能となった。これまでは成体幹細胞がどのような足場を利用してその未分化維持や分化方向の決定を制御しているか未解明な点が多かったため、培養系でこれら幹細胞を扱うことが難しかった。今回確立した技術を用いて成体幹細胞周囲の組成(幹細胞ニッチ)が明らかになれば、マウス成体幹細胞の培養技術の開発につながり、ひいては基礎的な解析がほぼ不可能であるヒト成体幹細胞の培養技術に重要な手がかりを与えるものである。

2. 2. 4. 2 基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築

大阪大学および日本皮革研究所

(1) 事業目的と背景

細胞ごとに最適化された基底膜の分子構成を反映した人工基底膜を生体外で再構築するためには、まずその材料となる様々な基底膜構成分子を自由に調合し、本来の基底膜を模倣した空間配置をとらせることが必要である。本課題では、このような人工基底膜の構築を以下の 2 段階で行う。すなわち、基底膜の中核となる IV 型コラーゲンとラミニンからなる 2 成分コンポジット人工基底膜(第一世代人工基底膜)をまず構築し、これに細胞特異的に発現する他の基底膜分子を組み込んだ多成分コンポジット人工基底膜(第二世代人工基底膜)を次ぎに構築する。

本分担課題では、これら人工基底膜の構築に必要な基底膜構成分子の高発現系・安定供給系の構築とそれを利用した人工基底膜の構築を目的とする。基底膜の中核となるのは、IV 型コラーゲンとラミニンであり、第一世代人工基底膜の構築に必要な IV 型コラーゲンの安定供給系は日本皮革研究所が担当し、組換えラミニンの高発現系・安定供給系の構築は大阪大学で行う。また、ラミニンに加えて、第二世代人工基底膜の構築に必要な細胞特異的基底膜分子の高発現系・安定供給系の構築は大阪大学が担当する。

通常、IV 型コラーゲンはペプシン等の酵素による部分分解によって可溶性・精製されるが、このような方法で調製した IV 型コラーゲンは基底膜内にあるような超分子会合体を再構築するには不向きである。日本皮革研究所では、以前報告された方法を改良して、非酵素的に IV 型コラーゲンを抽出し、精製する方法を確立している。この方法をさらに改良して、生体外で基底膜様超分子会合体を安定に再構成する IV 型コラーゲンの調製法および超分子会合体の再構成技術を確立することを目的とする(日本皮革研究所)。

ラミニンに関しては、マウス EHS 腫瘍から分離・精製されたラミニン-111 が広く利用されている。しかし、それ以外のアイソフォームに関しては、ヒト胎盤や培養細胞の培養上清を材料とした調製法が報告されているものの、得られる精製蛋白質の量は少なく、大量かつ安定した精製蛋白質の供給には適していない。一方、遺伝子組換えによるラミニンの発現・供給系は、一旦確立されれば安定な供給が可能であるが、ラミニンは α 鎖(400 kDa)、 β 鎖(200 kDa)、 γ 鎖(200 kDa)のヘテロ 3 量体であり、6~10 kb の 3 本の cDNA を細胞に共発現させる必要がある。大阪大学では既にラミニン-411 および-511 の発現系を構築しており、これまでの実績を踏まえて、既に同定されている 15 種類のラミニンアイソフォームの発現系を確立し、各アイソフォームの安定供給系を確立することを目的とする。また、これら精製基底膜分子を組み合わせた第一世代および第二世代の人工基底膜の構築技術を開発する。さらに、増殖因子をあらかじめ固相化したオールインワン型の人工基底膜の構築を視野にいれて研究開発を展開する。

(2) 事業内容と目標

① IV 型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

非酵素的に純度の高い、ゲル化能を保持した IV 型コラーゲンを調製する方法を確立することを目標とする。具体的には、林らが 1993 年に報告した方法(Muraoka and Hayashi, 1993; Nakazato

et al., 1996)を参考にして、眼球のレンズ嚢(水晶体嚢)から非酵素的に IV 型コラーゲンを調製する方法を確立する。材料としては、ウシ、ブタなど、大量に眼球が入手可能な大動物を用いる。また抽出した IV 型コラーゲンの分子組成、アミノ酸組成、円偏光二色性測定等、蛋白質としての化学的物性を検討するとともに、そのゲル化能についての評価を行う。平成 18 年度は、100 mg のゲル化能を保持した IV 型コラーゲンの抽出・調製を行うことを数値目標とした。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築 (大阪大学)

基底膜の基本骨格となるラミニンは、3本のサブユニット鎖(α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖)からなるヘテロ3量体蛋白質である。 α 鎖には5種類($\alpha 1 \sim \alpha 5$)、 β 鎖と γ 鎖には3種類($\beta 1 \sim \beta 3$ および $\gamma 1 \sim \gamma 3$)のタイプがあり、これらの組み合わせに違いにより15種類のアイソフォームの存在が知られている(表3)。細胞表面の受容体と結合する領域は α 鎖のC末端領域にあり、 α 鎖のタイプがラミニンの基本的生理活性を規定している。本課題では、15種類すべてのラミニンアイソフォームの高発現系・安定供給系を構築することを目標とし、平成18年度はその中でも α 鎖のタイプの異なる代表的なアイソフォーム5種類(ラミニン-111, -211, -332, -411, -511)の発現系・安定供給系の構築を完成させることを目標とした。

ラミニン	旧名称	サブユニット組成
ラミニン-111	ラミニン-1	$\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-211	ラミニン-2	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-121	ラミニン-3	$\alpha 1 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-221	ラミニン-4	$\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-332	ラミニン-5	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$
ラミニン-311	ラミニン-6	$\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-321	ラミニン-7	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-411	ラミニン-8	$\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-421	ラミニン-9	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-511	ラミニン-10	$\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$
ラミニン-521	ラミニン-11	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$
ラミニン-213	ラミニン-12	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 3$
ラミニン-423	ラミニン-13	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 3$
ラミニン-523	ラミニン-14	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 3$
ラミニン-333	ラミニン-15	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 3$

表3:ラミニンアイソフォームの種類

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

基底膜の主要な構成分子としては、IV 型コラーゲンとラミニンに加えて、ニドゲンとヘパラン硫酸プロテオグリカンがある。細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜を構築するためには、これら主要構成分子の組換え蛋白質の発現系の構築と大量調製法の確立が不可欠である。ニドゲンにはニドゲン-1 とニドゲン-2 の 2 種類があり、ヘパラン硫酸プロテオグリカンにもパールカンとアグリンの 2 種類がある。これら 4 種類の基底膜主要構成分子の組換え蛋白質を mg 単位で安定に供給できる発現・精製法を確立することを目標とする。

④分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

はじめに IV 型コラーゲンとラミニンの 2 成分からなる第一世代人工基底膜を構築する。そのために必要な IV 型コラーゲンのゲル化条件の最適化を行うとともに、IV 型コラーゲンゲルにラミニンを不溶化するための条件検討を行う。次にニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを第一世代人工基底膜に組み込んだ第二世代人工基底膜の構築技術を確認する。そのために必要となる各基底膜分子間の相互作用を定量的に解析し、人工基底膜の構築に必要な基盤情報を取得する。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

細胞外マトリックスの役割は、単に細胞が接着するための足場を提供するだけではない。組織間相互作用のインターフェイスとなる基底膜には、双方の組織から分泌された様々な増殖因子や細胞分化誘導因子が組み込まれ、生体内での局在と活性の制御を受けている。生体内での基底膜の機能を真に反映した人工基底膜を構築するためには、単に基底膜分子の組成をカスタマイズするだけでなく、そこに組み込まれる増殖因子もカスタマイズする必要がある。この条件を満たす人工基底膜を構築するため、本来可溶性の増殖因子を基底膜に固相化する技術開発を行う。具体的には、ラミニンへの強い結合活性を賦与した基底膜組み込み型増殖因子の創製を行う。

(3)研究成果

①IV型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

IV型コラーゲンの抽出のための材料には、眼球レンズ嚢を用いた。3次元再構成コラーゲンを人工基底膜構築の材料とするには、できるだけ大量のコラーゲンを得る必要がある。回収量は材料の大きさと材料の得やすさに依存すると考え、ウシ、ブタ、ダチョウ、マグロの眼球よりレンズ嚢を採取し、IV型コラーゲンの抽出を行った。IV型コラーゲンの調製にあたっては、1回の抽出作業で100mg以上のコラーゲンが得られることを念頭において調製法の検討を行った。

様々な条件検討の結果、現在採用しているIV型コラーゲン調製法の概略を図19に示す。この調製法ではウシ眼球10個を出発材料の単位としている。まず、眼球をメスで切開し、水晶体を傷つけないように取り出した後、水晶体内から水晶体成分を慎重に絞り出し、水晶体を包む嚢を取り出す。取り出したレンズ嚢より図19に示す非酵素的でコラーゲンを抽出、精製した。抽出したコラーゲンを還元条件下でSDSゲル電気泳動すると、180 kDa, 175 kDa, 160 kDaのIV型コラーゲンのバンドが検出された(図20)。また、円偏光二色性測定によってコラーゲンらせん特有の210 nmの円偏光が見られ(図21)、変性温度は38°Cであった。また、アミノ酸分析の結果では、1000アミノ酸残基中ヒドロキシプロリンが90残基を占め、ほぼ純粋なコラーゲンであることが確認された。また、このように精製したIV型コラーゲンは、中性条件下で3次元ゲルを形成し、ゲル上で皮膚上皮細胞の培養が可能であった。ウシの眼球1個あたり0.27 mgのIV型コラーゲンが得られた。ブタ眼球を用いても同様の分子量のコラーゲンが得られたが、眼球1個あたりの収量は0.05 mgとウシの1/5程度であった。ダチョウの場合は、酢酸条件ではIV型コラーゲンが抽出されず、尿素存在下で抽出された。また、コラーゲン以外の夾雑蛋白質の混入が認められた。マグ

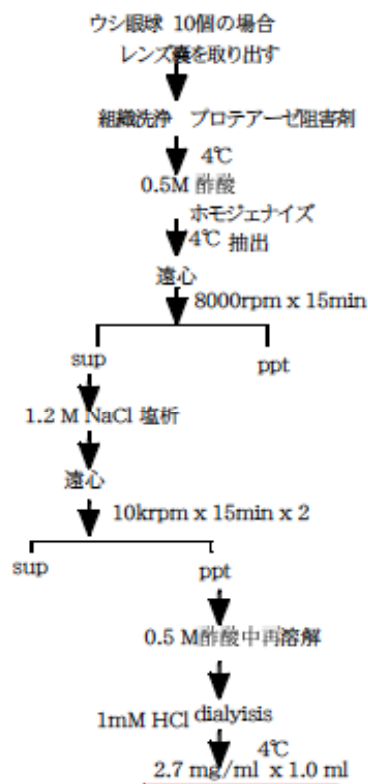


図 19: IV 型コラーゲンの抽出・精製プロトコール

口の場合は、1個の眼球あたり 1 mg 以上の蛋白質が得られたが、円偏光二色性測定ではコラーゲンらせん構造に由来するピークが得られず、なんらかの理由で変性したものと考えられた。

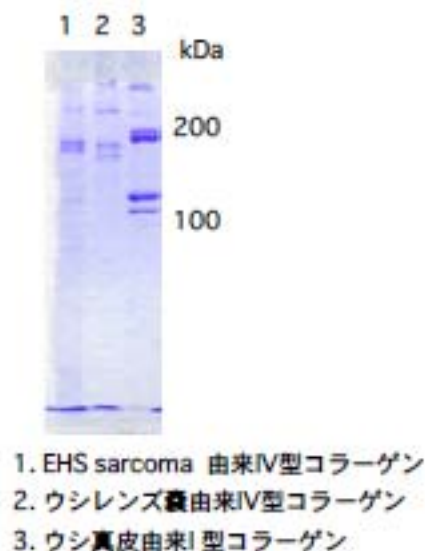


図 20: 精製 IV 型コラーゲンの SDS ゲル電気泳動パターン

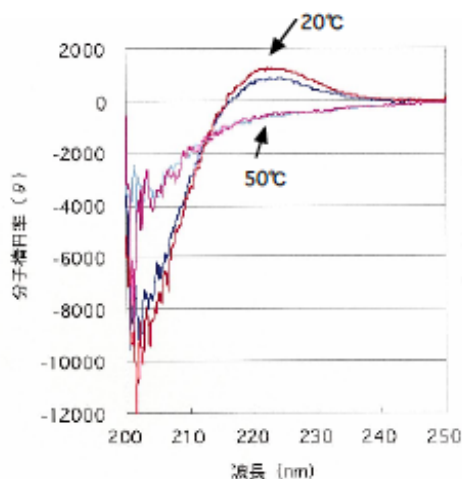


図 21: 精製 IV 型コラーゲンの円偏光二色性スペクトル

以上の結果を踏まえ、これまで調べた材料の中では、ウシ眼球が収量および純度の点から最も有利であると判断される。これまでにウシ眼球 500 個を材料として、約 100 mg の高純度の IV 型コラーゲンが得られている。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築（大阪大学）

(ア) $\beta 1$ 鎖をもつラミニンおよびラミニン-332 の高発現・安定供給系の構築

α 鎖の異なる5種類のラミニンアイソフォームの発現系は、浮遊培養に馴化したヒト 293F 細胞を用いる哺乳動物細胞遺伝子発現システム（インビトロジェン社製）を利用して構築した。 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖を含むアイソフォームは、 $\beta 1$ 鎖および $\gamma 1$ 鎖とのヘテロ三量体（ラミニン-111、ラミニン-211、ラミニン-411、ラミニン-511）として発現させ、 $\alpha 3$ 鎖を含むアイソフォームは $\beta 3$ 鎖および $\gamma 2$ 鎖とのヘテロ三量体であるラミニン-332 として発現させた。発現系を構築した5種類のラミニンアイソフォームの構造を図22に示す。なお、 $\alpha 3$ 鎖の場合は、その C 末端側球状ドメインを構成する LG3 モジュールと LG4 モジュールの間でプロテアーゼによるプロセッシングを受けるため、LG4~LG5 モジュールを欠失させた成熟型ラミニン-332 の発現系を構築した（図22参照）。発現系の構築に必要な各サブユニット鎖の発現ベクターは、既に構築済みのもので（ $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ ）と市販されているもの（ $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ ）を除き、残りはすべて RT-PCR により cDNA をクローニングし、発現ベクターを構築した。

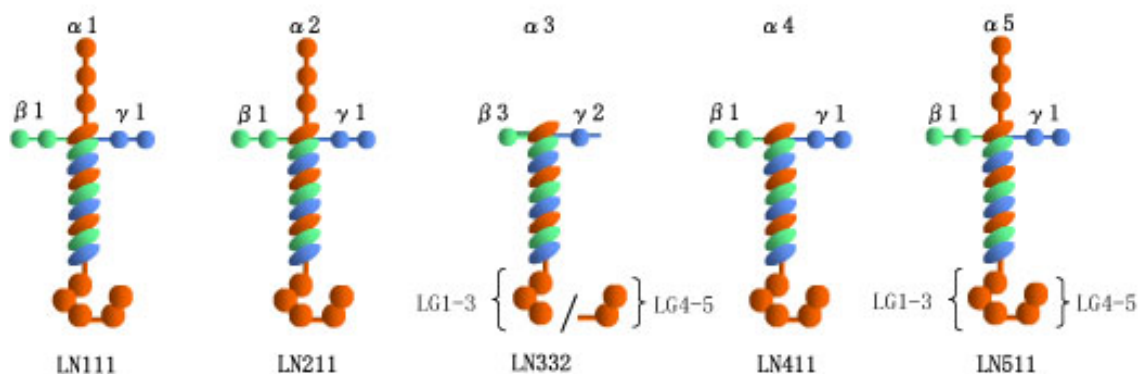


図 22: 組換えラミニンアイソフォームの構造

ヒト 293F を用いる発現系は、高密度浮遊培養した細胞に α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をコードする3種類の発現ベクターを導入し、一過的に大量の組換えラミニンを発現させる系である。現在採用している標準的組換えラミニン発現系では、293F 細胞 1.0×10^9 個/1000 ml を1単位として、これに各サブユニット鎖の発現ベクターを 330 mg ずつ 293fectin を用いて導入し、3日間の浮遊旋回培養後に培地を回収して、分泌された組換えラミニンを当該 α 鎖に対する単クローン抗体を不溶化したカラムで精製している。なお、5種類のヒト α 鎖に対する単クローン抗体は既に大阪大学において取得済みである。抗体カラムに結合したラミニンは 0.1 M トリエチルアミンで溶出した後、速やかに PBS に対して透析し、最終精製標品とした。抗体カラムの素通り画分にもかなりの未回収ラミニンが含まれているため、抗体カラムによる精製操作は3~5回に渡って繰り返す行い、収量の増加をはかった。このような一連の操作で得られる組換えラミニン量は、1回のトランスフェクション操作あたり 0.3 mg ~0.6 mg、全行程に要する時間は 2~2.5 週間である。これまでの精製によって、5 mg 前後の精製ラミニンが各アイソフォームについて得られている。なお、ラミニン-511 を発現させる場合は、 $\alpha 5$ 鎖のC末端領域の G4-G5 領域がプロセッシングを受け易いため、293F 細胞の培地にヘパリン(25 mg/ml)を添加して培養を行い、G4-G5 がプロセッシングされていない完全長の $\alpha 5$ 鎖をもつラミニン-511 が得られるよう工夫した。

精製した5種類のラミニンアイソフォームの還元条件下での SDS-ゲル電気泳動のパターンを図 23に示す。ラミニン-111 およびラミニン-411 については、分解の少ないインタクトな標品が得られている。ラミニン-211 は $\alpha 2$ 鎖に若干分解がみられたが、これは LG4-LG5 モジュールのプロセッシングによるものと思われる。ラミニン-332 は $\gamma 2$ 鎖が分解を受けたと思われるバンドが認められるが、これは $\gamma 2$ 鎖の N 末端側でのプロセッシングによる可能性が高い。ラミニン-511 は遺伝子導入した 293F 細胞をヘパリン存在下で培養した場合と非存在下で培養した場合で、 $\alpha 5$ 鎖の大きさに違いが認められた。これは、ヘパリン存在下で培養した時に LG3 と LG4 モジュールの間のプロセッシングが阻害されたためと考えられ、ラミニン-511 の発現・精製時におけるヘパリン添加の有用性が確認された。なお、各ラミニンの銀染色法を行った際に、ラミニン以外の蛋白質由来と思われる

るバンドが 150 KDa 付近に見られたため、 γ 1 鎖に結合することが知られているニドゲン-1 の可能性を考え、ニドゲン-1 に対する抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、予想通り γ 1 鎖を含む組換えラミニン標品はニドゲン-1 を含むことが確認された。これは 293F 細胞が内在的に発現しているニドゲン-1 がラミニンの γ 1 鎖に結合して共精製されたためと考えられる。

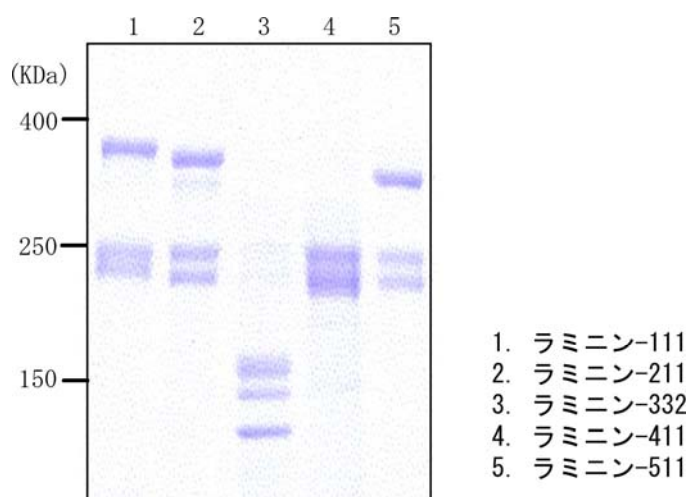
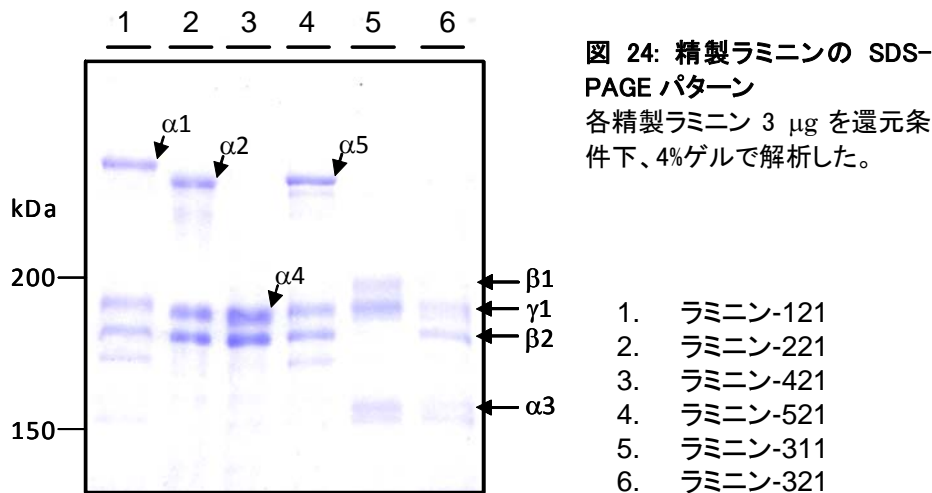


図 23: 精製ラミニンの SDS-ゲル電気泳動パターン

各精製ラミニン 2 mg を還元条件下、5%ゲルで解析した。

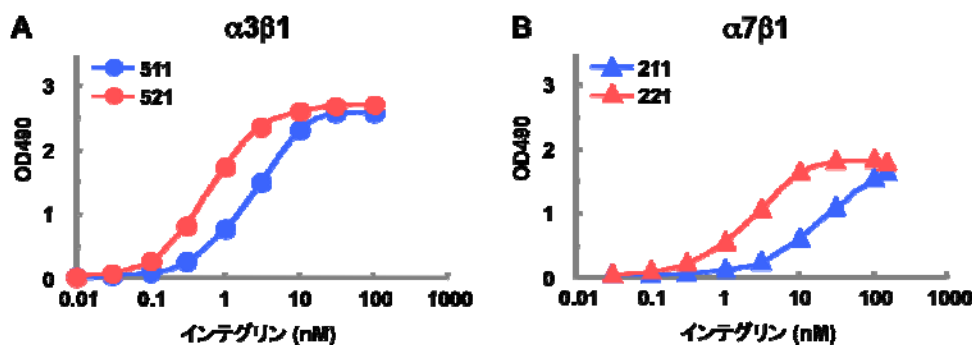
(イ) β 2 鎖をもつラミニンの高発現・安定供給系の構築

平成 19 年度は、先の5種類に次いで生体内での発現量が比較的高い β 2 鎖を含む5種類のラミニンアイソフォーム(ラミニン-121, -221, -321, -421, -521)の発現・精製系の構築を行った。また、 α 3 鎖と β 1 鎖を含むラミニン-311 の発現・精製もあわせて行った。ラミニン β 2 鎖の遺伝子はヒト胎盤由来 cDNA から PCR 法によりクローニングを行い、pcDNA3.1(+)(インビトロジェン社製哺乳細胞発現ベクター)に組み込んだ。組換え蛋白質の発現は、 β 1 鎖ラミニンの場合と同様に 293F 細胞を用いて行い、各 α 鎖と γ 1 鎖とのヘテロ三量体として発現・精製した。各ラミニンの精製は各 α 鎖を認識する抗体を用いてアフィニティ精製法により行った。 β 2 鎖を含むラミニンの発現量は、 β 1 鎖を含むラミニンの発現量より低く、ラミニン-121 とラミニン-521 については 293F 細胞の内在性 β 1 鎖の発現によるラミニン-111 とラミニン-511 の混入が問題となった。これらの問題点を解決するために、293F 細胞のトランスフェクション条件や精製手順の見直しを行った結果、発現量および精製収量の改善に成功し、293F 細胞の培養液 1L あたり 0.4~0.6 mg の組換えラミニンの精製が可能になった。これら精製ラミニンの純度を SDS-PAGE で確認したところ、 β 1 鎖のバンドはほとんど認められず、 β 2 鎖をもつラミニンが高純度で精製できていることが確認された(図24)。



なお、ラミニン-311 およびラミニン-321 に関しては、他のラミニンアイソフォームと比較して発現量が低く、ラミニン-321 では 293F 細胞の内在性ラミニン $\beta 1$ 鎖に由来すると思われるラミニン-311 の混入も認められた。これらの問題を解決するため、トランスフェクションする発現ベクターの比率の見直し、培養スケールの拡大など、精製収量を上げる工夫を行った。その結果、ラミニン-311 とラミニン-321 とともに精製に成功し、SDS-PAGE でいずれも高純度精製品を 293F 細胞の培養液 1L あたり 0.1~0.2 mg 精製することが可能になった(図24)。

精製した $\beta 2$ 鎖をもつラミニンアイソフォーム(ラミニン-121, 221, 521)のインテグリン結合活性を測定した結果、 $\beta 2$ 鎖をもつラミニンは $\beta 1$ 鎖をもつラミニンよりもインテグリン $\alpha 3\beta 1$ および $\alpha 7\beta 1$ に対して高い結合親和性をもつことが判明した(図25)。このことから、 $\beta 2$ 鎖をもつラミニンを人工基底膜に組み込むことにより、これらインテグリンを発現する細胞に対してはより接着活性が期待できる。



(ウ) $\gamma 3$ 鎖をもつラミニンアイソフォームの高発現・安定供給系の構築

$\gamma 3$ 鎖を含む4種類のラミニンアイソフォームは、完全長で精製した報告はなく、インテグリン結合活性も不明であった。そこで、ヒト胎盤由来 cDNA を用いて PCR 法により $\gamma 3$ 鎖 cDNA のクローニングを行った。クローン化した cDNA を pSecTag2A(インビトロジェン社製哺乳細胞発現ベクター)に組み込み、 $\gamma 3$ 鎖を含むラミニンアイソフォームを 293F 細胞に発現させた。しかしその発現量は極めて低く、さらにインテグリン結合部位を欠失していることが判明した。そのため、 $\gamma 3$ 鎖を含む4種類のラミニンアイソフォームは人工基底膜の構成成分から除外することにした。

(エ) 組換え蛋白質の発現条件および精製法の改良

人工基底膜を ES 細胞の培養基材として利用するためには、大量の精製ラミニンの調製が必要となる。さらなるラミニンの精製収量の増加を目的として、各ラミニンアイソフォームの発現条件や精製手順の最適化を行った。まず、ラミニンアイソフォームごとにトランスフェクションに使用するプラスミドの配合比を変え、293F 細胞におけるラミニン発現量の変化を比較し、各アイソフォームの発現に最適化された配合比を求めた。また、培養上清をあらかじめ濃縮することにより、カラムに添着するラミニン量を増加させ、一回の精製サイクルあたりの収量と純度を向上させた。このような精製法の改良により、ラミニン-332, -511 では、培養上清 1L あたりの収量が 2 倍以上に増加した。

(オ) ラミニン E8 フラグメントの発現・安定供給系の構築

マウス EHS 腫瘍から得られるラミニン-111 をエラストラーゼで限定分解すると、全長ラミニンと同程度の細胞接着活性を有するフラグメントが得られる。このフラグメントは E8 フラグメントと呼ばれ、ラミニンの coiled-coil 領域 C 末端部と α 鎖の球状ドメイン(LG1-LG3)から構成されている(図26)。E8 フラグメントは、完全長のラミニンと同様の細胞接着活性が期待されるだけでなく、低分子量であるため発現量が高く、ニドゲンやアグリンなどと結合する領域を欠損していることから、全長ラミニンと比較してこれらの混入が回避されるというメリットも予想される。そこで、平成 21 年度においてはラミニン-511 とラミニン-332 の E8 フラグメント相当領域を組換え体として作製した(図27)。

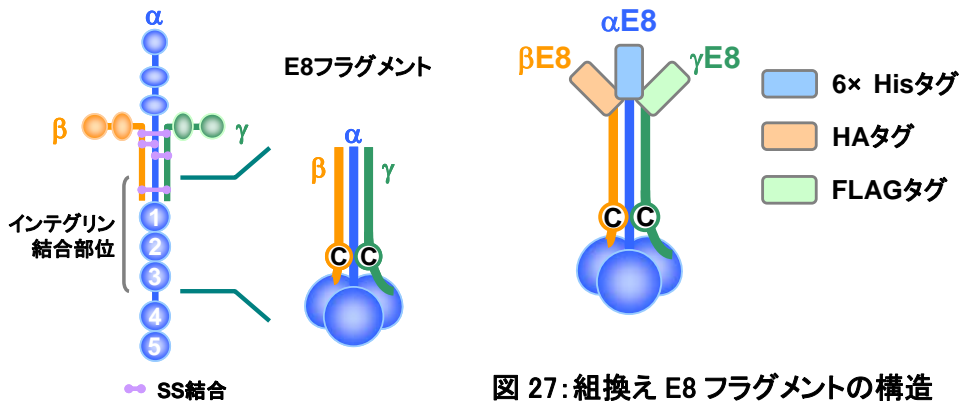


図 26: ラミニン分子における E8 フラグメントの位置

図 27: 組換え E8 フラグメントの構造

ヒトラミン-511 の組換え E8 フラグメントの作製にあたり、マウスラミン-111 の E8 フラグメントのアミノ酸配列と比較して、ヒトラミン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の E8 相当部位のアミノ酸配列を決定した。次に、ヒトラミン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の全長 cDNA 配列を含むプラスミドを鋳型として PCR を行い、各鎖の E8 部位に相当する cDNA 領域を増幅し、哺乳細胞用発現ベクター pSecTag2B に挿入した。E8 フラグメントの各鎖の N 末端側には、 $\alpha 5$ 鎖には 6×His タグ、 $\beta 1$ 鎖には HA タグ、 $\gamma 1$ 鎖には FLAG タグを付加した(図27)。同様に、ヒトラミン-332 の E8 フラグメントの作製にあたってマウスラミン $\alpha 3$ 鎖、 $\beta 3$ 鎖、 $\gamma 2$ 鎖の E8 相当部位のアミノ酸配列を決定し、N 末端側に 6×His、HA、FLAG の各タグを付加した発現ベクターを作製した。

組換えラミン-511E8 とラミン-332E8 の発現には全長ラミンと同様に 293F 細胞発現系を用い、培養上清からの精製には His タグ、FLAG タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーを用いた。精製した組換え E8 フラグメントの純度を SDS-PAGE で確認したところ(図28)、両組換え体とも分解物や不純物が少なく高純度で精製されていることが確認された。マウスラミン-111 由来の E8 フラグメントは β 鎖と γ 鎖がジスルフィド結合で、 α 鎖は非共有結合で相互に結合している。SDS-PAGE 解析の結果から、組換え E8 フラグメントのサブユニット鎖も同じ様式で結合しており、組換え E8 フラグメントがマウスラミン-111 由来 E8 フラグメントを模倣できていることが確認された。インテグリン $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ に対する結合活性を確認したところ、ラミン-511E8 とラミン-332E8 とともに全長ラミン-511 とラミン-332 と同程度のインテグリン結合活性を有することが確認された。

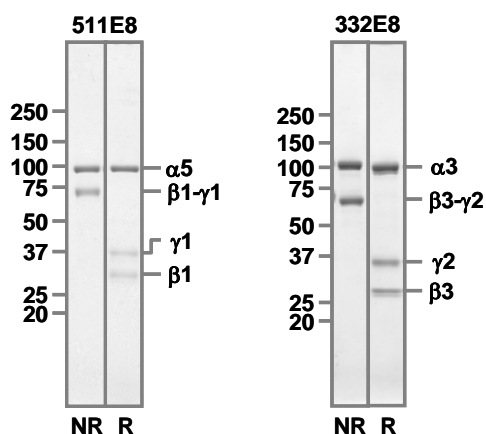


図 28: 精製したラミン E8 フラグメントの SDS-PAGE パターン 各組換え E8 フラグメント 1.5 μ g を非還元(NR)または還元(R)条件化で 5-20%グラディエントゲルで解析した。

組換え E8 フラグメントの収量は培養上清 1L あたり >5 mg と完全長ラミンの収量よりも大幅に向上していた。また、293F 細胞由来の内在性プロテオグリカンの混入を確認したところ、完全長ラミン-511 にはプロテオグリカンの混入が検出されたのに対し、ラミン-511E8 フラグメントにはほとんど混入がみられなかった。これらの結果から、ラミン E8 フラグメントは完全長ラミンと同程度のインテグリン結合活性を保持している一方で、大量調製に有利な特性をもつことが明らかとなった。

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

平成 20 年度は、ニドゲン-1、ニドゲン-2、アグリンの高発現・精製系の構築を行った。これらの基底膜蛋白質はラミニンや IV 型コラーゲンに結合する基底膜の主要構成成分であり、より生体内環境を反映した人工基底膜の構築には欠かせない分子である。発現ベクターの作製に際して、ニドゲン-1 とニドゲン-2 は市販の cDNA を利用し、アグリン cDNA はヒト胎盤由来 cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅・クローニングした。発現する蛋白質の C 末端には His タグが付加されるように構築した。ラミニンの場合と同様、ヒト 293F 細胞を用いて発現させ、各蛋白質に付加し

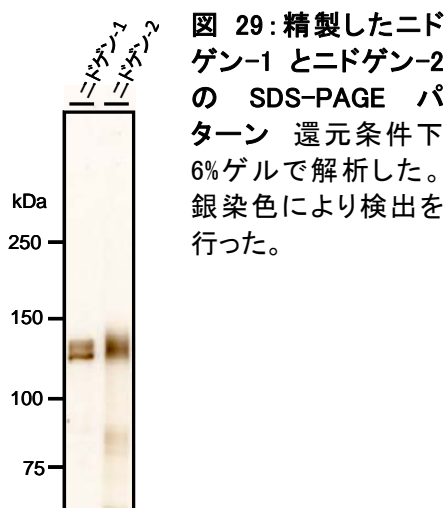


図 29: 精製したニドゲン-1 とニドゲン-2 の SDS-PAGE パターン 還元条件下 6%ゲルで解析した。銀染色により検出を行った。

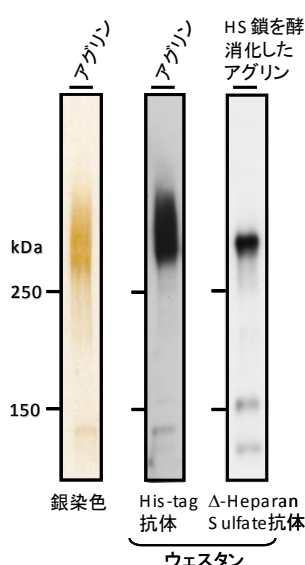


図 30: 精製アグリンの SDS-PAGE とウェスタンブロット 還元条件下 4%ゲルで解析した。銀染色および His タグ認識抗体によるウェスタンブロットで検出した。右端のレーンはヘパラン硫酸(HS)鎖を酵素消化したアグリンを泳動し、HS 鎖付加部位を認識する抗体で検出した。

た His タグを利用してニッケルレジン(キアゲン社製)によるアフィニティ精製を行った。発現条件や精製手順の最適化を行い、最終的に、293F 細胞培養上清 1L からニドゲン-1、ニドゲン-2、アグリンのいずれも >5 mg の精製が可能となっている。各精製蛋白質の SDS-PAGE を行い、銀染色およびウェスタンブロットングで確認したところ、ニドゲン-1 とニドゲン-2 はともに N 末端部分が分解を受けていたものの(図29)、ラミニン及び IV 型コラーゲンに結合するドメインは保持されており、実際に ELISA によって結合能が保持されていることが確認された(次項④-(イ)参照)。一方、アグリンはヘパラン硫酸プロテオグリカンの特徴であるヘパラン硫酸鎖が付加されていることが確認された(図30)。また、精製蛋白質の大部分はコア蛋白質が完全長であり、ラミニン結合能は保持されていることが確認された。

