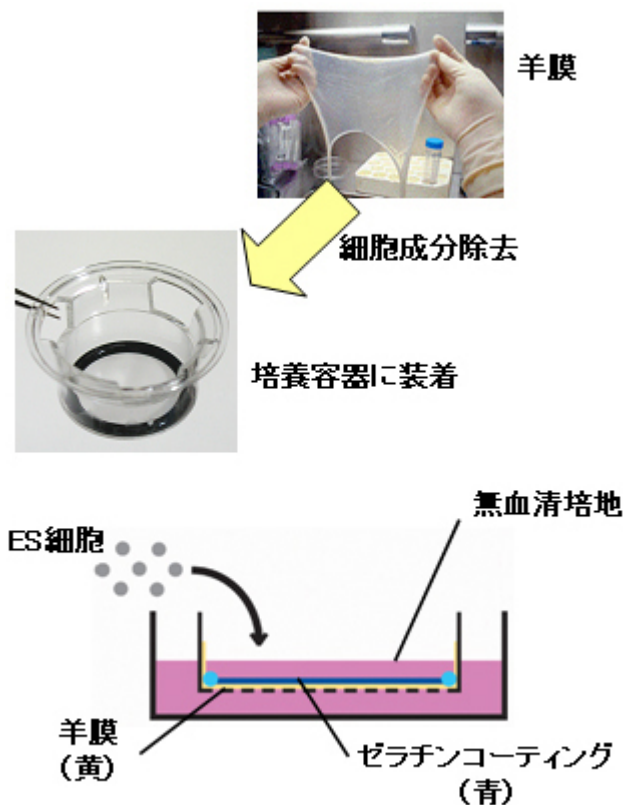


2006年6月6日  
独立行政法人 理化学研究所  
京都府立医科大学

## 世界初:ヒト羊膜成分を用い、ヒト ES 細胞から高効率に神経細胞を産生 - 動物由来の培養成分を完全除去、再生医学応用に貢献 -

“トカゲのしっぽのように、人間もケガした部分が自然に修復されればいいのに”。ES細胞は、こんな夢物語を現実にする可能性を秘めています。この細胞は、神経や網膜など身体のあらゆる組織・器官に分化する能力を持っています。これまで、サルやマウスなど動物のES細胞に、マウス由来の「PA6細胞」と呼ばれる細胞とともに培養することで神経細胞を作り出すことには成功していましたが、しかし、この方法では、動物由来の病原体の感染などのリスクがあるため、ヒトへの移植には応用できませんでした。

発生・再生科学総合研究センター細胞分化・器官発生研究グループらは、出産時に得られるヒト羊膜由来の「細胞外マトリックス（細胞外基質）」を培養成分として用い、ヒトES細胞から神経細胞などを高効率で分化誘導させることに成功しました。ヒト羊膜は既に臨床で外科的処置などに用いられており、安全性が実証されているため、ヒトへの移植の安全性が高いと考えられます。この研究によって、パーキンソン病や網膜疾患への臨床的な治療法開発へと大きく前進したといえます。



(図) 新しく開発した培養方法の概略

2006年6月6日  
独立行政法人 理化学研究所  
京都府立医科大学

## 世界初:ヒト羊膜成分を用い、ヒト ES 細胞から高効率に神経細胞を産生

- 動物由来の培養成分を完全除去、再生医学応用に貢献 -

### ◇ポイント◇

- ・ヒト羊膜の成分を用いヒト ES 細胞から 90%の高い効率で神経前駆細胞を分化誘導
- ・ドーパミン神経細胞、運動神経細胞、網膜色素上皮細胞、水晶体細胞なども産生
- ・ヒト ES 細胞に関する指針制定後、日本で初めての分化研究に関する論文に

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）と京都府立医科大学（山岸久一学長）は、ヒト羊膜成分を培養成分に用いた、ヒトES細胞から神経細胞を育てる神経分化誘導法を世界に先駆けて開発しました。理研発生・再生科学総合研究センター（竹市雅俊センター長）細胞分化・器官発生研究グループの笹井芳樹グループディレクター、上野盛夫客員研究員（現在は国立長寿医療センター病院 感覚器再生科医長）および京都府立医科大学眼科学教室の木下茂教授を中心とした研究グループの成果です。

