

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

Isolation of pluripotent adult stem cells  
discovered from tissues derived from all three germ layers

三胚葉由来組織に共通した  
万能性体性幹細胞の探索

申請者

Haruko	Obokata
小保方	晴子

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2010年 12月

体性幹細胞は、成体の体内に実際に存在し、生体の恒常性を保つため老化細胞の代替となる若い細胞を生み出し、炎症などの生体反応にตอบสนองして失われた細胞を補充する役割を担っていると考えられている。現在までに、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞は多種の分化可塑性を有する体性幹細胞として研究が進められている。また、前駆細胞との区別が難しいが、各種生体組織にはそれぞれの組織幹細胞が存在していると考えられており、多くは培養系においてその存在が認められている。間葉系幹細胞研究に代表されるように、体性幹細胞の研究は発生学的な観察に基づき展開されている。哺乳類の発生において三胚葉分化は決定的な過程であり、体性幹細胞の多くも三胚葉分化の後に存在が確認されることから、三胚葉分化が起こった後は、例えば外胚葉系組織に存在している幹細胞が中胚葉や内胚葉由来組織の細胞に分化する、中胚葉系に存在している細胞が外胚葉・内胚葉由来組織の細胞に分化すると言った、いわゆる胚葉を超えた分化は起こりえないと考えられている。しかし近年、分子生物学的解析手法の発展により間葉系幹細胞の一部は外胚葉系の細胞から構成されることや、間葉系幹細胞が生体内で神経形成に関与するなどといった、いわゆる胚葉を超えた分化が三胚葉形成の後にも起こっていることが報告されている。これらの報告により、体性幹細胞の起源や分化能の限界についての前提に疑問がもたれるようになってきている。

Vacantiらは2000年に、全身の生体の組織内には三胚葉由来によらず非常に強いストレスに耐性を有する spore-like stem cell が存在し体性幹細胞の補充に寄与している可能性を提唱してきた。その後、他の研究グループからも同様な概念に基づいた研究報告が相次いでいる。2002年には骨髄中に万能性幹細胞 MAPC が存在することが報告され、2004年には間葉系幹細胞の一部に分化万能性を有する MIAMI cell が存在することが報告され、2006年には造血幹細胞の小さいサイズの分画の中に VSELS cells が存在することが報告され、2010年には間葉系細胞の一部にストレス耐性の muse cells が存在することが報告されている。本研究では、spore-like stem cell の仮説を証明する第一歩として、全身の組織に共通の性質を持つ幹細胞が存在することを証明することを目標とし、幹細胞の採取、解析、再生医療研究応用への可能性を検討した。第一章では、生体組織由来の pluripotent stem cell に関する研究の動向を概説し、本研究の背景をまとめると共に、本研究の意義及び目的を明らかにした。

第二章では、spore-like stem cell の採取法を検討すると共に、幹細胞マーカーの発現を解析した。Spore-like stem cells は細胞直径が非常に小さいという特徴を有しているため、小さい細胞を採取する方法を施行した。まず、cell sorter を用いて Black6 マウスの骨髄細胞から、直径 6  $\mu\text{m}$  以下の細胞のみを回収した。続いて低浸透の溶液で細胞を短時間処理することによって、大きな細胞の細胞膜

を破壊し小さな細胞のみを回収した。また先端を 10  $\mu$ m ほどまで細めたガラスピペットで細胞を粉碎することによって小さい細胞を回収した。それぞれの方法で回収した細胞群を無血清培地で培養を行うと浸透圧処理または粉碎処理によって回収された細胞群から浮遊した球形のコロニー形成（以降 sphere と呼ぶ）が確認された。粉碎処理を行った場合、高頻度に sphere 形成が観察された。sphere 形成の数は年齢依存的であり、生後 4 週齢のマウスからは生後 8 週齢のマウスの約二倍の数が観察された。

Sphere 形成は幹細胞の強い自己複製増殖能の結果として現れる現象であると考えられているため、免疫染色により、幹細胞マーカーの発現解析を行った。まず間葉系幹細胞や造血幹細胞など広範な体性幹細胞に発現が報告されている c-kit と Sca-1 の発現を調べた結果、多くの sphere に発現が確認された。続いて ES 細胞や発生初期の受精卵に発現が観察される万能性幹細胞マーカーである SSEA-1 と E-cadherin の発現を調べた結果、これらも多くの sphere に発現が確認されることが明らかとなった。

タンパク質レベルでの万能性幹細胞マーカーの発現が確認されたことから、遺伝子レベルでの万能性幹細胞マーカーの発現を ES 細胞の遺伝子発現と比較して検討を行った。特に、タンパク質レベルでのマーカーの発現強度は個々の sphere によって異なっていたため、個々の sphere は異なる遺伝子発現パターンを示すのではないかという予想の下、sphere 一つ一つを顕微鏡下で採取し遺伝子発現の解析を行った。その結果、Oct4, Nanog, Sox2, Ecat1, Cripto, Esg1 など万能性幹細胞に特異的に発現が見られる遺伝子マーカーが高頻度に発現していることが分かった。

