

2007年5月28日

独立行政法人 理化学研究所

ヒト ES 細胞の画期的培養法開発：大量培養や大脳神経細胞産生が可能に

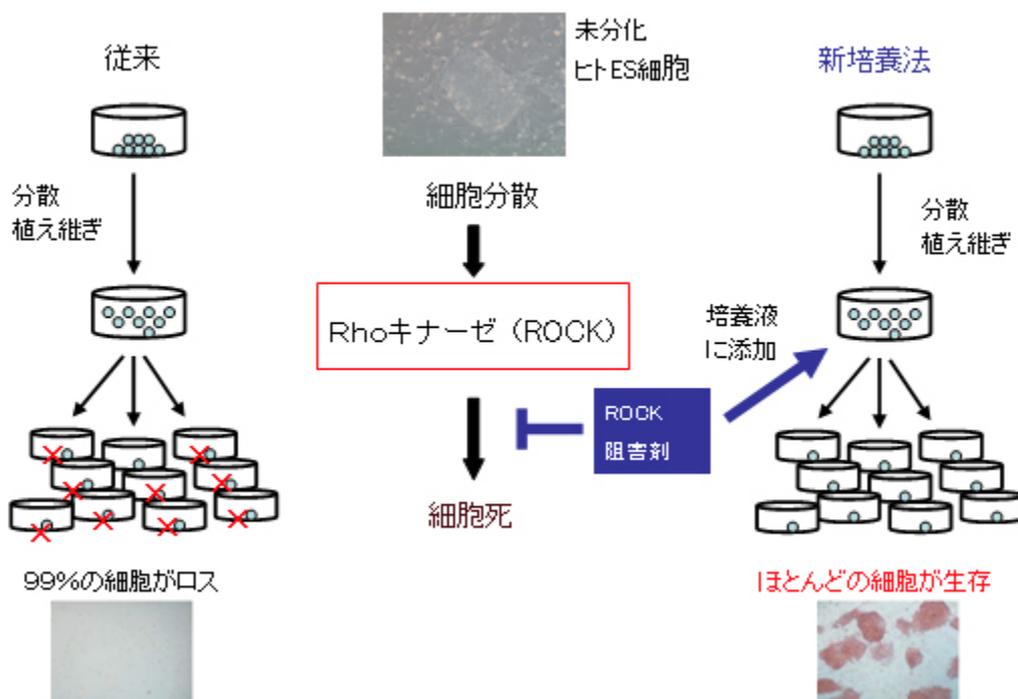
- 再生医療や創薬開発を加速する新技術の確立 -

私たちの体を構成している組織は、一旦損傷すると自然には回復せず、そのため大事な機能を失ってしまうことがあります。失われた組織機能を取り戻す医療として、幹細胞を活用した再生医療に対する期待が高まっています。とくに胚性幹細胞（ES細胞）は、身体の全ての種類の細胞に分化して組織を構成する能力（多能性）や試験管内で無限に増える能力（自己複製能）を持っており、万能細胞として再生医療の切り札となることが期待されています。

これまでに、ヒト ES 細胞からドーパミン神経細胞などいくつかの種類の細胞を生み出す培養方法が確立されていますが、ヒト ES 細胞を自在に医学利用するためには、従来の培養法で大きな問題となっている「細胞死」を防ぐ必要がありました。

理研 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では、この細胞死を防ぐ阻害剤を発見し、簡単な薬剤処理でヒト ES 細胞の培養効率を飛躍的に向上させる方法を世界で初めて開発しました。さらにこの技術を用いて、これまで困難であった大脳皮質前駆細胞を効率的に産生することにも成功しました。

今後はこの新しい培養法によって、ヒト ES 細胞の大量培養が容易になり、再生医療への応用に必須である細胞の品質管理、大量培養、分化技術の開発が大きく進むことが期待されます。



(図) 分散したヒト ES 細胞の ROCK 阻害剤による劇的な生存促進

2007年5月28日
独立行政法人 理化学研究所

ヒト ES 細胞の画期的培養法開発：大量培養や大脳神経細胞産生が可能に

- 再生医療や創薬開発を加速する新技術の確立 -

◇ポイント◇

- ・従来の培養法で起こるヒト ES 細胞の細胞死の問題を簡単な薬剤処理で解決
- ・たった1個のヒト ES 細胞から高効率で細胞塊を形成、遺伝子導入が飛躍的に簡便に
- ・ES 細胞からヒト大脳細胞の高効率な産生を世界で初めて成功

