

4-2-11 生殖医療研究部（生殖細胞機能研究室、生殖技術研究室）

当研究部では、以下の研究プロジェクトを進行している。

- 1) 受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用
- 2) 卵の老化と胚発生メカニズムの解明から生殖医療への応用
- 3) ES 細胞の樹立に関わる技術の確立と機能解析
- 4) ヒト幹細胞の心筋組織への分化と細胞移植法の開発
- 5) 先天代謝異常に対する幹細胞治療法の開発に関する研究
- 6) 成育バイオリソース～ヒト臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・軟骨・骨髄・眼球由来幹細胞への単離技術の開発、多分化能の同定
- 7) 安全で高品質な細胞提供技術の開発

1. 研究目的

当研究部では、受精からヒトとして成長する過程で生じる疾患の成立機序の解明とその予防、診断・治療法の開発をめざした研究を行っている。卵、精子、幹細胞を主な研究対象としており、さらに、生殖腺、胎盤、心臓、神経系、骨、軟骨、脂肪組織を研究対象に加え、幹細胞の機能を調節する分子機構の解明と臨床応用をめざした一連の研究を展開している。これらの基盤的研究をさらに臨床研究に進展させることにより、生殖医療ならびに再生医療に貢献することが当研究部の使命であると考えている。

1.1 「いのちの萌芽(受精)」のエビデンスに基づいた考え方の提示

受精の膜融合過程は、精子の卵細胞膜への接着、融合、多精拒否からなる一連の現象である。本研究ではその分子メカニズムの解明に挑戦するため、膜融合過程に関わる因子群を明らかにし、その挙動を可視化することにより、受精における膜融合複合体が、時間的・空間的にどのように形成されるのかを解析してきた。この研究から、不妊治療への道が開かれるとともに、受精以外の膜融合にも新しい概念を提案することができると考えている。

1.2 ヒト胚性幹細胞の樹立

国立成育医療センターでは、ヒト ES 細胞に関する医学研究が、生命倫理及び医の倫理に基づき、「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」(平成 19 年 5 月 23 日改正文部科学省告示第 87 号;以下「指針」)を遵守して、医学的、社会的にも適正に行なわれるよう、外部委員も含めたヒト ES 細胞研究倫理審査委員会(以下「倫理審査委員会」)を設置している。当研究部が行ってきた幹細胞研究を基盤として「ヒト ES 細胞の樹立」研究計画を策定し、研究所内のヒト幹(ES を含む)細胞プロジェクト推進委員会での審議を経て倫理審査委員会による全 8 回の慎重な審議の結果承認を頂き、最終的に平成 19 年 3 月 5 日付けで文部科学大臣による確認を頂いた。今後は国の指針を遵守し、我々の研究がヒト生命の萌芽の滅失の上に成り立っていることを常に認識し厳粛にヒト ES 細胞研究を行っていく。

1.3 細胞治療・再生医療

ヒト組織幹細胞を生体外で培養することで増殖させることに成功しており、その分離・同定をする。細胞の生体外における培養技術とそれによる細胞数の確保とそれに続く分離技術は、再現性の高い生物実験系に基づいた細胞の基盤解明によってのみ可能となるものである。

1.4 成育バイオリソースの構築

国立成育医療センターでは、病院内の整形外科、産婦人科、眼科、形成外科と研究所の連携により、骨髄、臍帯血、胎盤、子宮内膜を細胞供給源として研究を遂行している。臨床研究を前提とした ad hoc 委員会を設立し、臨床試験研究への具体的なロードマップの作製、医療に提供できる新たなヒト細胞の分離・培養法の開発、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を行