これまでに、笹井グループディレクターらは、PA6 細胞という特殊なマウス由来のフィーダー細胞<sup>\*1</sup>とともに培養することで、動物のES細胞からドーパミン神経などの中枢神経系ニューロンを試験管内で高効率に分化させる方法（SDIA法）を開発しています。さらに昨年、京都大学医学部脳神経外科学教室との共同研究で、このSDIA法によりサルES細胞から分化させたドーパミン神経細胞をパーキンソン病モデルサルの大脳基底核に移植し、治療効果があることを実証しました。このようにSDIA法はES細胞の再生医学への応用に役立つ優れた方法ですが、培養中に動物（マウス）由来のPA6細胞を誘導源として共存させる必要があり、動物由来の病原体の感染などのリスクがあるため、この方法による人への移植治療のためのヒトES細胞からの神経細胞を産生することには問題がありました。

今回の研究は、この問題を解決し、ヒトES細胞の再生医学応用への技術開発を狙ったものです。研究グループは、ヒト羊膜の細胞外マトリックス（細胞外基質）成分に注目し、これがPA6細胞のようにES細胞に対して強い増殖と神経分化誘導活性を有することを明らかにしました。ヒト羊膜は、臨床で角膜幹細胞の培養や外科的処置などの際にも用いられていることから、すでに安全性が実証されている材料組織です。さらに、このヒト羊膜成分を用いた培養で、ヒトES細胞からドーパミン神経細胞、運動神経細胞、網膜色素上皮細胞、水晶体細胞などの産生も確認しています。この方法を用いることで、従来除去が不可能とされていた動物由来成分を除去したヒトES細胞の効率的な神経分化培養が可能となり、神経難病や網膜疾患への治療法開発の促進に大きく貢献することが期待されます。なお、この成果は、わが国でヒトES細胞に関する指針制定後、初めての分化誘導研究に関する論文発表となります。本研究は、文部科学省のリーディングプロジェクト「再生医療の実現化プロジェクト」の一環として進められました。

本研究成果は、米国科学誌「米国科学アカデミー紀要」オンライン版（6月5日の週）に掲載予定です。

## 1. 背景

ヒトを含む哺乳類動物の中樞神経系のニューロンは非常に再生能力が低く、一旦損傷すると自然には回復しにくいことが知られています。そのため損傷したニューロンと同じ細胞を移植し補充する「神経細胞移植」がパーキンソン病の治療などで期待されています。このような移植に使う神経細胞を幹細胞などから作る、いわば「神経細胞パーツ化」の技術開発が、治療や病態解明の重要な課題の一つとなっています。研究グループは、2000年からマウスや霊長類のES細胞から効率よく神経細胞を試験管内で産生する技術（SDIA法）を確立してきました。このSDIA法の特徴は、ドーパミン神経細胞を効率よく産生することが可能であることです。最近では京都大学との共同研究において、カニクイサルのパーキンソン病モデルでの細胞移植治療に成功しました。このようにSDIA法を用いた神経細胞産生技術は、再生医学の基盤技術として、大きな期待が寄せられています。

SDIA法では、ES細胞をPA6細胞というマウスの骨髄由来の細胞とともに培養することで、ES細胞から神経細胞への分化をほぼ選択的に誘導することができます。既にドーパミン神経細胞以外にも運動神経細胞、知覚神経細胞、網膜色素上皮細胞などの分化にも成功しています。しかし、SDIA法をそのまま再生医学に応用するには、一つの大きな欠点があります。それは、マウス由来のPA6細胞にES細胞が接触することです。そのため、産生された神経細胞は、たとえヒトES細胞由来であっても、感染リスクなどが考慮され、動物レベルの「異種移植」扱いとなります。従って、マウス由来のPA6細胞の代替として、ヒト由来の材料（培養因子）を探索する必要があります。しかし、ヒトの骨髄由来の細胞では、腫瘍化した場合を除いて、一般に増殖に制限があり大量に増やすことができず、良い細胞株が未だに得られていない等の問題があり、SDIA法のヒトへの応用に一つの大きな障壁となっていました（図1）。

## 2. 研究手法と成果

今回、上野客員研究員らは、SDIA法におけるマウスPA6細胞に代えて、ヒト羊膜組織成分を用いる新しい神経分化誘導法の開発に取り組み、「AMED法

(Amniotic membrane Matrix-based ES cell Differentiation;羊膜マトリックス成分に基づくES細胞分化法)」と名付けた技術を樹立しました。また、この方法によりヒトES細胞から神経前駆細胞の分化、さらにドーパミン神経、運動神経、網膜組織などの中樞神経系由来の神経・感覚系細胞の分化誘導を可能にしました。