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、ヒトES細胞^{※1}の培養効率を、簡単な薬剤処理を行うことで飛躍的に向上させる培養法を世界に先駆けて開発しました。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、渡辺毅一研究員（現在はカリフォルニア工科大学研究員）、上野盛夫客員研究員（国立長寿医療センター病院感覚器再生科医長）らを中心とした研究グループの成果です。

笹井グループディレクターらは、これまでに、マウスなどの動物ES細胞からドーパミン神経、網膜細胞、大脳細胞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技術を世界に先駆けて開発してきました。2006年には、羊膜の成分を利用して、ヒトES細胞からドーパミン神経細胞を高効率に産生する技術も開発し、パーキンソン病の再生医療の実現に向けた取り組みも行っています。しかし、マウス由来のES細胞に比べて、ヒトES細胞の培養には高度な技術的課題を伴い、それが研究開発を遅らせる要因となっていました。特に、ヒトES細胞は、培養過程で必要な様々な操作を行うと容易に細胞死^{※2}を起こし、細胞数を著しく損なうことは、未解決の技術的な障壁となっていました。

研究グループは、この障壁を解決し、ヒトES細胞の医学応用を大きく促進する技術開発を狙いました。渡辺研究員らは、ヒトES細胞を1つずつバラバラにしてから培養する際に必ず起こる細胞死の引き金が、Rho キナーゼ（ROCK）^{※3}という細胞内のリン酸化酵素の活性化によることを発見し、その働きを阻害すると細胞死が抑制できることを明らかにしました。実際に、ヒトES細胞をROCK阻害剤を含む培養液で育てるとES細胞1個あたりの細胞塊（コロニー）形成率は約30倍も亢進しました。また、難しかったヒトES細胞への遺伝子導入も容易にできることも実証しました。さらに重要なことに、この技術を活用して、これまで困難であったヒトES細胞からの大脳皮質前駆細胞の効率的な産生にも、世界に先駆けて成功しました。

今回の研究成果は、ヒトES細胞の培養をマウスES細胞の培養並に容易にする点で技術的なブレークスルーとなります。これは、再生医療への応用に必須である細胞の品質管理、大量培養、分化技術の開発に大きく貢献します。さらに医療産業への応用として、新薬の開発や安全性研究を大きく加速することが期待されます。

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。成果は、米国科学誌「ネイチャー・バイオテクノロジー」オンライン版（5月27日付け）に掲載予定です。

1. 背景

ヒトを含む哺乳動物の組織は、一般に再生能力が低く、一旦損傷をうけると自然には回復しにくい特徴があります。幹細胞を応用した再生医学研究は、生体内あるいは生体外で幹細胞を殖やし、それを利用して組織を修復・再生することを目指しています。特に胚性幹細胞（ES 細胞）は、身体のすべての種類の細胞に分化（自らの性質を不可逆的に変化させ、別の種類の細胞になること）する能力（多能性）と、試験管の中で無限に殖える能力（自己複製能）とを有しており、その利用開発は、再生医療の基盤技術として大きな期待が寄せられています。90年代後半にヒト ES 細胞が樹立され、日本でも研究利用が可能になり、その高い医学利用の可能性に多方面から注目が集まっています。

これまでに、研究グループは、神経系および感覚器系の様々な有用細胞をマウスやサルの ES 細胞から試験管内で分化させることに、世界に先駆けて成功しています（SDIA 法や SFEB 法など：2005 年 2 月 7 日プレス発表：ES 細胞から大脳前駆細胞の分化誘導など）。

それらのうち、例えば、パーキンソン病細胞治療に期待されている中脳ドーパミン神経細胞、網膜変性症治療に期待されている視細胞や色素上皮細胞、小脳変性症の研究に必須の小脳神経細胞、痴呆やハンチントン病と関わりの深い大脳皮質細胞や基底核細胞などは、医学的に価値の高いものです。

同グループではさらに、これらの動物 ES 細胞で開発した技術を順次ヒト ES 細胞の分化に応用してきました。2006 年にはヒト ES 細胞をヒト由来材料（ヒト羊膜細胞外基質）と培養して、ドーパミン神経細胞を産生することに成功し、パーキンソン病細胞治療の実現化に大きく寄与しました（2006 年 6 月 6 日プレス発表：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）。

