

サブテーマ名：新規血管構成細胞分化誘導因子を用いた血管再生療法の開発

小テーマ名：DNAマイクロアレイ法によるデータ集積

テマリーダー：(財)先端医療振興財団、特別研究員、岡田 光浩

研究従事者：(財)先端医療振興財団、特別技術員、河野 麻理

(財)先端医療振興財団、特別技術員、藤井 律子

● 研究の概要

再生医療は次世代再生療法の主たるテーマである。この新規療法を可能にするためには、まず、移植用の細胞が必要である。現在、細胞移植材料として、血管前駆細胞が注目されている。我々は将来の産業化を見越して、広く医療現場へ目的の細胞が供給可能なES細胞に注目し、このES細胞から機能的な血管構成細胞を高効率に分化誘導できる培養システムの構築に成功した。血管細胞のみならず、この研究モデルを中心に将来の細胞作製技術のもととなる情報・技術基盤として「ES細胞分化経路地図」の作成を目指した。

1. フェーズI

(1) 研究の目標

医療現場への血管再生医療用移植材料(細胞)を供給することを目的とした細胞創製技術の開発を目的に、血管細胞移植による必要な細胞を高効率に分化誘導できる培養系の開発と網羅的遺伝子発現情報を取得する方法の検討とサンプル調整方法の確立を行った。

(2) 実施内容

我々は、DNAチップ実験に供するサンプル調整法とマウスES細胞を用いた高効率 *in vitro* 血管細胞分化誘導系について評価・検討を行った。

まず、最初に網羅的遺伝子発現情報を取得する方法としてDNAチップタイプの検討を行った。この時点で採用可能な技術であるDNAマイクロアレイ法はcDNAチップタイプとオリゴDNAタイプが存在した。両者の特徴を比較検討したところ、オリゴチップ(GeneChip: Affymetrix社)のほうが定量性やチップ上のプローブ数が圧倒的に多く、優れていると判断した。そのため、オリゴチップを第一選択とし、実験を開始した。しかし、現在のDNAマイクロアレイ法には以下の利点・欠点が存在した。

利点：一度に大量の遺伝子発現情報を定量的に得ることができ、同一遺伝子(プローブ)の経時的変化を見る容易に解析できる。

欠点：ターゲットとしてのRNAが1チップ当たり大量に必要。

ES細胞を用いた培養系は、未分化な細胞から特定の細胞系列に分化誘導が容易にできるという点で、有用な評価系であるが、各細胞集団(血管細胞)を純化(ソート)する必要がある。現在FACSを使って血管細胞集団をソートしているが、一度にソート可能な細胞数が限られるため、DNAマイクロアレイに供するRNA量を確保することが困難であった。

そこで、この問題を解決するために少量の細胞から定量性を損なわずにDNAマイクロアレイ用のターゲットRNAを調製する方法について検討を始めた。同一RNAサンプルを用いて以下の検討を行った。

1) スタンダード法と PCR 法による比較

スタンダード法: mRNA→cDNA 合成→cRNA→Fragmentation→Hybridization

PCR 増幅法: mRNA→cDNA 合成→cDNA 増幅→cRNA→Fragmentation→Hybridization

結果; 25 cycles、30 cycles の PCR 増幅により cDNA はマイクロアレイに供するに十分な量得ることができた。しかし、マイクロアレイ法でスタンダード法との定量性比較を行ったところ、PCR 増幅により定量性が著しく損なわれていた。

2) スタンダード法とアンチセンス RNA (aRNA) 増幅法による比較

スタンダード法: mRNA→cDNA 合成→cRNA→Fragmentation→Hybridization を目的と aRNA 増幅法: mRNA→cDNA 合成→aRNA 合成→cDNA 合成→cRNA→Fragmentation→Hybridization

結果; aRNA 増幅法は T7RNA polymerase による cDNA から aRNA 合成を行う方法で、PCR 増幅法と違い、RNA レベルでの遺伝子増幅法である。

