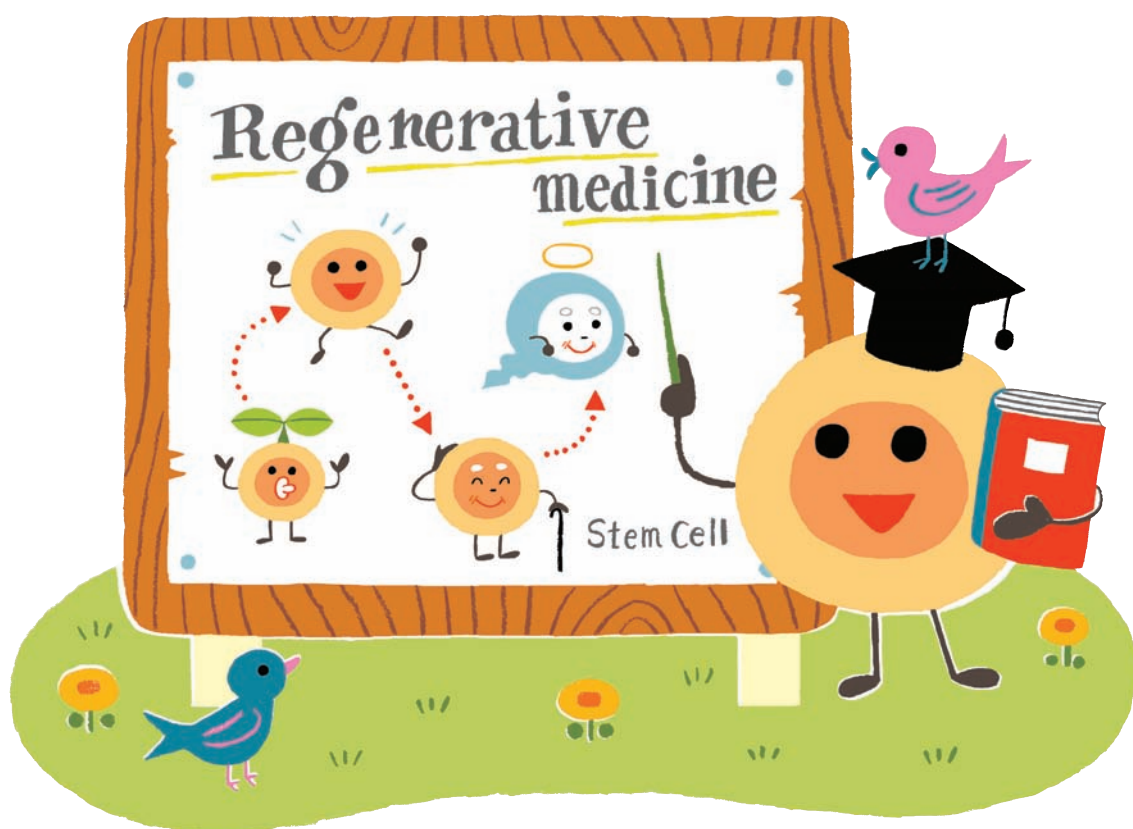


# 知ってみよう再生医療2 別冊

再生医療の実現化プロジェクト実施課題概要集



文部科学省委託研究開発事業  
再生医療の実現化プロジェクト



# C O N T E N T S — 目 次 —

## 研究用幹細胞バンク整備領域

|                                                      |   |
|------------------------------------------------------|---|
| 研究用幹細胞バンク整備事業<br>公募に基づく臍帯血幹細胞受託実験等および新規幹細胞の探索・増幅技術開発 | 1 |
|------------------------------------------------------|---|

|             |       |                                                                                                                                                                                      |
|-------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 東京大学医科学研究所  | 中内 啓光 | <a href="http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sct/">http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/sct/</a>                                                                                                    |
| (財)先端医療振興財団 | 西川 伸一 | <a href="http://www.stemcellproject.mext.go.jp/bank/contents02.html">http://www.stemcellproject.mext.go.jp/bank/contents02.html</a>                                                  |
| 慶應義塾大学      | 岡野 栄之 | <a href="http://www.okano-lab.com/">http://www.okano-lab.com/</a><br><a href="http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/index.html">http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/index.html</a> |

## 幹細胞治療開発領域

|                  |   |
|------------------|---|
| 脊髄損傷に対する幹細胞治療の確立 | 2 |
|------------------|---|

|           |       |                                                                                                                                                                                      |
|-----------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 慶應義塾大学医学部 | 岡野 栄之 | <a href="http://www.okano-lab.com/">http://www.okano-lab.com/</a><br><a href="http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/index.html">http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/index.html</a> |
|-----------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                          |   |
|--------------------------|---|
| ヒト体性および胚性幹細胞を利用した人工角膜の作成 | 3 |
|--------------------------|---|

|               |       |                                                                 |
|---------------|-------|-----------------------------------------------------------------|
| 東京歯科大学・慶応義塾大学 | 坪田 一男 | <a href="http://www.keio-eye.net/">http://www.keio-eye.net/</a> |
|---------------|-------|-----------------------------------------------------------------|

|                   |   |
|-------------------|---|
| 再生医学による心血管疾患治療の確立 | 4 |
|-------------------|---|

|               |     |                                                                                                                                                               |
|---------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 京都大学大学院医学系研究科 | 北 徹 | <a href="http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1303/index.html">http://www.med.kyoto-u.ac.jp/J/grad_school/introduction/1303/index.html</a> |
|---------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                  |   |
|------------------|---|
| 細胞移植による網膜機能再生の研究 | 5 |
|------------------|---|

|        |       |                                                                               |
|--------|-------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 理化学研究所 | 高橋 政代 | <a href="http://www.retinastem.jp/xoops/">http://www.retinastem.jp/xoops/</a> |
|--------|-------|-------------------------------------------------------------------------------|

|             |   |
|-------------|---|
| 内耳再生医療技術の開発 | 6 |
|-------------|---|

|              |       |                                                                                                           |
|--------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 京都大学大学院医学研究科 | 伊藤 壽一 | <a href="http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/index.html">http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/index.html</a> |
|--------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|               |   |
|---------------|---|
| 幹細胞ニッチ制御の技術開発 | 7 |
|---------------|---|

|           |       |                                                                                                                 |
|-----------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 慶應義塾大学医学部 | 須田 年生 | <a href="http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/index.html">http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/index.html</a> |
|-----------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                    |   |
|--------------------|---|
| 臨床応用を実現する多能性幹細胞の樹立 | 8 |
|--------------------|---|

|              |       |                                                                                                                       |
|--------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 京都大学再生医科学研究所 | 山中 伸弥 | <a href="http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/index-j.html">http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/index-j.html</a> |
|--------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 内胚系幹細胞バンクモデルの構築と幹細胞の増殖分化制御機構の解明 | 9 |
|---------------------------------|---|

|                |      |                                                                                                                                           |
|----------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 熊本大学発生医学研究センター | 桑 昭苑 | <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/stem_cell_biology/">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/stem_cell_biology/</a> |
|----------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 神経疾患に対する神経幹細胞を用いた細胞療法を臨床の場へ | 10 |
|-----------------------------|----|

|                  |      |                                                                                             |
|------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 | 伊達 勲 | <a href="http://neuro.hospital.okayama-u.ac.jp/">http://neuro.hospital.okayama-u.ac.jp/</a> |
|------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|

|                     |    |
|---------------------|----|
| 骨髄移植による構造タンパク欠損症の治療 | 11 |
|---------------------|----|

|               |      |                                                                       |
|---------------|------|-----------------------------------------------------------------------|
| 北海道大学大学院医学研究科 | 清水 宏 | <a href="http://www.derm-hokudai.jp/">http://www.derm-hokudai.jp/</a> |
|---------------|------|-----------------------------------------------------------------------|

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 造血幹細胞、間葉系幹細胞、成体多能性幹細胞の骨髄内移植法の有効性の検討 | 12 |
|-------------------------------------|----|

|         |      |                                                                           |
|---------|------|---------------------------------------------------------------------------|
| 東海大学医学部 | 安藤 潔 | <a href="http://www.med.u-tokai.ac.jp/">http://www.med.u-tokai.ac.jp/</a> |
|---------|------|---------------------------------------------------------------------------|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 体性幹細胞システムを利用した糖尿病再生医療 | 13 |
|-----------------------|----|

|             |      |                                                                                 |
|-------------|------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 群馬大学生体調節研究所 | 小島 至 | <a href="http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/">http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/</a> |
|-------------|------|---------------------------------------------------------------------------------|

## 幹細胞操作技術開発領域

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 多能性細胞の維持法と誘導法及び生体パーツ化技術開発 | 14 |
|---------------------------|----|

|                       |       |                                                                             |
|-----------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター | 笹井 芳樹 | <a href="http://www.cdb.riken.jp/sasai/">http://www.cdb.riken.jp/sasai/</a> |
|-----------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 各種幹細胞の生体内外での人為的操作技術開発 | 15 |
|-----------------------|----|

|                       |       |                                                                                                                                     |
|-----------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター | 西川 伸一 | <a href="http://www.stemcellproject.mext.go.jp/bank/contents02.html">http://www.stemcellproject.mext.go.jp/bank/contents02.html</a> |
|-----------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 固形臓器における組織幹細胞の分離・解析と医療応用基盤開発 | 16 |
|------------------------------|----|

|                       |       |                                                                                                                                                                     |
|-----------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター | 谷口 英樹 | <a href="http://www.cdb.riken.jp/jp/index.html?CDBdirect#02_research/0207_lp01.html">http://www.cdb.riken.jp/jp/index.html?CDBdirect#02_research/0207_lp01.html</a> |
|-----------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                     |    |
|---------------------|----|
| 体性組織幹細胞の実体解明と応用技術開発 | 17 |
|---------------------|----|

|                       |       |                                                                                                                                                                     |
|-----------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター | 小阪美津子 | <a href="http://www.cdb.riken.jp/jp/index.html?CDBdirect#02_research/0207_lp02.html">http://www.cdb.riken.jp/jp/index.html?CDBdirect#02_research/0207_lp02.html</a> |
|-----------------------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

# 研究用幹細胞バンクの整備 公募に基づく臍帯血幹細胞受託実験等および 新規幹細胞の探索・増幅技術開発

東京大学医科学研究所 中内 啓光、先端医療振興財団 西川 伸一、研究用幹細胞バンク、理研BRC

## ■研究目的

再生医療に関わる研究者・研究機関が、公平かつ迅速に幹細胞資源を入手し、生命倫理に則った研究活動を行える環境を整備する。

## ■内容

再生医療の実現を促進の為に、人の細胞を使って研究を推進する必要があります。  
お母さんから提供して頂きたい帯血の中で、量や細胞の数が少ない等、**日本さい帯血バンクネットワークの移植基準\***に満たなかったさい帯血を活用しています。

\*日本さい帯血バンクネットワーク基準

細胞処理後の有核細胞数が $6 \times 10^6$ 個以上、細胞処理開始時刻が採取後24時間以内→約半数が移植適応外

### 移植適応外となった臍帯血を活かすために

- 臍帯血細胞は多くの可能性を秘めた幹細胞の貴重なリソースである。
- 再生医療の実現には幹細胞に関するさらなる基礎研究の進展と臨床へのトランスレーションが必須である。
- 実用化、臨床応用のためにはヒト幹細胞を用いた効果や安全性確認のための研究が要求される。
- 多くの研究者にとってヒト幹細胞を含む研究試料を入手することは難しい。

## 研究用幹細胞バンク

研究用幹細胞リソースバンクは、“未来の医療”の為に、世界にも類がない合理的なシステムです。

研究用幹細胞リソースバンクには、  
日本さい帯血バンクネットワーク11バンクのうち、  
5つのバンクが参画しています。

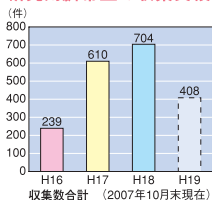
宮城さい帯血バンク（東北大学）  
東京臍帯血バンク（東京大学）  
東海大学さい帯血バンク（東海大学）  
東海臍帯血バンク（名古屋医療センター）  
兵庫さい帯血バンク（兵庫医科大学）

善意で提供されながら細胞数が足りない等（さい帯血移植へ提供の為に保存基準を満たさない）の理由により廃棄されている臍帯血中の造血幹細胞（血のもとになる細胞）を体外で増やす技術が確立出来れば、骨髄移植を待つ世界中の患者さんだけでなく、再生医療の実現化にむけ大きな技術革新となります。

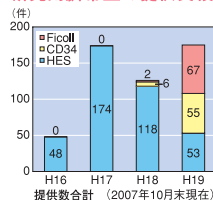


## ■研究用臍帯血の提供実績

研究用臍帯血の収集実績



研究用臍帯血の提供実績



## 提供中の研究用臍帯血の種類

- ・凍結臍帯血… 有核細胞数: $3 \times 10^6$ 個以上 (Hes法/Ficoll法)
- ・CD34陽性細胞… 純化細胞数: $1 \times 10^6$ 個以上  
※CD34というマーカーを用い“血のもとになる細胞”に純化されています。

