

生殖医療研究部（生殖細胞機能研究室、生殖技術研究室）

(1) 生殖細胞機能研究室

研究目的

発育途中にある原始胚細胞核の機能およびゲノムの発生支持能をそれぞれ評価することによって、その生殖細胞の発生、成熟過程と epigenetic な修飾との連関を明確にしていく。この生殖細胞の機能評価のひとつとして、ゲノムの「成熟」度をひとつの評価基準として、その配偶子形成機構における意義を追求する。これらの研究は、生理的な配偶子形成のみならず、異常発症機構の解明に直接つながると考えられる。

また、ヒト中胚葉性幹細胞は、幹細胞としての多分化能を有しているだけでなく、ニッチェとしての機能を有している可能性が高く、ヒト初期胚のモデルであるヒト胎児性幹細胞の支持細胞としての役割を明確にしていく。また、現在、既にウシおよびマウス骨髄間質由来の体細胞を用いたクローン技術（核移植）およびクローン胚作成に成功し細胞移植を進めており、将来これらの技術が生殖医療ならびに再生医療に役に立つことは疑いない。これらの基盤的研究をさらに高いレベルに進展させ、生殖医療研究に貢献したいと考えている。

研究概要

(a) ヒト初期発生を模倣する幹細胞システムを用いた生殖細胞機能研究

ヒト胎児性癌に注目し、ヒトの初期胚のモデルとしてヒト細胞の発生・分化の研究から疾患成立機序の解明を目指す。

(b) 初期発生とゲノム修飾機構の研究

受精卵を初めとする多分化能を有する細胞では、固有のゲノム修飾機構が存在することを仮定し、遺伝子の分化過程における発現と epigenetics の関係を検討していった。上皮系細胞のマーカーであるケラチン 18 遺伝子の Ets 認識配列のメチル化は臓器および腫瘍において、発現と完全な逆相関にあった。その相関は、ヒト・ケラチン 18 遺伝子を導入したトランスジェニック・マウスにおいて認められた。

(c) 骨髄由来の間葉系幹細胞の研究

ヒト初期発生のモデルとなる胎児性癌細胞が有している多分化能と同等の分化能を有する細胞が成体にも存在する過程の元に、骨髄に由来する体性幹細胞を同定し、体性幹細胞の分化および機能に直接関与する分子発現の調節機構について研究を進めていく。多能性幹細胞が成体組織に存在するならば、梗塞や炎症、外傷等によって傷害された部位を積極的に再生させることが可能と考えられるため、成体に存在する幹細胞の同定を行っていく。

(d) 母体血中の胎児血を用いた非侵襲的出生前診断のための基礎的研究

単一血球からの PCR の効率を調べ、染色細胞は非染色細胞と較べて格段に効率が低いことを確認した。効率は遺伝子によって異なるが、調べた数個の遺伝子については例え低くても PCR 産物を得ることはできた。遺伝子のコピー数と PCR 効率の関係を調べた。PCR 産物量は遺伝子コピー数が 2, 100、および 1000000 と増えるに従って多くなることを確認した。Alu family PCR を用いて single cell のサンプル中に本当に cell が存在するかどうかを確かめることができることを示した。非染色血球を用いて、有核赤血球を識別し、単離することができることを示した。そして、母体末梢血中に胎児有核血球が存在し、それを単離し、PCR と制限酵素分析により遺伝子型を確認できることを示した。

当該年度の発表リスト

欧文論文

*Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A.: Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, in press.

*Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J.-i., and Umezawa, A.: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell.*

Physiol. in press

*Shibata, R., Hashiduchi, A., Sakamoto, J., Yamada, T., Umezawa, A., and Hata, J.: Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (Wt1) mutation and the histological findings in Wilms tumor (WT), J Med Genetics, in press

*Shibata, R., Umezawa, A., Takehara, K., Aoki, D., Nozawa, S., Hata, J.: Primary carcinosarcoma of the vagina, Pathology Int, in press

*Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, and Kasugai S.: Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. J Biomed Mater Res. 2002;62(2):292-298.

*Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Toyama, Y., Hata, J., and Umezawa, A.: Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing's sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun.2002;293: 61-71. (Tables are corrected in BBRC.2002; 295: 573-574.)

*Hakuno, D., Fukuda, D., Makino, S., Konishi, F., Tomita, Y., Manabe, T., Suzuki, Y., Umezawa, A. and Ogawa, S.: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation. 2002;105: 380-386.

*Ohayama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T.: Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris. J Invest Dermatol.2002;118: 199-204.

