

図13. 末梢血由来AC133陽性細胞におけるCx37発現の経時変化と
Cx37を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後のCD31発現解析

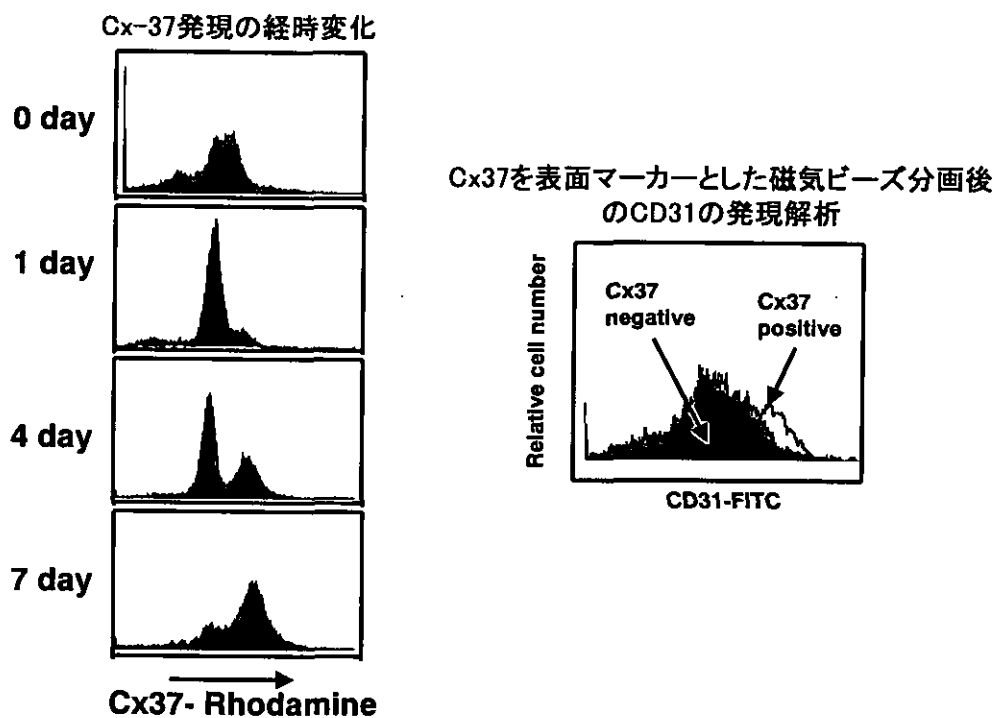


図14. 臍帯血及び末梢血のAC133及びCD34陽性