# 脊髄損傷に対する幹細胞治療の確立

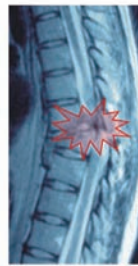
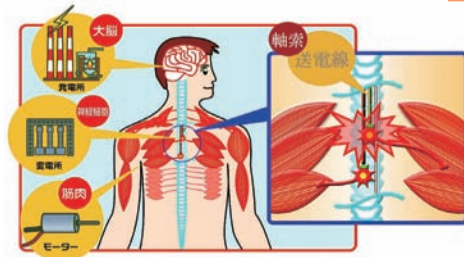
慶應義塾大学 岡野 栄之

## ■研究の概要と目的

これまで不可能とされてきた脳・脊髄の再生に向け、幹細胞を用いた脊髄損傷に対する新しい治療法とリハビリテーションを併用した総合的な治療法の開発と検討

### 脊髄損傷患者さんのMRI

実際の臨床では約10%の軸索が損傷を免れるか、もし再生できれば、機能的にはかなりの改善が期待できる



### 脊髄再生は不可能

- ・軸索(送電線)は断裂すると二度と伸びない
- ・神経細胞(変電所)は壊れると二度とできない

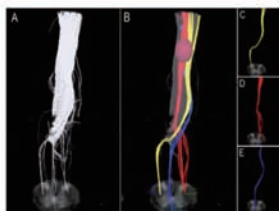
### 脊髄再生への挑戦

- ・脊髄損傷の肝細胞治療の開発
- ・2次障害を防止する治療の開発
- ・損傷脊髄の再生を促す治療法の開発

## ■研究内容

1. ラット脊髄損傷に対する自己組織化ペプチドを用いた神経幹細胞移植の有効性の立証
2. ラット脊髄損傷に対する自己血漿を用いた神経幹細胞移植の有効性の立証
3. ラット脊髄損傷に対する骨髄由来幹細胞移植の有効性の立証
4. マウス脊髄損傷に対するES・iPS細胞由来神経幹細胞移植の有効性を立証
5. ラット脊髄損傷に対するラット嗅粘膜由来グリア細胞移植の有効性を立証
6. Bio-imagingを用いた損傷脊髄に対する神経幹細胞移植の至適投与法を明らかにした
7. 慢性期脊髄損傷に対するコンドロイチナーゼABCの有効性を明らかにした
8. 損傷程度の異なるサル頸髄損傷モデルを確立した
9. 拡散テンソールMRIによるサル損傷頸髄内投射路の可視化に成功した
10. サル脊髄損傷に対する肝細胞増殖因子の有効性を立証
11. サル脊髄損傷に対するガレクチン導入ヒト神経幹細胞移植の有効性を立証

## 治療後の評価法の確立



## MRIによる脊髄内神経軸索の可視化

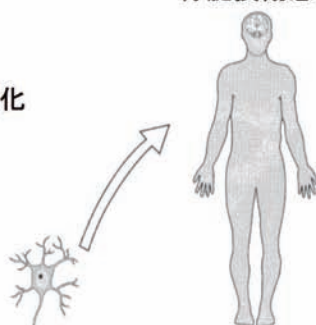
## 損傷脊髄内への自家移植



- ・肝細胞増殖因子
  - ・スカフォールド(足場)
  - ・軸索伸展阻害因子の抑制剤
- などとの併用

## iPS細胞・神経堤幹細胞を用いた自家移植による脊髄再生

### 脊髄損傷患者



### iPS細胞 神経堤幹細胞

### 細胞の安全性の確立

### 神経幹細胞への分化 誘導法の確立

### 神経幹/前駆細胞

## 安全かつ安定した細胞供給体制の確立



# ヒト体性および胚性幹細胞を利用した人工角膜の作成

東京歯科大学・慶應義塾大学 坪田 一男

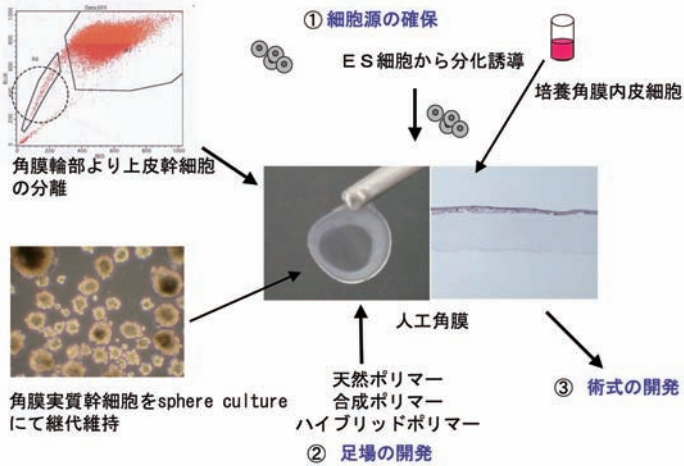
### ■研究目的

幹細胞を含む組織工学的手法を用いて、人工角膜を作成し、年間約2万数千人の角膜疾患による失明者を治療することにより、医療・福祉費用の削減、および患者らの社会的・経済的自立を図る。

### ■研究の概要

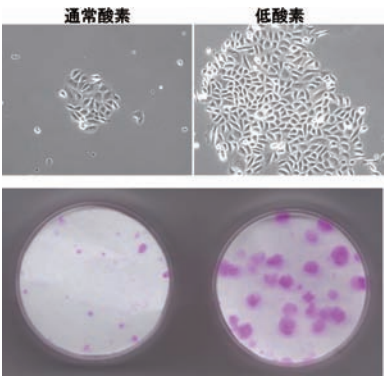
不可逆的な角膜の疾患による視力障害を来した場合には、提供者の死後、アイバンクにより提供を受けた角膜を移植する以外に視力を回復する方法はない。しかし、十分な供給が得られている米国以外の国々では、提供者数が圧倒的に不足しており、日本でも年間2万数千例必要とされる角膜移植に対して、1600例程度の献眼しか得られていない。逆に潤沢な供給が得られている米国では、アイバンクの角膜に依存する傾向が強いため、代用物の開発に力が注がれていないのが現状である。本研究ではまず、人工角膜を作製するための細胞を恒常的に供給できるシステムを構築する。戦略として、まずは未だ同定されていない各細胞成分の幹細胞を分離培養する。また、移植用培養組織を作成する際に必要となるフィーダー細胞を、現存のマウス由来3T3細胞を使用せずに済む方法として、角膜実質幹細胞をフィーダー細胞として用いる技術を開発する。

一方で、免疫原性を回避する方法としては、口腔粘膜上皮などの自己細胞を用いる技術も開発する。拒絶反応は極度の視力低下を招くばかりか、再移植の必要なレシピエントも少なくなく、再手術による物理的、精神的、経済的負担が大きいに、アイバンクからの提供が必要となりドナー不足に拍車を掛けている。これらの総合的な問題解決には、単にヒト角膜細胞で構築された人工角膜ではなく、今回の目標とされている1) 抗原性の少ない、2) 安定供給が可能な、3) 生体材料の利用により生着性の高い、人工角膜の作成が角膜移植における究極の再生医療と考えられる。

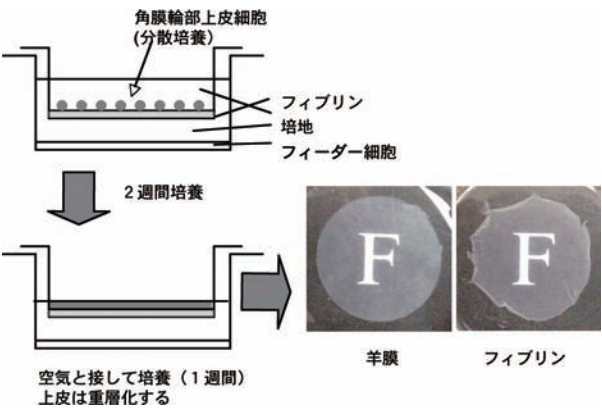


### ■今年度成果の概要

ヒト角膜上皮前駆細胞を低酸素条件(2%O2)で培養することで、より多くの未分化な、増殖能の高い細胞を培養することに成功した。これらの細胞から上皮シートを作成するためにも、羊膜を用いない上皮シート作成法を開発した。本技術では外科用フィブリン糊を用いることで、上皮シートを直接角膜に移植することが可能となった。また、上皮前駆細胞を培養するためにフィーダー細胞(補助細胞)を必要とする。従来はマウス由来のフィーダー細胞(3T3)を用いていたが、ヒト骨髄幹細胞をフィーダー細胞として用いることが可能であることを始めて示した。これらの技術を組み合わせることで、より安全に角膜上皮を再生することが可能となった。現在は臨床応用に向けて厚生労働省に申請中である。

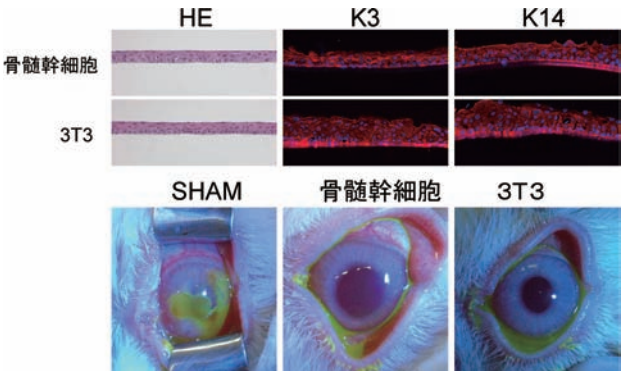


ヒト角膜上皮前駆細胞を低酸素で培養する技術を確認。低酸素によって、より増殖能力の高い前駆細胞を選択的に培養できる。

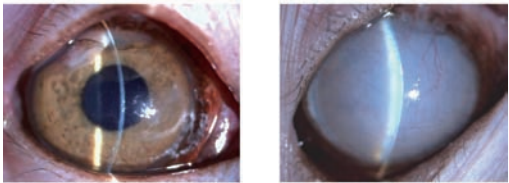


### フィブリンを用いた培養上皮シート

従来は羊膜などの媒体を用いて上皮シートを作成していたが、外科用フィブリン糊を用いて上皮シートを作成する技術を開発させた。移植時にはフィブリンは溶解しているため、上皮を直接移植することが可能となった。将来は、自己血からフィブリンを生成する予定である。



ヒト骨髄幹細胞をフィーダー細胞として用いても3T3細胞と同等の上皮シートを作成することが可能となり、家兎を用いた実験(下段)でもその有効性が示された。



### 角膜上皮細胞シート移植

ヒトと同じ霊長類であるカンクイザルを使って、角膜上皮細胞のシート移植に成功した。霊長類の角膜上皮細胞は増殖しないことで知られているが、培養系では限定的に増殖する。一つのドナー角膜から数人分の角膜上皮シートの作成が可能となる。今後は、角膜上皮細胞の幹細胞を分離培養する予定である。

# 再生医学による心血管疾患治療法の確立

京都大学大学院医学研究科教授 北 徹

## ■研究目的

幹細胞から心血管構成細胞を再生し移植することによる虚血性心疾患ならびに心不全の心血管再生治療法の確立

## ■研究の概要

### 1. 血管再生による虚血性心疾患治療の基盤開発

- ①血管前駆細胞の同定とin vitro血管再生系の確立
- ②霊長類における虚血性心疾患の血管再生療法の確立

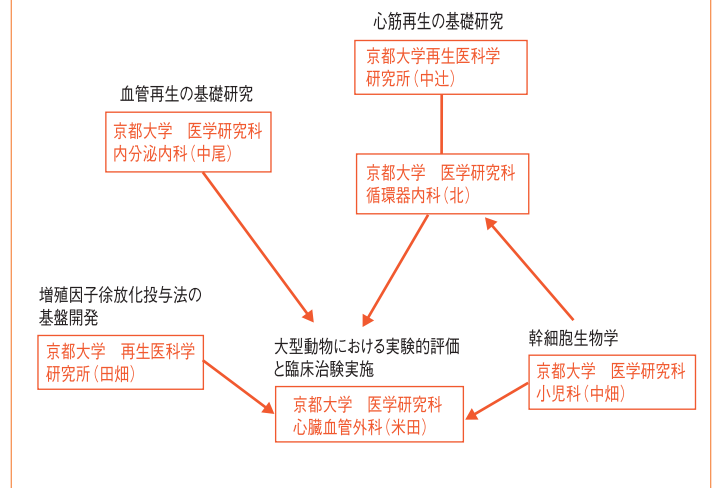
### 2. 心筋再生による心不全治療の基盤開発

- ①遺伝子導入による心筋細胞分化系の確立と心筋細胞移植
- ②霊長類ならびにヒト胚性幹細胞からin vitro心筋分化系の確立

### 3. 心血管再生療法の実験的評価と臨床治験実施

- ①大型動物における心血管再生療法の評価とヒトにおける臨床治験実施
- ②心血管細胞移植の併用療法としての増殖因子徐放化投与法の確立
- ③成体幹細胞による心血管再生療法の確立

## 心血管再生医療実現に向けた研究チーム



## ■研究成果

### (1) 血管再生療法

ヒトES細胞において血管前駆細胞を世界で初めて見出し、これらの細胞の移植により下肢や脳の虚血が改善することを示しました。

### (2) 心筋再生療法

マウスならびにカンクイザルES細胞において、心筋分化機構を解明し、高効率に心筋に分化するシステムを確立しました。

### (3) 増殖因子徐放体を用いた血管新生療法

- 下記2つの臨床試験を開始致しました。
- ・下肢閉塞性動脈硬化症に対する血管新生療法
  - ・びまん性冠動脈病変に対するバイオCABG



増えつつある心血管疾患の新規治療法確立のための研究を行っています。

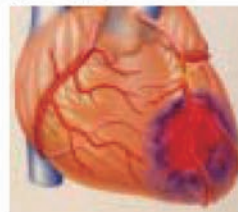
## 参考文献

1. M. Sone, H. Itoh, J. Yamashita, T. Yurugi-Kobayashi, Y. Suzuki, Y. Kondo, A. Nonoguchi, N. Sawada, K. Yamahara, K. Miyashita, K. Park, S. Nito, M. Shibuya, S.-I. Nishikawa and K. Nakao. Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation* 107: 2085-2088, 2003.
2. Kawamura T, Ono K, Morimoto T, Wada H, Hirai M, Hidaka K, Morisaki T, Heike T, Nakahata T, Kita T, Hasegawa K. Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:19682-19688
3. Takaba K, Jiang C, Nemoto S, Saji Y, Ikeda T, Urayama S, Asuma T, Hokugo A, Tsutsumi S, Tabata Y, Komeda M. A combination of omental flap and growth factor therapy induces arteriogenesis and increases myocardial perfusion in chronic myocardial ischemia: evolving concept of biologic coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 132:891-899.

