

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。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評価と hTERT プロモーターの発現制御に關与する分子の解析から、がん化指標としての有用性を明らかにする。

ポリウレタンは、その弾性、高い引っ張り強度、生体適合性の良さ、取り扱い易さから医療用具に広く使われており、特に豚肝細胞モジュールとして実績がある。ポリ乳酸は生分解性の良さから、整形外科領域で骨スクリューや骨固定プレートとして使われている。しかし、ポリウレタンはラット皮下に埋植すると腫瘍を誘発することが知られている。また我々は、マウス BALB/3T3 細胞を用いるトランスフォーメーション試験で、ポリウレタンフィルム上で形質転換巢が誘発されることを報告している。

BALB/3T3 細胞を用いるトランスフォーメーション試験は、発癌物質だけでなく発癌<sup>7942</sup>をも検出できる試験系として広く実施されている。これまでに化学物質のトランスフォーメーション試験は数多く実施されているが、分離された形質転換巢の DNA 解析に関する報告は少ない。また、我々はこれまでに材料上で分離された4つの形質転換巢および親株についてそのテロメラーゼ活性を測定したところ、テロメラーゼ活性陽性のデータを得ている。そこで、これらの株について幅広く癌関連遺伝子の発現解析を実施することにした。医用高分子材料上で、

分離された形質転換巢の DNA チップを用いる解析を行い、遺伝子発現の変化とその悪性度との比較検討を行った。平行して形質転換巢の染色体数の変化も検討し、がん化指標としての有用性を検討した。

#### 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。

#### 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。生分解性ポリマーであるポリ乳酸 (PLLA) が軟骨細胞の培養基質として用いられているが、その軟骨分化誘導作用に関する知見はほとんどない。そこで、軟骨分化のモデル細胞株である ATDC5 を用いて PLLA の軟骨分化誘

導作用について検討した。また、軟骨分化が起こっている部位で発現が亢進されていると報告されているタンパク質架橋酵素である組織型トランスグルタミナーゼの新たな軟骨分化・成熟マーカーとしての機能を評価するために、分化誘導 ATDC5 におけるトランスグルタミナーゼの活性を測定した。

## B. 研究方法

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

HCV は、細胞より、RNA を抽出し、最近開発された RT-PCR リアルタイムモニタリングシステムを用いてデータ解析を行い、判定した。EBV は、ヘルペスウイルス群に属し、二本鎖の線状 DNA ウイルスであり、ガンマヘルペスウイルス亜科に属する。DNA を抽出し、Taq DNA polymerase による DNA 増幅後、エチジウムブロマイド存在下でアガロースゲル電気泳動後、UV ライトで泳動パターンを確認して判定した。CMV は、ヘルペスウイルス科に属し、二本鎖の線状 DNA ウイルスである。DNA を抽出し、Taq DNA polymerase による DNA 増幅後、エチジウムブロマイド存在下でアガロースゲル電気泳動後、UV ライトで泳動パターンを確認して判定した。HSV は、ヘルペスウイルス科アルファヘルペス亜科に属し、エンペロープと二本鎖 DNA を持つ DNA 型ウイルスである。細胞より、DNA を抽出し、Taq DNA polymerase による DNA 増幅後、エチジウムブロマイド存在下でアガロースゲル電気泳動後、UV ライトで泳動パターンを確認して判定した。B19 は、パルボウイルス科に属し、一本鎖 DNA を持つ小型 (22-25nm) のウイルスである。細胞よ

り、DNA を抽出し、Taq DNA polymerase による DNA 増幅後、エチジウムブロマイド存在下でアガロースゲル電気泳動後、UV ライトで泳動パターンを確認して判定した。

**HSV-1 の増殖影響** 仔牛真皮不溶性コラーゲンをペプシンで可溶化し精製した type-1 コラーゲン溶液を 35mm シャーレに加え、培養皿全面に伸ばす。クリーンベンチ内で培養皿のふたをあげ、このまま、室温で風乾した。PBS (-) で数回洗い中和して、コラーゲンコートしたシャーレを作製した。このシャーレを、10kGy、25kGy、50kGy の 3 段階異なる量の  $\gamma$  線を照射した。未照射コラーゲンコートシャーレおよび組織培養用シャーレとともに、 $\gamma$  線の照射線量の異なるコラーゲンコートシャーレについて、HSV-1 ウイルスの増殖影響について調べた。コラーゲンコートした 4 種類 (0、10、25、50kGy) のシャーレとウイルス対照としてコーティングされていないシャーレ各 3 枚に、Phfb 細胞 (新生児包皮由来細胞株) を培養した。4 日間培養した各 Phfb 細胞の培養液を 5% FCS-Eagle-MEM 培地 3ml に交換し、1000TCID<sub>50</sub>/0.1ml、100TCID<sub>50</sub>/0.1ml に調製した HSV-1 を各シャーレに添加 (0.1ml/シャーレ) した。細胞対照として各 1 枚は、HSV-1 未接種とし、各々炭酸ガス培養器で培養した。3 日後、ウイルスの増殖を確認 (細胞変性を確認) して、スクレイパーにて細胞を剥がし、培養液と共に凍結保存した。次に、培養液を凍結融解して、2000rpm で 5 分間遠心後、上清を回収しウイルス液とした。

**ウイルス感染力価測定** 4 日間 Phfb 細胞を培養した 96well plate を用意した。培養液を 5% FCS-Eagle-MEM 培養液 0.1ml/well に交換した。力価測定する

ウイルス液を10倍段階希釈して、各希釈液を4well/0.025ml添加し、炭酸ガス培養器にて培養した。5日後、細胞変性を観察して、ウイルス感染力価を算出した。

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)、合成あるいは微生物由来生分解性ポリエステルからなる低分子量ポリマー(液性)や高分子量多孔質体とそれぞれ混合培養した。ヒト皮膚モデルにHIV感染細胞OM10.1及びHTLV-1感染細胞MT-4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。

(ヒト皮膚モデル材料) 1) 合成生分解性ポリマー-(1)ポリ-L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体: P(LA/CL)

(50:50)、分子量57万、ポリマー-1-S:ポアサイズ100 300μm、ポリマー-1-L:ポアサイズ250 350μm (2)ポリ-L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体: P(LA/CL)(75:25)、分子量84万 ポリマー-2-S:ポアサイズ100 300μm、ポリマー-2-L:ポアサイズ250 350μm

(3)ポリ-L-乳酸(PLLA)、分子量20万:ポリマー-3-L:ポアサイズ250 350μm

2) 微生物由来生分解性ポリマー-(1) P(3HB-3HH)、3HH:15% ポリマー-4-L:ポアサイズ250 350μm、(2) P(3HB-3HH)、3HH:7% ポリマー-5-L:ポアサイズ250 350μm

(細胞) 1) NHDF(正常ヒト皮膚繊維芽細胞) 10%牛胎児血清添加DMEM培地で培養した。2) HIV感染細胞:OM10.1(HIV-1持続感染細胞) 3) HIV非感染細胞:MT-4(HTLV-1持続感染細胞)

