

図40 -b 臍帯血AC133⁺細胞から血管内皮細胞への分化過程における
KDR発現の経時的変化

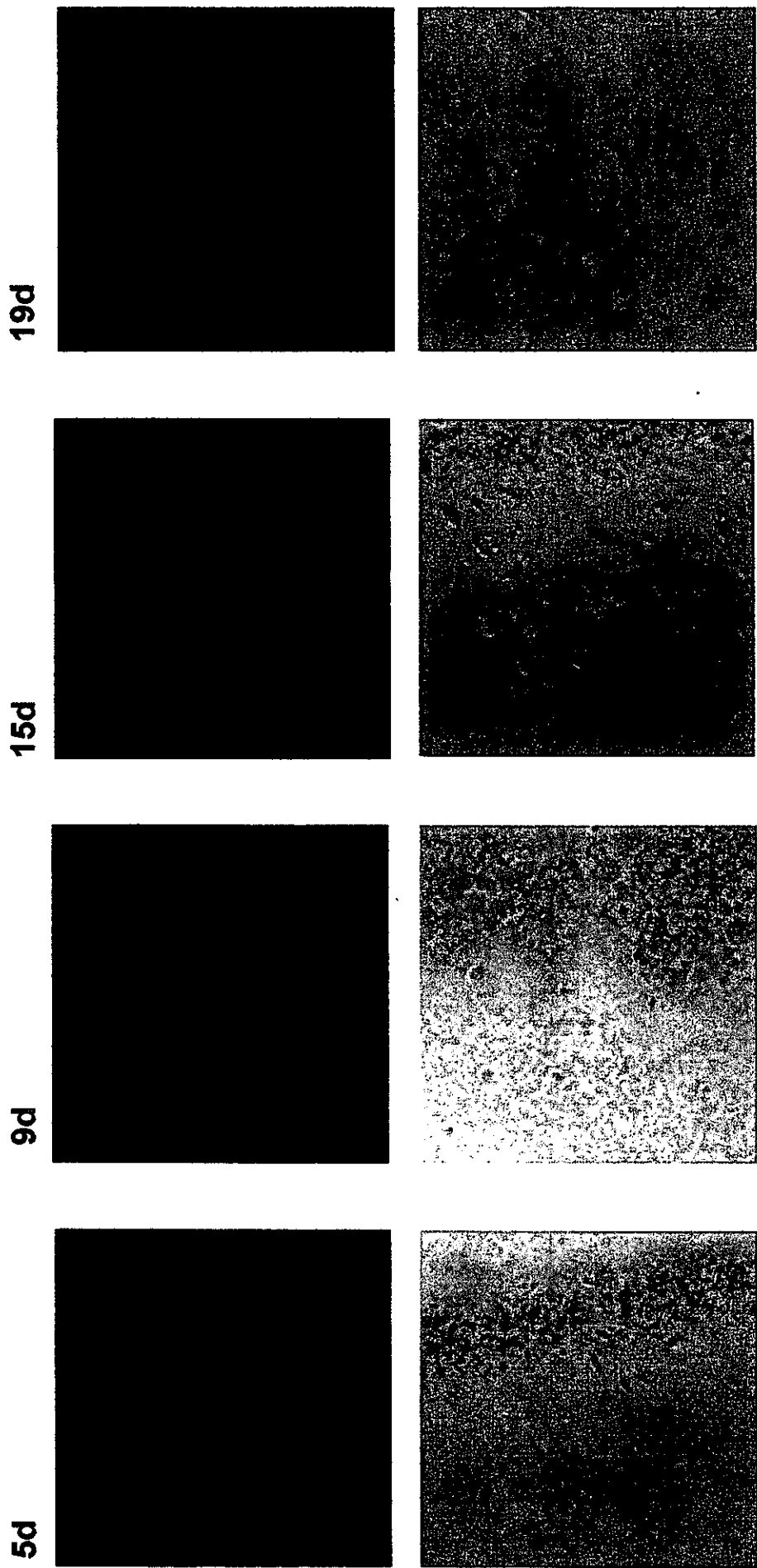
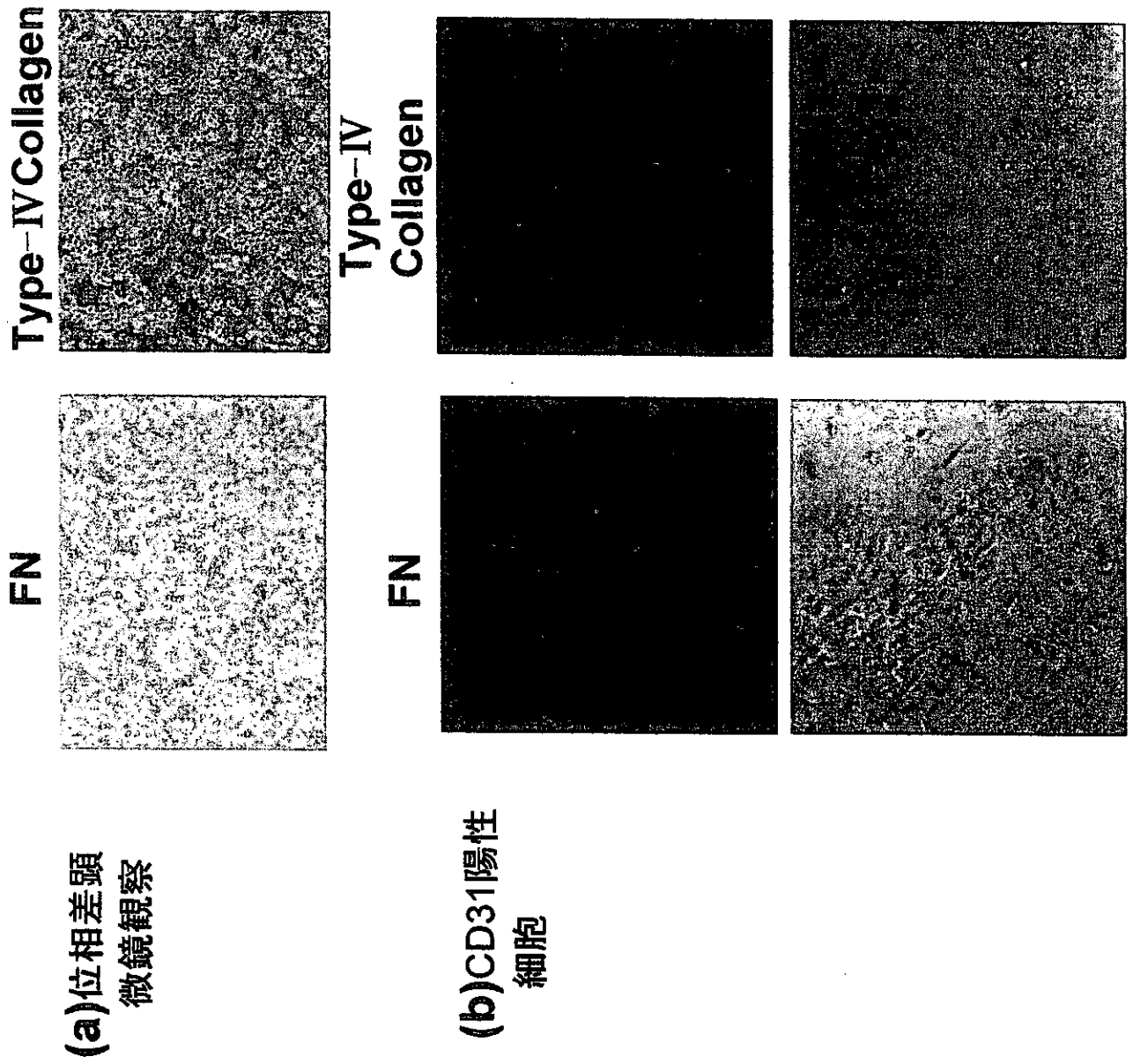
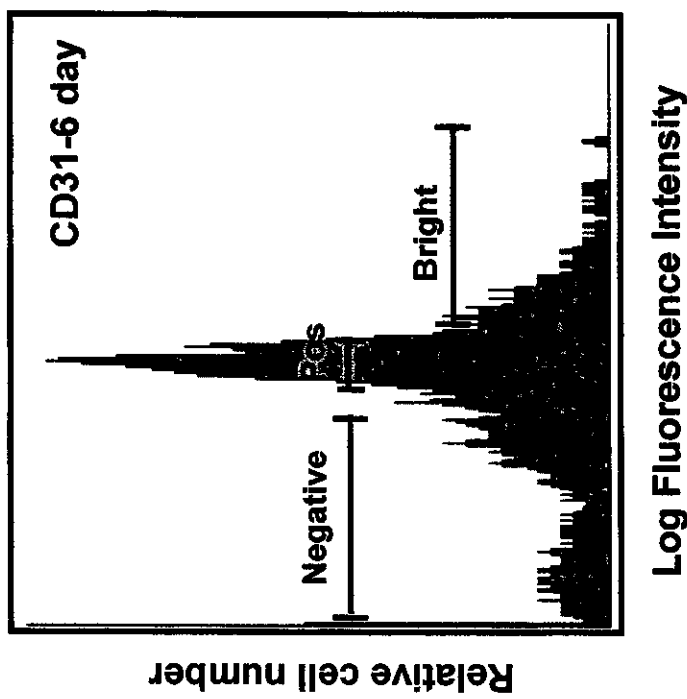
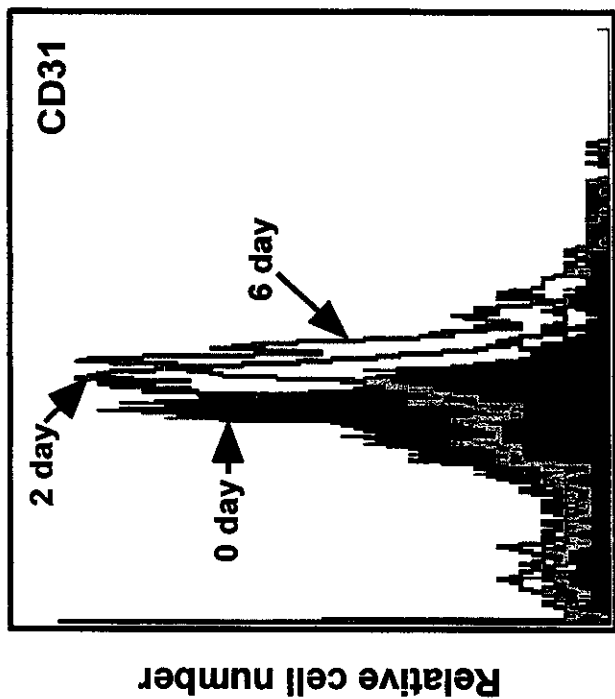


