

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

骨髄由来の間葉系幹細胞と生分解性ポリマーを用いた
細胞移植

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成15（2003）年 4月

目 次

I総括研究報告書	1
骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植.....	3
梅澤 明弘	
II分担研究報告書	7
1, 遺伝子導入による細胞の寿命延長に関する研究	9
清野 透	
2, 細胞と足場を用いた臨床応用の検討に関する研究.....	11
大串 始	
3, 治療実験を含む臨床応用への検討.....	13
戸口田 淳也	
4, 足場への細胞応用、細胞分化誘導に関する研究.....	17
牛田 多加志	
5, 遺伝子導入効率に関する基礎的研究	19
渡辺 研	
6, 足場の製剤化に関する研究	21
大川 広行	
III研究成果に関する一欄表.....	23
IV研究成果の刊行物・別冊.....	33

I 総括研究報告書
骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植
梅澤 明弘

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
総括研究報告書

骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植に関する研究

主任研究者 梅澤明弘 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 部長
研究協力者 宇山 太郎（財団法人医療機器センター・リサーチレジデント）
崔 昌浩（財団法人医療機器センター・リサーチレジデント）
徐 明利（財団法人医療機器センター・リサーチレジデント）
今林 英明（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
槌谷 宏平（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
松本 智志（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
水村 珠青（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
竹田 征治（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
森 泰昌（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
肥田 直子（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
井尻 旬子（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
伊藤 愛主（国立成育医療センター研究所・共同研究員）
多喜 裕子（国立成育医療センター研究所・共同研究員）

研究要旨

骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。先天性・後天性の難治性骨欠損に加え加齢・閉経による骨粗鬆症、炎症性疾患による骨形成能低下など骨組織の再生医療が待ち望まれている疾患が多々存在する。多くの骨再生に関する治療法が検討されているものの、既に骨形成能の低下した病態への画期的な治療方法は未だないのが現状である。近年の再生医学研究より組織構成要素である細胞が治療材料となり得る可能性が示されている。しかし、臨床応用のためには移植細胞のコントロール、移植方法の確立といった問題を解決する必要がある。本研究では、ヒト骨髄間葉系細胞が多分化能を有する状態を保つ培養条件、方法を確立し、それらの細胞に遺伝子を導入することにより細胞寿命の延長、移植に必要な細胞量の確保をはかる。生分解性ポリマー（特許、高分子化合物多孔質複合構造体及びその製造方法 牛田多加志 出願番号：特願 2000-349294）を足場として骨への分化能、再生能、整形性に関する検討を行なう。申請者らは、既にマウス骨髄間葉細胞と生分解性ポリマーを用い骨折、偽関節の細胞治療モデルマウスを

作製することに成功しており、その成果を本研究に応用することが可能である。また共同研究者である大串らにより、これまで骨髄間葉系細胞無機人工骨を用いての骨再生に多くの知見を有し医薬品 GCP 基準に合致する施設の立ち上げを既に終了しており、上記モデルを臨床応用する準備はできている。ヒト細胞の増殖をコントロールし移植への系を確立することにより、骨難治性疾患に対する移植医療の新たなパラダイムを獲得する。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト間葉系細胞の寿命を延長することにより細胞を増殖させ、生分解性ポリマーの足場を併用し広範な骨欠損、全身性の骨形成能低下状態の患者に対する新たな細胞治療法を開発することである。具体的には、ヒト骨髄間質細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、遺伝子導入による細胞寿命の延長の検討を行う。それらの細胞を生分解性ポリマーの足場と併用し自家、及び他家移植モデルを作成する。これらの結果に基づき、細胞、及び足場の製剤化の検討、臨床への探索的研究へ着手する。

B. 研究方法

Bone tissue engineering の有用な細胞源である骨髄間質細胞の寿命は有限であり、出来得る骨組織量もおのずと制限される。遺伝子導入による細胞の寿命延長は大量の細胞を得るひとつの可能性を持った手法と考えられる。我々は90歳の患者骨髄より確立した骨髄間質細胞をクローニングし得られた細胞に遺伝子操作による細胞寿命延長を行い、この細胞の骨再生能力について *in vitro* および collagen hybrid PLGA mesh を用いた免疫不全マウス移植8週における組織像

の検討を行った。

C. 研究結果

in vitro での骨分化誘導では導入遺伝子の種類による差異は見られるものの von Kossa 染色性細胞の出現、マーカー遺伝子の発現が確認された。*In vivo* において β TCP 及び BMP-4 の複合化により新生骨の形成を認めた。この短期間においては細胞の腫瘍性増殖は確認されなかった。

D. 考察

1988年 Maniatiopoulus らは、デキサメタゾン等を含む培地でのラット骨髄細胞を培養することにより骨様組織が形成されることを報告した。本研究の共同研究者である大串らは、同組織に細胞外マトリックス産生、骨芽細胞活性を同定した。さらに大串らは、無機人工骨とともに骨髄間質細胞を培養することにより人工骨内の多孔質内に培養骨が形成され、動物実験においても移植後1週間で有意な骨形成を生ずることを明らかにとした。ヒト骨髄間葉系細胞においても同様にヌードマウスへの移植において同様の骨形成能が検証されている。しかしながらヒト骨髄間葉系細胞は、現在までの方法で