動脈硬化症



虚血性心疾患



下肢閉塞性動脈硬化症



壊疽

心不全  
不整脈  
心破裂

死亡

## 心血管細胞の再生による虚血性心疾患の治療

ES細胞

血管構築細胞



心筋細胞



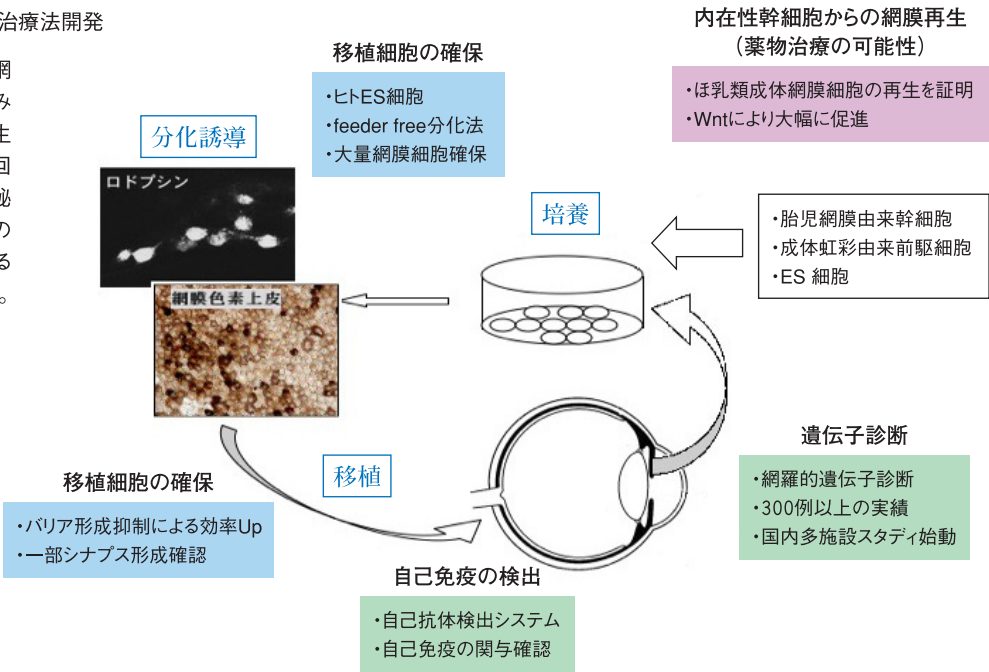
細胞移植による網膜機能再生の研究

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チーム 高橋 政代  
研究協力機関 京都大学医学研究科、ウイルス研究所、再生医科学研究所

研究の目的

網膜細胞移植および再生による網膜疾患の新しい治療法開発

最近まで再生しないと思われていた成体ほ乳類の網膜が、少なくとも傷害時には網膜細胞を新たに生み出す力を持っていることがわかってきました。機能再生のためには、網膜細胞新生とともに網膜内で神経回路を再構築する能力が必要ですが、その能力をも秘めているのかもしれないと期待させます。この再生の力を薬物で増強して、あるいは外から細胞を移植することによって、疾患で失われた網膜機能を再生させたい。これが我々の目標です。



|                  | 基礎研究<br>（移植および薬物治療）                                         |                                    |                                                       | 臨床の準備<br>（網膜色素変性の病態解明）                     |                           |
|------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
|                  | 網膜細胞移植                                                      |                                    | 内在性幹細胞からの<br>網膜再生<br>（薬物治療）                           | 遺伝子診断                                      | 自己免疫の検出                   |
|                  | 移植細胞確保                                                      | 細胞移植法の改良                           |                                                       |                                            |                           |
| プロジェクト<br>開始前の状態 | マウスES細胞<br>Feeder必要<br>少量網膜細胞                               | 胎児網膜細胞を単に<br>移植<br>シナプス形成なし        | 成体網膜は再生なし                                             | 単一遺伝子の診断のみ                                 | 自己免疫の関与不明                 |
| 成果               | ・ヒトES細胞<br>・feeder free<br>・網膜細胞分化効率化<br>（視細胞、<br>網膜色素上皮細胞） | ・バリア形成抑制による<br>効率Up<br>・一部シナプス形成確認 | ・ほ乳類成体網膜細胞<br>の再生を証明<br>・Wntにより大幅に促進<br>↓<br>薬物治療の可能性 | ・網羅的遺伝子診断<br>・300例以上の実績<br>・国内多施設スタディ始動    | ・自己抗体検出システム<br>・自己免疫の関与確認 |
| 課題               | 視細胞<br>・シナプス形成<br>・動物実験での<br>機能確認<br><br>網膜色素上皮細胞<br>・拒絶反応  | ・移植用手術器具の<br>整備                    | ・再生した視細胞による<br>網膜機能回復確認                               | ・未知の原因遺伝子検索<br>・網膜変性の診断に有用な<br>遺伝子診断システム構築 | ・自己抗体が原因となる<br>抗体であるか検討   |

網膜機能の再生方法として、皮膚のように網膜内に存在する幹細胞から失われた細胞を生み出し組織を再建する方法と、各種幹細胞から疾患の治療に必要な視細胞や網膜色素上皮細胞を多量に得て、移植した細胞の生着、神経回路再構築を誘導する方法があります。現在は薬によって網膜細胞を増やすことと、ES細胞から移植材料となる網膜細胞を得ることが可能となっています。今後検討が必要なのは、薬で増えた細胞、および移植して補充した細胞がもとの網膜の細胞と繋がり（シナプス形成）、神経回路を再構築するかどうかです。

さらに、再生医療を成功させるためには、基礎側からのアプローチだけでなく、臨床側からのアプローチ、すなわち対象となる疾患の深い理解も重要です。網膜色素変性の遺伝子変異解析や自己免疫の関与について解明せずに細胞移植を行えば、動物実験上は良い結果が得られても、実際の臨床では成功しないという結果に陥る可能性があります。しっかりした基礎と臨床の事実、両者をふまえた網膜再生研究が必要です。

# 内耳再生医療技術の開発

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 伊藤 壽一

## ■研究の目的・目標

### 1) 感音難聴とは？

難聴には、伝音難聴と感音難聴があります。鼓膜や中耳に異常があり、音が伝わりにくくなるのが、伝音難聴です。この多くは、手術で治療することができます。感音難聴は、中耳のさらに奥にある内耳（図1）が悪くなって聞こえが悪くなる病気です。

### 2) 感音難聴は治るのですか？

急に聞こえが悪くなるタイプでは、薬物治療で半分ぐらいが治りますが、ゆっくりと悪くなる難聴、例えば、老人性難聴などは治りません。また、多くの先天性難聴（生まれたときからの難聴）も治らないことが多いです。

### 3) どのぐらいの人々が感音難聴で困っているのですか？

日本では、36万人が高度難聴で障害者となっています。また、生まれてくる子供の1000人に1人には難聴があります。65歳を超えると半分の人に難聴があります。

### 4) どうすれば、感音難聴は治るのですか？

感音難聴では、内耳の蝸牛（図2）にある音を感じる細胞や神経細胞が失われています。これらの細胞が再生すれば、聞こえが戻ると考えられます。

この研究では、**内耳の神経細胞を再生させることによって、感音難聴治療の新しい方法を開発すること**を目的としています。

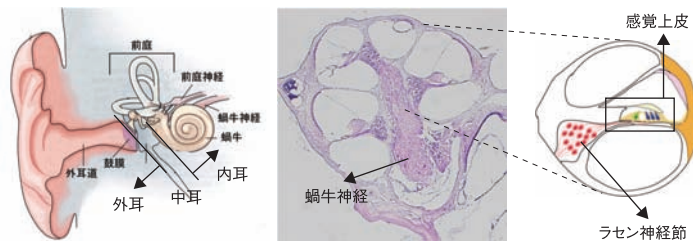


図1: 耳の構造

図2: 蝸牛の断面図

## ■研究内容

### 細胞移植による蝸牛神経（ラセン神経節）の再生

- ✓ 蝸牛の中心、軸に相当する部分にラセン神経節があります（図2）。
- ✓ ラセン神経節は、感覚上皮が感じ取った音刺激を脳に伝えます。
- ✓ ラセン神経節が失われると、感音難聴になるだけでなく、人工内耳も役に立たなくなります。

●この研究では、**細胞移植という方法を用いて、内耳のラセン神経節細胞再生に関する研究を行いました。**

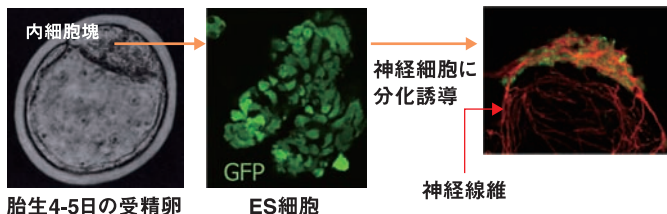
### 1) 移植した細胞は、神経を伸ばすのか？

### 2) 実際に、内耳の働きがよくなるのか？

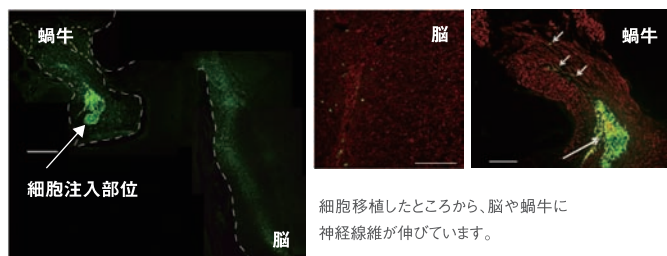
を中心にいろいろな実験を行いました。

## 移植に使った細胞：胚性幹細胞（ES細胞）

ES細胞とは：受精後の卵から採取される万能細胞

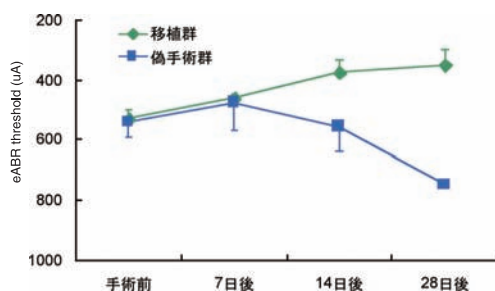


### 1) ES細胞から作った神経細胞は、内耳で神経を再生する



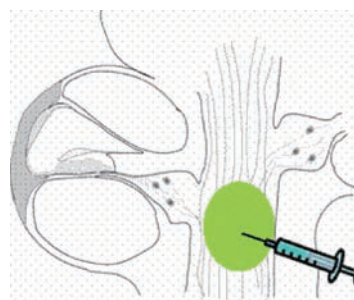
### 2) 細胞移植により、神経の機能が回復する

内耳を直接電気刺激して、脳の反応を調べる検査を行いました。



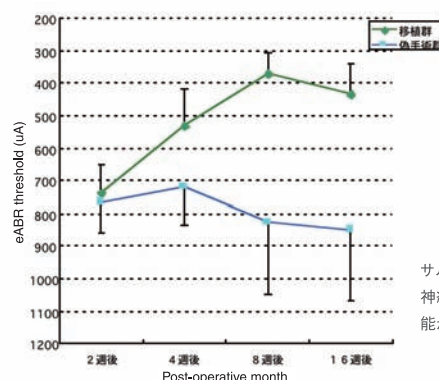
細胞移植を行った耳（緑色）では徐々に改善していますが、細胞を入れていない（偽手術群、青色）では、どんどん機能が悪くなっています。