図41. ヒト末梢血AC133陽性細胞をFN及びType-IVコラーゲン上で培養した時のCD31陽性細胞の誘導



(b)



(a)

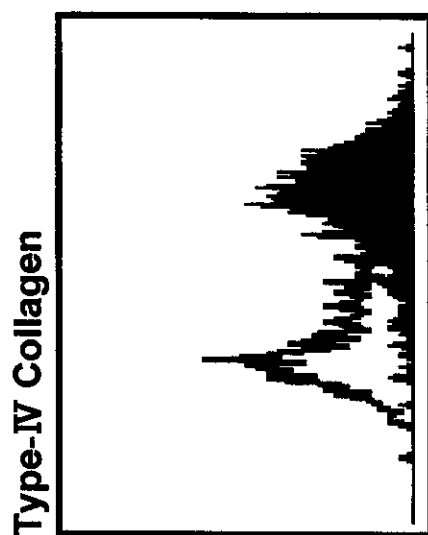


図42. ヒト末梢血AC133陽性細胞をFN及びType-IVコラーゲン上で培養した時のCD31陽性細胞の誘導

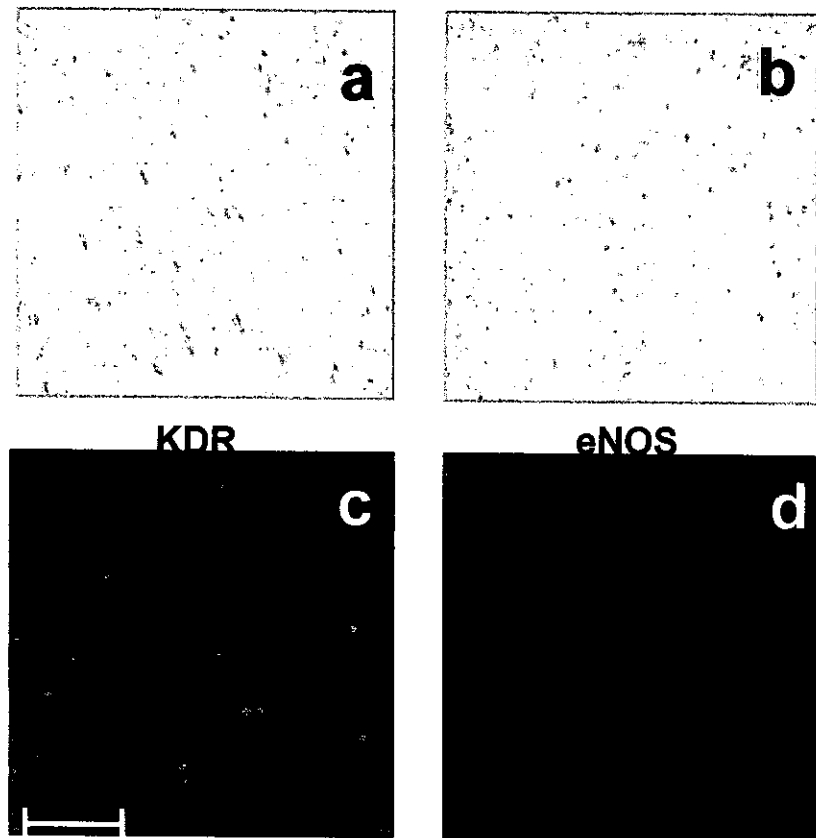
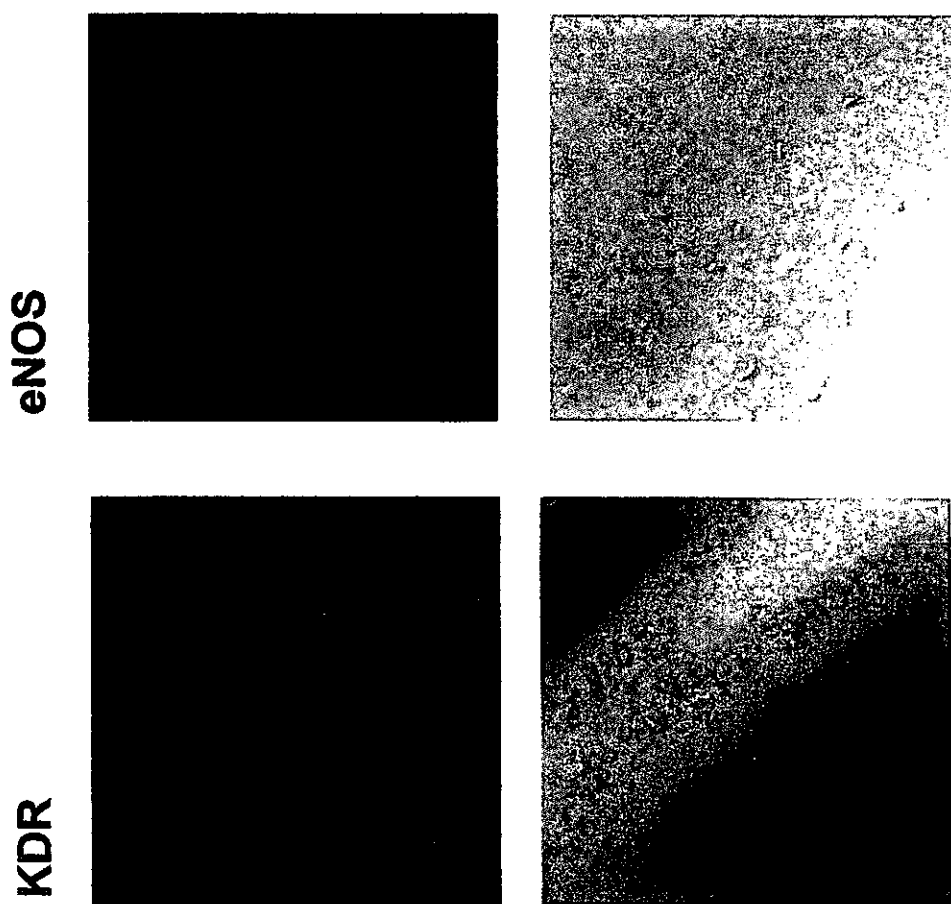