は必要な量の細胞数を得るには至らず、広範な欠損に対する再建や骨粗鬆症、慢性関節リウマチに代表される自己の骨再生能の低下した患者に対する治療法としての限界があった。

本研究の推進により、①ヒト骨髄間葉系細胞および生分解性ポリマーの足場を用いた骨再生法の確立 ②骨再生能力低下のある患者に対する同種他家細胞を用いた骨再生法の確立 ③ヒト骨髄間葉系細胞の寿命延長、増殖法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、それらの方法の安全性、科学性、倫理性の確立することが可能となる。

本研究の共同研究者である清野らにより発見された遺伝子を導入することによって、従来、困難であった腫瘍化を伴わないヒト細胞の寿命延長、増殖が可能となりつつある。また共同研究者である牛田らの開発した生分解性ポリマーを足場とすることで、より整形性が高くなり、広範な骨欠損を再建することが可能となる。これらの技術を応用することによって、マウスモデルにおける治療効果の評価をするとともに、さらなる改善策、新たなプロトコールの考案をはかり、治療モデルとしての科学性、倫理性を確保し、臨床応用を図る。

E. 結論

寿命延長骨髄間質細胞が *in vivo* において骨分化能を保持していることが確認された。

F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

G. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。ヒト由来細胞に関しては、国立成育医療センター倫理委員会により承認された細胞のみを使用し、それらの倫理申請事項を厳守する(国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認)。実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して(動物実験委員会に現在、申請中)研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

H. 研究発表

Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, in press.
Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and Umezawa, A.: Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocr*, in press.
Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A.: Up-

- regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 22(1): 1-9, 2003.
- Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J.-i., and Umezawa, A.: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic- co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003
- Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J., Yamada, T., Umezawa, A., and Hata, J.: Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (Wt1) mutation and the histological findings in Wilms tumor (WT). *J Med Genet.* 39(12):E83, 2002
- Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology international*, in press,
- Shibata, R., Umezawa, A., Takehara, K., Aoki, D., Nozawa, S., Hata, J.: Primary carcinosarcoma of the vagina, *Pathology Int.* in press,
- Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, and Kasugai S.: Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62(2):292-298, 2002.
- Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Umezawa, A., Hata, J., and Fukuuchi, Y.: Expression of interleukin-6 in cerebral neurons and ovarian cancer tissue in Trousseau syndrome. *Clin Neuropathol.*, 21 (5): 232-235, 2002
- Ogawa, S., Matsumura, S., Yoshikawa, T., Satoh, T., Kumagai, H., Mitamura, H., Iwanaga, S., and Umezawa, A.: A case of dilated cardiomyopathy with end-stage heart failure treated by prolonged continuous hemodiafiltration. *Keio J Med.* 51 (3): 165-177, 2002
- Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Toyama, Y., Hata, J., and Umezawa, A.: Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing's sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 61-71, 2002 (Tables are corrected in *BBRC*, 295: 573-574, 2002)
- Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H: Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 277(46):43730-4, 2002.
- Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62(2):292-8, 2002.
- Hakuno, D., Fukuda, D., Makino, S., Konishi, F., Tomita, Y., Manabe, T., Suzuki, Y., Umezawa, A. and Ogawa, S.: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 105: 380-386, 2002
- Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T.: Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 118: 199-204, 2002
- 森泰昌、今林英明、梅澤明弘：再生医学と幹細胞—成体幹細胞、*日医雑誌*、129(3): 307-312, 2003
- 槌谷宏平、松野丈夫、梅澤明弘：間葉系幹細胞、*日本医学会新聞* (2523), 2003年2月17日 (4)
- 梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医療、*慶應医学部新聞* (615), 2003
- 竹田征治、梅澤明弘：筋ジストロフィーに対する再生医療、*医学のあゆみ*、204(3): 179-182, 2003
- 梅澤明弘：発生・細胞分化過程におけるクロマチン構造と遺伝子発現、*実験医学「細胞分化機構とエピジェネティクスの解明」*、20 (15): 2206-2211, 2002
- 梅澤明弘：骨芽細胞から神経への転換、*最新医学*、57 (7): 1640-1647, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞、*再生医学再生医療、現代化学増刊*、41: 16-23, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞による臓器再生-その表面マーカーに着目する- *化学と生物*、40(6): 362-369, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞、「生活習慣と遺伝子疾患」*メディカルレビュー社*、pp255-257, 2002
- 梅澤明弘：再生医療、*小児科臨床*、55 (5): 844-846, 2002
- 梅澤明弘：幹細胞とエピジェネティクス、*Molecular Medicine*, 39 (7), 816-822, 2002
- 桜田一洋、梅澤明弘：間葉系幹細胞と再生医学、*わかる実験医学シリーズ「再生医学がわかる」*、pp84-92, 羊土社、2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞をもちいた再生医療研究 *分子細胞治療* 1(1): 31-37, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞 *ゲノム医学* 2(1): 87-94, 2002
- 梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医学、*DOCTER'S MAGAZINE*, 33: 40-41, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞、*医学のあゆみ*、200(13):1127-1226,2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell)による造血再生 *血液・腫瘍科* 44: 126-136, 2002
- 梅澤明弘：間葉系細胞による臓器再生、*化学と生物*、40(6):362-369,2002
- 五條理志、梅澤明弘、秦順一：多能性体性幹細胞としての間葉系幹細胞 *最新医学* 57(1): 38-46, 2002
- 五條理志、梅澤明弘：間葉系幹細胞の分化制御機構 *炎症と免疫* 10(1): 13-18, 2002
- 梅澤明弘：細胞不死化・臓器再生・置換から寿命延長の可能性をさぐる (4章-3, pp114-120) 「老化研究が分かる」(編集/井出利憲) 羊土社, 2002
- 浦野野彦、梅澤明弘、秦順一：Ewing 肉腫と PNET、*病理と臨床*、14 (臨時増刊号) : 188-192, 2002