## ES細胞から作った神経細胞を耳に移植



あらかじめ神経細胞を破壊した内耳に細胞を移植します。

### 3) サルでも同じ機能回復効果があることが分かった



サルでもサルES細胞から作った神経細胞を移植すると、徐々に機能が良くなることが分かりました。

## ■将来の展望

実際の治療に用いるためには、いくつかの問題を解決する必要があります。今後、次のようなことを調べます。

- ✓ ヒトES細胞でも同じ結果はえられるのだろうか？
- ✓ iPS（皮膚線維芽細胞由来の万能細胞）でも同じことはできる？
- ✓ 安全性に問題はないか？

# 幹細胞ニッチ制御の技術開発

慶應義塾大学 須田 年生

## ■研究目的

- 1) ヒト造血幹細胞のニッチを特定する。
- 2) Ang-1/Tie2シグナルに着目した体外におけるヒトニッチ環境を作成する。
- 3) 体外ニッチ環境を用いて、ヒト臍帯血造血幹細胞の増幅を試みる。

## ■研究内容

臍帯血は造血幹細胞を豊富に含み、造血幹細胞移植のソースとして、様々な疾患に臨床応用されている。しかし、1本の臍帯血に含まれる造血幹細胞、前駆細胞数は少なく、臍帯血幹細胞移植の適応が限られてしまうこと、移植後免疫回復遅延などの問題があげられる。

これらの問題を解決すべく、臍帯血幹細胞の体外増幅が多くの研究者の注目を集め、試みられるようになった。

われわれは、マウスにおいて、静止期造血幹細胞にはTie2受容体が発現し、その結合因子であるAng-1がニッチを構成する骨芽細胞から産生されること、Tie2/Ang-1シグナルが造血幹細胞を静止期に維持することを報告した。

そこで、このマウスの知見をもとに、ヒト造血幹細胞ニッチを特定し、ex vivoでヒト造血幹細胞ニッチを再構築することで臍帯血幹細胞の増幅系の確立を図る。まず、ヒト臍帯血幹細胞にTie2受容体が発現していることを確認し、その上で、Ang-1を加えた培養系を用いて造血幹細胞維持、増幅に最適な培養条件・環境を検討する。

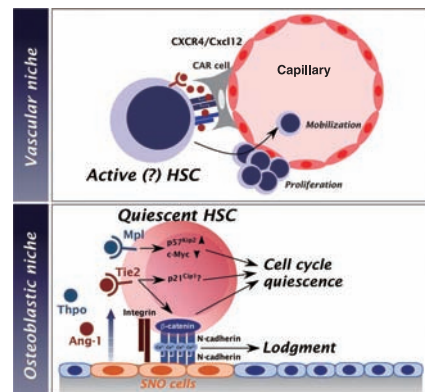
## ■マウス造血幹細胞におけるTie2/Ang-1シグナル

マウス骨髄からTie2+KSL-SP (C-kit+Sca-1+Lin- Side Population)細胞を採取し、Stem Cell Factor、Thrombopoietinを加えた無血清培地を用いてAng-1添加群と非添加群に分けて7日間培養し、致死的放射線照射したマウスに骨髄移植を行った。移植後のキメリズム解析から、Ang-1添加群で長期骨髄再構築能が維持され、Tie2/Ang-1シグナルが造血幹細胞の静止期維持に重要な働きをしていることがわかった。

成体骨髄においては、造血幹細胞の存在する微小環境「ニッチ」には骨芽細胞ニッチ (Osteoblastic niche) と血管細胞ニッチ (Vascular niche) が存在する。

造血幹細胞は骨芽細胞に接着して静止期を維持しており、その制御にはTie2/Ang-1, Mpl/Thpo, b-catenin/N-cadherinが重要な役割を果たしている。(右図参照)

(Cell, 2004, Cell Stem Cell, 2007)



## ■研究結果

ヒト臍帯血細胞において未分化な造血幹細胞集団であるCD34+CD38-細胞はTie2を発現している。SCF, TPO, Ang-1を含む無血清培地を用いた低酸素条件下 (O<sub>2</sub> 1%)での培養が未分化な造血幹細胞の維持に適しており、また、Tie2の発現も保持されることがわかった。培養後の細胞を用いた造血幹細胞移植実験 (免疫不全マウスNOGマウスへの移植) は現在進行中である。

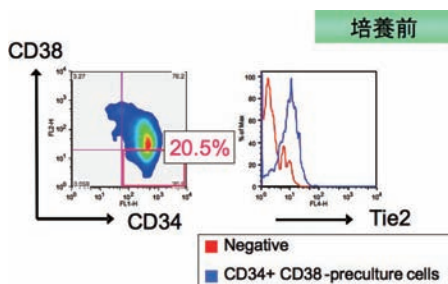


図1: 培養前の臍帯血細胞の特徴  
96%がCD34+, 20.5%がCD34+ CD38-分画。  
このCD34+CD38-細胞はTie2を発現していた。

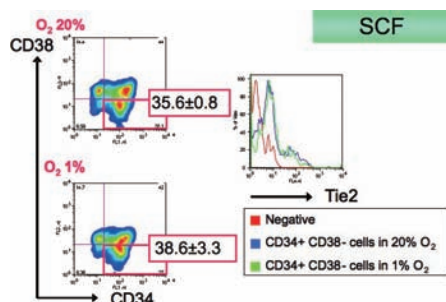


図3: 培地にSCFを加え6日間培養。CD34+ CD38-は35-38%、Tie2の発現は保持された。酸素濃度による差はみられなかった。

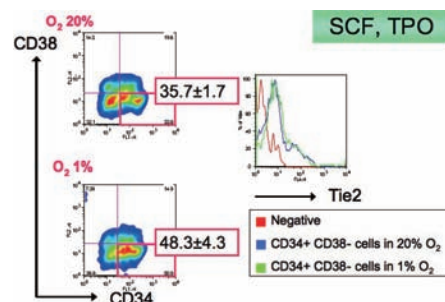


図4: 培地にSCF, TPOを加え6日間培養。CD34+ CD38-はO<sub>2</sub> 1%で増加、Tie2の発現は保持された。

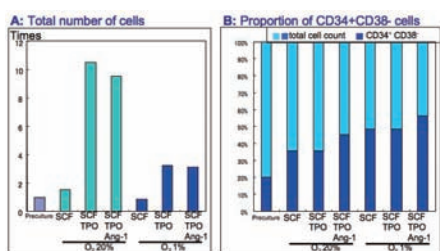


図2: 6日間培養後の全細胞数 (A)とCD34+ CD38-細胞の比率 (B)を示す。低酸素培養では細胞増殖は抑制されるが、未分化な幹細胞分画の比率は上昇した。

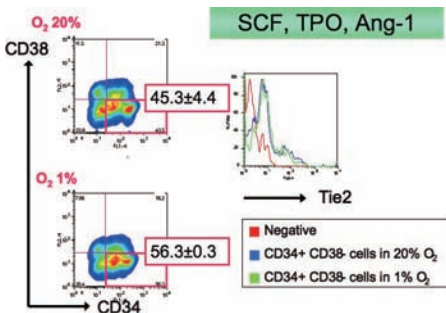


図5: 培地にSCF, TPO, Ang-1を加え6日間培養。CD34+ CD38-はO<sub>2</sub> 1%で56%に上昇。Tie2発現は保持された。

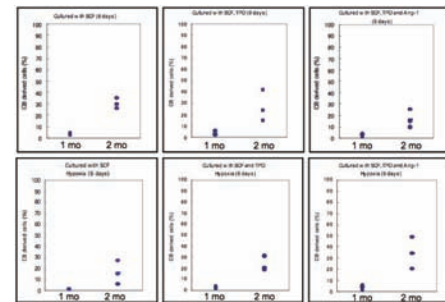


図6: 6日間培養した臍帯血細胞をNOGマウスへ移植 (培養前CD34+細胞3万個/マウス) Ang-1添加低酸素群では細胞増殖は抑制されるが (図2) 長期骨髄再構築能は維持される。

# 臨床応用を実現する多能性幹細胞の樹立

京都大学再生医科学研究所 山中 伸弥

## ■本課題の目的

ES細胞培養法の改善、腫瘍形成の抑制

多能性を誘導する因子の探索

→臨床で使える多能性幹細胞を樹立

## ■これまでの成果

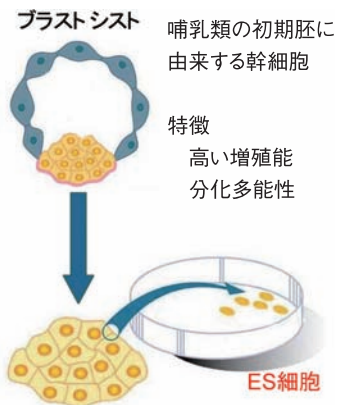
マウス線維芽細胞から多能性細胞を誘導する因子

(Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4)

を同定し、人工万能細胞 (iPS細胞) を樹立

→ヒト皮膚細胞からのiPS細胞作製に成功

## ES細胞とは



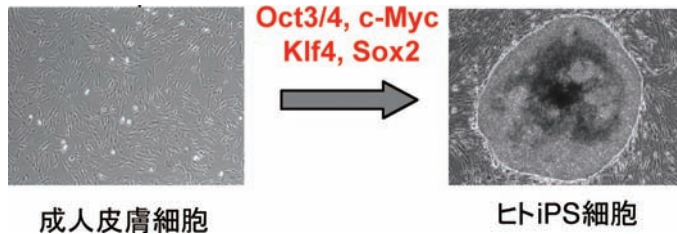
## 細胞移植療法



## ヒトES細胞の問題点

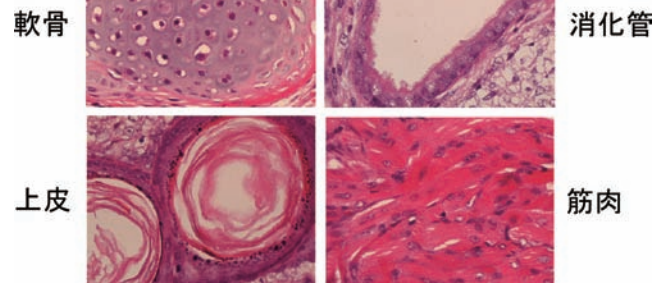
- ・ヒト受精卵の利用
- ・拒絶反応
- ・培養困難
- ・腫瘍形成

ヒトES細胞を作製するためには受精卵を破壊する必要があります。こうしてできたヒトES細胞は患者自身の細胞ではないため、移植後の拒絶反応が心配されます。さらに、腫瘍形成の可能性があることやマウスES細胞と比べて培養が困難であるという問題もあります。



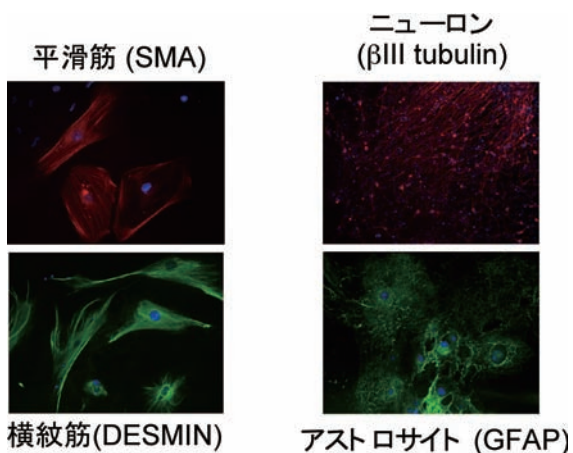
## 3因子による多能性幹細胞の誘導

成人の皮膚から採取した線維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4といった3つの遺伝子を導入することにより、ES細胞に良く似た人工多能性幹 (iPS) 細胞を作製することができます。



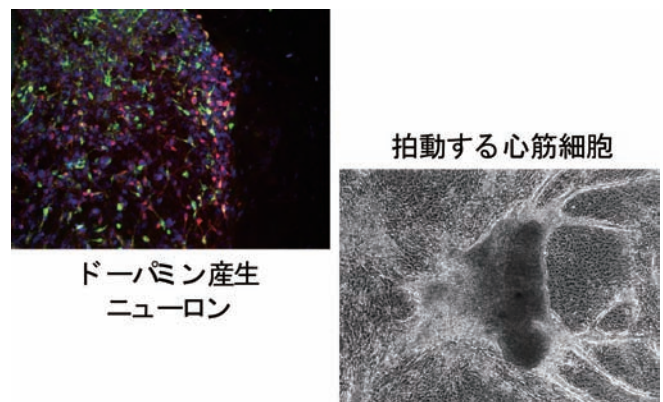
## iPS細胞から形成される奇形腫

ヒトiPS細胞は軟骨、消化管、上皮、筋肉など様々な組織を含む奇形腫を形成できます。この性質ES細胞やiPS細胞が分化多能性であるという指標のひとつです。



## iPS細胞からの分化細胞誘導

ヒトiPS細胞は試験管内において、筋肉細胞 (平滑筋、横紋筋) や神経細胞 (ニューロン、アストロサイト) を含む様々な細胞に分化することができます。



## iPS細胞を直接目的の細胞に分化させる

ヒトiPS細胞に試験管内で特定の刺激を加えることにより、ドーパミンを産生する神経細胞や拍動する心筋細胞を作製することができます。この技術を発展させることで、必要な細胞を必要ときに得られるようになることが期待されます。