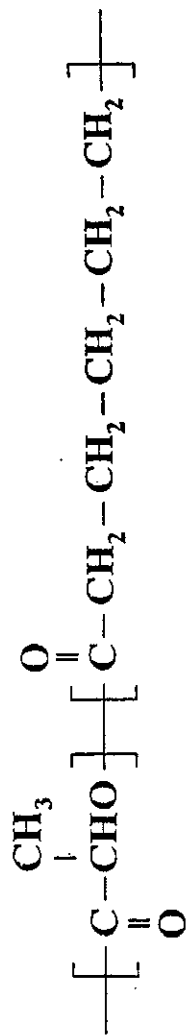
図43. ヒトAC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞の血管内皮細胞への分化能

AC133陽性細胞を6日間培養した後、CD31強陽性細胞(a)及び陽性細胞(b)をソーティングし、VEGF存在下さらに1週間培養した。接着細胞が観察されたCD31強陽性細胞について、KDR(c)及びeNOS(d)の発現を調べた。

図44 臍帯血AC133⁺細胞由来CD31強陽性細胞の
分画・培養後におけるKDR、eNOS発現



L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体



乳酸
(LA)

ε-カプロラクトン
(CL)

重量比

LA : CL = 75 : 25

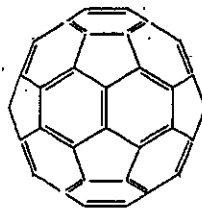
P(LA-CL)₂₅ 10000

LA : CL = 50 : 50

P(LA-CL)₅₀ 18000

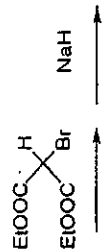
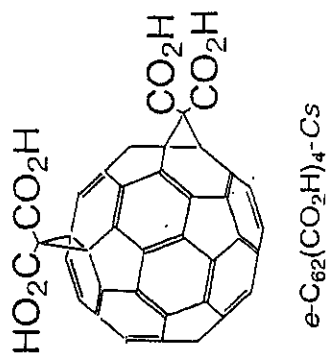
フラーレン

C₆₀



水溶性フラーレン

C₆₀DMA



Synthesis of C₆₀DMA

図45 試験物質の化学構造

P(LA-CL)₂₅ 10000 (60 μ g/ml)

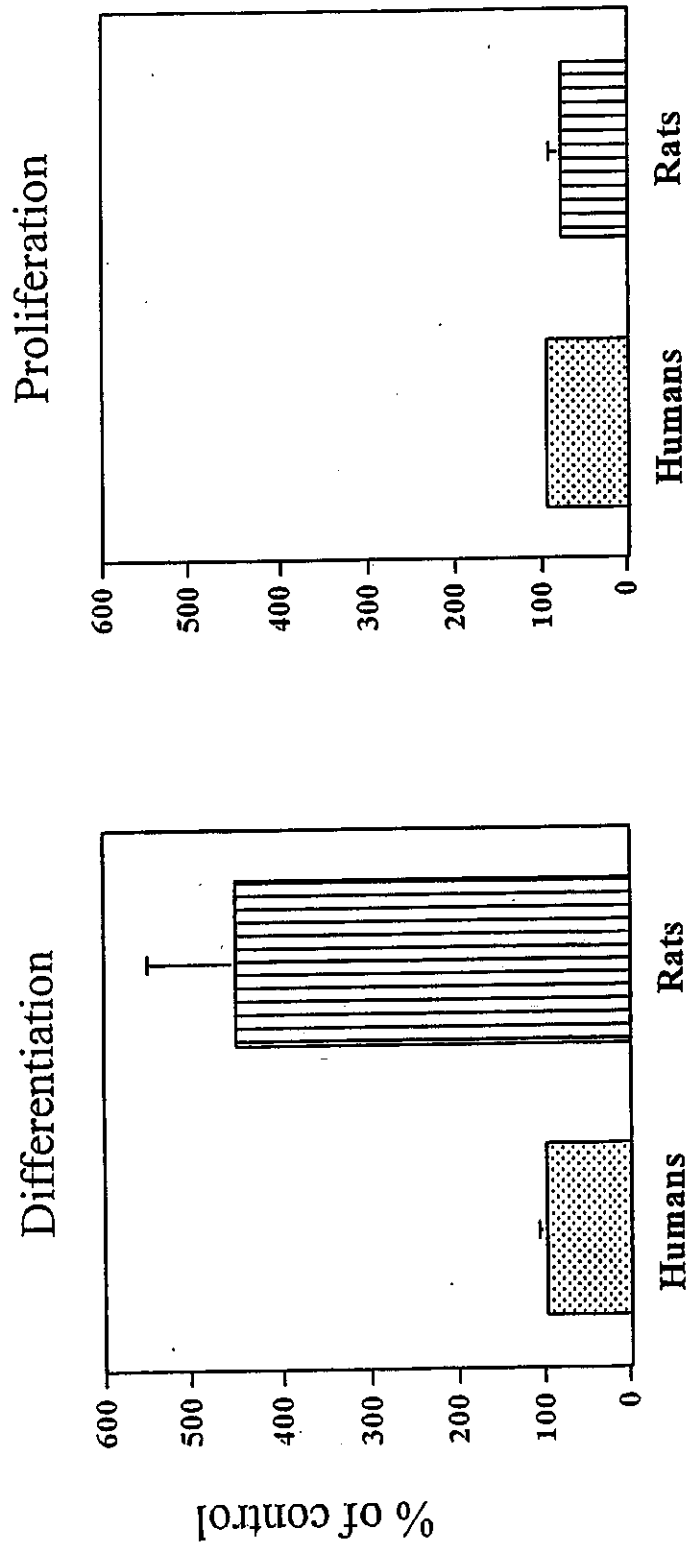


図46 ヒト細胞およびラット細胞での P(LA-CL)₂₅ 10000 の軟骨分化に及ぼす影響

P(LA-CL)₅₀ 18000 (60 μ g/ml)