2) 及び3)の細胞は10%牛胎児血清添加RPMI1640培地で培養した。

(ヒト皮膚モデルの作成)ヒト皮膚モデルは、5種類の合成ポリエステル由来ポリマー-1-S, 2-S, 1-L, 2-L, 3-Lおよび2種類の微生物ポリエステル由来ポリマー-4-L, 5-Lを足場として、これらにそれぞれNHDFを吸着させて作成した。各ポリマーを直径3mm、高さ1mmの円柱状にくり貫き、ポリマー1個当たり $10^5$ 個のNHDFを加えて1.5mlのチューブに入れて37°Cのインキュベーターで4時間吸着後、96穴プレートに移し一昼夜培養した。翌日、100μlの10%牛胎児血清添加DMEM培地を加え、ポリマーに吸着しなかったNHDFと分離するため、NHDFが吸着したポリマーを新しい96穴プレートに移し37°Cで培養した。

(細胞の増殖能の測定(Alamar Blue assay)) Alamar Blue染色液(wako)を用いて細胞の増殖能の測定を行った。原理は細胞の代謝活性により酸化還元型の色素となり、細胞の増殖能を定量的に吸光度で測定する方法である。Alamar Blueは易水溶性で細胞毒性を示さず、培地中で安定であり、長時間のモニタリングが可能である。色素無添加のDMEM培地に1/10のAlamar Blue染色液を添加し4時間培養後、吸光度570/600nmで測定した。

(感染細胞接種実験)ヒト皮膚モデルにHIV-1持続感染細胞OM10.1又はHIV非感染細胞MT-4を接種し、両細胞の動態を比較検討した。各ヒト皮膚モデルに $10^5$ 個の感染細胞を接種し、96穴プレートで4時間吸着後、100μlの10%牛胎児血清添加DMEMを加え培養した。翌日、新しい培地へ移して6日間培養し、増殖能及びHIV-1

抗原の検出を行った。

(HIV-1 抗原検出) OM10.1 の HIV-1 抗原検出はルミパルス 1 HIV-1p24 (富士レビオ) を用いて行った。HIV-1 持続感染細胞 OM10.1 を接種したポリマ-の培養上清を経時的に採取し、HIV-1 抗原の検出を行った。判定はカットオフインデックス (COI) で示し、1.0 以上を示す検体は陽性、1.0 未満を示す検体は陰性とした。COI=S/C (S: 検体の発光量、C: カットオフ値)

#### 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、 $1 \times 10^5$  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  $25 \mu\text{l}$  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  $50 \mu\text{l}$  を各 well へ添加した。3 時間にわたり、細胞を  $37^\circ\text{C}$  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、ホタ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、ホタ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。

#### (1) プラスミドの構築

**E-box** クラスタールシフェラーゼレポータープラスミドの構築 hTERT 遺伝子の第2イントロン内には、c-Myc 結合部位である E-box が多数存在していることが明らかになっている。そこで、この E-box クラスタ領域の取得を PCR 法により試みた。プライマーを用い、hTERT のゲノム DNA を鋳型として、94℃、1分間の後、98℃、20 秒；65℃、2分間を 30 サイクル、最後に 72℃、10 分間の LA PCR 反応を行った。PCR 産物はそれぞれ E-box1,2,3 と命名した。この時使用したプライマーの 5' 末端には無作為な 4 塩基に続き XbaI 認識配列を付加した。また、Taq ポリメラーゼは、LA Taq を使用した。次に、これらの PCR 産物を TA クローニング用のベクターである pGEM-T Easy vector へサブクローニングし、XbaI 消化により、E-box 1, 2, 3 の断片を取得した。このようにして得られた断片を、pGL3-Promoter(Promega) の NheI 部位へ挿入した。この時用いた

pGL3-Promoter は、SV40 プロモーター制御下でホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現誘導できるため、エンハンサー領域の特定に適している。

**E-box**変異導入 hTERT プロモータールシフェラーゼレポータープラスミドの構築 hTERT コアプロモーター領域に存在する 2 個の E-box(-239bp および -34bp) への変異導入は、GeneEditor in vitro Site-directed Mutagenesis System を用いて行った。変異導入用オリゴヌクレオチドに、T4 Polynucleotide Kinase と ATP を加え、37℃で 30 分間、次に 70℃で 10 分間インキュベートし、変異導入用オリゴヌクレオチドの 5' 末端のリン酸化を行った。ハイブリダイゼーション反応は、アルカリ変性させた二本鎖 DNA テンプレート、あたらしい抗生物質耐性獲得用 Selection Oligonucleotide、変異導入用オリゴヌクレオチド等を加え、75℃で 5 分間、室温で 30 分間インキュベートしてハイブリダイゼーションした。更に、T4 DNA polymerase、T4 DNA Ligase 等を加え 37℃で 90 分間インキュベーションして変異鎖の合成をおこなった。形質転換は、BMH71-18mutS Competent Cells に対してプラスミドを加え、氷中で 30 分間、42℃で 47 秒間、再び氷中に移し 2 分間インキュベートした後、培地を加え、37℃で 60 分間振とう培養した。抗生物質含有 LB 培地に加え、37℃で 16-18 時間培養した。この培養液からプラスミドを抽出した。更に、JM109 Competent Cells に対して、プラスミドを加え、氷中で 30 分間、42℃で、47 秒間、氷中で 2 分間インキュベートした後、培地を加えて 37℃で 60 分間振とう培養した。抗生物質(アンピシリン等)含有 LB プレートにプレーティングし、

37°Cで12-14時間培養した。プラスミド抽出を行った後、シーケンスにより陽性クローンを選択した。目的断片をXbaI消化により切り出し、pGL-3BasicのNheI部位へ挿入し、pGL3b-286(EboxMut)を構築した。

エフェクタープラスミドの構築 c-mycのATGの上流側にEcoRI認識配列をPCRにより付加し、このc-mycのcDNAをpGEM-T Easy vectorにサブクローニングした。EcoRI消化によりc-myc cDNAを切り出し、pcDNA3/HAのEcoRI部位へ挿入した。このc-myc発現ベクターをpcDNA3/HA-c-mycと命名した。PEMBL-hMyoDをEcoRIで消化し、MyoD cDNAを切り出し精製した。このMyoD cDNAをpcDNA3のEcoRI部位へ挿入し、pcDNA3-MyoDと命名した。PUC-hIRF-1をBamHI, XhoIで消化し、IRF-1cDNAを切り出し精製した。このIRF-1 cDNAをpcDNA3のBamHI、XhoI部位へ挿入し、pcDNA3-IRF-1と命名した。

## (2)トランスフェクション

トランスフェクション操作は、Life Technologies製のLipofectAMINE PLUS Reagentの製品プロトコルに従った。ルシフェラーゼアッセイに用いる細胞を100,000cells/wellの細胞密度で、24wellプレート上に準備した。次の日、コンストラクトを無血清ERDF培地で希釈し、PLUS-Reagentを加えてプロトコルに従って実施した。PRL-TKは、ウミシイタケルシフェラーゼをチミンキナーゼ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。