第三章では、これらの細胞の分化能を *in vitro*, *in vivo* の双方で調査した。ES 細胞から三胚葉由来の細胞へ分化させるための培養条件を参考に、培養条件を設定し分化誘導実験を行った。その結果、sphere 由来の細胞は神経・筋肉・肝実質細胞などの代表的な三胚葉由来組織細胞へ分化できることが確認された。生体内での分化能と増殖能を検討するために移植実験を行った。Sphere の細胞は PGA 上に播種され、2-3 日 PGA (poliglycolic acid) 上に細胞を接着させるために培養した後、NOD/SCID マウスの皮下に移植した。4-6 週間後に移植片を採取し、組織学的、免疫組織化学的に解析を行った。移植後直径 3 mm ほどのカプセル化した塊を形成した。内部には上皮、神経、筋肉、管といった三胚葉由来すべての組織形成が確認された。以上の結果から、粉碎処理後に sphere を形成する細胞は、無血清条件下で培養すると、非常に幼弱なタンパク質・遺伝子を発現し、培養系、生体内双方において三胚葉系由来組織への分化能を有することが示された。

第四章では同様の細胞群がその他の組織にも存在しているかを確認するため三胚葉由来組織の代表的な組織である脊髄（外胚葉）、筋肉（中胚葉）、肺（内胚葉）

から細胞を単離し、粉碎処理後、無血清培養条件下で浮遊培養を行った。タンパク質マーカーの発現は骨髄で行ったときと同様に c-kit, Sca-1, SSEA-1, E-cadherin 陽性の細胞が確認された。遺伝子発現解析の結果、骨髄のときと同様、ES 細胞に特異的な遺伝子の発現が多数確認された。特に肺由来の sphere からは高頻度に Oct4 陽性の sphere 細胞塊が確認された。一方、脊髄からは多くの sphere 形成が確認されるが、Oct4 などの ES 細胞特異的な遺伝子マーカーを発現した sphere の割合は骨髄由来の sphere と比較して低い値を示した。培養系での分化誘導実験を行うと、骨髄のときと同様に、各特異的なマーカーで陽性を示す三胚葉由来組織の細胞へと分化した。さらに PGA に播種し NOD/SCID マウスの皮下に移植すると、骨髄のときと同様に上皮、神経、筋肉、軟骨、腺といった三胚葉系の組織へと分化した。以上のことから、骨髄中から発見された広範な分化能を有する細胞群は、脊髄、筋肉、肺といったすべての三胚葉由来組織からも単離され得ることが確認された。

第五章では、幹細胞の万能性を証明するための最も重要な証明方法であるキメラマウスの作成を幼弱神経幹細胞培養条件である bFGF, LIF 依存浮遊培養系によって培養した sphere を用いて試みた。ICR マウスの受精卵と sphere を用いた凝集法によってキメラ卵を作成し、24 時間培養した後、子宮に移植した。20 日後に産まれた新生児の毛皮には sphere 由来の毛が観察されなかった。また産まれてきた新生児の数は移植した受精卵の数よりも少なかった。キメラの胎生致死、もしくは特定の組織への貢献、もしくは低頻度での貢献の可能性が考えられたため、胎生 12.5 日目の胎児の解析を行った。その結果全身に sphere 由来の細胞が散在していることが確認された。このことから、sphere 由来の細胞は全身の組織形成に寄与できる能力を有していることが明らかとなった。

第六章では本研究の総括と展望について述べた。本研究ではこれまでの常識を超えた体性幹細胞の起源と分化可能性についての新しい学説をもとに、体性幹細胞の創生の可能性を探る実験を試みた。本研究で得られた幹細胞が実際に生体内に存在するかどうかは、これから明確にすべき大きな課題である。しかしながら培養法をさらに効率化することによって大量培養を可能とし、組織工学をはじめとする再生医療研究の新たな細胞ソースとして期待できる。また、これまで iPS 細胞を始めとした万能性幹細胞の創生の研究が盛んに行われているが、再生医療研究に必要なのは安全に機能する体性幹細胞であり、万能性幹細胞からの体性幹細胞の分化誘導は難しい。そこで本研究の第四章で検討したような体性幹細胞を体細胞から創出する試みが成功すれば細胞生物学的にも発生学的にも非常にインパクトのある研究成果となり、再生医療応用に最も適した細胞ソースを提供できるようになるものと期待される。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 小保方 晴子 印