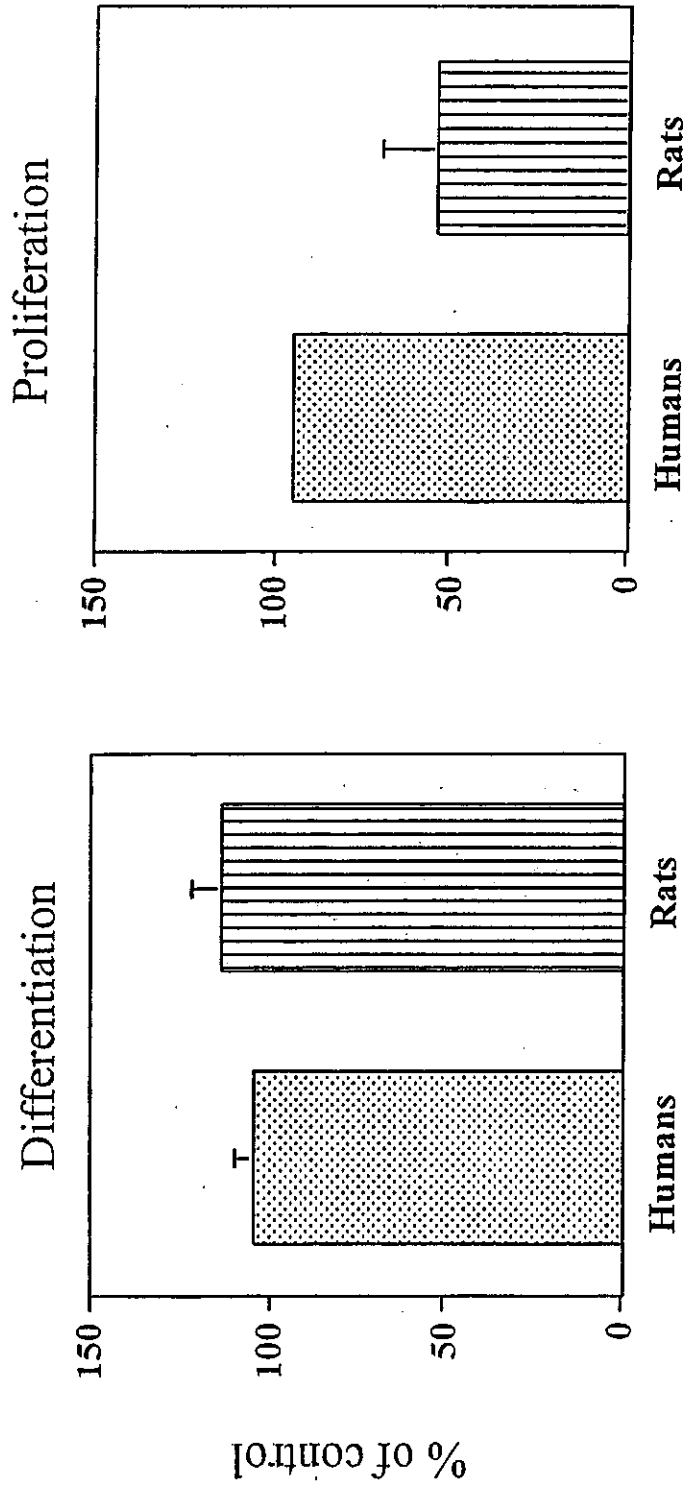


図47 ヒト細胞およびラット細胞での P(LA-CL)₅₀ 18000 の軟骨分化に及ぼす影響

C₆₀ DMA (60μg/ml)

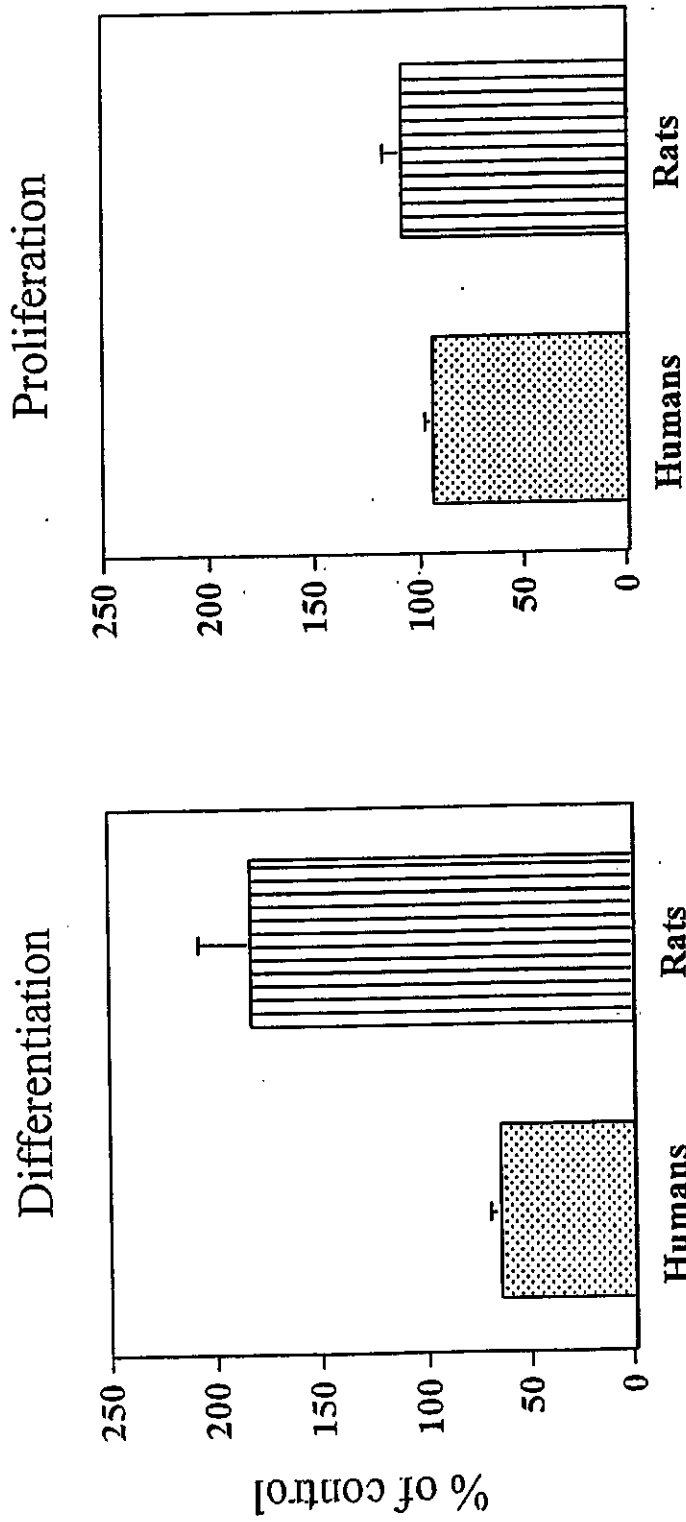
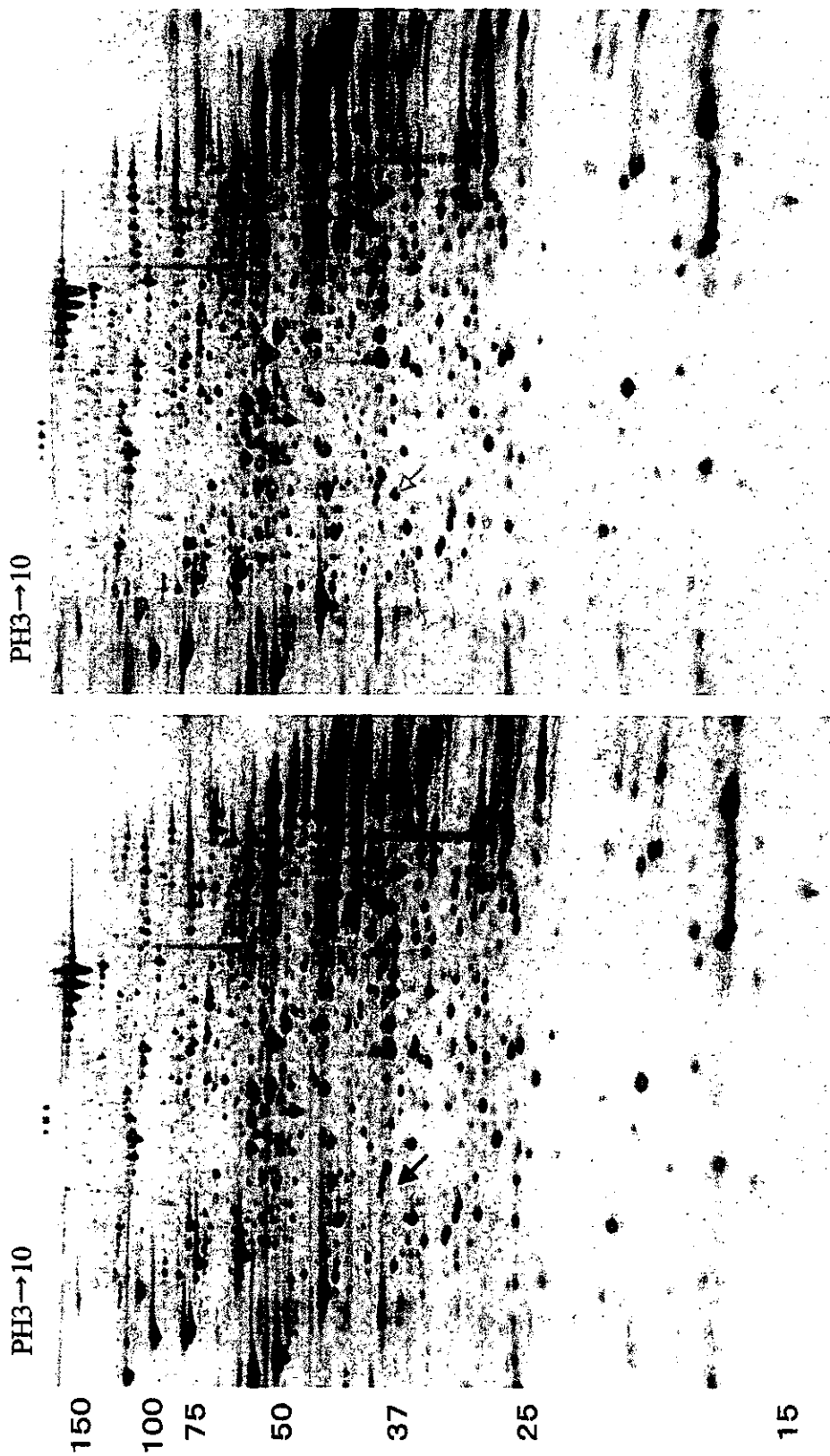