### (1) 羊膜マトリックス成分を用いた培養法「AMED法」の確立

ヒト羊膜は、事前のインフォームドコンセントに基づき、京都府立医科大学付属病院において予定帝王切開手術時に得られた羊膜を、超低温フリーザーで保存したものを使用しました。羊膜マトリックス（細胞外基質）はこの羊膜から薬剤処理（または徒手法と薬剤処理の組み合わせ）により細胞成分を除去した後、培養に利用しました（図2）。

フィーダー細胞を用いずに、この羊膜マトリックス上にマウスES細胞を蒔き、特別な無血清培養液で培養すると、マウスES細胞は盛んに増殖し、90%以上の高い効率で神経前駆細胞に5日間以内に分化誘導されることが判明しました。

さらに、同様の AMED 法をヒト ES 細胞の分化培養に応用したところ、ヒト ES 細胞でも 90%程度の効率で神経前駆細胞を約 2 週間の培養で分化誘導することに成功しました (図 3)。この際、ヒト ES 細胞はやや羊膜に接着しにくいいため、ラミニンという細胞接着を促すタンパク質を羊膜マトリックスに添加しています。

ヒト羊膜成分が、ES 細胞 (マウスおよびヒト由来) に対して分化誘導活性、増殖支持活性を有することは世界で初めての報告です。また、ヒト ES 細胞からこれほど高い選択性を持った神経分化誘導に成功したことも、世界で初めてです。

なお、ヒト ES 細胞は京都大学再生医科学研究所でヒト余剰凍結胚 (不妊治療のため作成され、不要となったもの) から国の指針に基づいて作成された国産のものを使用しました。また、理研発生・再生科学総合研究センターでは、笹井芳樹、西川伸一、丹羽仁史の 3 つの研究チームがヒト ES 細胞の使用計画の確認申請を文部科学大臣に行い、2004 年に承認されており、盛んにヒト ES 細胞の大量培養、分化誘導、再生医療への基盤技術開発を行っています。

- (2) AMED 法により、ヒト ES 細胞から中枢神経系ニューロンへの分化誘導に成功  
AMED 法によりヒト ES 細胞を神経前駆細胞に分化させた後、さらに約 4 週間 (合計 6 週間) 培養すると約 4 割の細胞がニューロンに分化しました。そのうち約 3 割の細胞がドーパミン神経細胞に分化していることが解析の結果判明しました (図 4)。この効率は、PA6 細胞を用いた SDIA 法に匹敵する高い効率です。動物由来の誘導源を用いず、また中間段階での細胞選別などを行わず、直接ヒト ES 細胞からこのように高い効率でドーパミン神経の分化誘導に成功したことも世界で初めてです。

さらに、分化培養の過程で、Shh (ソニック・ヘッジホグ:筋肉の収縮を制御する運動神経細胞の分化を促進する可溶性タンパク質) を添加することで、約 2 割の神経細胞を運動神経細胞に分化させることが可能となりました (図 5)。

- (3) AMED 法により、ヒト ES 細胞から網膜色素上皮、水晶体組織への分化誘導に成功  
ヒト ES 細胞をドーパミン神経細胞に分化させる条件下で、AMED 法を使い、ヒト ES 細胞を長期培養すると数パーセント以上のコロニーに眼の組織である網膜色素上皮および水晶体組織の大きな細胞塊が出現することを確認しました (図 6、図 7)。これらの組織は、サル ES 細胞を PA6 細胞とともに培養した場合にも分化誘導されることが確認されています。

このようにヒト羊膜マトリックスは、広い用途でマウス PA6 細胞の代替材料として使用できることが示されました。

### 3. 本研究成果の特徴

今回の研究では、技術的に困難であったヒト ES 細胞の神経分化誘導を確実にかつ安全に行うための優れた培養法「AMED 法」を開発しました。この技術は、ヒト羊膜の成分を分化誘導源に用いるユニークな培養法ですが、培養技術の基本的な部分は 2000 年に京都府立医科大学眼科学教室 木下茂教授の研究室で開発された

羊膜上での角膜幹細胞培養法をもとに改良したものです。理研と同大学との密接な共同研究により、手間のかかるヒト ES 細胞研究にも関わらず 1 年半程度という短い研究期間で成功した点は特筆に値します。