T7RNA polymerase による aRNA 合成→cDNA 合成ステップを繰り返すことにより、十分量のターゲットを増幅できる。

実際、1回増幅では100倍、2回増幅では2,000倍、3回増幅では5,000倍まで増幅する結果が得られた。しかし、スタンダード法との定量性比較実験では、定量性を維持しているという結果は得られなかった (PCR 増幅よりは定量性が良かった)。

また、増幅回数の増加に伴い定量性が悪くなる傾向が得られ、さらに、増幅回数の増加に伴い RNA サイズが小さくなった。

実験データから、aRNA 法は PCR 法より優れているものの、定量性に問題を残した方法であることが実験結果から明らかとなった。オリゴ DNA チップでは1遺伝子当たり、遺伝子全長の1/6箇所をプローブとして設定しており、ある程度の RNA の長さが必要であると思われる。つまり RNA 増幅回数に伴う 5' 領域の欠損が定量性の低下に悪影響を及ぼしている可能性が推察された。

3) スタンダード法 (mRNA) とスタンダード法 (Total RNA) の比較

スタンダード (mRNA): mRNA→cDNA 合成→cRNA→Fragmentation→Hybridization

スタンダード (Total RNA): mRNA→cDNA 合成→cRNA→Fragmentation→Hybridization

結果; 同一サンプル mRNA と Total RNA からスタンダード法でターゲットを作製した。再現性の比較を行ったところ、再現性がよいデータが得られた。また、同一サンプル Total RNA 同士の比較においても再現性の良さが確認できた。

上記実験結果から、オリゴチップ (GeneChip: Affymetrix 社) の採用と非増幅方法による DNA マイクロアレイデータ取得を目標とした。

そこで、次に ES 細胞分化培養系を用いた血管細胞分化系譜の遺伝子発現解析を進める上で、非増幅方法に供する細胞数つまり RNA 量の確保が必要となった。DNA マイクロアレイ実験を目的とする高効率な in vitro 分化誘導系の構築を行った。マウス ES 細胞由来血管前駆細胞が同定された手法を元に工夫・改良した。

我々の方法は、血管細胞分化誘導系の場合、Flk-1 陽性細胞を経由して内皮細胞および壁細胞へ in vitro 分化誘導可能であり、この場合にもストローマ細胞を必要とせずに分化誘導可能である。しかしながら、今までの培養条件では Flk-1 陽性細胞から効率よく血管細胞を分化誘導することは不可能であった。特に分化刺激導入後の早期の細胞は、分化誘導率が低いため、DNA マイクロアレイ実験に供するだけの細

胞数を集めることが技術的に困難であった。そこで、我々は血清という成分内容が不明の生体材料を除き、より単純化した培養系を確立することでデータの再現性や信頼性向上を目指した無血清培養系を構築した。

(この工夫は DNA マイクロアレイデータ解析の際にも、同一培養条件ということでデータ間比較を容易にし、データ解析精度の向上に貢献した。)

我々は、この無血清培地をもとに VEGF 添加培地で Flk-1 陽性細胞を培養することで、*in vitro* で高効率に血管細胞を分化誘導することに成功した。この培養条件下で Flk-1 陽性細胞から分化誘導した血管細胞をマイクロアレイに供するに十分な細胞数を集めることが可能になり、内皮細胞と壁細胞に分化した細胞を特定細胞系列特異的マーカー(内皮マーカー等)を用いてラベルし、セルソーターを用いて経時的に特定の分化細胞のみ分取した。この分取した細胞から DNA チップに供する RNA を抽出し、実験サンプル調整を行った。