# 内胚葉幹細胞バンクモデルの構築と増殖分化制御機構の解明

熊本大学発生医学研究センター 糸 昭苑 (代表)  
熊本大学大学院医学薬学研究部 遠藤 文夫

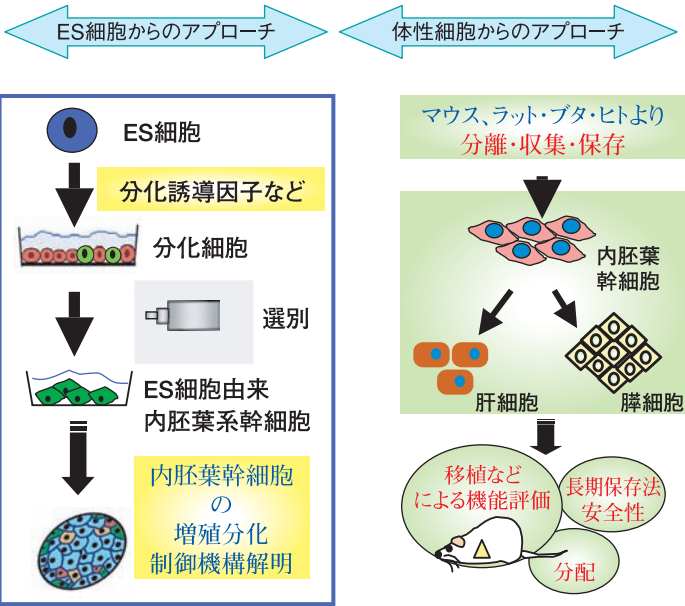
研究概要と目的

- ES細胞から内胚葉系幹細胞への効率的分化誘導法の開発
- ES細胞由来の内胚葉系幹細胞の単離同定
- 内胚葉系幹細胞バンクモデルへの各種動物からの単離収集、細胞の安全性に配慮した採取と保存方法の確立
- 保存された細胞の機能を評価するシステムを確立
- 保存した幹細胞の分化誘導方法について臨床応用の観点からの検討

- 重篤な肝疾患、糖尿病を対象とした幹細胞治療の実現化
- 内胚葉系幹細胞の増殖分化誘導機構についての基礎研究
- 並びに幹細胞を収集保存し機能評価するバンクモデルの構築

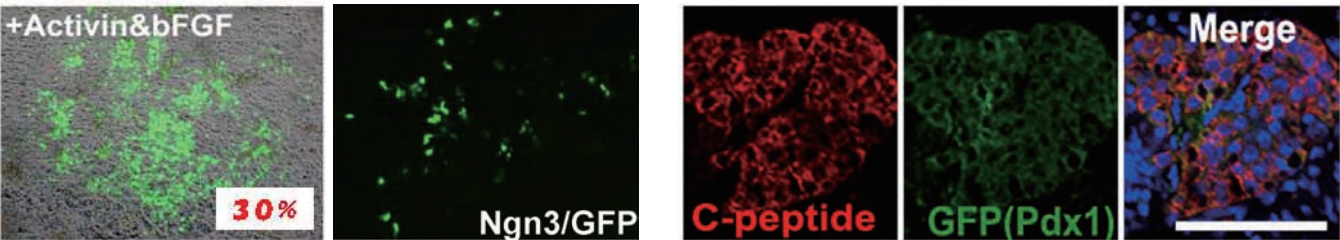
想定される波及効果

重篤な肝疾患、糖尿病を対象とした幹細胞治療の実現化、患者のQOLの改善



① ES細胞

内胚葉系幹細胞への効率的分化誘導法の開発



ES細胞から膵前駆細胞分化誘導効率の上昇2%から30%へ

ES細胞からNgn3陽性内分泌前駆細胞への*in vitro* 分化誘導

膵前駆細胞を*in vivo* 移植により、インスリン陽性細胞へ分化した

- ES細胞由来の膵臓幹細胞の単離同定、遺伝子発現解析を行った
- 膵臓前駆細胞から内分泌細胞への分化制御

② 体性幹細胞

保存したヒト由来内胚葉系幹細胞の分化誘導法による多分化能の比較

ヒト唾液腺由来内胚葉系幹細胞の分化誘導法を変えることにより、胎児の膵臓β細胞とほぼ同等の性質を持った細胞集団を得ることができた。この多分化能は細胞の凍結保存後も維持することができた。

Table 1. Markers for human-salivary gland-derived progenitor cells, endocrine progenitors, and islet β-cells

| Marker        | Human-SGP Monolayer culture | Human-SGP spherical culture | Fetal pancreas endocrine progenitor | Adult pancreas Islet β-cel | References                    |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Cytokeratin19 | -                           | +                           | +                                   | -                          | Bouwens, L. et al.(1997)      |
| Neurogenin3   | -                           | +                           | +                                   | -                          | Schwitzgebel, VM et al.(2000) |
| Nkx6.1        | -                           | +                           | +                                   | +                          | Watada, H. et al.(2000)       |
| PDX-1         | -                           | +                           | +                                   | +                          | Offield, M.F. et al. (1996)   |
| GLUT2         | -                           | +                           | +                                   | +                          | Pang, K. et al.(1994)         |
| Insulin       | -                           | +                           | +                                   | +                          |                               |
| PTF1-p48      | -                           | -                           | -                                   | -                          | Krapp, A. et al.(1998)        |
| amylase       | +                           | +                           | -                                   | -                          |                               |

# 神経疾患に対する神経幹細胞を用いた細胞療法を臨床の場へ

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経病態外科学 伊達 勲

## ■研究の目的

パーキンソン病などの神経変性疾患や脳梗塞などの脳卒中が原因で、多くの患者さんが後遺症に悩まされている。これらの疾患に対して神経再生・修復をめざした脳内への細胞移植療法は、最も新しい治療法の一つといえる。しかしながら、これまで、ドナー細胞や倫理的問題などから日本では脳への移植治療はほとんど行われていないのが現実である。

そこで、大人の脳内にも存在し、生涯にわたって維持されている神経幹細胞を取り出し増殖させて、新しいドナー細胞として利用できないか、また、患者さんから取り出した細胞を自分に移植する、いわゆる自家細胞移植が可能かどうか検討し、最終的には臨床応用の可能性をめざす。

## ■研究の内容

### 1. 自家神経幹細胞移植に関する研究

ネズミもしくは、ニホンザルより定位脳手術装置を用いて、殺すことなく神経幹細胞を脳室周囲より採取し、増殖させ、目的の細胞へ分化誘導を行う。特に、パーキンソン病に関しては、ドパミン産生神経細胞への分化を誘導する。さらに、その細胞を脳内に移植し、宿主脳内で生着できるかどうか検討する。

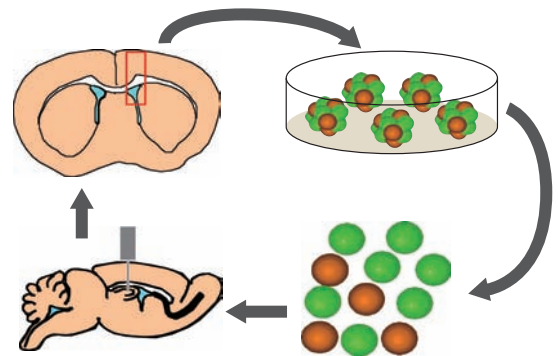
### 2. パーキンソン病に対する神経幹細胞移植に関する研究

神経幹細胞はパーキンソン病患者に必要なドパミンを産生する神経細胞へは、ほとんど分化できない。そこで、分化に必要な因子を補い、ドパミン産生神経細胞に分化誘導する。

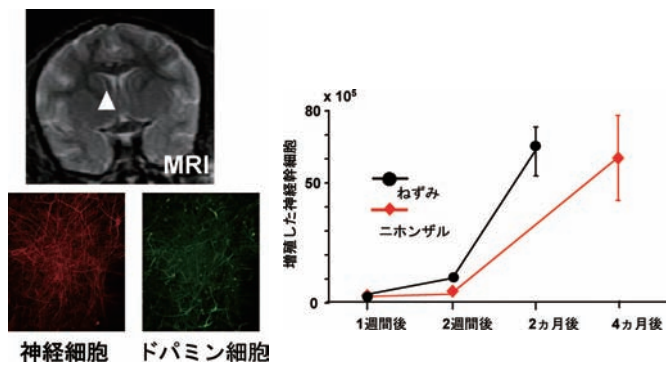
次に、この細胞をパーキンソン病モデルネズミやニホンザルの脳内に移植し、移植された神経幹細胞が脳内で生着し、パーキンソン病症状を改善することができるかどうか検討する。

### 3. 脳梗塞に対する神経幹細胞移植に関する研究

脳梗塞に対する治療は、如何にして神経細胞の脱落を保護するか、また、脱落した神経組織を修復するかが大切である。そこで、脳梗塞の急性期に対して神経幹細胞移植は神経保護効果を有するか、脳梗塞の慢性期に対して脱落した神経細胞を修復し、症状を改善できるか検討する。

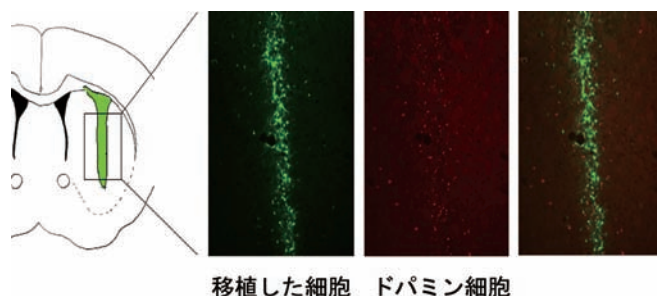


### 自家神経幹細胞移植



MRIを用いて、ニホンザルの脳室周囲から定量的に神経幹細胞を取り出す。非常にゆっくりではあるが、移植に必要な細胞の数まで増殖させることができる。その神経幹細胞は、誘導因子の投与により、多数のドパミン産生細胞へ分化できる。

### パーキンソン病に対する自家神経幹細胞移植

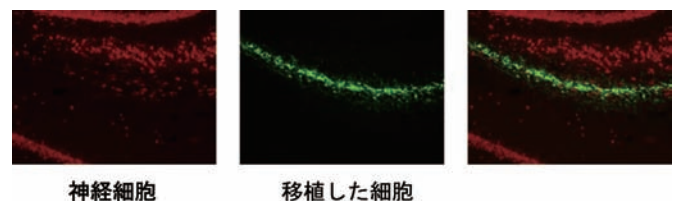


神経幹細胞移植によりパーキンソン病症状の改善を認め、移植した神経幹細胞は、線条体内に生着し、多数のドパミン産生細胞を認める。

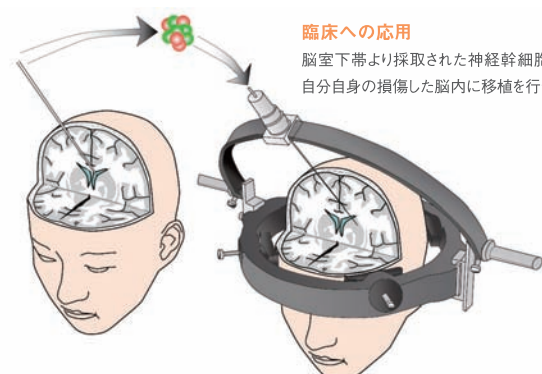
### 脳梗塞への自家神経幹細胞移植



脳梗塞の初期に移植された神経幹細胞は、脳梗塞巣の減少および行動学的な症状の改善を得ることができる。



脳梗塞の慢性期に神経幹細胞を移植することにより、脱落した神経細胞を補うように遊走し、生着することができる。



# 骨髄移植による構造タンパク欠損症の治療

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏

■研究概要と目的

皮膚は様々な細胞からできていますが、細胞のみならず、それらを繋げているタンパク質も皮膚の機能に重要な役割を果たしています(図1)。

そして、これらのタンパク質が1つでも働かないと皮膚は弱くなり、簡単に剥けたりみずぶくれになりやすくなります。

皮膚を繋げるタンパク質が、生まれつき遺伝子の異常によって産生されない方がいらっしゃいます。先天性表皮水疱症と呼ばれるまれな病気です(図2)。

先天性表皮水疱症の根本的な治療法は、現時点で残念ながら存在しません。正常の人の皮膚を移植する(植皮)や遺伝子治療が試されていますが、①植えたところにしか効果がない ②植えても、皮膚は特に拒絶反応が出やすい ③遺伝子治療は安全性が評価されておらず、倫理的障壁が大きい ことから実現には長い道のりを要します。

そこで我々は、より現在の医療で確立された方法で、かつ全身に正常の遺伝子(を含む細胞)が行き渡る方法として、骨髄移植の可能性に着目しました。

近年、骨髄に含まれる幹細胞が様々な臓器の細胞へ変化(分化)することがわかり、再生医療の担い手として大きく期待されています。我々のグループでも、マウスで骨髄から皮膚の細胞に分化することを報告しました。また、当教室では最近、表皮水疱症を起こすマウスの作成に成功しました(Nat Med 2007)(図3)。これを用いて、モデルマウスが骨髄移植によって治療できるかどうか、そしてそれを実現するための要因について研究を続けています。

