

サブテーマ名：ES細胞からの内胚葉系細胞の分化誘導技術の確立

小テーマ名：内胚葉系幹細胞の増殖分化に関する液性因子の検討

テマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、宮崎 純一

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、宮川潤一郎

(財)先端医療振興財団、特別研究員、齋藤 弘一

ステムセルサイエンス(株)、共同研究員、安永 正浩

● 研究の概要

マウス ES 細胞からベータ細胞を一期的に誘導同定する従来の方法ではなく、中間段階の細胞を同定して最終的にベータ細胞に分化させる系を確立している。各々の中間段階に特異的な表面マーカーと増殖分化に関わる因子を同定していくことにより、正常発生に基づく真のベータ細胞を試験管内で作成できると思われる。最終的に表面マーカーによる幹細胞分離精製法と液性因子添加無血清培地による培養法を確立して工業化に対応できる治療用細胞作成方法のプラットフォーム作りを行う(図1)。

1. 研究の目標

内胚葉分化マーカー遺伝子(Sox17、HNF6)ノックイン ES 細胞を作成して、ES 細胞から胚性内胚葉系幹細胞、肝臓共通幹細胞と段階的に中間段階のモニタリングシステムを完成する。

2. 実施内容

平成15年度:理化学研究所幹細胞グループで開発されたグースコイドノックインES細胞に新たに内胚葉系マーカーSox17をノックインしたグースコイド^{gfp}Sox17^{huCD25}ダブルノックインES細胞を作成した。この細胞はグースコイド遺伝子の発現を蛍光蛋白GFPの発現で、Sox17遺伝子の発現を表面分子ヒトCD25の発現と蛍光標識された抗ヒトCD25抗体の組み合わせで可視化されたものである。この細胞とセルソーターの使用で、グースコイド陰性Sox17陽性の原始内胚葉系幹細胞とグースコイド陽性Sox17陽性の胚性内胚葉系幹細胞という2種類の内胚葉系幹細胞を可視化することに成功した(図2)。

平成16年度:胚性内胚葉系幹細胞を表面マーカーCXCR4でモニタリングして分離精製培養する技術を完成した。これにより、従来では困難であった原始内胚葉系幹細胞との区別を明確にできるようになった。具体的には下記の通りである。

胚性内胚葉系幹細胞はアクチビンと無血清培地で選択的に分化誘導可能であった。原始内胚葉系幹細胞はアクチビン非存在下の無血清培地に細胞を高密度で培養することで選択的に分化誘導可能であった。この2種類の選択培地とグースコイド^{gfp}Sox17^{huCD25}ダブルノックインES細胞の使用は、胚性内胚葉系幹細胞と原始内胚葉系幹細胞から比較的短期間に大量の極めて純度の高いRNAサンプル採取を可能にした優れた幹細胞純化法である。実際、DNAマイクロアレイ解析後、特異的表面マーカーについての検索を行い、胚性内胚葉系特異的表面マーカー3種類(既知1、新規2)と臓側内胚葉系特異的表面マーカー6種類(既知2、新規4)を同定し得た(図3)。さらに、フローサイトメトリーによる発現解析の結果、既知の胚性内胚葉系特異的表面マーカーはグースコイド遺伝子の発現と相関していた(図4)。

グースコイド陽性細胞はグースコイド陽性 Sox17 陽性の胚性内胚葉細胞とグースコイド陽性 Sox17 陰性の中胚葉細胞からなるが、この2種類の細胞は上皮表面マーカーのEカドヘリンの有無で分離可能である。フローサイトメトリーによる解析の結果、アクチビン分化誘導後の既知胚性内胚葉特異的表面マーカー陽性Eカドヘリン陽性細胞は、グースコイド陽性 Sox17 陽性の胚性内胚葉系幹細胞に相当していることが判明した。実際、セルソーターによって分離された既知胚性内胚葉特異的表面マーカー陽性Eカドヘリン陽性細胞は各種分化マーカー解析の結果、胚性内胚葉系幹細胞そのものであった(図5)。これによって、ノックインES細胞を使用することなしに胚性内胚葉系幹細胞を純化する技術の確立に成功した。この技術は野生型、組み換え型の如何にかかわらず、あらゆるES細胞株に応用可能なため汎用性が高く極めて有用な方法である。

