

図64. AC133陽性細胞及びCD34陽性細胞由来接着細胞のvon Willebrand因子の発現

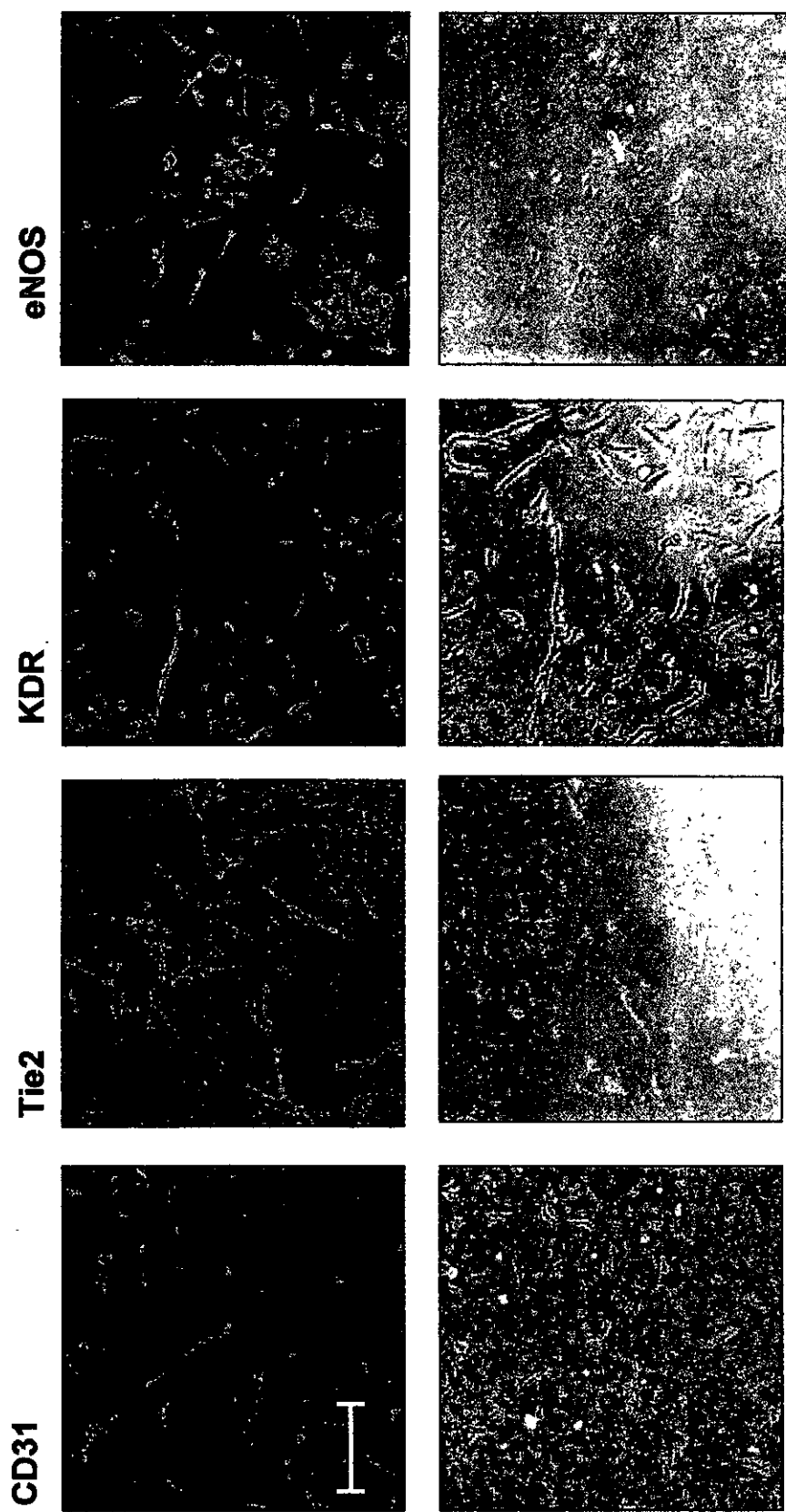


図65. AC133陽性細胞由来接着細胞の血管内皮指標の発現

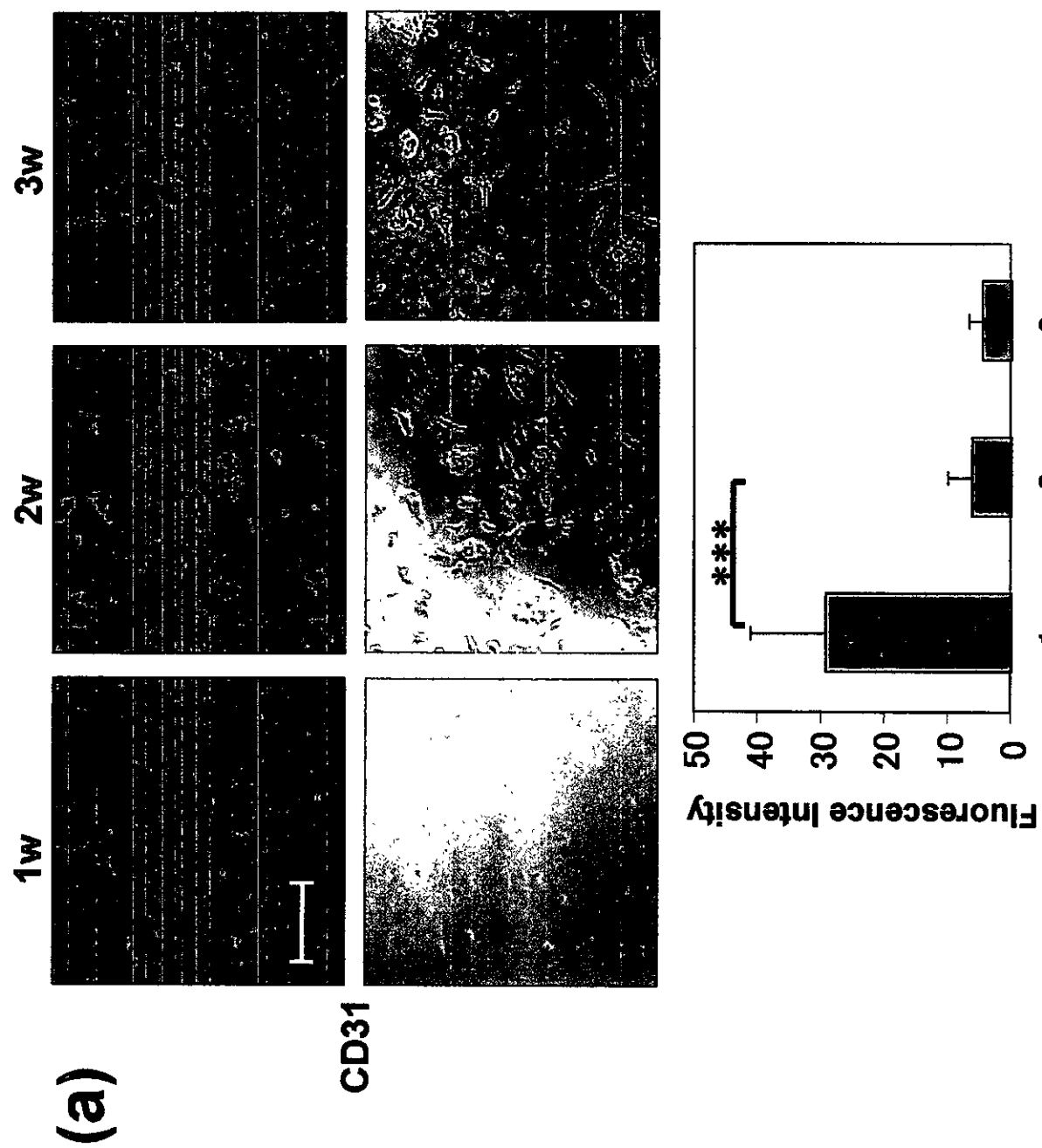


図66. AC133陽性細胞由来接着細胞のCD31発現の経時的変化