ES 細胞の分化誘導条件の研究では、これまで一般に、増殖因子などの培養液の組成の検討に重きが置かれていましたが、今回の研究は、培養細胞が接着する基質（今回の場合は羊膜マトリックス）が非常に重要な役割を果たすことを明らかにした点でも、ユニークな発見と言えます。何故、羊膜のマトリックスにこのような活性があるのかは、依然として謎のままで、ある意味神秘的であり、今後さらに解析を行い分子実体を明らかにしたいと考えています。

応用面の観点からは、ヒト羊膜成分を用いたヒト ES 細胞の神経分化誘導法の開発は次のような大きな意義も持ちます。

- 1) ヒト ES 細胞から高効率で神経分化誘導を容易かつ確実に行うことができる
- 2) 動物由来の細胞成分を培養中に含まないため、移植を考えた場合の安全性が高い
- 3) 無血清の化学合成培養液で医学的に有用な神経細胞(ドーパミン神経細胞など)の産生が可能である
- 4) 羊膜は既に外科、皮膚科、眼科領域で、臨床で使用されており、安全性が確立している（米国などでは製品化もされている）
- 5) 羊膜は出産に伴って高頻度に得られる
- 6)  $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーで長期保存が可能であるほか、凍結乾燥（フリーズ・ドライ）によっても活性を失わないため、産科クリニックを持たない研究機関でもヒト ES 細胞の分化誘導に使用することができる

このように有用性の高い技術であるため、羊膜成分を用いた ES 細胞の分化誘導法についてはすでに、理研と京都府立医科大学との共同で特許を出願しています。

#### 4. 今後の展望

今回の研究で、ヒト ES 細胞の神経難病、網膜疾患への再生医学応用への一つの大きな技術的問題を取り除くことができました。

パーキンソン病は、現在国内に約 10 万人が発症している比較的発症頻度の高い神経変性疾患であり、強い運動障害のため病気が進行すると寝たきりになるなど社会的にも大きな問題となる疾患です。今回の研究で、ヒト ES 細胞からドーパミン神経細胞が高効率で得ることが可能になったことから、ヒト ES 細胞によるパーキンソン病モデルサルを用いた本格的な前臨床研究（臨床試験での患者の治療を想定し、動物を用いた前段階研究）を行う道が開けました。これまでのサル ES 細胞での研究をさらに展開して、京都大学医学部脳神経外科学教室橋本信夫教授・高橋淳講師の研究チームと共同で、移植研究を進めたいと考えています。

また、ヒト ES 細胞から容易に運動ニューロンを産生することも可能となったため、運動ニューロン疾患<sup>\*2</sup>の原因解明や治療法開発などにも利用されることが期待されます。

同時に、眼組織である網膜色素上皮や水晶体組織も効率良く産生可能であることが分かりました。特に、前者の網膜色素上皮に関しては、本論文の共同著者でもあ

る京都大学病院探索医療センターの高橋政代助教授が、これまでにサルES細胞由来の網膜色素上皮を用いた網膜色素変性症<sup>\*3</sup>のモデルラットへの移植治療実験に成功していることから、ヒトES細胞に関してもさらに共同研究を展開していく予定です。

最後に、さらにこの手法を簡便化するために、将来的には羊膜マトリックス内の有効成分の抽出・濃縮を行い、この成分を表面にコートした培養皿でヒトES細胞を培養し、容易に有用な神経細胞を産生できるように改良を行いたいと思います。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