図48 ヒト細胞軟骨分化およびラット細胞増殖へのC₆₀DMAの影響

表9 ヒト種の物質の軟骨分化に及ぼす種差
ヒト種のおよびラット細胞間での種差

Chondrogenesis

	Humans	Rats	
P(LA-CL) ₂₅ 10000	→	↑↑	↑↑ : Strong stimulation
P(LA-CL) ₅₀ 18000	→	→	↑ : stimulation
			↑ : no effect
C ₆₀ DMA	↓	↑	↓ : inhibition



成熟肝細胞

小型肝細胞

図49 成熟肝細胞と小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動像

▲ 35 kDa タンパク質の位置

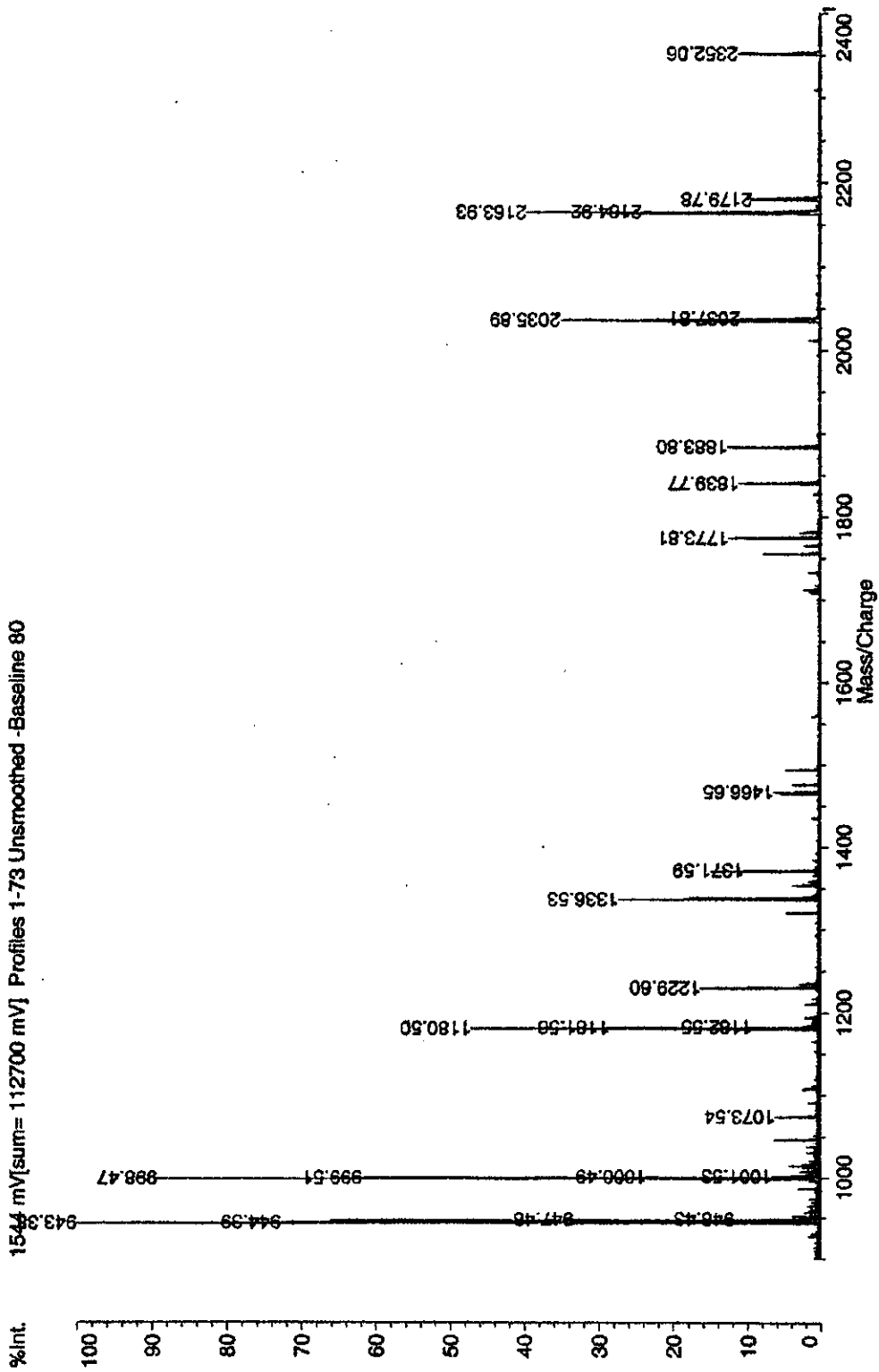
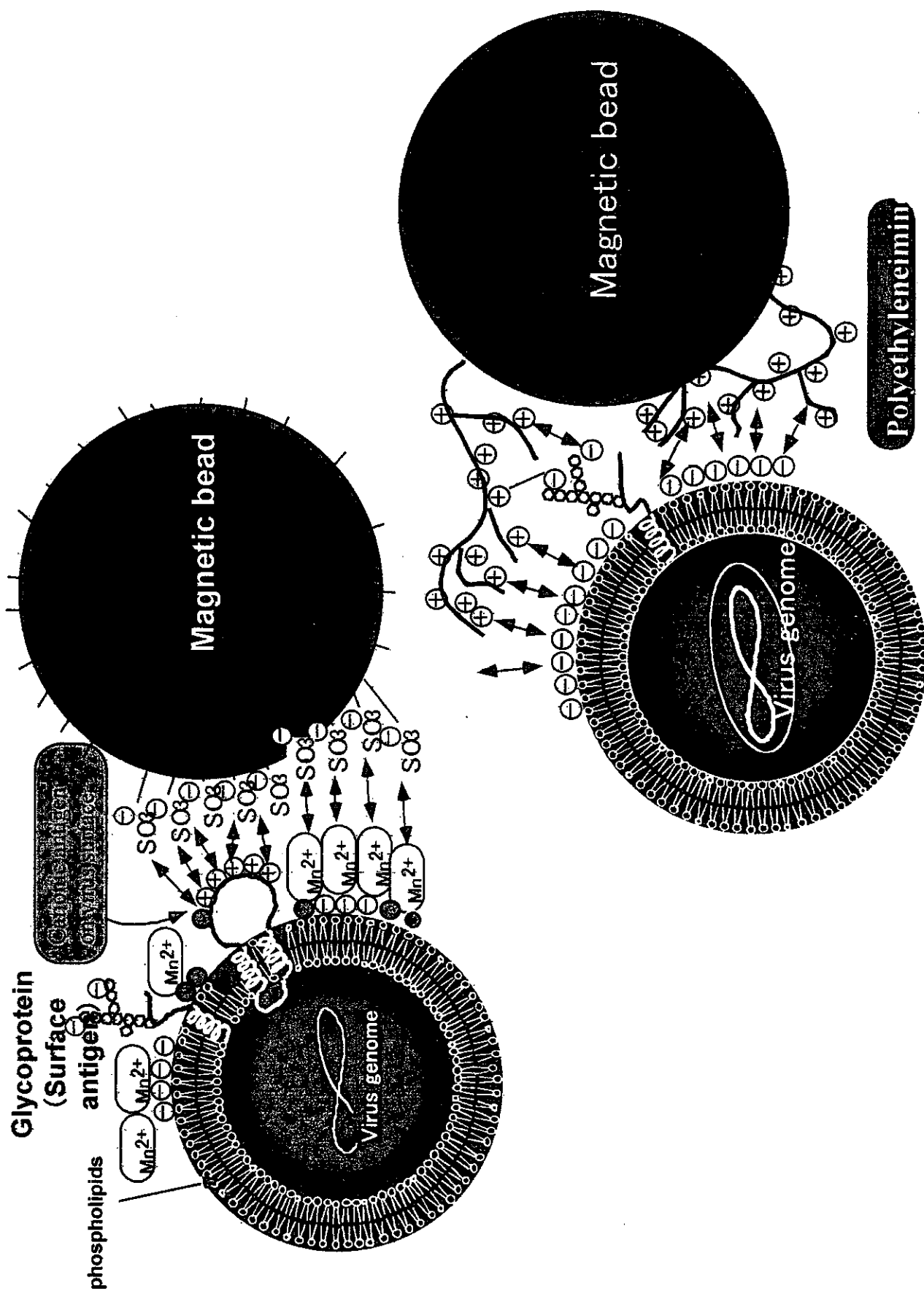