図67. 末梢血AC133陽性細胞におけるKDR発現の経時的変化

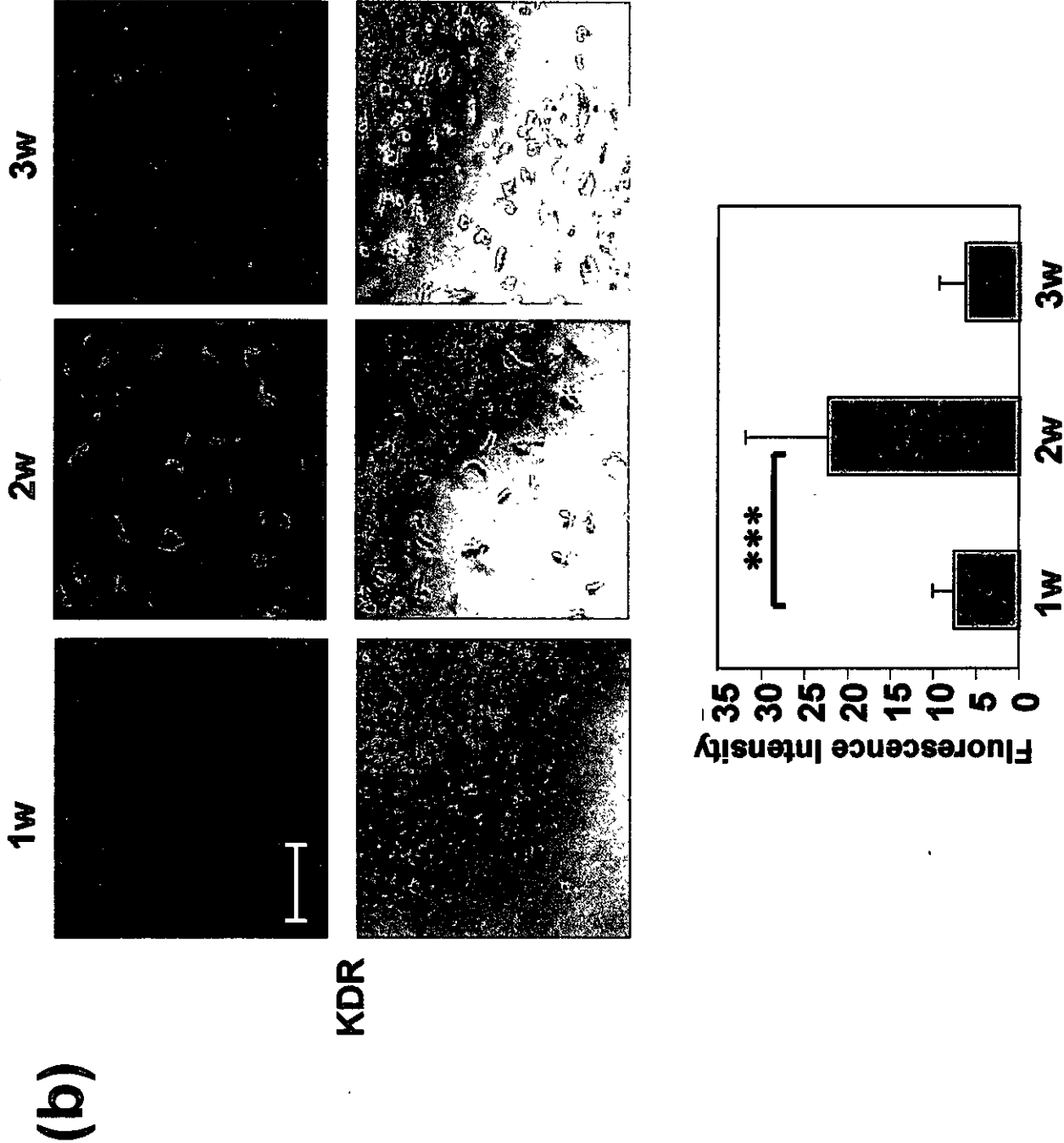


図68. AC133陽性細胞由来接着細胞におけるeNOS発現の経時的変化

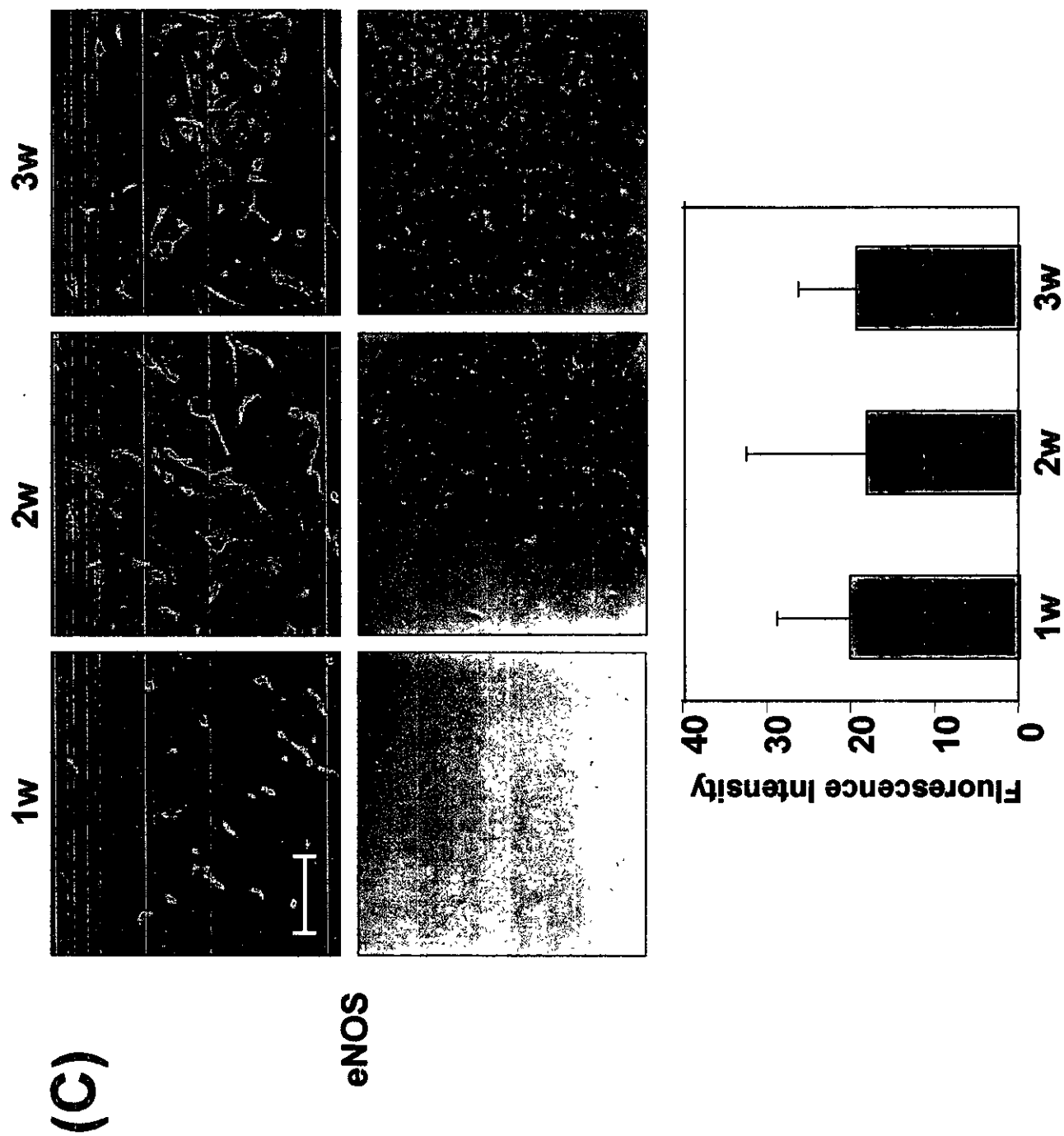


図69. AC133陽性細胞由来接着細胞におけるCD11b発現の経時的変化