Ⅱ 分担研究報告書

1, 遺伝子導入による細胞の寿命延長に関する研究

清野 透

2, 細胞と足場を用いた臨床応用の検討に関する研究

大串 始

3, 治療実験を含む臨床応用への検討

戸口田 淳也

4, 足場への細胞応用、細胞分化誘導に関する研究

牛田 多加志

5, 遺伝子導入効率に関する基礎的研究

渡辺 研

6, 足場の製剤化に関する研究

大川 広行

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の不死化に関する研究

分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所 ウイルス部 部長

研究要旨

ヒトの正常体細胞を培養すると一定回数分裂した後増殖を停止する。そのためヒト体細胞を用いた再生医療の研究において、必要な十分量の細胞数を得るのは困難であり、再現性を確認するのも一般に困難である。本研究ではヒト正常体細胞の不死化機構を解析すると共に、これらをできるだけ正常なまま不死化する技術を開発し再生医療の研究に資することを目的とする。今年度はヒト骨髄由来間葉系幹細胞が増殖停止に至る分子機構を解析すると共にそれに拮抗する遺伝子を導入し不死化することに成功した。本研究で不死化された細胞は梅澤らにより多分化能を維持していることが既に確認されており将来の臨床応用に向けた基盤技術の開発を可能にするものである。

A. 研究目的

骨髄由来の間葉系細胞を遺伝子導入により不死化し多分化能を維持した骨髄間葉系幹細胞株を樹立し、将来細胞移植による再生医療をめざした基盤研究に資する。また、細胞不死化機構を明らかにし臨床応用において理想的な遺伝子導入を伴わない細胞延命増殖の技術開発の可能性を検討する。

B. 研究方法

ヒト骨髄由来の間葉系細胞を用いて細胞老化にいたる細胞周期関連遺伝子群の発現を調べ増殖停止に至る分子機構を検討すると共に、それらに拮抗する種々の遺伝子を導入し細胞が延命・不死化するか否かを検討する。不死化した細胞が間葉系幹細胞の性質を維持しているかどうかを梅澤らが既に確立した方法を用いて確認する。

（倫理面への配慮）

ヒト骨髄間質細胞を本研究に使用するにあたり慶應大学医学部倫理委員会承認(13-11)を得ている。

C. 研究結果

本研究で骨髄由来ヒト間葉系幹細胞はES

細胞などと異なりテロメラーゼ活性が存在せず理論的にテロメア短縮による絶対寿命が存在することが確認された。また、テロメラーゼ触媒サブユニットTERTを導入しテロメラーゼ活性を誘導しても、延命できないことが示された。この時、乳腺上皮細胞などと同様にRb経路を活性化するp16Ink4aの発現増加が見られ、p16の発現上昇によるRb経路の活性化が培養皿上での寿命を規定していることが示された。Rb/p16経路に拮抗するHPVのE7の導入や内在性遺伝子であるbmi-1の高発現により細胞は延命しさらにp53経路に拮抗するHPVのE6の導入により細胞は長期間安定に増殖できるようになった。しかし、これらの遺伝子導入だけではテロメラーゼ活性は誘導されず、やがてクライシスと思われる細胞死を迎えた。延命した細胞に予めTERTを導入しテロメラーゼを活性化した細胞ではクライシスは見られず事実上、不死化した。これらの細胞は梅澤らにより間葉系幹細胞の多分化能の内、少なくともいくつかを有していることが確認されている。

D. 考察

ヒト骨髄間質細胞の不死化にはテロメラーゼ活性の誘導の他にRb/p16経路の活性化阻止が必要であることが実験的に確かめられた。その背景となる主たる分子機構はテロメア長の短縮とp16Ink4aの発現増加によるものであることが明らかとなった。将来、臨床応用をめざす上でp16Ink4aの発現増加機構を解明し遺伝子導入によらないp16Ink4aの発現増加阻止と同じく遺伝子導入によらないテロメラーゼの活性化が鍵となることが強く示唆された。これらは、理論的に可能であり再生医療にとって理想的な自己体細胞の培養を遺伝子に傷を付けることなく無限増殖させる技術は開発可能であることを示すことができたと考える。