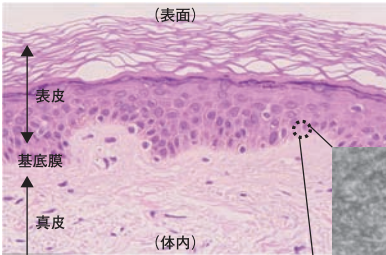
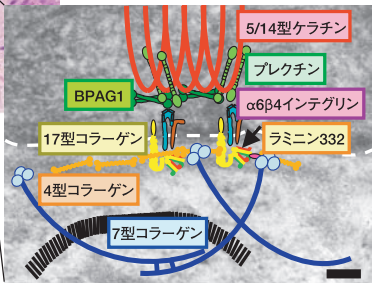


図1 皮膚の断面・拡大図(顕微鏡)  
皮膚の断面を約200倍に拡大したものです。表面の方から、表皮・真皮・皮下組織と呼ばれており、表皮と真皮の境目には「基底膜」と呼ばれる構造があります。

基底膜の部分の拡大・模式図

基底膜の部分電子顕微鏡で約2万倍に拡大したものです。

右に示したような多くのタンパク質が関係しています。これが一つでも欠けると、皮膚は弱くなり水疱(水ぶくれ)を作りやすくなります。



McMillan and Shimizu, 2003



図2 先天性表皮水疱症

本邦での患者数は約600人です。

様々な病型があり、ほぼ日常生活を送れる程度ものから、生後1年以内に亡くなる重症型まであります。写真は接合部型と呼ばれるもので、17型コラーゲンと呼ばれるタンパク質が無いために全身の皮膚がむけやすくなります。

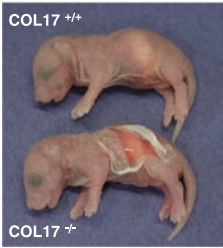
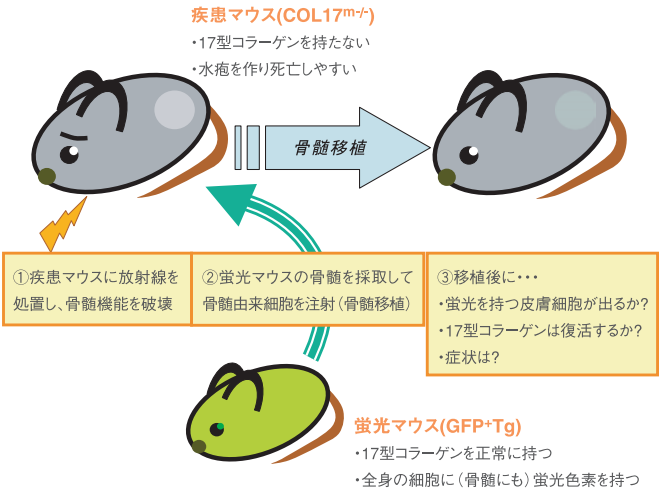


図3 先天性表皮水疱症モデルマウス

17型コラーゲンの遺伝子を無効にしたマウス(ノックアウトマウス)は、生まれた時から非常に皮膚が剥けやすく、手足では水疱を作りやすくなります。

1. 実験の流れ



2. 結果① 臨床症状

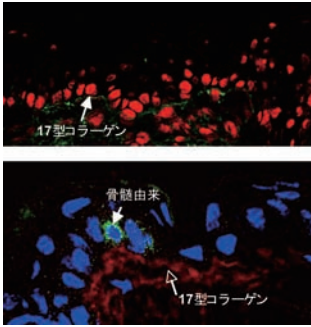


17型コラーゲン欠損マウス(骨髄移植無し)  
口の周りの皮膚が剥けている。

17型コラーゲン欠損マウス(骨髄移植あり)  
皮膚はあまり剥けていない。耳の皮膚も障害が少ない。

\*骨髄移植後60日

3. 結果② 蛋白の出現



骨髄移植後に皮膚の一部を剥いて、治ったところの皮膚を採取しました。この部分の皮膚で、失われた17型コラーゲンが復活しているか、骨髄由来の蛍光を持つ細胞が皮膚に居るかを検討しました。

(左上) 免疫蛍光抗体法という手法を用いて17型コラーゲンの有無を調べたところ、基底膜の部分に一致して17型コラーゲン(緑)が出現しているのがわかりました。なお、赤色は目印として細胞の核を表します。

(左下) 今度は、骨髄由来の蛍光を緑色、17型コラーゲンを赤、目印の細胞核を青になるように調整しました。骨髄から来たと思われる細胞が表皮にみられ、その下に17型コラーゲンが広がっているのがわかります。

17型コラーゲンの出現は、免疫蛍光抗体法のほか、遺伝子レベル(RT-PCR)でも証明されました。

4. 解説

骨髄移植を行うことで、17型コラーゲン欠損マウスの皮膚の一部にタンパク質の出現が確認されました。

マウスで自然に発生するびらん(皮膚が剥けること)も、少ない傾向にありました。以上から、マウスにおいて骨髄移植が先天性表皮水疱症の治療方法の一つになりうる事が示唆されました。

今後の課題および展望としては...

- ①皮膚になる細胞およびタンパク質が少ない;骨髄細胞を皮膚へ遊走させる因子の併用を検討しています。
- ②ほかのタンパク質欠損が原因の先天性表皮水疱症ではどうか?;17型コラーゲン欠損マウスでの検討を進めています。
- ③ヒトでも同じか?;ヒト骨髄細胞での検討を進めています。
- ④長期的な経過についても検討中です。
- ⑤臨床応用に向けての働きかけ

といったものが挙げられます。近い将来の先天性表皮水疱症への有効な治療法の一つとして我々は期待しています。

# 造血幹細胞・間葉系幹細胞・成体多能性幹細胞の 骨髄内移植法の有効性の検討

東海大学医学部 安藤 潔(代表)、川田浩志、六車ゆかり、八幡 崇

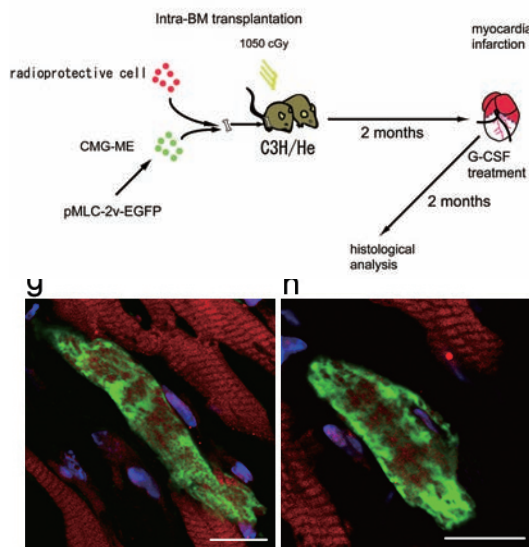
## ■研究の目的

再生医療は幹細胞を利用することによって機能不全に陥った臓器の再生を目指す治療法である。成体骨髄には、造血幹細胞 (HSC)、間葉系幹細胞 (MSC)、成体多能性幹細胞 (MAPC) など様々な幹細胞が存在しており、骨髄は幹細胞の貯蔵場所として機能している。すなわち、骨髄にはこれらの幹細胞を維持するための特別な環境が存在する。そのような骨髄に直接幹細胞を移植する骨髄内移植法は再生医療における効率の良い細胞移植法として期待される。また一方、骨髄に移植することにより、血液細胞のように骨髄から全身に細胞を供給することも可能である。本課題では、このような幹細胞および骨髄環境を利用した再生治療法の開発を目的とする。

## ■研究結果

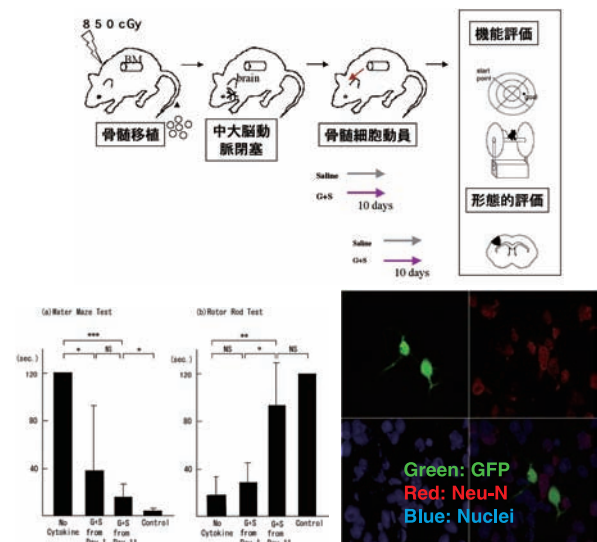
過去5年間に以下の臓器障害モデルにおける再生治療法を開発した。

- ・心筋梗塞モデル  
骨髄内移植したMSCが心筋梗塞部位で心筋再生を促すことを示した。
- ・脳梗塞モデル  
サイトカインを用いて骨髄より動員された細胞が脳梗塞部位で神経再生を促すことを示した。
- ・造血障害モデル  
放射線照射した骨髄にMSCを骨髄内移植することにより造血環境を再構築できることを示した。



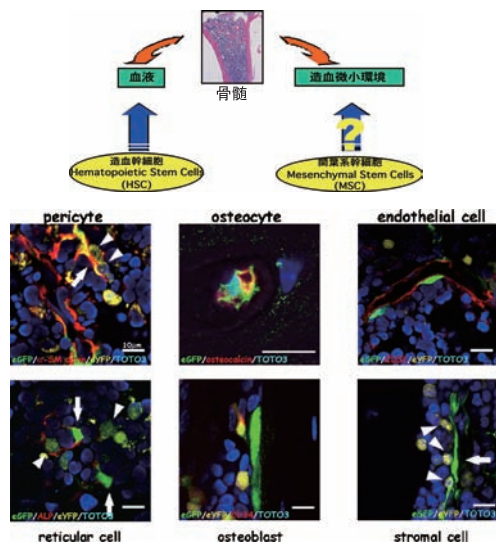
### 心筋梗塞モデル

骨髄内移植したMSC (緑色の細胞) が心筋梗塞部位に生着し、心筋再生を促している。



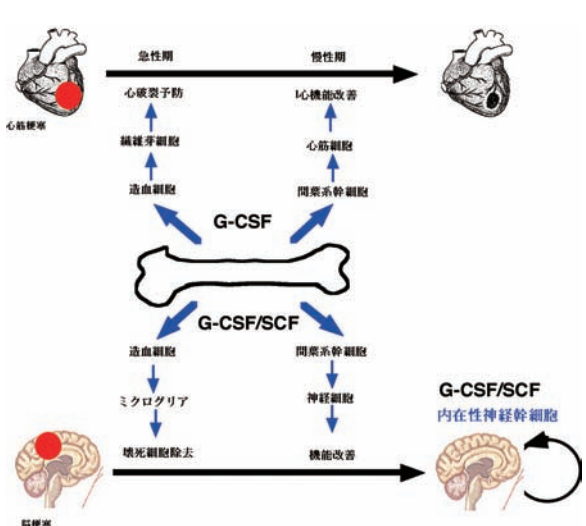
### 脳梗塞モデル

サイトカインを用いて骨髄より動員された細胞 (緑色の細胞) が脳梗塞部位で神経再生を促し、学習能力や運動能力の回復を促進した。



### 造血障害モデル

放射線照射した骨髄にMSC (緑色の細胞) を骨髄内移植することにより、血管周囲細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞、細胞網細胞などに分化し造血環境を再構築できることを示した。



### まとめ

以上の結果から、G-CSFやSCFなどのサイトカインを用いて骨髄よりMSCを末梢に動員することにより損傷された心臓、脳などの再生医療を実現する可能性が示された。

# 体性幹細胞システムを利用した糖尿病再生医療

群馬大学生体調節研究所 小島 至

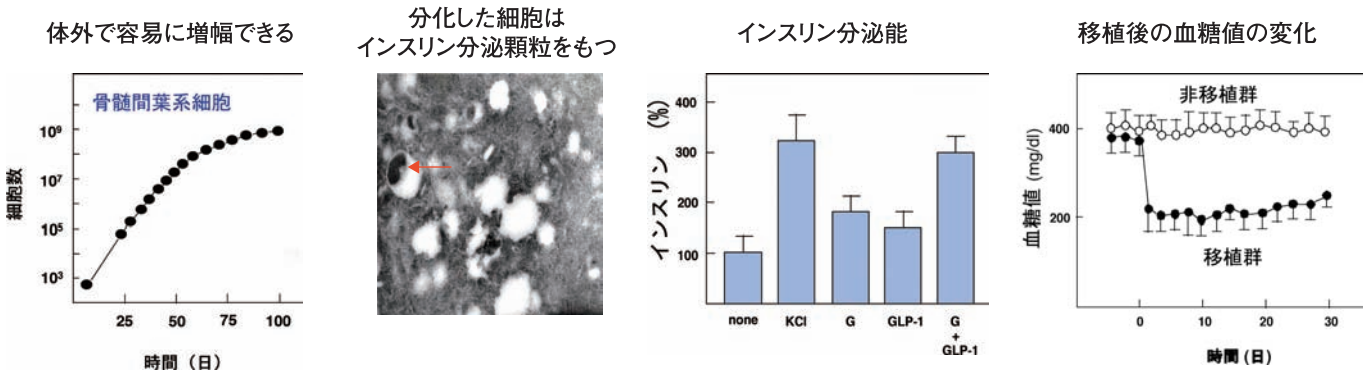
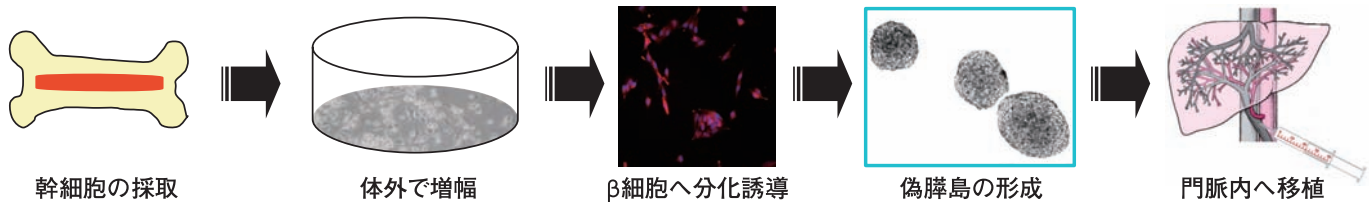
■研究目的