っている。

2. 研究の概要

2.1 受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用

受精は一つの配偶子と、もうひとつの配偶子とが“細胞融合”することによって新しいゲノムの組み合わせを持った次世代が誕生する最初の過程である。そのため、受精メカニズムの破綻は単なる細胞の機能不全を超えて、生物種の存続にかかわる問題になってしまう。一方、受精の基礎研究には長い歴史があるにもかかわらず、いまだに全容解明には至っていない。特に、精子と卵子の接着機構については、今まで考えられていた概念が完全に否定されてしまったため、それ以降はほとんど基礎研究が進展しておらず、卵子の細胞膜に存在すると仮定される精子レセプターも不明のままである。受精のメカニズムを解明することは、ひとの「いのち」について（科学的意味を含めて）考えるきっかけとなる。また、受精は、2つの細胞間で起こるシンプルな細胞融合であるため、他の細胞融合（筋繊維の形成、骨形成、感染症など）の分子メカニズムを解明するためのモデル系にもなりうる。

2.2 卵の老化と胚発生メカニズムの解明から生殖医療への応用

現在わが国は、出生率（合計特殊出生率）が1.32（2006年）と依然非常に低い値である。一方で、不妊症治療特に生殖補助医療（ART）享受による出生児数は総出生児数の1%を超え、着実に増加しているが、社会のライフスタイル変化に伴い女性の妊娠・出産時年齢が上昇してきた昨今、ARTはいかなる生殖年齢層にも有効ではないことが明らかとなっている。加齢による生殖機能の不可逆的低下に関して、その一つの要因である卵子の質の低下について確かな基礎実験に裏打ちされたエビデンスを社会に提供する必要がある。これまで実験動物マウスを用いた研究により卵子から胚盤胞までの着床前期胚発生における遺伝子発現解析を行ってきた。その結果、初期胚特異的及び加齢卵特異的な発現動態を示す遺伝子を見出すことができ、その遺伝子群の機能解析を行ってきた。

2.3 ES細胞の樹立に関わる技術の確立と機能解析

ヒト胚性幹（ES）細胞は、正常染色体核型を保ちながら体を構成するすべての細胞へと分化できる多能性を保持し、増殖し続けることができる極めてユニークな細胞であり、発生・分化の理解とともに再生医療や創薬領域に大きく貢献するものと期待されている。再生医療に対応したヒトES細胞を樹立し維持するための、異種由来成分を排除した培養システムの構築を目指している。更に、ゲノム安定的に培養維持できるシステムとその検定方法及び評価方法の確立を目指す。ES細胞の樹立には「胚の滅失」が不可欠な行為であるため、倫理的観点から本邦ではヒトES細胞の樹立・使用に対して慎重な対応がなされている。研究所では、定期的に生命倫理に関する講演会を開催している。

2.4 ヒト幹細胞の心筋組織への分化と細胞移植法の開発

現在、骨髄細胞を用いた心不全に対する細胞治療が臨床で始動しているが、間葉系細胞の心筋分化のメカニズムは不明であり、骨髄細胞を用いることがベストな方法であるか疑問の余地がある。我々の研究室では、骨髄細胞に比べ心筋に高率に分化する間葉系細胞を有し、共培養系を用いることで、生理的に機能する心筋を *in vitro* で誘導させる技術を有する。本研究は、細胞治療に用いる細胞源となる組織の選択、細胞の調整という臨床に即した課題と、心筋分化のメカニズムに迫るものであり、基礎・臨床を包括するまさにトランスレーショナルリサーチといえる。今後も大きな資源が投入されるであろう再生医療分野において、我が国の知的財産を確立する上でも重要な役割を果たす可能性を有する。

2.5 先天代謝異常に対する幹細胞治療法の開発に関する研究

ムコ多糖症（mucopolysaccharidosis: MPS）は、ムコ多糖を分解するライソゾーム酵素の先天的欠損により、全身にグリコサミノグリカンが蓄積し、ガルゴイ様顔貌、骨変形、肝脾腫、呼吸障害、心臓弁膜症、角膜混濁、難聴、精神運動発達遅滞などの多彩な症状を呈する遺伝性疾患である。欠損している酵素により I 型から VII 型の病型に分類される。症状は進行性で、早いもので 10 歳頃ま