E. 結論

ヒト骨髄間葉系幹細胞を不死化するにはテロメラーゼ活性の誘導とRb/p16経路の活性化阻害が必要であり、遺伝子導入による方法は本研究により確立された。また、遺伝子導入によらない技術の開発も可能であることが示された。

F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換えDNA安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

G. 研究発表

1. Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Yamada, J., Hara, S., Nakagawa, M., Shinoda, J., Sakai, N. Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp. Cell Res.* 273:157-168, 2002.
2. Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T., Tsurumi, T. Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 277:10354-10361, 2002
3. Okamoto, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Nakamata, T., Hosaka, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Kiyono, T., and Toguchida, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295:354-61, 2002.
4. Nakamura, H., Fukami, H., Hayashi, Y., Kiyono, T., Nakatsugawa, S., Hamaguchi, M., Ishizaki, K. Establishment of Immortal Normal and Ataxia Telangiectasia Fibroblast Cell Lines by Introduction of the hTERT Gene. *J Radiat. Res.* 43: 167-174, 2002.

5. Handa, K., Saito, M., Yamaguchi, M., Kiyono, T., Sato, S., Teranaka, T., Narayanan, A.S. Cementum matrix formation in vitro by cultured dental follicle cells. *Bone*, 31: 606-11, 2002.
6. Kudoh, A., Fujita, M., Kiyono, T., Kuzushima, K., Sugaya, Y., Izuta, S., Nishiyama, Y., Tsurumi, T. Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication. *J. Virol.* 77: 851-861, 2003.
7. Fujita, M., Ichinose, S., Kiyono, T., Tsurumi, T., Omori, A. Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant b-actin. *Oncogene*, 22: 627-631, 2003.
8. Bruemmer, D, Yin, F., Liu, J., Kiyono, T., Fleck, E., van Herle, A., Graf, K., Law, R. E. Atorvastatin inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.* in press.

1. 清野 透 「老化研究の最前線」第6章 DNAウイルスと老化 石川冬木編, シュプリンガー・フェアラーク東京, pp59-66, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

細胞と足場を用いた臨床応用の検討に関する研究

分担研究者 大串 始

産業技術総合研究所
ティッシュエンジニアリング研究センター

研究要旨

フローサイトメトリー（FCM）に基づく効率的な分化骨芽細胞の分取を試みた。モデル細胞として HOS 細胞を用い、細胞集団の中から、アルカリフォスファターゼ活性の高い集団を得ることが出来た。回収純度は 99%以上、回収後の細胞生存率は 90%以上であった。このように、骨芽細胞を選択的に採取する技術が確立され、この分離細胞と種々生体材料の複合化により、高効率の骨再生技術に展開できうと思われる。

A. 研究目的

骨組織再生研究において、骨芽細胞や骨マトリックスを用いた研究がおこなわれつつあり、骨芽細胞の骨化能を利用した再生医療への応用が期待されている。骨髄中には間葉系幹細胞が含まれていることが明らかになっており、各種分化誘導因子の存在下で培養すると、骨芽細胞や軟骨細胞をはじめ、脂肪細胞、腱細胞、筋肉細胞などに分化することが報告されている。また、骨髄はヒト ES 細胞と異なり、大きな倫理的障壁が回避できることから、再生医療における細胞供給源として非常に注目されている。骨芽細胞の分化誘導についてさらに言及すると、*in vitro* 培養細胞そのものでは、強度のある骨再生は現段階で不可能であるという問題点を持つ。よって、人工材料上で間葉系細胞から分化させた骨芽細胞、および骨基質を分化誘導できれば、そのハイブリッドは人工材料による適切な強度と骨芽細胞による骨形成能を合わせ持ったマテリアルとなり、生体内でより早期の新規骨形成や、確実かつ強固な生体骨—人工材料間の固着が期待できる。この点において、我々は間葉系細胞[1]やこの細胞と種々の材料との複合体研究[2-4]について報告しているが、骨形成の効率は理想的な状態ではない。そこで、より骨形成に適した細胞利用、より細胞に親和性のある人工材料を

組み合わせた高効率に骨を誘導できる再生培養骨の作製が本研究目的である。

B. 研究方法

上記のように、骨芽細胞と人工材料の複合体作製をおこなうには、骨芽細胞が効率よく分取することが必要とされる。そこで、骨芽細胞様細胞を用いて、フローサイトメトリー（FCM）に基づく効率的な分化骨芽細胞の分取を試みた。

HOS 細胞は、コンフルエントになると分化誘導因子の存在下で ALP 活性が上昇し、カルシウム沈着が促進するなど、骨芽細胞と類似した挙動を示すことが知られている。そこで我々は、HOS 細胞 (Osteosarcoma, ATCC No. CRL-1543) を骨化のモデル細胞として用い、以下の研究を行った。まず FITC 標識した抗ヒト骨由来 ALP 抗体にて接着性の HOS 細胞を浮遊状態にして免疫染色後、FCM 解析をおこない、ALP 抗体に強く反応した細胞群のセルソーティングを行った[5]。そして、コントロールとしてソーティングを行わなかった細胞を用意し、2群の細胞を同一条件で培養した。