しかし、マウスなどの ES 細胞で急速に開発されている技術を、医学利用のためにヒト ES 細胞に応用することには、技術的に大きな障壁が存在します。特に、1) 未分化ヒト ES 細胞の増殖を促進する因子が明確でないこと、2) ヒト ES 細胞は培養過程の様々な操作で容易に細胞死を起こすこと、が容易に解決できない二大問題でした。

1) については、マウス ES 細胞と異なり、単一の増殖因子を培養液に添加することで未分化のヒト ES 細胞を維持培養することは未だに実現できていません。しかし、米国ウィスコンシン大学などからのいくつかの研究の結果、複数の増殖因子や培養条件を組み合わせることで、近年徐々に増殖効率が改善されてきました。

一方、2) の「細胞死」の抑制は全く未解決のままでした。ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞と異なり、非常にストレスに弱く、細胞培養で頻用している通常の操作でも簡単に細胞死を起こします。例えば、細胞を増殖させるために植え継ぐ際には、通常トリプシンなどを使って細胞を 1 つずつバラバラにし、新しい培養皿に移し、1 つ 1 つの細胞から細胞塊（コロニーと言います）を形成させます（分散培養）。ところが、ヒト ES 細胞はこのような分散培養をすると 99% の細胞が 2 日以内に死んでしまいます。そのため、細胞塊を機械的に少し小さくほぐして植え継ぐ（ここでは「株分け培養」と呼びます）という非常に非効率的な方法でしか ES 細胞を確保できません。そのため、高度な培養技術、例えば大量培養や細胞単離、遺伝子導入はできず、応用への大きな障壁となっていました（図 1）。

一方、分散培養は、ES細胞から各種の有用細胞を分化させる方法としても不可欠で、マウスES細胞研究では多用されてきました。この分散培養をヒトES細胞に適用できないことが、ヒトES細胞の分化の研究でも大きなネックとなっていました。

研究成果は、この問題を根本的に解決する技術的なブレイクスルーをもたらすものです。

2. 研究手法と成果

研究グループは、細胞内の特定の酵素に対する阻害剤を培養液へ添加するという単純な処理を行うことで、ヒトES細胞の生存を著しく亢進させる技術を樹立しました。また、この方法により、これまで困難であったヒトES細胞から効率の良く大脳神経細胞を産生することを可能としました。

(1) ヒトES細胞の「内なる殺し屋」Rhoキナーゼ (ROCK) を同定 (図2)

上述のように、ヒトES細胞は、単一細胞に分散して培養すると99%が細胞死を起し、コロニーを形成することができません。このような細胞死を引き起こす現象は、マウスES細胞では認められず、霊長類(ヒト及びサル)ES細胞に特有の現象です。これまでに、笹井グループディレクターを始め、多くの研究者が細胞死の阻害剤(カスパーゼ阻害剤など)を用いて、この細胞死を抑制し、ヒトES細胞の生存を高める試みを行いましたが、十分な成果は得られませんでした。ヒトES細胞を効率よく培養することが出来ないために、ヒトES細胞の大量培養はもちろん、分散培養やコロニー形成を必要とする研究開発は、実際上不可能でした。

研究グループでは、運動神経細胞などのごく特殊な細胞死に関わっている可能性のみが示唆されていたRhoタンパク質と、Rhoが結合することで活性化されるRhoキナーゼ(ROCK)という酵素に注目しました。このRhoタンパク質がヒトES細胞で果たす役割を調べたところ、ヒトES細胞をバラバラに分散するとすぐにRhoタンパク質の活性化が起こることを発見しました。Rhoタンパク質の活性化は、続いてROCKの活性化を引き起こしますが、ROCKの選択的阻害剤であるY-27632^{*3}を作用させたところ、ヒトES細胞の分散による細胞死を強く抑制し、1個の細胞からの細胞塊(コロニー)形成率が約30倍に亢進しました。分散したヒトES細胞の生存促進は、Fasudil^{*3}などY-27632以外のROCK阻害剤を添加することでも認められました。

このことは、分散培養の際にヒトES細胞の「殺し」をつかさどる細胞内因子が、実は、一般的な細胞死にはあまり関係しないとされてきたROCKであることを世界で初めて証明したことになります。

(2) ヒトES細胞培養が劇的に改善

ROCK阻害剤の生存促進作用は非常に強力で、たった1個のヒトES細胞を培養皿にいた場合でも、そこから細胞塊を成長させることができます。また、分散後12時間作用させるだけで、細胞死をほぼ完全に抑制することができます。さらに、ROCK阻害剤存在下で培養すると、ヒトES細胞は、ES細胞特有の