平成17年度：胚性内胚葉系幹細胞を様々な分化条件で培養することによって、肝細胞(Alb、AFP、TAT、Cyp7a1 陽性)や膵幹細胞(HNF6 陽性・Hlx9 陽性細胞)への分化誘導に成功した(図5)。胚性内胚葉系幹細胞が Pax9 陽性食道細胞、Hoxc5 陽性胃十二指腸細胞、Hoxc8 陽性小腸細胞、Hoxd13 陽性大直腸細胞に分化誘導可能であることを明らかにした。この特性は、臓側内胚葉系幹細胞には欠如しているものであった。

HNF6 ノックイン ES 細胞：HNF6 陽性細胞への分化誘導実験に成功して、モニタリング用の HNF6^{Venus} ノックインES細胞作成を目指したが、コンストラクションに難渋した。最終的に発現ベクターの作成に成功したが、HNF6 ノックインES細胞自体は未完成のまま終了となった。

膵組織幹細胞：膵組織幹細胞に関しては、初代膵組織培養からインスリン産生細胞に分化可能な上皮細胞の分離に成功した(図6)。しかし一方で、1)増殖に限界がある、2)細胞由来が膵島由来か膵管由来か同定できていない、3)インスリン産生能が低い、4)培養系に牛血清を1%含んでいる等、技術基盤としては不安定要素が強く細胞工学的見地からもシーズといえる状況ではない。さらに安全性も十分に確保されているとはいえないので将来の臨床応用と言う意味でも不安材料を残した。

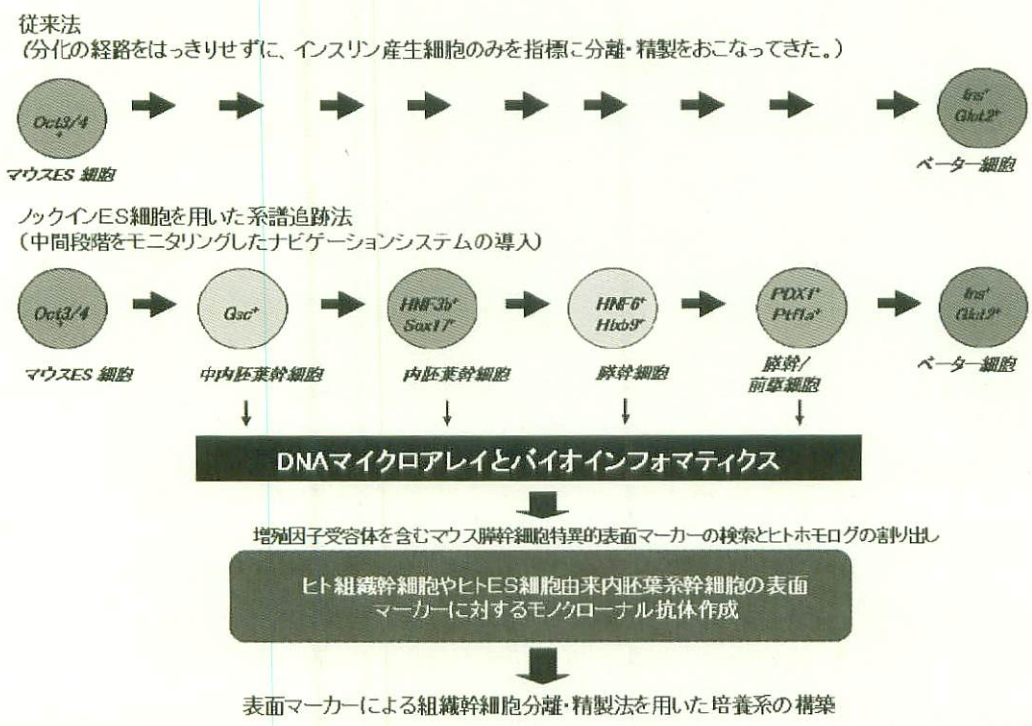
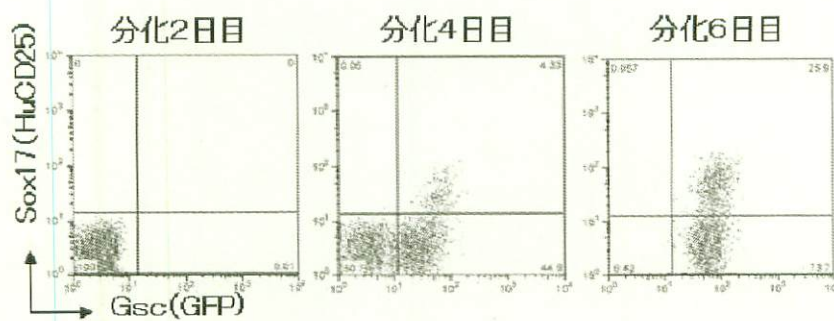