C. 研究結果

HOS 細胞の免疫染色像から、HOS 細胞は細胞膜表面が ALP 抗体で確かに染色さ

れることが分かった。FCM 解析の結果、HOS 細胞には抗 ALP 抗体に強く反応する細胞集団と弱く反応する細胞集団の 2 種類が存在することが分かった[5]。その割合は、培養開始直後の HOS 細胞を用いた場合(約 80%コンフルエントの状態)、約 64%が強く反応する集団、約 31%が弱く反応する集団であった。これらの細胞集団のうち、ALP に強く反応した細胞をソーティングしたところ、回収純度は 99%以上、回収後の細胞生存率は 90%以上であった。

D. 考察

ここに紹介したセルソーティングによる細胞分取、骨分化誘導システムは、ヒト初代培養骨髄細胞にも応用可能であり、我々はすでにヒト間葉系細胞を用いての *in vitro* 実験から有益な結果を得ている。実際の臨床応用にこの技術をすぐさま応用することは安全性などの面をクリアする必要があるが、本手法が骨化誘導のみならず、他の再生骨組織構築のための細胞ソースを提供する基盤技術になりうると考え、さらなる研究展開を進めている。

文献

1. M. Ikeuchi, Y Dohi, K Horiuchi, H Ohgushi, T. Noshi, T. Yoshikawa, K. Yamamoto, M Sugimura, Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Promotes Osteogenesis within Atelopeptide Type I Collagen Solution by Combination with Rat Cultured Marrow Cells J.Biomed. Mat. Res:60,61-69,2002
2. T Noshi, T Yoshikawa, Y Dohi, M Ikeuchi, K Horiuchi, K Ichijima, M Sugimura, K Yonemasu, H Ohgushi. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the *in vivo* osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. Artif Organs.25(3):201-8, 2001
3. M.Akahane, H.Ohgushi, S.Kuriyama, T.Akahane, and Y.Takakura Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells J. Orthop. Scie, 7,677-682, 2002
4. A.Ito, H. Kawamura, M. Otsuka, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, K Ishikawa, K Onuma, N Kanzaki, N. Ichinose, Zinc-releasing calcium phosphate for stimulateing bone formation. Materials Science and Engineering C 22: 21-25,2002
5. Kotobuki N, Hirose M, Funaoka H, H. Ohgushi Flowcytometric analysis of human osteoblastic cells expressing bone specific alkaline phosphatase. Key Engineering Materials 240-242: 729-731, 2003

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

治療応用を含む臨床応用への検討

分担研究者： 戸口田 淳也

京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野・教授

研究要旨

骨髄由来間葉系細胞を用いた組織再生の臨床応用を目指して、本年度はその基礎となる骨髄由来間葉系細胞の増殖分化能に関する *in vitro* の解析を行った。

1. 間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)の増殖分化能の解析

ヒト MSC は培養早期に細胞周期制御因子である p16 及び p21 の発現が亢進し、かつテロメラーゼ活性を有さないため増殖停止に至ることが判明した。そこで多分化能の本質を解析するために、遺伝子導入により不死化 MSC を樹立し、単一細胞由来のクローンの分化能を解析した。その結果、多分化能を有するクローンは極少数であり、ヒト MSC は分化能に関して多様な細胞集団であることが明らかになった。

2. 分化方向決定プロセスにおけるエピゲノム因子の関与

MSC より各最終分化細胞への分化方向決定機構に関連した研究として、骨と軟骨の両者に分化する能力のある骨肉腫細胞を用いて、軟骨特異的遺伝子であるコンドロモデュリン-I (ChM-I) 遺伝子の発現制御機構の解析を行った。その結果 ChM-I 遺伝子の発現制御にはシスエレメント結合転写因子に加えて、DNA のメチル化、ヒストンのメチル化及びアセチル化のエピゲノム因子が関与していることが明らかになり、骨肉腫細胞の分化段階に応じてこれらの因子が発現を可逆的あるいは非可逆的に制御している機構が存在している可能性を示す結果が得られた。

A. 研究目的

骨髄由来間葉系細胞を用いて組織再生を計るためには、その有効な細胞増殖法及び必要とする分化形質の発現誘導法を開発する必要があり、そのためにはまず細胞自身のもつ増殖及び分化形質発現機構を把握することが不可欠である。本研究では MSC 及び骨細胞系に分化した細胞として骨肉腫細胞を用いてこれらの点を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. MSC の増殖及び分化能の解析

1-1. MSC の増殖制御機構

MSC の培養過程における p16 及び p21 細胞周期制御因子の発現及びテロメア長の変化とテロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase, TERT) の活性を解析した。

1-2. 不死化 MSC の樹立

テロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 及びヒトパピローマウイルス E6 及び E7 遺伝子を MSC に導入し MSC の不死化を試みた。