生分解性高分子ポリ乳酸およびポリウレタン材料上で分離されたBALB/3T3細胞由来形質転換巢の遺伝子発現プロファイリング

マウスBALB/3T3細胞のA31-1-1株を黒木登志夫博士(東京大学医科学研究所)より供与を受けた。細胞を10%牛胎児血清を添加したMEM培地で、5%炭酸ガス、37°C条件下で培養した。

高分子材料:ポリウレタン(MDI/PTMO 1000/BD, 重量平均分子量40,000と80,000の2種は三洋化成(株)より、ポリ乳酸フィルム(PLLA; 厚さ0.3 mm, 重量平均分子量200,000)は島津製作所より入手した。

トランスフォーメーション試験 細胞を材料をコートしたシャーレに、 $1 \times 10^4$ /シャーレの細胞密度で播種し、1週間に2回培地交換を行いながら、6週間培養を続けた。誘発された形質転換巢を分離し、-80°Cで保存した。保存した複数の形質転換巢のうち、PU上で分離された2個(A5, A6)と、PLLA上で分離された2個(L11, L21)を解凍、増殖させ、DNAチップを用いる遺伝子発現解析、トランスフォーメーションの確認実験、および染色体数の解析を併行して実施した。トランスフォーメーションの確認実験では、3-メチルコランスレン(3-MC, 0.5  $\mu$ g/ml)を陽性対照物質として用い、細胞をプラスチックシャーレで培養し、6週間後の形質転換巢の数を計数した。

DNAチップを用いる遺伝子発現解析 親株(A3111)および4個の形質転換巢を増殖させ、 $10^7$ 以上の細胞を回収し、すぐに液体窒素で凍結させた。RNAの抽出、精製、収量および純度の測定、並びにcDNAプローブの合成はAtlas™ Pure Total RNA Labeling Systemを

用いてプロトコールに従って実施した。<sup>33</sup>P 標識プローブの DNA チップへのハイブリダイゼーションおよび洗浄は Atlas™ cDNA Expression Arrays を用いて実施した。ハイブリダイゼーション後の DNA チップのシグナルはフォスフォイメージで取り込んだ後、AtlasImage™ ソフトウェアを用いて解析した。より確実な発現の変化のみを検討対象とするために、原則として親株に対して 5 倍以上の発現変化を示した遺伝子について比較検討を行った。

**染色体標本作製** 標本作製 2 時間前にコルセミドを添加し、トリプシンによる細胞回収、低張処理および氷酢酸 1 容:メタノール 3 容の固定液を用いる固定を 3 回繰り返す、脱脂洗浄済みガラススライド上に細胞懸濁液を滴下し、空気乾燥させた。ギムザ染色後、染色体数の計数を行った。

#### 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-PE-PP 膜内に入れたものを埋入し、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修飾ポリウレタン膜も使用した。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。

修飾ポリウレタンコート膜内に免疫担当器官である脾臓を埋入したときの長期 in vivo 免疫応答実験には、以下の 4 群を設けて、12 週および 24 週目に観察した。

第 1 群:シャムオペレーションのみを行った Lewis 系ラット群 (control 群)。

第 2 群:修飾ポリウレタン被覆コートした (MPU-PP) 袋のみを Lewis 系ラットの腹腔内に埋入した群 (Bag 群)。

第 3 群:Brown-Norway ラット (donor) の脾臓をそのまま直接 Lewis 系ラット (recipient) の腹腔内に埋入した群 (Spleen 群)。

第 4 群:修飾ポリウレタン (MPU) で片面を被覆コートしたマイクロメンブレン (MPU-PP) 袋に Brown-Norway 系ラット (donor) の脾臓器官を入れて、袋の口をシールし、Lewis 系ラット (recipient) の腹腔内へ埋入した群 (Spleen+Bag 群)。

各群 8 匹のラットを用い、埋入後 12 週目と 24 週目に各 4 匹ずつの Lewis ラットについて以下の項目について解析・評価した。血液中のリンパ球のサブセット (CD4/CD8) の FACS 解析、レシピエントの血中リンパ球からの TNF $\alpha$ 、INF $\gamma$ 、IL-4 および IL-13 を ELISA 法で測定し、各群間で比較し、レシピエントの免疫応答を調べた。

#### 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

Wistar-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- $\epsilon$ -カプロラクトン共重合体で乳酸と $\epsilon$ -カプロラクトンの配合比が 75:25 で分子量が 10000 の P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 と乳酸と $\epsilon$ -カプロラクトンの配合比が 50:50 で分子量が 18000 の P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 および水溶性フラーレンである C<sub>60</sub>DMA を使用した。

マウス胚性細胞株である ATDC5 細胞 10,000 個/well の 24well プレートを用いて、維持培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。3 日後、軟骨分化誘導のため、分化培地(10ug/ml 牛インシュリン含有維持培地)に切り替えて更に 11-14 日間培養した。ポリ乳酸もこのタイミングでインシュリン存在下・非存在下で添加した。2 日に一度培地交換を行った。軟骨分化の度合いはアルシアンブルー染色と RT-PCR を用いて評価した。

**RT-PCR** ATDC5 細胞から Total RNA を TRIzol 試薬を用いて抽出し、SuperScriptII を用いて逆転写反応を行った。II 型コラーゲン遺伝子と

GAPDH 遺伝子について PCR を行い、PCR 産物について 2%アガロースゲル電気泳動を行った。

トランスグルタミナーゼ活性測定分化誘導処理を行った ATDC5 を PBS で洗浄後、回収し、超音波破碎した。遠心して不溶性膜画分を除去し、細胞質画分を得た。トランスグルタミナーゼ活性は固相マイクロタイタープレートアッセイで測定した。

(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

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

市販されているヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト軟骨細胞およびヒト血管内皮細胞を購入し、培養した後、HCV、EBV、CMV、HSV およびヒトパルボ B19 (B19) の 5 種のウイルスについて、ウイルスゲノム同定法(核酸プローブを用いる診断法)により、判定した。その結果、いずれも検出限界以下であり、陰性であった(表 1)。市販のヒト細胞では、通常 HIV、HBV、および HCV については、陰性であることを確認しているが、その他のウイルスについては、検査をおこなっていない。今回、試験した EBV、CMV、HSV、B19 の 4 種も陰性であることが明らかになった。

次に、天然由来材料であるコラーゲンを 3 段階の $\gamma$ 線照射量で照射し、細胞を培養後、HSV-1 を感染させた

後、ウイルスの増殖能を調べた(表2)。50 kGy  $\gamma$ 線照射材料では、接種ウイルスの感染力価が下がる傾向が認められたが、コラーゲン非存在下と比べても大きな差異は認められなかった。10 kGy、25 kGyでは、コラーゲン非存在下と比べて、同レベルか感染力価が弱くなる傾向が認められたが、50 kGyに比べてさらにその程度は小さかった。 $\gamma$ 線未照射のコラーゲンでは、コラーゲン非存在下に比べ、若干の増減があり、一定の傾向は得られなかった(表2)。