性質を失いません。すなわち、自己複製能や多能性を保ったまま培養する、維持培養が可能となります。また、ヒト ES 細胞は、分散培養をしなくても中程度に細胞死が起こりやすく、殖えにくい性質がありますが、ROCK 阻害剤は、分散培養以外でもヒト ES 細胞の生存、増殖を促進することが判明しました。長らく解決されなかったヒト ES 細胞の細胞死の問題は、このように単純な ROCK 阻害剤の薬剤処理でほぼ解決することができました。

ちなみに、大量培養を考えた場合、従来の「株分け」培養法では 1 ヶ月かけてやっと 100 倍程度に細胞を殖やすことができるのみでしたが、今回の ROCK 阻害剤を使う新しい分散培養法では、計算上 1 ヶ月で 1 万倍以上に細胞数を殖やすことが可能になる効率になります。

(3) ヒト ES 細胞への遺伝子導入改変細胞を作成 (図 3)

ヒト ES 細胞に外部から遺伝子を導入し、遺伝子改変細胞を作成することは、ヒト ES 細胞を用いた基礎および応用医学研究で非常に重要な手法となります。しかし、外来遺伝子がヒト ES 細胞のゲノムへ組み込まれる効率は一般に 0.1%以下と非常に悪く、そのため遺伝子が組み込まれた細胞を、組み込まれなかった数多くの細胞から選別するためには、分散培養によるコロニー形成が必須になります。ところが、上述したように、これまでヒト ES 細胞の分散培養の効率が著しく低かったため、遺伝子改変細胞株を得るためには何十枚もの培養皿を使う大量の導入実験を行う必要がありました。

この難問も、ROCK 阻害剤を培養中に添加すると分散培養の効率が劇的に向上することにより、解決しました。遺伝子改変細胞の作成は、10cm 培養皿 1 枚程度で十分行うことが可能となりました。

(4) ヒト ES 細胞からヒト大脳皮質細胞を産生

これまでに、同研究グループは、マウス ES 細胞から大脳神経前駆細胞を効率的に産生する手法を開発しました (2005 年 2 月 7 日プレス発表: ES 細胞から大脳前駆細胞の分化誘導)。しかし、この方法は、細胞分散および浮遊培養 (細胞を培養皿の底に接着させず、培養液に浮遊させて培養する) のステップを含んでいたため、ヒト ES 細胞にこの手法をそのまま適用すると、強い細胞死を惹起し、細胞がほとんど全滅してしまうという問題がありました。

そこで、ROCK 阻害剤をこの培養系に添加したところ、ヒト ES 細胞は、分散および浮遊培養にも関わらず良く生存しました (図 4)。さらに神経分化を阻害する Wnt、Nodal、BMP という 3 つの細胞外シグナル因子を働かなくするために、それらの阻害剤を加えると、培養開始 35 日後には 9 割以上の細胞が神経系細胞となり、その 33% の細胞が大脳神経前駆細胞または大脳神経細胞に分化していることがわかりました (図 5)。こうして育った大脳細胞を詳細に解析した結果、それらの大部分は大脳のなかでも皮質の前駆細胞であることが判明しました。大脳には皮質以外に、その腹側に存在する基底核という運動制御中枢がありますが、培養の過程でソニックヘッジホグというタンパク質を添加すると、同様の分散・浮遊培養法でヒト ES 細胞から基底核の神経細胞も産生できることが判明しました。

3. 本研究成果の応用面での特徴

今回の研究は、困難であったヒト ES 細胞の培養を劇的に改善したことで、マウス ES 細胞並の操作を可能にする画期的な技術的ブレイクスルーをもたらします。

医学応用の観点からは、この技術は次のような重要な意義を持ちます。

- 1) ヒト ES 細胞の分散培養による大量培養を可能にする。
- 2) ヒト ES 細胞を単一細胞から増やし直すことで、均一な細胞品質管理を可能にする。
- 3) 上記の細胞品質管理は、腫瘍化や染色体異常などの再生医療での安全性を改善する。
- 4) ヒト ES 細胞を用いるハイスループットでの創薬や毒性スクリーニングを可能にする。
- 5) ヒト ES 細胞への遺伝子導入株の単離を容易にし、病因解明や創薬研究を加速する。
- 6) ヒト ES 細胞の取扱い全般を容易にし、再生医学以外にもより広い範囲の医学・薬学系研究者の開発研究への参加を促進する。
- 7) ヒト由来の脳皮質および基底核細胞を試験管の中で大量に産生することを可能にし、脳の神経変性疾患^{*4}の再生医療研究、病因研究や創薬開発を強力に推進する。