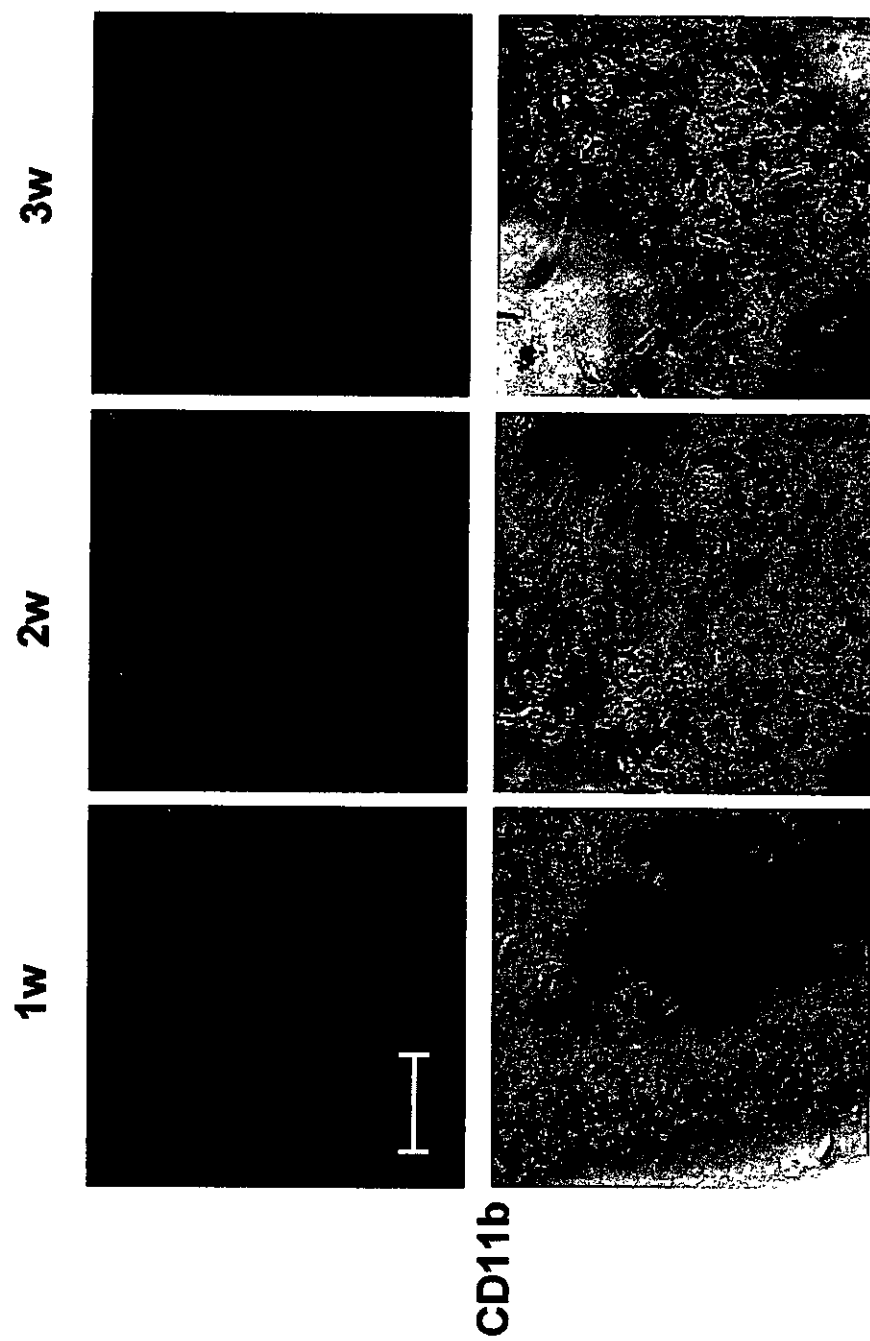


図70. AC133陽性細胞の血管内皮細胞の分化に及ぼす細胞外マトリックスの影響

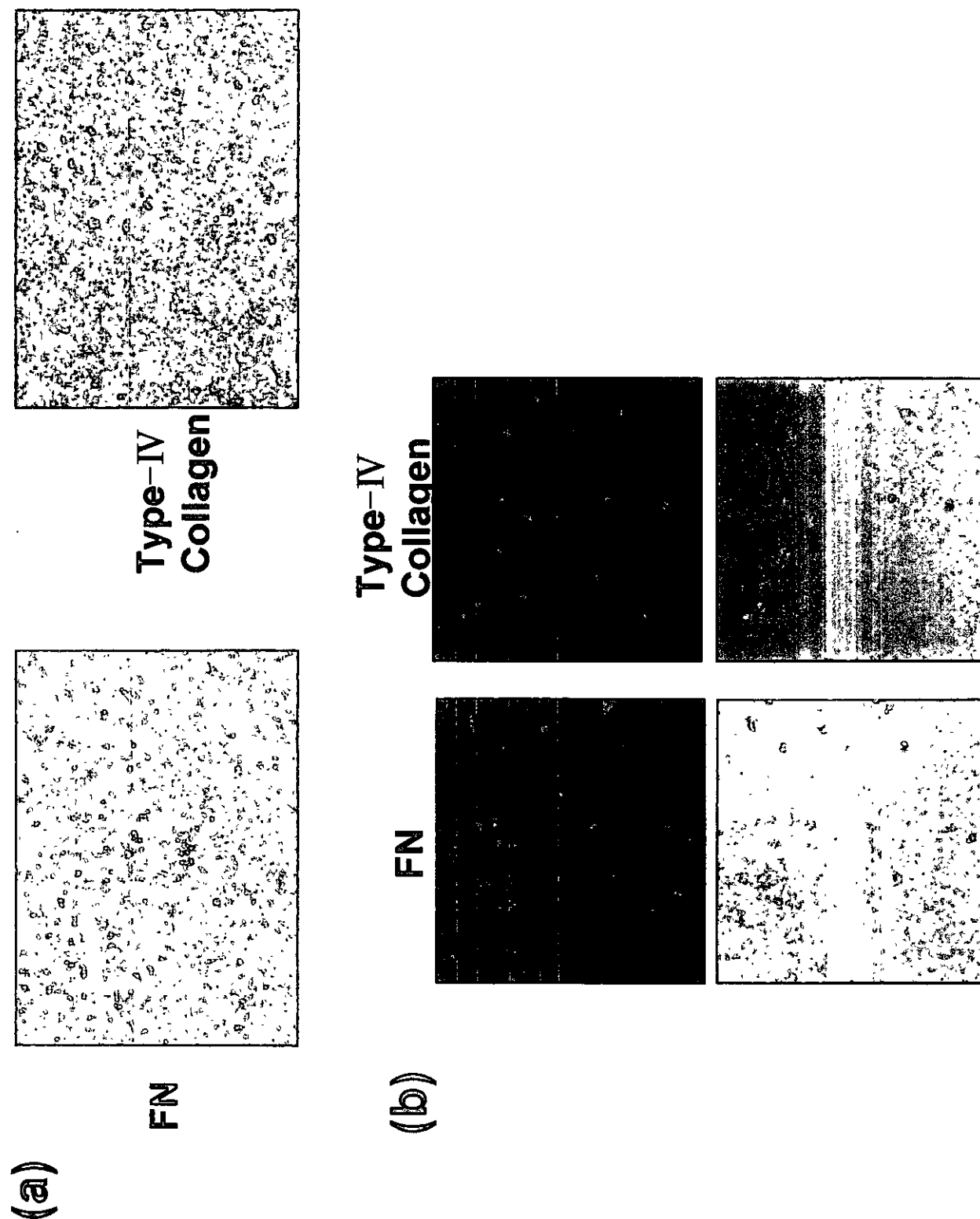


図71. 培養したAC133陽性細胞のCD31の発現とCD31強陽性細胞と陽性細胞の分離

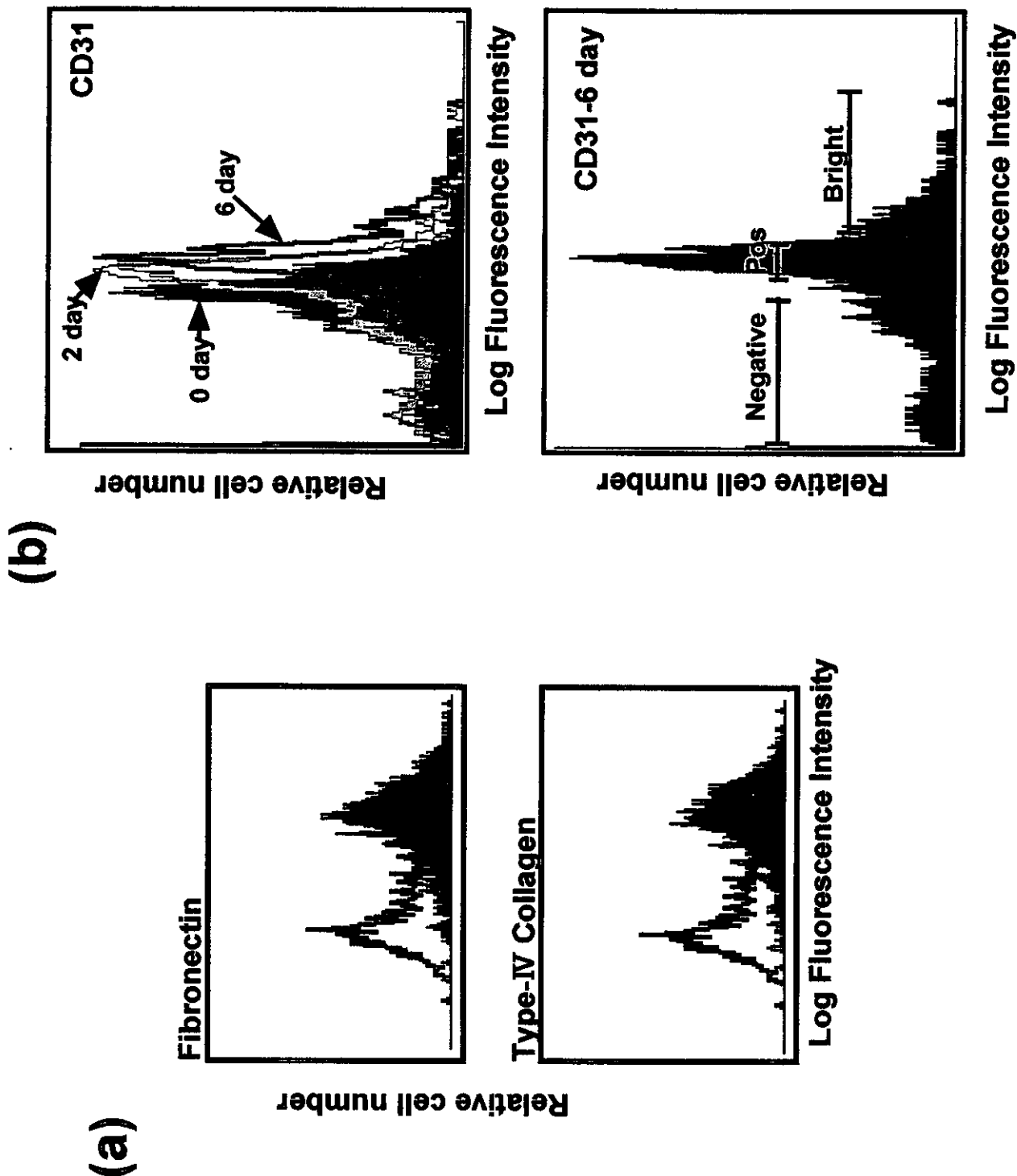