合成及び微生物由来生分解性ポリマーを用いてヒト皮膚モデルを作製した場合、ポアサイズ及びポリマーの構成成分の違いにより、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)の増殖性に差があった(図1)。使用した合成ポリマーは、人工物であるため自由に強度や分解性をコントロールできるので、吸収性合成材料として良く使用されているものである。ポリ-L-乳酸とカプロラクトン(50:50)共重合体は、スポンジ状であり、弾力性に富んでいる。これに対してポリ-L-乳酸及びポリ-L-乳酸とカプロラクトン(75:25)共重合体は、弾力性にとぼしくもろい。これらのポリマーから作製した皮膚モデルのうち、ポリ-L-乳酸とカプロラクトン(75:25)共重合体(polymer2)を用いたものは、天然のコラーゲン由来のコラーゲンスポンジハニカムと同等の増殖性を示し最適な皮膚モデルであったと考えられた(図1)。微生物由来のポリマー(polymer4,5)による皮膚モデルは、中程度の増殖性であった(図2)。NHDFは繊維芽細胞、OM10.1及びMT-4は血液由来のマクロファージ及びリンパ球細胞である。皮膚モデルへの感染細胞OM10.1およびMT-4の接種実験で

は、これらの増殖性は、3日目まで増加傾向であったが、6日目には感染細胞未接種の皮膚モデルのみよりも明らかに増殖性が低下し(図3、4)、更に、OM10.1とNHDFの共存は、MT-4とNHDFの共存より増殖性が低下した(図3、4)。つまり、感染細胞との共存によりNHDFと感染細胞が、細胞死をおこし、増殖性が低下したと考えられた。図には示していないが、ポリマーに直接MT-4またはOM10.1を接種した場合も、全ポリマーで、両細胞とも3日目以降増殖性は急速に低下し、皮膚モデルへの感染細胞接種と同様の結果だった。これらの感染細胞は付着性のNHDFとは異なり浮遊系の細胞であり、狭いポリマー内では、栄養補給が十分でなく細胞死を起こしたのであろうと考えられた。

MT-4はウイルスを細胞外に放出しないが、OM10.1はウイルスを細胞外に放出し、感染増殖する。従って、OM10.1の場合は、培養上清からHIVのウイルス量を容易に測定することができた(図5)。皮膚モデルにOM10.1を接種した場合は、全ポリマーで増殖性は3日目以降急速に低下したが、HIV-1p24抗原量は、6日目まで増加した(図5)。これはOM10.1の細胞死により細胞が破壊され、内部のウイルスが放出した為であらうと考えられた。今回の実験は、大量の感染細胞を接種した場合であり、ウイルス量が少ない場合は、PCRによるウイルス検出がより有効であらうと思われた。しかし、HIV-1p24抗原検出法は短時間(1時間以内)でウイルス量を検出できるため、ウイルス汚染の検出には有効な方法であり、他のウイルスにも応用できると考えられた。

## 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

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滅し、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6)。

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7)。

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(h

TERT)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繊維芽細胞(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。

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(図8)。この時使用した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。

細胞をPBS(-)で洗浄後、lysis bufferを加えて細胞抽出液を調製した。Luciferase Assay Reagent IIを加えルミノメーターでホタルルシフェラーゼ活性の発光量を測定した。引き続き、同じサンプルに対してStop & Glo Reagentを加え、同様な方法で、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、ホタ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、評価した。

hTERTプロモータールシフェラーゼコンストラクトの構造を図8に示した。ATG翻訳開始点の上流25塩基目をhTERTプロモーター領域の3'末端とし、図8に示したような様々な断片長のプロモーター欠失変異体をPCRにより調製し、ホタルルシフェラーゼ遺伝

子を有するプラスミド pGL3-basic に挿入し、それぞれのルシフェラーゼコンストラクトを構築した。

がん細胞株 A549 および正常繊維芽細胞株 TIG-1 について、hTERT mRNA の発現は、A549 において確認された。この hTERT mRNA の発現を転写レベルで解析するために、hTERT プロモーター活性を評価した。まず、図 8 に示したように、hTERT の ATG の上流領域(-1391bp~-25bp)を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミド(pGL3b-1391)を構築し、A549 がん細胞および TIG 正常細胞へトランスフェクションした。その結果、この-1391bp~-25bp の領域は、がん細胞に機能する hTERT のプロモーターであることが判明した。即ち、hTERT の発現制御は、mRNA の安定性のような転写後のレベルで制御されているのではなく、むしろ転写レベルで主に制御されていると考えている。また、pGL3b-1391 の hTERT プロモーター領域を一方向へ短縮した欠失変異体についても、同様のレポーターアッセイを行い、転写活性化能について検討した。その結果、がん細胞株 A549、HeLa、HepG2、および SK-MEL-28 において、様々なプロモーター断片間で、転写活性化能の違いが示された。特に、pGL3-286 のコンストラクトにおいて最も高く転写活性が誘導された。一方、プロモーター領域が-286bpよりも長いコンストラクト(pGL3-1119 ~ 583) に関しては、pGL3-286 のプロモーター活性と比較し、最大で約 40%の転写抑制効果が認められた。従って、この-1119bp~-286bp の塩基配列内には、hTERT プロモーターを抑制するエレメントが存在しているものと推測された(図 8)。

hTERT mRNA は、A549 がん細胞で

発現しており、hTERT のプロモーター活性化と一致した。TIG-1 正常細胞では、いずれも検出されなかったことより、hTERT は、主に転写レベルでその発現が制御されていると示唆された。また、様々な断片長の hTERT プロモーター欠失変異体を用いた実験より、hTERT の転写制御に関与すると推定されたシス-エレメントの存在が確認された。特に、pGL3-1119 の転写活性化能が著しく低下しており、このプロモーター領域内(-1119bp~-286bp)には、転写を抑制的に制御する転写因子が結合していると考えられる。

この hTERT プロモーターは、がん細胞に特異的なプロモーターである可能性が高い(図 8)。

hTERT コアプロモーター領域内(-286bp~-25bp)に c-Myc 結合部位である E-box が 2ヶ所存在した(図 9)。そこで、この E-box を介した c-Myc による hTERT プロモーター活性化機構の解析を行った。c-Myc の発現ベクターを A549 細胞へトランスフェクションし、hTERT コアプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼコンストラクト(pGL3b-286)におけるルシフェラーゼの発現量を評価した。その結果、c-Myc の発現誘導により、hTERT の転写活性が著しく増強した(図 9)。次に、2つの E-box に変異を導入したルシフェラーゼコンストラクト(pGL3b-286(EboxMut)) について hTERT の転写活性化を評価した。その結果、E-box に変異を導入したことにより hTERT の転写活性は約 80%抑制された。更に、c-Myc の応答性も消失していた。更に、c-Myc の応答性も消失していた(図 9)。次に、第 2イントロン上に存在する E-box クラスター領域の hTERT 転写活性化への関与について