発生・再生科学総合研究センター

細胞分化・器官発生研究グループ

グループディレクター 笹井 芳樹

Tel : 078-306-1841 / Fax : 078-306-1854

神戸研究推進部

土手 陽子

Tel : 078-306-3005 / Fax : 078-306-3039

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 フィーダー細胞

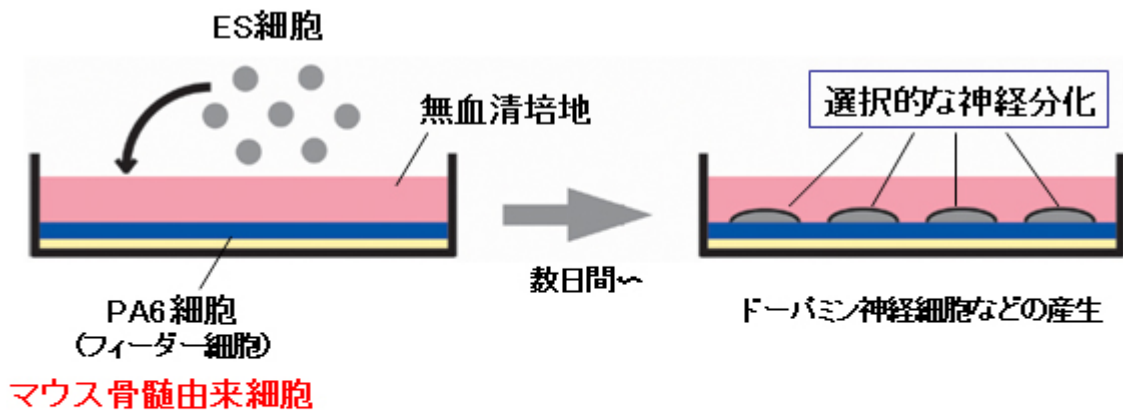
動物（マウス）由来の PA6 細胞などの ES 細胞の増殖・分化を助ける細胞。

### ※2 運動ニューロン疾患

中枢神経系の運動神経細胞が変性・脱落しておこる神経変性疾患。国内では2～3万人に1人の発症頻度と想定されている。体の筋肉に力が入らなくなるため、動くことができなくなり、最終的には人工呼吸器も必要となる。筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその代表例で、多くの場合原因は不明である。現在、有効な治療法なし。

### ※3 網膜色素変性症

網膜の色素上皮または視細胞の何らかの問題により、視細胞が変性脱落する網膜変性疾患。発症頻度は約5,000人に1人とされているが、そのうち約半数には遺伝的原因（家族内発症）が認められる。現在、有効な治療法なし。



**SDIA法の問題点**  
 動物由来(マウス)細胞を神経分化の誘導源として用いている

ヒト ES細胞を用いた移植用細胞の産生には  
 分化誘導源をヒト由来材料に置換することが望まれる

図1 SDIA法の概略と問題点

SDIA法は、ES細胞をマウスの骨髄由来のPA6細胞と一緒に培養することにより、ES細胞の神経細胞への分化をほぼ選択的に誘導できる。ES細胞に動物由来の細胞が接触しているため、SDIA法で産生された神経細胞は、それがヒトES細胞由来であっても、その移植は「異種移植」と分類される。