で死亡する予後不良な疾患である。治療法として骨髄移植、酵素補充療法があるが、骨髄移植では重篤な副作用（GVHD や生着不全に伴う重症感染症）が問題となる。酵素補充療法は効果が一過性であるため頻回投与せざるを得ず、莫大な費用がかかり、定期的な通院を一生継続する必要がある上、角膜や脳や軟骨などのように血流を介する方法では到達できない場所がある。そのため、安全で有効な新規治療法の開発が急務である。我々の研究室ではVII型の酵素であるβグルクロニダーゼが欠損しているマウス（MPS-VII型マウス）を有しており、幹細胞移植を用いた治療法の実験研究を行っている。

2.6 成育バイオリソース～ヒト臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・軟骨・骨髄・眼球由来幹細胞～の単離技術の開発、多分化能の同定

ヒト由来組織（成育バイオリソース：月経血、臍帯血、末梢血、胎盤、子宮内膜、指、眼球、軟骨等）のヒト間葉系細胞についての維持管理・品質管理・保存に関する技術革新を行う。我々の樹立した細胞株を日本国内の公的細胞バンク（独立行政法人 医薬基盤研究所）に登録し、他の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供できる体制を構築する。また、バンク化された細胞自身が多分化能を保持しており、細胞の遺伝子発現データベース・分化形質・ゲノム情報を伴った提供システム構築ならびに技術革新は、再生医療、がん、循環器疾病への基盤資源となり、科学立国を目指す社会への貢献度は極めて高い。再生医療、細胞移植に関し、現在「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針（平成18年9月）」に関する議論が厚生労働省科学技術部会ヒト幹細胞を用いた臨床研究のあり方に関する専門委員会およびヒト幹細胞治療臨床研究指針の策定に関するワーキンググループで進められている。細胞移植が具体的な治療法として確立されつつあるが、実験的な治療が日常的な治療法の選択肢となるためには、治療に用いる細胞に関して再現性を保証するための基準がぜひとも必要である。現在、ヒト細胞の明確なバリデーション方法は、国内外で模索されており、一定のコンセンサスは得られていない。細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 細胞の分離培養技術の確立、2) 細胞のカタログ化、3) 細胞品質管理の標準化がある。世界に向けて有用な細胞の発信してゆくことは重要であり、本研究成果は日本国内のみならず世界標準（ゴールデン・スタンダード）となる可能性が高い。

2.7 安全で高品質な細胞提供技術の開発

国立成育医療センター研究所の施設に有する機関内細胞プロセッシング・センターにおいて、日本国内の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供する。間葉系細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになり、この提示された過程に従い、提供医療施設を増やしていくことになる。現在の間葉系細胞培養に使用されている条件は、ウシ血清、ウシ胎児血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は否定できない。このため治療法としての安全性、有効性の基準の確立は急務である。

3. 研究成果

3.1 受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用

CD9欠損マウスより排卵された卵を用いて体外授精を行ったところ、CD9欠損卵ではほとんど受精が起こらず、多数の精子が透明帯と卵細胞膜のすき間に溜まった状態になることが観察された。そこで、透明帯を人為的に除去したCD9欠損卵に精子を加えると、精子は卵細胞膜には結合するが、融合はきわめて稀にしか起こらなかった。すなわち、CD9欠損卵では、精子の透明帯への結合、透明帯の通過、卵細胞膜への結合は起こるが、続いて起こるべき膜融合がほとんど観察されず、その段階で精子が止まったままの状態になっていることが明らかになった。抗CD9抗体によってもCD9欠損卵とよく似た膜融合の異常が観察されたことから、CD9は卵細胞膜の表面で精子側の因子との相互作用に何らかの役割を担っており、膜融合過程のいずれかのステップに必須であると考えられ