また、平成 20 年度から 21 年度にかけてパールカンの発現・精製系の構築を行った。パールカンは基底膜の代表的なヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、そのヘパラン硫酸鎖は液性因子や他の細胞外マトリックス蛋白質、膜蛋白質との相互作用に重要な働きをしていることが知られている。最初に、内在的にパールカンを発現しているヒト子宮ガン由来 JAR 細胞の培養上清を採集して、パールカン抗体を固相化したイムノアフィニティカラムにかけてパールカンの精製を行った。この精製方法により得られたパールカンの量は、JAR 細胞培養上清 1L あたり 30 μ g と極めて少ないものであった。そこで、パールカン全長 cDNA をヒト胎盤 cDNA ライブラリーより PCR 法によって増幅・クローニングし、発現する蛋白質の C 末端には His タグが付加されるように発現ベク

ターを構築した。これを 293F 細胞で発現させ、その培養上清からニッケルレジジンによるアフィニティ精製を行った。精製条件の最適化を行った結果、純度の高い精製品を培養上清 1L あたり約 5 mg 精製することが可能になった。精製したパールカンの SDS-PAGE を行い、銀染色およびウェスタンブロットで確認したところ、JAR 細胞の培養上清から精製したものと比較して分解が少なく、液性因子との相互作用に重要であるヘパラン硫酸鎖の付加が確認できた(図31)。JAR 細胞を用いた発現系よりも 293F 細胞を用いた発現系の方が純度、発現量、いずれの点においても優れていることから、293F 細胞発現系を採用することとし、パールカンの発現・精製の構築を完了した。

人工基底膜の構築に供する基底膜蛋白質は ES 細胞などの細胞培養系に使用するため、すべて無菌的にしておく必要がある。そのため精製した基底膜蛋白質は PBS (-)で透析後、蛋白質低吸着ディスク型フィルター(0.22 μ m, 13 mm, 親水性 PVDF メンブレン、ミリポア製)を使用して濾過滅菌を行った。フィルトレーション後の回収率は蛋白質の種類によって異なるものの、概ね 65%以上であった。また、SDS-PAGE でフィルター操作前後での精製蛋白質の純度に変化がないことも確認した。このようにして ES 細胞の分化誘導制御技術の開発に必要な基底膜成分を安定供給する態勢が整備された。

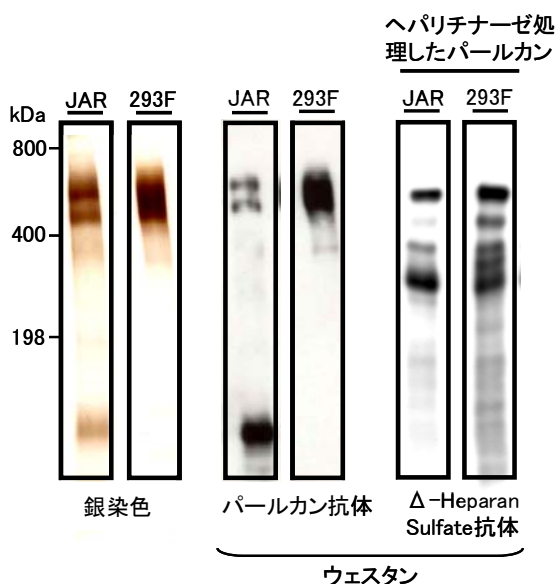


図 31:JAR 細胞と 293F 細胞から精製したパールカンの SDS-PAGE パターン還元条件下 4%ゲルで解析した。銀染色とパール認識抗体によるウェスタンブロットで検出した。右端のレーンはヘパリチナーゼ処理によりヘパラン硫酸鎖を消化してパールカンを泳動し、ヘパラン硫酸付加部位を認識する抗体で検出した。

④人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

(ア)第一世代人工基底膜の構築: IV 型コラーゲンゲルと様々なラミニンアイソフォームを組み合わせた第一世代人工基底膜を構築するための基礎的条件を検討するため、各ラミニンアイソフォームと IV 型コラーゲンの結合を定量的に解析した。対照として、3 次元培養基材として使用されている I 型コラーゲンと各ラミニンとの結合もあわせて解析した(図32)。その結果、調べた 11 種類のラミニンアイソフォームの中で、ラミニン-332 を除くすべての β 1 鎖ラミニンおよび β 2 鎖ラミニンが IV 型コラーゲンに対して強い親和性を有することが明らかとなった。一方、I 型コラーゲンはどのラミニンに対しても弱い親和性しか示さなかった。これらの結果から、ラミニンを組み込んだ

人工基底膜を構築するためには、I 型コラーゲンではなく IV 型コラーゲンを使う必要があることがわかる。実際に IV 型コラーゲンゲルにラミニン-111 とラミニン-511 を結合させたところ、どちらも結合することが確認された(図33)。しかし、IV 型コラーゲンとラミニンからなる人工基底膜はゲル自体が非常に柔らかく、その上で細胞を培養すると、培地交換の際にゲルが破損し易いことが判明した。また、IV 型コラーゲンをゲル化させるには 4°C で 5 日間以上静置する必要がある、IV 型コラーゲンゲルを ES 細胞の培養用基材として用いるには、これらの問題をまず解決する必要があると考えられた。

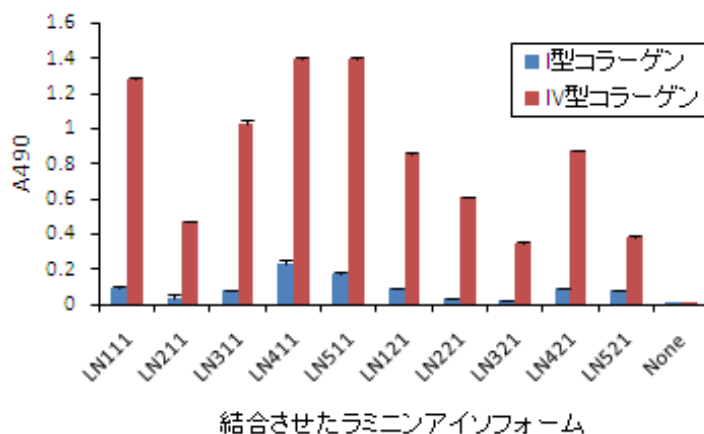


図 32: I 型コラーゲンおよび IV 型コラーゲンに対するラミニンアイソフォームの結合活性 I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンを 10 μ g/ml でコーティングしたプレートに、各ラミニンアイソフォームを 10 μ g/ml で添加して室温で 1 時間インキュベートした。結合したラミニンはラミニン γ 1 抗体で検出した。None はラミニンを添加していない対照である。いずれのラミニンも IV 型コラーゲンとは結合したが、I 型コラーゲンとはほとんど結合しなかった。

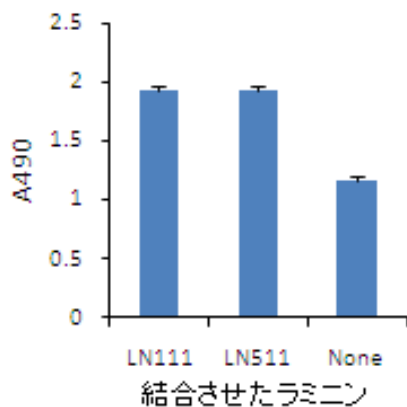


図 33: IV 型コラーゲンゲルへのラミニン結合量評価

1 mg/ml の IV 型コラーゲンを 4°C、5 日間インキュベートしてゲル化させた後、10 μ g/ml のラミニン(LN)-111 または LN-511 を添加して室温で 3 時間インキュベートした。洗浄後、結合したラミニンはラミニン γ 1 抗体で検出した。None はラミニンを添加していない条件(対照)を示す。バックグラウンドが高いものの、IV 型コラーゲンへのラミニンの結合が確認された。

IV 型コラーゲンゲルがもつこれらの問題を解決するため、ゲル化が容易でゲル強度の増加が期

待できる I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンとの混成ゲルの形成を試みた。I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンをあらかじめ混合し、37°C で 1 時間インキュベートしたところ、物理的に安定なゲルが形成されることがわかった。この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルには、洗浄後も IV 型コラーゲンが残っていることを確認している。I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルの表面構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、I 型コラーゲンの線維上に膜様の付着物が確認され、基底膜様の構造が I 型コラーゲンゲル上で形成されていると考えられた(図34)。この膜様構造は、I 型コラーゲンゲルや、ゲル化能を持たない市販の IV 型コラーゲンを使った混成ゲルでは認められず、ゲル化能を有する IV 型コラーゲンのみで観察された。この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルにラミニン-111 またはラミニン-511 を加えて 37°C、2 時間インキュベートし、洗浄後に残ったラミニン量を評価したところ、I 型コラーゲンゲルや、ゲル化能を持たない市販の IV 型コラーゲンとの混成ゲルと比較して、効率よくラミニンがゲル上に保持されていることがわかった(図35)。このようにして、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを 3 次元ゲル基材とする第一世代人工基底膜の作製に成功した。

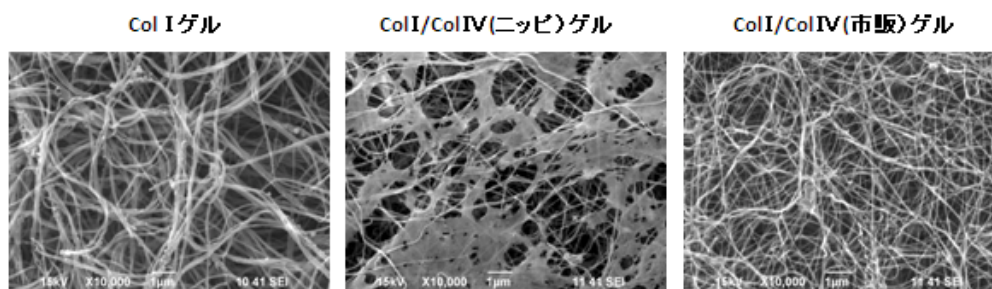


図 34:コラーゲンゲル表面の走査型電子顕微鏡像 1.5 mg/ml の I 型コラーゲン(Col I) ゲルとニッピ(Col IV ニッピ)または市販(Col IV 市販)の IV 型コラーゲン 0.5 mg/ml を I 型コラーゲン 1.5 mg/ml と混合して形成させたゲルの表面構造。ゲル化能を持つニッピの IV 型コラーゲンを混成したゲル(中央)では、I 型コラーゲンの線維上に膜様の付着物が確認された。

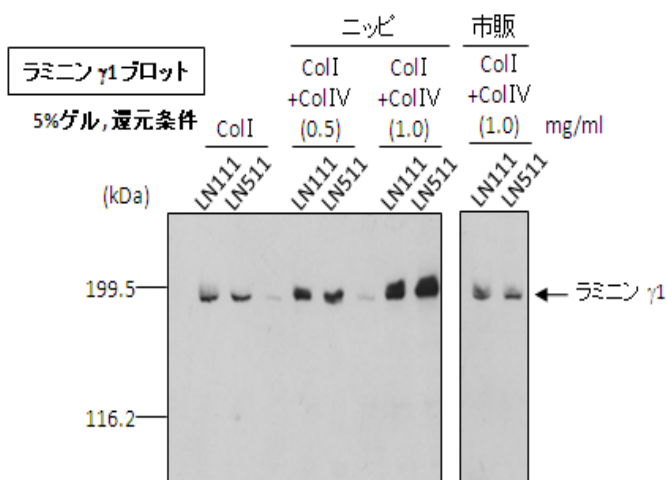


図 35:コラーゲンゲル上へのラミニン結合量の評価 I 型コラーゲン(1.5 mg/ml) に濃度を変えた IV 型コラーゲン(ニッピまたは市販品)を混合してゲル化させ、50 μ g/ml のラミニン(LN)111 または LN511 を加えて 37°C で 2 時間インキュベートした。洗浄後、ゲルを溶解して LN γ 1 抗体でブロットした。ゲル化能を保持した IV 型コラーゲンの含量に比例して、LN の結合量が増加している。

(イ) 第二世代人工基底膜の構築

ラミニン以外の基底膜成分(ニドゲンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカン)を組み込んだ第二世代人工基底膜の構築方法を探るため、ニドゲン 2 種(ニドゲン-1、ニドゲン-2)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン 2 種(アグリンとパールカン)とラミニンおよび I 型、IV 型コラーゲンとの結合活性を固相結合アッセイ法により検討した(図36)。その結果、ニドゲンはニドゲン-1、ニドゲン-2 ともにラミニンには強く結合し、IV 型コラーゲンには微弱な結合活性しか示さないことがわかった。I 型コラーゲンにはどちらのニドゲンも結合しなかった。同様に、アグリンとパールカンもラミニンに対して強い結合活性を示したが、I 型コラーゲンとはまったく結合せず、IV 型コラーゲンに対しても結合しないか(アグリン)、弱い結合活性しか示さなかった(パールカン)。以上から、第二世代人工基底膜を構築するためには、IV 型コラーゲンにラミニンを結合させ、その上にニドゲン・アグリン・パールカンを結合させればよいと考えられる(図37)。

I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルにラミニン 511・ニドゲン-1・パールカンを添加したところ、パールカン単独ではほとんど結合しなかったのに対し、3 者を混合した場合はいずれもゲルに結合したことが確認された(図38)。パールカンの代わりにアグリンを使用した場合も同様に結合可能であることを確認している。以上から、IV 型コラーゲンとラミニンに加え、ニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを組み込んだ第二世代人工基底膜の構築に成功した。

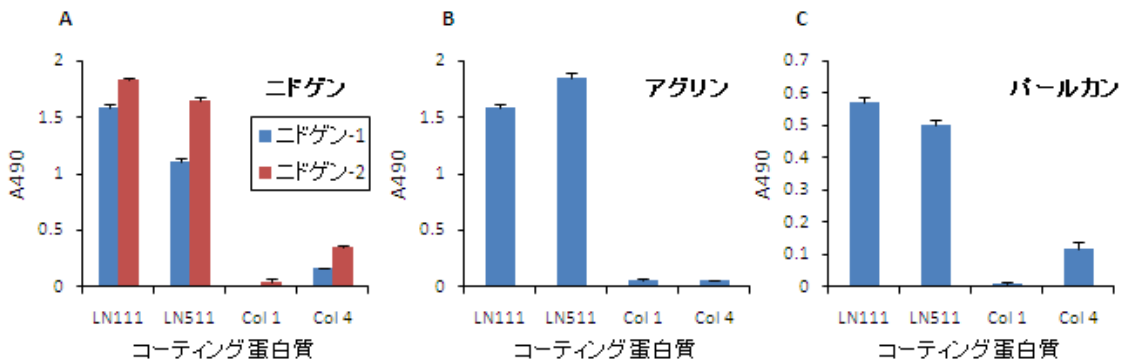


図 36: ニドゲン、アグリン、パールカンのラミニンとコラーゲンへの結合特異性評価 ラミニン(LN)-111、LN511、I 型コラーゲン(Col 1)、IV 型コラーゲン(Col 4)を $10 \mu\text{g/ml}$ でコーティングしたプレートに、ニドゲン-1 またはニドゲン-2 (A)、アグリン(B)、パールカン(C)を $10 \mu\text{g/ml}$ で添加し、室温で 1 時間インキュベートした。結合した各蛋白質の量は、各組換え蛋白質に付加している His タグに対する抗体で検出した。

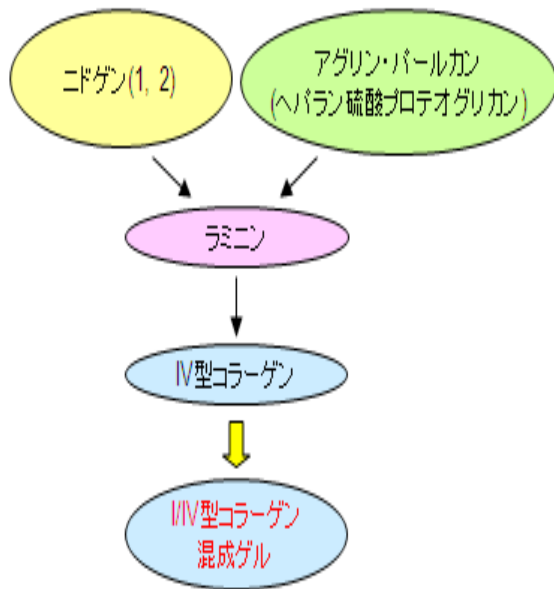


図 37: 基底膜蛋白質間の結合特異性と第二世代人工基底膜構築の戦略 IV 型コラーゲンはラミニンと強く結合するが、ニドゲンやアグリン・パールカンとの結合は弱い。ラミニンはニドゲンやアグリン・パールカンとも強く結合することから、第二世代人工基底膜の構築には、IV 型コラーゲンゲルにラミニンを結合させ、その上にニドゲンやアグリン・パールカンを結合させるとよいことがわかる。IV 型コラーゲン単独ゲルよりも I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルが 3 次元基材として適している。

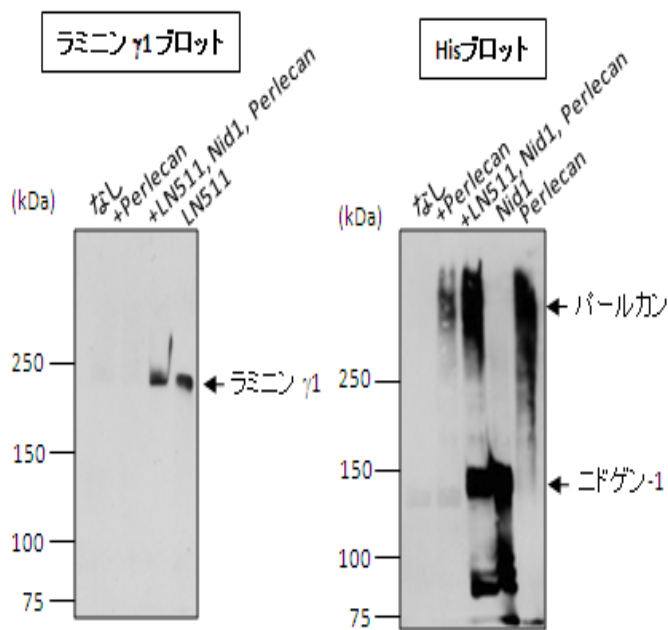


図 38: I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲル上へのラミニン・ニドゲン・パールカンの結合 I 型/IV 型コラーゲン混合ゲル化に、パールカン単独(+perlecan)、あるいはラミニン(LN)511、ニドゲン-1(Nid1)、パールカン混合物(+LN511, Nid1, perlecan)を添加し、37°Cで 2 時間インキュベートした。洗浄後ゲルを溶解して、LN・1 抗体(左)および抗 His 抗体(右)でプロットした。パールカン単独でほとんどゲルに結合しなかったが、LN511・ニドゲン-1 と同時に添加するとパールカンが混成ゲルに保持されている。

この I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルを基材とした人工基底膜は、-80°Cで凍結保存・輸送が可能である。また、37°Cで解凍してもゲルの形状を保ち、結合させた基底膜蛋白質も保持されていることを確認している。解凍後のゲルはそのまま ES 細胞の培養に利用可能である。I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルは、IV 型コラーゲン単独ゲルよりも短時間で作製可能な上に、ラミニンや他の基底膜構成成分をカスタマイズすることが可能であり、3 次元人工基底膜の基材として有用であると考えられる。本混成ゲルの作製法については、2009 年 10 月に特許申請を行った。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

細胞外マトリックスは、細胞が接着するための単なる足場ではなく、近傍の細胞を含めた外部環境(間質)から発信される情報(増殖因子)を受け取り、増殖因子シグナルを制御するインターフェイスとしての役割を果たしている。そこで、細胞増殖と分化に深く関わる HGF とアクチビン A を人工基底膜に選択的に不溶化する方法の確立をめざした。具体的には、アグリン N 末端ドメインがラミニンと結合する性質を利用し、これを増殖因子とキメラ化することにより基底膜組み込み型の増殖因子の創製を試みた。ニワトリアグリン N 末端ドメイン(Nt)は γ 1鎖を含むマウスラミニン-111、-211、-221 と強く結合することが知られている。しかし、それ以外のラミニンとの結合については不明である。事業分担者は、まず 293F 細胞を用いて Nt ドメインを調製し、各ラミニンアイソフォームとの結合活性を調べた。その結果、Nt はラミニン-111、-221、-511 と強く結合したが、血管基底膜に存在するラミニン-411 との結合能はラミニン-211 の約2割にとどまった。表皮基底膜に存在するラミニン-332 とは結合しなかった。また Nt-GFP 融合蛋白質は基底膜様成分マトリゲルに不溶化されることが判った(図39)。

293F 細胞を用いて HGF-Nt 融合蛋白質を発現させ、ニッケルレジンカラムで組換え蛋白質を精製した。HGF は Nt と融合することによって、ラミニン-111、-221 との結合能を獲得し、かつ HGF の本来の生理活性(受容体 c-Met のリン酸化、細胞分散活性、血管内皮細胞の増殖促進活性)を完全に保持していることが明らかとなった。このようなラミニン結合型 HGF を用いてラミニン上において血管内皮細胞の増殖促進活性を調べた結果、HGF-Nt は細胞増殖活性を保持していた。また、ラミニン-111 に固定化された HGF-Nt も血管内皮細胞に対して増殖促進活性を示した。

次に、ヒトアグリン N 末端ドメイン Nt について検討した。ヒト Nt はニワトリ Nt と同様、ラミニン-511 と ラミニン-221 に最も高い親和性を示した。アクチビン A(Act)はヒト Nt と融合することによって、ラミニン-511 との結合能を獲得した。Nt-Act 融合蛋白質はラミニン-511 に結合後もアクチビン A の生理活性(Smad 依存的遺伝子発現活性)を保持していた。これらの結果は、Nt とキメラ化した増殖因子(HGF-Nt と Nt-Act)がラミニン-111、-221、-511 を含む人工基底膜上での細胞培養、分化誘導の制御に有用であることを示している。

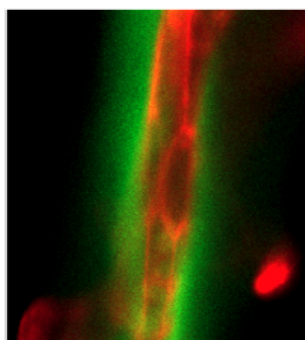


図 39:細胞周囲に不溶化された Nt-GFP Nt-GFP を発現する A431 細胞をマトリゲル上で3日間培養した後、発現蛋白質の局在を観察した。Nt-GFP(緑)は細胞周辺のマトリゲルに不溶化されている。細胞をアクチン(赤)で染色した。

(4) 目標の達成度と意義

①IV型コラーゲンの安定供給系の開発(日本皮革研究所)

平成 18 年度の目標は、生体内に近い3次元ゲル構造をとることができる IV 型コラーゲンの安定供給系を確立することであった。材料は IV 型コラーゲンを豊富に含むレンズ囊に定め、できるだけ収量の上がる動物から検索を始めた。連続的な材料供給が可能で、眼球の大きな4種の動物から IV 型コラーゲンの抽出を試みた結果、ウシを材料に用いた場合に最も効率よく IV 型コラーゲンが得られることが明らかとなった。これまでに約 100 mg の高純度の IV 型コラーゲンが得られており、当初の目標を十分に達成することができた。

従来、マウス EHS 肉腫を材料とした IV 型コラーゲンが市販されているが、正常動物から抽出されたゲル化能を有する IV 型コラーゲンは市販されておらず、今回はじめて安定的に供給できる体制を整えることができた。平成 19 年度～平成 21 年度は、このようにして調製した IV 型コラーゲンを基材に用いる第一世代人工基底膜、さらに第二世代人工基底膜の開発を大阪大学と共同して進め、計画通りに IV 型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、パールカンを組み合わせた第二世代人工基底膜の構築に成功した。また、その過程で、人工基底膜の基材として I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの混成ゲルを開発し、改良型の人工基底膜の構築に成功した。これらの成果は、当初の目標を十分に達成している。

②ラミニンの高発現系・安定供給系の構築(大阪大学)

当初の計画通り、 α 鎖の異なる5種類のラミニンアイソフォームの高発現系・安定供給系を確立し、それぞれ 5 mg 以上の精製ラミニンの調製に成功した。また、得られた精製ラミニン標品は、SDS-ゲル電気泳動に見る限り、分解の少ない高純度標品であることが確認された。また、精製標品のインテグリン結合活性についても予備的解析を進めているが、これまでに調べた限り、従来の方法で調製した標品と同等の活性が確認されている。これらの結果より、平成 18 年度の目標は十分に達成されたといえる。また、平成 19 年度～21 年度においては、 $\beta 2$ 鎖を含むラミニンアイソフォームの発現・精製法を確立し、細胞接着活性を持たない $\gamma 3$ 鎖ラミニンを除く全アイソフォームの安定供給系の構築を完了した。また、 $\beta 1$ 鎖ラミニン、 $\beta 2$ 鎖ラミニンともに、トランスフェクションの条件および精製法を改良し、収量を 1.5～2 倍高めることに成功した。さらに、ラミニンの細胞接着活性部位だけを含む組換え E8 フラグメントの発現系を構築し、このフラグメントが全長ラミニンとほぼ同等の細胞接着活性を有すること、収量は全長ラミニンと比べて 5～10 倍増加し、不純物の混入もほとんどないことを確認した。この組換え E8 フラグメントはヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養基材として有用であることが、京都大学との共同研究で明らかにされている。以上の成果は、当初の目標を達成するに止まらず、ヒト ES 細胞の培養技術開発におけるブレークスルーとなるものである。

③第二世代人工基底膜構築に必要な基底膜蛋白質の高発現・安定供給系の構築(大阪大学)

第二世代人工基底膜の構築に必要な 2 種類のニドゲン(ニドゲン-1、ニドゲン-2)および 2 種類のヘパラン硫酸プロテオグリカン(アグリン、パールカン)の組換え蛋白質の発現系を構築し、これ

らを安定に供給する態勢を整え、期間内に完了した。パールカンの場合は、完全長 cDNA が 13 kb という巨大な糖蛋白質であり、そのクローニングには多くの労力を要したが、比較的短い期間でこれを達成することができた。また、高発現・安定供給の要求を満たすため、発現・精製系の最適化を行い、いずれも mg 単位の精製収量を達成している。これらの成果より、当初の目標は十分に達成されたと考えられる。なお、これら組換え蛋白質を利用することにより、第二世代人工基底膜の構築が可能となり、分子組成を細胞ごとにカスタマイズした人工基底膜の構築が可能となった。

④人工基底膜の構築技術の開発(大阪大学および日本皮革研究所)

分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築は、本プロジェクトの中核となる研究課題である。当初の計画通り、平成 19 年度には IV 型コラーゲンとラミニンの 2 成分からなる第一世代人工基底膜の構築に成功し、平成 21 年度には IV 型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの 4 成分からなる第二世代人工基底膜の構築に成功した。どちらの場合も、ラミニンのタイプやヘパラン硫酸プロテオグリカンのタイプを細胞ごとにカスタマイズすることが可能であり、当初の「細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築」という目標を達成している。なお、当初計画していた IV 型コラーゲン単独のゲルでは細胞培養用基材として物理的強度が不十分であるため、IV 型コラーゲンと I 型コラーゲンの混成ゲルを利用する新たな 3 次元培養基材の開発に成功している。この I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルは、I 型コラーゲンの物理的強度と IV 型コラーゲンの生理活性(ラミニンやその他の基底膜分子に対する結合能)を併せ持ち、人工基底膜の 3 次元ゲル基材としては理想的である。これらの成果は、当初の目標を十分に達成しているだけでなく、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを利用した新たな 3 次元細胞培養用基材の開発の嚆矢となるものである。

⑤基底膜組み込み型増殖因子の創製(大阪大学)

生体内では基底膜に様々な増殖因子、分化誘導因子が結合し、その局在と活性が制御されている。足場としての機能に加えて、増殖因子の貯蔵機能・活性制御機能を持たせることにより、生体内での機能をより忠実に反映した人工基底膜の構築が可能となる。本課題では、アグリンの N 末端ドメイン Nt が強いラミニン結合活性を持つことに着目し、Nt とのキメラ化により、HGF を基底膜組み込み増殖因子の改造することに成功した。また、アクチビン A にこの方法を適用し、本来の生理活性を保持したままラミニン結合能を獲得した基底膜組み込み型アクチビン A の作製にも成功した。この方法を様々な増殖因子、分化誘導因子に応用することにより、本来拡散性の液性因子をあらかじめ組み込んだオールインワン型人工基底膜の構築が可能となる。

2. 2. 4. 3 人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発

大阪大学および日本皮革研究所

(1)事業目的と背景

分子構成の異なる人工基底膜を用いて、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する技術開発を行う。従来、ES細胞の選択的分化誘導制御は、主に液性因子の側から研究が進められており、

細胞外基質の側からES細胞の分化誘導を系統的に解析した研究はごくわずかである。特に、基底膜の分子構成に着目した解析は、細胞培養に利用可能な基底膜分子が EHS 腫瘍由来の基底膜粗抽出物マトリゲルやそこから分離・精製されたラミニン-111 と IV 型コラーゲンにほぼ限定されるため、それ以外の基底膜分子を含めた網羅的解析はこれまで皆無といってもよい状況にある。本課題では、細胞ごとに最適化された基底膜分子構成を反映させた人工基底膜を構築し、その有用性をマウスES細胞の選択的分化誘導の観点から検証することを目的とする。なお、ヒトES細胞を用いた選択的分化誘導活性の評価は京都大学再生医科学研究所、幹細胞創薬研究所、熊本大学と共同して別途行う。

(2) 事業内容と目標

ES 細胞から組織特異的な細胞分化を誘導するためには、まず分化の初期段階において、外胚葉、内胚葉、中胚葉それぞれの細胞系譜への選択性を制御することが重要である。未分化ES細胞をいったん分散させ、浮遊細胞塊(以下、胚様体と呼ぶ)として leukemia inhibitory factor (LIF) 非存在下で培養すると、自発的な分化により外胚葉、中胚葉(心筋を含む)、内胚葉を含む複数の系譜の細胞が誘導される。本課題では、胚様体を介したマウスES細胞の三胚葉分化誘導実験系の立ち上げ、人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導を実証することを目標とする。人工基底膜としては、様々なラミニンと IV 型コラーゲンを組み合わせた第一世代人工基底膜およびこれに細胞特異的に発現する基底膜分子を組み込んだ第二世代人工基底膜を用いる。初年度の平成 18 年度は、人工基底膜の活性評価に不可欠なマウスES細胞の三胚葉分化誘導系を立ち上げることを達成目標とした。平成 19 年度～21 年度は、マウス三胚葉分化誘導系を利用して、心筋細胞、肝臓細胞、膵臓前駆細胞への分化誘導条件を検討するとともに、京都大学、幹細胞創薬研究所、熊本大学と共同して、ヒトES細胞の未分化性維持(京都大学)、心筋細胞分化(幹細胞創薬研究所)、肝臓・膵臓前駆細胞分化(熊本大学)に最適化した人工基底膜の開発を行う。

(3) 研究成果

①人工基底膜によるES細胞の三胚葉分化誘導制御(大阪大学)

2 種類のES細胞、ht7 および Nkx2.5-GFP(Hidaka et al., FASEB J, 17, 740, 2003)を用いて、胚様体形成を介する三胚葉分化誘導系を立ち上げ、その妥当性を検討した。ht7 はフィーダーフリー培養が可能で、Oct-3/4 遺伝子制御下で発現するハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、ハイグロマイシンを培地に常時添加することで未分化細胞が選択的に維持される。Nkx2.5-GFP は ht7 を親株とし、さらに心筋分化マーカーである Nkx2.5 遺伝子座に GFP が挿入されている。これらの未分化 ES 細胞を trypsin/EDTA 処理で分散させ、10%血清含有 DMEM に懸濁し、細胞 500 個を一単位として hanging drop 法により 2 日間培養して胚様体を形成させた。これらの胚様体を 5 日間浮遊培養した後、再び trypsin/EDTA 処理で細胞を再分散させ、ゼラチン被覆基質上に播種して培養を継続し、三胚葉の分化マーカーの発現を定量 RT-PCR 法により解析した(図 40)。なお、Nkx2.5-GFP については、GFP 蛍光を心筋分化の指標としてフローサイトメーターによる解析を行ったが、Nkx2.5 制御下の GFP 蛍光が非常に弱く、心筋分化の指標としては適当ではないと判断している。

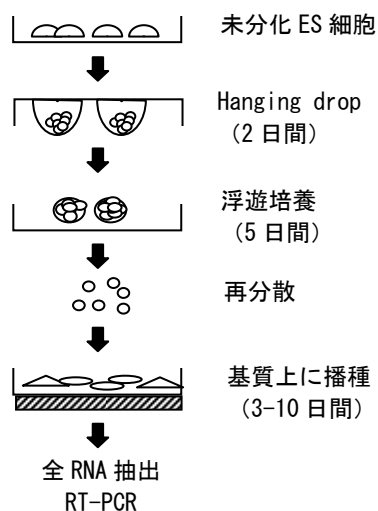


図 40: 胚様体を介したES細胞の分化誘導系

未分化ES細胞は feeder-free、10% Knockout Serum Replacement (Invitrogen)および 1%血清含有 DMEM、LIF、ハイグロマイシン存在下で維持した。胚様体の形成以後は 10%血清含有 DMEM で培養を行った。

定量 RT-PCR による解析から、ht7 と Nkx2.5-GFP とともに、5 日間浮遊培養した胚様体では Oct3/4 の発現が顕著に低下し、初期内胚葉分化マーカーである Gata4 の発現が上昇していることが示された。さらに、胚様体を再分散させてゼラチン被覆基質上で培養した細胞では、初期外胚葉マーカーである Fgf5、中胚葉マーカーである Brachyury の発現がそれぞれ上昇することが確認された(図41)。これらの結果から、いずれのES細胞においても、胚様体形成による自律的な分化を介して、三胚葉それぞれの系譜への初期分化が誘導されることが確認された。

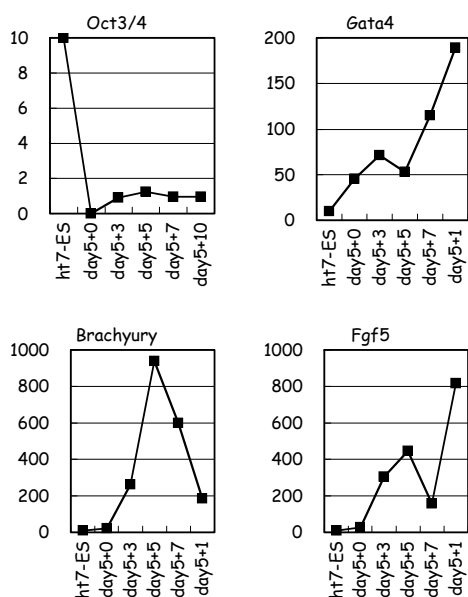


図 41: 胚様体を再分散させたES細胞における分化マーカーの発現挙動 定量 RT-PCR による分化マーカーの発現。グラフは ht7 の結果で、未分化ES細胞(ht7-ES)、胚様体浮遊培養 5 日目(d5+0)、胚様体を再分散した細胞をゼラチン被覆基質上に播種し、3、5、7、10 日目(d5+3, 5, 7, 10)の値を示す。定量 RT-PCR の値は Gapdh を標準として補正し、ht7-ES の値を 10 とした場合の相対値を縦軸に示した。

次に、培養基質の効果を解析するための予備的検討として、ht7 の胚様体を再分散した細胞を異なる細胞外マトリックス蛋白質被覆基質上に播種し、細胞接着、増殖、分化マーカーの発現について解析した。細胞外マトリックス蛋白質として、EHS 腫瘍由来ラミニン-111、組換えラミニン-511、

ヒトフィブロネクチン、ウシ IV 型コラーゲン、マトリゲルを用いた。これらの蛋白質はいずれも PBS 中で 20 mg/ml に希釈後、24 ウェル細胞培養プレート上に 4°C 一晚吸着させ、被覆基質とした。この基質上に胚様体を再分散させた細胞を低密度で播種し、3~10 日間培養した後、全 RNA を回収して各分化マーカーの発現を定量 RT-PCR により解析した。