この方法の組み合わせにより、DNA マイクロアレイ実験が可能となり、マウス ES 細胞由来血管細胞分化系譜の網羅的遺伝子発現データを取得した。

(3) 成 果

in vitro ES 細胞分化培養系の改良。血管細胞分化過程における DNA マイクロアレイデータの取得。

2. フェーズ II

(1) 研究の目標

フェーズ I で確立した *in vitro* 分化誘導系のノウハウと研究成果を基盤とし、血管構成細胞のほかにも個体発生過程の三胚葉由来分化経路情報を統合・想定したデータベース「ES 細胞分化経路地図」の作成を目標とした。

そのため、他の細胞分化誘導に必要な実験系の確立とデータ取得法の開発を研究している他グループと協力し、DNA マイクロアレイデータ取得とデータベースの拡大を目標とした。

(2) 実施内容

フェーズ I では、マウス ES 細胞分化誘導系を立ち上げ、未分化 ES 細胞からの血管細胞系譜分化誘導評価系の確立と DNA チップ実験評価系のための高効率分化誘導条件・目的とする細胞分離手法の確立を行った。その研究成果として、無血清 *in vitro* 血管細胞分化誘導システムと血管細胞分化系譜の DNA マイクロアレイデータセットを取得した。

フェーズ II では、上記マウス ES 細胞 *in vitro* 分化誘導系および細胞分離手法をもとに、マウス ES 細胞の *in vitro* 分化誘導培養系を中心にデータベース構築しており、その分化過程における分子機序の網羅的遺伝子発現解析を行っている。フェーズ I での血管細胞分化系譜の構築を手始めに、現在、共同研究として他の研究機関とその他の系譜、主に中胚葉系、内胚葉系譜への分化誘導系の構築を進めている。具体的には、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターと協力し、他分化系譜のマウス ES 細胞分化誘導系を立ち上げ、未分化 ES 細胞からの各細胞系譜分化誘導評価系の確立と DNA チップ実験評価系のための分化誘導条件・目的とする細胞分離手法の確立を行い、DNA マイクロアレイサンプルの調整を行った。

サンプル調整法は、血管細胞誘導条件に従い、分化する細胞集団を細胞表面マーカーにより染色後、

各細胞分画を FACS セルソーターにより細胞分離を行った。分離した各分画由来の RNA を分離精製し、DNA Chip 実験に供した。DNA Chip は、Murine Genome U74 series GeneChip (Affymetrix 社) を用い、DNA Chip 用に精製した Total RNA を用いて、逆転写酵素による First strand cDNA、second strand cDNA 合成反応を行った。さらに 2 本鎖 cDNA を鋳型に試験管内 cRNA 合成反応後、cRNA Fragmentation による GeneChip 用サンプル調整を行った。

各調整済み核酸サンプルは、ハイブリカクテルとして DNA Chip カートリッジ内に注入し、プレハイブリダイゼーションに続き、ハイブリダイゼーション (45℃ 60 回転/分 16 時間) を行った。ハイブリダイゼーション後 各カートリッジを Fluidics station にセットし、指定の protocol (洗浄、染色) による処理を行い、最後にスキャナーによる DNA Chip 表面の蛍光度測定を行った。

生データは、4 種類の拡張子を持つ File 形式 (Experimental File, Dat File, Cel File, Chip File) に保存され、各サンプルデータをデータベース化し、The eXintegrator system を用いたデータ解析を行った。[\(http://www.cdb.riken.go.jp/scb/\)](http://www.cdb.riken.go.jp/scb/)

実際これまでに、血管細胞系 (中胚葉系) 以外に、*in vitro* 血管構成細胞分化誘導系をベースにして、内胚葉分化系譜への高効率分化誘導条件の工夫・改良を行い、内胚葉分化系譜へ分化する細胞集団の DNA マイクロアレイデータを取得にも成功した。

以下に実験の操作について記述する。

・ Goosecoid (Gsc) 遺伝子座 knock-in ES 細胞の作製

オルガナイザー特異的に発現する Goosecoid をマーカー分子として、この分子の発現細胞を可視化するために、goosecoid 遺伝子座に Green Fluorecence protein (GFP) 遺伝子を Knock-in 法にて挿入した ES 細胞を樹立した。