細胞の含有率の比較

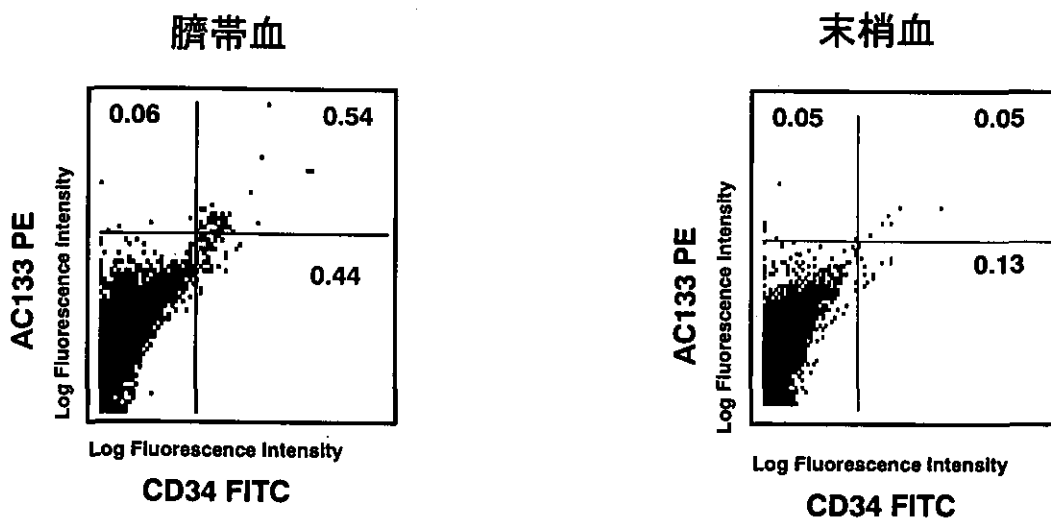


図15. 臍帯血及び末梢血由来AC133陽性細胞の増殖の比較

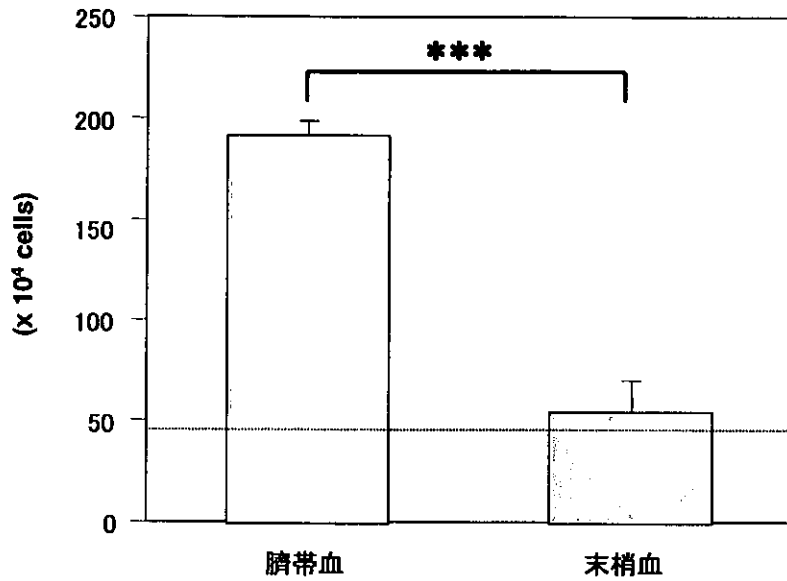


図16. 臍帯血AC133陽性細胞における6日間培養後のCD31強陽性細胞の出現