図1. 工業化・細胞治療を目指したES細胞を用いた膵ベータ細胞作成法を完成するための戦略プラン

胚性内胚葉系幹細胞への分化誘導



臓側内胚葉系幹細胞への分化誘導

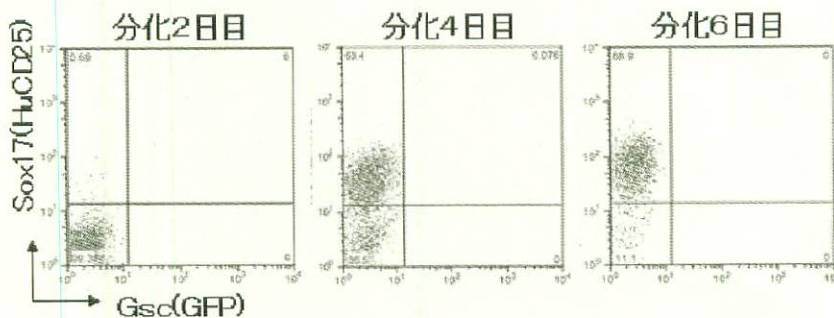


図2. GscとSox17のダブルノックインES細胞の作成と分化誘導系の確立し、中内胚葉系幹細胞と胚性内胚葉系幹細胞のモニタリングを可能にした。

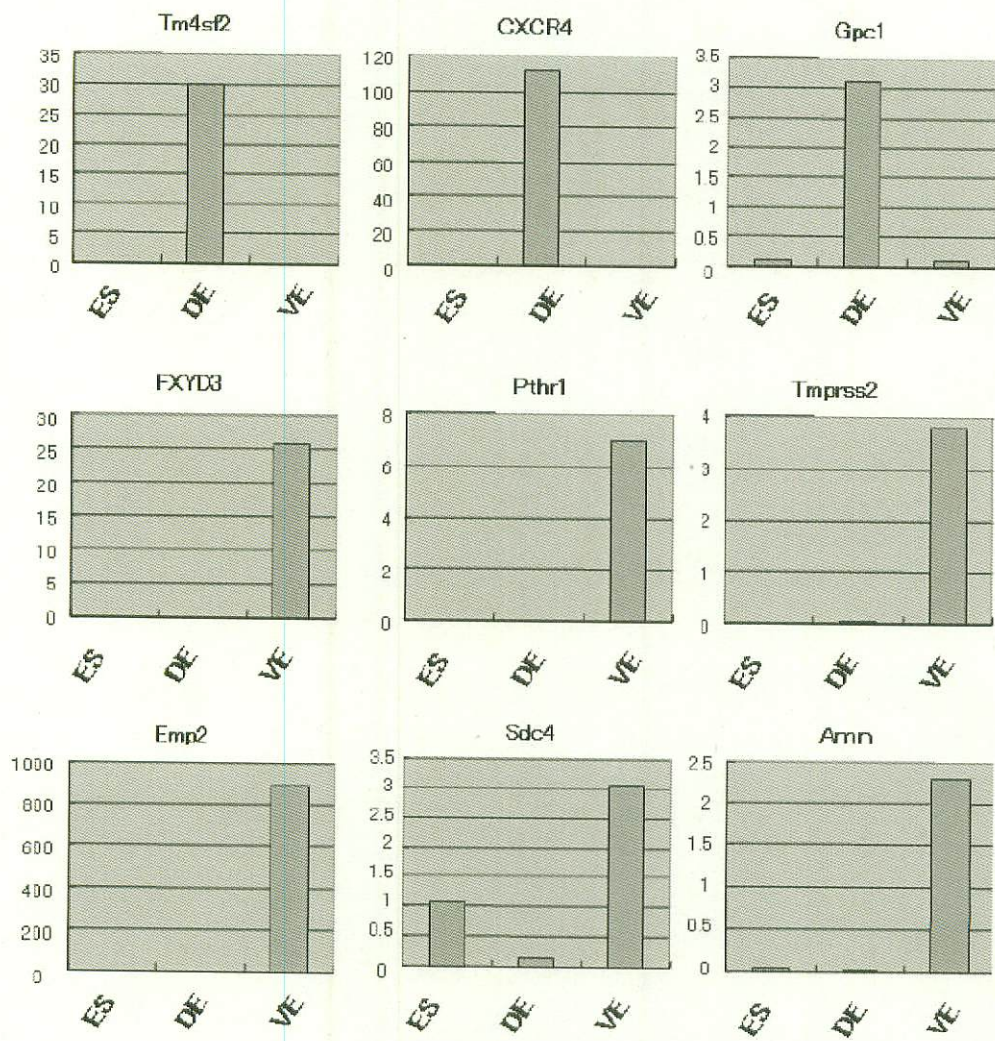


図3. DNAマイクロアレイとバイオインフォマティクスにより胚性内胚葉幹細胞と臓側内胚葉系幹細胞特異的表面マーカーを同定した。

