

性を引き起こす原因分子であり、STAPは肝臓において過酸化物のスカベンジャーとして、抗肝線維化分子として機能していることが推定される。現在、STAPの *in vivo* における役割を明らかにするために、STAPトランスジェニックマウスの作製を行っている。

フェーズ I、フェーズ II では、ラットの小型肝細胞の性質を明らかにし、*in vitro* でヒト肝細胞を継代培養する方法を確立した。また、マウス肝臓でヒトの肝細胞を生着・増殖させ、本来の肝臓をヒトの肝細胞によって置換する技術に世界に先がけて成功した。このヒト肝細胞キメラマウスで増殖させたヒト肝細胞は、機能面ではマウスの生存を維持していることから、各種肝機能を喪失することなく保持していると考えられる。また、ヒト特異的な薬物代謝酵素の発現も認められている。このことから、このキメラマウスやキメラマウスから分離したヒト肝細胞は薬物代謝試験、毒性試験などの産業用に充分有効であるといえる。特に人種差が指摘されている薬の有効性や体内動態に関して、日本人の肝細胞を使用することで、従来なかった日本人専用の試験系を確立できる大きな利点がある。また、生きたヒトの肝細胞にしか感染しない肝炎ウイルスなど、従来は研究すらできなかった領域での新薬開発における実験需要にも答えられる。

フェーズ III においては、キメラマウスの改良研究、キメララットの開発、およびヒト培養肝細胞のキット化の研究を知的クラスター創生事業により実施する。また、製薬企業や大学にキメラマウスの供給を行う株式会社ヘパトフェニックスを設立する予定である。この企業はこれらの技術革新を基に新たなバイオ産業創出を目指す。

2-2．組換えヒトコラーゲン生産系の開発

コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する代表的タンパク質であり、生体のタンパク質の約 1/3 を占める程多量に存在する。特に真皮、腱、骨等には高い割合で存在し、これらの組織や器官の構造を維持する機能を担っている。また、細胞にとっては、その足場となるタンパク質であり、さらに細胞の移動、増殖、分化等を制御する機能も有している。このような機能をもったコラーゲンは、正常組織においてはもちろんのこと、損傷した組織が修復・再生する際にも重要な役割を果たしている。またコラーゲンは、バイオマテリアルとして見た場合、優れた強度と高い組織適合性をもつことから極めて有用であり、医療分野等において広く利用されている。特に再生医療においては、人工組織を構築するための生物由来素材として必要不可欠なタンパク質である。しかし、現在用いられているコラーゲンの大部分は、ウシの真皮等から抽出した動物組織に由来するものであり、ヒトに移植した場合、アレルギー反応を引き起こす危険性や、動物由来の病原体が混入する危険性が指摘されている。特に狂牛病の病原体であり、ヒトに感染した場合クロイツフェルト・ヤコブ病を引き起こす異常プリオン混入の危険は近年非常に大きな問題となっている。従って、抗原性がなく病原体混入の危険性のない安全なコラーゲンを安価に生産することが可能な組換えヒトコラーゲン生産系を開発することは、社会的に極めて重要な意味をもちつつある。

海外では組換えヒトコラーゲンの大量生産を目指す幾つかのベンチャー企業が設立されている。アメリカの Fibrogen Inc. は酵母を、Cohesion Inc. はトランスジェニック動物（ウシ）を、またフランスの Meristem therapeutics はトランスジェニック植物をそれぞれ宿主系に用い開発を進めている。この中で最も実用化に近い段階まで開発が進んでいるのは酵母を用いた Fibrogen のシステムである。しかし、このシステムでは、コラーゲンは菌体内に合成

されるため、精製工程が煩雑であり十分にコストを下げるのは難しいと予想される。トランスジェニック動物のシステムでは依然として動物由来病原体混入の危険が残り、またトランスジェニック植物のシステムは生産性の面で問題がある。このように、現時点では安全で安価な組換えヒトコラーゲンが供給可能な生産システムを開発することに成功した企業は存在しない。

本テーマでは、宿主としてカイコを選択し、安全なヒトコラーゲンを安価に生産することが可能なシステムを開発することを目標としている。カイコは、蛹になる直前に繭を作る。繭を構成する絹糸の97%はフィブロインおよびセリシンといった絹タンパク質であり、その合成量はカイコ一頭あたり0.3~0.5gにも達する。ヒトコラーゲン遺伝子を組み込んだトランスジェニックカイコを作出し、ヒトコラーゲンをカイコが合成する繭の一部として生産させることができれば、医療分野等に用いることが十分に可能な程の低コストで生産することができる。また、絹糸は数種類の限られたタンパク質のみから構成されるため、ヒトコラーゲンの精製も容易であると予想される。この計画を実現させるためには、絹タンパク質の合成器官である絹糸腺でヒトコラーゲン遺伝子を発現させヒトコラーゲンを繭中に分泌させることが可能なベクターを構築すること、および効率の良い遺伝子導入法を開発することが必要である。そこで、コア研究室では、京都工芸繊維大学や農業生物資源研究所が開発したカイコへの遺伝子導入法を利用して、実際にヒトコラーゲン遺伝子をカイコに組み込みコラーゲンを繭中に分泌させる検討を行った。また、共同研究機関である京都工芸繊維大学では、カイコへの遺伝子導入の効率化を計るために、AcNPVベクターやpiggyBac/AcNPVベクターの開発を行った。