る。受精の膜融合過程での CD9 の機能を、更に詳細に検討するため、mRNA をマイクロインジェクションすることにより、マウス未受精卵に外来性蛋白質を発現させる実験系を確立した。そこで、様々な変異体を使って膜融合の有無を検討したところ、膜融合における CD9 の機能には C 末端にある 23 アミノ酸が必須であることが明らかとなった。さらに、CD9 の N 末端に EGFP を融合させた蛋白質を卵子特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、受精前後での CD9 の経時的な局在変化について調べたところ、受精前後でのダイナミックな局在の変化が明らかになってきた。現在、CD9 を手がかりとして、受精の膜融合を制御する分子メカニズムの全貌に迫ろうと奮闘している。昨年度までに、共焦点レーザー顕微鏡を使ったイメージングシステムを確立した。この実験系を用いて受精の膜融合を観察した結果、膜融合前後での卵細胞膜の動態を明らかにすることができた。現在、この分子機構を解明するため、数種類の遺伝子改変マウスを作製中である。

3.2 卵の老化と胚発生メカニズムの解明と生殖医療への応用

初期胚の網羅的遺伝子発現解析より初期胚に特異的に係わる新規遺伝子群と個体の加齢にともなって卵子で大きく変動する遺伝子群を同定してきた。今年度は、それら重要な遺伝子群の *in silico* から *in vitro* と *in vivo* 解析に発展させる。同定した遺伝子が初期胚特異的に発現をしていることを RT-PCR、QPCR にて確認した。タンパク質レベルでの解析には、抗体を作成し初期胚での発現時期と細胞内のタンパク局在を同定することができた。機能解析のために、siRNA を用いた RNA 干渉法によるノックダウン法によりこの遺伝子が胚盤胞期以降の胎児個体形成の初期に非常に重要であることが判明した。これらの結果から、我々が同定した遺伝子は、初期発生に極めて重要であり、ヒトでも同様の遺伝子が存在することより不妊症あるいは不育症の原因遺伝子である可能性もある。

3.3 ES 細胞の樹立に関わる技術の確立と機能解析

これまでマウス ES 細胞を用いた無血清 ES 細胞培地を開発し、無血清及びフィーダー細胞無しの条件で良好にマウス ES 細胞が培養維持されるシステムを構築してきた。ES 細胞の未分化維持に関して更に、分子レベルでの知見を加え基盤を固めるため、ES 細胞で高発現しているタンパク質の一つである CD9 に着目した。膜 4 回貫通型テトラスパニンファミリーの CD9 は、マウス ES 細胞やヒト ES 細胞で高発現し未分化維持に必須とされてきた。我々は、CD9 ノックアウトマウスを用い ES 細胞樹立し詳細に検討したところ CD9 は未分化マーカーとはなりうるが未分化維持には必須ではないことが初めて判明し、現在投稿中である。ヒト ES 細胞異種成分排除培養システムでは、完全無血清培地を開発し、霊長類 ES 細胞では 30 継代以上培養した細胞での未分化維持と多分化能を保持していることを確認できた。フィーダー細胞のヒト化では、ヒト組織よりフィーダー細胞を樹立し、DNA マイクロアレイ解析より ES 細胞維持に適したフィーダー細胞を選定し、これまで確立してきたヒトフィーダー細胞検定システムにより良質なフィーダー細胞を同定することができた。

ヒト iPS 細胞が世界的にも注目を集めているが、その培養維持にはヒト ES 細胞の培養システムが必須であり、我々の研究成果はヒト iPS 細胞研究推進に大いに貢献するものと考えられる。