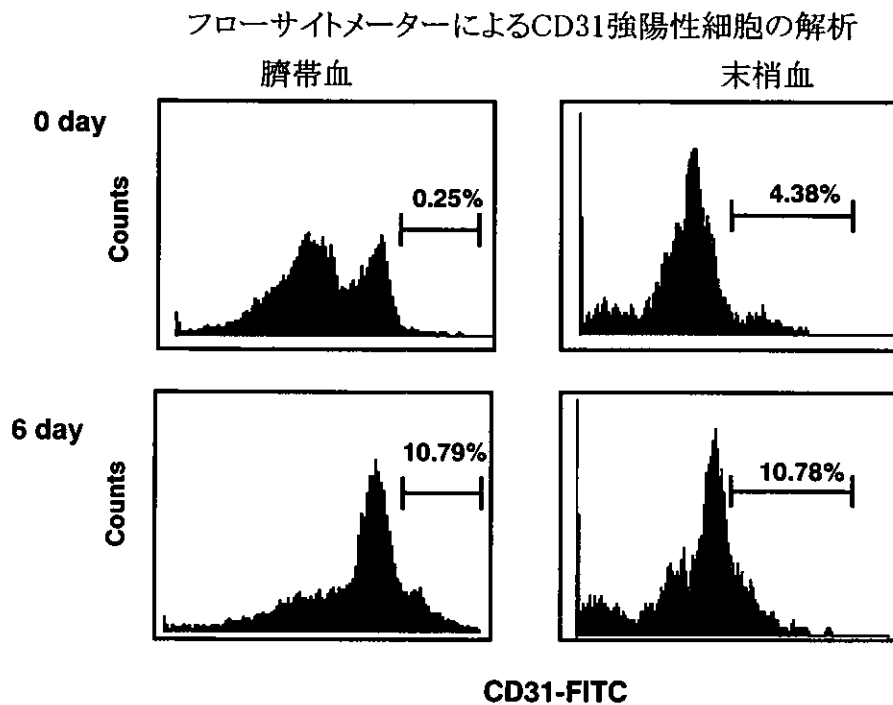


図17. 臍帯血AC133陽性細胞由来CD31強陽性細胞及び陽性細胞の
 ファイブロネクチン上での血管内皮細胞への分化

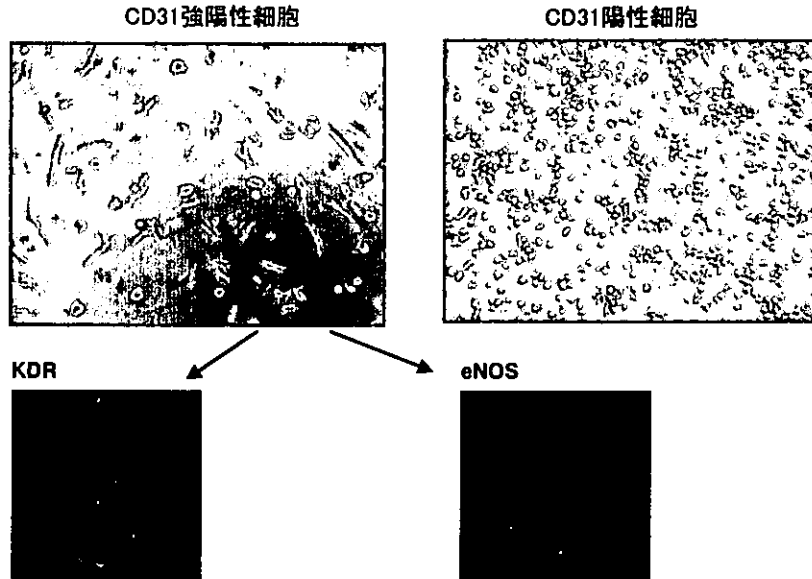
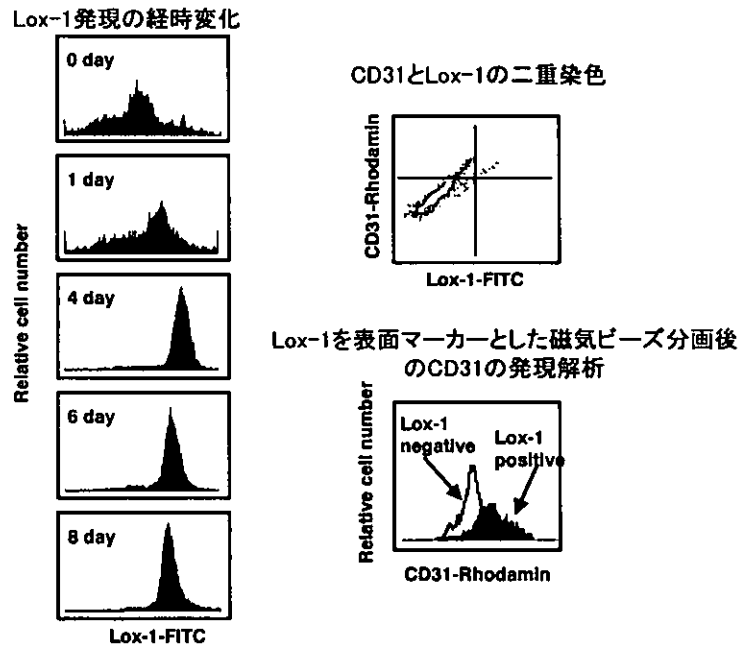