フェーズ I では、当時唯一成功例のあったカイコへの遺伝子導入法である AcNPV ベクターを用いた遺伝子ターゲティング法により、ヒトコラーゲン cDNA をカイコゲノム内のフィブロイン L 鎖遺伝子座に挿入することを試みた。コア研究室にてターゲティングベクターを作製し、京都工芸繊維大学から技術指導を受けカイコへの遺伝子導入を試みた。AcNPV ベクターを接種した世代のカイコ体内では、ベクターが良好に増幅された。ところが、次世代以降のカイコの中からヒトコラーゲン cDNA が組み込まれたトランスジェニックカイコを樹立することはできなかった。遺伝子導入効率の悪い遺伝子ターゲティング法では、サイズが大きいコラーゲン cDNA の組み込みは難しいのではないかと考えられた。

そこでフェーズ II では、カイコ細胞内で転移活性を持つトランスポゾン (piggyBac) を利用して、コラーゲン cDNA を組み込むことを試みた。まずは、piggyBac を挿入した AcNPV (piggyBac/AcNPV) をベクターとして用いた。培養昆虫細胞を用いた検討では、このベクターは有効に機能する可能性が示唆された。しかしながら、カイコ幼虫に接種しても、トランスジェニック体を得ることはできなかった。このように、piggyBac/AcNPV ベクターでコラーゲン遺伝子を導入することはできなかったが、このベクター系は開発が進めば有用な系になる可能性が残されている。そこで、共同研究機関である京都工芸繊維大学にて、その後の開発を進めることにした。

コア研究室では、piggyBac を組み込んだプラスミドベクターをカイコ卵にマイクロインジェクションする方法を取り入れ、Ⅲ型コラーゲンの三重らせん領域を約 1/5 に縮めたミニコラーゲン cDNA を導入した。この方法により、始めてカイコへコラーゲン遺伝子を組み込むことに成功した。しかしながら、最初に作出されたトランスジェニックカイコからは、合成されたコラーゲンタンパク質を検出することができなかった。そこで、遺伝子

銃を利用した絹糸腺での一過性の遺伝子発現系を構築し、この発現系を用いてコラーゲタンパク質が合成されない原因を探った。その結果、ミニコラーゲンに含まれている一部の領域がミニコラーゲンの合成に阻害的に作用しており、この領域を取り除けば、ミニコラーゲンがカイコ絹糸腺で合成されることが明らかになった。そこで、合成を阻害する領域を取り除いたミニコラーゲンcDNAを piggyBac ベクターを用いてカイコに組み込んだ。作出されたトランスジェニックカイコは、その絹糸腺でミニコラーゲンを合成し、さらにミニコラーゲンを繭中に分泌した。現在は、全長Ⅲ型ヒトコラーゲンを合成するトランスジェニックカイコの作出を急いでいる。また、ヒトコラーゲンの合成量を高めるため、高発現プロモーターの開発にも着手しており、既に遺伝子銃を利用したアッセイ系を確立している。

体温で安定な三重らせん構造を有するコラーゲンを合成させるには、三重らせん領域内のプロリン残基が水酸化プロリンへと修飾される必要がある。しかし、カイコの絹糸腺細胞内にはプロリン残基を水酸化するプロリン水酸化酵素の活性が十分に存在しない。そこで、熱安定な組換えコラーゲンを合成させるためには、コラーゲン cDNA に加えて、プロリン水酸化酵素 cDNA も導入する必要がある。プロリン水酸化酵素は α と β の2種のサブユニットから構成される。従ってヒトのプロリン水酸化酵素 cDNA を利用する場合は、2種のサブユニットをコードする両方の cDNA を導入する必要がある。一方、カイコの絹糸腺細胞には多量の β サブユニットが存在するため、カイコのプロリン水酸化酵素を利用すれば、 α サブユニット cDNA のみの導入で充分であると考えられる。そこで、フェーズ I 後半より、カイコプロリン水酸化酵素 cDNA のクローニングを開始し、フェーズ II では全長 cDNA のクローニングに成功した。現在は、遺伝子銃の導入系で、絹糸腺にて組換え水酸化酵素を発現させる実験を行うと共に、水酸化酵素導入トランスジェニックカイコの作出にも着手している。