評価した。E-box クラスターは図 10 に示したように、ATG より下流の+2.7kb ~+5.5kb に位置しており、E-box を含む約 30bp の長さの配列がタンダムに繰り返されている。従って、この領域はc-Myc による hTERT の転写活性化に関与していると推測される。E-box クラスター領域は、hTERT のコアプロモーターを含んでいないため、SV40 プロモーター制御下でルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現させるベクター (pGL3-Promoter) 内にこの領域を挿入した。この E-box クラスター領域に対する c-Myc の転写活性化効果を評価するために、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、すべての E-box クラスター (E-box1、E-box2、E-box3) について、c-Myc の強制発現によりその転写が活性化された (図 10)。

hTERT プロモーター内には、様々な転写因子の潜在的結合部位が多数存在していた。その中でも特に、細胞の分化、増殖と深く関係のある転写因子 MyoD の結合部位 (E-box、CANNTG) は非常に多く存在していた。また、-729bp にはガン抑制因子として機能する IRF-1 の結合部位も確認された。テロメラーゼ活性は細胞の分化に伴ってその抑制が認められた。また、ガン細胞特異的に発現していることから、上述の転写因子 MyoD および IRF-1 が hTERT の転写抑制に深く関与していると推測された。そこで、MyoD および IRF-1 の hTERT 転写制御への関与を解明するため、A549 細胞および HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによりその解析を行った (図 11)。A549 細胞、HepG2 細胞に対し、hTERT のコアプロモーター領域を含んだルシフェラーゼコンストラクト (pGL3b-1391、pGL3b-801、pGL3b-164) および MyoD

発現ベクターまたは IRF-1 発現ベクターを共導入したところ、hTERT の転写活性には変化が認められなかった (図 11、12)。つまり、MyoD および IRF-1 は、hTERT の転写には関与していないと示唆された。しかしながら、今回検討したプロモーター領域以外に、これら転写因子が作用する可能性も残されている。

**トランスフォーメーション確認試験** 表 3 に示すように、親株マウス BALB/3T3 A3111 株でプレートあたり 0.3 個の foci が、陽性対照の 3-MC 処理で 30 個の foci が観察されたのに対して、各形質転換巣では 2.3 個から 114.1 個の foci が観察され、ポリ乳酸上で分離された形質転換巣 (L11 および L21) の方がポリウレタン上で分離された形質転換巣 (A5 および A6) に比べて、悪性度が高いことが明らかとなった。A5 および A6 の foci は 3-MC で形成された foci にその形状は似ていたが、L11 および L21 の foci は細胞外マトリックスが溶解されたような形態を呈していた。

**DNA チップ**を用いる遺伝子発現解析合計 1176 の癌関連遺伝子について、DNA チップを用いて遺伝子発現の亢進と抑制を調べた。その発現がいずれかの形質転換巣で親株の5倍以上亢進していた 14 種の遺伝子を図 13 に示す。図中では、コード番号で遺伝子を示しているが、その名称は表 4 に示している。発現の亢進が顕著な遺伝子は、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 3 種であった。特に形質転換巣 L11 はこれら 3 種の遺伝子すべてにおいて、4 個の形質転換巣のうちで最も強くその発現が亢進していた。形質転換巣 A6 は他の形質転換巣と異なり、これら 3 種の遺伝子の発現の変化は顕著ではな

かった。

その発現がいずれかの形質転換巢で親株の 5 倍以上抑制されていた 25 種の遺伝子を図 14 に示す。コード番号と遺伝子名の対応表を表 5 に示す。発現抑制が顕著であった遺伝子は pleiotrophin、histidine triad nucleotide-binding protein、protein kinase C iota、および large multifunctional protease 7 をコードしている遺伝子であった。形質転換巢 L11 は最後の遺伝子以外の 3 種の遺伝子において 4 個の形質転換巢のうちで最も強くその発現が抑制されていた。発現亢進が著しかった遺伝子群でその変化が小さかった形質転換巢 A6 が、発現抑制が見られた遺伝子群のうち large multifunctional protease 7 については約 20 倍も変化していた。

次に DNA チップ上の癌遺伝子および癌抑制遺伝子 30 種についてその発現の変化を調べた(図 15)。変化が顕著であったのは、c-fos 癌原遺伝子、FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B、Jun 癌遺伝子で、形質転換巢 A5、L11、および L21 において顕著にその発現が亢進していた。ras、src、raf、MAP kinase、MEK、および p53 の発現はいずれの形質転換巢においても親株に比べて約 2 倍の亢進または抑制が認められた程度であった。

細胞外マトリックス関連遺伝子の発現プロファイルを図 16 に示す。HSP60、HSP65、HSPD1、mitochondrial matrix protein P1 precursor、60-kDa chaperonin、GroEL protein、および matrix metalloproteinase 9 は特にその発現が抑制されており、それは形質転換巢 L11 で顕著であった。

TGFβ1 および TGFβ2 についても解析したが、有意な発現の変化は認め

られなかった。また、現在、発癌指標の一つとなりうると考えられている細胞間連絡に重要なコネクシンについて、関連する 8 種の遺伝子の発現変化を調べた(図 17)。形質転換巢の悪性度との比較を行った結果、connexin43 ではその発現の抑制度と相関していることが明らかとなった(図 18)。

親株に対して、5 倍以上の発現の変化が認められた遺伝子を、形質転換巢ご

とに表 6 にまとめた。その中でも、10 倍以上の変化が認められたものは赤で記

載し、その変化の程度も括弧内に示した。いずれかの形質転換巢で、親株の 5

倍以上の発現亢進が認められた遺伝子は 14 種で、5 倍以上の発現抑制が認めら

れた遺伝子 25 種であった。形質転換巢 A5 では 7 種の遺伝子の発現亢進が認め

られたが、発現の抑制が明らかであったのは、large multifunctional protease 7 だ

けであった。Large multifunctional protease 7 は、今回解析した形質転換巢すべて

について共通して発現の変化が見られた。ただ一つの遺伝子である。形質転換

巢 A6 の発現亢進遺伝子は 4 個の形質転換巢中最も特異的で、他の 3 個の形質転換巢で共通に発現亢進が認められた c-fos 癌原遺伝子、Jun 癌遺伝子で有

意な変化が認められなかった。また、proliferin は発現亢進で、thrombospondin 1

は発現抑制で、親株の 10 倍以上の変

化が認められた。他の形質転換巢では、この2種の遺伝子について10倍以上の発現変化は認められなかった。

Large multifunctional protease 7はA6において最も強くその発現が抑制されていた。形質転換巢L11は発現の変化を示した遺伝子数が最も多く、またその変化の程度も強かった。特に発現の抑制が認められた遺伝子数は24種で、*c-fos* 癌原遺伝子および *Jun* 癌遺伝子は最も強く発現が亢進され、*histidine triad nucleotide-binding protein, protein kinase C iota* は最も強く発現が抑制されていた。形質転換巢L21では、*c-fos* 癌原遺伝子、*Jun* 癌遺伝子の発現が特に強く亢進され、*pleiotrophin, histidine triad nucleotide-binding protein, protein kinase C iota*、および *large multifunctional protease 7* の発現が抑制されていた。

遺伝子発現の変化と悪性度(トランスフォーメーション試験のfoci数)との間には前述の*connexin43*の他に、二つの遺伝子で有意な相関が認められた。それらは、細胞性腫瘍抗原 *p53* と *procollagen VI alpha 3 subunit* で、遺伝子発現と悪性度との間に負の相関が認められたが、いずれの遺伝子も発現の変化は5倍以下であった。