取得研究費

厚生労働省科研費

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業 梅澤明弘（代表） 96,000,000 円
骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植
ヒトゲノム・再生医療等研究事業 梅澤明弘（分担） 6,000,000 円
骨髄細胞を用いた形質転換心筋細胞の開発に関する研究

医薬品機構 梅澤明弘（分担）5,000,000 円
間葉系細胞の規格設定の研究

成育委託研究費 梅澤明弘（分担）1,500,000 円

文部科学省科研費

特定領域研究(2) 梅澤明弘（代表）2,100,000 円
胎児性間葉系幹細胞の心筋への分化と生体内の心拍動とのシンクロナイゼーション
萌芽研究 梅澤明弘（代表）700,000 円
再生医療・細胞移植に対する病理学的な評価システムの確立
基盤研究(B)(2) 梅澤明弘（代表）3,100,000 円
アポトーシス抑制分子 EAT の生体内機能ならびに疾病における分子機構の解明
基盤研究(B)(2) 梅澤明弘（代表）2,300,000 円
骨芽細胞 KUSA-A1 を用いた低分子の骨形成促成物質（因子）の同定
特定領域研究(2) 梅澤明弘（代表）11,000,000 円
間葉系幹細胞の分離と幹細胞可塑性を利用した臓器再構築

慶應義塾大学学事振興基金（平成14年10月まで） 梅澤明弘（代表）1,900,000 円
骨髄間質細胞の多分化能の同定 - 胚盤胞への細胞注入によるキメラ作製法を用いて -

(2)生殖技術研究室

プロジェクト名 妊婦末梢血中の有核赤血球等を用いた非侵襲的出生前診断のための基礎技術の開発

研究概要

1989年にLancetに出た論文で、母体末梢血中に胎児血球に由来するDNA配列が見つかるという報告が出、この応用で非侵襲的出生前診断の技術が可能であろうと思われ、その方向の研究が多くの研究室で始まった。

1990年代初めに金沢医大の高林先生の所で、妊婦末梢血中のNRBC(nucleated red blood cell)をギムザ染色後にmicromanipulatorで拾うと大部分が胎児血球であり、このNRBCのDNA分析により非侵襲的出生前診断が可能であろうという提案と実験が示された。日本の多くの研究室はこの方向に進んだ。我々も高林研究室から技術を習得した。

最初は、stained single cellを拾いPCRによるDNA分析は、特別難しいことではないように思われたが、実際はかなり難しいことであった。

- 1) まず、母体末梢血中のNRBCは非常に少ない(100万個の有核血球に一つ以下)ので、5~10mlの母体血から、0~数個しか得られない。
- 2) stained single cellからのPCRは容易ではない。
Single cellからPEP(pre-amplification elongation PCR)をしてゲノムの数を数十にふやしてから(理論的には)PCRをするのだが、live cellではきれいな結果がでるのだが、Stained single cellからは、10個に一つの結果ができれば良いということもある。
- 3) NRBCであろうと考えて拾ったsingle cellが実際に胎児由来であることを示すことが必要であるがこれはPCR産物のpolymorphismから示すことができる。
 - (a) ZFX 遺伝子のRFLPを用いて、我々は、妊婦末梢血中に胎児有核血球が含まれることを示した。このときは、live NRBCを用いて、NRBCとRBCとを見分けることが可能であることも示した。(J.Reprod.Engineer 3(1), 111-155, 2000)
 - (b) HLA-DQA 1.1/1.2/1.3/2/3.1/3.2/4のpolymorphismを利用して胎児血を見分ける基礎実験として、正常大人の血球を用いhybridization kitを用いてやってみたが、結局、PCR後にクローニングをしてDNA配列を決定することで、polymorphismを決定することにした。数個の配列の決定をしたところである。
 - (c) STR(short tandem repeat)
STRを用いてgenomic DNAからChromosome 18、Chromosome 21のtrisomyを明確に示す論文が出たので、我々はnormal single cellを用いて、同じように実験してdoublet peakがChr.18にみられることを見つけた。
数個のSTR配列を用いれば、この方法でのpolymorphismの判別は非常に有用であると思われる。
- 4) single cellからのPCRがうまくいかない理由はPCR生産物が少ないということと、染色した染色体は分断されやすいということだと推測できる。
PCR生産物を今のPCRの100倍、1000倍にもできるという新しいPCR技術を試すことも考えている。
- 5) single stained cell, live cellを自動的に拾うautomatic manipulatorの開発、胎児NRBCのin vitroでの増殖、胎児NRBCに対する特異的抗体の開発、などの研究もあちこちで行われている。実用化されれば、この分野の画期的な技術となる。
- 6) cell freeの胎児DNAが妊婦末梢血中にかなりの量で見つかるという発見が3~4年前になされたが、これもおもしろい方向となるかもしれない。
- 7) 数年前に報告されたことで、経産婦は以前の胎児と遺伝子的に同型の血球を20年、30年後も保持しているという論文があるが、最近の報告ではこれが確認されたようである。これも意外なことではあるが、このことも事実であるなら十分我々のプロジェクトの方向に関して考慮しなければならない。