この ROCK 阻害剤を用いたヒト ES 細胞の維持培養および分化誘導法については、すでに理化学研究所から特許申請を出願済みです。

なお、ROCK 阻害剤 (Y-27632 や Fasudil など) はすでに血管拡張剤などとして臨床応用されており、ヒトに対して安全性の高い薬剤であることはすでに証明されています。ROCK 阻害剤を用いたヒト ES 細胞の培養が、再生医療応用に活用される場合についても、安全性の問題は少ないと考えられます。

4. 今後の展望

今回の研究では、ヒト ES 細胞を医学および関連産業に応用する際に立ちはだかっていた一つの大きな技術的障壁を解決することができました。今後の研究開発としては、主として4つの方向性が考えられます。1つ目は、何故ヒト ES 細胞でだけ (マウス ES 細胞ではなく) 細胞死が高頻度に起こるのかという疑問に答える基礎研究です。2つ目は、この新規の培養法を用いて、臨床応用に使えるより高い品質のヒト ES 細胞を大量に培養するプロセス技術開発です。3つ目は、マウス ES 細胞で開発済み (または開発中) の有用細胞 (視細胞など) 産生技術をヒト ES 細胞へ迅速に技術移転することです。4つ目は、今回産生が可能となったヒト由来の脳神経細胞を用いて、脳梗塞やハンチントン病への細胞治療法の開発や、アルツハイマー病などへの新薬の開発研究を支援することです。

理研発生・再生科学総合研究センターでは、様々なヒト ES 細胞の研究開発を行っており、それらの成果の社会還元を念頭に、開発技術の医学応用を促進する基盤

整備を開始しました。本年度からは、ヒト幹細胞研究支援室を設置し、国内の研究機関・開発機関（民間を含む）への技術面、管理面（生命倫理面を含む）での支援を行う体制作りを2年以内を目処に整備する予定です。

（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（ささい よしき）

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

神戸研究推進部 企画課

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 報道担当

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

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ES 細胞の培養と理研での研究

ES 細胞は着床前胚由来の未分化な幹細胞で、体のすべての種類の細胞に分化する能力（多能性）と自己複製能を特徴とする。多能性を保ったまま培養し増殖させることを特に「維持培養」と呼ぶ。ヒト ES 細胞では、多能性は培養過程で失われやすく、さらに細胞死が高率に起こるため、これまで維持培養が非効率的であり、また高い培養技術を要した。

なお、ヒト ES 細胞は文部科学省の指針に基づいて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たが、使用されないことになったもの）から作成された国産のものを使用した。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、高橋政代の4つの研究チームがヒト ES 細胞の使用計画の確認を文部科学大臣から受けており、3年前から盛んにヒト 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る。

※2 細胞死

細胞は、物理的なダメージや毒物などによる強い障害で死滅するだけでなく、増殖シグナルの欠如あるいは様々な刺激の結果、細胞の「自殺スイッチ」が入り細胞死を起こすことが知られている。このような細胞死は、プログラム細胞死またはアポトーシスと呼ばれる。ヒト ES 細胞の分散による細胞死は、細胞環境変化による特殊なアポトーシスと考えられる。

※3 Rho キナーゼ (ROCK) と ROCK 阻害剤 (Y-27632、Fasudil)

Rho キナーゼ (ROCK) は細胞質に存在し、細胞の形や運動など様々な制御を行う重要なリン酸化酵素で、京都大学医学部成宮教授や名古屋大学医学部貝淵教授によって90年代に発見された。Rhoなどいくつかの細胞内因子によって活性化される。ROCK 阻害剤 Y-27632 や Fasudil はそれぞれ日本の企業である三菱ウェルファーマ、旭化成で開発された。さらに、成宮教授らは ROCK の阻害が血管拡張を惹起することを発見し、その後日本を中心に医学応用が急速に展開した。ROCK 阻害剤は血管拡張剤などとして循環器・脳外科領域での臨床で既に利用されているほか、緑内障の治療薬として眼科領域でも臨床研究が行われている。