(2010年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
報文	<p>(1) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Subcutaneous transplantation of autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", Journal of Biomedical Materials Research: A 86:1088-96. 2007</p> <p>(2) <u>Haruko Obokata</u>, Koji Kojima, Masayuki Yamato, Satoshi Tsuneda, Charles A. Vacanti, "The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers." Tissue Eng Part A. 2010 in press.</p> <p>(3) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Time-course analyses of reconstructed ultrastructure change in oral mucosal epithelium cell sheet after subcutaneous transplantation" submitted to Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.</p> <p>(4) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Protocol for reproducible subcutaneous transplantation of cell sheets" submitted to Nature Protocols.</p> <p>(5) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "The effectiveness of inflammatory cytokines for regeneration of transplanted cultured keratinocyte cells" submitted to Journal of Investigative Dermatology</p> <p>(6) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Hyperacute inflammation analyses after subcutaneous transplantation of human fibroblast cell sheets into Lewis rats." submitted to Xenotransplantation.</p>
講演（海外）	<p>(1) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Subcutaneous transplantation of autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", Society for Biomaterials 2007 Annual Meeting, Chicago, IL, April 17-21, 2007.</p> <p>(2) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Time-course observation of subcutaneously transplanted autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes", The 13th World Congress of International Society for Artificial Organs, IFAO-JSAO Annual Meeting, Osaka, Japan, Jun 28-31, 2007</p> <p>(3) <u>Haruko Obokata</u>, Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, "Inflammatory analyses of subcutaneously-transplanted human epithelial cell sheets", Termis-AP, Tokyo, Japan, December 3-5, 2007</p>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演（国内）	(4) Koji Kojima, Shohta Kodama, <u>Haruko Obokata</u> , Ana C Paz, Charles A. Vacanti. “Generation of Pneumospheres from Pulmonary Stem Cells.” Termis-NA, San Diego, December 7-10, 2008,
	(5) <u>Haruko Obokata</u> , Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, “Subcutaneous Transplantation of Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets Fabricated on Temperature-Responsive Culture Dishes”, TERMIS-WC, Seoul, Korea, August 31- September 3, 2009
	(6) <u>Haruko Obokata</u> , Masayuki Yamato, Kohji Nishida, Satoshi Tsuneda, and Teruo Okano, “Inflammation Analyses after Subcutaneous Transplantation of Cell Sheets for a Novel Tissue Engineering Method”, TERMIS-WC, Seoul, Korea, August 31- September 3, 2009
	(7) Koji Kojima, <u>Haruko Obokata</u> , Ana C Paz and Charles A. Vacanti. “Generation of Pneumospheres from Pulmonary Stem Cells.” TERMIS-WC, Seoul, Korea, August 31-September 3,2009
	(8) <u>Haruko Obokata</u> , Koji Kojima, Masayuki Yamato, Teruhiko Wakayama, Teruo Okano, Satoshi Tsuneda and Charles A. Vacanti, “ The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers. ” TERMIS-NA, Orlando, December 5-9 2010
	(9) Koji Kojima, <u>Haruko Obokata</u> , Jason Ross and Charles A. Vacanti. “Autologous Tissue Engineered Trachea with Epithelial Cell Sheets in Ovine Model.” TERMIS-NA, Orlando, December 5-9 2010
	(10) 小保方晴子、大和雅之、西田幸二、常田聡、岡野光夫、「温度応答性培養皿で作製した口腔粘膜上皮細胞シートの皮下移植」、第6回日本再生医療学会総会、横浜、2007年3月14日
	(11) 小保方晴子、大和雅之、西田幸二、常田聡、岡野光夫、「温度応答性培養皿で作製した口腔粘膜上皮細胞シートの皮下移植」、第7回日本再生医療学会総会、名古屋、2008年3月14日
	(12) 小保方晴子、大和雅之、西田幸二、常田聡、岡野光夫、「細胞シート皮下移植後の急性期炎症反応解析」、第29回炎症・再生学会、東京、2008年7月8日-10日
	(13) 小保方晴子、大和雅之、西田幸二、常田聡、岡野光夫、「ヒト上皮細胞シート皮下移植後の経時的炎症反応解析」、第9回日本再生医療学会総会、広島、2010年3月17日
	(14) 小保方晴子、小島宏司、大和雅之、若山照彦、常田聡、岡野光夫、Charles A. Vacanti, 「三胚葉由来組織に共通した成体幹細胞の探索」第10回日本再生医療学会総会、東京、2011年3月1日-2日

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
国際特許	<u>Haruko Obokata</u> , Charles A. Vacanti. Sub Population of Retained Embryonic Like Cells （成体の中に存在する幼弱な表現系を有し、3胚葉系の細胞に分化することのできる幹細胞集団）
著書・著作物	大和雅之、 <u>小保方晴子</u> 「成長因子」バイオマテリアルの基礎、日本バイオマテリアル学会、印刷中