1-3. クローン化不死化 MSC の分化能の解析

不死化 MSC より単一細胞由来のクローンを樹立し、その分化能の解析を行った。

2. 骨肉腫細胞を用いた骨軟骨分化決定機構の解析

2-1. 骨肉腫細胞における軟骨関連遺伝子の発現

骨肉腫腫瘍組織及び培養細胞株における軟骨関連遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。

2-2. ChM-I 遺伝子の骨肉腫における発現

骨肉腫腫瘍組織及び培養細胞株における ChM-I 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法、ノザンプロット法及びウエスタンブロット法により解析した。

2-3. ChM-I 遺伝子発現におけるメチル化の関与

5-アザシチジン処理による ChM-I 遺伝子発現誘導を試みた。ChM-I 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を Bisulfite 処理によるメチル化特異的塩基配列解析により解析した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、メチル化による発現制御を解析した。

2-4. ChM-I 遺伝子発現におけるアセチル化の関与

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による ChM-I 遺伝子発現誘導を試みた。ChM-I 遺伝子発現調節領域に結合するヒストンのアセチル化状態を Chromatin Immunoprecipitation 法により解析した。

C. 研究結果

1. MSC の増殖及び分化能の解析

1-1. MSC の増殖制御機構

培養早期に細胞周期制御因子である p16 及び p21 の発現が亢進し、かつテロメラーゼ活性を有さないことから増殖停止に至ることが判明した。

1-2. 不死化 MSC の樹立

hTERT のみでは MSC は不死化せず、E6/E7 遺伝子導入により旺盛な増殖能をもつ不死化 MSC を樹立することに成功した。不死化 MSC は骨、軟骨及び脂肪への分化能を維持していた。

1-3. クローン化不死化 MSC の分化能の解析

100 個のクローンを樹立し、各クローンの分化能の解析を行ったところ、骨・軟骨・脂肪の三方向へ分化する能力を維持しているクローンはわずかに 2 クローンであり、二方向への分化能をもつもの、あるいは一方向への分化能のみを有するものがあり、分化能において多様な集団であることを示す結果が得られた。

2. 骨肉腫細胞を用いた骨軟骨分化決定機構の解析

2-1. 骨肉腫細胞における軟骨関連遺伝子の発現

軟骨形成型骨肉腫では骨関連遺伝子に加えて軟骨関連遺伝子も正常軟骨と同程度に認められた。また骨形成型骨肉腫でも部分的に軟骨関連遺伝子の発現が認められ、特に SOX9 遺伝子の発現は全ての骨肉腫において認められた。

2-2. ChM-I 遺伝子の骨肉腫における発現

軟骨形成型骨肉腫のみに発現が認められ、培養骨肉腫細胞でも軟骨形成型骨肉腫より樹立されたものでは高い発現が RNA 及び蛋白レベルで確認できた。

2-3. ChM-I 遺伝子発現におけるメチル化の関与

5-アザシチジン処理により ChM-I 発現陽性となる細胞株が検出された。メチル化特異的塩基配列解析により ChM-I 遺伝子のプロモーター領域の特定の転写因子結合部位のメチル化と発現の有無が相関していることが判明した。

2-4. ChM-I 遺伝子発現におけるアセチル化の関与

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により未分化骨肉腫細胞株で ChM-I 遺伝子発現調節領域に結合するヒストンのアセチル化及び ChM-I 遺伝子の発現誘導が認められた。一方より分化段階の進んだ骨肉腫細胞株ではヒストンアセチル化及び発現誘導は認められなかった。

D. 考察

現行の方法によって単離されたヒト MSC の分化能が多様であったことは、組織再生を計る上で考慮すべき点である。現在、真に多分化能を有していた細胞と、他の細胞との相違点を細胞表面マーカー等に関して解析中であり、その結果より真の MSC の単離方法を開発できることが期待できる。また分化方向決定機構にエピゲノム因子が関与している事実は、SOX9 等のマスター遺伝子の発現のみでは説明しがたい現象の理解とともに、クロマチン修飾機構による分化制御という

新しい展開につながる成果であると考えられる。

E. 結論

MSC を用いた組織再生の基礎的データを得るために、不死化 MSC を樹立し、その多分化能の解析を行い、MSC が分化能に関して多様な細胞の集団であることを明らかにした。また骨軟骨の分化決定機構にエピゲノム因子が関与していることが判明し、クロマチン修飾機構の改変による分化誘導が期待できる結果が得られた。

G. 研究発表

Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamata, T., Hosaka, T., Nishijo, K., Nakamura, T., Kiyono, T., Toguchida, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295:354-61. 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

足場への細胞応用、細胞分化誘導に関する研究

分担研究者 牛田 多加志 東京大学大学院工学系研究科再生医工学研究室

研究要旨

生体内において修復を目的とする組織へ細胞集積させることが良好な組織再生への第一歩となる。細胞を接着、集積させるためには細胞が存在するための足場（担体：Scaffold）が重要な役割を果たす。特に骨・軟骨などの硬組織再生においては再生組織の成形性、形状の維持が必須となる。過去、我々はスポンジ形状をした合成高分子ポリマーに天然高分子コラーゲンを複合化した生体親和性材料添加型生体分解性高分子化合物担体を開発してきた。しかし、スポンジ形状は均一な細胞播種が困難であるという欠点を持っていた。そこで新たにシート形状をした複合材料を作製し、細胞の播種効率、細胞との親和性向上をはかった。本年度は本担体を用い細胞播種効率の評価、および実際に梅澤らが樹立したマウス由来骨芽細胞株を生体内に移植し骨の形成性を検討した。