全 RNA の収量を指標として、各基質上での細胞の増殖を比較したところ、ラミニン-111 および IV 型コラーゲン上に播種した細胞では全 RNA 収量の増加率が小さく、ラミニン-511、フィブロネクチン、マトリゲル上の細胞と比べて細胞増殖が遅延していることが示唆された(図42A)。また、代表的な分化マーカー遺伝子の継時的な発現を比較したところ、特に中胚葉マーカー Brachyury の発現パターンについて基質間で顕著な差異が観察された(図42B)。未分化 ES 細胞および胚様体では Brachyury の発現はほとんど認められないが、胚様体を再分散して IV 型コラーゲンやマトリゲル上に播種した場合には一過性に発現が上昇した。ラミニン-111、ラミニン-511、フィブロネクチン上では明瞭な発現上昇は確認されなかった。外胚葉マーカーである Fgf5 の発現は未分化 ES 細胞や胚様体では低く、胚様体を再分散して播種すると発現が若干上昇し、基質間でも発現パターンに差異が認められた(図42C)。内胚葉マーカーである Gata4 の発現は胚様体の浮遊培養の段階で誘導され、再分散して播種した細胞においては発現が維持もしくは緩やかに増加した。検討した範囲では基質間の Gata4 発現の明瞭な差異は見出されなかった(図42D)。以上の結果から、胚様体を介する誘導系が三胚葉への選択的分化誘導の評価系として利用可能であることを示された。

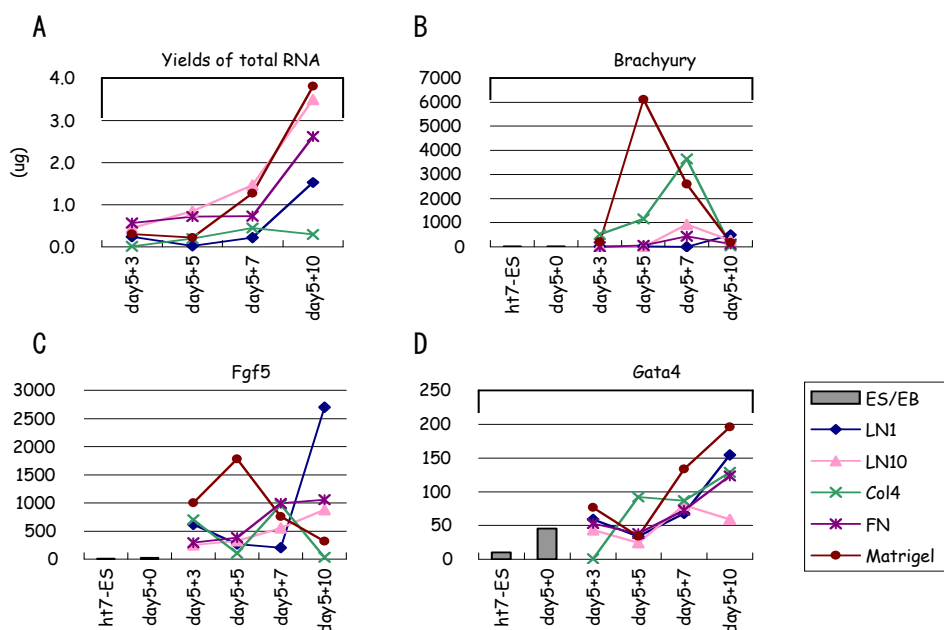


図 42: 各種基質上に播種した ES 細胞の全 RNA 量および分化マーカーの発現 A) ht7 の胚様体を浮遊培養後に再分散させ、各種被覆基質上に播種して継時的に全 RNA を抽出し、RNA 収量 (μg) を示した。B-D) 定量 RT-PCR により各種分化マーカーの発現を継時的に解析した。定量 RT-PCR の値は Gapdh を標準として補正し、未分化 ES 細胞 (ht7-ES) の値を 10 とした場合の相対値を縦軸に示した。

②人工基底膜による心筋分化誘導(大阪大学)

(ア)マウスES細胞を用いた条件検討: 平成 19 年度以降は、胚葉体を用いた心筋分化誘導における基底膜蛋白質の効果について検討を行った。ES細胞からの心筋分化誘導法としては、noggin で前処理したES細胞を浮遊培養する方法(Yuasa et al, Nature Biotech, 23, 607, 2005)を改変して用いた(図43)。LIF 存在化で noggin 処理した細胞を解離し、低密度で浮遊培養して胚葉体を形成させると、高い効率で心筋細胞の分化が誘導されることを確認した。

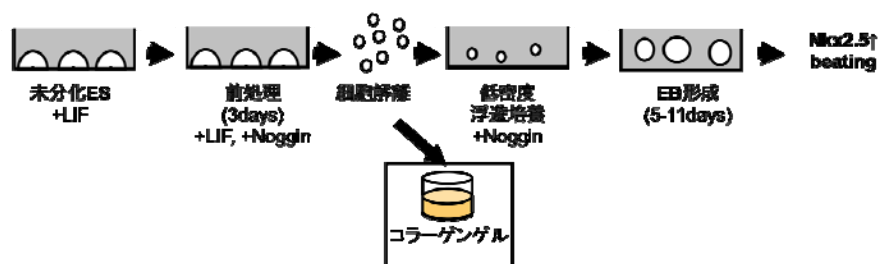


図 43: Noggin 処理による心筋分化誘導法 LIF 存在化でマウスES細胞を 3 日間 noggin 処理し、低密度での浮遊培養により胚葉体を形成させると、高効率で拍動細胞が出現し、Nkx2.5 など心筋分化マーカー遺伝子の発現上昇が確認された。心筋分化における細胞外マトリックスの影響を検討するため、浮遊培養の際にコラーゲンゲルを用いた方法、浮遊培養中への細胞外マトリックス蛋白質の添加を検討した。

次に心筋分化初期における細胞外マトリックスの分化誘導効果を検討するため、浮遊培養と基質上で培養した細胞で心筋分化効率の比較を行った。基質としては I 型コラーゲンゲル、および新たに開発した I 型コラーゲン/IV 型コラーゲン混成ゲルを用いた。noggin で前処理した細胞を I 型コラーゲンゲル上で培養したところ、心筋分化マーカー遺伝子の発現上昇は見られなかった。また、細胞をゲル内に包埋して培養した場合には、I 型コラーゲンゲルでは細胞が増殖せず、I 型/IV 型混成ゲルでは細胞は増殖したが心筋への分化は見られなかった。これらの結果から、少なくとも心筋分化の初期段階では基質への接着が抑制的な効果をもつ可能性が示唆された。

そこで、細胞が基質に接着することによる影響を排した状態での細胞外マトリックスからのシグナルの効果を検討するため、浮遊培養の培地中に各種細胞外マトリックス蛋白を添加して分化誘導を行なった。上記実験と同様に noggin 処理した細胞を用い、浮遊培養の培地中に、心臓形成初期の基底膜で発現が見られるラミニン-111、-411、-511、およびマトリゲルを添加して 11 日間培養後の心筋分化マーカー遺伝子の発現レベルを定量した。その結果、いずれの蛋白質を添加した場合でもマーカー遺伝子の発現の上昇は見られず、むしろ心筋分化には抑制的な影響があることが示唆された(図44)。

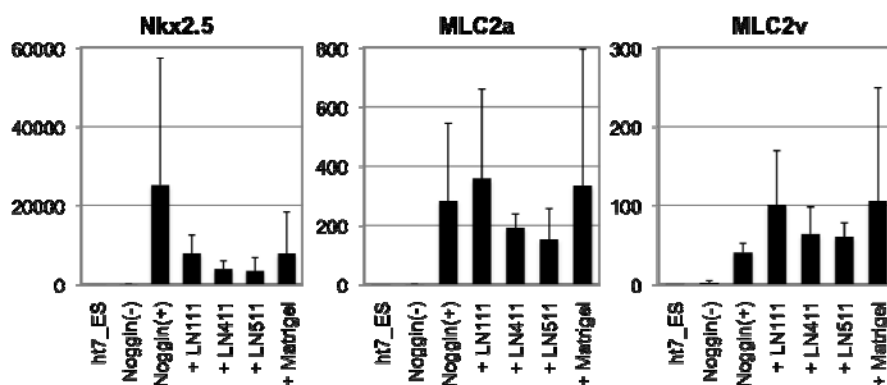


図 44: 心筋分化誘導で培地中に添加した細胞外マトリックスの影響 noggin 処理を行ったマウスES細胞を低密度で浮遊培養すると心筋分化マーカー遺伝子(Nkx2.5、MLC2a、MLC2v)の発現上昇が確認された(Noggin (-)、Noggin (+))。さらに浮遊培養の培地にラミニン、マトリゲルを添加した場合、Nkx2.5 の発現は抑制され、MLC2a、MLC2v についても有意な促進効果は認められなかった。遺伝子発現量は定量 RT-PCR により評価し、未分化ES細胞(ht7_ES)を1とした相対値で示した。

(イ)ヒト ES 細胞を用いた条件検討: 心筋細胞周囲の基底膜の発現プロファイルの解析(2.2.5.1の項を参照)から、心筋細胞は発生がすすむにしたがって細胞周囲にラミニン-211 を主体とする基底膜を形成することが判明している。このことから、心筋細胞の分化後期において、ラミニン-211 が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。この可能性を検討するため、幹細胞創薬研究所と共同して、ヒトES細胞由来心筋細胞の分化後期におけるラミニン-211 の影響について検討した。ヒトES細胞を END-2 細胞と共培養することで心筋細胞が誘導され(初期誘導)、さらに長期培養すると成熟型的心筋細胞へと分化がすすむ。初期誘導後の心筋コロニーを接着培養と浮遊培養に分け、それぞれ未添加、PBS 添加、ラミニン-211 添加で2週間培養を行い、分化マーカー遺伝子の発現を調べた。しかし検討した範囲では、ラミニン-211 添加による心筋成熟分化マーカー発現の促進は見られなかった。

③人工基底膜による肝細胞・膵臓細胞への分化誘導(大阪大学)

熊本大学と共同して、ヒトES細胞の肝臓前駆細胞への分化誘導における人工基底膜の有用性を検討した。あらかじめ M15 細胞との共培養により内胚葉に選択的に分化誘導したヒトES細胞を様々な分子組成の人工基底膜上に播種し、6日間培養すると、 α フェトプロテインが高発現する組み合わせが確認された。また、同様に、M15 細胞との共培養により内胚葉に分化誘導したマウスES細胞を様々な分子組成の人工基底膜上に播種し、2週間培養すると、膵臓分化マーカーが高発現する組み合わせがあることがわかった。これらの結果は、分子組成をカスタマイズした人工基底膜が特定の細胞系譜への選択的分化誘導に有効であることを示している。

④人工基底膜の分化誘導活性評価(大阪大学および日本皮革研究所)

(ア)マウスES細胞を用いた条件検討(大阪大学): 本研究で開発した I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルを基材とする人工基底膜の有用性を評価するため、マウスES細胞を組成の異なるコラーゲンゲル上で LIF 非存在下で培養し、その形態と分化マーカー遺伝子の発現を比較した。IV 型コラーゲン・ラミニンを含む人工基底膜上に播種したES細胞は、ゲル上に接着・増殖して小型のコロニーを多数形成し、I 型コラーゲンゲルとはコロニー形態が大きく異なっていた(図45)。分化マーカー遺伝子の発現を確認したところ、いずれのゲル上でも未分化マーカーOct-3/4 の発現は低下し、細胞が分化したことが示唆された。また、I 型コラーゲンゲル上では中胚葉マーカー遺伝子である Flk1 の発現が誘導されるのに対し、人工基底膜上では Flk1 の誘導が比較的強く抑えられることが示された。一方、初期外胚葉(エピプラスト)のマーカー遺伝子である Fgf5 の発現は人工基底膜上で I 型コラーゲン単独ゲルよりも効果的に誘導されることを見いだされた。これらの結果から、IV 型コラーゲンとラミニンからなる人工基底膜は I 型コラーゲンとは明らかに異なる生理活性を持ち、中胚葉系への分化を抑制してエピプラスト分化を促進あるいは安定化すると考えられる。

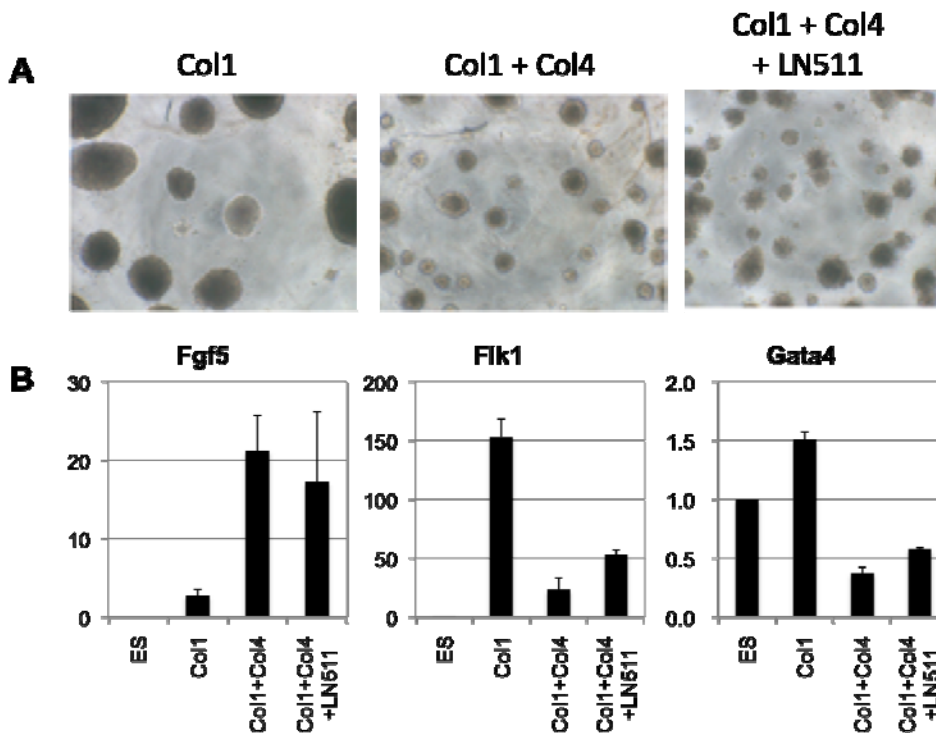


図 45: 人工基底膜上で培養した ES 細胞の挙動はコラーゲンゲルとは異なる マウスES細胞を LIF 非存在化で I 型コラーゲンゲル、I 型/IV 型コラーゲン混成ゲル、さらにラミニン-511 を添加した人工基底膜上で 5 日間培養した。(A)細胞コロニーの形態はゲル間で顕著な違いが見られた。(B)遺伝子発現パターンも、I 型コラーゲンゲルと I 型/IV 型混成ゲル、人工基底膜上では顕著な違いがみられた。遺伝子発現レベルは定量 RT-PCR によって評価し、未分化ES細胞(ES)を 1 とした相対値を示した。

(イ)ヒトケラチノサイトを用いた条件検討(日本皮革研究所): 細胞の分化形質維持における人工基底膜の有用性を評価するため、ヒト皮膚ケラチノサイト(HFKs)を用いた検討をあわせて行った。

HFKs は I 型コラーゲンゲルと IV 型コラーゲンゲル上で培養した場合に異なる挙動を示すことが知られており、その増殖、分化にはラミニンからのシグナルが関わっていると考えられている。そこで、ラミニン 511 を含む人工基底膜上で培養した HFKs の生存、増殖、分化を従来の I 型コラーゲンゲルと比較した。しかし、人工基底膜上の HFKs は I 型コラーゲンゲル上の細胞と同じような生存、増殖パターンを示し、いずれのゲル上においても分化抑制が観察された。

⑤組換えラミニンを利用したヒトES細胞フィーダーフリー培養基材の開発(大阪大学)

ヒトES細胞のフィーダーフリー培養基材としての組換えラミニンの有用性を京都大学と共同して検討した(2.2.6 を参照)。α鎖の組成が異なる 5 種類の組換えラミニンアイソフォームを被覆した培養基質上でヒトES細胞を培養したところ、ラミニン-332 および -511 を被覆した基質上では、未分化性を維持されたままヒトES細胞が経代培養可能であることがわかった。ラミニン-332 および -511 はどちらもインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ と強く結合することが知られている。ヒトES細胞が発現しているインテグリンを定量 PCR で解析したところ、 $\alpha 6 \beta 1$ がヒト ES 細胞で強く発現していることが確認された(図46)。また、ヒトES細胞が産生するラミニンを同様に解析した結果、ヒトES細胞はラミニン-511/-521 を主に発現していた(図47)。これらの結果は、ヒトES細胞が発現するインテグリン受容体に対して高親和性のラミニンアイソフォーム(ラミニン-332 および-511)が培養基材として有効であること、そしてこれらのラミニンアイソフォームがヒト ES 細胞のフィーダーフリー培養基材として有用であることを示している。

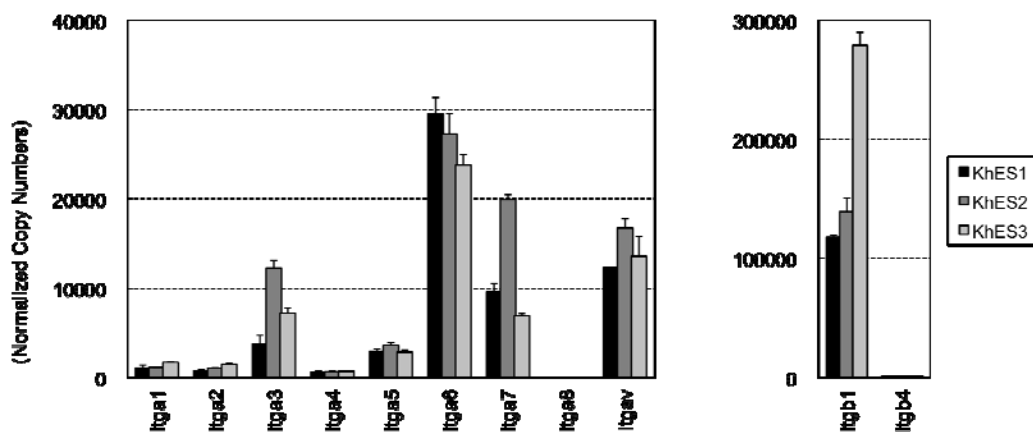


図 46: ヒト ES 細胞におけるインテグリンの発現パターン 京都大学で使用しているヒト ES細胞 KhES1, KhES2, KhES3 それぞれについて、インテグリン α サブユニット 9 種類 (左)と β サブユニット 2 種類(右)の mRNA 発現量を、定量 RT-PCR により測定した。既知濃度のヒトインテグリン cDNA を鋳型として検量線を作成し、コピー数を算出した。ヒト ES 細胞はインテグリン $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 αv および $\beta 1$ を主に発現していることが示された。

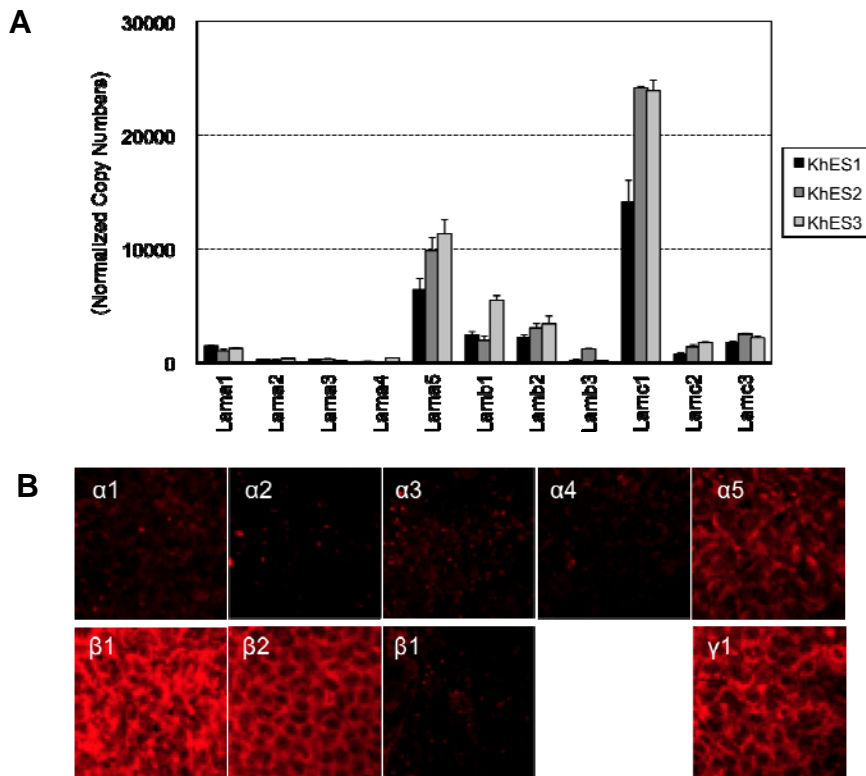


図 47: ヒトES細胞におけるラミニンの発現パターン 京都大学で使用しているヒトES細胞 KhES1, KhES2, KhES3 それぞれについて、ラミニンサブユニット 11 種類の mRNA 発現量を、定量 RT-PCR により測定した(A)。既知濃度のヒトラミニン cDNA を鋳型として検量線を作成し、コピー数を算出した。また、ヒトラミニンのサブユニット特異抗体を用いた蛍光抗体染色により、ヒト ES 細胞コロニー中のラミニン蛋白質発現を可視化した(B)。いずれも、ヒト ES 細胞ではラミニン $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ が主に発現し、ラミニン-511、-521 として存在することが示された。

ヒトES細胞のフィーダーフリー培養基材としてのラミニン-332 および -511 の有用性を踏まえ、その活性部位の組換えフラグメント(E8 フラグメント)が全長ラミニンと同様に有効であるかどうかを引き続き京都大学と共同で解析した。E8 フラグメントは全長ラミニンとほぼ同等のインテグリン結合活性を保持していることは確認済みである。現在、その解析が進行中であるが、全長ラミニンと同等以上の未分化性維持活性を保持していることが確認されている。なお、組換えラミニンフラグメントを用いるヒトES細胞フィーダーフリー培養基材について 2009 年度に特許申請を行った。

(4) 目標の達成度と意義

4年計画の初年度にあたる平成 18 年度は、マウス ES 細胞を利用して、人工基底膜による三胚葉への選択分化誘導制御の評価系を立ち上げることを目標とした。上記のように、2種類のマウス ES細胞(ht7 および Nkx2.5-GFP)を用い、胚様体を介した分化誘導系を立ち上げ、この実験系が三胚葉への分化誘導の評価系として利用可能であることを確認した。また、再現性の確認が今後必要であるが、被覆基質に違いによって、三胚葉への分化誘導に違いが出るが示された。これらの成果は、当初の目標を十分に達成しているものと判断される。

平成 19 年度～平成 21 年度は、2.2.5.2 で調製した基底膜蛋白質を組み合わせた人工基底膜上でマウスES細胞を培養し、特に心筋および内胚葉(肝臓)への分化誘導に焦点を絞り、研究開発を進めた。マウスES細胞を用いた心筋分化誘導の検討では基底膜蛋白質の添加方法や添加時期などの工夫を行い、ヒトES細胞の心筋分化に関しては幹細胞創薬研究所グループとの共同研究で成熟分化への影響を検討した。心筋分化においては、未だ人工基底膜の有用性を示す結果は得られていないが、熊本大学と共同で進めている肝臓および膵臓への分化誘導系では基底膜蛋白質の組み合わせが重要であるという結果を得ている。これらの結果は、細胞ごとに分子組成をカスタマイズした人工基底膜がヒトES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導する上で有用であることを示しており、本研究の当初の目標は達成できたと判断される。これに加えて、京都大学との共同研究により、ヒトES細胞のフィーダーフリー培養にラミニン-332 およびラミニン-511 が有効であることを明らかにした。ヒトES細胞を再生医療に利用するためには、フィーダーフリーかつゼノフリーの条件下でヒトES細胞を培養する必要がある。組換えラミニンを培養基材とするヒトES細胞のフィーダーフリー・ゼノフリー培養法の目処がたったことの意義は極めて大きい。

2. 2. 5 擬似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

ここから非公開

ここまで非公開

2. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学
共同実施:環境研究所
大阪大学
日本皮革研究所

(1)事業目的と背景

ヒトを含む霊長類ES 細胞では通常支持となるフィーダー細胞を用いて維持される。しかしこのような支持細胞を完全に除去することは難しく、創薬スクリーニングに必要なモデル細胞への分化誘導を遅延あるいは阻害している可能性もある。現在、支持細胞を用いないヒトES 細胞の未分化維持培養としては、マトリゲルとよばれるものが一般的に用いられている。しかしながら、マトリゲルはマウスEHS 腫瘍から抽出・精製される構成成分であり、これを用いた培養系では、先に述べた

様な創薬スクリーニングの問題点以外にも異種動物細胞や異種生物由来成分、腫瘍由来成分に由来する成分の混入が懸念される他、再生医療への臨床応用としての適用範囲は非常に限られている。またマトリゲルの構成成分と同質の成分を大量に分泌できるヒト由来の代替物は存在しない。このようにヒトES細胞の未分化維持に適した簡素な細胞外基質の組み合わせは今のところ同定できていない。

これまでにヒトES細胞における細胞外基質の検討についてはXu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK; Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells; Nat Biotechnol. 2001 Oct;19(10):971-4. などいくつかの論文で、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどで調べられているものの、ヒトES細胞の未分化維持に十分効果があるものは未だ同定されていないのが現状である。マトリゲルと同等以上の、ヒトES細胞に最適な細胞外基質が未だ発見できていない理由として、市販の細胞外基質でその効果を調べるといって一方での検討しかなされていないとことが大きいと思われる。今回のプロジェクトにおいて、細胞外基質のエキスパートである大阪大学、日本皮革研究所、国立環境研究所が新たに加わったことで、京都大学でのヒトES細胞での評価をフィードバックし、細胞外基質のさらなる改良、開発を進めることが可能になり、今まで見出すことができなかったヒトES細胞の未分化維持が可能な人工基底膜あるいは疑似マトリックスの開発を達成することが期待できる。

またマウスES細胞では細胞外基質を用い特定のES細胞へと分化誘導していくシステムもよく使われており、同様なシステムをヒトES細胞においても確立していくことで、創薬スクリーニングへの分化誘導を効率よく行うことが期待できる。このように細胞外基質を用いた効率の良いヒトES細胞の未分化維持、あるいは分化誘導に関する技術開発を達成できれば従来の分化誘導よりも簡便に行うことが期待できる。またこのような細胞外基質成分あるいはそれをプレコートした培養ディッシュを商品として販売が可能であり、かつこれらは継続的に使われる消耗品となりうることから、将来的な実業化への展開も十分に期待できる。

また効率の良いヒトES細胞の未分化維持、あるいは分化誘導に関する技術開発を達成できれば従来の分化誘導よりも簡便に行うことが期待できる。またこのような細胞外基質成分あるいはそれをプレコートした培養ディッシュを商品として販売が可能であり、かつこれらは継続的に使われる消耗品となりうることから、将来的な実業化への展開も十分に期待できる。

(2)事業内容と目標

本プロジェクト全体の流れとして、まず大阪大学・日本皮革研究所で開発された人工基底膜、国立環境研究所で開発された疑似マトリックスを、京都大学(あるいは特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所)で評価を行い、ES細胞の未分化維持あるいは分化誘導制御に適したものを開発していく。この際、人工基底膜及び疑似マトリックスを開発するサイドでも、マウスES細胞などを用いた自らの評価系を持ち、よりヒトES細胞で適した改良されたものをこちらで評価を進める方が、効率的である。「細胞外環境制御」は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくことを踏まえ、中間目標としては実際にいくつかの人工基底膜や疑似マトリックスを用いて検討を行い、評価系の確立を目指す。また最終目標としては効果のある

ヒトES 細胞の未分化維持、特定方向への分化誘導系の確立を目指す。またヒトES細胞とよく似た性質を持つことが知られているヒトiPS細胞においても検討を進めたいと考えている。

(3) 研究成果

事業内容と目標で述べたように、細胞外環境制御自体は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくことを踏まえ、評価系の開発を進め、それを確立することに成功した。

具体的には国立環境研究所に供与を受けた疑似マトリックスを用いて、カニクイザルES細胞での未分化維持に関する有効性の評価の検討を行った。評価系としては、(1)ES 細胞の接着能、(2) ES 細胞の増殖能、(3)ES 細胞未分化維持能、(4)長期培養における(1)~(3)の評価を行い、またこれらの検討項目が十分であることを見出した。最終的には長期培養において、多分化能が低下していないのか、また染色体が正常であるかなど詳細な検討が必要になってくるが予想される。

今回評価を行った疑似マトリックスでも興味深い結果がでており、さらなる改良を行うことで、ヒトES 細胞の未分化維持に適した基質の開発が期待できる。上で述べたように今後はカニクイザルES 細胞での評価については疑似マトリックスを開発する国立環境研究所で行い、京都大学ではヒトES 細胞で評価を進めることとした。さらに、この確立した評価系を用い、大阪大学から供与を受けた人工基底膜を用いてヒトES 細胞での評価を進めた。

ヒトES 細胞はマウス胎仔繊維芽細胞上で、あるいはその馴化培地を用いて基底膜成分マトリゲル上で恒常的に培養される。これらの支持基質は多種の基底膜成分を含み、ヒトES 細胞の未分化維持に不適な物を含む可能性、あるいは逆にヒトES 細胞から創薬基盤研究に用いるモデル細胞作出に必要な分化誘導を抑制している問題がある。そこで、我々はマトリゲルの主成分であるラミニンに着目し、人工的に作製した組換え基底膜がヒトES 細胞の培養に適用できるかを検討課題とした。またこのように人工的に作成した組換え基底膜を用いることで、異種の成分の除外が可能になり、ヒトES 細胞の医療応用への加速も期待できる。

ラミニンは α 、 β 、 γ から成る三量体で、その組合せから現在までに 15 種類のアイソフォームの存在が知られている。細胞毎にアイソフォームの発現パターンや効果が異なるため、対象の細胞に適したアイソフォームを選別する必要がある。これまでヒトES 細胞培養時の細胞外環境について調べた報告例がないことから、ヒトES 細胞が産生しているラミニンアイソフォームを特定するため、初めに基底膜タンパク質の解析方法の確立に努めた。今期では基底膜成分の構成比が反映される染色前処理の検討を重点的に行った。アセトン、パラフォルムアルデヒド、そして透過処理の有無の組合せを検討した結果、パラフォルムアルデヒド固定および透過処理を行うと染色時の蛍光バックグラウンドが高くなる傾向があり、特異的シグナルの検出が困難であった。一方、アセトン固定を施した場合は、バックグラウンドが軽減されることが判明し、抗体間の差が明瞭に検出された。また透過処理を施さずアセトン固定を行うことで、マウス胎仔繊維芽細胞に対する非特異的染色が抑えられた。従って、アセトン固定かつ透過無処理の前処理操作が、ヒトES 細胞培養下の細胞外基質を解析するのに最良であることが判明した。

次に、確立した評価系を用い、大阪大学蛋白質研究所により作製されたラミニンサブユニットを認識する抗体で免疫染色を行い、ヒトES 細胞上におけるラミニンサブユニットの発現を検出した。

結果として、 α 鎖においては $\alpha 5$ のみが陽性であり、 β 鎖においては $\beta 1$ と $\beta 2$ 、 γ 鎖においては $\gamma 1$ が陽性であった。従って、この組合せから得られるラミニン-511/521 が、ヒト ES 細胞が特異的に産生するアイソフォームであることが判明した。今後はこの解析結果を元にし、組換えタンパク質を用いてヒト ES 細胞を培養することが課題である。

antibody species	ECM	staining intensity
human	laminin $\alpha 1$	+/-
	laminin $\alpha 2$	-
	laminin $\alpha 3$	-
	laminin $\alpha 4$	-
	laminin $\alpha 5$	+
	laminin $\beta 1$	+++
	laminin $\beta 2$	+++
	laminin $\beta 3$	-
	laminin $\gamma 1$	+++
	mouse	laminin $\alpha 1$
	laminin $\alpha 2$	-
	laminin $\alpha 3$	-
	laminin $\alpha 4$	-
	laminin $\alpha 5$	-
	laminin $\beta 1$	-
	laminin $\beta 2$	-
	laminin $\beta 3$	-
	laminin $\gamma 1$	++
human/mouse	fibronectin	+
human/mouse	collagen	+/-
human/mouse	perlecan	-

表 免疫染色法によるヒト ES 細胞培養が産生する細胞外基質の検出

ヒト ES 細胞は通常、マウス胎仔繊維芽細胞上で、あるいはその馴化培地を用いてマウス EHS 腫瘍由来基底膜成分マトリゲル上で未分化維持培養される。これまでに約 9 種類のヒト ES 細胞用完全合成培地の作製報告例があるが、そのほぼ全てにおいて培養の支持基質にマトリゲルを用いている。マトリゲルの組成にはまだ不明なものもあり、ヒト ES 細胞からモデル細胞の作成に阻害的な影響を与えている可能性もある。またヒト ES 細胞からのヒト ES 細胞の医療応用等への有効利用には、異種由来成分であるそれら支持基質の使用が弊害となると考えられるため、分子構成が明確なヒト由来成分である代替物の開発が望まれている。そこで本開発項目においては、マトリゲルの主要成分であり細胞接着に大きく関与しているラミニンに着目し、人工的に作製した組換えヒト型ラミニンがヒト ES 細胞の未分化維持培養に適しているかを評価した。

そこで本年度は、1) ラミニンの細胞表面受容体であるインテグリンアイソフォームのヒト ES 細胞における発現パターンを特定し、2) 得られた結果を基に選別した組換えヒト型ラミニン上で長期培養を行い、ヒト ES 細胞の未分化維持状態を確認する、2 段階評価を行った。

1) インテグリンを構成する $\alpha \cdot \beta$ 鎖それぞれの発現量を、インテグリンサブユニットを包含するプラスミドベクターを用いて定量 PCR 操作により絶対定量を行ったところ、ヒト ES 細胞はラミニン結合型に分類されるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を主に発現していることが判明した。ラミニン結合型インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ は、同じラミニンでも特に、ラミニン-511/521, ラミニン-332, ラミニン-111 のアイソフォームに強い親和性を持つことが明らかにされている。これらの成果・情報を基に、次に、候補となる組換えヒト型ラミニンアイソフォーム上で実際にヒト ES 細胞を培養し、その適応性を評価した。

2) rhLM アイソフォームを培養器にコーティングし、MEF 馴化培地を用いてヒト ES 細胞の接着効率と増殖速度を測定した結果、KhES-1・KhES-3 の両細胞共に rhLM-332 に対して非常に強い接着を示し、rhLM-511, rhLM-111 上においても良い接着を示した。一方、対照群に用いた rhLM-411, rhLM-211 にはほぼ接着を示さなかった(図1)。接着を示した rhLM アイソフォーム上で長期

培養を行い、細胞の状態を表面抗原解析・RT-PCR 解析で評価した結果、ヒト ES 細胞は未分化状態を維持していることが判明した(図2および図3)。また胚葉体を作製後に RT-PCR 解析を行い、分化マーカーの発現を調べたところ、いずれの rhLM アイソフォームを用いた場合においても分化マーカーの上昇が確認可能であったことから、多分化能の維持においても問題ないことが判明した。以上より、組換えヒト型ラミニンアイソフォームである rhLM-332, rhLM-511, rhLM-111 はヒト ES 細胞の未分化維持培養に非常に適した支持基質であり、これら人工基底膜成分を用いることで、将来的に完全な xeno-free culture が可能であることが、本年度の成果から示唆された。