図50 小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動で特異的な発現が観察された
35kDaタンパク質のトリプシンによるゲル内消化物の質量スペクトル

表 10. 小型肝細胞二次元電気泳動で特異的な発現が観察された 35kDa 蛋白質のトリプシン消化ペプチドの質量分析結果と推定されたペプチド配列

<i>m/z</i> observed	<i>m/z</i> expected	<i>m/z</i> calculated	assigned amino acid residues		assigned peptide sequence
			Start	End	
943.38	942.37	942.44	212	218	LTFDEYR
946.47	945.46	945.50	250	258	NTPFLAGR
1073.54	1072.53	1072.58	281	289	SEIDLLDIR
1180.50	1179.49	1179.55	265	275	GAGTDEFTLNR
1229.60	1228.59	1228.68	281	290	SEIDLLDIRR
1336.53	1335.52	1335.63	128	138	EISQAYYTAYK
1370.59	1369.58	1369.65	60	70	QYQEAYEQALK
1464.66	1463.65	1463.73	128	139	EISQAYYTAYKK
1711.77	1710.76	1710.78	140	154	NLRDDISSETSGDFR
1754.90	1753.89	1753.94	231	246	GELSGHFEDLLAVVR
1882.79	1881.78	1881.91	191	205	WGTDEDKFTTEILCLR
2034.84	2033.83	2033.98	11	29	GTINNYPGFNPSVDAEAIR

図51. ポリエチレンジイミン磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズのウイルス濃縮機構



厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

細胞・組織加工医療用具の品質評価技術に関する研究
分担研究者 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所療用品部長

細胞・組織加工医療用具の品質評価技術に関する基盤研究として、以下の4課題に取り組んだ。

(1) ウイルス等の感染性危険因子を排除するための研究では、コラーゲンハニカムや生分解性ポリマーを用いてバイオ皮膚モデルを作製し、それらを用いてHIV汚染時のウイルス検出法を検討した。これらのヒト皮膚モデルは、感染細胞の動態及びHIV-1の検出に応用できることがわかった。生分解性ポリマーは、ハニカムよりもHIV-1抗原量が多く、ポリマーの種類によりHIV-1感染細胞OM10.1の増殖に影響することが明らかになった。

(2) 細胞・組織のがん化を予測する評価技術開発では、テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子(h TERT)プロモーターの活性化のガン細胞特異性を評価した。その結果、正常細胞においてはhTERTプロモーターの活性化は全く観察されなかったが、テロメア活性の観察される複数のガン細胞においてhTERTプロモーターの活性化が観察された。

(3) 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究では、モデル免疫隔離膜を作製し、その物理的性能を評価した。胎児肢芽器官を袋状PP膜に入れて物理的刺激下で培養した時の形態保持能は、袋状膜を使用しなかった時と比較して優れていた。次に、袋状PP膜の免疫隔離能を評価するために、肢芽器官を袋状膜内に納め、ラット腹腔内に埋入した。異系ラットや異種マウスの肢芽器官を埋入するとCD8陽性細胞が増加する傾向がみられた。しかし、袋状PP膜の外面を修飾ポリウレタンでコートするとCD8陽性細胞は対照群と同レベル程度であった。更に、PP膜では原型をとどめなかった肢芽器官は、修飾ポリウレタン被覆PP膜では、原型に近い形態を示した。

(4) 前駆細胞を素材とする細胞・組織加工医療用具の製造過程における品質・安全確保技術については、代表的な生分解性ポリマーであるε-カプロラクトンとL-乳酸共重合体であるP(LA-CL)₂₅ 10000とP(LA-CL)₅₀ 18000、水溶性フラーレンであるC₆₀DMAの3種の物質について、ヒト細胞およびラット細胞を用いて、軟骨分化に及ぼす影響を調べた結果、ヒト及びラット細胞間では、細胞分化や増殖能に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。組織工学利用医療用具の評価を行う上で、動物モデルからヒト臨床使用するとき、分化・増殖機能が両種間で異なる可能性を考慮する必要がある。

A. 研究目的

1. ウイルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術に関する研究
ウイルス感染は組織加工医療用具をヒト臨床に使用する場合に最も危

惧される因子の一つである。細胞とハイブリッド化した医療用具の開発が目覚ましいが、これらの組織工学利用医療用具製品のウイルス安全性については、まだ、研究が十分にされてお

らず、標準的プロトコールがない。バイオ皮膚モデルを作製し、それらを用いて HIV 汚染時のウイルス検出法を検討する事を目的とした。

2. 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

細胞・組織加工医療用具等の適用時における細胞のがん化は、安全性評価上の最大の関心事であり、多角的な検討が必要である。細胞のがん化を予測する評価法としては、従来、軟寒天コロニー法や、ヌードマウスでの造腫瘍性で判定されている。しかし、ヌードマウスを用いる方法は、高度な技術が必要とし、また、動物を使用するために動物愛護の観点はもとより、コストや判定までの時間がかかるなどの欠点がある。一方、ヌードマウスで腫瘍化する細胞すべてが、軟寒天でコロニーを形成するとは限らないので、本法をすべての場合について、ヌードマウス法の代替として使用することはできない。

