

## 特別講演

主催 埼玉医科大学倫理委員会・企画 埼玉医科大学卒業教育委員会

平成18年2月6日 於 埼玉医科大学第一講堂

## ヒトES細胞株の樹立とその利用

末盛 博文

(京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター 霊長類胚性幹細胞研究領域助教授)

ES細胞(胚性幹細胞)は、胚発生初期の胚盤胞の内部細胞塊を培養して作られ、未分化状態を維持し多分化能を有することから万能細胞とも呼ばれる細胞である。ヒトES細胞株は1998年に初めて樹立され、ES細胞を必要な細胞や組織に分化させて医療に応用するという再生医療への研究が、世界各国で精力的に開始された。日本でも2002年からヒトES細胞を輸入して研究が開始されたが、それらの細胞株の多くは民間企業の所有物であり、研究成果の帰属や公表に制限がかけられていた。

そこで、京大再生研では、政府認可を受けて2003年に日本国内初のヒトES細胞株を樹立した。ヒトES細胞株の樹立に用いられる受精卵は、体外授精や顕微授精などの生殖補助医療のために作製された受精卵のうち、治療が成功し今後使用しないことが確定して廃棄されるいわゆる「余剰胚」を、提供者にES細胞研究についての十分な説明をして同意を得た上で提供を受けた。余剰胚は治療に用いられた状態の良い胚の残りであるということもあり、提供を受けた二十数個のうち胚盤胞にまで発生したのは3つだけであった。この3つの胚盤胞の内部細胞塊を取り出し、それぞれマウス胎児繊維芽細胞などから作製したフィーダー細胞上で培養した。ヒトES細胞は細胞が分化してしまったり死んでしまったりする傾向が強かったが、安定的に継代維持する培養法を確立し、増殖してくる未分化細胞を選別・継代を繰り返して、3つの胚盤胞すべてからES細胞株を樹立し、KhES-1,2,3と名付けた。

ヒトES細胞は、1つ1つバラバラにしてしまうとそこからの増殖が著しく阻害され分化するか死んでしまうため、常に数十個程度の細胞集団として扱わなければ安定した継代を行うことが困難であった。細胞の形状については、マウスES細胞と同様に、細胞質が核の大きさに比べて少なく核小体が明瞭に観察されたが、マウスES細胞はフィーダー細胞上で盛り上がったコロニーを形成し細胞間の境界もはっきりとしていない

のに対して、ヒトES細胞はフィーダー細胞の間隙部分で扁平なコロニーを形成し、コロニー内部の細胞では細胞間の境界線もはっきりと認められた。倍化時間は、マウスES細胞では12時間前後であるのに対し、ヒトES細胞では24-36時間程度であった。これらヒトES細胞は正常な染色体構成を保持し、多分化能を検討したところ、試験管内での神経や色素細胞などへの分化が確認された。また、免疫不全マウスに移植して奇形腫を作製する解析では、神経管様構造、軟骨、筋肉、消化管上皮など三胚葉性の細胞分化が認められた。このことから、これらのヒトES細胞株もマウスとほぼ同等の分化能を持っていると考えられた。マーカーの発現は、ヒトとマウス間でアルカリ性フォスファターゼやOct-3の発現は共通しているが、SSEA抗原は全く異なる発現様式を示していた。ヒトES細胞では、マウスと異なりLIFによる分化抑制現象が全くといってよいほど認められなかった。また、機械的・化学的刺激に非常に感受性が高く、通常マウスES細胞で行われるような遺伝子導入方法では細胞が分化あるいは死んでしまうことにより、遺伝子導入の効率が著しく低くなった。同様に、凍結保存した細胞を解凍した場合にも通常の方法では細胞の生存率が非常に悪く、細胞の保存や配布を困難なものにしている。京大グループは継代方法や遺伝子導入法、凍結保存の方法について改良を重ねており、これらの問題の多くが解決されるのもそう遠いことではないと期待される。

ヒトES細胞に最も期待されているのは、その高い増殖能と分化能を利用して様々な機能細胞を作製し、移植医療へ応用することである。必要とされる細胞種を効率よく分化誘導する方法や、必要な細胞種のみを分離する方法については世界中で精力的に開発が進められている。しかし、ES細胞を分化させた機能細胞を移植に用いるためにはいくつかの問題が指摘さ

れている。まず、未分化ES細胞は高い増殖性を持つので、移植の際に混入すると体内で増殖する危険性が指摘されているが、これを防止するために、遺伝子操作によって増殖性の高い細胞のみを薬剤で死滅させる方法が考えられている。次に、感染性因子の混入については、培養に用いられる動物由来成分が感染源として考えられるため、これらを用いない培養方法が世界中で開発中である。また、ES細胞は基本的に他者の細胞なので、免疫拒絶反応が起きる可能性が高いので、拒絶反応を回避する方法もいくつか考えられている。第一にES細胞の側からのアプローチとして、①多くのHLA型を網羅できるES細胞株バンクの作製や、②遺伝子操作により拒絶されにくいES細胞の作製があげられる。第二にオーダーメイド医療として、③患者の体細胞を用いてクローン胚を作成してES細胞株を樹立する方法や、④ES細胞の体細胞を未分化な状態に戻す能力を利用して、患者の体細胞をES細胞のような未分化な細胞に変換しようという方法が考えられている。いずれの方法にしても、技術的もしくは倫理的

な問題があり、今後の研究の進展とさらなる議論が必要である。

さらに、ヒトES細胞は移植医療の他に医薬品開発用の各種ヒト細胞を供給するためのソースとしても注目されている。現在、医薬品開発における候補物質のスクリーニングや薬物代謝、毒性等の解析研究に用いられるヒト細胞の多くは海外から購入されており、経済的にも倫理的にも問題が指摘されている。これらの問題を解消して安定的に細胞を供給するために、ヒトES細胞由来の各種細胞が利用できると期待されている。

京大グループによって樹立されたヒトES細胞株は、提供者から無償で提供された胚から樹立したものであり、公共の財産であるとの認識から、政府認可を受けた研究機関への分配は無償であり、研究成果に対しても樹立者による権利主張はない。今後は、日本国内でもヒトES細胞の医療応用研究が加速されると思われる。

(文責 三谷幸之介)