※4 神経変性疾患

多くは不明の原因 (一部、遺伝性) で起こる中枢神経系細胞の変性・脱落に起因する難病。中脳ドーパミン神経の変性で起こるパーキンソン病や小脳神経細胞等の変性による脊髄小脳変性症などが典型例。大脳の神経変性疾患としては、広範囲の大脳皮質細胞が変性するアルツハイマー病、大脳基底核の神経細胞の変性で起こるハンチントン病などが有名。変性した細胞の代わりに幹細胞由来の神経細胞を移植する再生医療の開発が盛んに試みられている。

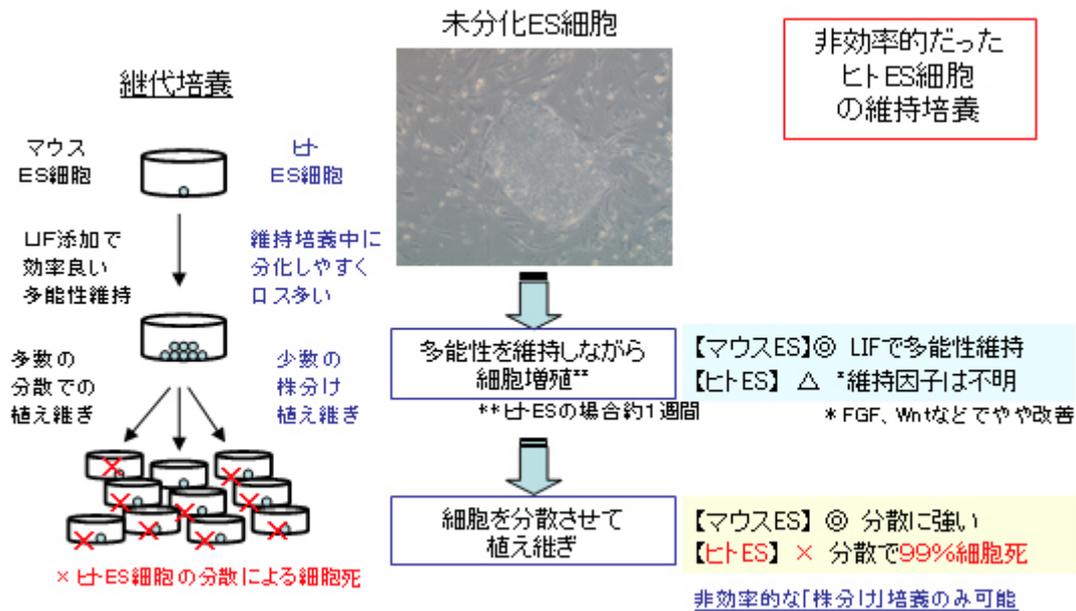


図1 従来問題であったヒトES細胞とマウスES細胞の培養面での違い

ヒトES細胞では、多能性の維持因子が不明であることに加えて、植え継ぎの際の細胞分散で99%が細胞死でロスする問題点がある。そのため、効率の良い分散培養 (1回の継代で20~30倍になる) を使えず、非効率的な株分け培養 (1回の継代で3倍程度) しかできず、大量培養が困難だった。