80%を越えるがん組織にテロメラーゼ活性が検出され、がん診断への新たなマーカーとして注目されていることから、テロメラーゼ活性との関係が細胞・組織のがん化を予測する新たな指標となり得る可能性がある。既存の評価指標等との相関性を検討することによって、それ自体独立した指標として、あるいは他の指標との組み合わせで、相補的な指標として有用であることを明らかにすれば、細胞・組織加工医療用具等のがん化を迅速かつ高感度に予測することが可能となり、極めて有意義である。

今年度は、複数のがん細胞において、テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 (hTERT) プロモーター活性化の

がん特異性を評価することを目的とした。

3. 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究

細胞・組織加工医療用具を生体に適用する際に、引き起こされる免疫原性の評価系を確立するために、袋状膜を作製し、物理的刺激からの保護作用を明らかにする事を第一の目的とした。次に、免疫隔離膜作用を明らかにするために、同系間、異系間、異種間の生体内移植を行った際に移植された器官の正常性と、レシピエント側の免疫機能は、拒絶の方向へ傾くか否かについて確認する事を第二の目的とした。

4. 幹細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究

細胞・組織加工医療用具の前臨床評価試験として、細胞を組み込んだ生分解性ポリマーからなる足場について、動物をモデルとして評価が行われる。ヒトと動物では、解剖学的組織構造の違いから、細胞・組織加工医療用具の *in vivo* 評価が異なる可能性がある。ヒト細胞、ラット細胞を用いて生分解性材料等に付着した細胞の軟骨分化の程度に両種間でどのような結果が得られるのか明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルス等の感染性危険因子を排除するための基盤技術に関する研究

ヒト皮膚モデルは、ヒト正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)を動物由来のコラーゲンスポンジおよびコラーゲンハ

ニカム（固形）または合成生分解性ポリエステルからなる4種類の低分子量ポリマー（液性）とそれぞれ混合培養し作製した。ヒト皮膚モデルにHIV-1感染細胞OM10.1及びHTLV-1感染細胞MT4を接種し、ウイルス感染細胞混入時の細胞動態の観察およびHIV-1抗原検出を行った。

2. 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

テロメラーゼは、タンパク質とRNAの複合体（リボヌクレオタンパク質）で、ヒトの場合、テロメア繰り返し配列の相補鎖に相当するCAAUCCCAAUCを含む鋳型RNAを持っている。テロメラーゼは、テロメアDNAの末端と相補的に結合した後、逆転写によりGGTTAGを合成付加し、テロメアDNAが伸長する。ヒトゲノムライブラリーより、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT)cDNAをプローブとし、hTERT遺伝子の5'領域の取得を行う。塩基配列解析後、欠失変異体を作製し、がん細胞特異的プロモーター領域の同定を行う。がん細胞としては、A549細胞（ヒト肺癌上皮由来）は、5%FCS含有ERDF培地を用いて培養した。HeLa（ヒト子宮頸癌由来）、HepG2（ヒト肝癌由来）、SK-MEL-28（ヒト黒色腫由来）およびTIG-1（正常繊維芽細胞）は、5%FBS含有MEM培地を用いて培養した。トランスフェクション操作は、LipofectAMINE PLUS Reagentの製品プロトコールに従った。ルシフェラーゼアッセイに用いる細胞を、 1×10^5 cells/wellの細胞密度で、24wellプレート上に準備した。次の日、昨年報告したhTERTプロモーター-ルシフェラーゼコンストラクトおよびpRL-SV40を無血清ERDF培地で希

釈し、PLUS-Reagentを加え、最終容量が25 μ lになるように無血清ERDF培地を加えた。次に、このDNA-PLUS Reagent混合溶液を室温で15分間、インキュベートした。また、このとき使用したpRL-SV40は、ウミシイタケルシフェラーゼをSV40プロモーター制御下に組み込んだベクターであり、各wellにおけるトランスフェクション効率を標準化するための内部対照用のベクターとして用いた。次に、LipofectAMINEを無血清ERDF培地で希釈し、上述のDNA-PLUS Reagent混合溶液に等容量加え、室温で15分間インキュベートした。この間に、細胞の培養培地を血清を含まない新鮮なERDF培地と交換し、DNA-PLUS-LipofectAMINE混合溶液を50 μ lを各wellへ添加した。3時間にわたり、細胞を37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。3時間後DNA-PLUS-LipofectAMINE混合溶液を除き、5%FBS含有ERDF培地を各wellへ添加した。トランスフェクション3日後に、ルシフェラーゼアッセイを行った。上記のトランスフェクション操作は、A549細胞において実施したものである。HeLa細胞、HepG2細胞SK-MEL-28細胞およびTIG-1細胞に関しては、トランスフェクション培地に変更して実施した。

細胞抽出液の調製およびルシフェラーゼ遺伝子発現量の測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay Systemに従って実施した。細胞を充分量のPBS(-)で洗浄後、余分なPBSを完全に除去し、Passive Lysis Bufferを各wellへ加え、プレートを室温で15-30分間振とうし、得られた細胞抽出液をエッペンドルフチューブへ移した。ガラス製のカルチャーチ

ューブに LARII を分注した。細胞抽出液を LARII に加え、激しく混合し、ガラスチューブをルミノメーターにセットし、ホテルルシフェラーゼ活性の発光量を測定した。引きつづき同サンプルに対し、1xStop & GloRegent を加え、激しく混合し、同様の方法にてウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。hTERT プロモーターの活性値は、ホテルルシフェラーゼ測定値をウミシイタケルシフェラーゼ測定値で除した値をそのプロモーターの比活性とし、平均値および標準偏差値を算出して評価した。

3. 細胞等による望ましくない免疫反応の検出技術開発に関する研究
PP 膜を袋状とし、その端を熱で閉じて成形した。この袋内に、Wistar-imamichi ラット胎児の胎齢 14 日および 15 日から肢芽器官を切り出し、袋内に入れた群と直接 F12-10%FCS 培地に入れて動的条件下で培養した。次に、F344 ラットの腹腔内に、同系ラットの肢芽器官を袋状 pp 膜内にいれたものを埋入し、1 週間飼育した。1 週間後、袋内の肢芽器官を取り出し、アルシアンブルー染色した。異系ラットや、異種マウスを F344 ラットの腹腔内に埋入するときは、陰イオン性修飾ポリウレタンで袋の外側を被覆コートした PP 膜も使用した。血中リンパ球サブセット (CD4/CD8) について、FACS で解析し、レシピエントの免疫応答を調べた。

4. 細胞や前駆細胞等を素材とした細胞・組織加工医療用具等の製造過程における品質・安全性確保技術や製品の評価方法に関する研究

Wisitar-imamichi ラットの胎齢 13 日胎児の四肢を切り出し、肢芽細胞を

調製した。細胞を高密度にスポット状に well 内に播種し、2 時間後、F12-10%FCS 培地を加えた。翌日、試験物質を培地に加えて、更に 6 日間培養した。合計 1 週間培養後、培地を捨て、Alamar blue による細胞増殖度測定、Alcian blue 染色後、染色された proteoglycan をグアニジン溶液で溶出し、600nm の吸光度を測定した。ヒト細胞は、関節軟骨細胞をラットと同様、高密度にスポット状に well 内に播種し、2 時間後、市販のヒト軟骨培地を加えた。試験物質試験群では、試験物質を培地に溶かしてくわえた。ヒト細胞の場合は、4 週間培養した。培養終了後、ラット細胞と同様に Alamar blue による細胞増殖度測定、Alcian blue 染色による軟骨のプロテオグリカン量を 600nm での吸光度で測定し、コントロール群を 100% として試験物質の影響を評価した。