染色体数の変化 親株および各形質転換巢について、それぞれ20細胞について染色体数を計数したが、いずれの形質転換巢も約70本の染色体をもち、親株との間に大きな違いは認め

られなかった。

ポリウレタン材料上で分離された二つの形質転換巢(A5, A6)とポリ乳酸材料上で分離された二つの形質転換巢(L11, L21)と親株(A3111)についてDNAチップを用いる遺伝子発現解析を行った。確認のために実施した、トランスフォーメーション試験において、解凍した四つの形質転換巢は明らかに形質転換能を維持しており、その強さはA5<A6<L21<L11の順であることが明らかとなった。また、最も強い悪性度を示したL11が遺伝子発現の変化も最も顕著であることが判明した。

癌遺伝子および癌抑制遺伝子についてその発現の変化が顕著であったのは、*c-fos* 癌原遺伝子、FBJ骨肉腫癌遺伝子B、および *Jun* 癌遺伝子であった(図15)が、これらは、解析した遺伝子全体でも最も発現の変化が顕著なものであった。*c-fos* はげっ歯類の骨肉腫から分離された*v-fos*のホモログであるが、Wangらは、遺伝子改変マウスでの*c-fos*の過剰発現は、骨、軟骨、造血系細胞の発生に特に影響し、*c-fos*欠損マウス(*fos*<sup>-/-</sup>)で発育遅延、骨改変や歯の萌出の不良を伴う骨化石症の発症を報告している。FBJ osteosarcoma virusはマウスの自然発生骨肉腫から分離されたvirusであるが、このvirusを接種するとマウスの系統によって感受性に差がみられるが、接種部位およびその近辺の皮下に明らかに非常に固い、骨組織様の腫瘍の発症が観察されている。形質転換巢L11では親株の10.9倍、A5では7.8倍のFBJ骨肉腫癌遺伝子Bの発現亢進が認められたが、A6およびL21では発現の変化はなかった。形質転換巢L11およびL21において、親株の25.2倍の発現抑制を示した*pleiotrophin*は、神経細胞

突起促進因子または、線維芽細胞の発現促進因子として発見されたが、種々のヒト腫瘍でその発現が亢進していることが報告されている。また、佐藤らは、pleiotrophin は BMP 誘発異所性骨形成を制御しており、低用量 (10  $\mu$ g) の pleiotrophin の添加の方が、高用量 (50-100  $\mu$ g) 添加に比べて形成される骨量が増加したと報告している。A disintegrin-like and metalloprotease with TS-1 motif protein 1 (ADAM-TS) は亜鉛依存性蛋白質分解酵素ファミリーで、高発現したトランスクリプトが骨肉腫、黒色腫や結腸癌の生検や細胞で観察されている。

本研究での上記 4 種の遺伝子の発現は、すべて骨形成を促進する方向に変化しており、特に形質転換巢 L11 では 4 種すべての遺伝子が、四つの形質転換巢のうちで最も強く変化しており、L21 では c-fos と pleiotrophin が強く変化しており、A6 では pleiotrophin だけが若干変化していただけであった。

高分子材料の種類により、発現パターンに違いが認められるもののポリ乳酸上から分離された形質転換巢 L11 および L21 とともに、骨肉腫の発生に関連する FBJ 骨肉腫癌遺伝子 B および c-fos の発現が高いこと、またポリウレタンから分離された A5 でもこれらの遺伝子の活性が高かった。In vivo ラットでの発癌実験でもポリ乳酸では 50 匹中 22 匹が腫瘍を発生し、腫瘍中の 6 例では骨肉腫が認められたという。ポリウレタンではポリ乳酸に比べて腫瘍発生率は低いものの、骨肉腫の発生が報告されており、in vitro で得られた形質転換巢の遺伝子発現プロファイルは、in vivo での腫瘍発生強度や、骨肉腫発生を裏付けるものであった。

悪性度(トランスフォーメーション試験における foci 数)との相関を見た時、

顕著な相関を示したものはなかったが、表6に示すように、変化のあった遺伝子の数およびその程度を総合的に見る時、各形質転換巢の悪性度との相関が認められるようである。形質転換巢 A5 は最も悪性度が低かった(表6)が、遺伝子発現の変化という観点からは、発現抑制された遺伝子の数が最も少なかった。対照的に L11 は悪性度が最も強かったが、遺伝子発現の変化においても亢進、抑制ともその程度が最も強かった。特に、発現抑制された遺伝子の数は最も多かった。異物発癌において、重要な遺伝子として、我々が長年指摘しているコネキシン遺伝子については、その発現抑制の程度と悪性度とが相関した(図 18)。

#### 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

Wistar-imamichi ラットの胎齢 13、14、15、16、17 th の胎児前肢を切り出し固定し、Alcian blue 染色をした標本を図 19 に示した。15 th の肢芽器官で濃染された軟骨像が観察される(図 19)。

胎齢 14 th および 15 th 前肢を培地が入った培養ボトルにそれぞれ直接加えて回転培養すると指に相当する部分は、元に比べて細くなっているが、付け根の部分は、濃染された軟骨像が観察されたものの、機械的刺激により形態は変形していた(図 20)。次に、袋状 PP 膜内に胎児から切りだした前肢をいれて、袋の口をシーラーで閉じて、培地の入った培養ボトル内にいれて、回転培養すると、形状は袋なしの場合に比べて正常に近い形を残し、かつ、付け根部分は濃染した軟骨像が観察された(図 20)。そこで、この袋状 PP 膜は

形態維持能が期待されたので、in vivo 埋入試験に使用することとした。

14 th の肢芽器官を袋状 PP 膜内に入れて F344 ラットの腹腔内に埋入し、1 週間後、袋をとりだし、内部の肢芽器官を固定し、Alcian blue 染色した結果、形態は埋入時の原型を留めていなかった (図 21)。

図 22 は、Naive F344 ラットの血液中の CD4 と CD8 陽性 T リンパ球サブセットの割合を示した。コントロール群は、袋状 PP 膜のみを F344 ラットの腹腔内に埋入した結果であり、Test 群は、胎児肢芽器官を袋状内にいれ、埋入した時の結果である。Test 群では、CD8 陽性細胞が増加する傾向がみられた (図 22)。

そこで、次に、この袋状 PP 膜は、内部器官の形態維持能が劣ることから、修飾ポリウレタンで袋の外面を被覆化した後、異系 (Brown-Norway) ラットの肢芽器官を袋内にいれて、F344 ラットの腹腔内に埋入した結果を図 23、図 22 に示した。

図 22 の黒バーの test 群は、修飾ポリウレタンコート膜を用いた結果である。この場合、修飾ポリウレタン膜は、内部に組織を含む場合と入っていないもの (=含んでいないもの) との間で、CD8 が増加する傾向がなかった。しかし、PP 膜 (白抜きのバー) では、対照群に比べて、内部に組織を含む場合には、CD8 陽性細胞が増加した (図 22)。

CD4 に関しては群間で大きな差異はなかった (図 22)。袋内部の器官は、PP 膜内では、原型を留めていなかったが、修飾ポリウレタン膜内部の器官では、元の形態を維持していた (図 23)。