図18. 臍帯血AC133陽性細胞におけるLox-1発現の経時変化
 とLox-1を表面マーカーとした磁気ビーズ分画後のCD31の発現解析



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

細胞・組織加工医療用具の品質等の確保に関する研究
分担研究者 土屋利江 国立医薬品食品衛生研究所療用品部長

研究要旨

1. 組織工学品のウイルスに対する安全性を評価する検査法を確立するための、*in vitro* 実験の一つとして、コラーゲンスポンジ及びヒト皮膚繊維芽細胞を用いて作製した皮膚モデルに、HIV-1 感染細胞 OM10.1 を汚染させて RT-PCR 法による HIV-1 検出を試みた。皮膚モデルに OM10.1 を接種した場合、 10^5 個接種では 3 日目から 10^{1-4} 個接種では 6 日目から増殖率が急速に低下した。HIV-1 p24 抗原は、 10^2 個接種以下では検出できなかったが、RT-PCR 法では 3 日目に全ての OM10.1 接種例、すなわち 10^{1-6} 個接種で HIV-1 を検出することができた。この時の RT-PCR 法の検出感度は HIV-1 P24 抗原検出の千倍であった。さらに HIV-1 P24 抗原検出では検出できない 10^1 個未満（1 個～数個）の接種実験でも RT-PCR 法では 6 日目に HIV-1 が検出された。以上の結果よりこのヒト皮膚モデルは HIV-1 検出に応用できるが、少量の感染細胞汚染時は RT-PCR 法など高度のウイルス検出法を採用すべきであろうと思われた。

2. ポリ-L-乳酸（PLLA）は組織工学用のスキャホールドといった外科的なインプラント用の有望なマテリアルとして広く使用されている。本研究では、2つの系統のマウス（腫瘍形成し易い BALB/cJ マウスと腫瘍形成しにくい SJL/J マウス）を用いて、それぞれ皮下に PLLA プレートを埋植し、PLLA の腫瘍形成に関連するメカニズムについて比較検討した。BALB/cJ マウスでは、PLLA を埋植していない control に比べて埋植したマウスのギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達（GJIC）と Cx43 タンパク質の発現は有意に低下したのに対し、transforming growth factor-beta 1（TGF- β_1 ）分泌は有意に上昇した。一方、SJL/J マウスでは TGF- β_1 分泌に対して PLLA 埋植による影響は見られなかった。この様に、発癌に対する感受性の違う 2 つのマウスの系統間での PLLA 埋植による作用の違いを初めて明らかにした。

3. 同種間の臓器や組織移植後の免疫反応の軽減に対する陰イオン修飾ポリウレタン（SPU）コーティングの有効性についてラットの細胞を用いた *in vitro* の系で検討した。Lewis ラット（ドナー）の骨髄リンパ球（BML）を SPU コートしたバッグとコートしていないバッグに入れ、Brown Norway（BN）ラット（レシピエント）のリンパ球と共に培養した。3 日間培養後、BML の生存率と、レシピエントのリンパ球のサイトカイン IL-4、IL-13、TNF- α 、IFN- γ 産生量と、リンパ球 CD4 陽性と CD8 陽性の細胞数を測定した。その結果、BML の生存率は SPU コートすることによって、生存率が有意に上昇した。また、レシピエントのリンパ球のサイトカイン産生量と CD4 陽性と CD8 陽性の細胞数の測定結果から、