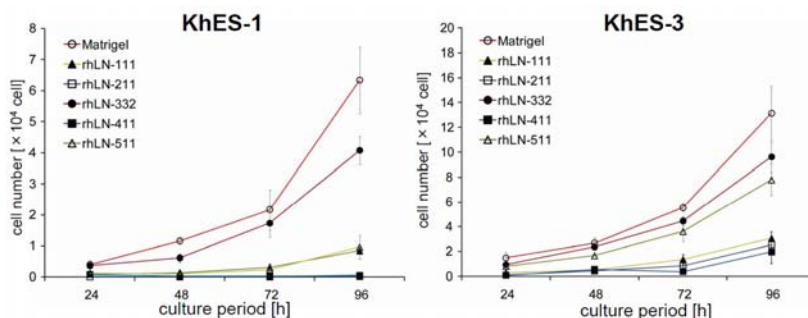


図 1. 組換えラミニン上におけるヒト ES 細胞の増殖曲線

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

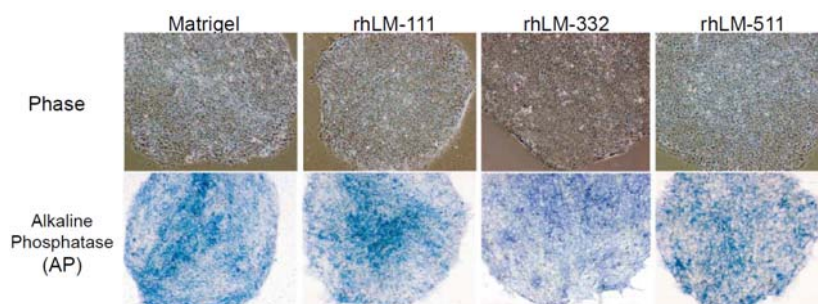


図 2. 組換えヒト型ラミニン上におけるヒト ES 細胞の長期培養時の細胞形態

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

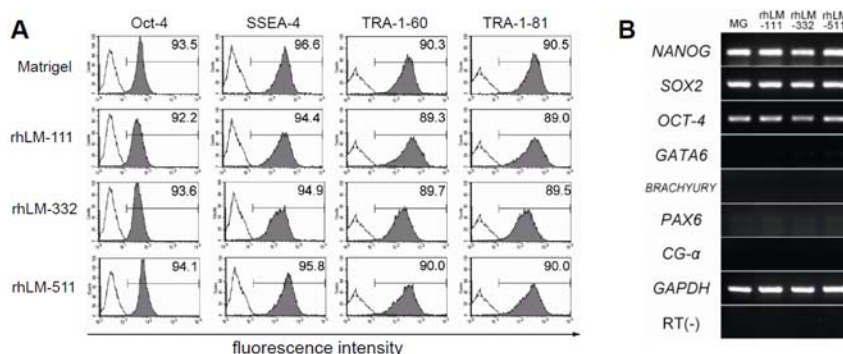


図 3. 長期培養時における未分化状態の評価。A)表面抗原解析、B)RT-PCR 解析

BBRC 375, 27-32(2008)から引用

(4) 目標の達成度と意義

上の項目で何度か述べたように、「細胞外環境制御」自体は平成18年度から開始されたこと、またその成果をもとに本プロジェクトが進められていくことを踏まえ、今回、未分化維持に対する評価系の確立を達成できたことは、計画通りと判断する。評価系の確立ができたことで、今後大阪大学・日本皮革研究所から供与を受ける人工基底膜、あるいは国立環境研究所から供与を受ける疑似マトリックスの評価を効率よく検討することが可能になり、本プロジェクトを進める上でその意義は十分値する。

中間評価以後、レコンビナントのラミニンを用いてヒトES細胞の支持細胞の培養が可能となることを見出した。従来はマトリゲルと呼ばれる物を用いることが多かったがこれは構成成分に不明なものが多く、ヒトES細胞の未分化維持、あるいは効率的なモデル細胞作出に不利益になる可能性があったことから、大きな前進といえる。また本研究成果は例えばヒトES細胞の臨床使用へもそのまま適用できる可能性が高いことから、非常に意義が高いとなる。

2. 3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

2. 3. 1 研究用モデル細胞の構築

2. 3. 1. 1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

神経変性疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、プリオン病などがあり、痴呆、ふるえ、運動失調、筋力低下、行動異常などのそれぞれ神経変性疾患特有の症状を示す。これらの神経変性疾患の根本的な治療法は今のところ見いだされていない。そのため、神経変性疾患の予防および根本的な治療法の開発は急務である。さらに日本社会は今後世界に類を見ない高齢社会を迎えようとしており、平成18年版高齢社会白書によると2050年には65歳以上の高齢者が3人に1人の割合になると予想されている。そのため、アルツハイマー病などのような高齢になるにつれ発症率が上昇する疾患は、社会的にも非常に大きな問題になってきている。

これまでにも神経変性疾患のモデル動物を用いて治療薬や予防薬が開発されてきている。しかし、マウスやラットなどのモデル動物に対し有効とされた薬が、治験を始めると全くヒトの疾患に対し効果が見られない場合が多い。この種間差の影響は、創薬研究での開発時間や費用において無視することの出来ない状況にある。

本プロジェクトでは神経変性疾患モデル細胞の創製にあたり、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮

性側索硬化症(ALS)、ポリグルタミン病の一疾患であるハンチントン病(HD)の三つの神経変性疾患のモデル細胞を創製することを目指し研究を進めている。

アルツハイマー病(AD)では、60歳以上10万人に対し2000人を超える有病率で、その率は年齢と共に上昇する。神経変性疾患の中でも高い有病率をもつ疾患の一つである。アルツハイマー病の大部分は孤発性であるが、アミロイドβ蛋白質(Aβ)の脳内の蓄積など家族性アルツハイマー病と共通する病態も多く、変異を導入したモデル細胞の解析はアルツハイマー病全体の有望な治療戦略の構築、例えば、細胞死などの分子細胞機構を解析や細胞死軽減治療のための方策などに役立つものと考えられる。

ハンチントン病(HD)に代表されるポリグルタミン病は、CAG繰り返し配列の異常延長を原因とする遺伝性の神経変性疾患であり、延長ポリグルタミン鎖を有する変異蛋白質が核内に蓄積し、種々の蛋白質を巻き込んで凝集体を形成することにより、細胞機能維持に必要な蛋白質の機能を阻害し、神経細胞障害に至ることが明らかとされつつある。原因遺伝子にCAG繰り返し配列を挿入することにより、変異蛋白質の核内での凝集をモデル細胞で誘導することが可能である。そのようなモデル細胞を用いることで、変異蛋白質の凝集の結果もたらされる病態の解析や凝集の抑制法が開発され、ポリグルタミン病の治療法開発に大きく貢献するものと考えられる。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞が傷害され、多くは2～5年のうちに呼吸不全で死亡する神経変性疾患である。ALSの90%以上は孤発性で原因不明であるが、家族性ALSの病理像は孤発性ALSと共通点も多く、家族性ALSの発症機序を明らかにすることは、孤発性ALSの原因解明のためにも重要である。家族性ALSの原因遺伝子の一つは常染色体優性遺伝で、Cu/Znスーパーオキシジスムターゼ1(SOD1)遺伝子に変異を認め、家族性ALSの10～20%程度を占める。このような変異を導入したモデル細胞を用いて運動神経細胞変性のメカニズムを解明することは、原因不明の難病克服のための重要な取り組みであると考えられる。

(2)事業内容と目標

最初に構築するモデル細胞として、疾患原因遺伝子の恒常的な過剰発現により疾患が誘導される細胞を創製する。これまでにこのような戦略でいくつかの研究が行われてきていたが、多くの場合において腫瘍細胞株を用いている。神経系でない細胞株を用いているモデル系もあるが、神経疾患が疾患特異的な神経細胞に症状が現れることを考えると、モデル細胞としては決して良い系とはいえない。また、神経系細胞株を用いても、その後の治療薬の探索や原因解明などへの利用を考えあわせると、細胞が腫瘍化していることを無視することは出来ない。さらに、組織からのプライマリー培養では、モデル細胞を構築できるほどの細胞数を得ること及び遺伝子改変を行うことは困難である。これらのことを考慮すると、増幅可能で正常な細胞であるES細胞がモデル細胞の元になる細胞として適していると考えられる。最近ではヒトiPS細胞も利用可能になって来ている。この考えは世界的にもコンセンサスと成りつつあり、ES細胞やiPS細胞を用いたモデル細胞の論文も発表されてきている。また、ヒトゲノムの塩基配列が既に明らかになっているが、人種によって塩基配列に違いが存在することも明らかになっている。そのことは、海外で樹立された欧米人型のゲノムを持つヒトES細胞やiPS細胞から構築されたモデル細胞を用いて確認された治療薬の効果や安全性が、場合によっては日本人やアジア人に適さない可能性があること

を示している。よって、京都大学で樹立された日本人の遺伝的バックグラウンドをもつヒト ES 細胞を用いることは、本プロジェクトにおいて非常に重要である。

本プロジェクトの最終目標は、創薬研究に利用可能な神経変性疾患モデル細胞を構築することであるが、目標達成には、ヒト ES 細胞の加工技術開発とヒト ES 細胞の分化誘導制御技術の進捗状況に大いに依存している。つまり、神経変性疾患が特定の神経細胞タイプにだけ症状が現れることを鑑みると、モデルとしては、ES 細胞を特定の神経細胞へと分化させなければならない。また、疾患原因遺伝子の厳密な発現調節も必要になる可能性もある。これらの技術が順調に成果を上げていたため、それらの成果を取り入れ、疾患モデル細胞の構築を目指した。

(3) 研究成果

① ランダム遺伝子導入法によって得られた疾患遺伝子発現 ES 細胞によるモデル細胞構築

①-ア. 疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株

疾患原因遺伝子が既に明らかになっている神経変性疾患、家族性 AD、家族性 ALS、そして単一遺伝子病である HD のモデル細胞を構築するために、まず、それぞれの疾患原因遺伝子として、AD ではプレセニリン1(PS1)、ALS ではスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1)、そして、HD ではハンチンチン(HTT)を選定し、家族性 AD の変異 PS1 遺伝子(2 種)、家族性 ALS の変異 SOD1 遺伝子(3 種)、そして様々な長さで過剰延長した CAG リピートを持った HTT 遺伝子(エクソン 1 領域)を含むベクターを京都大学、東京大学の共同研究者から入手した。

ES 細胞で遺伝子を発現させるためのプロモーターとして、頻繁に使用されている CMV プロモーターを当初用いたところ、導入されたヒト SOD1 遺伝子の発現をサル ES 細胞で確認することができなかった。おそらくサイレンシングが起きたためと考えられたため、ウイルス由来のプロモーターよりはサイレンシングが起き難いと期待されるヒトのハウスキーピング遺伝子 EF1 α のプロモーターを用いることとし、その ES 細胞内での活性を確認した。EF1 α プロモーターをもったプラスミド(GFP の蛍光で活性確認可能)を ES 細胞に導入したところ、GFP の蛍光は CMV プロモーター制御下のそれより明るく、CMV プロモーター活性より強いことが確認された。

PS1 および SOD1 の正常遺伝子と家族性変異遺伝子を EF1 α プロモーターで制御する発現ベクターへ組み入れ発現プラスミドを構築した。SOD1 野生型と変異遺伝子(SOD1-G93A)、また、PS1 野生型と変異遺伝子(PS1-P117L)発現ベクターをヒト ES 細胞(KhES-1)に導入し、各 50~100 の薬剤耐性安定株を得た。その後、未分化細胞での外来遺伝子の発現レベルを RT-PCR によって確認し、クローンの選択をおこなった。ランダム遺伝子導入法では、多くの場合、細胞の状態が変化、例えば神経細胞へ分化すると外来遺伝子の不活性化、つまりサイレンシングが観察される。そこで、未分化細胞での外来遺伝子の発現レベルが高いクローンを、「分化誘導制御技術」の成果であるノギンによる分化誘導を行い、分化細胞での外来遺伝子の発現レベルを確認した。その結果、多くの細胞株でサイレンシングが確認されたが、未分化細胞でのレベルよりは発現が低下していたが、比較的高発現な株もあり、それらを今後の研究に用いた。

①-イ. AD モデル細胞

変異型遺伝子 PS1-P117L を分化細胞でも高レベルで発現している ES 細胞を得ることが出来た。しかし、野生型と変異型 PS1 の発現レベルに差があり、今後の研究にはあまり向いていなかった。

そのため、「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果を取り入れた加工細胞を用いることとした(後述)。しかし、それらの細胞が得られる前に、実際に変異型 PS1 発現神経細胞が、AD の表現型を示すか否かを調べた。アミロイド仮説によると、AD 患者の脳内では、アミノ酸 42 残基数のアミロイド β 42(A β 42)の量が増え、アミノ酸 40 残基数のアミロイド β 40(A β 40)との比率が上昇し、神経細胞毒性を有する A β の凝集体が形成されやすくなることが提唱されている。具体的には、 γ -secretase の活性中心である PS1 に疾患由来型の変異が起こると、A β の切り出しに異常が起こり A β 42 の産生比率が増加する。これらのことから疾患由来型変異 PS1 を発現した AD モデル細胞の必須な特徴として、さらに期待される表現型として、A β 42 の産生比率が増加することが挙げられる。そこで、培養液上清に含まれるアミロイド β の濃度を測定した。その結果、親株である KhES-1、野生型 PS1 発現 ES 細胞から分化誘導させた神経細胞の培養上清では、A β 42 の存在比は 10%程度であったが、変異型 PS1-P117L が発現している ES 細胞由来の神経細胞の培養上清では、約 20~25%にまで上昇していた。このことは、変異型 PS1 遺伝子の発現によって、AD 表現型が再現できることを示しており、「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果を取り入れた加工細胞を用いた場合でも同様な結果を得ることが出来るであろう一つの証拠となった。

①ーウ. ALS モデル細胞

樹立した SOD1 発現ヒト ES 細胞株の表現型解析を行うために、既に確立した脊髄運動神経細胞分化誘導法を適用した。その結果、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞は、未分化 ES 細胞から神経幹細胞までの分化状態では、親株である KhES-1 細胞および野生型 SOD1 発現ヒト ES 細胞と変化は見られなかった。しかし、運動神経細胞への分化誘導系に持って行ったところ、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞での HB9 陽性運動神経細胞割合は、野生型 SOD1 発現運動神経細胞に比べて、劇的に低くなっていた(Fig.1)。更に、変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞での TUNEL 陽性死細胞割合が野生型 SOD1 発現ヒト ES 細胞でのそれと比べると、有意に高くなっていることがわかった(Fig.1)。このことにより、運動神経細胞特異的細胞死が変異 SOD1 発現ヒト ES 細胞で起こっていることがわかった。

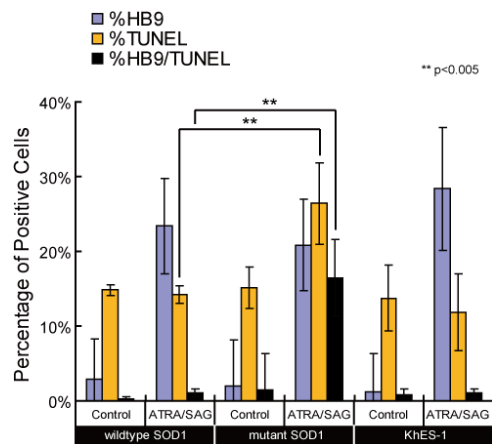


Fig.1 SOD1 発現神経細胞の細胞死の測定

また、変異 SOD1 発現運動神経細胞での疾患特異的マーカーであるユビキチンや SOD1 の凝集体を観察し、ALS モデル細胞としての特徴が示された。既に、マウス ES 細胞を用いた ALS モデルの報告では、変異 SOD1 発現アストロサイト培養上清の運動神経細胞死誘導活性が示されている。このことを、我々のモデル細胞で確認した。変異 SOD1 発現ヒト ES1 細胞由来アストロサ

イトの培養上清を、密度勾配遠心濃縮を行った運動神経細胞集団に添加したところ、高頻度な細胞死が観察された。これは、野生型 SOD1 発現運動神経細胞では認められなかったことから、変異 SOD1 発現アストロサイトから分泌された細胞死活性であると考えられる。この活性は、炎症誘導物質である Prostaglandin で類似した作用が確認されており、アストロサイトからの炎症関連物質の可能性が考えられる。

②部位特異的遺伝子挿入法によって得られた疾患遺伝子発現 ES 細胞によるモデル細胞構築

②ーア. 第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株

「ヒト ES 細胞の加工技術開発」の成果によって、HPRT 遺伝子座へ任意の遺伝子カセットを挿入することが可能になった。この技術を使うことで、外来遺伝子のサイレンシングや挿入突然変異が起こる可能性を避けることができる。それによって、①ランダム遺伝子導入法では、薬剤耐性クローンを数多く取得、培養しなければならなかったが、開発された方法では HPRT 遺伝子座への遺伝子の挿入がほぼ確実なため、数クローンの薬剤耐性クローンを培養すれば良いことになり、時間的にも、コスト的にも効率を上げることが出来る。

このシステムを利用するため HPRT 遺伝子座挿入用発現ベクター(CAG プロモーター)を構築した。疾患遺伝子は、これまで同様に SOD1、PS1、そしてハンチンチン(HTT)であるが、SOD1 と PS1 では 3 種類の異なった変異型遺伝子を発現するベクターを構築した。HPRT 遺伝子座挿入用の親株に遺伝子を導入し、構築した全ての発現ベクターに関して、疾患原因遺伝子(野生型もしくは変異型)を安定に発現しているヒト ES 細胞株を作成し、これらを第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株とした。加えて、最近 ALS の原因遺伝子として同定された TDP43 を発現する ES 細胞株の作成を試みたが、変異型 TDP43 に毒性があるためか、野生型 TDP43 発現 ES 細胞株は樹立できたが、変異型 TDP43 発現 ES 細胞株は樹立出来なかった。

これらの疾患遺伝子安定発現 ES 細胞は、その未分化細胞のコロニー形態に違いは見られず、遺伝子発現解析を行ったところ、未分化維持に関与する OCT3/4 や NANOG の遺伝子の発現レベルに差は見られなかった。また、内在性の疾患遺伝子発現レベルも親株との間に差はなく、唯一、発現ベクター由来の外来遺伝子の発現に差が見られた。疾患遺伝子遺伝子の強制発現による未分化細胞への影響は、調べた限りではないと分かった。

②ーイ. 第二世代の AD モデル細胞

AD 原因遺伝子 PS1 が HPRT 遺伝子座で発現しているヒト ES 細胞(HPRT1-hESC-PS1)を用いて AD モデル構築を行なった。使用した PS1 遺伝子の種類は WT, P1117L, G378E, D385A の 4 種類である。WT は野生型、P1117L, G378E が家族性 AD 由来、D385 は PS1 非活性型である。PS1 遺伝子の挿入部位を確認するためにサザンブロットを行なった。解析したすべての細胞(4 種類の PS1 それぞれ 2 クローンずつ)で想定どおりの大きさのバンドが見られ、HPRT 遺伝子座への遺伝子導入が確認できた。HPRT1-hESC-PS1 は、通常のヒト ES 細胞と同様に継代培養が可能であり、未分化マーカーの発現に対する RT-PCR と免疫染色の結果から正常に未分化状態が維持されていることが確認された。さらに、これまでに開発してきたノギンによる神経細胞への分化誘導技術も適応でき、成熟した神経細胞への誘導が可能であった。そこで分化誘導後の神経細胞での PS1 発現量をウェスタンブロットのバンドより比較した。外来性、内在性のどちらも含んだ PS1 の発現

量は親株に対して、N 端断片では WT : 2.7, P117L : 3.4, G378E : 2.7, D385A : 0.7 倍、全長では WT : 2.4, P117L : 2.1, G378E : 2.8, D385A : 20.0 倍の増加が見られた。D385A の変異は PS1 を切断出来ない変異であることが報告されている。前述のようにランダムインテグレーション法で作製した細胞株では分化誘導後にサイレンシングを強く受けるクローンが現れ、PS1 の発現が極端に低下している株も出現したが、HPRT1-hESC-PS1 株では、分化誘導した 7 種類(WT;2 株, P117L;2 株, G378E;2 株, D385A;1 株)すべての細胞株で安定した外来遺伝子(PS1)の発現が見られた。このことから、本プロジェクトで作製した HPRT 遺伝子座へ遺伝子が挿入するシステムは、各種遺伝子を発現するヒト ES 細胞を神経細胞へ分化させた細胞でも有用であることがわかった。

さらに疾患由来型変異 PS1(P117L, G378E)発現株を用いて AD モデル細胞としての特性解析を行なった。前述したように、AD モデル細胞の必須な特徴として A β 42 の産生比率が増加することが挙げられる。そこで、変異 PS1 を発現した神経細胞の培養上清中にある A β の濃度測定を ELISA により行なった。それぞれの発現株での A β 42/ A β 40 比は以下の通りであった。親株を 1 として、WT : 1.0, P117L : 3.9, G378E : 2.6, D385A : 1.0(Fig.2)。

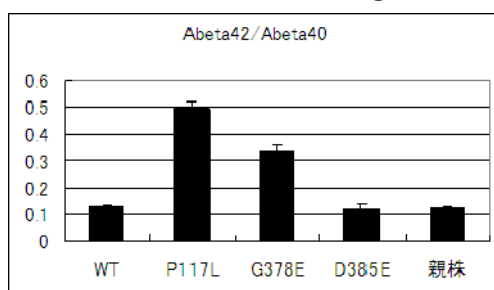


Fig.2 アミロイド β の測定

疾患由来の変異 PS1(P117L・G378E)を発現する株では、有意に A β 42 の産生比率が増加しており、アルツハイマー病としての特徴を再現していた。産生された A β 40 と A β 42 の総量は、親株を 1 として、WT : 0.82, P117L : 0.78, G378E : 1.10, D385A : 1.39 であり、PS1 の発現量は数倍の違いが見られたが、培養上清中の A β 総量には影響はなかった。また、培養上清中の A β 量は、 γ -secretase 阻害剤の DAPT の添加によって減少したことから、外来遺伝子由来の変異 PS1 を含む γ -secretase でも阻害剤に対し問題なく応答することが判明した。このことは、この AD モデル細胞を用い、 γ -secretase のインヒビターまたはモジュレーターをアルツハイマー病治療薬の候補分子としてスクリーニング出来る可能性を示唆している。

次に、アルツハイマー病は認知機能障害が認められ、それはシナプス活動の低下を伴っていることから、シナプス活動への影響を調べる目的で、自発的な活動電流の発生頻度の比較を行なった。疾患由来型変異 PS1 発現株では自発的な興奮性活動電流の発生頻度の減少が認められた。自発的な興奮性シナプス後電流頻度(sEPCsf) (/sec)は、親株 : 1.28, WT : 0.99, P117L : 0.45, G378E : 0.37(Fig.3)であったが、一方、自発的な抑制性シナプス後電流頻度(sIPCSf) (/sec)は、親株 : 0.33, WT : 0.33, P117L : 0.41, G378E : 0.68 であり、抑制性シナプス後電流頻度では大きな違いは見られなかった。

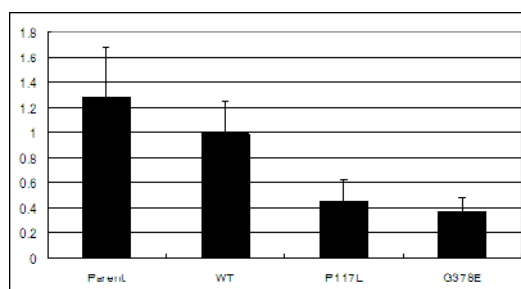


Fig.3 自発的な興奮性シナプス後電流の発生頻度

さらに、この発現頻度の減少にはシナプス関連蛋白質の変化が関与していると考えられるため、各種シナプス関連蛋白質の発現量の比較を行なった。野生型 PS1 発現株に対して疾患型変異 PS1 発現株では、ポストシナプスに存在する PSD95、AMPA(GLUR2/3)、GABAAR の発現量は P117L 発現株で AMPAR の発現が有意に増加していたが、他は同程度であった。それに対して、プレシナプスに存在する synaptophysin の発現量は G378E 発現株で有意に減少しており、P117L 発現株でも減少傾向が見られた。同様に免疫染色により synaptophysin 陽性ドットの数と比較した結果でも G378E 発現株で有意に減少が認められ P117L 発現株では減少傾向であった。synaptophysin はアルツハイマー病の機能障害において相関関係が示唆されており、得られた細胞株(G378E 発現株)は、その特徴を強く表していると考えられる。これらの特徴を持つ細胞は、アルツハイマー病における神経細胞機能の低下機構の解明に有用であると考えられる。

これまでのところ、他のアルツハイマー病の特徴である神経細胞死やリン酸化タウの蓄積は現れていないが、これらは疾患の後期に見られる現象であるため、長期培養等の条件検討によって、それらの表現型を認めることが可能になるかもしれない。

②ーウ HD モデル細胞

HTT 遺伝子(エクソン 1 領域)に GFP 遺伝子が融合した cDNA を、HPRT 遺伝子座挿入用発現ベクターに組み入れた。HTT に含まれるポリグルタミン残基数 25 を野生型タイプとして、97 を変異型とした。さらに、核移行シグナル、核排出シグナル、シグナルなしの各発現ベクターも構築した。変異型 HTT の発現は、細胞の種類によっては細胞死を招くことが知られているが、未分化ヒト ES 細胞に変異 HTT 強制発現させも細胞死が観察されないことは、ランダム遺伝子導入法によって得られた HTT 安定発現 ES 細胞によって確認されていた。HPRT 遺伝子座へ挿入された第二世代 HTT 安定発現細胞は、薬剤耐性および GFP 蛍光によって確認できた。

HD で影響を受けるのは線条体であり、線条体の主な神経細胞タイプは、中型有棘神経細胞である。そこで、得られた HTT 安定発現 ES 細胞を「ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発」の成果である中型有棘神経細胞へ分化誘導し、野生型 HTT 発現神経細胞と変異型 HTT 発現神経細胞で HD 疾患症状である細胞死に差が生じるか否かを観察した。WST-1 アッセイ、Live/Dead reduced biohazard viability/cytotoxicity kit(インビトロジェン)による細胞死を測定したが、親株由来の神経細胞、野生型 HTT 発現神経細胞、変異型 HTT 発現神経細胞、いずれにおいても差が見られなかった。最近、線条体特異的に細胞死が起こる原因として、線条体特異的に発現している分子 RASD2/RHES が同定された。我々が分化誘導した中型有棘神経細胞にも、RT-PCR によって RASD2/RHES が発現していることは確認できていた。そのため、変異型 HTT

を発現している細胞に細胞死が見られなかった原因としては、HTT 遺伝子のエクソン1部分だけを利用したためか、ES 由来の中型有棘神経細胞の成熟度が足りなかったためなのか、今段階では明らかではない。

(4) 目標の達成度と意義

ALS モデル細胞、AD モデル細胞の構築は順調に進んだ。特に AD モデル細胞では、ヒト ES 細胞の加工技術開発で得られた成果を、モデル構築に組み込んでいくことによってより良いモデル細胞が創製出来た。両モデル細胞とも、疾患に見られる表現型を再現することに成功している点は大きな成果である。また、ALS モデル細胞においても第二世代の疾患遺伝子安定発現 ES 細胞株は作成できているため、今回得られた ALS モデル細胞での結果を第二世代の細胞を用いても再現できると考えられる。今回、HD モデル細胞では、疾患の特徴である細胞死が見られなかったが、今回作成した HTT 発現 ES 細胞株を用いることで、HTT 遺伝子の発現を抑制もしくは蛋白質の分解に関与する分子等の探索に利用が出来る可能性はある。

作成したモデル細胞は、ヒト細胞由来で大量調製が可能な神経細胞としての特徴とあわせ、新たな治療薬スクリーニングにおける有用な材料となることが期待できる。また、AD モデル細胞では多電極システムを用いれば、多数の神経細胞が構成するネットワークの解析が可能であり、マルチウェルでの電気シグナルの取得を行えば、神経機能に対する治療薬スクリーニングへの利用も期待できる。

創製されたモデル細胞は、それぞれの神経変性疾患研究での創薬分野ばかりでなく、疾患発症機序解明などの基礎的研究でも大いに寄与することが出来ると考えられる。さらに、疾患遺伝子を変えれば他の神経変性疾患のモデル細胞も作成可能であり、他の組織や臓器の疾患も、原因遺伝子とその分化誘導系を組み合わせることで作成可能であるため、その利用価値は非常に高い。

2. 3. 1. 2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

(1) 事業目的と背景

血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)は、血管周皮細胞およびアストロサイトに周囲を覆われた脳毛細血管内皮細胞同士が緊密に結合した密着結合(tight junction)を主体とするバリア構造であり、体循環系と脳内との間の単純拡散による物質透過を制限する他、栄養物質、神経伝達物質、脳内不要代謝産物、薬物を含む生体異物の物質交換を能動的に制御する dynamic interface として機能している。この BBB を介する物質交換の機構は、中枢神経系に限定される特殊なものであり、薬物の有効性や安全性を評価する医薬品開発プロセスにおいては、その開発の運命を左右するといっても過言ではないほど大きく関与している。

創薬活動の現場において、中枢神経系医薬品の開発は、末梢組織をターゲットとする医薬品に比べて 20 倍以上難しいといわれる。何故ならば、中枢薬では BBB を介した中枢移行という高いハードルを余分にクリアしなければならないからである。多くの開発化合物は BBB のバリア機能

により脳内への移行を阻止されてしまったり、一旦脳内へ入ったものが BBB の生体異物排除機構によって脳外に汲み出されてしまい、開発を断念しなければならないケースが多く発生する。また逆に、末梢組織での薬効発揮を期待する医薬品の開発において、開発化合物がこの BBB を簡単に通過してしまい中枢毒性をもたらしてしまうことが問題となるケース等もある。

このように脳内の薬物動態試験は、創薬活動に不可欠なものであり、これまでは主に開発の後期の段階の動物個体レベルでの評価によって行われていた。勿論こうした *in vivo* 脳内薬物動態試験は、前臨床試験項目として今後もその重要性は変わるものではない。しかし、その一方で近年、開発の時間やコストを低減させるため、より早期段階で多くの候補化合物群から有望検体を絞り込もうとする動きが高まると、これを動物試験によって対応することは難しく、短時間に多数の薬物を効率よくスクリーニングできる *in vitro* 細胞評価系が強く求められるようになってきている。

BBB モデルの構築の試みは、これまでも、ウシ・ラット・マウスなど非ヒト動物の脳組織から調達される脳毛細血管内皮初代培養細胞や株化培養細胞(脳毛細血管内皮細胞株)等を用いた例が報告されており、それらの多くはアストロサイトや血管周皮細胞との共培養系として構築されている。しかし、脳毛細血管内皮細胞の初代培養を利用する場合には、分裂回数が有限であり頻回の細胞調製が必要となるといった制限に加え、脳毛細血管内皮細胞は脳全体の 0.1%程度しか存在せず調製が困難であるという量的な問題、さらに生体内から培養系への移行によって多くの BBB 機能が欠落してしまうという問題が生じていた。また、培養細胞株やその他脳毛細血管以外に由来する血管内皮細胞を代替利用した場合には、BBB 機能の獲得が難しかった。今のところ、実用に耐える十分な性能を有した *in vitro* BBB モデルは存在しないと思われる。

優れたヒト型 *in vitro* 血液脳関門(BBB)モデルは、医薬品開発において、特に中枢作用型薬の脳内移行性や中枢での副作用が問題となる薬物等を早期段階で予見可能にする創薬支援ツールとして有用であるばかりでなく、脳神経・血管系の機能発現・維持の理解を助ける基礎研究材として、その開発の意義は大きいと考えられる。

そこで本開発では、ヒト ES 細胞から BBB モデル構成細胞として、血管系細胞(血管前駆細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞)および神経系細胞(アストロサイト、神経系前駆細胞)を量産調製する技術を確認するとともに、ここで得られる各種細胞を利用して、生体機能に限りなく近い特性を有するヒト型 BBB モデルを創製することを目的とする。

(2)事業内容と目標

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

in vitro BBB モデルの構築に供する細胞として、ヒト ES 細胞から血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)を量産調製する技術を確認する。

中間目標(平成 19 年度末まで):

・ヒト ES 細胞から血管系細胞への分化誘導技術の確立

—BBB モデル構築に供する血管系細胞材として、ヒト ES 細胞から血管内皮細胞、血管周皮細胞を分化誘導する技術を検討し、血管系細胞の量産調製技術として確立する。

・ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術の確立

—BBB モデル構築に供する神経系細胞材として、ヒト ES 細胞からアストロサイトや神経系前駆細胞

胞を高効率に分化誘導する技術を検討し、神経系細胞の量産調製技術として確立する。

最終目標(平成 21 年度末まで):

・ヒト ES 細胞由来 BBB モデルの性能を評価・判断しながら、用いる細胞性状の最適化を図り、モデル構築に好適な細胞調製技術として確立する。

② in vitro BBB モデルの構築

ヒト ES 細胞から調製される各種 BBB 構成細胞をデバイス上に共培養することで、生体機能に限りなく近い特性を有する BBB モデルを in vitro 構築する。

中間目標(平成 19 年度末まで):

・従来モデルの試験的構築による性能把握と BBB 機能評価技法の取得

—非ヒト動物由来初代培養細胞等による従来モデルを試作し、その性能評価を通して、物質透過性をはじめとする BBB 特性の評価技法を取得する。

・BBB モデル構築形態に関する事前検討

—初代培養細胞やマウス・サル ES 細胞から調製した BBB 構成細胞等を用いて、モデル構築形態(共培養系)を予備検討し、最適な共培養形態についての情報を先行蓄積する。

最終目標(平成 21 年度末まで):

・ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞を用いたモデル構築

—ヒト ES 細胞の分化によって得られる血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)および神経系細胞(アストロサイト、神経系前駆細胞)を用いて BBB モデルを in vitro 構築する。

—BBB 特性の獲得に向けたモデル構築の最適化を図る。

—各種 BBB 特性を評価し、バックグラウンドデータとして蓄積する。

—完成したヒト ES 細胞由来モデルに化合物ライブラリーを適用し、BBB 透過/非透過物質、透過促進/抑制物質、BBB 形成促進/抑制物質などの評価を実行し、スクリーニングアッセイ系としての精度を検証する。

(3) 研究成果

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

①—ア:ヒト ES 細胞から神経系細胞の分化誘導技術の確立

当初の計画に従って、神経系細胞分化誘導法“Neural Stem Sphere(NSS)法”(「神経系細胞の製造方法」(WO2004-007700))を技術基盤とし、簡便性と量産性を有する BBB モデル構築用神経系細胞の調製法として国産ヒト ES 細胞に適用可能な系への改良検討を行った。

ヒト ES 細胞(KhES-2、KhES-3 株)のコロニー丸ごとをセルスクレーパーで回収し、これをグリア培養上清(神経細胞培養液 MB-X9501、住友ベークライト)で約 10 日間浮遊培養後、形成された凝集塊(NSS)を bFGF(20ng/mL)を添加した Neurobasal B27 培地を用いて、ポリ L リジン/ラミニンコート培養皿にて接着培養を行った。その結果、ディッシュ底面に接着した NSS 凝集塊の周辺部に一様形態の細胞の遊走増殖が観察された。この遊走増殖する細胞は神経幹細胞マーカー Nestin を発現しており、培養環境を変えることで神経細胞(β III tubulin 陽性)にもアストロサイト(GFAP 陽性)にも分化させることができることから“神経系前駆細胞“と呼べる分化段階の細胞性状であることが判定された。更に、この神経系前駆細胞集団(Nestin 陽性)は、0.05%トリプシンを

用いての継代が可能であり、数継代後には培養器中の殆ど(90%以上;残りの細胞は神経細胞に分化している)が Nestin 陽性細胞になること[高純度な神経系前駆細胞の調製と in vitro 増幅]、汎用の細胞保存液によって十分な生存率を確保しての凍結保存が可能であることが確認された。[神経系前駆細胞の凍結保存]