試験物質としては、L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体で乳酸と ε-カプロラクトンの配合比が 75:25 で分子量が 10000 の P(LA-CL)₂₅ 10000 と乳酸と ε-カプロラクトンの配合比が 50:50 で分子量が 18000 の P(LA-CL)₅₀ 18000 および水溶性フラレンである C₆₀DMA を使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト細胞 (市販品) については、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について、倫理委員会の審査・承認を得た。

C. 研究結果

1. ウイルス等の感染性危険因子を排

除するための基盤技術に関する研究
コラーゲンスポンジCLS-01にヒト皮膚
繊維芽細胞 (NHDF) を吸着させ6
日間培養したが、CLS-01では、NHDF
は増殖せず Alamar blue 染色での
値は、6日間殆ど変化せず、ブランク
(培養のみ)と同値を示し、皮膚モデル
を作製出来なかった。これに対して
コラーゲンスポンジのハニカムでは
図1に見られるようにNHDFは6日間
0.3以上の増殖能が観察され皮膚モ
デルを作製することができた。

MT-4によるハニカムを用いた皮膚
モデルへの接種実験：まず HIV 非感染
細胞コントロールとしてMT-4を用いて
ハニカムと NHDF で作成した皮膚モデル
への接種実験を行い、皮膚モデル内
に異種細胞が混入した時の影響を調
べるために、NHDF 及び MT-4 の増殖能
について Alamar blue 染色を行い検討
した。図1に示すように1日目、3日
目、6日目の3回サンプリングを行っ
た。3日目まではNHDF 及び MT-4 は増
殖傾向であったが、それ以降 MT-4 は
急速に死滅し、6日目にはMT-4 を接種
したものは未接種よりも増殖能が低
下した。NHDF なしでハニカムに直接
MT-4 を接種した場合も3日目以降増
殖能が低下した。

OM10.1によるハニカムを用いた皮膚
モデルへの接種実験：ハニカムと
NHDF の皮膚モデルに HIV-1 感染細胞
OM10.1 を接種し、HIV-1 感染細胞混入
時の細胞の増殖能及び HIV-1p24 抗原
の検出を行った。図2に示すように増
殖能は MT-4 の場合と同様に3日目以
降急に低下し、6日目にはOM10.1 未接
種よりも低下した。ハニカム+OM10.1
も3日目以降増殖能は低下した。図3
はその時の HIV-1p24 抗原の結果を示
した。カットオフインデックス

(C.O.I.) は1.0以上が陽性、1.0未
満が陰性である。NHDF のみではC.O.I
が0.5以下で陰性を示した。OM10.1の
み及びハニカムにOM10.1を接種した
場合は6日目もC.O.I.が2.5以上で上
昇傾向であった。しかし、皮膚モデル
にOM10.1を接種した場合は3日目以
降 HIV-1p24 抗原量が低下し陰性とな
った。

生分解性ポリマ.での細胞毒性試験：4種類
の生分解性ポリマ.を用いて皮膚モデル
を作成する前に各ポリマ.のNHDF
に対する細胞毒性試験を行った。今
回の生分解性ポリマ.は、ハニカムと
は異なり液性であるため、96ウェル
に 10^4 個のNHDFを播き6mg、 $6\mu\text{g}/\text{ml}$
の濃度のポリマ.を添加し7日間培
養した。ポリマ.は $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下
では細胞毒性を示さなかったため、
以下の実験は $600\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の
ポリマ.とNHDFを混合培養したものを
皮膚モデルとして行った。

生分解性ポリマ.を用いた皮膚モ
デルでのNHDFの増殖性：図4に示
すように4種類のポリマ.とNHDFを
各々混合培養した。NHDFの増殖は
2日でプラト.に達するため、培養期
間は2日間とした。各ポリマ.は未接
種のNHDF単独よりも増殖性は少し
低下したが、2日目にはO.D.0.3以
上でポリマ.の対照溶媒であるDMSO
と同等の増殖能を示した。

生分解性ポリマ.による皮膚モデル
へのMT-4接種実験：ポリマ.とNHDF
の皮膚モデルにMT-4を接種した場合
図5に示すように3種類のポリマ.
はポリマ.未添加のNHDFとMT-4よ
りも多少増殖能が低くなったが、
ポリマ. $3(\text{P}(\text{LA}-\text{CL})_{25} 10000)$ のみは
2日目にはポリマ.未接種以上のO.D.
値を示した。

生分解性ポリマ.による皮膚モデルへの OM10.1 接種実験:4 種類のポリマ.による皮膚モデルに HIV-1 感染細胞 OM10.1 を接種し増殖性及び HIV-1 抗原について検討した。図 6 は増殖性について示したものであるが、4 種類のポリマ.による差は認められなかった。しかし図 7 に示すように 4 種類のポリマ.の HIV-1p24 抗原量は差があった。全てのポリマ.は OM10.1 単独よりも C.O.I.は低かったが、分子量 1 万のポリマ.3 (P(LA-CL)₂₅ 10000)は 2 日目には NHDF+OM10.1 と同等の C.O.I. 10 以上を示した。次に分子量 1 万 8 千のポリマ.4 (P(LA-CL)₅₀ 18000)とポリマ.の対照溶媒である DMSO が C.O.I.8 以上を示し、分子量 1 万未満の小さなポリマ.1 (PGA 3000)と 2 (PLLA 5000)は C.O.I.6 で HIV-1 抗原量が他のポリマ.に比べ少なかった。

2. 細胞・組織のがん化を予測する評価技術の開発に関する研究

ヒトでは、テロメラーゼ活性は、細胞分裂している生殖原細胞(精母細胞、卵母細胞)にあるが、精子、卵子ではいったん消退し、受精後細胞が増殖するとともに、再び活性が上昇し、その後、発生分化とともに活性が次第に低下する。テロメラーゼの制御が働いている最中の芽細胞から小児がんの多くは発生してくる(図 8)。

檜山らは、100 例あまりの神経芽細胞腫について、テロメラーゼ活性を測定し、94%で活性を検出した。活性レベルは、自然退縮を含む予後良好群は、活性が低く、予後不良群は高活性である。明らかにテロメラーゼが再活性化されたと思われる腫瘍は、様々な不可逆的な遺伝子異常をとともなう脱分化

の現象がある。この場合、分化傾向を認めない悪性度の高い腫瘍となる。

ヒトテロメラーゼの構成成分は、逆転写酵素 hTERT と鋳型 RNA からなり、in vivo では、テロメラーゼ付属蛋白質(hTEP1)も複合体に加わり、テロメラーゼホロ酵素を形成する。テロメア結合蛋白 hTRF1 は、テロメラーゼによるテロメア伸長の負の制御を行う。TRF2 は、テロメアの保護作用を行う。

hTERT mRNA の発現量およびプロモーター活性とテロメラーゼ活性はほぼ相関し、テロメラーゼ陰性の細胞では、一般に発現していない。hTERT mRNA の発現量が主にテロメラーゼ活性を規定していると考えられる(図 9)。

昨年度は、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT)プロモーターのがん化リスク評価系の確立に関する研究を行った。ヒトゲノムライブラリーより、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT) cDNA をプローブとし、hTERT 遺伝子の 5'領域の取得を行ない、塩基配列解析後、欠失変異体を作製し、がん細胞特異的プロモーター領域の同定を行なった。がん細胞としてはヒト肺がん細胞株(A549 細胞)を、正常細胞としてはヒト正常線維芽細胞(TIG-1 細胞)を用い、hTERT プロモーターのがん特異性の評価を、ルシフェラーゼ法により行なった。

今年度は、hTERT プロモータールシフェラーゼコンストラクトおよび pRL-SV40 を、LipofectAminePLUS-reagent を加えて、各種がん細胞にトランスフェクションした。この時使用した pRL-SV40 は、ウミシイタケルシフェラーゼを