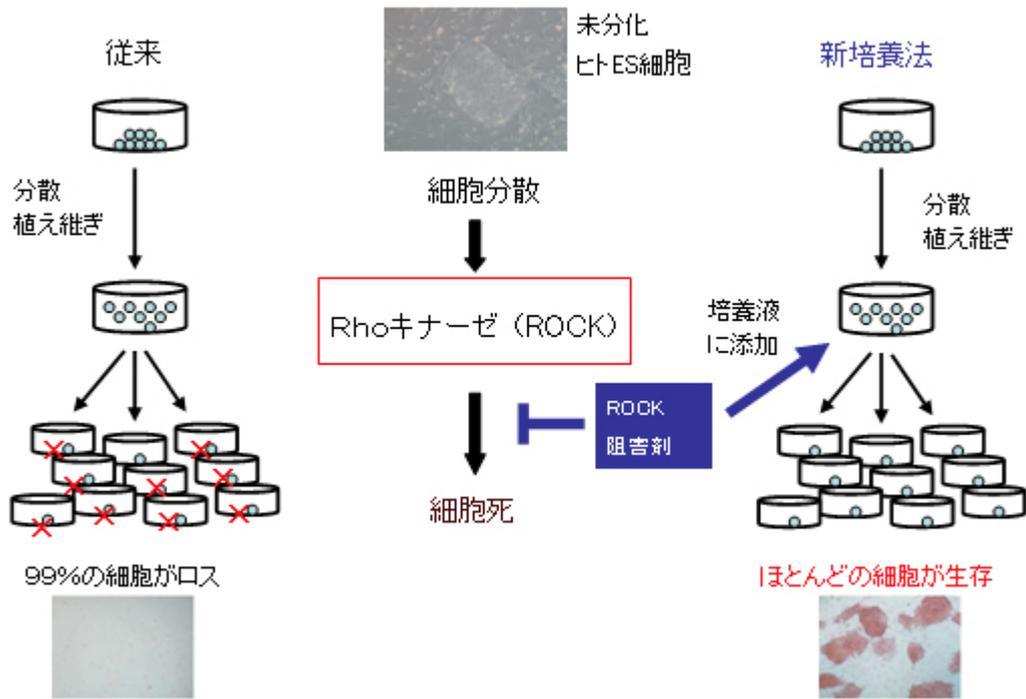


図2 分散したヒト ES 細胞の ROCK 阻害剤による劇的な生存促進

ROCK 阻害剤 (Y-27632 または Fasudil; 10 μ M) の培養液への添加により、細胞分散による細胞死はほとんど抑制され、多数の細胞コロニー (単一細胞から増殖した細胞塊) が生じる。1 回の植え継ぎで十数倍程度の細胞数に殖やすことが可能。

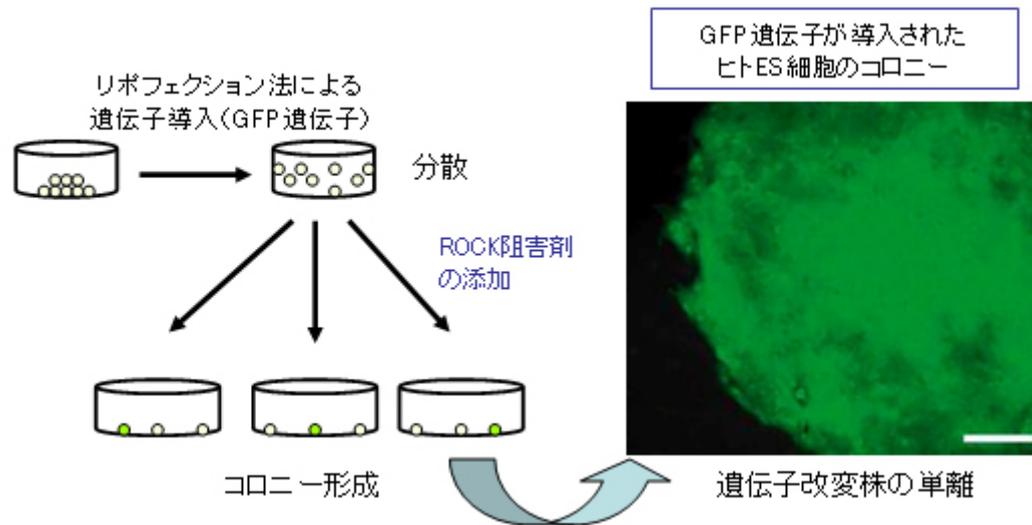


図3 ROCK 阻害剤によるヒト ES 細胞からの効率的な遺伝子改変株の単離

これまでヒト ES 細胞は分散培養で死ぬため、改変株を通常のコロニー形成法で単離できず、遺伝子改変細胞の同定が困難であった。ROCK 阻害剤の処理により、簡単に単一細胞から細胞コロニーを得ることができるため、容易に遺伝子導入した改変株の同定・単離が可能となった。