DE ; 胚性内胚葉系幹細胞 VE ; 臓側内胚葉系幹細胞

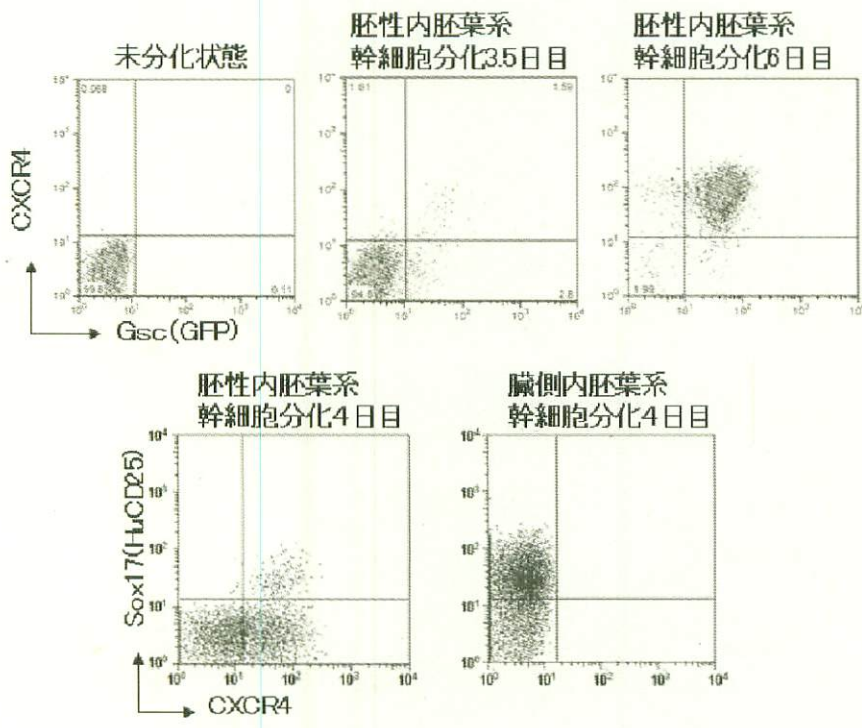
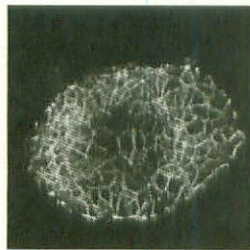
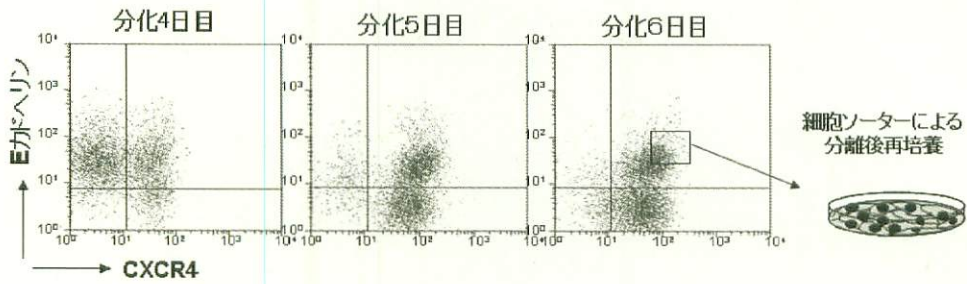


図4. CXCR4陽性細胞がGsc陽性細胞との正の相関関係にあり、CXCR4陽性所見はSox17陽性臓側内胚葉系幹細胞には認めず、胚性内胚葉系幹細胞に特徴的であることを示した。