3.4 ヒト幹細胞の心筋組織への分化と細胞移植法の開発

本研究は、ヒト組織由来の幹細胞を用いて心筋細胞を作製し、心筋細胞移植のドナー細胞を開発することを目的としている。昨年度までに骨髄幹細胞から心筋細胞への分化誘導法の開発、再生心筋細胞の遺伝子発現とイオンチャネルを解析し、心筋分化に伴ってイオンチャネルが経時変化することを明らかにした。また、GFP あるいは LacZ トランスジェニックマウスの骨髄細胞を SCID マウスに骨髄移植すると、心筋梗塞時に骨髄より移動し、一部が心筋細胞に分化することも明らかにした。TERT、E6、E7、および Bmi-1 を遺伝子導入することにより寿命を延長したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて *in vitro* と *in vivo* において心筋への分化条件を検討した。さらにマウス胎児心筋細胞と共培養することで心筋への分化誘導の系を確立した。

今年度はさらに胎盤、子宮内膜、臍帯血、臍帯など、その採取・研究利用にあたり倫理委員会の審査を経た組織を用いて、同様の検討を行った。現在、間葉系細胞の心筋分化にはマウス心筋との共培養が必要である。マウス心筋との共培養が、どのようなメカニズムで間葉系細胞の心筋分化に

影響するのは、いまだ想像の域を超えていないが、マウス心筋からの分泌物質、物理的刺激、細胞融合などの要素が考えられている。細胞融合に関しては、我々のこれまでの研究により、マウス心筋と間葉系細胞との間にコラーゲン膜を挟んだ状態でも、間葉系細胞の心筋分化が得られることから、否定的な考えを持っている。分泌物質の探索は、無血清培地を用い、マウス心筋から分泌される物質、間葉系細胞から分泌される物質を、クロマトグラフィーを用いることで同定することを計画している。

3.5 先天代謝異常に対する幹細胞治療法の開発に関する研究

先天代謝異常症、とくにリソゾーム蓄積症の分子遺伝学的、細胞生物学的研究は、近年急速な進歩を遂げ、遺伝子変異の解析や病態の解明から新しい治療法の開発へと研究の主体はシフトしている。本研究では、先天代謝異常を対象として骨髄間葉系細胞を含めた体性幹細胞を利用した細胞治療法の確立に向けた基盤研究を行う。さらに、これらの幹細胞を臨床応用するための安全かつ効果的な培養システムの確立をめざしている。準備段階として、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の単離および多分化能の研究を行ってきた。さらにムコ多糖 VII 型モデルマウスを用いた細胞治療法の安全性と治療効果を検討した。

臨床チームにより、クリコサミノグリカンの分解を触媒する酵素を欠損したことより発症するライソゾーム蓄積症の一つであるムコ多糖症を対象疾患とした臨床プロトコールを作製し、診断基準、治療適正条件などを明確にした。

新規のヒト細胞供給源となるヒト細胞培養システムとして、月経血、臍帯血より間葉系細胞の培養を開始しており、それらが複数の分化形質を示すことを明らかにした。また、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法を確立し、non-stress 培地として数施設に提供し、有用性について検討を行った。胎児期における細胞移植法についても検討を行い、遺伝性ヘモグロビン異常症モデルを用いて、ドナー細胞の種類による治療効果の違いについても検討を行った。細胞移植における免疫寛容の誘導は、必要不可欠な課題であるため、今後も検討を行う。

3.6 成育バイオリソースーヒト臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・軟骨・骨髄・眼球由来幹細胞一の単離技術の開発、多分化能の同定

ヒト体性幹細胞は、ドナーの性質に影響されるため、現在に至るまでその定義はまちまちである。そのため、臨床応用を考えた際に治療効果の判定が困難である。本研究では、細胞表面に発現しているタンパク受容体、細胞表面の糖鎖などを用いて、ヒト幹細胞の指標となるマーカーの同定を行っている。細胞表面タンパク受容体は、いくつかの抗体で間葉系幹細胞特異的な反応が見られた。細胞表面糖鎖については、新たにレクチンのファージ・ライブラリーを用いた間葉系幹細胞の新規の評価システムを開発中である。