・ Gsc-GFP knock-in ES 細胞の試験管内分化誘導

血清添加培地では GFP 陽性細胞が出現するもののその割合は低い。培養条件の検討を行い、無血清培地に activin A 添加の条件で、day6 では実に 97% の細胞に GFP の発現が誘導される条件を確立した。このようにして得られた細胞では、GFP 陽性細胞と同じく HNF-3 β , Chordin, GATA-4, Sox17 を発現していた。

・ GSC-GFP 陽性細胞の cell fate

GFP 陽性細胞は E-cadherin の発現パターンで大きく 2 つの分画に分けられることが判明した。まず、分化誘導開始 4 日目では GFP 陽性細胞のほとんどが、E-cadherin 陽性であるのに対して、培養日数が進むにつれて E-cadherin 陰性細胞の割合が増加する。E-cadherin が ectoderm と endoderm で発現すること Goosecoid が mesendoderm に発現することを考えあわせると、GFP 陽性 E-cadherin 陽性の細胞は内胚葉前駆細胞であることが考えられる。そこで 6 日目の GFP 陽性の中で E-cadherin 陽性と陰性の細胞を FacsVantage を用いて純化し、培養を行った。E-cadherin 陽性分画からは上皮様の細胞のみ出現してきたのに対し、E-cadherin 陰性分画からは、このような上皮様の細胞の出現はほとんど観察できなかった。RT-PCR の結果から、この上皮様の細胞の大部分は内胚葉で発現する分子を発現していた。したがって、細胞形態とこの遺伝子発現のパターンより day6 の GFP 陽性 E-cadherin 陽性から分化した上皮様の細胞は、内胚葉系細胞であることが示唆された。

・ Gsc knock-in ES 細胞の Sox17 遺伝子座への別の可視化分子の Knock-in

さらにより効率よく内胚葉細胞を可視化するために、内胚葉マーカーである Sox17 遺伝子座へのヒト CD25 分子を Knock-in した Gsc^{efp}Sox17^{huCD25} ダブルノックイン ES 細胞を作成した。この細胞は、ゲースコイド遺伝子の発現が蛍光蛋白 GFP の発現で、Sox17 遺伝子の発現がヒト CD25 の発現と蛍光標識された抗ヒト CD25 抗体との反応で完全に可視化することができる。

・ Gsc^{efp}Sox17^{huCD25} ダブルノックイン ES 細胞を用いて原始内胚葉選択的分化誘導法の確立

この細胞を用いて、新たに原始内胚葉を選択的に分化誘導可能な細胞高密度培養分化誘導法を開発した。以上より、Gsc^{efp}Sox17^{huCD25} ダブルノックイン ES 細胞と 2 種類の選択的分化誘導法を組み合わせることによって、胚性内胚葉系細胞と原始内胚葉系細胞を効率よく分離採取できるようになり、経時的に出現する各分化系譜細胞集団の RNA 抽出にも成功し、DNA マイクロアレイデータの取得が可能となった。(Nature Biotechnology 2005, Nov, 27)

外胚葉起源の分化系譜に関しては、無血清分化誘導法の改良により神経細胞の分化誘導(未分化マウス ES 細胞～神経冠細胞～分化神経細胞)に成功し、外胚葉経由の初期分化系に関して、経時的なサンプリングが可能となったため、DNA マイクロアレイデータセットの取得を行った。同時にこのデータセットもデータベース化を完了した(神経細胞の分化誘導法とサンプリングは、理化学研究所 笹井研究室の協力によるものである)。

また、ES 細胞以外の細胞種についても、当方システムの利用を希望する多くの共同研究依頼があり順次対応を行った。

これにより「マウス ES 細胞を用いた機能細胞分化過程における細胞分化マップ」を作成するためのサンプル供給と情報ネットワークを構築した。現在までに大学を始めとする公的研究機関の研究室との共同研究開始、および民間研究機関からの共同研究依頼を受けている。