体性幹細胞システムを利用し、1型および2型糖尿病に対する再生医療を実現するために必要な基盤技術を開発するための前臨床研究。

■研究内容1)

**1型糖尿病に対するアプローチ:**比較的容易に採取し、体外で大量に増幅することができる幹細胞として骨髄間葉系幹細胞と肝幹様細胞を選び、それらをインスリン産生細胞へと分化させる方法を確立した。さらに分化した細胞を用いて偽膵島を形成させ、これを1型糖尿病モデル動物に移植して血糖値をコントロールすることが可能になった。

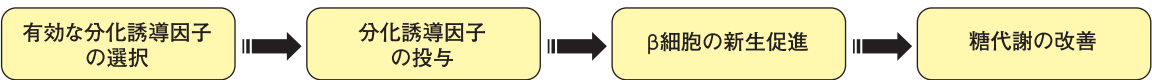
■アプローチの概略



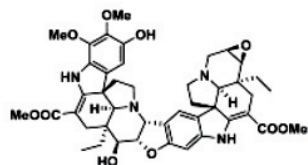
■研究内容2)

**2型糖尿病に対するアプローチ:**膵幹細胞に作用し、これをインスリン産生細胞へと分化させる有効な分化誘導因子を同定した。この因子を効果的に作用させる投与方法を確立して2型糖尿病モデル動物の血糖値をコントロールすることが可能になった。

■アプローチの概略



有効な $\beta$ 細胞分化誘導因子の同定



# 多能性細胞の維持法と誘導法及び生体パーツ化技術開発

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 笹井 芳樹(代表)、丹羽 仁史、若山 照彦、阿形 清和、榎本 秀樹、近藤 亨

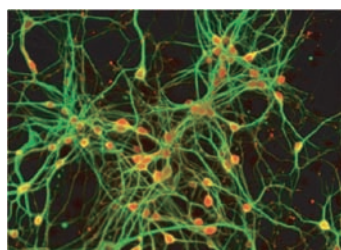
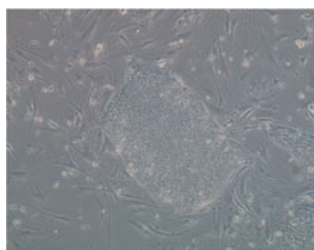
## ■研究の目的と内容

### 【ヒトES細胞の医学応用の基盤操作技術を確立】

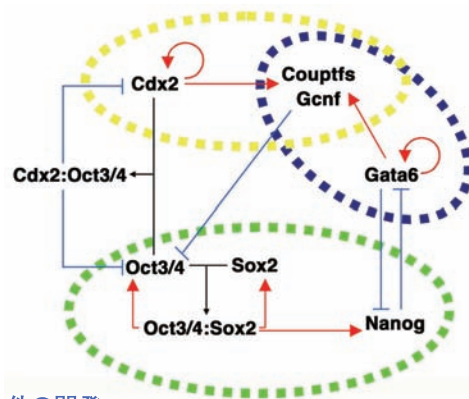
胚性幹細胞の医学利用に必要な高度な培養法および生体パーツ化作成技術の基盤を確立。また、クローン技術による体細胞核の初期化を促進する基盤技術を開発。

- ・ES細胞の未分化性を段階的に制御する因子の解明
- ・ヒトES細胞の安全かつ効率的な維持培養法の確立
- ・ヒトES細胞からの各種神経系の生体パーツの産生技術の確立
- ・クローン胚由来ES細胞と通常のES細胞との生物学的差違の解明
- ・クロマチン再構築プロセスを応用した核の初期化促進化

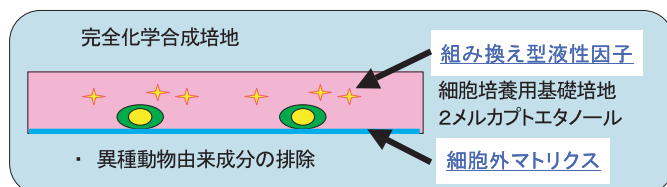
未分化ヒトES細胞 → ES細胞由来神経細胞



ES細胞の多能性を規程する遺伝子ネットワーク

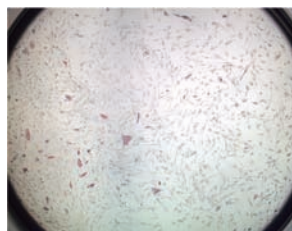


ヒトES細胞培養条件の開発

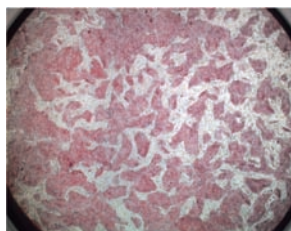


## ヒトES細胞の安全かつ効率的な培養法の確立

ROCK阻害剤による  
ヒトES細胞分散培養の劇的な改善

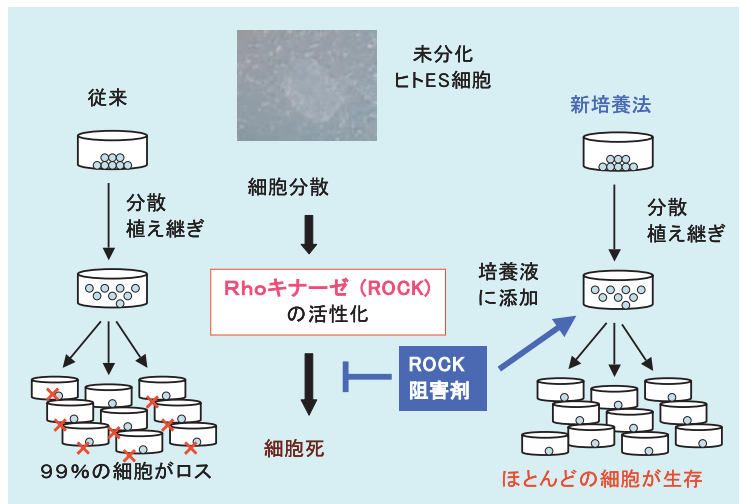


ROCK阻害剤なし



ROCK阻害剤あり

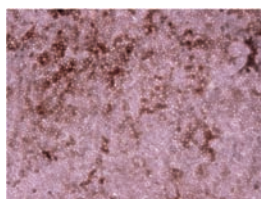
大量培養や細胞品質管理、さらに効率の良い遺伝子導入などが可能に



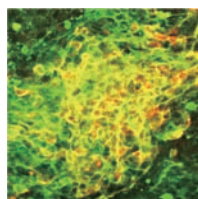
## ヒトES細胞からの神経・感覚器パーツ産生の成功



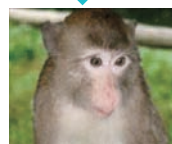
大脳皮質前駆細胞



網膜(色素)細胞



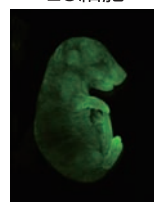
ドーパミン神経細胞



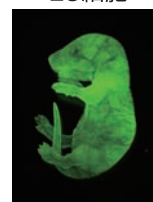
動物への移植研究  
(京大病院などの  
共同研究)

## 単為発生胚から高分化能のmES細胞を作成に成功(若山ら)

単為発生  
ES細胞



NT単為発生  
ES細胞



キメラ胚

単為発生胚と核移植(NT)を組み合わせることで、高いキメラ率が可能な高い品質のES細胞が作成

# 各種幹細胞の生体内外での人為的操作技術開発

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
幹細胞研究グループ 西川 伸一

## ■研究の目的と目標

再生医療を実現させるためには、必要な細胞を、必要な時に、必要な数だけ用意できなければいけません。

また、目的の細胞を体の外で作り出すことができるになれば、その細胞を使ってあらかじめ薬の効果を調べることもできるようになります。

目的の細胞を自由に作り出したり増やしたり、といった細胞をコントロールする技術の開発を目指して研究に取り組んでいます。

### 発生や分化に注目しています

ひとつの受精卵が分裂を繰り返して色々な細胞になり(分化)、やがて体を作り上げるまでの過程が“発生”です。

それぞれの細胞になるまでの間に、どんな経緯をたどるのか、どんな遺伝子や分子が、どのように働いているのかという“しくみ”が分かれば、そのしくみを使って細胞をコントロールすることができるようになります。

## ■研究の概要

### ①幹細胞のニッチ

幹細胞が分裂や分化をせずに、幹細胞のままとどまる場所“ニッチ”のしくみを解明する⇒毛根にあるニッチをモデルに研究しています。幹細胞を静止期にとどめておくしくみは何なのか？それがわかれば、必要なときに幹細胞を分裂や増殖させられるようになります。

### ②造血幹細胞の発生

主に骨髄に存在して、血液を作り出している“造血幹細胞”。これがどのように発生するのかを解明する⇒判明した経路から、造血幹細胞を作りだしたり、増やしたりする手がかりを見つけられます。

### ③中内胚葉系細胞への分化

ES細胞から中内胚葉系細胞(ゆくゆくは骨や筋肉、心臓、消化器などになります)への分化のしくみを調べる⇒ES細胞から、目的の細胞のもとになる細胞が自由に作り出せるようになります。

### ④幹細胞に必要な性質

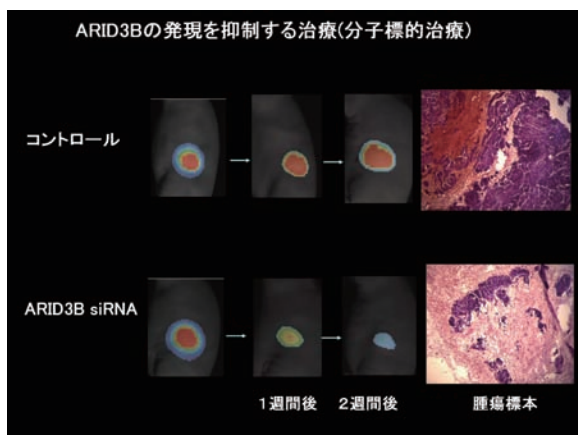
ES細胞に近い能力を持つといわれる“間葉系幹細胞”と、ふつうの間葉系細胞との違いを調べる⇒働いている遺伝子などの違いを比べて、幹細胞であるために必要な要素を見つけます。この要素を使えば、便利な間葉系幹細胞をつくることができるようになります。

## 小児がんに関わる遺伝子の発見

いろいろな遺伝子を調べる中で、ARID3Bという遺伝子が神経芽腫(小児がんのひとつ)の発症に関わっているということを発見しました。

### がん遺伝子“ARID3B”の4つの特徴

- ① たちの悪い“がん”ほど、この遺伝子を持っている。
- ② 試験管内で正常な細胞を“がん”化させてしまう。
- ③ “がん”細胞からこの遺伝子を奪うと、“がん”細胞は死ぬ。
- ④ この遺伝子は、私たちの体では発現が低下している。



マウスでの実験ですが、上(コントロール)は何の治療もしなかったもの、下はARID3B遺伝子を奪うという治療を行ったものです。コントロールは徐々にがん細胞が大きくなっていきますが、治療を行ったものはがん細胞が少なくなっていることがわかります。

がんの治療には「手術・抗がん剤・放射線」の3本柱に加え、現在では、がん遺伝子をターゲットとした、より効果的で副作用の少ない治療法が色々開発されています。

このARID3Bという遺伝子は、小児がんのよりよい治療のために役立つことが期待されているのです。

## 造血幹細胞の由来

血液を作り出す“造血幹細胞”が、卵黄囊\*から発生するということを証明しました。生涯にわたって血液を供給する“二次造血”を行う細胞がどこから来たのかは、これまで明らかにされておらず、今回のこの証明は、近年の定説をくつがえす発見となりました。

\*卵黄囊(らんおうのう): 妊娠の初期に赤ちゃんに栄養を与えている袋。



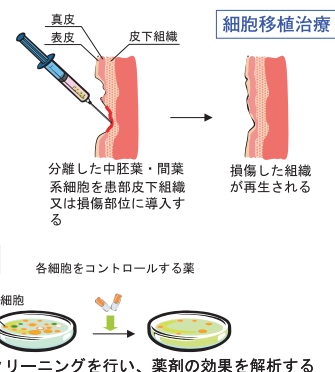
左:卵黄囊に由来する造血細胞が青く染まっています。

造血幹細胞の正しい由来が判明したことで、発生の過程が正しく解明できるようになります。これによって造血幹細胞が出来てくるしくみがわかれば、造血幹細胞を作りだせるようになります。将来は、骨髄性白血病などの治療法である「骨髄移植」に活かされる技術へとつながる可能性もあります。