本年度の成果は、ヒト細胞取得に関する倫理的な手続きを明確にできたことと、実際にヒト細胞を培養することに成功したことである。その過程で、月経血、臍帯血、骨髄よりヒト幹細胞を得ると同時に、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法およびフィーダー細胞について、最適な細胞を同定し、その培養法を確立した。また、得られたヒト間葉系細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (GeneChip による遺伝子網羅的解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分化形質解析を行った。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、組織構築能を検討中である。また、細胞表面糖鎖を用いた細胞規格設定についてはマウス骨髄由来細胞を用いて、特異的に発現するレクチンマーカーを数種発見した。

3.7 安全で高品質な細胞提供技術の開発

前年度までに、CPC (セル・プロセッシング・センター) を使用したヒト幹細胞の培養ならびに臨床研究への供給を課題として、研究部横断的な推進体制を構築した。手順書の整備を完了した。

今年度は実際にそれらの手順に従って、細胞培養をおこなった。その上で基準・手順の見直しと患者検体の受け入れから出荷まで全ての手順を網羅した模擬培養を行った。この作業で得たデータ

を基に再度基準、手順の見直しを図り、委員会承認後第一例目の臨床研究をスタートさせる。

4. 教育活動

- 梅澤 明弘：慶應義塾大学医学部（非常勤講師）
東京農業大学（客員教授）
熊本大学医学部（非常勤講師）
- 宮戸 健二：東京農業大学（客員准教授）
東京医科歯科大学（非常勤講師）
- 阿久津英憲：東京農業大学（客員准教授）
東京医科歯科大学（非常勤講師）

5. 社会貢献・その他

5.1 社会貢献・情報発信

研究成果等の公表のための、Web ページを更新した。

<http://www.nch.go.jp/reproduction/index.html>

- 1) 2007年6月26日 科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会
特定胚及びヒトES細胞等研究専門委員会 人クローン胚研究利用作業部会（第28回）
ヒアリング「受精卵を用いたクローン技術-人クローン胚研究の新たな展開-」阿久津英憲
- 2) 2008年1月31日 総合科学学術会議第47回生命倫理調査会
ヒアリング「iPS研究の現状と方向性」阿久津英憲

5.2 広報活動

- 1) 2007年（平成19年）7月2日 読売新聞「人間の卵子からES細胞作成、米企業などが成功と発表」
- 2) 2007年（平成19年）11月20日 NHK ニュース「ヒトiPS細胞の樹立」
- 3) 2007年（平成19年）11月21日 TBS ニュース「ヒトiPS細胞の樹立」
- 4) 2007年（平成19年）11月25日 共同通信「夢の医療世界に衝撃 京大の「万能細胞」成功」
- 5) 2007年（平成19年）12月7日 共同通信「万能細胞ががん遺伝子使わず 課題はレトロウイルス」
- 6) 2007年（平成19年）12月8日 読売新聞「[解説]「iPS細胞」研究競争」
- 7) 2008年（平成20年）1月22日 日本経済新聞「万能細胞の再生医療-臨床ルール策定厚労省が研究班」
- 8) 2008年（平成20年）2月13日 日経産業新聞「先端技術-iPS細胞 臨床応用へ動く」
- 9) 2008年（平成20年）2月20日 毎日新聞「<iPS細胞>遺伝子の働きの仕組み解明」
- 10) 2008年（平成20年）3月3日 日本経済新聞「血液や骨の難病メカニズム iPS細胞使い解明へ」

5.3 センター外委員会活動

梅澤明弘

- 1) 第9回胎生期エピジェネティック制御研究所会議（早稲田大学） 委員
- 2) 角膜再生医療評価技術TR原案作成委員会（技術研究組合医療福祉機器研究所） 委員
- 3) 再生医療評価技術開発委員会（技術研究組合医療福祉機器研究所） 委員
- 4) 再生医療の実現化プロジェクト評価委員会（文部科学省研究振興課） 委員