現在、各ニーズに対応するため以下の手順でデータベース用サンプルを集めている。

1. 各共同研究機関からの詳細な実験計画書の提出。
2. 実験開始の事前の打ち合わせによる実験指導。
3. 実験デザインとデータベース用サンプル情報資料の作成と登録。
4. 細胞の収集と RNA 回収。
5. RNA の品質確認。
6. DNA チップ実験とデータ取得。
7. ユーザー登録と解析システムによるデータの提供とサポート。

マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 血管構成細胞分化誘導系を実験モデルとして DNA マイクロアレイデータ解析手法の検討およびデータ解析システム開発を行ってきた。さらに包括的な再生医学領域の研究基盤データベースとして展開するため、データ解析システムのコアとなる網羅的遺伝子発現データベース「ES 細胞分化経路マップ」の作成を進めた。現在(2005年12月1日)、当データベース登録サンプル数は 150 種類を超えた。

また、将来のデータベースの拡張性を目的に各 DNA チップ別(動物種別、デザイン別)のプロープ・シーケンス情報をゲノム情報に統合し、新たなデータベースを構築できるようマルチプラットフォーム化の構築も完了した。

現在 対応している DNA チップタイプは以下のとおりである。

- ・ Affymetrix 社 GeneChip システム
- ・ アマシャムバイオサイエンス社 CodeLink
- ・ Applied Biosystems 社 Gene Expression Array システム

上記は、プローブ情報を入手し、The eXintegrator system に入力を完了した。

(現時点において The eXintegrator system は、市販用 DNA Chip プローブ情報を全て収めたことになる。)

さらに、マウス ES 細胞を用いた試験管内血管細胞分化誘導技術のノウハウを活かし、霊長類(サル)由来 ES 細胞を用いた血管細胞分化誘導技術の確立を行ってきた。これら情報も、実際の医療の視点から、ヒトへのブリッジングスタディーが必要となるため、これを目的としたヒト由来 ES 細胞株における“血管前駆細胞”の特性の検討と遺伝子発現プロファイリング情報の The eXintegrator system 内のデータベースへ統合した。

(3) 成 果

- ・ データベース利用規則締結先 12 箇所(公的機関)。
- ・ データベース登録細胞数 150 サンプル以上(分化過程における前駆細胞、外部刺激による分化誘導細胞、遺伝子破壊または増幅操作細胞株など)。
- ・ 特許の出願
- ・ オリジナル研究ツール「The eXintegrator system: <http://www.cdb.riken.go.jp/scb/>」

3. 今後の展望

当研究テーマの特性(蓄積型研究)を活かした地域での研究・技術基盤作りが必要である。地域創出(神戸)の研究成果物が核となり、神戸が再生医学研究の中心的役割を持つように、周辺研究・技術とのネットワーク形成の仕組み作りを考えることが重要である。

当研究グループは H16 年度には、オリジナルデータ解析システム(当研究テーマの成果物)を複数の国内主要研究機関に導出し、その基盤創出を行った。

(The eXintegrator System: <http://www.cdb.riken.go.jp/scb/> 参照)

再生医療を実現するためには、これらの研究ツールを活かした情報基盤の構築が絶対条件である(ライフ・サイエンス分野は、情報の蓄積が新たな知識を生み出し、知識を活かした新たな価値(発見や技術)を創造する分野(知識集約・創造型)である)。

つまり、情報の蓄積が継続的に起こり、且つ同時に新たに登録された情報の精度(真偽)の検証や知的所有権の管理等を行える仕組み作りを考える必要がある。データベース管理・運営機関は、データベース運営方針を決定するとともに、上記の責任を負わなければならない(これはデータベースの生命線であり、データベース運営方法の難しさでもある)。

この研究成果創出にかかわった者としては、この成果を無駄にせず、上記条件を満たす適切な管理運営機関の決定と継続的なデータベース拡充を行う正しい運営に関する方針の具体案の作成を中核機関に期待したい。