SPU コートしたバッグにより局所的な免疫反応が抑制されたことが示された。

4. 間葉系細胞の軟骨への分化は、特異的な成長因子による反応の誘導によって始まると考えられ、細胞間の相互作用の強さに依存する。本研究においては、ヒトの関節の軟骨細胞 (HAC) の増殖や分化に及ぼす塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) と硫化第一鉄 (FeSO_4) の影響について明らかにすることを目的とし、今回、HAC の軟骨形成への FeSO_4 の効果について初めて明らかにした。増殖させた肩関節や股関節の軟骨細胞を bFGF、 FeSO_4 、または bFGF+ FeSO_4 両者を添加した軟骨成長培地を用いて 4 週間培養した。何も添加していない培地で培養した細胞を Control とした。4 週間培養後、細胞の増殖と分化をそれぞれ alamar blue と alcian blue を用いて測定した。増殖に対しては、bFGF、 FeSO_4 、または bFGF+ FeSO_4 両者を添加することによる影響は見られなかった。一方、分化については、bFGF、 FeSO_4 、または bFGF+ FeSO_4 両者を添加することにより、control に比べてそれぞれ 1.2 倍、2.0 倍、2.2 倍誘導された。このことから、軟骨細胞の分化は、 FeSO_4 、または bFGF+ FeSO_4 両者を添加することにより有意に促進されることが示唆された。また、bFGF と FeSO_4 の効果は、相乗効果ではなく相加効果であった。

5. 神経幹細胞の分化に伴ったテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子の発現制御について検討した。TGF- β によって神経幹細胞である SFME 細胞 (serum-free mouse embryo cells) のアストロサイトへの分化誘導を試みた。また、この時の SFME 細胞において、細胞の増殖、テロメラーゼ活性ならびに *mTERT* の転写活性に関する解析を行い以下の点を明らかにした。まず、TGF- β 処理により、SFME 細胞の増殖速度は約 50%減少した。また、この時のアストロサイトへの分化の程度を、その特異的マーカータンパク質 GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現ならびに細胞の形態を指標として検討した結果、未処理の SFME 細胞では GFAP の発現は検出されなかったのに対し、TGF- β 処理した SFME 細胞においては、GFAP の著しい発現誘導が認められた。また、細胞の形態においても、TGF- β 処理により細長く伸張したアストロサイト様の形態へと変化したことが観察された。また、TGF- β 処理した SFME 細胞のテロメラーゼの活性レベルを、TRAP アッセイによって解析した結果、TGF- β は SFME 細胞のテロメラーゼ活性を抑制しうることが判明した。一方、未処理の SFME 細胞では、高いテロメラーゼ活性を保持していたことも確認された。そして、TGF- β によってアストロサイトへと分化した SFME 細胞では、*mTERT* の著しい発現抑制が認められた。また、*c-myc* の発現も TGF- β 処理によって著しく減少した。さらに、*mTERT* プロモーター領域 (-1560bp~-27bp) を組み込んだルシフェラーゼコンストラクトを構築し、SFME 細胞の TGF- β 処理時における *mTERT* の転写抑制レベルをレポーターアッセイにより調べた。その結果、TGF- β 処理 2 日目で、*mTERT* の転写は、約 50%抑制されることが確認された。また、この *mTERT* プロモーター領域 (-1560bp~-27bp) 内には、c-Myc の結合部位 (E-box) が 2 つ存在することも判明した。

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

今や再生医療の進歩は目覚ましく、それらに利用される医療用具の安全性は大変重要な問題となっている。実際、生体内で分解、吸収される足場用材料を用いた細胞組織医療用具が盛んに開発されているが、これらの組織工学製品のウイルスに対する安全性については研究が十分にされていない。我々は組織工学製品に対するウイルス安全性の評価方法を確立することを目的として *in vitro* 実験を実施している。これまで、バイオヒト皮膚モデル製品において、HIV 汚染時を想定して、コラーゲンスポンジ及び正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) を用いて作製したバイオヒト皮膚モデル(HDF)に、大量 (10^5 個) の HIV-1 持続感染細胞を加えて、バイオヒト皮膚モデル内の細胞動態の観察および HIV-1 P24 抗原検出を行ってきた。今回は、実際のウイルス汚染状況に近づける目的で、少量のウイルス汚染の場合を想定し、高感度ウイルス検出法の一つである RT-PCR 法を用いて HIV-1 遺伝子検出を試み、その検査法の有用性について検討した。