図72. CD31強陽性細胞と陽性細胞の血管内皮細胞への分化能の比較

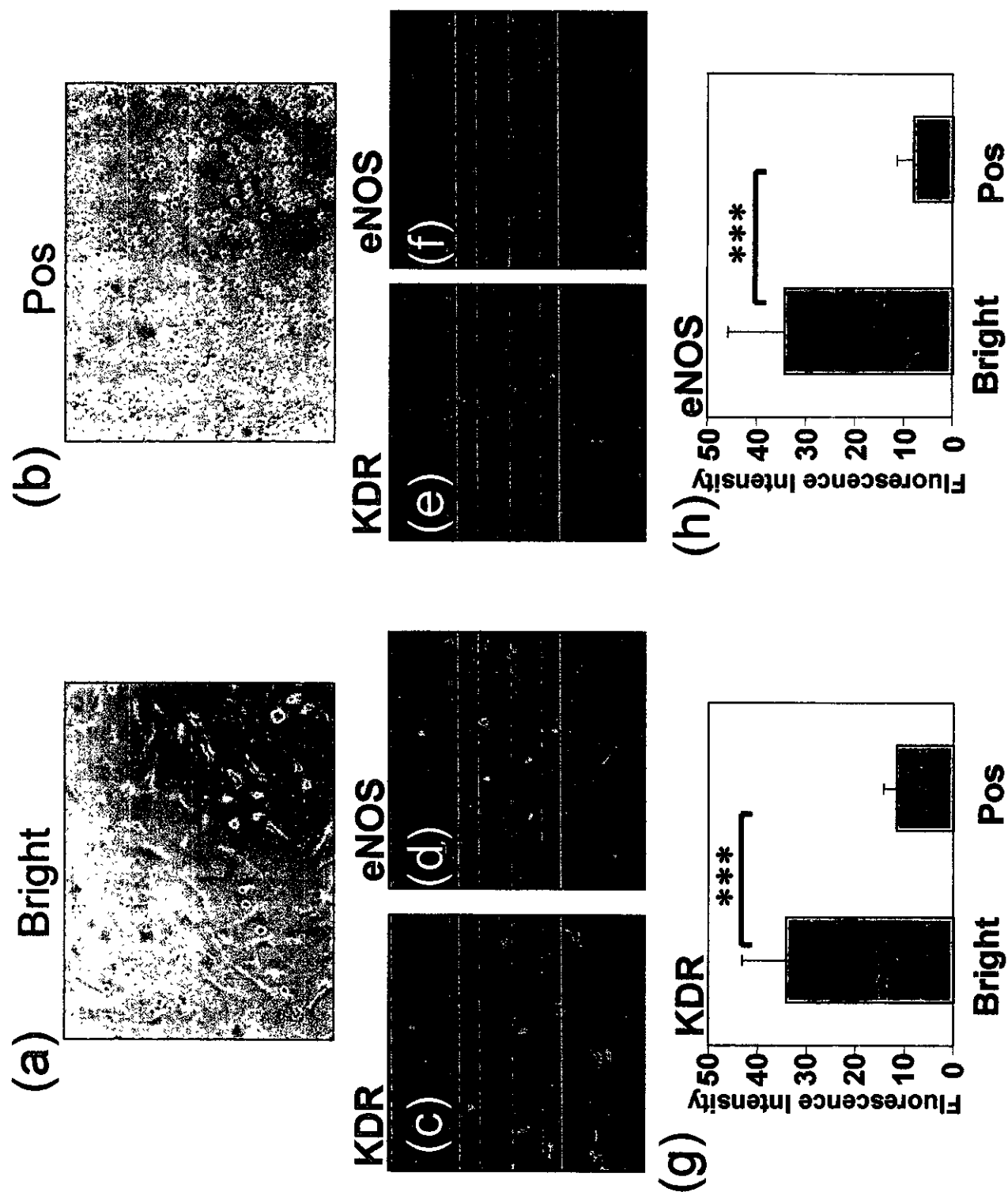


図73. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性細胞の含有率の比較

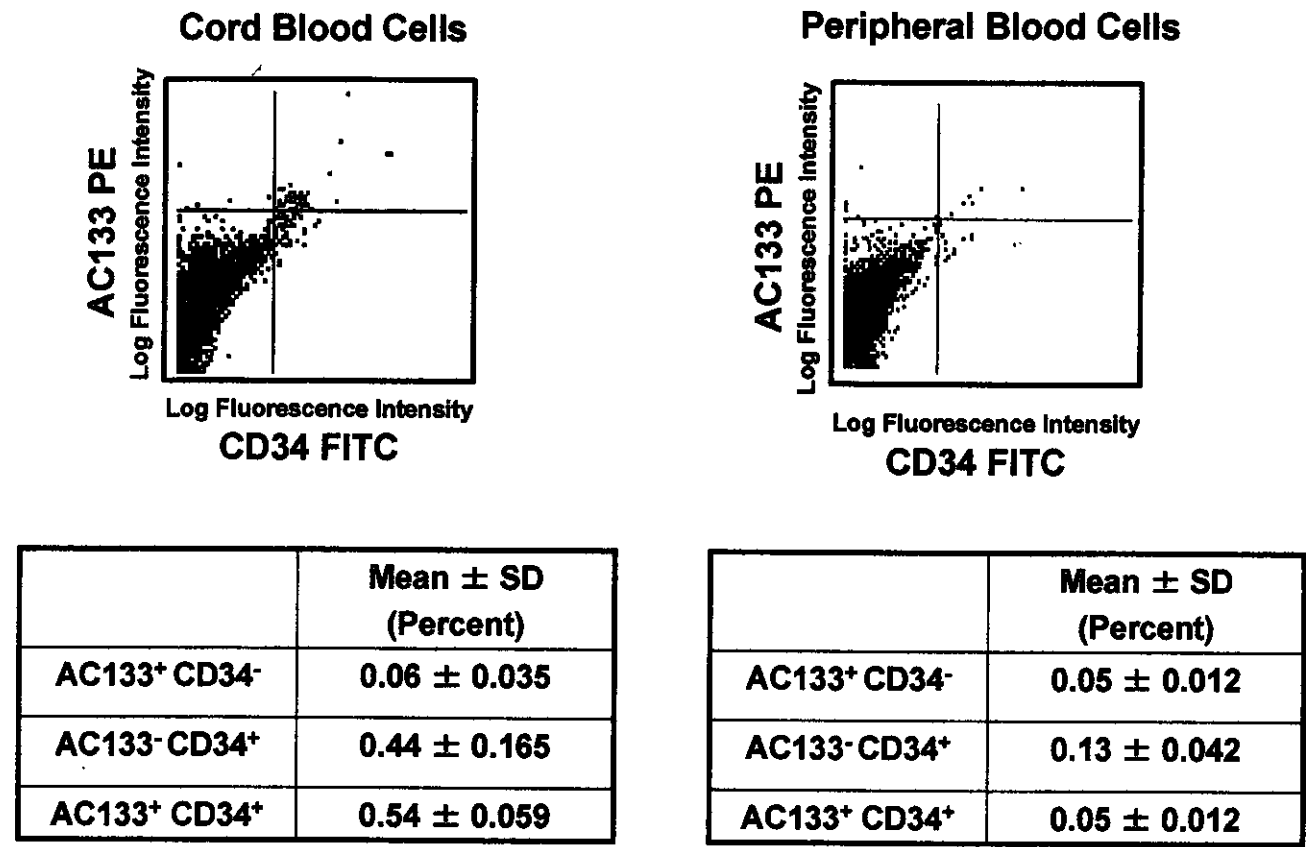