次に異種動物である ICR マウスに

ついて同様に PP 膜および修飾ポリウレタン膜を用いて解析した結果、CD4 細胞の T リンパ球はいずれの群でも変化はなかったが、PP 膜では、袋内に ICR マウスの肢芽器官をいれて埋入すると CD8 陽性 T リンパ球が増加する傾向がみられた (図 24)。しかし、修飾ポリウレタン膜での実験では (黒バー)、対照群に比べ、試験群では CD8 陽性細胞が減少していた。

次に、袋内部の器官を固定し、Alcian blue 染色した結果、やはり、PP 膜に比べて、修飾ポリウレタン膜の方が形態維持能が高いことが確認された (図 25)。

免疫担当器官である脾臓を移植器官として取り上げ、レシピエント側に生じる望ましくない免疫応答について、検討した。アロ移植では、埋植 12 週では、顕著な CD4 と CD8 のリンパ球が減少していた。作製した MPU-PP 膜を隔離膜として用いると、ドナーによるレシピエントのリンパ球の攻撃を Spleen を直接埋植した場合に比べ、若干の抑制は認められたが、Bag 群に比べて有意にリンパ球数が低下していた。しかし、MPU-PP 膜に脾臓をいれて埋入すると、レシピエントの TNF- $\alpha$  の減少が認められたことから、非特異的な炎症反応はこの膜の使用により、改善されることが明らかになった。INF- $\gamma$  は、Bag 群や spleen 群では、コントロール群に比べて減少していたが、Spleen+Bag 群では、コントロールと同レベルであった。レシピエントの Th1 細胞の機能は、MDU-PP 膜を隔離膜として使用することにより、膜内のドナーラットのリンパ球由来の物質や細胞による攻撃を受けにくいものと考えられた (表 7)。その他のサイトカイン

である IL-13 はいずれの群においてもコントロール群との間に大きな差異はみとめられなかったが、IL-4 は、Bag+spleen 群で増加していた(表7)。

#### 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

試験に使用した 3 物質の化学構造を図 28 に示した。

生分解性低分子量ポリマーである P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 をラット肢芽細胞軟骨分化培養系に添加し、7 日間培養後、アルシアンブルー染色を行った(図 29)。P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 は、60 μg/ml で著しい軟骨分化促進作用があることが明らかになった。P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 15 μg/ml でも、コントロールに比べて、アルシアンブルー染色性のプロテオグリカンが軟骨細胞からより多量に分泌されていることが明らかになった(図 30)。細胞の増殖に及ぼす影響及び軟骨分化に及ぼす影響を定量的に測定した結果を図 32 に示した。

その結果、P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 は、細胞増殖に対しては、コントロールの 20% 程度の有意な増殖阻害を示すことが明らかになった。しかし、軟骨分化には、逆に、濃度依存的に促進活性を示し、60 μg/ml でコントロールの約 4.5 倍増加していることが明らかになった(図 32)。

4 種の生分解性ポリマーと塩化スズの軟骨分化に及ぼす影響を調べた結果を表 8 にまとめた。4 種の材料では、PLLA5000 が最も軟骨分化促進作用が強く、増殖抑制作用のみを示すポリマーもあった(表 8)。

次に、ラット胎仔の中脳領域の細胞の神経分化に及ぼす影響を同じ化合

物を用いて検討した。ラット胎児の高密度培養系に種々の濃度の P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 を添加し、7 日間培養後、ヘマトキシリン染色を行った(図 29)。その結果、神経分化は、濃度が増加するにつれ、神経線維の数も減少し、神経叢も小さくなることが明らかになった(図 31)。P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 の神経分化および細胞増殖に及ぼす作用を定量的に調べた結果を図 32 に示した。軟骨細胞の場合に比べて、著しい細胞増殖の阻害とともに、神経分化への作用は、その増殖阻害よりも、より強力な阻害作用を示すことが明らかになった(図 32)。

次に、同じ種類の共重合体であるが、L-乳酸と ε-カプロラク톤の配合比を 50:50 にかえて合成した P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 について、神経分化に及ぼす影響を調べた(表 9)。P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 の場合には、P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 でみられたような著しく強い神経分化阻害作用は検出されなかった。P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 による細胞増殖への阻害作用に比べ、神経分化への阻害作用も弱いことが明らかになった(表 9)。

生分解性ポリマーによる神経分化に及ぼす影響について、PLLA5000 および PGA3000 についても評価した。更に、重合時の触媒として使用される塩化スズについて同様に影響を調べた結果を表 9 にまとめた。試験化合物の濃度が 60 μg/ml で比較した時、神経分化阻害作用は塩化スズ > P(LA-CL)<sub>25</sub>10000 > PGA3000 > P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 = PLLA5000 の順に強いことが明らかになった。

また、細胞増殖への影響もほぼこの順の強さで阻害することが明らかになった(表 9)。スズを触媒として合

成した共重合体については、ポリマー中のスズの量を測定したが、その含量は、スズ単独では、何ら影響を示す程度の濃度ではなかった。

組織工学材料として、様々なタイプの生分解性ポリマーが使用され、研究されているが、代表的な生分解性ポリマーの分解産物である低分子量 $\epsilon$ -カプロラクトンとL-乳酸共重合体等を用いて、ヒト軟骨前駆細胞の高密度培養での分化および増殖に及ぼす作用を調べ、ラット由来細胞との反応評価の違いについて、検討した。

ポリ乳酸と $\epsilon$ カプロラクトンとの共重合体(重量比75:25)分子量10000のもの{P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000}、ポリ乳酸と $\epsilon$ カプロラクトンとの共重合体(重量比50:50)分子量10000のもの{P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000}は、合成したものを使用した。軟骨細胞としては、ヒト関節軟骨を用いて、高密度培養法により、ヒト関節軟骨の分化に及ぼす影響を調べた結果、P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000では、軟骨分化は抑制され、コントロールの90%程度の分化に留まった(図33)。ラット胎児軟骨前駆細胞では、顕著な分化促進作用を認めたことより、細胞の採取組織や、種の違いにより、オリゴマーに対する反応は、異なることが明らかになった。一方、P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000を試験した結果では、ヒト軟骨細胞は、コントロールと同程度の分化レベルであった(図34)。しかし、細胞の増殖に及ぼす影響は、P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000 とP(LA-CL)<sub>50</sub> 18000 は、ヒト軟骨細胞に対して、7-5%程度の増

殖抑制が観察されたが、ラット胎児軟骨前駆細胞では、P(LA-CL)<sub>25</sub> 10000でコントロールの25%阻害、P(LA-CL)<sub>50</sub> 18000では、コントロールの40%阻害を示した(図33、34)。

フラワーレンは、マウスで著しい軟骨分化を促進することから、水溶性フラワーレンC60 DMAについて調べた。ラットでは、やはり軟骨分化を2倍程度に促進していたがヒトでは、逆に軟骨分化阻害作用が観察された(図35)。表10にこれら3物質でのヒトおよびラット軟骨分化過程に及ぼす影響をまとめた。

同じ濃度レベルの共重合体オリゴマーについて比較した結果では、ラットおよびヒト細胞間では、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。