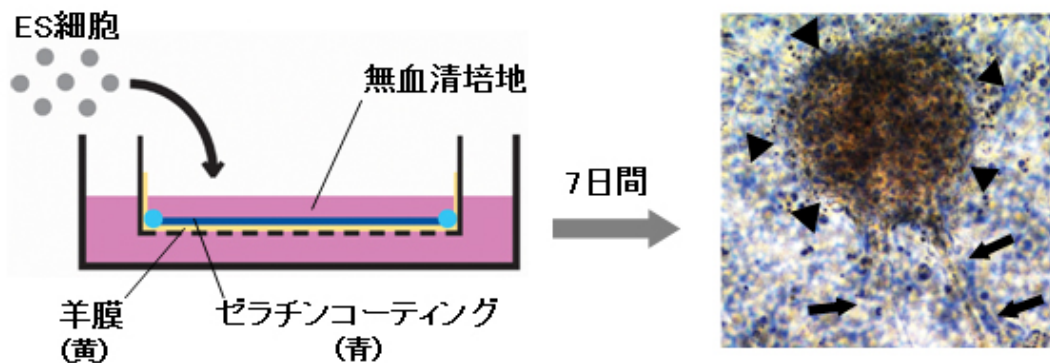


図2 AMED法の概略

帝王切開時に排出された羊膜を薬剤処理で細胞成分除去した後に、その羊膜マトリッ



クスで培養容器底を被覆する。その上に ES 細胞を蒔き、無血清培地で培養すると、ES 細胞はコロニーを形成し、神経前駆細胞へ分化する。

(右下) AMED 法で 7 日間培養したマウス ES 細胞。コロニー (矢頭) から神経突起 (矢印) が伸びている。

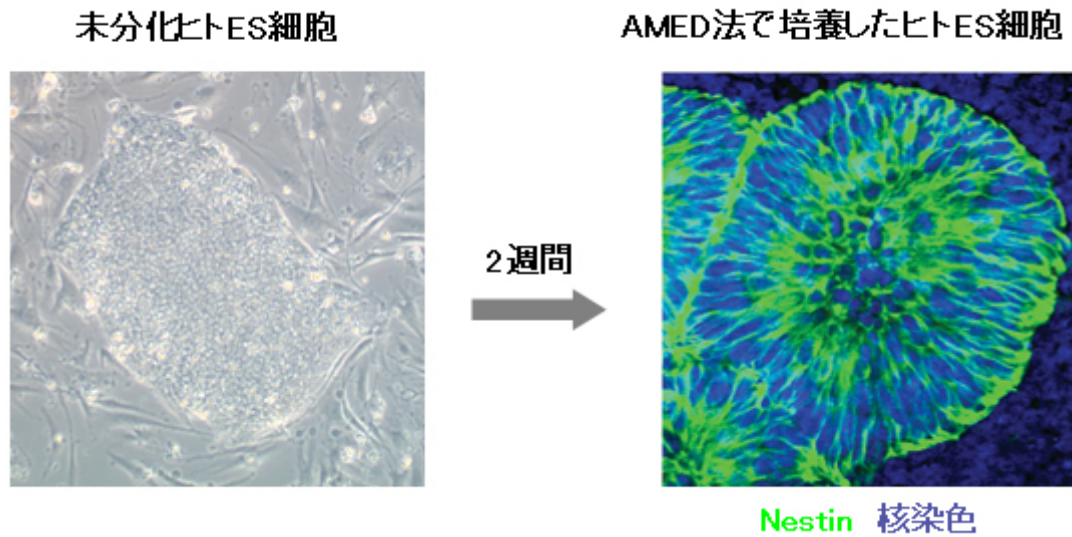


図 3 AMED 法によるヒト ES 細胞からの神経前駆細胞の産生

(左) 未分化状態のヒト ES 細胞 (中央;数百個の細胞からなる塊)。周りの紡錘形の細胞はフィーダー細胞。

(右) AMED 法で 2 週間培養したヒト ES 細胞。大部分の細胞が神経前駆細胞マーカー (Nestin;緑) を発現している。



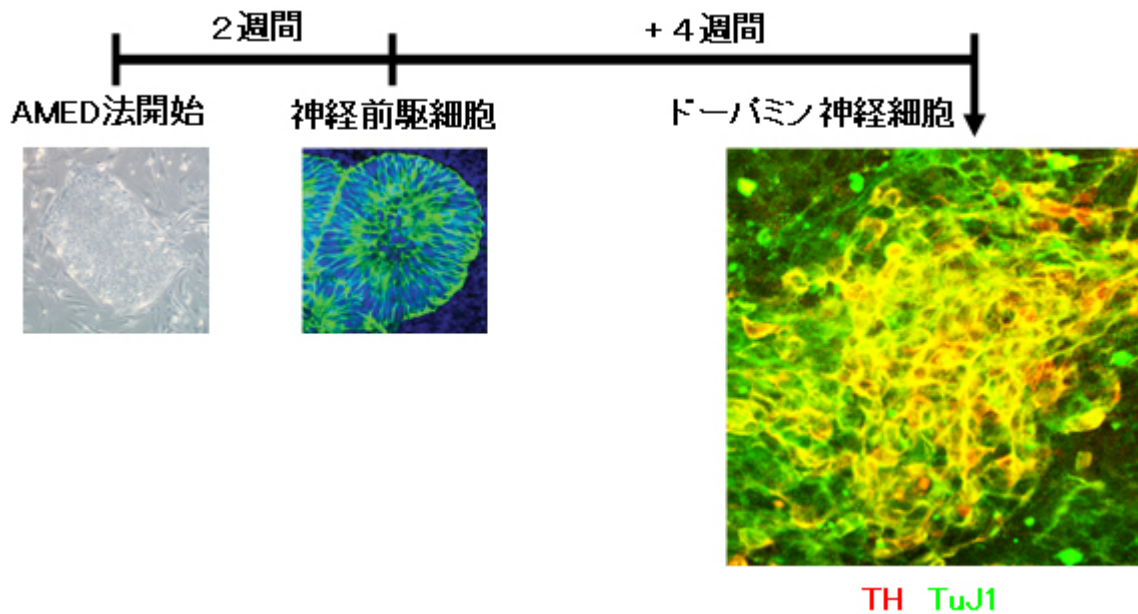


図4 AMED法によるヒトES細胞からのドーパミン神経細胞の産生

(左) 未分化状態のヒトES細胞。

(中) 神経前駆細胞に分化。

(右) AMED法で6週間培養したヒトES細胞。

多くの細胞が成熟神経細胞のマーカー (TuJ1;緑)を発現しており、うち3割の神経はドーパミン神経マーカー (TH;チロシン水酸化酵素) 陽性のドーパミン神経細胞 (黄) に分化している。