図74. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性細胞の増殖の比較

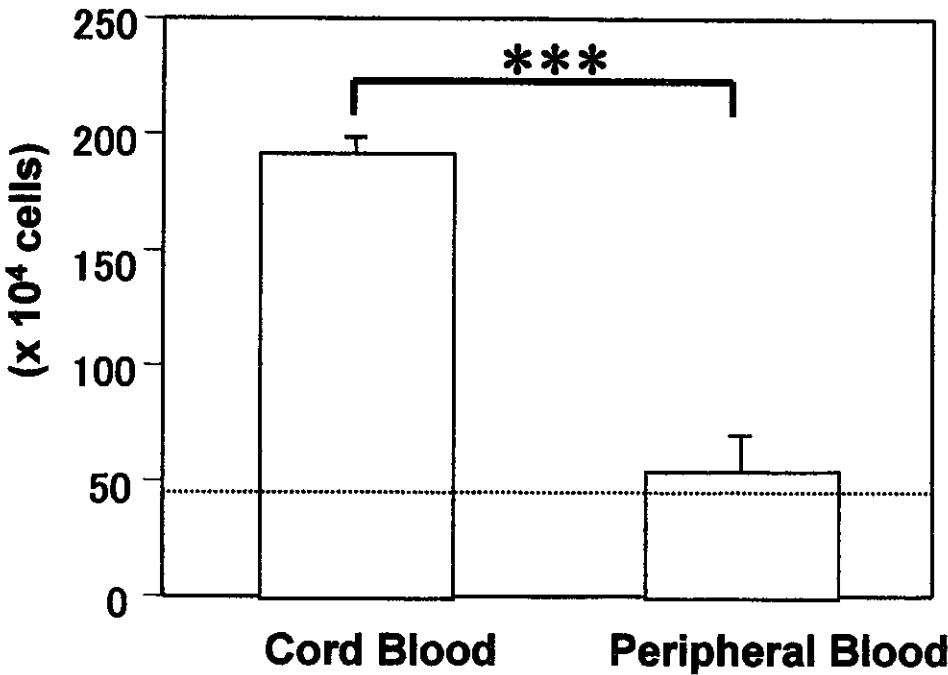


図75. 臍帯血AC133陽性細胞におけるCD31発現の経時的変化

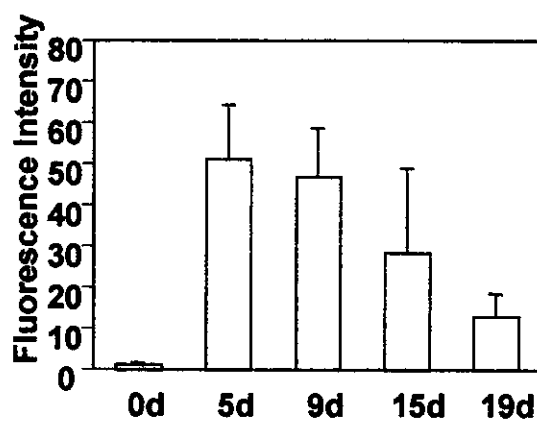
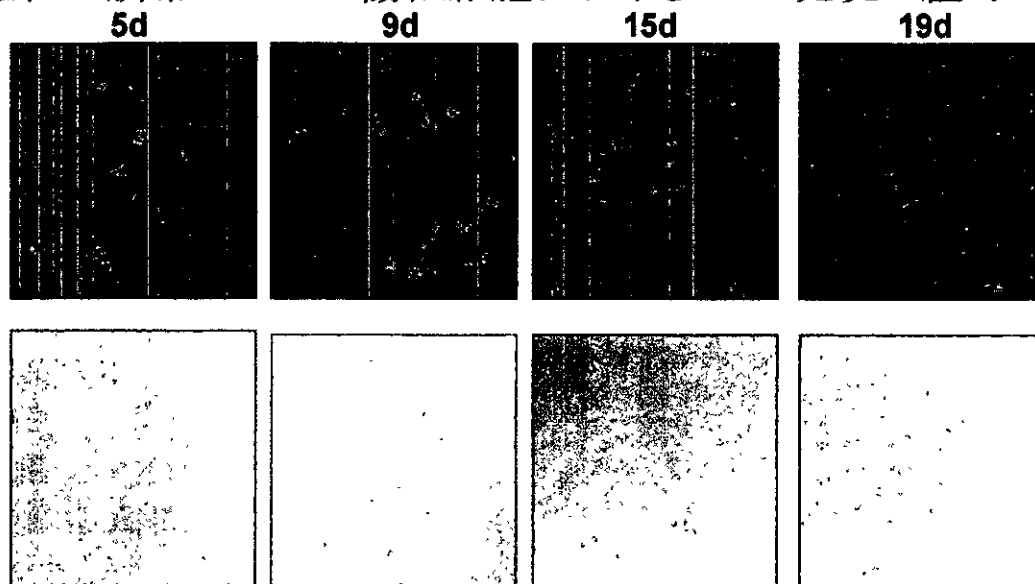