## 将来の展望

小児がんの治療や、骨髄移植の他にも、期待される医療技術の開発があります。

- ・細胞移植治療
- ・薬効試験



# 固形臓器における組織幹細胞の分離・解析と 医療応用基盤開発

理化学研究所LP 臓器再生研究ユニット 谷口 英樹

## ■目的 (1)

ヒト組織片やヒト尿中より、高い増殖能と機能細胞への分化能を有する組織幹/前駆細胞を分離・培養する方法を開発し、薬剤評価や細胞移植へ応用する。

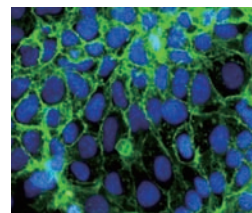
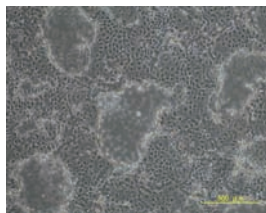
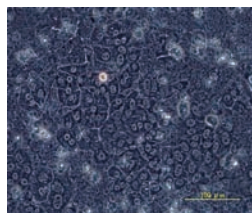
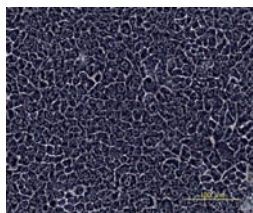
## ■成果

従来、培養が極めて困難であるとされていた腸管上皮前駆細胞ならびに尿細管上皮前駆細胞の分離・培養技術を新たに開発し、分化機能を有するヒト腸管上皮細胞およびヒト尿細管上皮細胞の大量供給系を確率した。

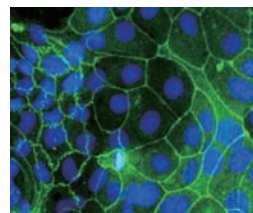
## ■波及効果

創薬産業への利用 (吸収・代謝試験、毒性試験)、腎不全患者への細胞移植療法

### ヒト腸管上皮幹/前駆細胞の分離・培養



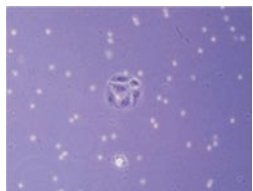
E-cadherin



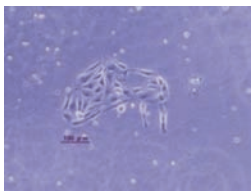
Zo-1

腸管幹/前駆細胞の取得方法 (特願2007-024169)

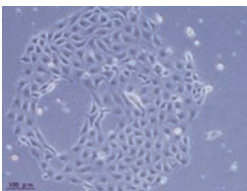
### ヒト尿細管上皮幹/前駆細胞の分離・培養



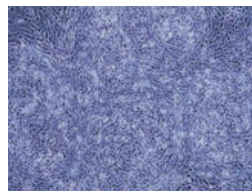
3days



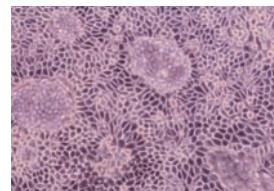
4days



6days



15days



ヒト尿細管上皮細胞  
によるドーム形成

## ■目的 (2)

膵幹細胞を分離・培養・分化誘導法を開発する。また、膵島 (pancreatic islet) の再構成が可能な新規3次元培養法を開発し、糖尿病に対する細胞療法へ応用する。

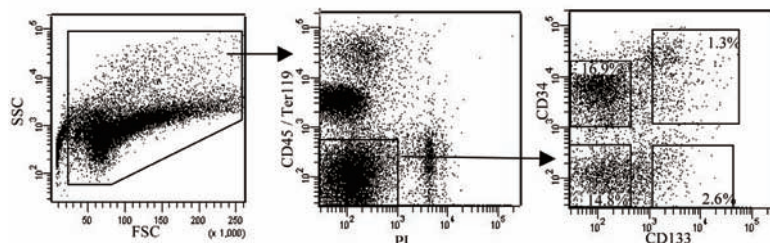
## ■成果

フローサイトメトリーを用いた膵幹細胞の分離・培養法を開発した。微小重力環境を設定可能な2軸式回転培養装置を利用して、膵島スフェロイドの大量創出技術を開発した。

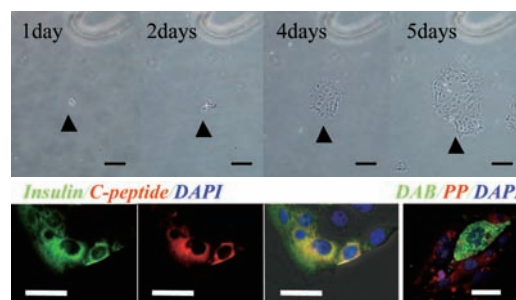
## ■波及効果

糖尿病に対する膵島移植への応用

### 膵幹細胞の分離・培養

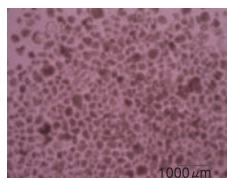
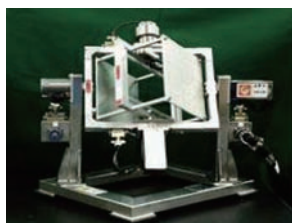


Taniguchi H, et al.; *Gastroenterology* 132(2):720-732 2007

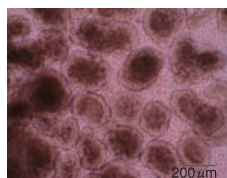


フローサイトメトリーを用いて分離したマウス膵幹細胞から分化したインスリン・C-ペプチド共陽性のβ細胞、膵ポリペプチド陽性のPP細胞、DABレクチン陽性の膵管上皮細胞。

### 3次元培養系による膵島の大量創出



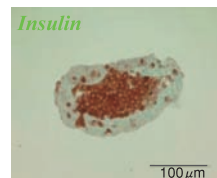
1000μm



200μm

他領域LP (ナノテクノロジーを活用した人工臓器の開発) において開発された3次元培養技術を用いて、膵幹細胞や膵β細胞から膵島スフェロイド (膵島様組織) を大量創出することを試みている。

3次元培養装置を用いた細胞集塊の大量形成法 (特願2006-99165)



100μm



100μm

マウス膵β細胞株から培養系で創出されたインスリン・C-ペプチド共陽性の膵島スフェロイド。スフェロイド直径は生体内の膵島サイズに類似している。

# 体性組織幹細胞の実体解明と応用技術開発

理化学研究所 発生再生科学総合研究センター  
体性組織幹細胞研究ユニット 小阪 美津子

## ■研究目的

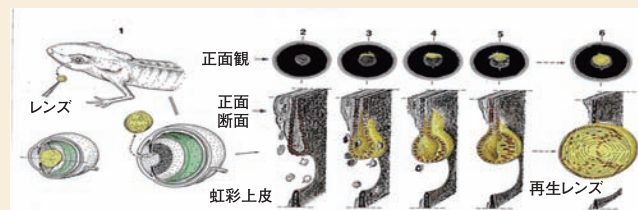
- (1) 眼組織幹細胞に着目して、体性組織幹細胞を正しく理解する
- (2) 虹彩由来幹細胞を網膜変性症などの再生治療に活用するための基盤技術の確立を目指す。

## ■研究内容

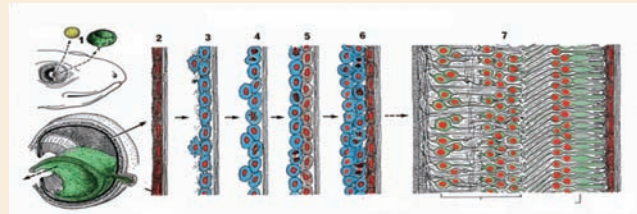
最近、予想を超える多分化能を有する組織幹細胞が、成人組織中にも存在することが分かってきました。私たちは、組織幹細胞の謎を科学的に解明し、その潜在能力を活用した再生医療の実現に向けて、組織幹細胞加工技術の開発を行っています。黒目(虹彩上皮)細胞には、ユニークな特徴があります。

- (1) イモリ成体組織中で実際に他の組織細胞を再生する。(右図上)
- (2) 再生が起こらないとされる哺乳動物の黒目細胞も、取り出して培養すると、レンズや神経細胞に転換できる。(右図下)
- (3) 細胞の外科的採取が容易で、自家移植が可能であることから、網膜神経再生治療への応用が期待される。

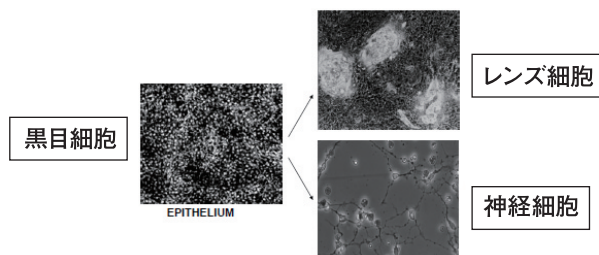
「黒目組織の中に含まれる幹細胞の実体」  
どこに? どのくらい? どのようにして? 存在するのか?  
能力を発揮させる方法とは?



成体イモリのレンズを切除すると、虹彩上皮の一部の細胞が変身(分化転換)して新しいレンズを作り上げる。

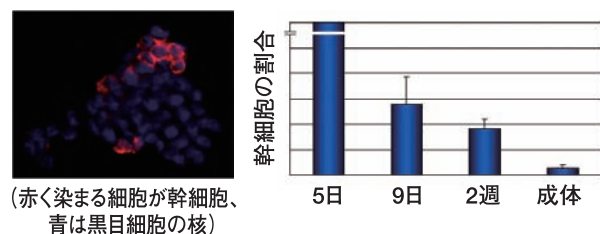
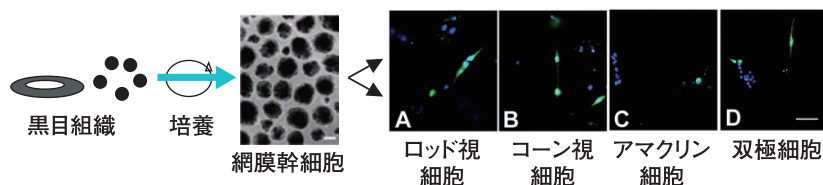


成体イモリの眼から網膜神経層を完全に取り除いても、網膜の色素上皮細胞が増殖・分化して、網膜神経層を再構築する。

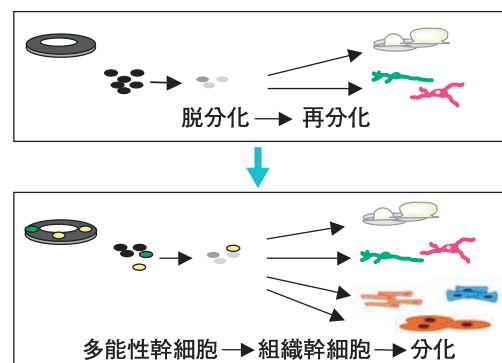


## ■主な研究成果

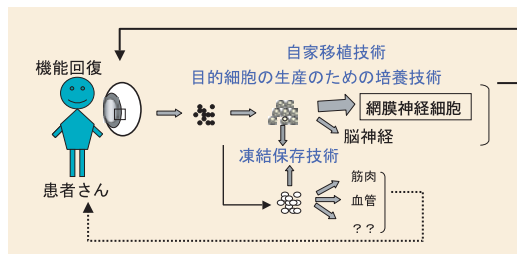
- ① ヒトを含む哺乳動物の黒目にもイモリのような変身能力を持つ細胞が一部に存在し、網膜神経やレンズに分化できる。
- ② その数は個体年齢が若いほど多いが、大人になっても少数残っている。
- ③ 幹細胞の性質を保持した黒目細胞は発生時期の幹細胞の形質を持っている。
- ④ 幹細胞の性質を示しうる黒目細胞は予め決まっていて、その細胞を特定するための技術を開発し濃縮できるようになった。
- ⑤ 黒目の幹細胞は試験管内で神経以外の様々な組織細胞へと分化しうる事が新たに分かった。



黒目組織の内葉と呼ばれる部分の一部に幹細胞が含まれ(左図)、その割合は加齢とともに減少することがわかった(右図)。



黒目組織は完成後も均一な集団ではなく、一部に幹細胞が含まれている。その幹細胞がまるで発生期の組織形成のように細胞分化することが分かり、これまでの概念とは異なる様式で細胞が変身すると考えられる。



## 黒目幹細胞を用いた理想的再生治療の実現にむけて

患者さん自身の黒目細胞を用いて、網膜神経やその他の組織細胞を効率よく産生できれば理想的な再生医療が実現する。そのためには、大量生産、保存、移植などの技術の更なる開発が今後必要となる。



## **再生医療の実現化プロジェクト事務局**

平成20年2月23日 発行

財団法人先端医療振興財団 研究事業推進課(幹細胞バンク事業担当)  
〒670-0047 神戸市中央区港島南町1-5-4 臨床研究情報センター2階  
FAX: (078) 306-0898 e-mail:stem-cell@tri-kobe.org