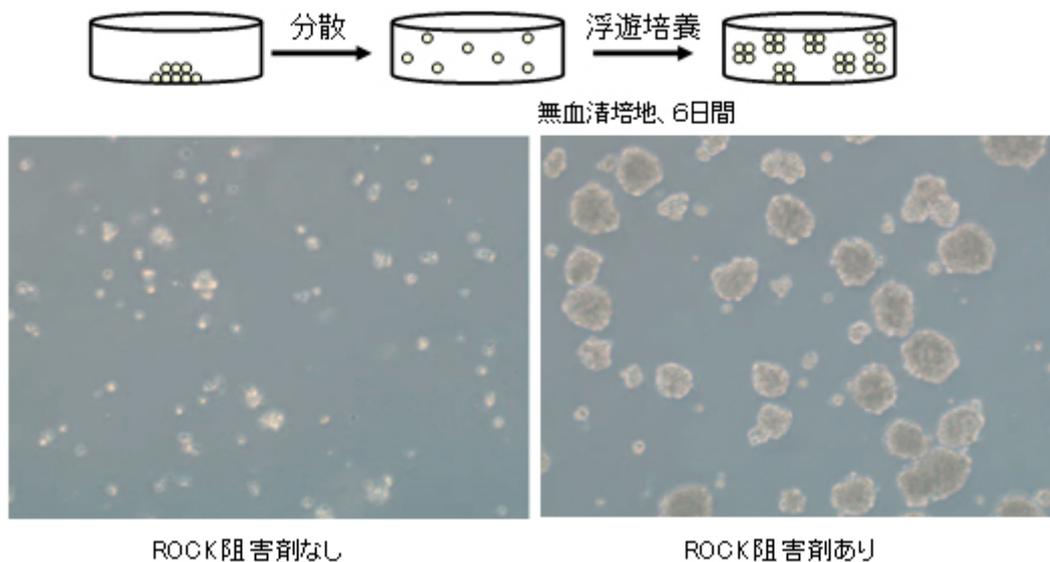


図4 ROCK阻害剤によるヒトES細胞の分散・浮遊培養

ヒトES細胞の分化を誘導するために、細胞をバラバラに分散し、無血清培地の中で浮遊培養（底面に接着させない培養法）を行うと、6日後にはほとんどの細胞が死滅する（左図）。しかし、分散処理および浮遊培養中にROCK阻害剤Y-27632（10 μM）を添加すると、このような厳しい培養条件でもヒトES細胞は盛んに増殖し、細胞塊を形成する（右図）。

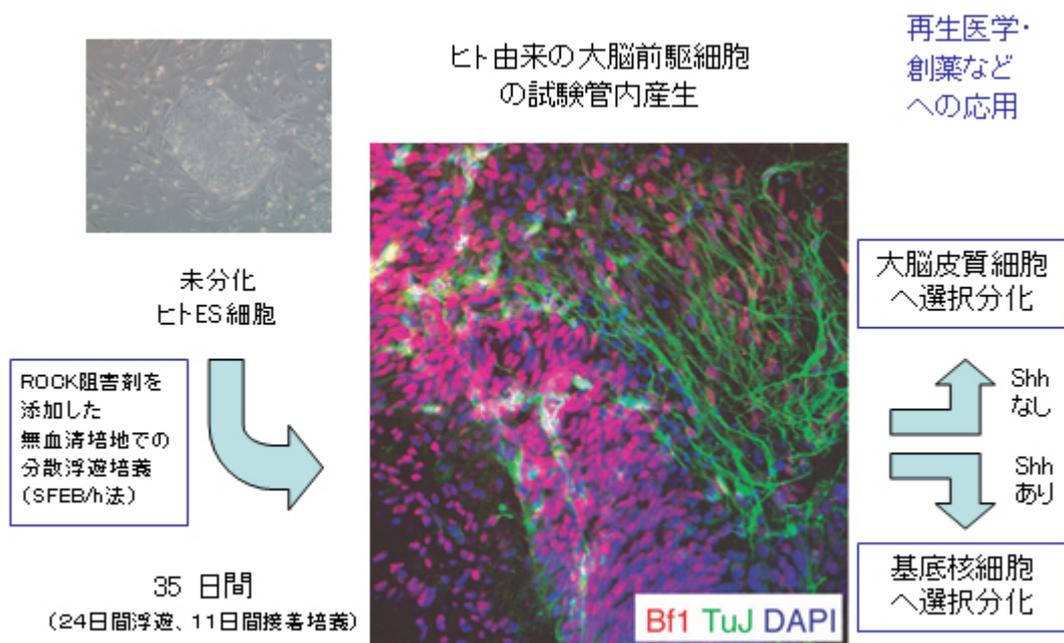


図5 ROCK阻害剤を応用したヒトES細胞からの脳細胞の産生

ヒトES細胞を分散し、無血清培地の中で24日間浮遊培養させたところ、未熟な神経前駆細胞に分化し、細胞塊が形成された。さらに11日間培養シャーレに接着させて培養したところ、3~4割の細胞が脳前駆細胞（Bf1 マーカー陽性）に分化した。培養液へのShh（ソニクヘッジホグ）の添加の有無で、大脳皮質細胞あるいは基底核細胞へ選択的に分化した。