図76. 臍帯血AC133陽性細胞におけるKDR発現の経時的変化

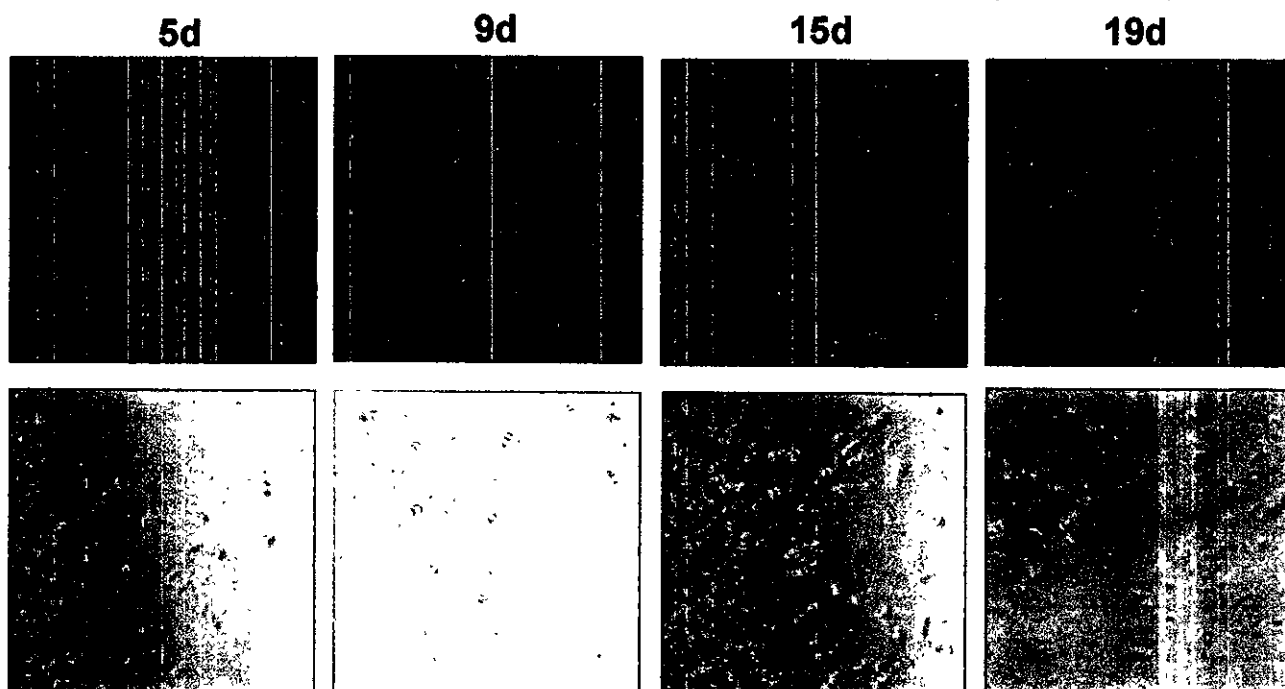


図77. 臍帯血AC133陽性細胞を6日間培養した時のCD31強陽性細胞の増加

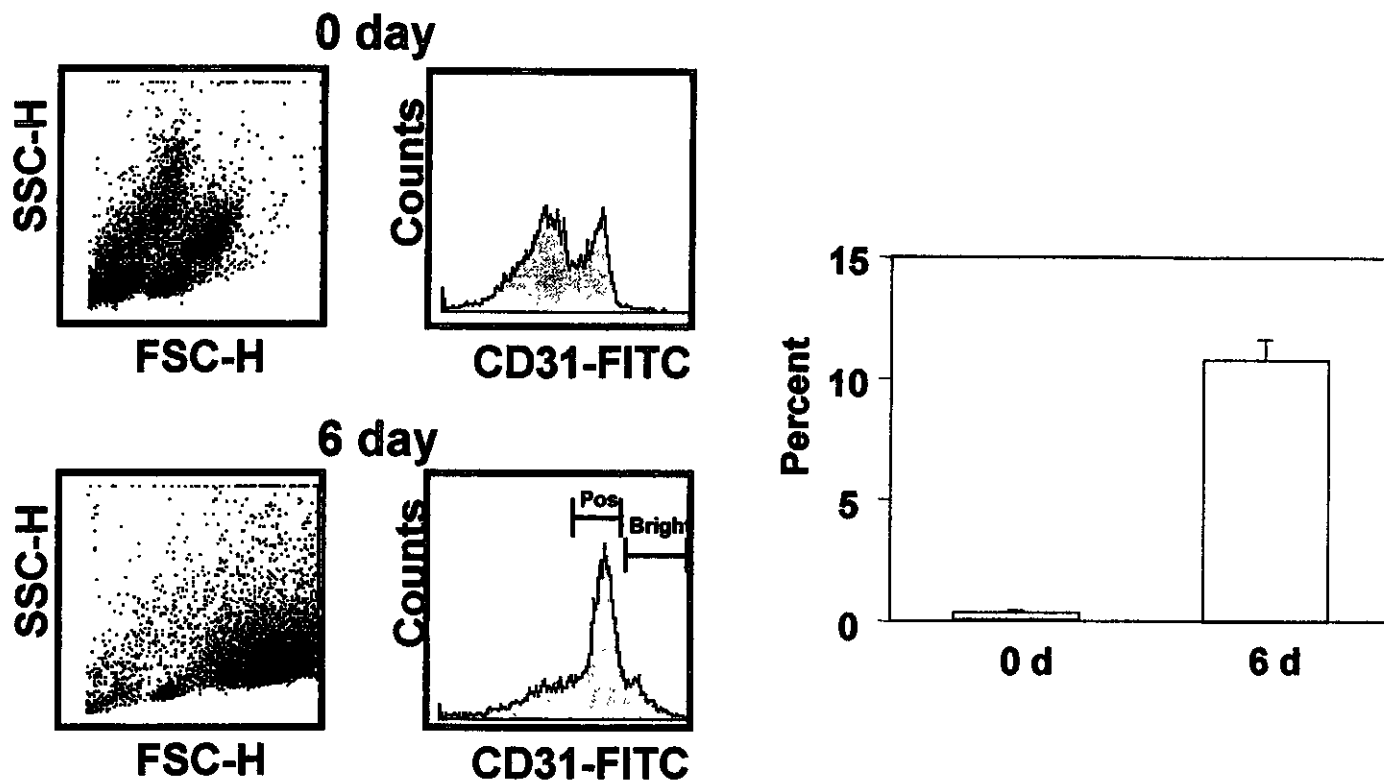
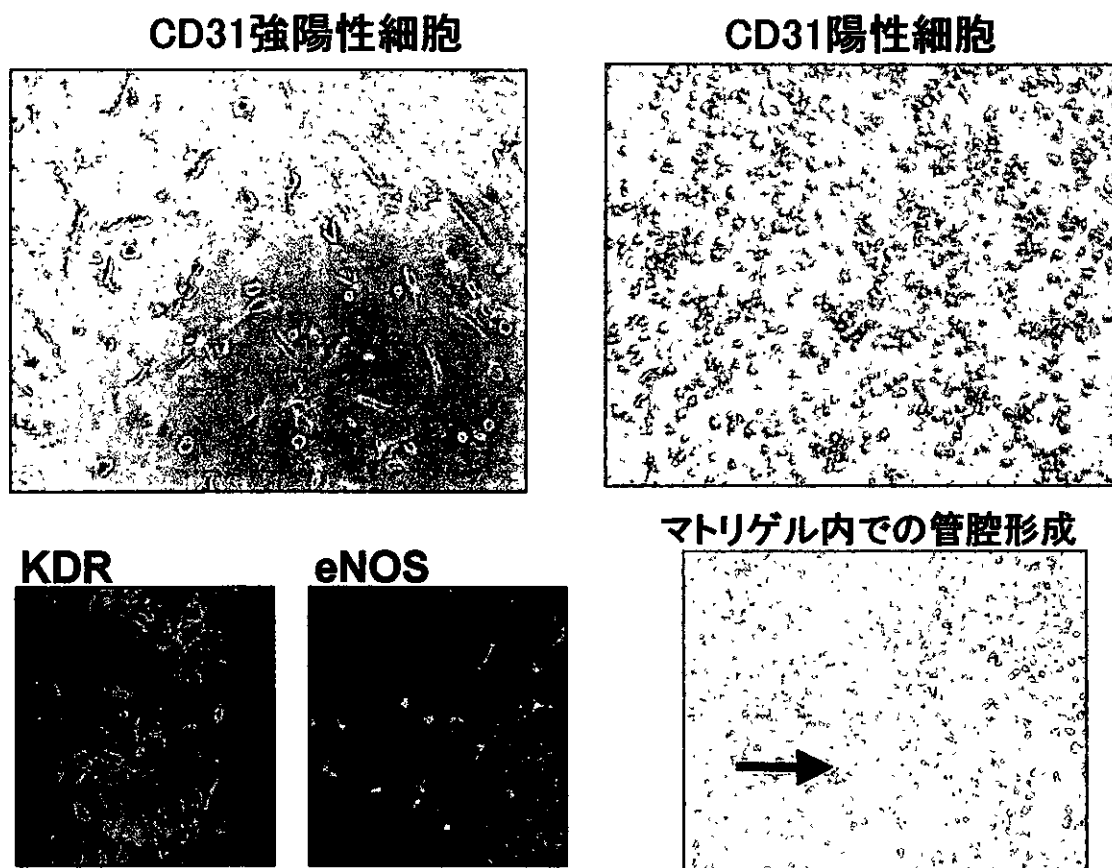


図78. 臍帯血AC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞の
ファイブロネクチン上での血管内皮細胞への分化