純化培養した胚性内胚葉系幹細胞

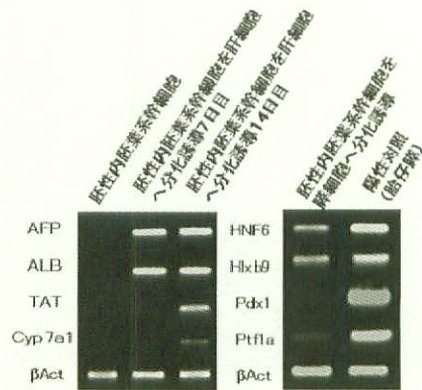


図5. 特異的表面マーカーCXCR4とEカドヘリンによる胚性内胚葉系幹細胞の分離・精製技術の確立及び分離した胚性内胚葉系幹細胞を肝細胞と膵幹細胞への分化誘導に成功した。

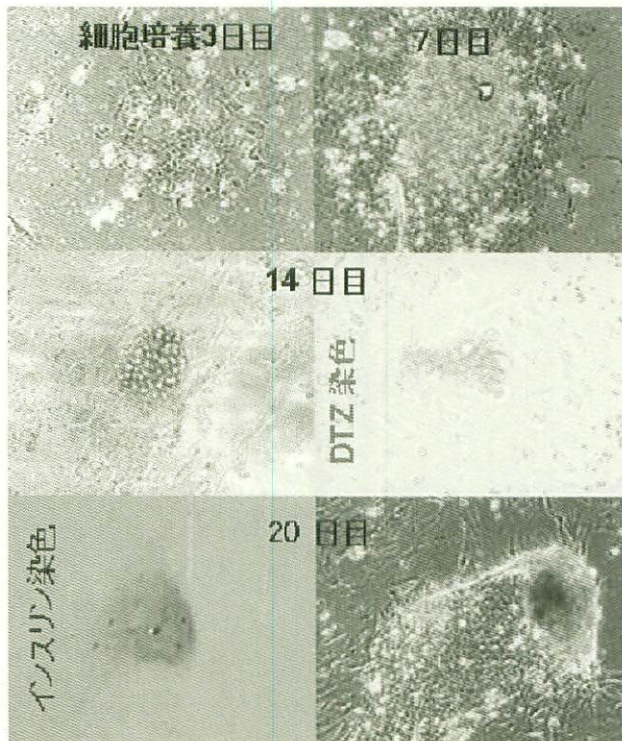


図6. マウス組織幹細胞様上皮細胞を培養してインスリン産生細胞への分化誘導に成功した。

3. 成 果

新規胚性内胚葉系幹細胞分離精製培養技術の開発に成功した。本技術の特徴は下記のごとくである。

1. 全過程において血清を使用しない完全に組成の明らかな培養条件下に分化誘導が可能である。したがって血清中に含まれるウイルス・プリオンなど未知病原体が混入する可能性がない。また、血清使用は、採取した個体により生物活性が異なるために、いわゆるロット差が存在し、工業化の際不安定要素のひとつに成りうるが、この可能性もない。
2. 特異的表面マーカーに対する抗体と細胞ソーターを用いて100%の純度で分離精製する技術は、分化過程のモニタリングで純度の確認ができると同時に、分離精製過程の時点での純度の調整も可能となり最終形態の規格を一定化できる。また、未分化ES細胞が混入すると生体内で奇形種を形成するという危険性が存在するが、未分化ES細胞も不純細胞として除去可能となった。
3. 全過程において遺伝子組み換え操作を必要としないため、生体投与可能な安全な細胞を産生できる。

本技術開発は理化学研究所幹細胞研究グループとの共同研究で行われ、謝辞に当事業名を記載した論文をNature Biotechnology 2005年度12月号に掲載予定である。

4. 今後の展望

マウスES細胞由来胚性内胚葉系幹細胞の純化法の確立に成功して、膵臓幹細胞（HNF6陽性・H1xb9陽性細胞）への分化誘導にも成功したが同細胞への分化効率・再現性の低さは改善されていない。純化の困難性から細胞特性も評価できないままである。したがって、より純化の容易な前段階である肝膵共通幹細胞（HNF6陽性・H1xb9陰性細胞）もしくはさらにその前段階の幹細胞をモニタリングするシス

テムの構築は必要と考える。しかし、再生医療の事業化を想定した場合、ヒト ES 細胞の臨床応用は倫理的・社会的な問題点からハードルが高く、組織幹細胞の方が早期の導入・応用が期待されているため、社会的ニーズが高いものと思われる。

したがって今後、組織幹細胞に関しても ES 細胞由来膵臓ベータ細胞作成技術で得られた成果と新たな科学的知見を積み重ねた上で新技術の開発を精力的に行う予定である。また、成果を上げた ES 細胞を利用した膵臓ベータ細胞分化モニタリング・純化システムに関しても、本システム完成を目指した研究を継続する予定である。