遺伝子組み換え技術を利用すれば、コラーゲンに新たな機能を付加することができる。このような高機能コラーゲンをトランスジェニックカイコを用いて生産すれば、組換えコラーゲンの用途を大きく広げることができる。この試みの一つとして、サイトカインや成長因子を結合したキメラコラーゲンを合成し、その有用性を検証する研究も行った。EGF および IL-2 をⅢ型コラーゲンの N 末端側に融合したキメラコラーゲンを、昆虫培養細胞を用いて合成した。これらのキメラタンパク質は、コラーゲン特有の三重らせん構造を有し、さらに EGF または IL-2 の生物活性も有していた。さらに、キメラコラーゲンは、生物活性を失うことなく、プラスチック上にコーティングできたり、ウシ由来コラーゲンと共に線維化させることもできた。このように、キメラコラーゲンは、新しいバイオマテリアルとして、あるいはドラッグデリバリーシステムを構築するための材料として利用できる可能性が示唆された。

トランスジェニックカイコのシステムは、コラーゲン以外のタンパク質を生産するためにも有用であると考えられる。その可能性を確かめるために、既に褥創治療薬として実用化している bFGF の合成を試みることにした。昆虫培養細胞を用いた発現系で高い生物活性を有した bFGF の合成が可能であることを見だし、活性型 bFGF がカイコ絹糸腺でも合成できる可能性が示唆された。

以上のように、フェーズ II までの研究により、トランスジェニックカイコを用いて組換えヒトコラーゲンを大量生産するための基盤的技術を確立させることができた。さらに、

コラーゲンの高機能化や、コラーゲン以外のタンパク質生産の可能性についても実証することができた。これらフェーズ II までの成果をもとに、フェーズ III では本格的な実用化の研究を進める。全長コラーゲンや熱安定性コラーゲンの生産、生産量向上化など残された基礎的研究課題は、知的クラスター創成事業の中で継続すると共に、ベンチャー企業（名称 マトリフェニックス）を立ち上げ事業化の準備を推進する。

2-3．発毛因子の探索 /毛髪再生療法の開発

皮膚の付属器官である毛髪は、皮膚が分化したものであり、胎児期において表皮細胞と真皮（間充織）細胞との相互作用によって形成された毛包から産生される。毛包は、形態的に見分けられる数種の組織から構成され、毛髪を包む鞘のようなものである。毛髪は、毛包基部に存在する毛母細胞が盛んに増殖することにより、表層へ向けて押し上げられるように伸長する。上皮組織である毛母に覆われるように存在する、毛乳頭（パピラ）と呼ばれる間充織組織は、毛包組織の分化・成長や毛周期の進行に重要な働きを持っていると考えられている。我々はこれまでに、ラット頬髭パピラ細胞の毛包誘導能を失うことなく、活発に増殖させるパピラ細胞の長期継代培養法を確立した。パピラ細胞に由来する毛包誘導因子の実体を明らかにするために、この因子の活性を検出するアッセイ法の開発を行った。

毛包誘導能を確認できる *in vivo* アッセイ法として、ラット足裏皮膚の表皮真皮間隙にパピラ細胞を挿入し、ヌードマウス背部に移植する方法を開発した。アッセイ結果の判定をより確実にするために、蛍光色素を用いた核染色により宿主（マウス）組織と移植組織片（ラット）を区別する方法を導入した。さらに、パピラ細胞を蛍光色素標識して足裏皮膚に詰め込み、移植片に蛍光標識された細胞由来の毛包構造が形成されていたことを確認した。これにより、足裏皮膚移植法が *in vivo* アッセイ法として有用であると証明した。

培養パピラ細胞が毛包誘導能のみならず、表皮を突き破る毛幹伸長を誘導することを確認しなければならない。そこで、培養パピラ細胞による発毛能を可視化できるアッセイ法としてグラフトチャンバーアッセイを導入した。これは、酵素処理によって細胞接着を解離したラット新生児表皮細胞と培養パピラ細胞を混合し、ヌードマウス背部に移植したグラフトチャンバー内に移植する方法である。この方法により、我々の培養技術によって長期継代培養したパピラ細胞が発毛能を保持していることが証明された。

実験動物皮膚への移植では、煩雑な操作や実験結果のばらつきを排除することが出来ない。そこで、完全に制御された培養環境下で作成した人工皮膚において毛包構造を形成させる *in vitro* アッセイ法の開発を行った。この人工皮膚に組織から単離したパピラあるいは培養パピラ細胞を人工皮膚に埋め込む方法を確認し、組織から単離したパピラを埋め込むと、パピラの周りの表皮細胞が肥厚し、パピラを包み込むような組織像が観察された。陰性対照群として、線維芽細胞のペレットを埋め込んだ人工皮膚では、表皮細胞の形態変化は観察されなかった。継代培養パピラ細胞のペレットを埋め込んだ人工皮膚は、パピラを埋め込んだものに比べて程度は低いものの、パピラ細胞ペレットを包み込むように表皮が増殖、肥厚していた。

培養パピラ細胞の毛包誘導能検定法として、ラット足裏皮膚による *in vivo* アッセイおよびグラフトチャンバーアッセイを用いた場合、結果を判定するまでに数週間を要する。そのため、多種の候補因子を線維芽細胞などの培養細胞に強制発現させて、その毛包誘導