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

医療材料は宿主の炎症反応を引き起こす可能性がある。これらの反応の程度やその制御が埋植用医療用具の長期にわたる使用を可能にするかどうか大きく関与している。ポリ-L-乳酸 (PLLA) は外科的インプラントや生分解性の縫糸材料として臨床の場で広く使用されている。SPU (PU) もまたその弾力性や高い抗張力、なめらかさ、

そして研磨に対する抵抗性といった性能からインプラントの材料として使用されている。しかし一方で、いくつかの動物実験によって、PLLA や PU といった医療材料の良くない作用なども報告されている。ラットにおいて、PLLA の長期に渡る埋植によって腫瘍が形成された。多くの腫瘍は通常細胞内シグナルトランスダクション異常の引き金となる細胞間シグナル伝達応答の恒常的な制御が崩壊した結果と見られる。単細胞生物から多細胞生物への進化の過程で、多くの遺伝子がこれらの細胞機能と関係があるらしい。膜結合性たんぱく質チャンネル (ギャップ結合) をコードする遺伝子もその一つである。ギャップジャンクション依存性細胞間情報伝達 (GJIC) は、低分子化合物の細胞間輸送をする膜通過性チャンネルであり、また、コネキシンとして知られるたんぱく質がサブユニットとして含まれる。少なくとも 19 種類のコネキシンが存在し、それらは細胞や発達段階に特異的に発現している。GJIC はまた、細胞の恒常性の保持や細胞の成長の制御においても重要な役割を果たしている。そのため、GJIC の喪失は発達異常や腫瘍形成などを引き起こすと考えられる。いくつかの癌プロモーターは、ギャップ結合チャンネルを形成するのに必須なタンパク質であるコネキシン 43 といったコネキシンタンパク質のリン酸化によって GJIC を抑制することが示されている。そこで、PLLA と PU の腫瘍形成能力の違いは、主にこれらの医療材料の癌促進活性の違いによるものであろうと仮定した。そこで本研究では BALB/cJ と SJL/J の 2 系統の雌マウスを用いて、PLLA の皮下埋植による影響について検討した。

3. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

拒絶反応や移植変体宿主疾患は、臓器移植では一般的であり、臓器移植に伴って通常免疫抑制剤が利用される。しかし不幸にも、日和見感染の危険率、リンパ母細胞の悪性腫瘍の発症率の上昇は、しばしば免疫抑制剤を使った治療との関連が指摘されている。臓器丸ごと移植の後、ドナーの骨髄由来の細胞を移植臓器から取り出し、レシピエントへ移すとキメラ形成がなされる。これがその後起こるドナー特異的な免疫寛容の誘導へとつながる第一段階である。しかしながら、以下に述べるほとんどの同種移植体の細胞は全ての移植に対して攻撃する。固体の臓器から離れたドナー細胞とその臓器へ入るレシピエントの細胞は同種移植片の免疫発生の主な原因といわれている。ドナーの腎臓細胞で前処理してレシピエントに免疫性を与えることによって腎臓の移植片正着率が有意に上昇するという報告がある。7日間のシクロスポリン投与と4週間一度のドナー由来物の注入との組み合わせにより、レシピエントに耐性が誘導され、腎臓の同種移植の後に拒絶反応は見られないという報告もある。そこで本研究では、ラットを用いた in vitro 系で、陰イオン修飾ポリウレタン (SPU) コートバッグが免疫原性を除去あるいは低下させる作用を示すかどうかについて検討した。