A. 研究目的

シート形状をした生体親和性材料添加型生体分解性高分子化合物担体の細胞保持性の評価、マウス由来骨芽細胞を用いて実際に移植実験を行い生体内における生体親和性、骨形成能の確認を行うことによりヒトへの応用の基礎的資料とする。

B. 研究方法

生体分解性合成高分子のシート状織布を天然高分子コラーゲン溶液に浸漬、吸引凍結乾燥させることにより織布のメッシュ構造内にコラーゲンのマイクロスポンジを形成させる。この複合シートにマウス由来骨芽細胞 KUSA/A1 懸濁液を滴下、細胞を付着させる。一定時間後、非付着細胞数を計測し、コラーゲンを複合化していないシートと比較した。さらに生体外培養にて付着細胞の形態的变化を電子顕微鏡にて観察、材料への親和性を探った。さらに、同細胞

播種シートをマウスの頭蓋骨、大腿骨欠損モデル、及び皮下移植をすることにより生体内での骨形成能を確認する。

C. 研究結果

コラーゲン複合化メッシュは非複合化メッシュと比較し高い細胞保持性を示していた。

低濃度の細胞懸濁液では約 10 倍、高濃度の懸濁液では 2～5 倍であり、シートへの細胞の分布は均一であった。走査型電子顕微鏡所見ではコラーゲン部への高い細胞集積が認められ細胞保持性に対する複合化の利点が明らかであった。透過型電子顕微鏡所見では 2 週間の生体外培養により細胞は活発な蛋白質合成、細胞外基質産生が認められ良好な細胞親和性が確認できた。この細胞播種シートを重層化しマウス頭蓋骨欠損モデルに移植すると、継時的に骨形成量は増加し 4 週で欠損部の修復が起こった。

またこのシートを筒状に巻き込みマウス皮

下へ移植すると管腔構造を持った長管骨様の骨形成が可能であり高い成形性が示された。組織学的に感染や強い拒絶反応は認められなかった。

D. 考察

シート状生体親和性材料添加型生体分解性高分子化合物担体は、均一かつ高い細胞保持性を示した。生体内外において高い細胞親和性、組織親和性を認めることより移植のための足場としては問題がないものと思われる。今後はヒト細胞との親和性、骨伝導性について検討する必要がある。

E. 結論

新規のシート状生体親和性材料添加型生体分解性高分子化合物担体は組織再生の足場として有用である。

F. 研究発表

Ochi K, Chen G, Ushida T, Gojo S, Segawa K, Tai H, Ueno K., Ohkawa H, Mori T, Yamaguchi A, Toyama Y, Hata J and Umezawa A: Use of Isolated Mature Osteoblasts in Abundance Acts as Desired-Sshaped Bone Regulation in Combination With a Modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid(PLGA)-Collagen Sponge. J Cell Physiol 194:45-53, 2002

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

遺伝子導入効率に関する基盤的研究

分担研究者 渡辺 研 国立療養所中部病院長寿医療研究センター 老年病研究部
運動・感覚機能研究室長

研究要旨

間葉系細胞に対する遺伝子導入法-レトロウイルスベクター-について検討を行い、レンチウイルス系ベクターが細胞種を問わず高い導入効率を示す事がわかった。また、間葉系細胞（骨芽細胞株 KUSA-A1）の Msx2 機能調節システムを用いて脱分化誘導系を確立した。

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞の細胞寿命の延長に際して、高効率の遺伝子導入法を検討する事により、少量の幹細胞を効果的に増幅させる方法について検討を行う。

B. 研究方法

遺伝子の細胞への導入効率は、Green Fluorescent Protein (GFP)発現ベクター pMx-GFP を用いることにより、導入細胞を蛍光により同定し算出した。遺伝子導入は、ecotropic, amphotropic, ならびに pantropic (lentivirus 系)のパッケージ細胞に transfection し、非増殖型レトロウイルスを産生させ、間葉系細胞株もしくは初代骨髄間葉系細胞に対して、培養上清に加える事により感染させ、培地交換の後、24時間後に蛍光観察をした。

C. 研究結果

間葉系細胞株（筋芽細胞 C2C12、骨髄由来ストローマ細胞 ST-2、間葉系細胞 C3H10T1/2、前脂肪細胞 3T3-L1、軟骨細胞 ATDC-5、前骨芽細胞 MC3T3-E1、骨芽細胞 KUSA-A1）ならびに初代培養骨髄ストローマ細胞をに対して、EcoPack293、PT67、GP2-293/VSV-G の各パッケージ細胞により作製したウイルスをポリブレン存在下で感染させ、蛍光による遺伝子導入効率を検討したところ、どの細胞においても、GP2-