また、アストロサイトの調製については、上記の量産した神経前駆細胞集団を、組織培養ディッシュへの接着性の違いによる選別(アストロサイトは他の細胞と比較して接着性が強い)や、N2 添加物含有 D-MEM/F-12(1:1)培地で継代する操作により、神経細胞の混入が殆ど認められない状態でアストロサイト集団(GFAP 陽性)を選択的に調製する技術として確立した。[アストロサイトの選択的調製]

①-I: ヒト ES 細胞から血管系細胞の分化誘導技術の確立

ヒト ES 細胞からの血管系細胞の調製では、神経系細胞のように高い誘導率を確保した分化誘導技術を確立することは困難で現実的ではない。そこで、ヒト ES 細胞から血管前駆細胞や血管内皮前駆細胞を先ず分化誘導し、これをソーティング技術(磁気細胞分離装置 MACS や FACS)で分取・純化した後、再培養下で in vitro 増幅する様式で最終的に血管内皮細胞や血管周皮細胞を量産調製する技術の確立を目指した。

①-I a: 血管系細胞分化誘導法の初期検討

当初の計画に掲げたマウスストローマ細胞 OP9 株との共培養による分化誘導法(M. Sone et al., Circulation, 107:2085-2088, 2003、「霊長類動物胚性幹細胞から血管系細胞への分化方法」米国特許出願 20050191744、「霊長類動物胚性幹細胞からの血管内皮細胞の製造方法」特願 2004-184138))に加えて、6種類のサイトカイン含有培地を用いる手法(6種サイトカイン法; 国立国際医療センター開発技術)も導入し、ヒト ES 細胞(KhES-2、KhES-3 株)から血管系細胞の分化誘導を試みた。その結果、いずれの分化誘導手法でも血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性、PECAM 陽性)、血管周皮(平滑筋)細胞(α SMA 陽性)の誘導を確認することはできたが、分化誘導効率を FACS 解析により比較した結果では、血管内皮細胞の分化誘導効率は低レベルに留まった(OP9 共培養法; <約 1%、6種サイトカイン法; 約 2-5%)。加えて、この低い分化誘導効率に起因して、その後のソーティング操作での分離精度が悪く、血管前駆細胞(VEGFR-2 陽性)や血管内皮前駆細胞(VE-cadherin 陽性)の効率的な分離・純化に支障を来たことが判明した。

①-I b: 新規な血管系細胞分化誘導法の開発

ヒト ES 細胞から血管系細胞の分化誘導手法に関して更なる分化誘導効率の向上を図る目的で GSK-3 β 阻害剤 BIO を使用する新たな手法の検討を行った。本法は 1)GSK-3 β 阻害剤 BIO 処理と、それに続く 2)VEGF 含有培養液での培養を、段階的に施すことを特徴とするオリジナルな分化誘導法である。未分化状態のヒト ES 細胞を 5 μ M 濃度の BIO で 3 日間処理することによって先ず中/内胚葉分化への選択的分化を誘起し、これを VEGF 含有培養液で引き続き培養することで、分化誘導日数わずか 5 日間で約 20~25%の高誘導率で血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性)を誘導することに成功した。ここで誘導された血管内皮細胞は、VE-cadherin の他に、VEGF-R2, CD34, PECAM-1(CD31)などの内皮マーカーを共発現する“血管内皮前駆細胞”と定義づけられる単一の細胞集団であり、管腔形成能や LDL 取り込み能やなどの内皮細胞に特徴的な基本機能を有することを確認した。

血管系細胞分化誘導技術の普遍性と iPS 細胞への適用検討:新規開発した BIO を使用する血管系分化誘導法の普遍性を調べる目的で、ヒト KhES-1、KhES-2、KhES-3 の 3 株について血管内皮細胞の分化誘導効率と分化誘導タイムコースを比較した。その結果、いずれの株においても分化誘導開始後 5 日目に 15-20%の誘導率で血管内皮細胞(VE-cadherin 陽性)の出現が誘導で、本法の普遍性が確認された。更に、本技術のヒト iPS 細胞への適用の可否を検討した結果では、253G1 株、IMR90-1、IMR90-4 細胞株において、ヒト ES 細胞株と比較して誘導率は若干低減するものの、血管内皮前駆細胞(VE-cad 陽性/TRA-1-60 陰性/VEGFR-2 陽性)を誘導可能であることが確認できた。

①-イc: 血管内皮細胞の分離・純化と量産化

分化誘導したヒト ES 細胞全細胞集団から血管内皮(前駆)細胞を分離・純化する目的で、VE-cadherin の発現を指標として、ソーティング技術で分離・純化することを試みた。その結果、GSK-3 β 阻害剤 BIO を使用する分化誘導法で誘導した血管内皮(前駆)細胞(VE-cadherin 陽性、誘導率 \sim 20%)は、磁気細胞分離装置 MACS による簡便かつ迅速な操作によって 95%以上の純度を確保した状態で分離することができた。また、こうして MACS 操作により分離・純化した細胞は十分なバイアビリティと増殖性を示し、標準的なトリプシン処理による継代操作によって、約1ヶ月の期間で 100 倍以上の細胞数に in vitro 増幅できることも確認した。こうして量産した血管内皮(前駆)細胞は、分離・増幅後の間でも内皮マーカー発現(VE-cadherin $^{+}$ 、VEGF-R2 $^{+}$ 、CD34 $^{+}$ 、PECAM-1 $^{+}$)や内皮機能(LDL 取り込み能、管腔形成能)を安定に維持しており、通例の凍結保存手法によって大きく生存率を低下させない状態で保存可能であった。

更に、血管周皮(平滑筋)細胞についても、同じ BIO を使用する新規分化誘導法を用いて誘導される血管前駆細胞(VEGFR-2 陽性)を一旦 MACS で分離した後、10%FBS 含有 DMEM 培養液を使用した再培養下で血管周皮(平滑筋)細胞(α SMC 陽性、calponin 陽性)へと分化させ、継代によって増幅・量産化を行うことにも成功している。

以上のように血管系細胞の調製に関しても、BIO を使用する分化誘導技術を新規開発することで、これまで他に報告されていない水準の高効率での血管内皮細胞や血管周皮(平滑筋)細胞を分化誘導し、BBB モデル構築に供する十分な血管系細胞の量産調製体制を確立することができた。

② in vitro 血液脳関門(BBB)モデルの構築

②-ア: 従来モデルの試験的構築による性能把握と BBB 機能評価技法の取得

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞の調製体制が整うまでの間、動物由来脳毛細血管内皮細胞を使用する従来モデルを試験構築し、その基本性能を把握すると同時に、当プロセスで使用する技術手法を後のヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築化検討にも活用できる BBB 機能評価技法として取得することを行なった。具体的には、多孔性の膜フィルターを貼った培養インサート(ミリポア社製 Millicell、グライナー社製 Thincert 等)の内側にウシ脳毛細血管内皮細胞(初代培養)を単層培養し、外側にアストロサイト(ラット胎児脳由来、ヒト正常脳由来)を共培養する様式モデルを構築し、tight junction 形成(ZO-1, claudin-5 等タンパク質の発現解析)、経内皮電気抵抗(trans endothelial electric resistance; TEER)、物質透過性(受動拡散能)といった静的バリア性能を評価した。また脳毛細血管内皮細胞マーカー酵素といわれる Alkaline phosphatase

(ALP)や γ -Glutamyl transpeptidase (γ GTP)の活性についてもその確認手法を習得した。

このように BBB 特性に関する各種評価技法を習得することで、後に実施するヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築化検討を円滑に推進することができた。また、従来モデルの性能限界(生体内 BBB 機能との乖離)を把握することができ、本開発で目指すモデルの性能基準を明確にすることができた。

②ーイ: BBB モデル構築化の事前検討

ヒト ES 細胞から BBB 構成細胞の調製ができるようになるまでの間、ウシ脳微小血管内皮細胞(初代培養細胞)を用いて、Mesh-fib 培養インサート(国立環境研究所技術)の活用による近接共培養構築形態や、マウス ES 細胞由来神経系前駆細胞の共培養効果に関する検討を行った。Mesh-fib 培養インサート(途上、コラーゲン線維の架橋程度を強化することや、培養インサートの規格を 6well から 12well スケールへ変更を実施)上に単層培養したウシ脳微小血管内皮細胞に対してマウス ES 細胞由来神経系前駆細胞を共培養し、形成された内皮細胞シートの電気抵抗値や FITC 標識デキストランを披験物質とした物質透過性の評価を行った。その結果、約 40%の強度上昇効果が検出され、モデル構築における ES 細胞由来神経系前駆細胞利用の有効性が確認できた。更に、この ES 細胞由来神経系前駆細胞の共培養によるバリア形成の促進効果は、血管内皮細胞単層に対する相互作用の様式(近接培養された場合とそうでない場合)に関わらず同程度であったことから、神経系前駆細胞集団(アストロサイトや神経細胞への分化過程を伴う)から分泌される液性因子を介した作用に因るものであることが示唆された。

②ーウ: ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築

生体における脳毛細血管の新生と BBB 形成過程には血管内皮前駆細胞が関与しており、高度な BBB 機能の発現・維持は、脳毛細血管の特徴的な構造と連関し、血管内皮細胞にアストロサイトや血管周皮細胞が相互作用することが重要と考えられている。そこで本開発では、「BBB モデル構築用細胞の調製技術(開発目標①)」で確立した技術を用いて量産調製したヒト ES 細胞由来の血管系細胞(血管内皮細胞、血管周皮細胞)や神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)を組み合わせることで BBB モデル化の検討を行った。すなわち、多孔性フィルターが貼られた培養インサートの内側(フィルター上面)にヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞を単層培養し、これにヒト ES 細胞由来の血管周皮(平滑筋)細胞や神経系細胞(アストロサイトや神経前駆細胞)を共培養・相互作用させるスタイル(共培養形態)を基本構想とした。構築スタイル自体は一見従来モデルと類似しているが、以前から試みられてきた従来型モデル構築戦略とは異なる性格の新しいアプローチといえる。従来モデルがもともと生体内で BBB 機能を発現していた成熟細胞を成体外に再構成するというやり方をしてきたのに対して、ここでは ES 細胞由来血管内皮細胞(ES 細胞の分化誘導によって得られる機能細胞は、総じて成熟分化を遂げていない分化幼若な性状である)をはじめとする各種 BBB 構成細胞がモデル構築下の共培養・相互作用によってはじめて分化を促され、最終的に BBB 機能の獲得へ向かわせることを狙っている。

BBB 機能の本態は 1)血管内皮細胞間に形成されたタイトジャンクションによる強固なバリア機構と、その上に備わる 2)各種トランスポーターによる選択性と方向性を有した物質輸送機能といわれている。そのため、検討するモデルの性能判断は、タイトジャンクション(TJ)形成や物質透過性(細胞間受動拡散性)をみる静的バリア性能評価に重点を置き、これに各種トランスポーターの

発現・機能を加えた評価を指標として行なった。

②ーウ a: ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞の性状改変

本開発で調製した量産直後の血管内皮細胞は、VE-cadherin の他に、VEGF-R2, CD34, PECAM-1(CD31)などを共発現する“血管内皮前駆細胞”と呼べる比較的未熟な分化段階の細胞であり、単独培養による内皮シート形成では TJ 形成(ZO-1 や Ckudin-5 発現)を示さずモデル構築に適さないものであることが明らかとなった。そこで、この細胞を TJ 形成能を有する細胞へと性状改変を行うことを検討した。その結果、同じ ES 細胞由来の神経前駆細胞や血管平滑筋細胞(α SMA 陽性、calponin 陽性)の培養上清(馴化培地)で約1週間程度培養することで TJ 形成能を有する血管内皮細胞に変化させることができた。

更に、トランスポーター発現量も上昇させる性状改変を目指した検討からは、血管平滑筋細胞馴化培地(StemPro34 SFM 培養液)で一旦、性状改変した後に、引き続き EGM-2 培養液で調製した ES 細胞由来神経前駆細胞の培養上清(馴化培地)で培養することにより、排出系トランスポーター群(MDR1、BCRP、MRP1)の発現レベルを増大させることができ、TJ タンパク質(Claudin-5 や ZO-1)の発現レベルも高い細胞集団を調製できることを明らかにした。血管内皮細胞分化における神経系細胞の関与は BBB 環境に特徴的なものであり、脳微小血管内皮細胞(Claudin-5 の高発現により強固な静的バリア形成能を有する)への分化方向づけを示唆する結果として興味深い知見の一つと考えられた。

②ーウ b: ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル構築

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞を用いたモデル化検討では、上述のモデル基軸として用いる血管内皮細胞の性状(分化段階)以外にも、共培養する細胞の性状やその組み合わせ位置、共培養のタイミング、あるいは培養インサート等については多角的かつ試行錯誤的な検討が必要となる。本開発でも相当の試行錯誤的検討を実施したが、ここでは最終的に優れた成績を示した成果についてのみ以下に記載する。

血管平滑筋細胞の馴化培地(StemPro34 SFM 系)と神経前駆細胞の馴化培地(EGM-2 系)を用いて段階的に性状改変したヒト ES 細胞由来血管内皮細胞を市販の培養インサート(Thincert, 孔径 $0.4 \mu\text{m}$)上に播種することで単層シートを形成させ、その静的バリア性能(経内皮電気抵抗 TEER、物質透過性、タイトジャンクションタンパク質発現)を評価した。その結果、培養インサート上でも内皮細胞間境界部に Claudin-5 を集積強発現し、良好なタイトジャンクション形成を示すことが認められた。また、2 種類の蛍光物質 FITC-Dextran(平均分子量 4kDa)および Fluorescein-Na(分子量 376Da)を用いて物質透過性(単純拡散・細胞間物質通過抑制性)を解析した結果では、それぞれ $P[\text{FD4}] = 0.26\text{--}0.42 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$, $P[\text{NaF}] = 0.83 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ という透過係数値が計測された。得られた上記の数値は、いずれもヒト脳毛細血管内皮細胞(初代培養)により形成される単層シートの数値(文献値)を大幅に上回るものであり、ヒト細胞由来の血管内皮細胞単層ではこれまでに報告されていないレベルの静的バリア強度を実現できることを示す成績である。また従来モデルの中で優位とされているウシ脳微小血管内皮細胞 BBMVEC を用いたモデルに匹敵する性能であった。

ヒト ES 細胞由来血管平滑筋細胞および神経系前駆細胞の共培養効果:ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞が形成する単層シートの静的バリア強度は、同じ ES 細胞由来の血管平滑筋細胞や神

経系前駆細胞と共培養することで更に増強されることも確認された。

②-ウ c: 人工基底構造体(sBM)培養インサート器材の活用

市販の培養インサート及び Mesh s-fib(コラーゲン基質 fib)培養インサートに基底膜構造体 sBM を形成させた各種器材 [rLN10/LI90 sBM、rLN10/TMNK sBM、rLN10/LI90 Mesh-sBM、BBMVEC only Mesh-sBM、BBMVEC/RPF Mesh-sBM 等]の提供を国立環境研究所から受け、これらの活用についても検討した。各培養インサート上に形成させた内皮単層において、蛍光標識デキストランを用いた物質透過性の評価を行った結果、sBM 器材上では良好な内皮シートを形成できることが確認された。特にヒト型ラミニン 10 を高発現する hLN10 をヒト肝星細胞株 LI90 と共培養することで作製した sBM(hLN10/LI90)上で形成されるシートが最も良好な成績を示した。また、代表的トランスポーター10 種類について遺伝子発現を RT-PCR 比較解析した結果からは、排出系トランスポーター(MDR1、MRP、BCRP など)の発現レベルに差異が生じやすい傾向が認められ、BCRP については血管平滑筋細胞や神経前駆細胞の共培養による発現量上昇効果が確認された。しかし、P 糖タンパク質 MDR1 の発現については、むしろヒト ES 細胞由来血管内皮細胞単独の方が高発現しており、好適なモデル化に向けて活用の優位性を判断することが難しい結果となった。

(4) 目標の達成度と意義

① BBB モデル構築用細胞の調製技術の確立

BBB モデル構築に供する細胞として、血管系細胞(血管内皮細胞と血管周皮細胞)と神経系細胞(アストロサイト、神経細胞)をヒト ES 細胞から高効率で分化誘導する技術、及びこれら各種細胞を量産調製する技術を確立した。これにより細胞調製が律速となることなく、BBB モデル開発を円滑に推進することが可能となった。

神経系細胞:当初の計画通り、技術基盤 NSS 法を国産ヒト ES 細胞株に適応した系に改良することによって、神経系前駆細胞(Nestin 陽性)を高効率に分化誘導し、これを増幅、凍結保存する技術を確立できた。更に、この神経系前駆細胞から神経細胞(β -tubulin 陽性)やアストロサイト(GFAP 陽性)の選択的な量産調製を実現させた。

血管系細胞:当初計画していた OP9 共培養法や6種サイトカイン含有培地を用いる手法による血管系細胞の分化誘導効率は、いずれも 5%以下の低値に留まる結果となったが、これを克服するオリジナルな手法として、GSK-3 β 阻害剤 BIO を用いる新規な高効率分化誘導法を開発することができた意義は大きい。本法における血管内皮細胞の分化誘導成績(誘導率;20%以上、誘導日数;5日間)は、他に報告されている多くの手法と比較しても、血管内皮細胞を高効率に誘導できる分化誘導技術として注目に値する。また本開発で量産化が実現した血管内皮前駆細胞は、BBB モデル構築の基軸材としてのみならず、血管の発生分化機構を解明するための基礎的研究や細胞移植治療や血管組織工学等の応用研究ツールとして広く活用できる。よって本開発成果は、ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞の効率的な量産調達手段としても、その有用性は高いと考えられる。

② in vitro 血液脳関門(BBB)モデルの構築

ヒト ES 細胞由来 BBB 構成細胞によるモデル開発は、平成 21 年度末までに完遂させることは

できなかった。BBB 特性の獲得を更に追及し、生体を反映した BBB 特性を獲得したモデルとして完成させるためには、今後も更なる継続検討が必要となる。

しかしながら、ヒト ES 細胞由来血管内皮(前駆)細胞を基軸として、これに同ヒト ES 細胞から調製した血管平滑筋細胞や神経系細胞(神経系前駆細胞、アストロサイトなど)を組合せるこれまでの検討において、ヒト ES 細胞から調製された分化幼若な血管内皮(前駆)細胞が血管周皮(平滑筋)細胞や神経前駆細胞の培養上清を用いることによって BBB 特異的タイトジャンクションタンパク質 Claudin-5 を高発現する血管内皮細胞へ性状改変できたという結果や、この性状改変した血管内皮細胞を培養インサート上に播種することで形成される内皮単層においてウシ脳毛細血管内皮細胞等を用いて構築される従来モデルに匹敵する静的バリア性能(細胞間物質透過性)の獲得に成功した結果は、後の開発を進展させる上で重要な知見といえる。未だ不明な点が多い BBB 機能の発現・維持を理解する点で、また量産性や安定性など実用化面で従来モデルが抱えていた問題を克服できるヒト型モデル実現の可能性を示唆する点で、本開発成果の意義は極めて大きいものと考えている。

2. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

(1)事業目的と背景

ハイスループットスクリーニング(HTS)は創薬では必須の技術であるが、ES 細胞を用いた HTS 系は現段階で実用化されている公知の報告はない。特に霊長類の ES 細胞を用いる場合には、細胞の取り扱いには細心の注意を払う必要があり、既存の機器がそのまま使用できないという問題点がある。HTS には細胞だけでなく周辺機器の整備も必須であるが、機器の検討には時間を要するために細胞技術と並んで開発を進める必要がある。本プロジェクトにおいて、創薬現場での実用上不可欠な ES 細胞の播種や培地交換を自動化することを実現し、分化制御の化合物をスクリーニングすること、分化後細胞を用いて化合物をスクリーニングできる技術を確立することを目的に HTS 技術の開発を行っている。

(2)事業内容と目標

HTS には用いる生物試料の他に最適な基材や分注機器、測定機器が必要である。細胞は、本プロジェクトのテーマから供与される細胞を用いることを前提に、その他の HTS 機器や消耗品の開発・検討を行う。

霊長類の ES 細胞の継代の際には細胞はコロニーで行う。そのため、細胞懸濁液をムラなくプレートに分注するためにはコロニーの沈降をおさえるために攪拌しながら、コロニーに物理的な損傷を与えずらく液切れのよい分注精度のよいノズルを開発する必要がある。攪拌も細胞に与える傷害を最小限にすることが求められる。このような、霊長類 ES 細胞に適合した機器は現段階で市販されていないために市販機器をベースに開発する。また、蛍光や発光といった read-out の検出については、現在、創薬現場で使われている HTS 用の検出器で十分な能力を有していると考えている。これらの機器を導入し、心筋分化を促す化合物の 95 スクリーニングおよび、分化

神経細胞を用いた HTS 系の構築および運用を計画している。ES 細胞に適用可能な HTS 条件の設定、およびより効率的な創薬モデル細胞を作出可能な活性を有する化合物を見出すことが目標である。

(3) 研究成果

ハイコンテンツ・ハイスループットスクリーニング(HTS)技術を用いた心筋分化誘導促進物質の探索

ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞は、薬剤誘発性 QT 延長試験の創薬スクリーニングや、心臓疾患への細胞移植技術に重要であるが、それらの試験に使用できる安定した細胞系は今のところ十分に確立されておらず、心筋分化をさらに誘導・促進する因子の探索が望まれている。そこで、我々は ES 細胞の心筋分化を促進する化合物を探索するための HTS 系を構築した(図 1)。特異的心筋マーカーである α -MHC のプロモータで駆動される GFP 遺伝子を導入したサル ES 細胞を、HTS 用マルチプレート上で心筋分化培養し、化合物ライブラリー中の約 1 万化合物を培養プレートに添加した。化合物を添加後約1週間培養し、GFP 陽性拍動心筋細胞が増加している化合物を我々の HTS 系により検出したところ、心筋分化促進効果がみられる低分子化合物が 2 個(化合物 X、化合物 Y)見出された(図2)。各化合物については濃度依存性が認められ、その適正濃度で約2~5倍の GFP 陽性コロニー数の増加、拍動コロニー数の約 10 倍前後の増加がみられた(図3)。また化合物 X については HERG チャネルなど各心筋チャネル遺伝子の発現量の増加が見られ、それと同時に HERG 電流の増加や活動電位の短縮など、心筋細胞の電気生理学的成熟も確認できた(図4)。化合物 X については現在、化合物用途特許を申請済みであり、化合物 Y についても物質特許を申請予定である。さらに、ヒト ES 細胞株や iPS 細胞株でも顕著な心筋分化促進効果が確認されており、この HTS 系はヒト ES/iPS 細胞にも適用することが可能である。

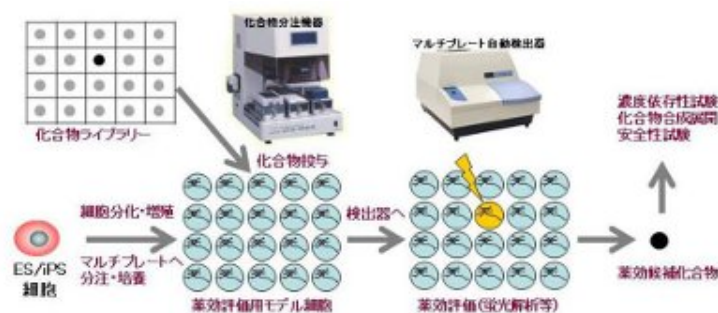


図1. ES/iPS細胞を用いたハイスループットスクリーニング(HTS)系

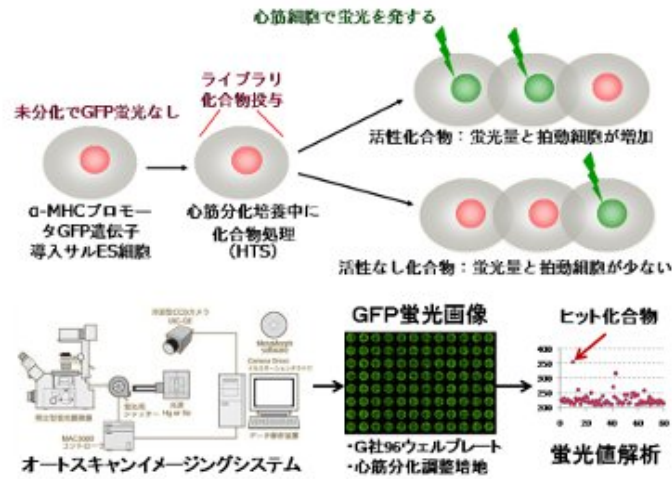


図2. 心筋分化誘導促進物質探索HTS

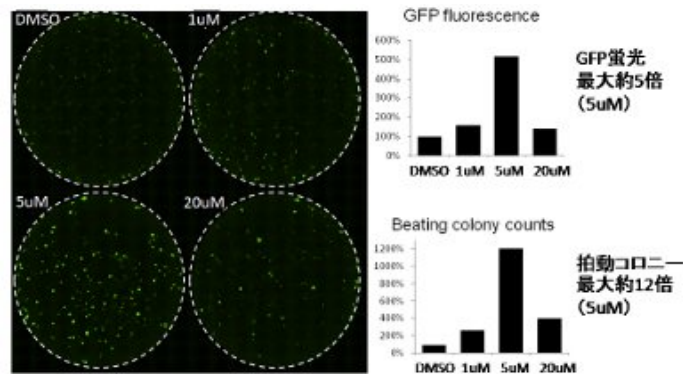


図3. 化合物XのES細胞に対する心筋分化促進効果

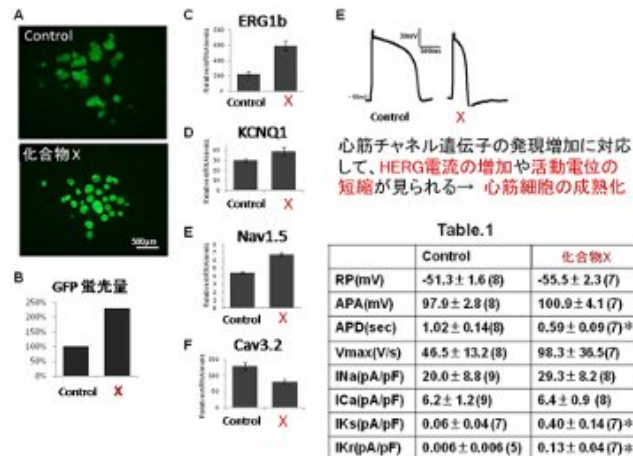


図4. 化合物Xによる心筋チャンネル増加と心筋の電気生理学的成熟

(4) 目標の達成度と意義

α-MHC プロモータ GFP 遺伝子を導入したヒト・サル ES 細胞を用いた HTS 系の開発により、心筋分化を促進する新たな化合物を検出することができた。これらの化合物はヒト ES/iPS 細胞にも有効であるため、QT 延長スクリーニング系の開発や移植細胞生産への応用が期待できる。またこの心筋分化促進物質探索 HTS 系は、様々な化合物ライブラリーに適用することができ、今後さらに新たな心筋分化促進物質の発見も期待できると考えられ、QT 延長評価系・心筋分化誘導技術の開発を大きく進展させるものとなっている。

2. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

(1) 事業目的と背景

創薬プロセスの効率化に寄与する有用な技術の開発を目的として、ヒト ES 細胞から臓器細胞へ分化した細胞をバイオチップ上に構成的にネットワーク構築することで「オンチップ・ヒト臓器組織モデル」を作成し、個体内で機能している臓器と同様な結果を得ることが期待できる、創薬スクリーニングや毒性評価用のデバイスの構築を行う。

現在までに東京医科歯科大学安田研究室で進めてきた構成的に構築した細胞集団・細胞ネットワークの研究である「オンチップ・セロミクス」計測技術を、動物細胞ベースでの臓器モデルチップ、そして京都大学再生医科学研究所で推進されているヒト ES 細胞分化制御技術によって構築したヒト臓器細胞を利用した臓器モデルチップ、を用いることで従来、動物あるいはヒト個体ベースでなければ困難であった創薬・毒性検査を、ヒト ES 細胞から臓器細胞へ分化した細胞をバイオチップ上に構成的にネットワーク「オンチップ・ヒト臓器組織モデル」で実用化し新しい薬剤・医療スクリーニング法へと発展させる。

実際には、すでに開発を推進してきた独自の細胞精製装置技術および手法、オンチップ細胞ネットワーク長期培養計測装置技術、1 細胞発現解析技術などを駆使して、臓器・組織と同様な機能の解析が可能となる細胞ネットワークモデルチップを動物細胞臓器細胞からチップ上に再構築し、さらにこのチップを用いることで薬効・毒性判断が可能な解析システムと解析プロトコルを開発する。さらに、個体レベルでの表現型の違いを再現できるプロトコルの開発を通じて、応答を推測できるセロミクス・データベースの構築、これらの臓器モデルからの解析結果を分析することで個体の応答を予測できる一連の「システム」「プロトコル」「ノウハウ」「ソフトウェア」の開発を並行して進める。

これらの研究を統合し、従来無かった「細胞ネットワーク」の「パターン」の重要性の理解に基づいた新しい細胞ベースの計測技術を実現し、動物実験、ヒト個体レベルの毒性・薬効評価を補佐できる「オンチップ・臓器モデル」の実用化を目的とする。さらにヒト ES 細胞より分化した神経組織、心臓、肝臓などの臓器細胞の実現に併せて、これらを動物細胞から置き換えてバイオチップ上に構築することで、ヒト臓器のモデルとなりうる組織、臓器モデルの構築条件を明らかにする。

本研究の推進によって、医療検査、食品衛生検査などでの信頼性の高いスクリーニング技術として少サンプルを高速・低コストで計測が可能となり、我々の健康に大きく寄与することが期待されるとともに、生命システムの新たな理解を促すことによって、基礎研究分野へも大きな貢献が期待される。

(2) 事業内容と目標

① 動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

動物臓器由来の初代培養細胞を用いて構成的にチップ上に臓器・組織モデルを構築し、この動物臓器モデルチップの薬剤等の刺激に対する応答と動物個体レベルでの応答の評価結果との比較検討を行い、臓器モデルチップが個体レベルと同程度の応答特性を持つための技術の最適

化を行うとともに、ヒト ES 細胞由来の細胞を用いたデバイス構築のための基礎データを取得することを目的とする。さらに、従来の個体では困難であった表現型の違いを細胞集団の配置の違いによって実現する「臓器モデルネットワークチップ」および表現型に基いた計測が可能となる創薬・毒性検査システムの構築を目指す。このために、具体的には下記課題に分けて開発を推進する。

①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発

これまでに開発してきたアガロース(寒天)を素材とした一連のマイクロ加工技術、アガロースマイクロチップ中での細胞培養・細胞集団の構成的配置技術、1細胞多電極アレイ刺激計測技術を組み合わせるとともに、薬剤添加による細胞の応答計測を可能とするマイクロチップ形状の追加、長期培養計測を実現するために必要な技術等を検討する。

平成 18 年度目標(中間目標)として、1細胞単位での細胞状態の計測が可能となる計測システムとチップの構築を目指す。さらに、薬剤の添加によって計測データがどのように変化するかを計測することで、その対策について検討を行う。特に、平成 19 年度には実質的な薬剤効果の評価が可能となるように、薬剤添加システムの構築を完了させる。

平成 21 年度目標(最終目標)としては、実用サイド(創薬企業、薬剤評価企業)からのアドバイスに基づいて、実用性を持った評価システムの構築、長期培養系の構築を完成させる。

①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

創薬・毒性検査のための臓器モデルとして最適な課題として心筋モデルの構築を選び、これについて検証をおこなう。ここでは、まず、心臓ネットワークの形状によって、どのように臓器に近い応答を行うモデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築できるかを検討する。そして、これに並行して、個体ベースでの QT 延長の計測に必要な変数をいかに細胞の状態データから取得するか、ハードウェア技術「細胞ベース QT 延長計測システム」とソフトウェア技術「細胞ベース QT 延長評価ソフト」の開発を進める。そして、最終的に、開発した「心筋細胞ネットワークチップ」と「細胞ベース QT 延長計測システム」「細胞ベース QT 延長評価ソフト」を組み合わせ、個体ベースで QT 延長が報告されている既知の試薬に対する応答を検証して実用化を目指す。

平成 18 年度目標(中間目標)として、心臓ネットワークの形状によって、どのように臓器に近い応答を行うモデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な細胞の特性(集団効果、繊維芽細胞の効果等)の基礎データを取得する。平成 19 年度は、引き続き個体ベースでの QT 延長計測評価に匹敵する細胞ベースでの評価技術の理解のためのハードウェア技術「細胞ベース QT 延長計測システム」の開発を進める。さらに開発したシステムを用いて、そのデータ解析によって評価ソフト開発に必要な各イオンチャンネルの応答についての基礎データの集積を進める。

平成 21 年度目標(最終目標)には、細胞ベースでの QT 延長計測が行える「心筋細胞ネットワークチップ」の実用化と、「細胞ベース QT 延長計測システム」「細胞ベース QT 延長評価ソフト」の実用化を完了させる。

①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価

創薬・毒性検査のための臓器モデルとしてさらに神経モデルを選び、「神経細胞ネットワークチッ

プ」の構築と、神経細胞への機能的解析が可能となる細胞ネットワークのヒステリシス(記憶)計測が可能システムを構築する。特に、神経細胞ネットワークについては、どのような介在ニューロンの空間ネットワークパターンが持つ意味を明らかにすることで、機能解析に最適な「細胞ネットワーク」についての知的財産化と実用化を目指す。

平成 18 年度目標(中間目標)として、グリア細胞を共存させない神経細胞 1 細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の実現と、細胞 1 細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起 1 本単位での電気計測を可能にすることで、1 細胞内での情報処理を明らかにする技術の実現を目指す。平成 19 年度は、さらに興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を識別する技術を実現し、これをすでに開発した軸索・樹状突起を識別してネットワークの方向性を制御する技術と組み合わせることで、完全に構成的な神経細胞ネットワークの構築を目指す。

平成 21 年度目標(最終目標)には、開発した神経細胞ネットワークチップの技術を駆使して、さまざまな神経回路パターンを構築することで、情報が記憶されるメカニズムの空間パターンの複雑さ、大きさとの関係を明らかにできるデータベースの構築を完成させ、構成的神経細胞ネットワークパターンの機能データベースについての標準化技術を実現する。さらに、機能ベースでの解析技術を利用することで、神経毒性だけでなく、神経機能障害の定量的評価技術となる創薬のための神経機能計測の標準化技術の実現を目指す。

②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

動物細胞を用いて検討を進めた技術を、ヒト細胞に適用し、ヒト ES 細胞由来の臓器細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築を目的とする。平成 18 年度においては、上記①の動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築に集中し、また、ヒト細胞が開発されたときに必要となる技術を事前に開発し、ヒト分化細胞の開発が完了したところで、オンチップ・ヒト臓器モデルの構築を開始する予定である。

②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発

臓器・組織内の細胞や ES 細胞から分化した細胞塊は、異なる分化程度、機能を持った細胞が組み合わされてできている。極力細胞に損傷を与える事無く、これらの細胞を機能の違いに応じて分離精製する技術を開発することは、細胞利用の観点から非常に重要である。

平成 18 年度目標(中間目標)は、これまでに開発したオンチップ・セルソーターを用いた細胞の精製方法の開発、細胞データベースの構築を行うことで、無染色での細胞精製の方法について検討する。特に、毒性検査技術で用いることが予定されている心筋細胞、神経細胞の精製技術について検討を行う。また、アプタマー等の可逆修飾技術を利用することで細胞を精製する技術についても検討を行う。

平成 21 年度目標(最終目標)には、さらに臓器細胞の画像データベースを充実させることで、画像データベースでの細胞精製技術についての標準化技術となることを目指す。また、アプタマーを用いた可逆細胞精製技術についても、アプタマーでの修飾に最適な細胞分化状態・表現型の違いを示す指標細胞表面マーカーへのラベル用アプタマーの開発を推進して、細胞表面アプタマー