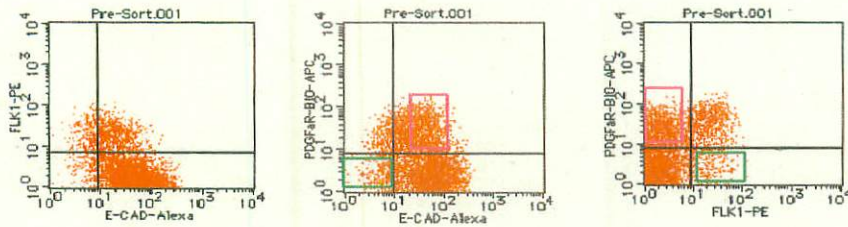
ES細胞培養系からの特定細胞系譜集団の収集法

試験管内 ES細胞分化培養系

問題点: 分化ステージが進行する過程で、細胞系譜の異なる細胞種が同時混在して現れる。

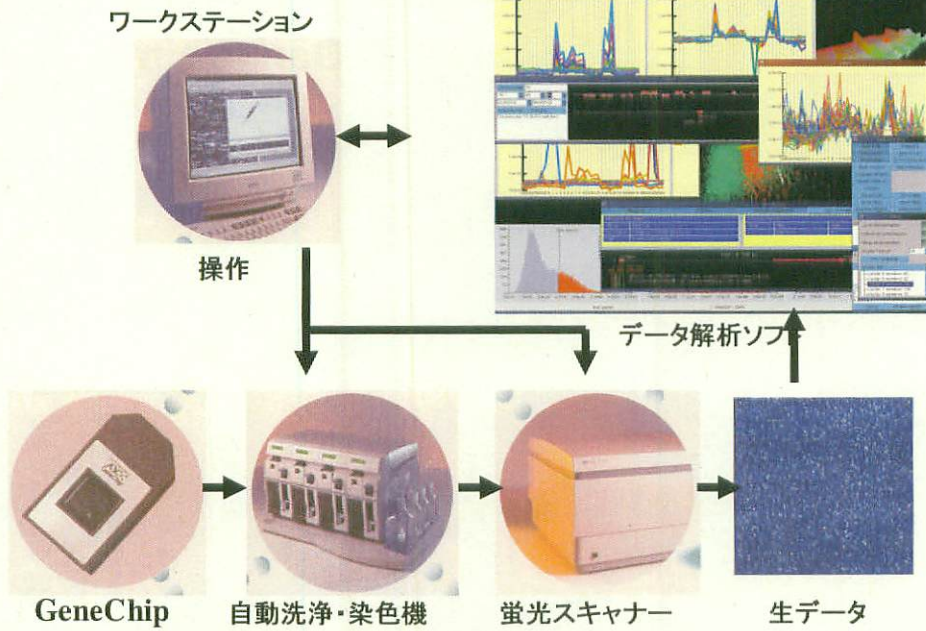
解決策: 細胞標識法による目的細胞の純化収集方法

- ・細胞表面分子に対する特異的抗体を利用した免疫標識法
- ・ノック・イン技術を用いた特定遺伝子座への蛍光分子標識法(分子生物学的技術)



未分化ES細胞から分化誘導開始後4日目の細胞集団の不均一性

DNAマイクロアレイ実験からデータ解析までの流れ



Novel Vascular Specific Genes

Preliminary Screen from Array Data

Novel or Uncharacterised Genes

- No gene prediction 4
- No domain prediction 9
- Transmembrane 8
- Signalling 16
- Transcription Factor 3
- Other interesting ~ 10



Novel Endothelial Expression

- Signalling 10
- Transmembrane 2
- Transcription Factor 7

ES細胞分化誘導モデルを用いたデータベースからの
ANOVA Sortによる上位50位の血管分化関連遺伝子群の探索結果

ES 細胞分化経路マップ