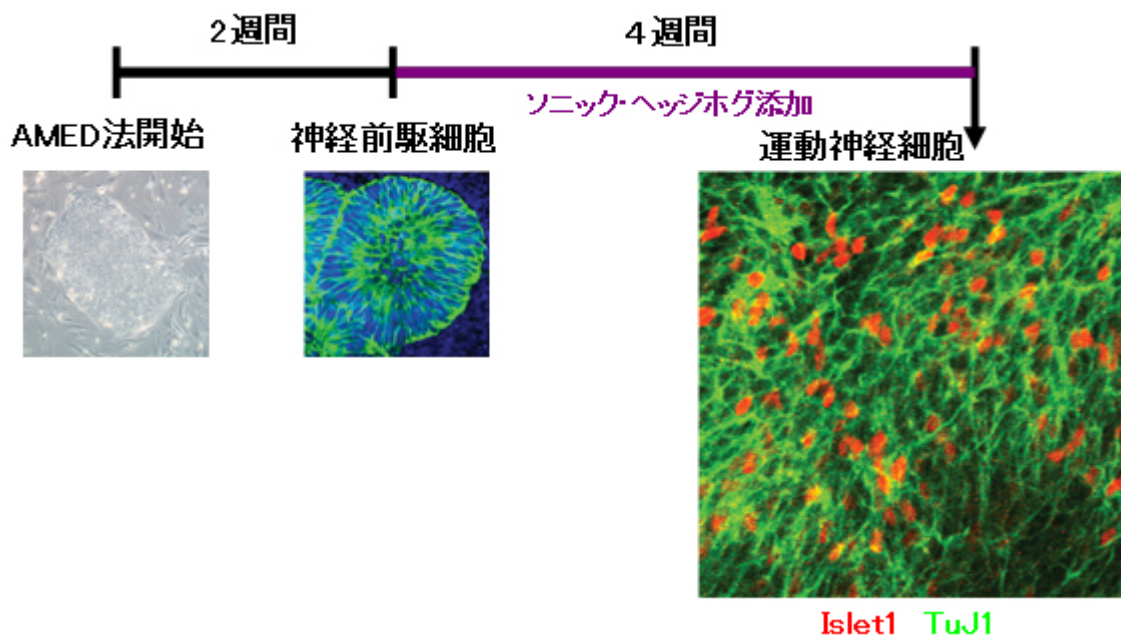


図5 AMED法によるヒトES細胞からの運動神経細胞の産生

(左) 未分化状態のヒトES細胞。

- (中) 神経前駆細胞に分化。  
(右) AMED 法でヒト ES 細胞を培養し、ソニック・ヘッジホグで処理することにより、ヒト ES 細胞由来のニューロン (TuJ1; 緑) の約 2 割が運動神経細胞マーカー (Islet1; 赤) に陽性となる。