の精製方法について確立して、可逆ラベル法による細胞精製技術の標準化技術となることを目指す。

②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

①で開発した動物細胞ベースでの技術を「ヒト細胞」に利用することを目指す。京都大学再生医科学研究所でヒト ES 細胞由来の心筋細胞の開発に成功した後、動物細胞ベースでの技術を転用して、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術としての可能性を検討する。

平成 18 年度目標(中間目標)は、まだヒト ES 細胞由来の心筋細胞の開発が完了していないことから、サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析を行う。

平成 21 年度目標(最終目標)には、ヒト ES 細胞由来の心筋細胞あるいはヒト体性幹細胞から分化させた心筋細胞を用いて、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術を実用化させる。

②-3 ヒト ES 細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発

遺伝性疾患情報を付与したヒト ES 細胞由来の疾患モデル細胞の機能を、実際の疾患モデル個体から摘出した疾患臓器由来の細胞と比較することで、ヒト ES 細胞由来の疾患モデルが疾患組織の表現型を継承していること(あるいは環境からのヒステリシスを刷り込む必要が無いこと)を確認し、「オンチップ細胞ネットワークモデル」が、さらに病理・創薬の分野でも利用できる技術となるようにする。具体的には、上記、①でも検討している、チップ上での異種細胞の配置、細胞集団サイズの効果の評価、細胞集団の空間配置の意味を理解し、これを利用することで異なる表現型をチップ上に構築することが可能とすることと、より臓器に近くなるように、チップ上に他の器官の一部を構成的に構築してより複雑なモデルを構築することを目指すものである。

平成 18 年度目標(中間目標)は、心筋細胞については、まず、動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築、細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことで、表現型を再現したモデルチップの構築を実現する。さらに平成 19 年度には引き続き、神経細胞ネットワークにアルツハイマー因子であるアミロイド蛋白質 $A\beta$ を添加することで、神経細胞ネットワークの応答の変化の有無から疾患モデル系の構築が可能か検討する。さらに、脳閾門モデルの構築を行い、脳閾門の機能評価を神経細胞ネットワークで可能とするより複雑なオンチップ臓器モデルシステムの構築を目指す。

平成 21 年度目標(最終目標)には、ヒト ES 細胞由来の心筋細胞あるいはヒト体性幹細胞から分化させた心筋細胞および繊維芽細胞等を用いて、病理心筋組織モデル計測システムの実現を目指す。また、①-3で得られる予定の、神経細胞ネットワークモデルの空間パターンデータを利用して、ヒト ES 由来の興奮性神経細胞・抑制性神経細胞ネットワークを組み合わせることでヒトと動物細胞との間での神経細胞ネットワークの特性の違いを明らかにし、ヒト神経細胞ネットワーク

計測システムを実現する。また、脳関門もでの組み合わせなど、より複雑な機構の再構築をチップ上で進めることで、より生体の反応に近い応答計測を可能とするシステムの構築を目指す。

(3) 研究成果

①動物細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

①-1 動物臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作・長期培養・薬剤添加技術の開発

これまでに開発してきたアガロース(寒天)を素材とした一連のマイクロ加工技術、アガロースマイクロチップ中での細胞培養・細胞集団の構成的配置技術、1細胞多電極アレイ刺激計測技術を組み合わせるとともに、薬剤添加による細胞の応答計測を可能とするマイクロチップ形状の追加、長期培養計測を実現するために必要な技術等を検討した。その結果、参照電極の構成の改善およびノイズ低減技術の開発によって、従来の多電極システムでは、細胞単位でしか取得できなかった信号を、神経細胞の神経突起単位で計測することに成功した。また、従来の電極では、白金黒を電極上に付加することでしか細胞電位が計測できなかったため、電極上の細胞の観察ができなかったが、参照電極の配置の工夫とノイズ低減技術によって透明電極上に直接配置した細胞の電氣的計測が可能となった。これによって、細胞の形状変化と細胞の電位変化を同時に計測することが可能となった。

さらに、上記、試作システムで得られた心筋細胞のデータに基づいて、システムの実用化につながる装置コスト低減のための装置のスペックダウン(最適化)と、より多くの電極での計測を可能とする多電極化を推進し、多サンプル同時計測が可能な 96 穴ウエルプレート内で計測が可能となるシステムの試作を行うことができた。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・参照電極の構成の改善およびノイズ低減技術の開発によって、透明電極上に直接配置した細胞の電氣的計測が可能となった。

- ・薬剤の添加によって変化するデータの計測法の対応策を開発。

- ・実用化につながる多サンプル同時計測技術の試作機の製作に成功した。

①-2 オンチップ動物心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

心筋モデルについては、細胞の集団効果に着目し、安定した細胞応答をもたらすために従来のチップ上での培養では注目されていなかった細胞集団の数とその空間配置に基づいた安定性の確認を行った。特に、安定性の確認については QT 延長に着目して、既知の QT 延長が報告されている試薬に対する応答を検証し、対象とする細胞集団の薬剤に対する応答が数分で起こること、また、集団サイズの違いによって応答後に薬剤を洗浄した後の、状態の復元能力が異なること等を明らかにした。

さらに、心臓の中に40%存在する線維芽細胞の機能についても計測を行い、より心臓に近いモデルを構築するための基礎データの取得を行うことに成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

・モデル「心筋細胞ネットワークチップ」を構築するために必要な心筋細胞の集団効果、繊維芽細胞の効果等の基礎データの取得に成功。

①-3 オンチップ動物神経モデルの構築と薬剤応答の機能評価

神経組織の神経モデルについては、まず、神経細胞 1 細胞から伸長する神経突起レベルでの計測を可能とするアガロース微細加工技術の開発、および計測チップ、ノイズ低減技術の開発を行い、1 本の神経突起上での信号伝達を計測することに成功した。

さらに神経細胞の長期計測をする上で障害となるグリア細胞の増殖の影響を排除するために、グリア細胞と共存しない神経細胞 1 細胞単位での培養技術の開発に成功した。

SCN 系に関連した視覚上核と LTP に関係した海馬組織に注目し、細胞集団を構築した。SCN については、チップ上で 24 時間の周期で活動状態の変化を連続して計測する標準化モデルを構築することができた。

神経細胞ネットワークにアルツハイマー病の因子であるアミロイド蛋白質 $A\beta$ を添加することで、神経細胞ネットワークの応答の変化の有無から疾患モデル系の構築が可能か検討し、これら $A\beta$ がミクログリアに特異的に集積されることが確認された。また、神経細胞ネットワークを用いた LTP モデルの構築に成功したことから、これを利用してアルツハイマー病の原因ペプチドとして考えられている $A\beta$ を添加したときの LTP の変化を計測したが、これについては有意な差は計測できなかった。

さらに、現状では神経細胞とグリア細胞との識別は画像処理ベースで可能であることは確認できたが、神経細胞のうち興奮性神経細胞と、抑制性神経細胞との区別は難しかったため、GAD-GFP マウスを入手し、これを飼育して、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を区別して利用できる環境を構築することに成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

・細胞 1 細胞レベルでの発火信号の計測、そしてさらに単一細胞から伸長する神経突起 1 本単位での電気計測技術の開発に成功。

・グリア細胞を共存させない神経細胞 1 細胞単位でのチップ上での細胞培養技術の開発に成功。

・SCN について、チップ上で 24 時間の周期で活動状態の変化を連続して計測する標準化モデルを構築することができた。

・神経細胞ネットワーク LTP モデルを利用してアルツハイマー病原因ペプチド $A\beta$ を添加したときの LTP の変化を計測したが有意な差は計測できなかった。

・GAD-GFP マウスを飼育して、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を区別して利用できる環境を構築した。

②ヒト ES 細胞を用いたオンチップ臓器モデルの構築

②-1 ヒト ES 細胞からの分化細胞を用いた健常(標準)臓器・組織モデル構築技術のための細胞操作技術の開発

ES 細胞からの分化細胞を利用する上での最大の課題のひとつは、普通の癌化細胞株と異なり、ES 分化細胞の塊はその分化状態や分化経路が異なる細胞が混入したヘテロな集団であることである。これを実際に利用するためには、ES 分化細胞塊からの細胞の精製が必要となる。これまでに開発したオンチップ・セルソーター及びアプタマー等の可逆修飾技術を組み合わせ、ヒト ES 細胞からの分化細胞の低侵襲抽出手法の開発を進めるための予備検討として、オンチップ・セルソーターシステムを用いて、細胞の形状の違いを見分けることで、心筋細胞と繊維我細胞、神経細胞とグリア細胞が識別分離可能であることを確認し、そのプロトコルを開発した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・オンチップ・セルソーターを用いた無染色での画像ベースでの心筋細胞、神経細胞の精製に成功。
- ・アプタマーと磁気ビーズによる可逆修飾細胞精製技術の開発に成功。
- ・金ナノ粒子を用いた細胞表面発現チャンネルタンパク質の定量解析技術を開発

②-2 オンチップ・ヒト心筋モデルの構築と薬剤応答の機能評価

動物用の技術を利用して、京都大学再生医科学研究所から供与を受けるヒト ES 細胞由来の心筋細胞を用いて、心毒性の評価を可能とするオンチップ・ヒト心筋モデルの構築を進め、ヒトに特異的な毒性が知られている既知の薬剤を用いて、創薬支援(毒性検査)技術としての可能性を検討した。ヒト ES からの心筋細胞に代わり、サル ES 細胞から分化した拍動細胞を用いて、この細胞のイオンチャンネルの発現状態、薬剤に対する応答などを実際に検討し、薬剤に対しての応答を計測することに成功した。

また、波形データのノイズ低減技術によって得られたきれいな波形を用いて、各イオンチャンネルの状態変化を見積もるためのデータの取得情報の確認、さらにモデルとの整合性評価技術の原理開発に成功した。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・サル ES 細胞由来の拍動細胞を用いた、K,Ca,Na 薬剤に対する細胞の応答解析、細胞イオンチャンネルの発現状態の解析が可能であることを確認。
- ・イオンチャンネルの状態を見積もるための波形評価のための基礎データの取得、およびモデルを用いたチャンネル状態の推測技術についての原理検討に成功した。

②-3 ヒト ES 細胞を用いた疾患臓器・組織モデル構築技術の開発

臓器モデル計測システムの開発については、まず心筋臓器モデルの計測評価技術の開発と、心筋モデルチップの構築を試みた。

装置開発については、1 細胞培養計測技術の特長を生かして、隣接細胞間の伝達速度変化計測に基づく Na イオンチャンネル遅延の計測、1 細胞単位での電位変化信号の計測による K、Ca イオンチャンネルの状態変化の計測、心筋細胞の拍動強度変化に基づく心筋拍出量の見積もりが可能なシステムの開発の試作に着手し、プロトタイプ構築に成功した。

心筋細胞については、まず、動物細胞ベースでの心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築のために必要な基礎データとなる「心筋－繊維芽細胞－心筋細胞」直列接合モデルによる伝達遅延時間計測に成功した。この基礎データによって、細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築を行うことが可能となった。また、直列に 1 細胞単位で接合した心筋細胞ネットワークを用いることで、心筋細胞の伝達遅延と細胞集団の局所的動機現象についても確認することに成功した。これらによって、表現型を再現したモデルチップの構築を実現する可能性を示唆することができた。

また、神経組織のオンチップ構築に併せて、関連性の高い脳閾門モデルの構築を開始し、ペリサイト、血管内皮細胞の初代培養からの継代を可能にした。

以上、本課題での成果をまとめると以下のとおりとなる。

- ・心臓臓器モデル総合計測評価システムの基礎システムの開発に成功。
- ・心筋細胞と繊維芽細胞の組合せによる「心肥大臓器モデルチップ」の構築に成功。
- ・細胞ネットワークの形状制御による不整脈発生機構モデルである「リエントリーモデルチップ」の構築に成功。
- ・極微量での薬剤透過性を評価するための In vitro Microfluidics 系 血液脳閾門モデルの構築の検討

(4) 目標の達成度と意義

平成 18 年度より開始した本研究計画の中で、当初の中間目標としていたオンチップモデル臓器による毒性検査技術としての立ち上げについては、実用化の検討を前提にすでに製薬企業等と共同研究を開始しており、目的に対する本プロジェクトでの装置ハードウェアの技術の実用化レベルへの到達という今年度の目標達成状況は、ほぼ 100%であると評価する。今後の残された課題は主に、実際に利用できるようにするためのソフトウェア、データベースの構築、そして特定の検査項目に対応するためのハードウェアのカスタマイズとなる。これらすべての開発に成功すれば、われわれが目標としていた創薬・毒性検査システムの構築は終了できることとなる。今後は、ユーザーとの打合せにより、ハードウェアおよびソフトウェアについて、実際に事業として最適なユーザーフレンドリーなシステムとしてゆく予定である。

更に、従来の発現解析ベースの計測では解明が困難であった心臓リエントリーモデルなどの臓器の空間構造に由来する創薬・毒性検査モデルの概念についても世界で初めて具体的な検討を

行い、特に心筋細胞ネットワーク内に繊維芽細胞の比率が増大する病理モデルである心肥大モデルの構築に必要な心筋・繊維芽細胞の細胞間の Na⁺ 電位伝達の数値計測などに成功し、拍動の衝突などの計測も成功した。これらのことは、将来の新しい細胞ベースでの創薬・毒性検査の方向性を示唆するものであり、達成状況としてはすでに実用の70%に達していると考え、初年度の目標であった原理検討という観点からの成果としては100%以上と考える。

細胞の無侵襲精製についても、画像認識ベースでの細胞精製、アダマールをもちいた新しい細胞精製技術などの立ち上げに成功し、これらも原理検討については達成状況100%、実用化についてはデータベースの蓄積、細胞表面結合アダマール精製技術の開発などの課題があるため、まだ50%程度と考える。

2. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

(1)事業目的と背景

本研究では、本プロジェクトにより作製される ES 細胞由来肝細胞を用いて、創薬の過程で評価することが必須である薬物動態・毒性を的確に定量的に評価可能な実験系ならびに評価方法を提案することにより、創薬プロセスの効率化を図り、新薬の創製を支援できるシステムを提供することにある。薬物動態や毒性の評価に関しては、大きな種差があることが知られており、ヒトにおける薬物動態や毒性を適切に評価するためには、ヒトサンプルを用いた検討が欠かせない状況である。しかしながら一方で、ようやくヒトサンプルを薬物動態のスクリーニングに用いる状況にはなってきたが、まだ利用できる量が限られており、さらには高価であることから、薬物候補化合物が多いような創薬研究の初期段階において大量にスクリーニングをかけることができるほど量的にも金銭的にも供給が困難な状況にある。もし、ヒト ES 細胞由来肝細胞が、一般に提供できるようになれば、事実上無限に同じ遺伝子背景を持った肝臓を提供でき、さらに再現よく代謝・輸送機能を評価できる点で、非常に有用な系を提供できると考えられる。現時点では、ヒト肝細胞を用いた薬物動態・毒性評価については、まだ系統的に定量的な評価系が確立しているとはいえない状況である。よって、本プロジェクトにより創製される ES 由来肝細胞を用いた薬物動態・毒性評価を行うための準備段階として、ヒト凍結肝細胞や動物由来肝細胞を用いて多くの観点から薬物動態・毒性を評価可能な実験系を提供することを目標として、検討を行っている。さらに、他のグループよりヒト ES 細胞由来肝細胞が作出されてきた折に、ヒト肝細胞と比較してどの程度の代謝・輸送能を有しているかを定量的に判断するための方法論を構築することを目的として、発現量の定量方法の確立や、個々の代謝酵素・トランスポーターの機能評価法の標準化についても併せて検討を行った。

(2)事業内容と目標

①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立ならびに胆汁排泄の評価系の構築

従来型の I 型コラーゲン dish 上で肝細胞を培養すると、極性形成の効率が悪く、胆管側に発現する薬物トランスポーターの内在水が見られるとともに、培養後わずか数時間で種々の代謝酵素・トランスポーターの発現量が劇的に低下することから、特に胆汁排出を評価するための系としては利用できないとされてきた。一方で近年、肝細胞をコラーゲンやマトリゲルなど種々の細胞外マトリックス成分ではさんで培養するサンドイッチ培養法を用いることで、肝細胞の極性が効率よく形成されるとともに、トランスポーターなど異物解毒に関与するタンパク質の発現量が培養後数日の単位で肝細胞単離直後のレベルで維持されることが報告されていることから、まず入手が容易であるコラーゲンを用いて単離したラット肝細胞を用いてサンドイッチ培養の実験系を立ち上げるとともに、種々の化合物の胆汁排泄を定量的な評価を行った。また、薬物の胆汁排泄過程には複数のトランスポーターが関与することが明らかとされているが、それぞれの基質認識性がオーバーラップしているために、1つの薬物が複数のトランスポーターの基質となる事例が報告されており、個々の薬物についてそれぞれの排出トランスポーターが胆汁排泄全体に占める寄与率を明らかにするための方法論の構築の検討を行った。その実現のために、MDR1, MRP2, BCRP といった代表的な薬物の排泄トランスポーターの輸送を選択的に阻害できる薬物の探索ならびに濃度条件の最適化を試みた。さらに、胆汁排泄クリアランスについて、サンドイッチ培養系から求められた bile pocket への薬物の移行を medium 中濃度で除した *in vitro* における胆汁排泄クリアランスと、*in vivo* での動物実験から求められた胆汁排泄クリアランスとの間の相関がどの程度あるのかについて検討を実施した。

併せて、ヒト凍結肝細胞を用いてサンドイッチ培養肝細胞の実験系を構築し、またヒト肝細胞の性質を十分に発揮できるロット選択の基準を作り、評価用の適切なロットを選択した。

②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立

ヒト凍結肝細胞を用いた、ヒトにおける輸送・代謝能力の精度よい定量的な薬物動態予測を進めるに当たってどのような評価法が必要であるかについて ES 由来肝細胞が作出されたときに備えて検討を進めていくと共に、ES 由来肝細胞の薬物動態評価における性能を比較するための実験系として用いることを目的として、複数のロットのヒト肝細胞のうち、予測系の確立のために使用可能な肝細胞のロットを複数確保するためのスクリーニング作業を行った。過去の検討から、ヒト凍結肝細胞は輸送活性についてロット間のばらつきが非常に大きいことが知られており、購入可能なロットのうち 30%程度でしか取り込み能力が保持されていないことが経験的に分かっている。従って、ヒト肝細胞を用いて輸送・代謝活性を評価する際には複数の活性が良好なロットを用いることが必要とされる。そのため、多数のロットの肝細胞を購入し、OATP(organic anion transporting polypeptide)ファミリートランスポーターの代表的な基質である Estradiol-17 β -glucuronide (E₂17 β -G)および NTCP(Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide)の基質である taurocholate を用いて、取り込み活性をスクリーニングして、輸送活性の良好なロットを確保し今後の計画を円滑に進めることを目的として検討を行った。

③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立

薬物は、主に肝臓からの代謝・胆汁排泄、腎臓からの尿中排泄の 2 ルートから消失を受ける。

例えば高齢者において腎機能の低下が見受けられるが、薬物の肝腎振り分け率によって、同レベルの腎機能低下患者においても薬物の体内全体からの消失効率の低下割合は異なってくる。従って、肝腎振り分けの予測は、肝機能・腎機能低下時の薬物動態の変動を理解する上で必要な情報の1つである。一方、薬物の消失には種差があることから、ヒトにおける肝腎振り分け率の予測が可能な方法論を確立していくことが必須であるといえる。まず前段階として、ラット肝細胞とラット腎スライスを用いて肝クリアランス・腎クリアランスならびに肝腎振り分け率を見積もり、*in vivo* における実際の振り分け率の結果と付き合わせることで予測の妥当性について評価した。さらにヒトにおいても、ヒト凍結肝細胞およびヒト腎スライスを用いて同様の検討を行うことで、ヒトにおける腎クリアランス・肝クリアランス(=腎外クリアランス)、肝腎振り分け率の見積もりを試み、実測の値と比較した。

④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析

個々の取込みトランスポーターが、ある薬物の肝取り込みクリアランス全体に占める寄与率を推測することは、個々の分子の様々な要因(遺伝子変異、病態、薬物間相互作用など)による機能変動が起きた際に、薬物動態全体に与える影響を予測する上で必須の情報となりうる。また、特に種々のアニオン性薬物の肝取り込み輸送を担うトランスポーターOATPファミリーについては、げっ歯類とヒトとの間で遺伝的な対応が見つからないことが知られており、ヒトにおける予測を進めるためにはヒトサンプルを用いた解析が必須である。そこで本研究では、本プロジェクトからヒトES細胞由来肝細胞が作出されたときに備えて、ヒト凍結肝細胞を用いてヒトにおける薬物の肝取り込みに関与するトランスポーターの寄与率を見積もるための方法論を複数考案しており、これらを用いて種々の薬物について検討を進め、解析事例を集積させることを目的として検討を行った。

⑤ES細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子のmRNA発現量の測定法の標準化および性能評価の支援

各グループによって作製されたES細胞由来分化肝細胞について、創薬スクリーニングに利用するにあたって、通常の肝細胞と比較して性能が十分に維持されているかについて適切に定量的に評価を進めるために、異物解毒に関与する代謝酵素・トランスポーターのmRNAならびに蛋白の発現量を定量化するための標準的な方法論を確立した。このことによって、複数の施設で同じ方法を用いて評価することで、相互比較ができるデータが取れるように考慮した。また、通常の肝細胞における発現レベルとの比較を通じて、どの程度創薬に対して汎用性のある細胞が構築されているかについて、評価を実施した。

⑥肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討

In vitro 実験において得られた各種速度論パラメータを元にして、最終的には *in vivo* における薬物動態や臓器分布を明らかにすることが創薬過程においては望まれている。従って、ES細胞由来肝細胞が完成したときに、どのようにして薬物動態の予測を全身レベルに持っていかを事前に検討しておくために、適切な全身の薬物動態をシミュレーション可能な生理学的薬物速度論モデ

ルを構築し、in vitro 実験のパラメータをその数理モデルにいかにして組み込むかについて検討を進めた。

⑦肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラット in vivo 実験ならびに in vitro 実験の結果に基づく)

トランスポーターを介した薬物間相互作用に関して、臨床試験などを通じて事例が集積しつつある。取り込み及び排泄トランスポーターの阻害は、血漿中・臓器中濃度の変動に対してそれぞれ異なった影響を与える。さらに、1つの阻害剤が両方のトランスポーターを同時に阻害するケースも考えられる。そこで本研究では、将来 ES 細胞由来肝細胞が創薬に使えるレベルの細胞として成熟したときを見越して、in vitro 実験系の結果から in vivo における血漿中・臓器中濃度の変動を定量的に予測することを目的とした検討を実施した。

(3)研究成果

①動物細胞並びにヒト肝細胞を用いたコラーゲン・サンドイッチ培養法の確立ならびに胆汁排泄の評価系の構築

ラット肝細胞を用いて、ゲルの厚さ、種類、培養時間など非常に多くの項目にわたって検討を行ったところ、下層には I 型コラーゲンが precoat された dish、上層にはマトリゲルをかぶせた培養フォーマットが最も胆汁排泄の評価には適していることが示された。位相差顕微鏡による観察の結果、培養を初めてマトリゲルをかぶせた後、経時的に線状の胆管腔 (bile pocket) の構築が進み、培養後 4 日目に最適な状態となった。さらに、薬物排出トランスポーター Mrp2 (multidrug resistance associate protein 2) の蛍光基質である CDF (carboxydifluorescein) のエステル体 (CDF-DA (diacetate)) を用いて、蛍光により胆管腔の形成、トランスポーターの機能を可視化して評価した。その結果、培養後 4 日目をピークにして、胆管腔への CDF の集積が認められ、本実験系が胆汁排泄トランスポーターの機能を評価するうえで有用な系となることが示された。さらに、Ca²⁺ の非存在下で胆管腔の tight junction が開放される性質を利用して、Ca²⁺ の有無の条件下でそれぞれ dish 上の細胞への化合物の蓄積の差分をとることで、経時的に胆管腔中に排出された化合物を定量することができる。我々は、薬物トランスポーターの基質の放射標識化合物を利用して、各種薬物の胆管腔中への排出を観察することに成功した。さらに、薬物の胆汁排泄過程における個々のトランスポーターの寄与率の評価法の構築へ向けて、個々のトランスポーターの選択的阻害剤・選択的基質を用いて検討を行った。その結果、Mdr1 (multidrug resistance 1), Bcrp (breast cancer resistance protein) については、verapamil, Ko143 がそれぞれ選択的阻害剤として用いることが示唆される結果を得た。さらに、それらを用いて rosuvastatin の胆管腔中への排出を評価したところ、Ko143 の共存により排出は約半分程度まで阻害された一方で、verapamil では阻害されなかったことから、rosuvastatin の胆汁排泄には、Bcrp は約半分程度関与するのに対して、Mdr1 はほとんど関与しないことが示唆された。この結果は、過去の動物実験の結果と矛盾せず、この系で、胆汁排泄トランスポーターの寄与率の評価が可能であることが示唆された。

さらに7化合物について、ラット in vivo における血中濃度基準の胆汁排泄クリアランスを求め、一方で、ラット肝細胞サンドイッチ培養系を用いて、胆管腔中に排出される薬物の速度を medium 中

の薬物濃度で除した値を *in vitro* における胆汁排泄固有クリアランスとして計算し、蛋白結合率や肝血流を考慮して *well-stirred model* の式に当てはめることにより、予測される胆汁排泄クリアランスを見積もった。その結果、7化合物について予測値と実測値の間には、比較的良好な相関が見られたが、その傾きを見ると、*in vitro* からの予測値が、実測値の約 1/10 程度の値を示していた。次にこの原因の1つとして、これら化合物の胆汁排泄が、肝取り込み過程が律速となっており、かつサンドイッチ培養系において取り込みトランスポーターの発現量が低下している可能性を考え、培養時間依存的な取り込みクリアランスの低下を各化合物で観察したところ、いずれの化合物においても取り込みクリアランスが大きく低下することが明らかとなった。さらに、培養後 5 時間後の *in vitro* 取り込みクリアランスをもとに *in vivo* 胆汁排泄クリアランスを予測したところ、1:1 の相関関係が比較的良好に観察され、取り込み過程が胆汁排泄クリアランス全体の律速段階になっており、短時間培養によっては取り込みトランスポーターの機能が維持されているがために相関が良好に見られたと考えられた。一方、サンドイッチ培養において胆管腔の形成が見られる4日後の肝細胞における取り込みクリアランスは短時間培養後の取り込みクリアランスと比較していずれの化合物においても低下しており、*in vivo* 胆汁排泄クリアランスの実測値より予測値が小さな値となることが示された。従って、胆管側膜の排出トランスポーターの機能を見るためには有用な系であるが、胆汁排泄過程全体を *in vivo* と同じ状況で比較しようとする場合には、取り込みトランスポーターの発現量低下を抑制できる何らかの手段をとる必要があることが示唆された。

また、ヒト凍結肝細胞を用いて同様の実験を行い、taurocholate や rosuvastatin の経時的な胆管腔への排出を観察することができた。そのことをうけ、ヒト肝細胞を用いたサンドイッチ培養肝細胞の検討ならびにロットチェックを行った。代表的な有機アニオントランスポーターの基質である taurocholate, estradiol-17 β -glucuronide の輸送を測定しており、その結果、サンドイッチ培養肝細胞として、胆汁排泄の解析にたえる肝細胞のロットを見つけ出すことに成功し、今後のさらなる解析のために、この肝細胞を一定数入手することができた。さらに、ヒト肝細胞を用いてラット肝細胞で行ったものと同様に MDR1, MRP2, BCRP の寄与率を阻害剤による阻害率で算定することを試みたが、BCRP の選択的阻害剤としてラットでは有効であった Ko143 が、ヒト肝細胞においてはあまり明確な阻害効果が見られなかったことから、Ko143 の肝細胞内における代謝安定性や BCRP 選択的基質として用いている rosuvastatin が不適切であるのかなど、今後詳細な検討を通じて、ヒト肝細胞において胆汁排泄に関与するトランスポーターを同定する方法論を構築していく必要があると認められた。

②ヒト凍結肝細胞を用いたヒトにおける肝取り込み・代謝能力の評価系の確立

現在、ヒト肝細胞を購入可能な4業者から 30 ロット程度について、E₂17・G, taurocholate それぞれの輸送活性について評価をした。その結果、ロット間でそれぞれの取込み活性にはいずれも数十倍程度の差が観察された。さらに、E₂17・G の輸送活性と taurocholate の輸送活性をそれぞれグラフの縦軸・横軸にプロットすると、一定の相関が見られた。これらは共に輸送するトランスポーターが異なることから、ヒト肝細胞において見られているロット間差は、個々のトランスポーターの機能の個体差というよりは、むしろ肝細胞自身の持つ輸送能力の差に起因する(*intact hepatocyte theory* に基づく)可能性が推察された。また、各肝細胞を取り扱う業者が公表している

代謝酵素(CYP)の酵素活性とトランスポーターにおける輸送活性に関して相関を調べたところ、有意な相関は見られなかったことから、トランスポーターと代謝酵素の機能維持については、別のファクターが関与していることが推察された。従って、目的に応じて評価したいタンパク質の輸送・代謝活性のよいロットをあらかじめスクリーニングしておいて、適切なロットだけを用いてヒトにおける代謝・輸送活性を評価することに一定の意味があることが示唆された。また今回の検討から、今後輸送活性を測定するのに適切な肝取り込み活性を有するロットを 7 ロット選択することができた。

③肝細胞と腎スライスを同時に用いた薬物の肝腎振り分けの予測系の確立

本検討では、in vivo において直接胆汁排泄と尿排泄が同時に測定可能であるラットを用いて、ラット肝細胞とラット腎スライスを用いて、主に代謝をあまり受けず胆汁排泄もしくは腎排泄を受ける薬物群を中心として取り込み活性について検討を行った。また、各種薬物の取り込みクリアランスから、薬物速度論に基づいてラットにおける臓器血流速度・蛋白非結合型分率などを考慮して in vivo における予測される肝・腎クリアランスを計算により求め、さらにその比として肝腎振り分け率を見積もった。一方でラット in vivo において実際の薬物排泄の胆汁排泄クリアランスと腎クリアランスの比較を行ったところ、肝クリアランスについては、ほぼ1:1の良好な相関性が認められたのに対して、腎クリアランスについては、分泌クリアランス基準での比較では、約 10 倍程度 in vivo のクリアランスが大きいという結果を得たが、相関性としては非常に良好であった。さらに、肝腎振り分け率について比較を行ったところ、両者の間に非常に良好な相関性を認めることができたことから、in vitro 実験の系から肝クリアランス・腎クリアランスならびに肝腎振り分けの予測が可能であることが示された。同様の実験をヒト凍結肝細胞およびヒト腎スライスを用いて検討しているが、ラットで行ったときと同様に、比較的良好的な相関関係が見られており、創薬初期段階における予測精度はクリアしていると考えている。

④ヒト肝細胞を用いた肝取り込み過程における個々のトランスポーターの寄与率の解析

肝取り込みトランスポーターの寄与率の評価については、

1)トランスポーター選択的基質(cholecystokinin octapeptide: OATP1B3 選択的基質など)について、それらの輸送活性をヒト肝細胞ならびにトランスポーター遺伝子発現系を用いて、それぞれ輸送活性比を測定し、一方で、試験化合物の輸送活性を遺伝子発現系を用いて測定し、先の比に乗じることで、肝細胞における各トランスポーターを介した試験化合物の取り込みクリアランスを算定する。

2)トランスポーター選択的阻害剤(estrone-3-sulfate: OATP1B1 選択的阻害剤など)を用いて、ヒト肝細胞における試験化合物の取り込み活性を阻害剤存在下・非存在下で比較することで寄与率を検討する。

3)Western blot 法を用いて、各トランスポーターの発現量を、ヒト肝細胞ならびにトランスポーター遺伝子発現系を用いて相対的な比を算出し、トランスポーター発現系を用いた試験化合物の輸送活性と乗じることで、1)と同様に寄与率を算定する。

の 3 つの方法論が使いうるが、各トランスポーターの肝取り込み全体に占める寄与率の算定を多くの薬物間で比較することによって、実例を増やし評価の妥当性を検討するために、angiotensin II

受容体拮抗薬である olmesartan, 肺動脈性高血圧症治療薬 bosentan についてそれぞれ検討を行い、両化合物とも OATP1B1, OATP1B3 の寄与率はほぼ同等であることを示した。この結果は、過去に報告をしている telmisartan が、OATP1B3 により主に取り込まれることを考えると、同じ薬理カテゴリーに属する薬物であり、共に未変化体で排泄され肝臓に集積するという共に同じ性質を有する薬物であっても、その分子機構は異なる可能性が考えられ興味深い結果であると考えており、このような評価系により個々の分子が薬物動態に与える影響の相対的な寄与を定量的に決める上で有用であることが考えられた。

⑤ES 細胞由来肝細胞のより定量的な性能評価のための代謝酵素・トランスポーター遺伝子の mRNA 発現量の測定法の標準化および性能評価の支援

定量的 PCR を用いた CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3 の mRNA 定量法の標準化プロトコールを作成し、各分化細胞を扱っている組織に対して、標準とする肝細胞およびプロトコールの供給をできる体制を整えた。また、複数の肝細胞における CYP3A4, OATP1B1, OATP1B3 の mRNA 発現量についても測定を行ない、測定の実現性についても良好であることを確認した。またさらに、現在、蛋白量についても Western blot 法で定量するためのプロトコールを作製した。これらに基づき、実際に幹細胞創薬研究所ならびに熊本大学には、標準となる肝細胞サンプル、測定方法に関する情報を公開している。また幹細胞創薬研究所の細胞については、当研究室でうけいれ、ヒト肝細胞との発現・機能比較を実施した。その結果、CYP や取り込みトランスポーターの発現量は著しくヒト肝細胞と比較して極微量か検出限界を切っていた。さらに、活性で評価するために、OATP 類の典型的な基質を用いた輸送活性や、蛍光基質を用いた CYP3A4 の活性を評価したが、いずれもヒト肝細胞と比較すると、著しく低下しており、さらなるヒト ES 細胞由来肝細胞の性能向上へ向けて頑張っていく必要があると考えられた。

⑥肝細胞を含む動物・ヒト組織サンプルや動物・ヒト遺伝子発現系を併用した結果をもとにした、動物・ヒト全身の薬物の体内動態を予測可能な数理モデルの構築法に関する検討

まず、HMG-CoA 還元酵素阻害薬の1つで、肝臓において代謝をほとんど受けず主に未変化体の胆汁排泄によって消失し、さらにその肝取り込み・排泄過程にいずれもトランスポーターの関与が認められているプラバスタチンをモデル基質として用い、まずはラットにおける薬物動態の予測が可能かどうか検討を行った。その結果、適切な数理モデルに *in vitro* 実験から得られたパラメータを適切な補正係数(*scaling factor*)を乗じることで代入してシミュレーションを試みることが出来た。また、プラバスタチンの投与量依存的なラットにおける血漿中濃度推移および胆汁排泄量の実測値の変化を数理モデルにより良好に再現することが出来、本数理モデルに基づき、プラバスタチンの肝クリアランスの飽和が良好に予測できることが実証できた。次にヒトにおいても、ヒト肝細胞やヒト胆管側膜ベシクルを *in vitro* 実験系として用いることで *in vivo* ヒト薬物動態の予測を試みた。その結果、ラットと同一のモデルを用いてパラメータだけを *in vitro* 実験の結果に基づき変化させたと、経口・静脈内投与されたプラバスタチンの血中濃度推移を良好に再現することが出来た。また、そのモデルを用いて、肝取り込み・排泄トランスポーターの機能がそれぞれ変動した場合に、副作用(筋毒性)と関係する血中曝露および効果(HMG-CoA 還元酵素の阻害)と関