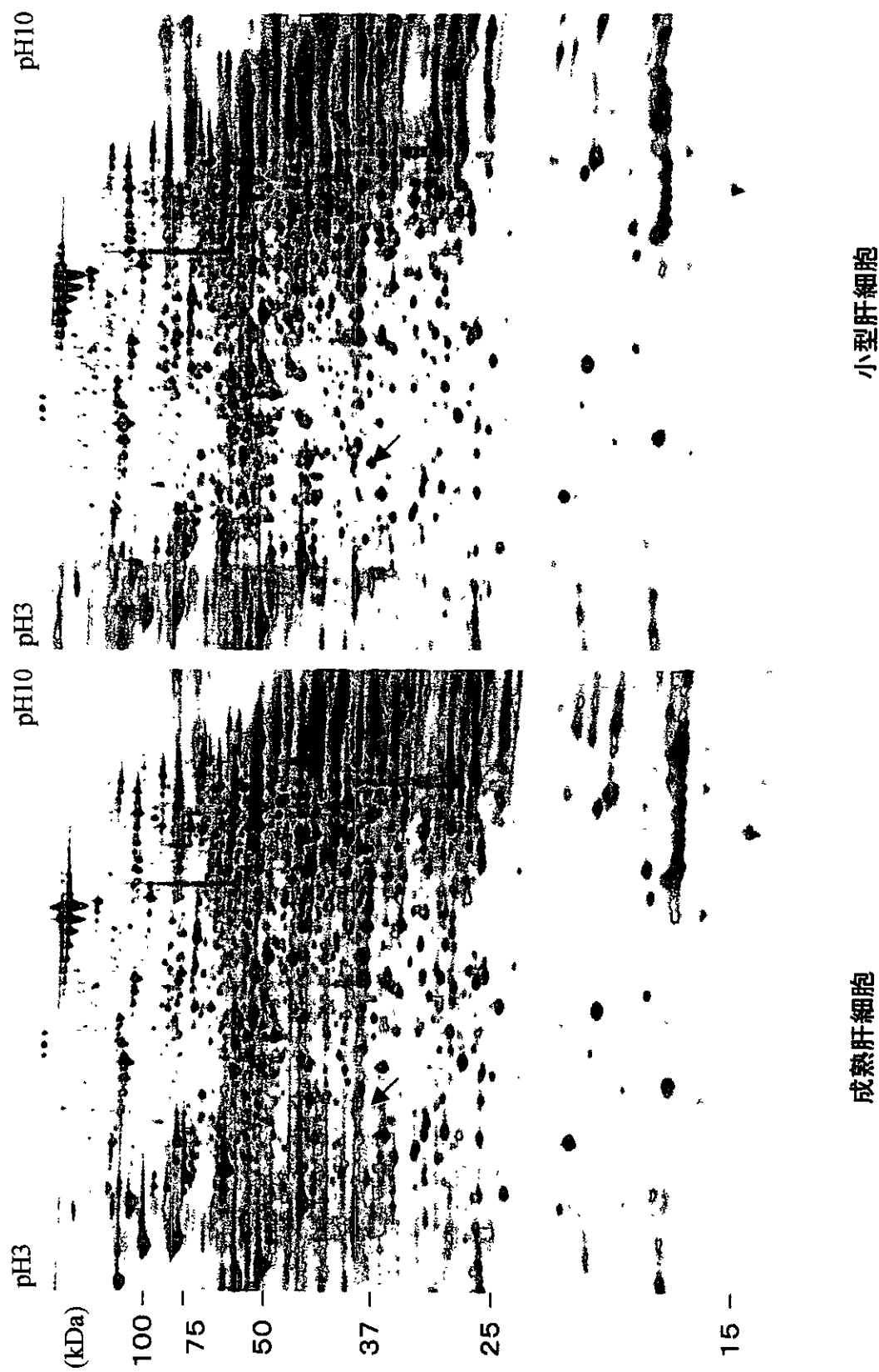


図79 成熟肝細胞と小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動

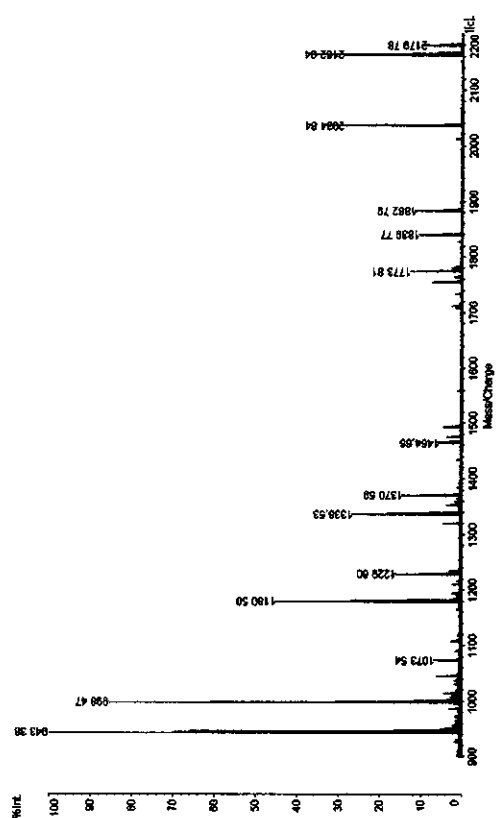


図80 小型肝細胞由来タンパク質の二次元電気泳動で
特異的な発現が観察されたタンパク質のトリプシンによる
ゲル内消化物の質量スペクトル

(1) (2)

アネキシン III

アルブミン

図81 アネキシン III とアルブミンのウエスタンブロット解析
(1) 小型肝細胞と (2) 成熟肝細胞を抽出緩衝液で懸濁後、室温で15分振とうしその後の操作に用いた。
抗アネキシン III 抗体及び抗アルブミン抗体はそれぞれ18000倍及び15000倍希釈で用いた。

図82 PLLAによるプロテオグリカン発現誘導

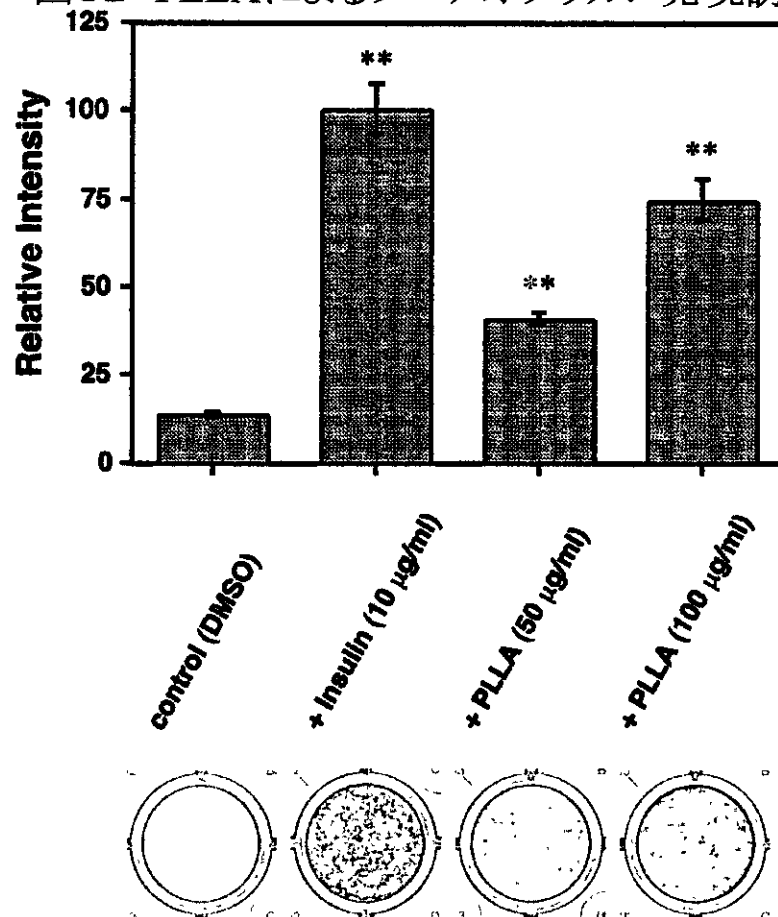


図83 PLLAによるII型コラーゲン遺伝子発現誘導
PLLA (µg/ml)