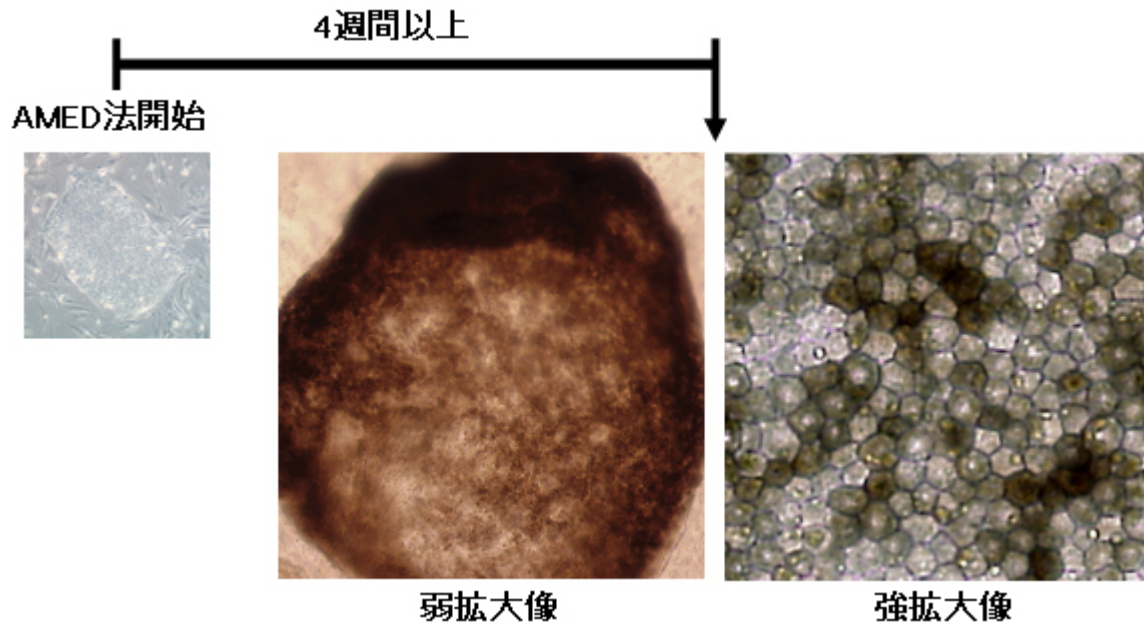


図 6 AMED 法によるヒト ES 細胞からの網膜色素上皮細胞の産生

- (左) 未分化状態のヒト ES 細胞。  
(中) AMED 法でヒト ES 細胞から分化誘導された網膜色素上皮細胞の塊(弱拡大)。  
(右) AMED 法でヒト ES 細胞から分化誘導された網膜色素上皮細胞 (強拡大)。網膜色素上皮細胞に特徴的な六角形の褐色の細胞で構成されている。

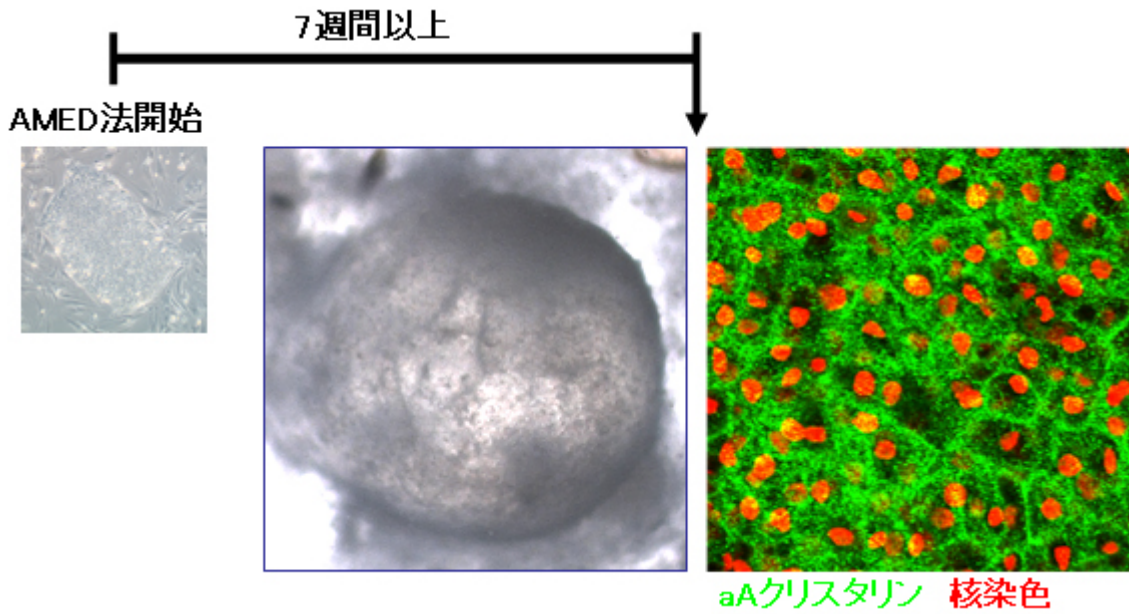


図7 AMED法によるヒトES細胞からの水晶体組織の産生

- (左) 未分化状態のヒトES細胞。
- (中) AMED法でヒトES細胞から分化誘導された水晶体組織 (弱拡大)。
- (右) ヒトES細胞から分化誘導された水晶体組織は、水晶体に特異的なタンパク質であるクリスタリン (緑) を発現する細胞で構成されている (強拡大)。