293/VSV-G 細胞により作製した Pantropic ウイルスが高効率の遺伝子導入が観察された。また、Msx2 と Estrogen Receptor (ER)のリガンド結合領域の融合タンパクを発現するレトロウイルスベクターを作製し、骨芽細胞株 KUSA-A1 に感染させ、ER アゴニスト（タモキシフェン）により Msx2 活性を誘導する系を構築した。Msx2ER を発現させた細胞株では、骨芽細胞のマーカーであるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性がタモキシフェンにより消失した。

D. 考察

レンチウイルス系ベクターは、標的細胞膜に特異的なウイルス受容体を必要としないため、ウイルス力価を上げる事により高効率の遺伝子導入が達成されたと考えられ、ヒト由来細胞でも効果的である可能性が示された。また、Msx2 による脱分化誘導系は間葉系幹細胞誘導の可能性を示した。

E. 結論

高効率遺伝子導入法として、レンチウイルス系レトロウイルスベクターによる方法が有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

M. Watanuki, A. Sakai, T. Sakata, H. Tsurukami, M. Miwa, Y. Uchida, K. Watanabe, K. Ikeda, & T. Nakamura. "Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading." *J Bone Miner Res* (2002) **17**:1015-1025

A. Sasaki, Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda, & K. Watanabe. "A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1." *J. Biol Chem.* (2002) **277**:22541-22546

M.E. Williams, P. Strickland, K. Watanabe, & L. Hinck " UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE." *J. Biol. Chem.* (2003) *In press*

学会発表

菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺 研

Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少 日本骨代謝学会第20回年会 岡山 平成14年 7月25日～27日

A. Hishiya, M. Ito, K. Ikeda, K. Watanabe

Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th annual meeting Am Soc Bone Miner Res September 20-24, 2002, San Antonio, TX.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

足場の製剤化に関する研究

分担研究者 大川広行

中外製薬株式会社製品育成研究部
(旧称：育成研究センター) 副部長

研究要旨

損傷を受けた部位や病変部位を多能性幹細胞で再生させるという再生医療の概念は、胎生幹細胞や胎児あるいは成熟ヒト骨髄由来間質性幹細胞などを用いた試みが広がり、ますます注目を集めつつある。本分担研究では扁平骨あるいは長管骨に人為的に作製した骨欠損部の骨再生について、多孔性材料(デバイス)を包埋させた場合と、細胞を予めデバイスに播種させておいた場合とを比較検討し、デバイスと細胞をあわせて用いることの有用性を明らかにすることを目的としている。本年度は、マウスの骨欠損部におけるマウス骨髄由来間葉系細胞の骨再生モデルを用い、欠損部位への細胞の生着と骨石灰化という骨再生のプロセスを詳細に検討した。その結果、細胞を播種しない場合、欠損部は肉芽形成のみで骨再生は見られなかったが、デバイスと細胞をあわせて用いることにより、欠損部は骨にて完全に被覆されることが確認された。以上のことから、骨欠損部の包埋のための骨の再生には、少なくとも細胞とデバイスが共存することが必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

扁平骨あるいは長管骨に人為的に作製した骨欠損部の骨再生について、多孔性材料(デバイス)を包埋させた場合と、KUSA/A1 細胞を予めデバイスに播種させておいた場合とを比較検討し、デバイスと骨髄間葉系細胞をあわせて用いることの有用性を明らかにする。

B. 研究方法

慶應義塾大学病理学教室において樹立したマウス骨髄間質由来の細胞株 KUSA/A1 を用いて、マウス骨欠損部への移植実験を行った。

1-1. 扁平骨欠損マウスへの KUSA/A1 細胞播種材料の移植

市販のグリコール酸と乳酸を 9 : 1 の割合で重合した共重合体によりできている Vicryl[®] ニットメッシュ (PLGA メッシュ、ジョンソン・エンド・ジョン

ソ株式会社) をウシ I 型コラーゲン酸性水溶液 (pH 3.2, 5 µg/µL) に浸漬し、-80℃で 12 時間凍結した。次にこの凍結物を、真空減圧下 (0.2 Torr) で 24 時間凍結乾燥し、さらに、37℃で、25% (w/v) のグルタルアルデヒド蒸気で 4 時間架橋処理した後、0.1 M グリシン水溶液に 4 時間浸漬した。これを脱イオン水で洗浄した後、再度凍結乾燥し、架橋したコラーゲンと PLGA メッシュからなる繊維性材料を作成した。

ついで、KUSA/A1 細胞 (1×10⁷ 個) を上述の架橋したコラーゲンと PLGA メッシュからなる繊維性材料へ播種し、1 週間恒温器内で培養した。C3H/He マウスの頭蓋骨を麻酔下に展開し、計 4.3 mm の円形ドリルにて骨を掘削し、骨欠損を作製した。欠損部へ上述の細胞播種繊維性材料を欠損部を覆うように設置し、皮膚を縫合し飼育を継続した。4 週間後にマウスより頭蓋骨を摘出し、X 線による