係し実測が *in vivo* では不可能な肝臓内濃度がどのように変動するかについて、シミュレーションを試みた。その結果、取り込みクリアランスの低下は、血漿中濃度の上昇を招くが、肝臓内濃度は血漿中濃度の上昇よりは比較的寛容であることが示された。一方で、胆汁排泄クリアランスの低下は、血漿中濃度にはあまり大きな影響は及ぼさないものの、肝臓内濃度は著しく上昇することが示された。このことは、過去臨床研究において、プラバスタチンの肝取り込みに寄与する OATP1B1 の機能低下を引き起こす遺伝子変異(V174A)を保有するヒトにおいて、血漿中濃度が有意に上昇するものの、コレステロール低下効果としては、あまり遺伝子多型による差が見られていないことと矛盾しない結果といえる。

⑦肝細胞を用いた薬物間相互作用の予測のための方法論確立および検証(ラット *in vivo* 実験ならびに *in vitro* 実験の結果に基づく)

本研究では、将来 ES 細胞由来肝細胞が創薬に使えるレベルの細胞として成熟したときを見越して、*in vitro* 実験系の結果から *in vivo* における血漿中・臓器中濃度の変動を定量的に予測することを目的として、ラットを用いて、pravastatin を門脈内投与後の体内動態に対する rifampicin、cyclosporin A、probenecid の併用投与の影響を検討した。いずれも高投与量条件下では pravastatin の肝濃縮率を低下させ、rifampicin は肝臓内濃度基準の胆汁排泄クリアランスも低下させた。一方で、肝取り込み・胆汁排泄の各過程を反映する *in vitro* 実験系として、ラット遊離肝細胞・胆管側膜ベシクルを用いた輸送実験により阻害定数を算出し、肝臓内の阻害剤血中濃度の予測値より見積もった結果、rifampicin、probenecid で阻害した場合、pravastatin の門脈内投与後クリアランス、肝濃縮率、肝臓中濃度基準の胆汁排泄クリアランスの変動は定量的に予測できた。Cyclosporin A については、阻害剤の蛋白非結合型濃度に基づく予測は、実際の阻害程度より小さく、蛋白結合型の阻害剤もトランスポーターの阻害に関わる可能性が考えられた。また、遊離肝細胞を用いて見積もった阻害剤の蛋白非結合型薬物の肝濃縮率と血中蛋白非結合型薬物濃度の情報から、阻害剤の肝臓中非結合型濃度を予測できることが示唆される結果も得た。

⑧代謝酵素・トランスポーターが同時に体内からの薬物消失に関わる場合の各分子の相対的重要性を評価するための実験系の確立

これまでは、トランスポーターもしくは代謝酵素単独による消失を受ける薬物に関する予測が主であったが、一方で、代謝酵素とトランスポーターが同時に肝クリアランスに寄与する薬物も多く報告されるようになってきた。血中濃度を考える際には、もし肝取り込み過程にトランスポーターが関与する場合、速度論的な考察から、代謝酵素とトランスポーターの両方が消失に関与する場合であっても、取り込みトランスポーターによる輸送過程が律速段階となっているケースが多く、この場合、取り込みトランスポーターによる輸送能力が肝クリアランスを決定すると考えられる。このことを実証するために、2種類の非代謝性スタチンおよび2種類の代謝性スタチンについて *in vitro* 実験で代謝クリアランスならびに肝取り込みクリアランスを見積もる実験を肝ミクロソームならびに肝細胞を用いて実施すると共に、*in vivo* における肝クリアランスとの比較を実施したところ、理論どおり、肝取り込みクリアランスからの予測のほうが、代謝クリアランスに基づく予測より良好な予測が成立することが明らかとなった。このことから、ヒト肝細胞における取り込みクリアランスの予測

法が、複合的な消失経路を持つ薬物の肝クリアランス予測にも有効であることが示唆された。

(4) 目標の達成度と意義

①～⑧すべての項目について、いずれも当初の目標を達成するものであり、今後 ES 由来肝細胞が作出されてきたときに、順次ヒト肝細胞を用いた実験の結果と比較して、どの程度異物解毒関連遺伝子の発現が維持されており、また、異物解毒機能の面から見て使用に耐える性能を有しているかについて明確な答えを出しうる程度に、複数の面から評価できる実験系の構築に成功してきた。本研究で得られた成果は、いずれもヒトないし動物由来の肝細胞を用いて薬物動態を様々な角度から評価するための複数の方法論の確立であり、ヒト ES 細胞由来肝細胞が正常な肝細胞と同等の性質を有するならば、理論的には同じ実験系・評価方法を用いることで、本プロジェクトの趣旨であるヒト ES 細胞由来肝細胞を用いた創薬支援ツールの開発に直結すると考えている。創薬研究には、一般的に莫大な費用と年月がかかることから、開発の初期段階で市場に出せる薬物を的確に見分けるための方法論が切望されている。本成果は、ヒト由来細胞を用いた定量的な予測系を提案することで、種差を超えて直接ヒトにおける体内動態の予測へとつながるものであり、この成果を元にしたスクリーニング系により創薬の効率化が進めば、経済的な面から見ても中長期的な波及効果は大きいものになると予想している。

特許に関しては、現在の成果だけでは不十分であるが、今後我々の実験系にヒト ES 由来肝細胞を搭載して良好な予測が成立するとすれば、実験系だけでなく定量的な評価方法(必要があればそれを実現するためのソフトウェア)まで含めて1つの創薬支援ツールボックスとしてパッケージ化することにより特許化することができると予想される。論文発表については、現在上記の成果についていずれも積極的に論文公表しており、また、学会においては既に発表を行ったものも含め、今後も広く国内外の関係学会で発表を行い、大学や会社の創薬研究者との議論を重ねることにより最適なかつニーズのある実験系の提案を続けて行きたいと考えている。

IV. 実用化の見通しについて

1. 実用化の見通し

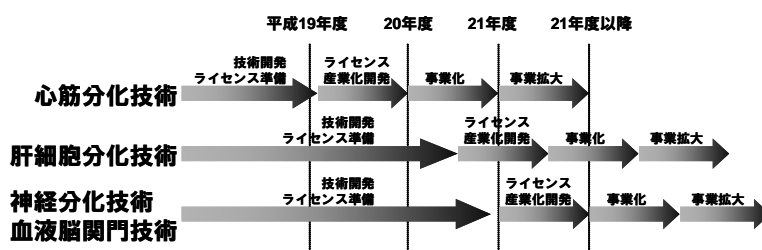
本プロジェクトでは、ヒトES細胞を用いた創薬基盤技術の開発を目的としており、得られた研究成果に関しては、医薬品メーカーおよび創薬受託試験を手がける企業にライセンスアウトすることで実用化・事業化することを目指している。

具体的なライセンスアウト先の候補としては、本委託事業に採択された後、幹細胞創薬研究所に権利譲渡を行ったアステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社、株式会社リプロセルが有力である。アステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社は、日本有数の大手医薬品メーカーであり、本プロジェクトの研究成果を自社内の創薬開発技術として実用化することにより、「安全」かつ「薬効の高い」新薬を「迅速」かつ「低コスト」で開発することが可能になると考えられる。また、日本を代表する医薬品メーカーが本新規技術を先行導入することで、我が国の医薬品業界全体への波及効果を見込むことができる。一方、株式会社リプロセルは京都大学・東京大学との共同研究契約に立脚して発足した産学連携バイオベンチャーである。リプロセル社は、本プロジェクトの研究成果を、「ES細胞を用いた新規創薬受託試験ビジネス」という形で事業化し、我が国の医薬品メーカー全体の創薬開発に大きく貢献すると考えられる。

本プロジェクトの具体的な事業化項目とスケジュールを以下に示す。

- 1、 ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験(QT延長):平成20－21年度事業化
- 2、 ES細胞由来の肝細胞を用いた代謝毒性試験:平成21－22年度事業化
- 3、 神経疾患モデル細胞および血液脳関門モデルによるスクリーニング:平成22－23年度事業化

技術の進捗により事業化のタイミングは異なるが、心筋毒性試験は平成20－21年度、肝細胞代謝毒性試験は平成21－22年度に事業化を見込んでいる。また、その他の事業に関しても、本プロジェクト終了後の平成22年度および平成23年度には事業化するスケジュールで開発を進めている。



事業化のタイムフレーム

(1)ES細胞由来の心筋細胞を用いた毒性試験(QT延長)

①事業化の進捗状況

本プロジェクトは平成 17 年からスタートし、当初はヒトES細胞に性質が類似したカニクイザルES細胞を用いて研究開発を進めてきた。それと同時に、ヒトES細胞の使用許可申請の手続きを進め、平成 18 年 10 月に文部科学大臣の確認を経て、ヒトES細胞の使用が可能となった。

サルES細胞から心筋細胞への分化誘導技術に関しては、平成 17-18 年の2年間で大きな進捗が見られ、平成 19 年度に、創薬における副作用試験のひとつである QT 延長試験に使用するための心筋細胞分化技術のライセンスアウトが可能となった。平成 19 年度上半期にはライセンスを希望する企業に対してライセンスの供与を行う予定であり、すでに株式会社リプロセルへのライセンスが決まっている。リプロセル社では平成 20 年 4 月には、サルES細胞を用いた QT 延長の受託事業を開始する予定である。幹細胞創薬研究所としては、プロトコルの作成および細胞株の譲渡等を含め積極的に技術供与を行い、ライセンス先企業の速やかな実用化・事業化を促進する。

更に、アステラス製薬株式会社、田辺製薬株式会社等の医薬品メーカーにおける実用化に関しても、積極的に推進する。

現在開発中のヒト ES 細胞を用いた心筋細胞への分化誘導技術に関しても、上記と同様の方式でライセンスを行い、事業化につなげていきたい。

②市場ニーズ

本技術のニーズは極めて高いと考えている。近年、新薬創製の研究開発費が増大している一方で、新薬承認件数の減少等により、創薬に関わる企業負担と開発リスクが増大している。そのため、製薬企業では新薬創製の各段階で効率的な方法論を積極的に導入し、膨大な候補化合物から新薬の種を見つけ出しているが、初期試験を合格する候補化合物は、臨床試験に移行する以前に実施する動物実験等のキャパシティに比して多く、開発プロセスの早期での開発候補品の簡便な絞込みが重要であると考えられるようになってきている。しかしながら、早期に候補化合物を絞り込むための指標不足という課題にも直面している。そこで、新薬候補化合物の絞込みには主たる薬効によるもの他、創薬後期に開発中止となる可能性のある化合物をできるだけ早期に切り捨てられるかに注目し、早期安全性も重要な判定基準となると考えられるようになってきている。

新薬の安全性の判定には、いくつか重要な項目があるが、その一つが心電図における QT 間隔の延長である。QT 延長は、過去 20 年間で米国で販売中止となった 25 薬剤のうちの 5 つの原因とされ、現在最も克服しなくてはならない副作用の一つであると考えられている。

現在、早期に QT 延長のリスクを排除するために、hERG 試験と呼ばれる試験法が広く適用されている。これは QT 延長に関わる多くの既知の薬剤が hERG(human ether-a-go-go related gene)チャンネルに結合してその活性を抑制することに起因するということが明らかになってきたからである。そこで hERG チャンネルを HEK293 細胞等の哺乳類培養細胞に発現させたものを用いることで簡便な試験法が開発された。しかしながら、それで完全に QT 延長の危険性を排除できるかといえば必ずしもそうではない。QT 延長をひきおこす化合物が必ずしも hERG チャンネルを介

するとは限らないためである。また、強制発現細胞を用いることで、感受性を上げているが、その感受性の高さ故に有望被検化合物がこの評価系で偽陽性となり開発から外れてしまうこともある。また、この細胞は拍動能を有していない。

このような組換え細胞に対して実験動物から摘出した心臓組織をもちいて評価するという方法もあるが、ヒトやヒトに近縁の動物種から安定した心臓や心臓由来の細胞が得られず処理能力は格段に下がるだけでなく、調製ロット差が試験ごとに発生するという問題もあり、化合物当たりの試験例数に乏しい開発早期に使用するだけの適合性に乏しい。

そこで、ヒトと同じ霊長類のサル ES 細胞から分化した拍動心筋細胞を用いて、実際に細胞外電位を測定することで心電図様のシグナルを得、QT 延長を測定することで、hERG 試験法や動物からの摘出組織の成績を上回ることができ、臨床試験への高い外挿性が期待できると考えられる。本プロジェクトにより、世界で初めて ES 細胞技術を用いた創薬試験への実用化・事業化が達成される。

新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の特性を検討するための非臨床試験・臨床試験の実施方法やルール、提出書類のフォーマットなどを標準化することにより、製薬企業による各種試験の不必要な繰り返しを防いで医薬品開発・承認申請の非効率を減らす日米 EU 医薬品規制調和国際会議である ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の提唱するヒト薬品の再分極過程に関連した頻脈性心室不整脈評価に関する非臨床試験ガイドラインにおける in vitro 試験で、医薬品開発早期に QT 延長の可能性を検出できることが求められている。このような制度上の要請もあり、製薬各社は簡便さと正確さのバランスのとれた試験法の出現を強く望んでいる。

現在、年間の医薬品の開発に5兆円が投じられ、毎年 8~10%の成長ということと、安全性薬理が現在重要な位置を占めることや現在実施されている試験法のコストなどから少なくとも本試験法の市場は 500~1000 億円規模であると見積もっている。

(2)ES細胞由来の肝細胞を用いた代謝毒性試験

①事業化の進捗状況

上述のように、肝細胞への分化誘導技術の開発に関しては、スケジュールどおりに進んでおり、今年度は成熟肝細胞取得に向けて大きな成果をあげることができた。今後、更に開発を進めることで、目標である平成 21 年度には薬物の代謝・毒性試験に応用できる肝細胞を得ることができると考えている。肝細胞のアッセイ系についても同様に、構築の見通しが立つであろう平成 21 年度には、事業化を希望する企業にライセンスアウトする準備を進め、ライセンス先企業において速やかに事業展開が可能なようにサポートする。

②市場ニーズ

心筋毒性と同様に重要な肝細胞を用いた代謝・毒性試験であるが、創薬初期段階から薬効のみならず心筋細胞や肝細胞を用いて安全性・薬物動態を総合的に評価する事は有用な医薬品を効率的に創生するのに重要である。医薬品開発候補化合物の選択には、多面的な科学領域からの総合的な評価が望まれているからであり、従来型の段階評価ではない平行評価が HTS の実

用化に伴い求められている。すなわち、創薬の初期に安全性、薬物動態、物性に関する評価をすることが可能となる心筋細胞の安全性試験および肝細胞の動態・毒性試験を構築することに対する必要性の理解は深まっているが、さらに HTS に応用できる世界でも類を見ない肝細胞アッセイ系の可能性については少量で多種の化合物について評価する必要性が出てきた昨今の創薬に対応した技術構築であり、産業化に即している。

今後、「良い薬」の創生には創薬の早い段階からその時代の科学を駆使してその薬効と安全性を総合的に評価する手法が主流となっていく。医薬品開発候補化合物の評価は、多面的にかつ総合的科学的領域からのアプローチが望まれ、心筋および肝細胞の技術構築の完成は各々単独技術の創薬現場に与えるインパクトよりも大きな相乗効果も期待できる。また、肝細胞技術は試験の性質上、心筋細胞よりもさらに簡便なハイスループットアッセイが構築可能であると考えられ、グローバル展開も急速であると予想しており、普及は速いと考えている。現在国内では肝細胞試験は 1000 億円以上の受託市場性を見込んでいるが、海外展開によりこの数倍以上の市場が見込まれている。

(3) 神経疾患モデル細胞および血液脳関門モデルによるスクリーニング

上述のように、神経への分化誘導技術および血液脳関門モデルの開発に関しても、スケジュールどおりに進んでおり、平成 21 年度完成を目指して研究を進めている。現在、有効な治療方法や適当なモデル系がないために効率的なスクリーニング系が存在しない中枢神経系に作用する薬剤開発あるいは中枢での動態研究は他の疾患領域と比べ創薬研究が進んでいない。しかし、ALS やアルツハイマー病をはじめ多くの疾患で苦しんでいる患者は多く、例えば ALS では 10 万人に 8~10 人といわれ治療薬のない難病であるし、アルツハイマー病(型認知症)の推定患者数は、米国で 250 万人、欧州で 150 万人、日本で 70 万人とされ、2010 年代半ばには、その患者数は 1.5 倍に増加すると予測されている。満足する治療薬に乏しいこれらの疾患の治療薬を探索する系を構築しうる本技術開発は、創薬研究では不可欠な技術となるため事業化へのハードルは低いと考えている。

(4) 我が国の医薬品業界への貢献

日本の医薬品大手の研究開発費は2003年時点で7000億円を超えたが、世界の医薬品の研究開発費は5兆円規模である。一社平均では欧米企業の3000億円に対し、日本企業は400億円前後であり、研究開発費の規模の差は歴然である。一方、医薬品開発には薬効試験や安全性試験が研究開発(企業)規模の差とは無関係に同様に課されており、開発品数を絞ろうとも、薬理試験や安全性試験の構築・維持は欧米列強と自社開発する限りは同等のコストが必要である。一方で、売上に対する研究開発費の比率は、欧米も日本の企業もほぼ同じレベルであるので、試験系の構築・維持により医薬品そのもののプロジェクト数が圧迫されている。

このような背景の中、創薬初期段階から薬効のみならず安全性・薬物動態を総合的に評価する事で、開発期間および開発コストを大幅に圧縮する新規技術の開発が望まれている。ヒト ES 細胞は、正常な状態を保ったまま、無制限に増殖でき、かつ、幅広い種類の細胞(例えば、神経、

心筋、肝、血管等)に分化する能力を有しているという点で、創薬技術において、「究極の理想」となる可能性がある。

世界的に見ても、ヒト ES 細胞の可能性に注目が集まっており、早期創薬技術を議論する世界最大の学会、Society for Biomolecular Sciences の2007年大会においても、ES 細胞の早期創薬への応用可能性が議論され、より自然な細胞で、かつ HTS 可能な ES 細胞の創薬研究応用は世界中が渴望している技術であることが確認されている。特に、サルやヒトといった霊長類 ES 細胞を用いた創薬基盤技術の一刻も早い実用化が望まれている。世界でまだ事業化に成功している例はないため、おそらく本プロジェクトの事業化が日本発の世界最初の霊長類 ES 細胞の応用事業となるであろう。

規模で劣る日本の製薬企業において、ヒト ES 細胞を用いた本創薬基盤技術は重要な競争力源泉となりうる。本プロジェクトの技術により削減できた研究開発費を新薬開発に投入することで、より多くの新薬開発が期待され、国民の健康福祉の向上に大きく貢献することになる。

1. 1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

1. 1. 1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 京都大学

細胞の遺伝子を導入するという一見単純なプロセスにも関わらず遺伝子導入法(遺伝子導入試薬を含む)は未だ日進月歩に開発されている。適した遺伝子導入法が細胞ごとに異なるということ踏まえると、開発メーカーにとっては需要が期待できる細胞株を中心として開発を行っているのが現状である。京都大学では市販のリポフェクション試薬について検討を進めてきたが、これらの試薬はいずれもヒトES細胞をターゲットとして開発されたものではなく、改良の余地が大きいと言える。ヒトES細胞の扱いには独自の経験が必要であり、開発にはメーカーが独自に進めるよりは、ノウハウを持っている我々と共同して開発を進める方がはるかに効率的である。今後、ヒトES細胞の研究がより広く普及されれば、遺伝子導入はほとんど不可避の技術となり、ビジネスモデルを展開できるマーケットとして認識されていくことが期待できる。実際、今回我々がFuGENE HDを見出した際に、製造開発元であるRocheは、この成果を第46回北米細胞生物学会で発表する機会を我々に与えており、開発メーカーにとってもヒトES細胞は魅力的な対象であることは間違いない。従って、我々としては5年度、10年後ヒトES細胞での研究が大きく展開してくる時期に、その機会を十分に活用できるように、ノウハウの蓄積とさらなるレベルアップに努めていくことが重要である。

(2) 幹細胞創薬研究所

エレクトロポレーションにはBio Rad社のGene Pulser Xcellを用いているが、このアプリケーションとして、本研究によって確立された条件や試薬をパッケージにしたキットの発売が可能となる。

(3) 埼玉医科大学

本実験で得た結果により、他グループの研究を一層推進することが期待される。例えば、京都大学のグループが開発した遺伝子発現制御法並びに遺伝子ノックダウン法をヒトES細胞においてより効率良く応用するためには、それらの遺伝子発現カセットを高い効率で細胞に導入する必要があることは明白である。さらに、目的によってはレンチウイルスベクターを用いることで、薬剤選択なしでもほぼ100%の細胞で安定な遺伝子発現が得られることを示した。他テーマで開発したの分化誘導法をさらに高効率化する上で、ウイルスベクターを用いた一過性並びに安定な遺伝子導入法が必須となると考え、実際に熊本大学桑グループと連携し、肝細胞への分化誘導を増進する候補遺伝子 (HNF1 α , HNF4 α , LAP) 及び阻害する候補遺伝子 (LIP) を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれ作製し、肝細胞誘導技術の開発に実用化された。また、ヒトiPSへの遺伝子導入効率もほぼ同等である事を示し、ヒトES細胞を用いて確立した遺伝子導入技術が、そのままヒトiPS細胞を用いた研究に実用化できるをと考えられる。

1. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

埼玉医科大学

(1) 京都大学

マウスES細胞では相同組換えベクターの構築までは自前でやるものの、それ以後は外注というものがはや世界的に当たり前となってきている。ヒトES細胞においても相同組換え技術がさらに今後進歩すれば、同様な状況になっていくことが期待される。ヒトES細胞の培養にもその取り扱いに熟練した経験が必要であることを考えれば、遺伝子相同組換えを行った心筋細胞、肝細胞へ分化誘導した細胞を提供するというビジネスモデルは十分に考えることができる。

(2) 幹細胞創薬研究所

ヒトES細胞への遺伝子相同組換えを、ウイルスを使わずに再現よく行なえるのは、世界中で我々のみがつ技術だと言っても過言ではない。また、創薬研究や医療応用の見地から、ヒトES細胞への相同組換えは、多くの人が望んでいる技術である。これらのことから、独占的にヒトES細胞への相同組換え技術を有することは大きなメリットであり、我々が展開する創薬スクリーニングのアプリケーションのみならず、相同組換えによって樹立された“使いやすい”ヒトES細胞を、研究や臨床のニーズを満たした形に加工するビジネスにも応用の可能性がある。

(3) 埼玉医科大学

ウイルスベクターを用いる相同組換え法の長所として、細胞数や細胞種の影響を受けにくいことが挙げられる。すなわち、より少ない細胞数(特に分離・培養が困難な一部の幹細胞)での相同組換えや、多様な幹細胞や分化細胞への応用も比較的容易であると考えられる。実際にヒトiPSへの応用可能であることを示した。これらベクターの使い分けとして、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは、染色体上のランダムな部位へのベクターの組み込みに対して相同組換えの割合が33%~90%と極めて高く、またES細胞での遺伝子発現量に左右されない。すなわち、どんな遺伝子座に対しても相同組換え体のスクリーニングが容易であるため、分化細胞特異的な遺伝子座にマーカー遺伝子をノックインし、分化誘導効率を可視的にモニターできる細胞の樹立や様々な遺伝子ノックアウト細胞の樹立に至適である。また、ES細胞で発現している遺伝子を標的としたモデルES細胞の創製には、プロモーターラップ法が使えるため、産生の容易なAAVベクターが向いている。レンチウイルスベクターを用いた相同組換えの応用については今後の検討課題である。

本プロジェクトで確立した『ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた高効率なヒトES/iPS細胞への相同組換え法』のノウハウを企業にライセンスアウトし事業化を進めている最中であり、本技術を用いたビジネスモデルの構築を目指している。一方、アカデミックな機関に対しては、これらのノウハウを無償で提供し、共同研究ベースでベクターの作製を引き受けている。実際に、複数の研究室と共同研究を行い、様々なヒトES/iPS細胞のノックイン・ノックアウト細胞の樹立を進めている。

1. 1. 3 ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

細胞分化は、複数の遺伝子群が分化ステージ特異的な発現制御を受けながら進行していると考えられる。単一の遺伝子により分化方向が決定される例は、骨格筋細胞における MyoD 遺伝子などごくわずかであり、心筋細胞や血管、神経細胞などで MyoD に相当するマスター遺伝子は同定されていない。したがって、ES 細胞を恣意的に分化誘導して目的の細胞を得るためには、複数個以上の遺伝子を同時に制御できることが望ましい。

現在マウス ES 細胞において構築を進めている「誘導性ノックダウンレスキューシステム」(研究成果2. 1. 3参照)は、複数の遺伝子の発現抑制と過剰発現が分化途上の任意の段階において誘導性に行うことが可能であり、ES 細胞分化誘導においてとりうる戦術選択を飛躍的に増大させると考えられる。実際 cDNA 発現システムを用いて血管細胞の分化・多様化を制御することに成功している(Yamamizu, Blood, 2009; J Cell Biol, in press)。同システムをヒトES細胞に導入することにより、様々なヒトモデル細胞を恣意的に誘導することが可能になると考えられる。本プロジェクトが目的とする研究用モデル細胞の創製の基盤となる技術と考えられるとともに、同システムを用いた様々なヒトモデル細胞の開発が期待される。

1. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞から神経系細胞への効率のよい分化誘導方法が確立されると、本事業の目的である研究用モデル細胞創製の基盤技術としての利用ばかりでなく、細胞移植による再生医療研究にも寄与することができる。つまり効率の良い分化誘導技術が開発できれば、ヒト ES 細胞から分化した神経細胞を用いる再生医療研究への波及効果が考えられる。また、現在、再生医療の研究は主にマウス ES 細胞を用いているが、マウスとヒトには明らかな種間の差が存在する。細胞移植が実際に行われるまでにはまだまだ多くの課題を解決しなければならないが、種間差の問題はマウス細胞だけを用いても解決することは難しいと思われる。そのため、ヒト ES 細胞が使用できない機関においては、ヒト ES 細胞由来の神経細胞は非常に魅力的な研究対象であり、それを供給するような事業化は考える。そのことにより、異なった種間での相違点を明らかにするための比較研究が推進されることが期待できる。また、ヒト ES 細胞で確立された分化誘導技術は、そのままヒト iPS 細胞へ適応可能であることも本プロジェクトで示すことが出来た。確立された分化誘導技術のノウハウ利用し、ヒト iPS 細胞からの分化細胞の販売などを事業化することも考えられる。

ES 細胞から分化細胞への分化過程は、実際に胚で起きている発生過程を再現しているという研究報告が多々ある。よって、ヒト ES 細胞から神経系細胞への分化誘導技術を用いることで、ヒトの神経発生分化の分子機構の解明を行うような基礎研究分野において利用されることが期待される。さらにヒトの神経発生の分子機構が解明されると、その結果が分化誘導技術の更なる改善や創薬研究へのフィードバックになると予想される。

1. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

(1) 京都大学

心臓には、洞房結節に存在し拍動を規定している PM 細胞、PM 細胞からの電氣的刺激を伝える刺激伝導系、ポンプ機能の中心として働く心室筋細胞など多様な心筋細胞が存在しており、その特性や心機能における役割は全く異なっている。モデル心筋細胞を創製する場合にはこうした心筋の多様性を考慮し、それぞれ機能特化した心筋細胞を用意することが望ましい。研究成果 2. 2. 2にあるように、心筋ペースメーカーとしての特性を明らかにし、その特性発現に関与している遺伝子発現を制御することにより、ペースメーカーが特異的に分化誘導できる可能性を見出したことは、機能特化した有用なモデル心筋細胞の創製に重要な意義を有する。2. 1. 3. ヒト ES 細胞における RNA 干渉法による遺伝子発現制御技術の開発を中心とするヒト ES 細胞の加工技術を応用することにより、ヒト心筋ペースメーカー細胞を誘導し、不整脈誘起などに対する薬剤安全性試験に利用可能なモデル細胞の開発が期待される。iPS 細胞からの分化誘導システムの構築、

特にヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞の誘導は、細胞治療による再生医療応用の可能性及び患者由来 iPS 細胞から誘導した疾患モデル心筋細胞の樹立の基盤技術として広く応用可能と考えられる。またサイクロスポリン A による効率的な心筋分化誘導法は、マウス ES 細胞からヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞に至るまで応用可能であること及び特許申請済みであることから心筋分化誘導の基本的アイテムとして応用・実用化が期待される。

(2) 幹細胞創薬研究所

これまでにサル ES 細胞由来の心筋細胞の細胞外電位測定と典型 3 化合物の本細胞への評価は終了している。これらの結果について希望する企業に秘密保持契約下で公開し、本技術のライセンスを希望する機関にはライセンスアウトを行う。公開した情報だけでなく、ライセンス先企業が今後の事業化のための検討に際して必要な技術供与を幹細胞創薬研究所が行い、ライセンス先の企業が幹細胞創薬研究所で確立された方法をベースに本試験法を実施できるようになることを目的とする。ライセンス先企業は、さらなる典型化合物の評価および品質管理、スケールアップの検討を実施することで創薬現場での技術評価に導入できるようになる。受託機関であれば製薬企業と共同で最終的に技術開発および事業化を実施し、製薬会社がライセンス先であれば、自社創薬に応用できるようになる。

1. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

熊本大学

(1) 京都大学

肝細胞は創薬研究において中心的な役割を果たす細胞であり、新薬候補物質の体内での代謝及び薬物毒性実験などにおいて極めて重要である。ヒト肝細胞を用いて、アッセイする安定な系が現在までに存在していないことから、京都大学で技術開発を進めているヒト ES 細胞から、肝前駆細胞、そして成熟肝細胞の系を確立し提供できれば、製薬会社などにとって今までにない極めて魅力的な系となることが期待できる。ユーザーにとって、ヒト ES 細胞から成熟肝細胞を自らが調達するよりは、必要時に必要量成熟肝細胞を調達できる方が簡便であり、そのためには成熟肝細胞をコンスタントに供給できるシステムの開発が重要である。我々が樹立した MLSgt20 細胞株はそのような将来的展開を可能にする。と、同時に共培養におけるストローマ細胞が肝細胞の成熟化にどのように関わっているのを分子学的に明らかにしていくことも可能となってくる。本研究でも既に生理的応答性を持つチクローム P450 酵素活性を有するヒト肝細胞様細胞が得られているが、成熟化の分子機構を応用し、さらに本プロジェクトの人工基底膜や疑似マトリックスなどの成果を組み合わせることで、共培養を経過しない肝細胞成熟化をより効率的に行うことも可能になることが予想される。また代謝アッセイや薬物毒性実験など得られる数値データもノイズの少

ないシャープなものが期待できる。

(2) 幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞の医療・創薬への応用を推し進めている Geron 社、Cellartis 社がそれぞれヒト ES 細胞由来の肝細胞を用いた安全性薬理試験を手がけ始めたように、従来ヒト由来肝細胞で問題となっていた細胞の供給量・供給時期や細胞のロット差等を解決できる手段として、ヒト ES 細胞由来の肝細胞は期待や要求が大きいものと考えられる。本プロジェクトでは、京都大学で樹立された日本人由来のヒト ES 細胞株を用いて安全性試験に利用可能な肝細胞を分化誘導させることを目指しており、日本人に投与する薬剤を調べる系を確立する意味で大変有用性の高いものを提供できるといえる。現段階で、主たる薬物代謝酵素(CYP)の発現が確認できたので、各々の酵素活性が測定可能なレベルにあれば化合物の CYP 阻害・誘導実験に供することが可能となり、安全性試験系の実用化の目処が立つと考えられる。また、これらの酵素群のプロモーターにルシフェラーゼや GFP などのレポーター遺伝子をつないだものを細胞に安定導入することにより、HTS 化することも期待できる。

最終的に薬剤応答をリアルタイムで検出する系が望ましいが、その前段階としての CYP3A4/7 発現レベルの変動を免疫染色で捉えることができた。さらに small scale での分化誘導にも成功しているため上記のようなプロモーター/レポーター細胞が構築できれば本プロジェクトで構築に成功した心筋分化促進物質 HCS システムと同様なシステムが開発できると期待される。

(3) 熊本大学

本プロジェクトでは、支持細胞を用いてヒト ES 細胞からある程度の成熟した肝細胞を創出できることを確認している。現在「ES 細胞の分化誘導方法」という題目で特許出願した。支持細胞から分泌される肝臓分化促進因子について、同定する作業を今後進めていくが、これを同定することができれば、無細胞系を用いた分化誘導技術として事業化が出来る。ヒト ES 細胞から創製した成熟肝細胞が創薬スクリーニングのモデル細胞として有用であることはもとより、このような分化促進因子は、将来再生医療への応用の可能性を秘めている。

今回開発したヒト ES 細胞の肝細胞分化誘導技術は、正常発生と似た過程を試験管内で再現させていると考えられる。今後ヒト ES 細胞から創出した肝細胞について、分化途上の細胞と終分化の細胞など、いくつか分化段階の異なる細胞を回収し、それぞれについて遺伝子プロファイルを調べることで、ヒトの肝臓の発生分化に関わる遺伝子について多くの発現情報を得ることができる。これまでのヒトの発生についての研究は、倫理的な観点から材料が手に入りにくい状況であった。ヒト ES 細胞からの分化誘導の技術開発により、発生段階に沿ったヒトの肝臓の遺伝子発現情報の蓄積が可能となる。このような発生段階に沿った遺伝子情報の蓄積が将来創薬のみでなく、医学的に有用であると期待される。

もう一つの特徴として、M15 細胞の系は、肝前駆細胞を大量に増幅させるためにきわめて有用な手法である。将来大量にかつ簡便に成熟ヒト肝細胞を培養する技術開発を進めることにより、モデル細胞として使用できる可能性が高く、きわめて有用な技術である。また、sBM を用いた方法

は「細胞の分化誘導」という題名で特許出願した(特願 2009-136520)。sBM を用いる方法は無細胞系により分化誘導できるため、肝成熟化に効果のある薬剤のスクリーニングにも使用出来ると考えられる。

1. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発

大阪大学

共同実施： 日本皮革研究所

本課題では、細胞ごとに最適化した分子構成の人工基底膜を構築し、ES細胞を特定の細胞系譜に分化誘導制御する技術開発を目標とした。平成 18 年度～平成 21 年度の4年間で得られた成果は、「Ⅲ. 研究成果について」に記載の通りであるが、その中から実用化・事業化につながる重要なシーズがいくつか生まれている。その一つは、組換えラミニンおよびそのフラグメントを利用したヒトES細胞用フィーダーフリー培養基材である。京都大学との共同研究により、ヒトのラミニン-332 およびラミニン-511 がヒトES細胞および iPS 細胞のフィーダーフリー培養基材として有効であることが確認されている。ヒトES細胞の現在の標準的培養法は、マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として用いるものであり、ヒト iPS 細胞でも同様の培養方法が用いられている。しかし、高品質のフィーダー細胞を安定に確保することは容易ではなく、また安全性確保の観点からも問題がある。ヒトES/iPS 細胞のフィーダーフリー培養基材の開発は喫緊の課題である。組換えヒトラミニンおよびそのフラグメントを利用するフィーダーフリー培養基材は、この問題を解決する重要なブレークスルーである。組換えラミニンおよびそのフラグメントの大量生産に向けての技術開発が今後さらに必要であるが、数年以内に組換えラミニンおよびそのフラグメントを用いるヒトES/iPS 細胞用フィーダーフリー培養基材の実用化が可能であると考えている。

二つめのシーズは、I 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの混成ゲルを利用した 3 次元培養基材である。コラーゲンを直接ポリスチレンプレートに被覆した 2 次元基質よりも、3 次元コラーゲンゲルを基質とした方が細胞の機能がよく維持されると報告されている。生体内環境を反映した 3 次元ゲルに対するニーズは益々高まっている。しかし、現在広く使われている I 型コラーゲンゲルは上皮系細胞に対しては有効ではなく、基底膜様活性をもつ 3 次元ゲル基材の開発が求められている。本研究で開発した I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルは、I 型コラーゲンゲルの物理的強度と IV 型コラーゲンの基底膜分子保持活性を併せ持っており、上皮系細胞の 3 次元培養基材としては極めて有用である。I 型/IV 型コラーゲン混成ゲルおよびそれにラミニン等を組み込んだ第一世代/第二世代人工基底膜は、ヒトES細胞に限らず、様々な臓器の実質細胞や幹細胞の培養基材として高いポテンシャルを有している。幅広い細胞を対象とした 3 次元培養基材としての製品化に近い将来可能であると考えている。

