

研究成果

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
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>① 研究の概要</p> <p>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。</p> <p>② 研究の独自性・新規性</p> <p>ES 細胞を用いた <i>in vitro</i> 無血清細胞分化誘導系には独自性があり、血管前駆細胞である Flk-1 陽性細胞から直接的なファクター刺激により血管構成細胞（内皮細胞および平滑筋細胞）を分化誘導することができる。そのため、血管細胞の細胞表面マーカーを利用した細胞収集法（セルソーティング）を利用することで、目的の細胞のみを得ることが容易になり、この手法を駆使して分化誘導の時系列を追うことも可能になった。この無血清分化誘導技術を基に血管細胞以外の分化系譜の細胞分化誘導法も最適化することが可能になり、各分化誘導した細胞を収集し、DNAマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現データベースを作成した。このデータベース化の成功により、血管細胞の分化機構を分子レベルで解明できる遺伝子発現情報データベース作成を可能にした上に、この技術の応用は、血管細胞以外にも将来想定される移植用細胞作製技術創出のための体系的情報・技術基盤「ES 細胞分化経路図」としての発展・利用が期待できる。</p> <p>③ 研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ I：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。 ・フェーズ II：遺伝子発現情報データベースを細胞作製情報基盤として拡大するため、血管細胞分化系譜以外の DNA マイクロアレイデータの蓄積とデータベース化を進める。
<p>研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）</p> <p>血管構成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 <i>in vitro</i> 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な点である。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、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、我々は培養条件を改良・工夫し、無血清培地を基に VEGF 添加培地で Flk-1 陽性細胞を培養することで、<i>in vitro</i> 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。これらの細胞から RNA を精製し、cDNA、cRNA を合成した後、Affymetrix 社のオリゴ DNA チップ（プローブ総数 36,000）を用いて、DNA チップ上で cRNA ハイブリダイゼーションを行い、各遺伝子プローブにおける蛍光強度を定量的に測定した。得られた測定値から、分化過程における遺伝子発現パターンを解析を行った。</p>

フェーズⅡでは、この遺伝子発現情報をもとに、血管構成細胞分化決定機構の解明を行い、ES細胞から血管細胞分化に関与する機能分子を同定した（千葉県CREATEとの共同研究テーマ）。さらに、この in vitro 分化誘導系を他の細胞分化誘導系構築に応用し、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターの協力により、内胚葉および外胚葉経路分化細胞のDNAマイクロアレイデータを取得・蓄積およびデータベース化を進めた。

内胚葉系譜分化誘導系の確立は、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し、goosecoid 遺伝子座に Green Fluorecence protein(GFP)遺伝子を Knock-in 法にて挿入した Gsc knock-in ES 細胞を樹立した。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^{6p}Sox17^{huCD25} ダブルノックインES細胞を作成した。

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^{6p}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った（2005年12月1日において、データベース登録サンプル数は150を超えた）。

また、上記協力機関のほかにも、データベース使用依頼がある外部研究機関にもデータベースのユーザー登録を行い、インフォマテイクスに関する研究サポートを行った。

主な成果

具体的な成果内容：遺伝子発現情報データベースを併せ持つマウスES細胞を用いた細胞分化経路地図作成のためのプライマリー・プラットフォームを構築した。

特許件数：0

論文数：2

口頭発表件数：10

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

ES細胞からの血管構成細胞分化過程をDNAマイクロアレイで網羅的に解析した報告は存在するが、ES細胞に由来する体系的な細胞分化経路を想定したDNAマイクロアレイ情報のデータベースは他に存在しない。

2 実用化に向けた波及効果

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は、ヒトES細胞への応用の際に、情報ビジネスとしてのDNAマイクロアレイデータ（マウスES細胞由来）自体が、付加価値の高い商品になる可能性がある。

残された課題と対応方針について

血管再生療法に有用な分子のヒト疾患での証明と治療評価モデルの確立。

DNAマイクロアレイデータベースのデータ蓄積継続に関する運営方法と利用方針の具体的な計画。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	2,000	5,000	8,000	11,000	7,000	33,000	0	0	0	0	0	0	0	0
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40,000	2,000	2,000	1,000	45,000	
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	8,000	10,000	16,340	11,491	19,000	7,218	62,049	0	0	0	5,000	5,000	0	10,000	
旅費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
小計	8,000	12,000	21,340	23,491	40,000	14,218	119,049	0	0	0	0	0	0	28,730	

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

JST負担による設備：核酸精製装置、低温インキュベーター、分光光度計

地域負担による設備：エクスペッション・プローブアレー