組織工学に使用される生分解性材料を骨格材料としたとき、細胞が骨格材料に付着し、増殖する過程で材料を分解し、その結果、生成される低分子量ポリマーの影響を評価することは重要であると考えられる。しかし、この方面の研究は殆どなされていない。

マウス軟骨幹細胞であるATDC5はインシュリン存在下で14日間培養することで、アルシアンブルーで染色されるプロテオグリカン陽性の軟骨細胞へ分化した(図36)。ポリ乳酸PLLA(MW=5,000)を維持培地に添加して14日間培養することで、濃度依存的にアルシアンブルーで染色されるプロテオグリカン陽性軟骨細胞への分化が上昇した(図36)。PLLA添加で軟骨細胞の分化マーカーであるII型コラーゲンmRNA発現が誘導されることがRT-PCR法で確認された(図

37)。これらの結果から PLLA 単独で ATDC5 の軟骨分化を誘導できることが示唆された。

インシュリン、PLLA で分化誘導した ATDC5 細胞から分化誘導開始 0 日目、5 日目および 11 日目に全 RNA を調製し、特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法で II 型コラーゲン mRNA 発現の時期を検討した。その結果、PLLA ではインシュリンより早期に II 型コラーゲン mRNA 発現が観察された(図 38)。一方、プロテオグリカンの産生においてはインシュリンの方が PLLA よりも亢進していた(図 39)。これらの結果から、PLLA とインシュリンでは ATDC5 の軟骨分化誘導における作用が一部異なっていることが示唆された。

PLLA とインシュリンでは ATDC5 の軟骨分化誘導における作用が異なっているかどうか検討するために、インシュリンによる軟骨分化誘導効果がプラトーになるインシュリン濃度で PLLA を添加し、その効果を見た。その結果、インシュリン飽和状態でも PLLA 添加による軟骨分化促進効果が観察された(図 39)。この結果から、インシュリンと PLLA は一部異なるシグナル経路を介して軟骨分化を誘導している可能性が示唆された。

ATDC5 細胞をインシュリン存在下、14 日間培養して軟骨細胞に分化培養後、細胞質画分を調製し、トランスグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、インシュリン添加の有無にかかわらず、同程度のトランスグルタミナーゼ活性が観察された(図 40)。この結果から、ATDC5 細胞では、軟骨分化の前後で、細胞質内のトランスグルタミナーゼ酵素の発現量に変

化がないことが示唆された。

マウステラトカルシノーマ細胞株 AT805 由来の軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞は、インシュリンで軟骨細胞に分化することが知られている。インシュリンによる軟骨細胞分化の過程では、ATDC5 細胞は細胞増殖が促進され、細胞の凝集・軟骨結節の形成が見られる。このインシュリンによる軟骨細胞分化誘導の過程で軟骨結節を形成しない細胞は軟骨細胞には分化しない。このことから、インシュリンが直接軟骨分化を誘導するのではなく、インシュリン刺激によって誘導される因子によって、軟骨分化が進行するものと考えられる。実際、BMP-4 を添加することで、ATDC5 細胞は軟骨結節を形成することなく軟骨細胞へと分化する。本研究では、生分解性合成高分子であるポリ乳酸(PLLA)が ATDC5 の軟骨分化を誘導・促進することを明らかにした。インシュリン非存在下で PLLA を添加すると、ATDC5 細胞は凝集し、軟骨結節を形成して軟骨細胞へと分化する。PLLA はインシュリンと同様な ATDC5 細胞の軟骨分化を誘導するが、軟骨細胞の分化マーカーの発現時期に違いが見られた。このことから、PLLA による軟骨分化誘導のシグナル経路はインシュリンによる軟骨分化誘導と一部異なる可能性が示唆された。今までは単なる培養基質と考えられてきた PLLA などの生分解性高分子からのシグナルによって細胞が分化・増殖を誘導することが明らかになった。今後、このシグナルを仲介する分子群を同定することによって、より効率のよい軟骨培養基質の開発が進むと期待される。

軟骨分化の新たなマーカー分子の

検討を行った。トランスグルタミナーゼは肥大軟骨部位での発現上昇が観察されている。また、軟骨を形成する細胞外マトリックスの主成分である II 型コラーゲンはトランスグルタミナーゼの役割と軟骨細胞の分化マーカーとしての評価を行うために、分化誘導処理前後におけるトランスグルタミナーゼ活性を測定した。しかし、期待に反して酵素活性に差は見られなかった。トランスグルタミナーゼの酵素活性はカルシウムイオン濃度に依存しており、通常の細胞質内の低カルシウムイオン環境下では酵素活性は発揮されない。更に、軟骨組織部位ではトランスグルタミナーゼは細胞外に何らかの機構で分泌され、II 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスの架橋に貢献していると考えられている。そのため、トランスグルタミナーゼ活性を軟骨分化の指標とするためには、細胞外に分泌されたトランスグルタミナーゼの酵素活性を測定する新たなアッセイ法の開発が不可欠である。また、組織型トランスグルタミナーゼは G タンパク質としての活性も併せ持つ多機能タンパク質である。そのため、タンパク質の架橋以外の機能における軟骨分化への関わりについても検討する必要があると思われる。

#### D. 考察

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

通常の実験室レベルで使用されている市販ヒト細胞 3 種について、販売元が陰性であることを確認している HCV、およびそれ以外のウイルス 4 種について、汚染状況の有無を調べてみた。その結果、我々が入手したヒト細胞 3 種については、いずれも検出限界

以下であった(表1)。EBV、CMV、HSV、パルボ B19 は、いずれも、ヒトに潜伏感染する可能性がある。例えば、臓器移植などの免疫不全状態では、EBV 感染 B リンパ球の増殖を細胞性免疫が抑制できないために、リンパ腫を形成する。日和見リンパ腫は腫瘍のオリゴナルな性格、EBV 発現が *in vitro* 不死化リンパ球と同じであることから、宿主の免疫が働かなければ EBV 感染リンパ球が *in vitro* におけると同様に増殖し、腫瘍を形成していることを示しているという。また、EBV は、種々の悪性腫瘍との関連が指摘されている他に、臓器移植などの免疫抑制状態で発症する致命率の高い EBV 関連リンパ増殖症 (EBV-LPD) の原因ウイルスとして近年問題になっており、EBV 感染症の制御においては、抗体などの液性免疫よりも CD8 陽性の細胞障害性 T リンパ球 (CTL) による感染細胞の破壊が疾患終息の鍵となるといわれている。葛島らは、ベッドサイドでリアルタイムに患者の EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を測定し、治療選択に必要な情報を提供した臨床応用例の発表をおこなっている。

ヘルペスウイルスの潜伏感染からの再活性化が、現代医学の進歩による以下の 3 局面においておこりやすくなっているという。第一に、臓器移植が、移植片の拒絶を予防するために、強い免疫抑制を必要とする。第二に、細胞毒性の強い抗癌剤を用いた化学療法または放射線照射、第三に、以前には生きられなかった強い先天性免疫不全症候群の小児が救われるようになったことだといわれている(4)。また、これらの要因のほか、AIDS と癌(特にリンパ腫)という疾病要因も加わる。大量の輸血(または、血漿透析)が救命