三つ目のシーズは、マウス胎児の全組織にわたる基底膜の分子組成プロファイル情報である。現在収集しつつある成体組織でのプロファイル情報、特に臓器幹細胞近傍の基底膜のプロファイル情報は、幹細胞ニッチの実体解明の糸口となり、臓器幹細胞を利用する様々な再生医療の実現につながるブレークスルーとなり得る。これまでに収集されたマウス胎仔および成体マウスでの

基底膜の分子組成プロファイル情報は、それ自体をライセンス化することにより、事業化の対象となり得る。胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日のマウス胎仔における主要 41 種類の基底膜分子の局在情報が免疫組織染色画像としてデータベース化され、現在、インターネットで閲覧可能な状態にある。

1. 2. 5 擬似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

非公開

1. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学

共同実施:環境研究所

大阪大学

日本皮革研究所

事業目的と背景で述べたように、ヒトを含む霊長類ES 細胞では通常支持細胞であるフィーダー細胞を用いて維持されるが、このような支持細胞を完全に除去することは難しく、創薬スクリーニングに必要なモデル細胞への分化誘導を遅延あるいは阻害している可能性もある。またヒトES細胞を分化誘導し、その後治療に使う場合にも、フィーダー細胞なしに培養維持されたヒトES細胞を用いることが望ましい。このようにヒトES細胞をフィーダー細胞なしに培養できる技術が開発されれば、それがもたらすビジネスチャンスは非常に大きいと期待されている。

現在フィーダー細胞なしの培養として最も効果があると考えられているのは、マトリゲルである。実際、京都大学をはじめ多くの研究室でES細胞の未分化維持あるいは分化誘導に対する評価系としてマトリゲルを定期的に購入し、使用している。したがって、マトリゲルと同等の細胞外基質を見出すことができれば、これにとって代わることが期待できる。またマトリゲルには不確定成分を含まれることまた臨床的応用ができないことを踏まえると、マトリゲルほど効果がなくても、十分な効果があれば、商品として十分に成立できる。このように細胞外基質は、今後ビジネス展開が非常に期待できる分野の一つであるといえよう。

ヒトES細胞株一つ一つに個性があると考えており、ES細胞の未分化維持にあるいは分化誘導に適した人工基底膜や疑似マトリックスは若干異なる可能性もある。しかし、例えばKhES-1、KhES-2、KhES-3の内、一株だけでも強い効果が特定できれば十分商品として成立すると考えられる。第一に、培養に合わせてフィーダー細胞を用意するということから開放され、ユーザーにとって時間を節約できること、またそれに関わる人件費などの削減も可能になるからである。商品としては、溶液あるいは培養ディッシュに予めコートしたものになると思われるが、いずれのケースでも継続した消耗品として使われる、すなわちユーザーが継続的に購入することが期待される。また効果のない細胞株においては、何らかの未知の構成成分が不足していることが考えられる、それ

を見出すことで他の細胞にも十分効果のあるものが期待でき、さらなる開発を効率よく進めることが可能になる。

1. 3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

1. 3. 1 研究用モデル細胞の構築

1. 3. 1. 1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

ヒト ES 細胞から創製される神経変性疾患のモデル細胞は、新薬のスクリーニングや安全性などの創薬研究の効率化のための基盤研究に使用することができる。また、本プロジェクトで構築された神経変性疾患モデルは、家族性疾患の原因遺伝子を用いているが、家族性神経変性疾患の病理と孤発性のそれには類似している点が多くあるため、家族性ばかりでなく孤発性の神経変性疾患の発症機構の解明のための基礎研究にも利用することができるなど、汎用性は非常に高いと思われる。よって、それらの研究を支援、促進させるモデル細胞またはモデル構築技術の供給を行うような実用化は考えられる。モデル細胞構築に関しては特許も申請済みであり、今後の実用化、事業化に向けて研究を進めている。

同様な展開をもって、別の神経変性疾患のモデル細胞を遺伝子発現制御技術や相同組換え技術の連携によって構築することも可能になると考えられ、今後本プロジェクトで示されるであろう成果の技術的な波及効果は大であると思われる。

1. 3. 1. 2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

in vitro 血液脳関門モデルの実用化形態としては、製薬企業の創薬活動の効率化を図る創薬支援ツールとしての活用以外に、薬物動態受託アッセイのスタイルが考えられる。ヒト生体の BBB 機構を反映し、BBB 透過を簡便かつ精度よく評価できる in vitro システムがあれば、候補薬の脳内移行性や中枢副作用の可能性を創薬プロセスの早期段階で予見できる評価系として創薬の迅速化や成功確率の向上など医薬品開発の効率化に大きく貢献することが期待される。また BBB は、アルツハイマー病や脳卒中など様々な中枢神経疾患の発症や病態と密接に関与している。これら病態下では、BBB 機能は破綻もしくは機能低下しており、健常時とは異なる BBB 透過性を示す。in vitro で病態を再現することで、疾患の発症や病態を解析や新しい治療法の確立、罹患時における BBB 透過の評価に活用することも可能となる。こうしたニーズに応えるべく、海外ではラットなど動物由来細胞で構成された BBB モデルを用いた受託アッセイビジネス展開がいくつか認められる。また本邦でも、大学発バイオベンチャーが READY-TO-USE のラット BBB モデルキットの商品化を行う事例が見受けられるが、ヒト生体機能(ヒト BBB 特性は動物のそれとは異なることが既に知られている)を忠実に反映できるヒト型モデルの実用化例は未だ報告されていない。

ヒト ES 細胞の分化誘導によって得られる血管系細胞、神経系細胞を用いて構築される BBB モデルは、言うまでもなくヒト型(ヒト細胞で構成されたもの)であり、また材料となる ES 細胞の無限増殖性と多分化能の特長を反映した量産性、安定性、遺伝的背景の均質性など実用化上のアドバンテージが十分に期待できる。よって、ヒト ES 細胞から創製され BBB 機能を再現した BBB モデルは、安定的かつ量産性に優れた信頼度の高い評価系として、その実用化・事業化の期待度は極めて大きいと考えられる。

1. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞の心筋分化誘導技術の開発は、心臓再生医療の実現やインビトロでの心疾患薬効評価試験、あるいは薬剤安全性試験の確立の鍵を握るものである。特に、心臓に対して心不全や不整脈など重篤な副作用を引き起こす薬物が多いことから、心毒性試験に用いることのできる均一な心筋細胞の供給が求められている。これまで、ヒトES細胞を心筋細胞へ分化させる手法として、マウス由来の支持細胞であるEND2細胞との共培養や、ES細胞から胚様体を形成し、そこに数種類のサイトカインを添加する方法が報告されているが、心筋細胞へのマウス由来細胞の混入の問題や、サイトカインのコストの問題、さらに分化効率が十分でない等の理由から、再生医療や薬剤安全性試験への実用化には至っていない。

本研究での心筋分化誘導促進物質探索HTS技術の開発によって、約1万検体の化合物ライブラリのスクリーニングから心筋分化誘導促進物質として化合物Xと化合物Yが見出されており、そのうち化合物Xについては既に特許出願済、化合物Yについても物質特許を申請予定である。これらの心筋分化誘導促進物質の発見により、支持細胞を使用することなく、多能性幹細胞を心筋細胞へ分化誘導し、純粋な心筋細胞を得ることが可能となった。また、既知の方法と比較して高効率かつ低コストに心筋細胞への分化を誘導し、心筋細胞を製造することが可能となった。これらの化合物は、薬剤安全性試験として重要なQT延長試験を高速スクリーニング系で行うため、あるいは心疾患に対する薬効評価に用いる均一かつ成熟したヒト心筋細胞の大量生産や、心臓疾患などに対する移植用心筋細胞の生産に特に有用であり、これらの技術の実用化へ向けて大きな寄与をもたらすものである。

このように、本研究の開発によってもたらされたGFP蛍光変化の検出システムが活性化化合物を実際に検出できたことは、再生医療や創薬分野への応用に対し大きな意義がある。すなわち、このHTSシステムを、多能性幹細胞における特定の遺伝子発現変化を指標にした活性化化合物の検出に普遍的に応用することが考えられる。特定の遺伝子プロモーターを持ったGFP遺伝子を発現する多能性幹細胞を作製することで、心筋細胞のみならず、神経系や肝細胞等の分化系あるいは病態モデルにおいてもGFP蛍光を利用したHTSシステムを適用することが可能となり、多種の細胞・組織に関する薬効化合物を効率的に検出できる汎用的な創薬スクリーニング技術として、本研究の実用化が期待できる。

1. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

1. 細胞利用のための細胞精製技術の事業化への展開

ヘテロな集団である細胞集団を精製して再利用する技術の実用化は、細胞を利用するさまざまなバイオ産業において、必須の基礎技術となるものである。ここで重要なことは、抗体のような不可逆なバイオマーカーラベル技術ではなく、無修飾あるいは可逆修飾技術による細胞の識別を可能にすることである。

(1) 画像データによる細胞精製技術の実用化

画像処理ベースのセルソーティングによって従来の比重遠心法などでは精製が困難であった神経細胞とグリア細胞の精製、心筋細胞と線維芽細胞の精製が可能となった。従来の細胞精製技術は、蛍光標識細胞の精製あるいは散乱光の特性による細胞の精製という間接情報に頼った精製であり、このように詳細な画像データに基づいて細胞を高速に精製する技術は、いまだ業界において認知されていない。これは、細胞の画像データベースの不足に起因するものと考えられる。本プロジェクトにおいて画像データベースを充実させることで、新しい細胞画像データに基づいた細胞精製技術の業界標準を目指すことが可能と考えている。

(2) RNA/DNAアプタマーによる可逆標識技術の実用化

細胞表面に存在するさまざまなバイオマーカーを的確に識別することは、上記、画像ベースでは判別できない、より詳細な細胞の分化状態、表現型の識別をするのに有効であるが、従来の抗体の問題点は、これが不可逆な標識であることである。われわれは、細胞表面のマーカーをターゲットとしたDNAアプタマーと磁気ビーズを用いることで、特定の細胞を選択的に抽出し、抽出後にDNA分解酵素を用いることで細胞に傷をつける事無く細胞を精製する技術の開発に成功した。あとは、細胞表面の特定のバイオマーカーに特異的に結合するアプタマーを精製する技術を実現できれば、抗体に替わる普遍的細胞可逆標識、精製技術が実用できるものと期待している。

本可逆修飾の手法とコンセプトは、われわれのオリジナルであり、すでにEP特許庁からは、基本概念として特許競合無しとのサーチレポートを受け取っており成立の見込みである。

2. 細胞ベースでの心筋毒性検査技術の実用化について

製薬企業等と共同での実用化のためのさまざまな検討を開始している。すでに動物細胞ベースおよび、ヒト心筋(拍動)細胞株を用いた検討を進めており、H19年度から20年度中には実用化の可能性を判断するのに十分な技術検討が完了できるものと考えている。

3. 病理モデル臓器チップの実用化について

心筋細胞については、繊維芽細胞の機能評価を通じて、「心肥大モデル」「リエントリーモデル」の構築の可能性が大きくなってきた。また、細胞の種類や空間配置を制御することによる疾患モデルの構築の試みは、他に無く、本プロジェクトのオリジナルである。これを実用化することで、さらに再現性ある細胞ネットワークという毒性検査・創薬分野における細胞ベースでの計測の優位

性を強調することで、業界標準化技術とできることを目指す。

本課題については、特にFDAおよびICHへの提案を含めて新たな業界標準化技術となるべく海外での学会活動も活発に進めてゆく予定で、FDA および ICH に強い影響力を持った国内の著名研究者との共同研究を推進している。

1. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

本研究の成果は、ヒトにおける薬物動態を定量的に予測できる実験系および評価方法(必要があればそれを実現するためのソフトウェア)まで含めて1つの創薬支援ツールボックスとしてパッケージ化したものとして実用化提案できるのではないかと考えられる。現時点では、動物由来の肝細胞を用いた検討やヒト凍結肝細胞を用いた薬物動態を評価する検討が始まっており、一部は定量的なレベルで *in vivo* 薬物動態を良好に説明できることが明らかとなったが、多様な化合物に関して一般化ができるレベルにまでデータの蓄積を行うには、さらなる検討が必要であると考えている。さらに、動物種差の問題や、ヒト凍結肝細胞の活性の人為的と推測されるばらつき、入手が限られていることなどを考慮すると、現時点ではヒト由来試料を使った創薬初期におけるスクリーニングは採算面から考えても不可能であると考えられる。しかしながら、もしヒト ES 細胞由来肝細胞が異物解毒に関連する一連のタンパク質の発現をある程度維持しており、我々の構築してきた実験系に利用可能であれば、ヒト ES 細胞の特性として事実上無限にヒト由来細胞を供給できる。さらには、遺伝的背景の異なるヒト ES 細胞をバンク化することができれば、もしくは ES 細胞の段階でゲノムの操作(変異導入など)をすることができれば、遺伝子多型による薬物動態の影響を直接ヒトサンプルを用いて大量にアッセイすることが可能となり、広く国内外の製薬会社の注目を集める新規実験系を提案することができると考えている。創薬研究における最も重要な問題のひとつに、ヒト臨床試験にまで到達してはじめて予期せぬことが起こり開発からドロップアウトする薬物があとを絶たないことである。この原因として、ヒトにおける薬物動態・効果・毒性を前臨床の段階で未だに定量的に予測できていないことが挙げられる。もし、創薬初期段階で大量の候補化合物についてスクリーニングをかける段階でヒト試料を大量に用いることができれば、よりいち早くヒトにおける薬物動態・薬効・毒性予測に結びつき、効率よい創薬研究が進むものと考えられる。従って、本成果の最終的な予測ツールは、製薬業界全体の創薬の方法論を根本から変えうるほどの大きな波及効果を持っており、そのことにより資金と時間をより効率よく運用した薬物開発が進むことが期待され、長期的には経済的な面や保健医療行政の面にも波及効果がでることが予想される。

2. 今後の展開

2. 1 研究開発項目①「ヒトES細胞の加工技術開発」

2. 1. 1 ヒトES細胞への遺伝子導入と導入遺伝子発現制御技術の開発

(1) 京都大学

京都大学ではリポフェクション試薬を用いてのヒトES細胞への遺伝子導入法の技術開発、遺伝子、加工技術開発に適したヒトES細胞株の探索、2Aによる同一プロモーターによる複数遺伝子発現制御システムの開発、あるいは導入遺伝子発現制御技術の開発などで成果を上げてきた。

今後、使いやすいサブライン、あるいはTet-On/Offシステムによる遺伝子制御などは引き続き発展させ、遺伝子導入技術に関して確立した技術となるよう向け開発を進めたい。また、ヒトES細胞の研究開発に向けて今後重要となることが予想される新しい技術の開発やその技術のさらなる向上を展開していきたい。またヒトES細胞の増殖が遅いことから、目的の安定遺伝子導入株をいかに効率よくスピーディにスケールアップしていくか、そのシステムの開発を検討していきたい。

(2) 幹細胞創薬研究所

幹細胞創薬研究所では、電圧ポレーション法によるヒトES細胞への高効率な遺伝子導入方法を確立した。今後は、電圧ポレーション法において、我々の開発したプロトコルが基準となることが期待される。

(3) 埼玉医科大学

平成19年度中間評価までは、多くの型のベクターを網羅的にスクリーニングすることを目的とする実験を行ってきたために、ベクターのデザインや産生法について特別な最適化は行っていなかったが、最適なベクターを決定したため、その後は、これらのベクター技術をより一層改良して、又、プロモーターなどのベクター構造をさらに最適化することにより、出来るだけ細胞を痛めずに、100%の効率で一過性もしくは安定に遺伝子を導入する技術の確立を目指した。この結果、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いることでほぼ100%の一過性遺伝子導入効率を、レンチウイルスベクターを用いることで70~80%の安定遺伝子導入効率をヒトES細胞で得た。今後は、本プロジェクトで開発された高効率遺伝子導入技術を、他の研究者が使えるように、幅広く情報提供を行なう。

2. 1. 2 ヒトES細胞における相同組換え技術の開発

(1) 京都大学

京都大学においてもヒトES細胞における相同組換え技術の開発に向けて順調に前進しているが、共同実施研究先でもある幹細胞創薬研究所あるいは埼玉医科大学では、現在までに偶然以外ではほとんど不可能と考えられていたヒトESでの相同組換えを効率よく成功しており、京都大学の方法をブラッシュアップしていくよりは、これらの相同組換え技術を導入していきたい。京都大学としては、平成18年度より始まった新たなプロジェクト(人工基底膜、疑似マトリックスの評価)に本格的に取り組んでいく必要もあり、相同組換え技術を自ら開発していくよりは、開発された技術を導入し、他のプロジェクトに有効利用していく方がプロジェクト全体の成果を上げていく方向にもつながるので、若干の軌道修正をすることにしたい。

(2) 幹細胞創薬研究所

本プロジェクトにより開発されたHPRT遺伝子座への相同組換え体は、その後の遺伝子置換を行なうことで、安定して遺伝子を発現させることができる。研究材料として従来のES細胞よりも格段に使いやすくなっていることから、今後はこの相同組換え体が、遺伝子改変用ES細胞のスタンダードとして使用されることが期待される。

(3) 埼玉医科大学

平成19年度の間評価以降は、至適化したベクター産生条件により調製した高濃度ベクターを用いて、相同組換え効率の改善を試みた。またそれと同時に、他のテーマを支援しながら、実際に相同組換えによって特定の遺伝子座 (*HB9*, *ALB*) にマーカー遺伝子を組み込んだ分化誘導アッセイ細胞の樹立に成功した。今後は、本プロジェクトで確立した技術を、企業にライセンスアウトしてビジネスモデルを構築すると同時に、アカデミアの機関に対しては無償で技術移転を行い、多くの研究機関で使用可能となる事を目指す。しかしながら、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターはその作製方法が煩雑である事が原因でこれまで一般に広く普及してこなかった。そのためベクター作製方法の簡易化を計る事も今後の課題であろう。また、ヒトES細胞を用いて本プロジェクトで確立した技術をそのままヒトiPS細胞へと応用できることが示されたため、ヒトiPS細胞を用いた遺伝子ノックアウト・ノックインや遺伝病患者由来のiPS細胞を用いた変異修復など、ウイルスベクターによる高効率相同組換え法を利用した今後の展開は様々な分野に広がるであろう。

2. 1. 3 ヒトES細胞におけるRNA干渉法による遺伝子発現制御技術の開発

京都大学

①マウスES細胞における「誘導性ノックダウン・レスキューシステム」の構築

まずマウスES細胞を用いて、ヒトES細胞に移行可能なシステムを確立する。

②ヒトES細胞における「誘導性ノックダウン・レスキューシステム」の構築

①の技術をヒトES細胞に導入し、ヒトES細胞分化途上において標的遺伝子発現の制御が可能なシステムを構築する。①の成功とともに、HPRT 遺伝子座への遺伝子導入など、本プロジェク

トにおける他の加工技術の導入を必要とする。3種類の異なる誘導性ノックダウンシステム(テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現系、タモキシフェン誘導性 shRNA 発現系、タモキシフェン誘導性マイクロ RNA 発現系)はさまざまな組み合わせで遺伝子発現の制御を可能とすると期待される。

③ヒト ES 細胞を用いたモデル細胞の創製

②の技術を応用して、様々なヒト ES 細胞由来研究用モデル細胞を誘導する。本プロジェクトにおける分化誘導制御技術の併用・導入を必要とする。神経細胞、心筋細胞、肝細胞等いずれの細胞の誘導に対しても当該技術は有効である。

2. 2 研究開発項目②「ヒトES細胞の分化誘導制御技術開発」

2. 2. 1 ヒトES細胞から神経系細胞への分化誘導技術の開発

幹細胞創薬研究所

本事業の最終目標である神経変性疾患モデル細胞構築のために、本プロジェクトではノギンによるサルおよびヒト ES 細胞から神経幹細胞・神経前駆細胞への分化誘導及び凍結保存に成功している。さらに、神経幹細胞から運動神経細胞など各種の神経細胞への分化誘導へも成功している。今後はその系をさらにブラッシュアップさせ、実用化させるためには分化効率をさらに上げる、また大量培養法の確立も必要である。さらに、他のタイプの神経細胞、例えばコリン作動性、またはグルタミン作動性神経細胞への分化誘導法の確立を行う必要がある。

2. 2. 2 ヒトES細胞から心筋細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施: 幹細胞創薬研究所

(1) 京都大学

① マウス ES 細胞における特異的ペースメーカー細胞誘導法の確立

すでに見出している転写因子(x)の発現抑制(研究成果2. 2. 2)により、実際にペースメーカー細胞が効率的に誘導されていることを明らかにする。誘導された細胞のペースメーカー細胞としての機能ならびに薬剤反応性などを検証する。さらに誘導ペースメーカーの純化法の開発を行う。

②ヒト ES 細胞における特異的ペースメーカー細胞誘導法

①の技術をヒト ES 細胞に導入し、ヒト ES 細胞からペースメーカー細胞を特異的に誘導・純化する方法を開発する。shRNA 発現システムなど本プロジェクトにおけるヒト ES 細胞加工技術の開発と導入を必要とする。

③ヒト ES 細胞を用いた効率的な心筋分化誘導法の開発

現在マウス ES 細胞において見出している高効率心筋前駆細胞・心筋細胞誘導法(研究成果2.

2. 2)をヒト ES 細胞に導入し、これまでにない高効率のヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法を開発する。

④iPS 細胞を用いた心筋分化誘導法の開発

上記ノウハウを利用してヒト iPS 細胞からの心筋分化誘導法を確立する。

これらの研究により、新しい薬剤安全試験や疾患研究が可能なヒト心筋細胞モデルを開発する。

(2)幹細胞創薬研究所

現段階では拍動細胞がどの程度分化しているのか、心臓のどの部位の細胞であるのか、分化後培養日数経過に伴う影響が観察可能であるのかといったことの検討は実施していない。また、心筋分化の効率を上げる検討および、フローサイトメトリーを用いた心筋細胞や心筋前駆細胞の効率的な回収方法の検討を行う。これらの検討についてヒトおよびサル ES 細胞の両方について実施する。また、パッチクランプ法を用いた本細胞の電気生理検討を実施し、電気生理的な本細胞のプロファイリングも行う。さらに、心筋細胞の産業規模の供給をサポートする目的で、心筋分化を促進する化合物を、ハイスループット技術を用いて幹細胞創薬研究所保有 12000 検体を対象に検索した。

ヒト ESC-CMs は、長期再接着培養法や浮遊培養法を用い心機能を増強することで QT 延長試験系に使用できる適切な成体心筋モデル細胞であることが示された。さらに化合物 A を用いることで、成体心筋モデル細胞の短期間で取得が可能となった。今後、本技術を用いたスクリーニング系の開発が期待され、創薬現場にとって有用な技術となるであろう。

2. 2. 3 ヒトES細胞から肝細胞への分化誘導技術の開発

京都大学

共同実施：幹細胞創薬研究所

熊本大学

(1)京都大学

京都大学では肝前駆細胞から成熟肝細胞への分化誘導に対して、マウス ES 細胞からヒト ES 細胞へと展開を進めている。そのため必要となる肝臓特異的プロモーター/レポーターを導入したヒト ES 細胞株を樹立した。また共培養に用いるマウス胎児肝臓由来の間葉系の初代細胞では多量な調達は現実的には不可能であり、何らかの細胞株で置き換えることが重要課題となっている。今後これらのツールを使い、KhES-1、KhES-2、KhES-3 いずれのヒト ES 細胞株を用いても、肝前駆細胞、そして成熟肝細胞への分化誘導ができるように技術開発を進めていきたい。

(2)幹細胞創薬研究所

現在、肝細胞成熟を支持する能力をもつことが確認されたマウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株からクローンを 73 個分離しているので、これらの肝細胞成熟支持能を個別に確認し、さらに成

熟を促進する条件を確立する。また、細胞外マトリクスの存在下で支持細胞との共培養を行うことによりさらに生体に近い肝細胞を創出できる可能性を探る。これらを通じてヒト ES 細胞を高効率に肝細胞へ分化・成熟させる系を確立する。本分化誘導技術を用いて作出された肝細胞の薬物代謝酵素群の活性を測定し、化合物による酵素阻害・誘導の検証系の確立を目指す。

京大での解析で、マウス胎仔肝臓由来ストローマ細胞株から高い肝細胞成熟支持能を持つクローン MLSgt20 が選別できた。一方、幹細胞創薬研究所では M15 細胞との共培養、コラーゲンコート皿での肝前駆細胞の増幅、分散培養での肝機能保持細胞集団の誘導に成功しており、薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現並びに酵素活性の薬剤による誘導を検出している。改めてこれらの誘導法を組み合わせることにより、生体肝細胞に匹敵する肝細胞をヒト ES 細胞から誘導できる可能性が開かれるものと考えられる。

(3) 熊本大学

現在、成熟度の高い肝細胞をヒト ES 細胞から創出できていることが確認できた。得られたヒト ES 細胞由来の肝細胞について幹細胞創薬研究所と連携して活性測定を行っていく予定である。さらに、ヒト ES 細胞より創出した肝細胞の遺伝子プロファイルについて、正常肝細胞と比較検証を行う。必要に応じて、より完成度の高い分化誘導の系の改良を検討する。今後 M15 細胞および sBM を組み合わせた方法により、大量かつ簡便に成熟ヒト肝細胞を分化誘導し、モデル細胞として使用できる肝細胞を創製し、創薬のためのスクリーニング系として、あるいは毒性評価系として有用であると期待される。一方、基底膜の有効成分についてさらに解析を進めることにより、肝細胞の成熟化にさらに寄与できると期待される。

2. 2. 4 分子構成を最適化した人工基底膜によるES細胞の分化誘導制御技術の開発

大阪大学

共同実施： 日本皮革研究所

分子構成をカスタマイズした人工基底膜をヒトES細胞の選択的分化誘導のための培養基材として実用化するためには、その構成部品となる各種ラミニンおよび IV 型コラーゲンの調製法をさらにもう一段スケールアップする必要がある。現在採用している浮遊高密度培養が可能な 293F 細胞を使う組換えラミニンの発現系をそのままスケールアップすることも可能であるが、コスト面からはより安価で大量調製が可能な酵母での発現系やカイコを使う発現系などを今後検討する必要がある。同様に IV 型コラーゲンの場合もどのようにスケールアップするかが今後の課題である。また、ラミニンと IV 型コラーゲンに加えて、細胞特異的に発現する他の基底膜分子を組み込んだ第二世代の人工基底膜を実用化するためには、素材として利用可能な基底膜蛋白質の種類を拡大する必要がある。また、それらの高発現系・安定供給系の構築も必要である。人工基底膜の製品化を視野に入れた場合、人工基底膜の活性を安定に保持する保存技術の開発も今後の課題である。

ES細胞の分化誘導制御や組織幹細胞の培養・維持は、培養基材の工夫だけで可能となる訳ではなく、培地に含まれる増殖因子やモルフォゲン等の液性因子の配合にも大きく依存している。培養基材の設計・開発という視点に立つとき、そのような液性因子も同時に組み込んだ培養基材の開発が今後の課題となる。事業分担者は、様々な液性因子をその活性を保持したまま基底膜やフィブロネクチンマトリックスに不溶化する新たな技術開発を進めている。この技術を人工基底膜と組み合わせることにより、増殖因子をあらかじめ組み込んだ高機能人工基底膜を実用化することも今後の研究開発の視野に入っている。

一方、基底膜分子の生体内局在情報のデータベースは、成体組織での局在情報を今後追加することによって、その情報源としての付加価値が高まり、ライセンス化した場合のニーズも高まると予想される。また、解析の対象を正常の個体だけでなく、様々な病態モデルマウスやノックアウトマウスに広げることにより、基底膜分子構成を指標とした新たな病因解析の基盤情報としての役割を持たせることも可能である。さらにヒト基底膜分子に対する抗体を整備することにより、ヒト組織を対象とした基底膜分子局在情報データベースを立ち上げることも視野に入れる必要がある。ヒトの様々な疾患における基底膜分子構成のデータベースは、新たな腫瘍マーカーの開発を含め、医薬品開発の様々な分野で利用可能な基盤情報ツールとなるであろう。

2. 2. 5 疑似基底膜を利用したヒトES細胞の分化誘導技術の開発

環境研究所

非公開

2. 2. 6 人工基底膜、疑似マトリックスの評価

京都大学

共同実施:環境研究所

大阪大学

日本皮革研究所

平成18年度までに、京都大学では霊長類ES細胞を用いての未分化維持に対する人工基底膜、疑似マトリックスの評価系をほぼ確立できたので、これを用い特にはじめは未分化維持について大阪大学・日本皮革研究所から供与される人工基底膜、国立環境研究所から供与される疑似マトリックスについて評価を進める。平成18年度での経験から単独ではあまり効果がなくても、いくつかの物質を組み合わせることで効果が出てくる可能性もあり、注意深く検討を進めたい、またヒトES細胞は細胞株ごとに性格がやや異なることを踏まえ、KhES-1、KhES-2、KhES-3すべての細胞株で評価を行っていく。と、同時に分化誘導に関する評価系の確立についても目指したい。

2.3 研究開発項目③「研究用モデル細胞の構築技術の開発」

2.3.1 研究用モデル細胞の構築

2.3.1.1 ヒトES細胞から神経変性疾患モデル細胞の構築

幹細胞創薬研究所

構築された神経変性疾患モデル細胞は、創薬研究分野ばかりでなく、疾患発症機構を解明するための有用なツールになる。創薬研究分野に利用するためには、今後大型培養方法の確立や各種表現型を感度良く検出するアッセイ系の構築が必要になるだろう。また、創薬研究分野だけでなく、疾患発症機構を研究する上でも、構築されたモデル細胞を長期に維持できる培養法の確立が必要であるだろう。

2.3.1.2 血液脳関門(BBB)モデルの創製

幹細胞創薬研究所

当面は、中間目標の達成に向けて残された課題である、ヒト ES 細胞から血管系細胞への分化誘導技術(血管内皮細胞・血管周皮細胞の量産調製技術)の確立を目指すとともに、BBB モデル構築形態に関する事前検討に注力する予定である。

本事業で目指すヒト型 BBB モデルが、従来モデルに優る性能を獲得できるブレイクスルーの鍵は、細胞材が ES 細胞に由来することにあると考えている。

ES 細胞の分化誘導によって得られる機能細胞は、総じて成熟分化を遂げておらず分化段階において幼若な性状であることが多く、このことは成体から分離調達した初代培養細胞や株化培養細胞を用いて長年行われてきたモデル創製とは異なる性格の新しい試みになることを示すものである。

血管内皮細胞をはじめ、ヒト ES 細胞から調製した各種 BBB 構成細胞が *in vitro* での共培養・相互作用過程に伴って分化成熟化を遂げ、これまでに実現されなかった優れた BBB 特性の発現に向けて好結果が得られることが期待される。この意味において、ヒト ES 細胞(及びマウス ES 細胞)から血管内皮細胞の調製が出来次第、これを基軸としたモデル構築形態の検討段階に移行し、静的バリア性能のみならず、能動的物質輸送機能(取込系、排出系トランスポーターの発現)にも着目した検討を重点化する展開を考えている。

ヒト ES 細胞から血管内皮細胞の調製が出来次第、これを主軸としたモデル構築形態の検討段階に移行し、ここでは静的バリア性能のみならず、能動的物質輸送機能(取込系、排出系トランスポーター)の発現にも着目した検討を推進していく展開を考えている。

2. 3. 1. 3 ハイスループットスクリーニング(HTS)技術の開発

幹細胞創薬研究所

心筋分化誘導促進物質探索 HTS 系においては、約 1 万検体の中から、ヒト・サル ES 細胞の心筋分化促進に効果のある化合物を見出し、現在特許申請を行っている。今後は、このシステムをより自動化・高速化して、別の化合物ライブラリから新たな心筋分化促進物質を探索する。さらに、発見された新規化合物の解析を通して心筋分化機構を解明し、ヒト iPS 細胞に適用することで移植技術への応用や、QT 延長試験等の創薬スクリーニング系の更なる改良・発展を目指す。また、特定の遺伝子プロモーターを持った GFP 遺伝子を発現する ES/iPS 細胞を用いて、様々な細胞・組織に関する分化系あるいは病態モデル等にも GFP 蛍光を利用した HTS システムを適用したい。

2. 3. 2 オンチップ・ヒト組織・臓器モデルを用いた毒性・創薬技術の研究開発

東京医科歯科大学

上記、実用化の見通しのある技術の開発の実現を最優先課題として、当初の開発計画を変更して、今後、まず、下記3つの技術開発への集中化を図る。

1. 細胞を再利用するための無染色・可逆修飾細胞標識技術による細胞精製技術の展開

上記、細胞精製技術の実用化のため、画像データベースの構築、細胞表面標識アプタマーの精製技術の開発を推進する。

2. 細胞ベースでの心筋毒性検査技術に関する展開

すでに製薬企業等との実用化のための条件抽出に入っており、この方向性をさらに強力に推進し、最短の期間で、原理実験のための装置システム・プロトコルから、実用化が可能な装置システム・プロトコルとなるように集中して開発を推進する。特に、ヒト細胞でのシステムの性能を評価するために、現在すでに開始しているヒト心筋株を用いたデータ取得を、継続して推進する。

3. 病理モデル臓器チップの実用化のための展開

これについても、個体ベースでの病理モデル毒性検査を進めている研究グループとの強力な連携によって、最短の期間でのモデルの構築と、その機能の評価を進める。評価では、すでに個体ベースで得られている一連のデータとの比較によってその信頼性についての客観的な評価を行い、国内の製薬企業との実用化のための協議もさらに強力に推進する

2. 3. 3 ES細胞由来肝細胞を用いた創薬支援のための薬物動態・毒性評価系の確立

東京大学

これまで、肝取り込み・排出過程についてトランスポーターを介した輸送に関して輸送能力および寄与率の解析を進めてきた。今後さらに事例を増やしてこれらについては検証を進める予定である。また、さらに長期に異物解毒タンパク質を維持できるような培養方法を考案し、長期に肝細胞に対して薬物を曝露させたときの誘導能の予測や薬剤誘導性肝障害の予測を可能とする実験系の構築へ向けて研究を進めていきたいと考えている。また、トランスポーターと代謝酵素両方が消失に関与する薬物について、それぞれの薬物の全身からの消失に占める相対的な寄与率の推定を行う方法論についても、速度論的な解析を通じて構築していきたいと考えている。

当研究室は、これまでも一貫して *in vitro* 実験系から得られた結果を定量的に解釈し、適切な数理モデルを介して *in vivo* における薬物動態を予測する手法を数多く報告しており、それら経験に基づいて、最終的な成果として単に適切な実験系の構築にとどまらず、*in vitro* 実験から得られた結果を元に *in vivo* における薬物動態特性を定量的に理解するための評価方法に至るまでを構築してきた。また、全身の薬物動態を予測する数理モデルの構築を行い、*in vitro* 実験系から得られた結果をこれらモデルに適切に導入することによって、全身薬物動態の予測を可能とする方法論の確立も複数の化合物のデータを説明できるような汎用的なモデル構築が可能であることをプラバスタチンの例をもって示すことができた。今後さらに他の化合物でも同様の検討をすすめ、本方法論の普遍化を図りたいと考えている。現在、ヒトにおける薬物動態の *in vitro* 実験系からの定量的な予測は創薬研究において最も切望されている方法論であり、事実上無限に均質な細胞を供給可能な ES 由来肝細胞を我々が構築する薬物動態評価法に取り込んでいくことによって、最終的には、世界の創薬研究者によって新規スクリーニング方法としてすぐに汎用されることが期待される薬物動態・毒性評価のためのスクリーニングシステムを評価法と合わせてパッケージとして提供できると考えている。