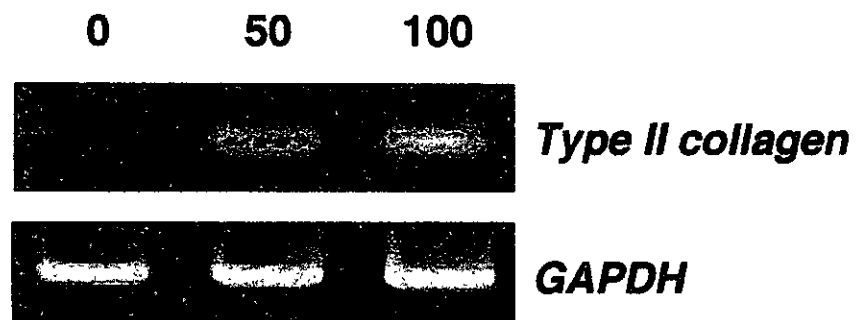


図84 II型コラーゲン遺伝子発現の経時変化

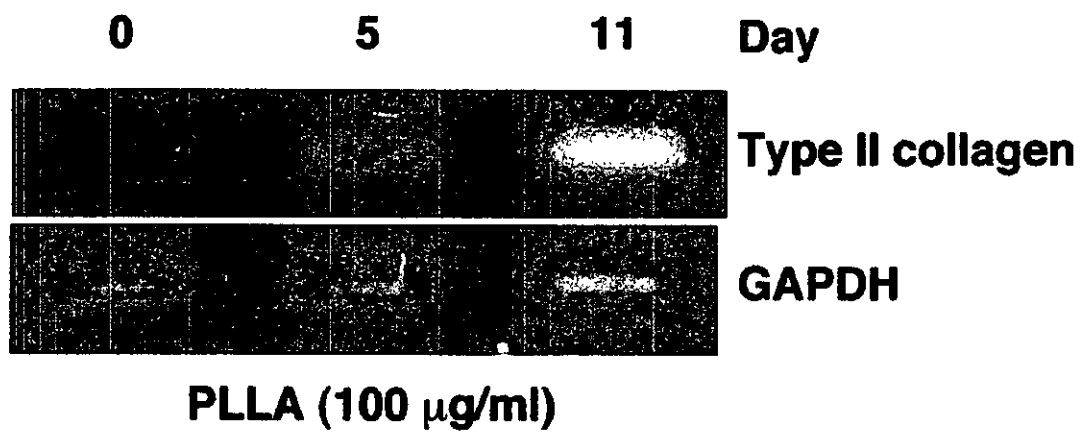
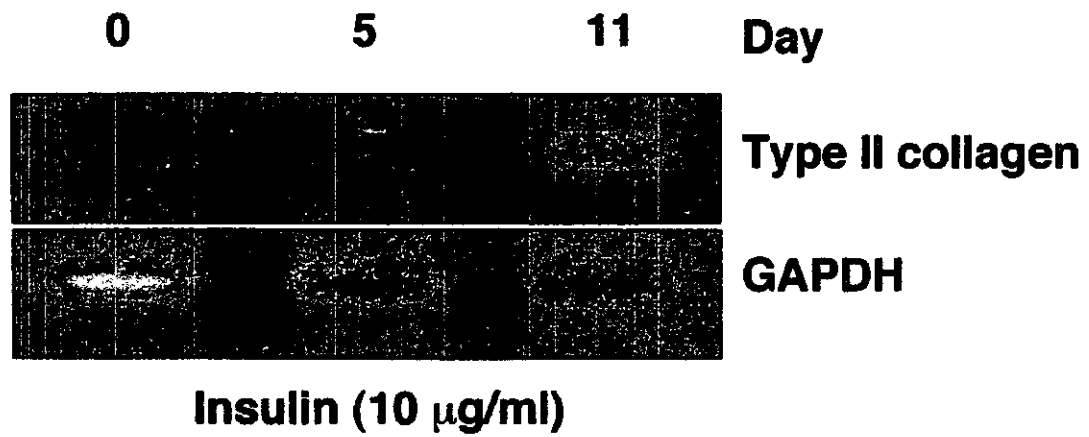
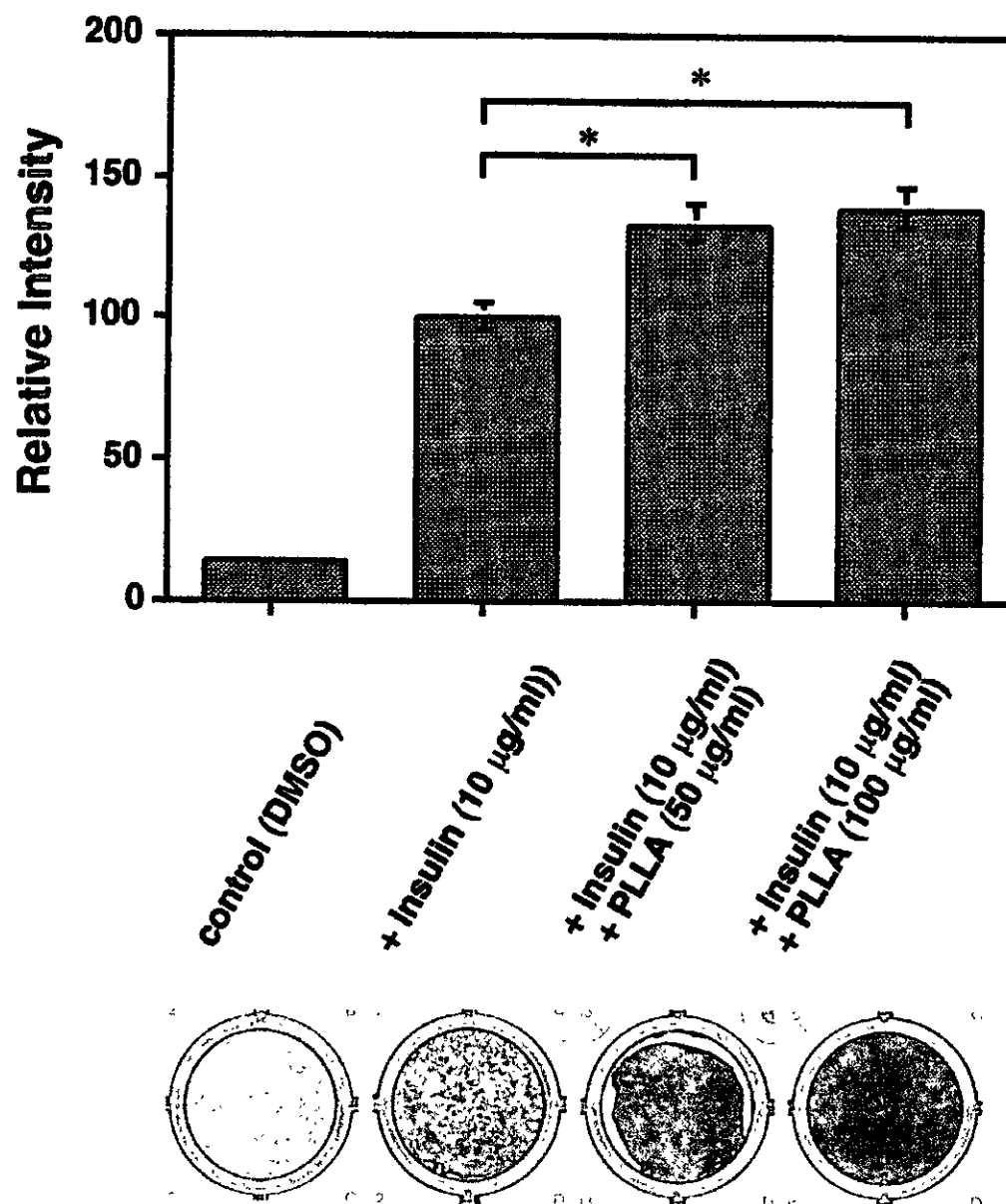


図85 プロテオグリカン発現におけるインスリンとPLLAの相加的促進効果



厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書(総合)

細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部長

研究要旨

(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、コラーゲンハニカムよりも 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(hTERT)プロモーターの活性化のがん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、テロメラーゼ活性の観察される複数のがん細胞において hTERT プロモーターの活性化が観察された。hTERT 発現に関与する転写因子制御に必須な因子の探索を行った。

げっ歯類で腫瘍の発生が報告されている医用材料(ポリウレタンおよびポリ乳酸)について、*in vitro* トランスフォーメーション試験を実施し、得られた形質転換株の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、代表的な癌関連遺伝子である、*c-fos* 癌原遺伝子、*FBJ* 骨肉腫癌遺伝子 B、および *Jun* 癌遺伝子の強い発現亢進が認められた。これら遺伝子の発現はすべて骨形成促進の方向に変化しており、*in vivo* での骨肉腫を含む発生腫瘍の種類と強度に一致していた。DNA tip 解析で、癌の特性のみならず、そのリスクレベルについても評価できる可能性を示した。

(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 1 週間埋入した。異系ラットや異種マウスの肢芽器官を埋入すると CD 8 陽性細胞が増加する傾向がみられた。しかし、袋状 PP 膜の外表面を修飾ポリウレタンでコートすると CD 8 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。長期動物実験による免疫隔離膜評価指標を検討し、レシビエントの末梢リンパ球のサブセット解析(CD4/CD8)、TNF α 、INF- γ 、IL-4、IL-13 の産生量から望ましくない免疫反応を検出できる可能性を示した。

(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 等 4 種の物質は、ラット神経前駆、軟骨前駆細胞において、神経では分化阻害を軟骨では分化促進と相反する影響を示した。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、同一材料による軟骨分化・増殖能に及ぼす影響は著しく異なった。適切な動物モデルおよび標的組織を考慮する必要がある。ポリ乳酸は、マウス軟骨幹細胞において、collagen typeII 遺伝子発現を誘導し、インシュリンとは一部異なる機構の可能性を示唆した。

A. 研究目的

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険される因子の一つである。しかし、組織工学製品のウイルスに対する安全性を評価する基準についてはまだ、十分に研究されていない。我々は、合成および微生物由来ポリエステルから作製された多孔質体生分解性ポリマーを足場としてヒト皮膚モデルを作製し、HIV-1 感染細胞を用いてヒト皮膚モデル製品の HIV 汚染時における感染細胞の動態および HIV 検出法を検討し、組織工学製品のウイルスに対する安全性を評価するための検査方法を検討することを目的とした。最近再生医療分野の発展が目覚ましく、それに伴い吸収性縫合糸や骨接合材などに利用される足場用吸収性材料が盛んに開発されている。特にポリエステル由来の生分解性ポリマーの開発は目覚ましく現代医療には不可欠なものである。しかし、それらの組織工学製品のウイルスに対する安全性を評価する基準についてはまだ十分に研究されていない。我々は、合成及び微生物由来ポリエステルから作成された多孔質体生分解性ポリマーを足場としてヒト皮膚モデルを作成し、HIV-1 感染細胞を用いてヒト皮膚

モデル製品の HIV 汚染時における感染細胞の動態および HIV 検出法を検討し、組織工学製品のウイルスに対する安全性を評価するための検査方法を検討することを目的とした。

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時であり、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、高度な技術を必要とし、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、軟寒天コロニー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