4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

軟骨の修復に必要な自家移植の軟骨細胞の使用の可能性は限られている。1977年に、関節の軟骨の修復のために、培養した軟骨細胞を使用する初の試みが行われた。これ

までに軟骨細胞とポリ乳酸の細胞工学的医療用具が移植 1 ヶ月後において成熟な軟骨組織を生産することが出来なかったという報告がなされている。それゆえ、軟骨細胞の生存力、接着、増殖、細胞外マトリックス (ECM) 産生を促進し細胞の形態を保つために、播種した細胞に移植の早い段階で栄養成分を添加することが必須である。現在、インスリン、インスリン様増殖因子、transforming growth factor- α (TGF- α)、 β (TGF- β)、甲状腺ホルモン、骨誘導因子といった様々な成長因子、またヘパリン、バナジン酸塩、レチノイン酸などの他の因子の効果についての検討が広く行われている。In vitro の軟骨細胞の増殖や分化に対しては、ヒアルロン酸は促進効果、阻害効果、影響なしなど、その効果についての見解は統一されていない。細胞外基質関連タンパク質である Cyr61 が細胞の増殖、情報伝達、接着を促進するという報告もなされている。ヘパリン結合性増殖因子であるプレイオトロフィンは微小集積培養において軟骨形成を促進するといわれている。塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) については何年も広く検討されているが、細胞の接着、増殖、分化に対する役割については、未だ議論の余地がある。bFGF は、関節の軟骨の修復や実質細胞の増殖や分化を促進するという報告がある一方で、コンドロイチン硫酸の合成を抑制するという報告もある。また、in vivo の実験において、bFGF が血管新生因子のように働き、コラーゲンとスポンジのスキヤホールド複合材料の移植箇所の周りの毛細血管の形成を誘導したという報告もある。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンはいくつかの組織中に見られ、様々な細胞

の相互作用に重要な役割を果たしていると思われる。大多数の哺乳類と鳥類のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンにおいて、グルコサミノグリカン鎖は N-アセチルガラクトサミン残基の 4 か 6 の位置に硫酸基を持つ。ヘパラン硫酸やケラタン硫酸の形で硫酸基もまた、細胞表面や細胞外マトリックス中のプロテオグリカンには存在する。そのため、軟骨細胞の培養の際に外因性の硫酸イオンを添加することによって軟骨細胞の分化に有益な影響を及ぼすのではないかと推察した。そこで本研究では、ヒト関節軟骨細胞 (HAC) の増殖や分化に対して FeSO_4 単独と bFGF との組み合わせの影響について、微小集積培養法を用いて検討した。

5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

テロメラーゼの活性化は、胚性幹細胞 (ES 細胞) 及び生殖系細胞において検出され、それ故にそれらの細胞は不死化性を獲得している。さらに、これら幹細胞は高い増殖能及び種々の細胞への分化能を保持しているため、再生医学の分野で汎用されている。また、中枢神経系にも幹細胞 (神経幹細胞) が存在し、自己複製能を持つとともに、さまざまな因子に反応して、前駆細胞を経てニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化することが知られている。この神経幹細胞は、損傷した中枢神経系を再生または修復することができるため、神経再生医学の分野で大いに貢献できるものとして期待されている。そのため、現在、多くの研究者によって神経幹細胞の機能解析が進められており、近い将来その全容が解明されるであろう。神経幹細胞及び神経

前駆細胞においては、テロメラーゼの活性化が認められ、それらの細胞は無限増殖能を獲得していると考えられる。Barnes らによって樹立された神経幹細胞 (serum-free mouse embryo cells : SFME 細胞) は、無血清培養条件下では未分化状態を維持し、血清あるいは TGF- β 刺激に応じてアストロサイトへと分化する。それ故、神経幹細胞のアストロサイトへの分化誘導機構を解明する上で、SFME 細胞は有用なモデル細胞であると考えられている。しかしながら、神経幹細胞の未分化維持機構あるいは分化誘導機構に関する研究はほとんど進展しておらず、その概要は依然として未解明のままである。最近、幹細胞の未分化維持には STAT3 と Oct3/4 という転写因子の活性化が必須であることが報告された。また、幹細胞が保持する無限増殖能の観点からも、その未分化維持にはテロメラーゼの活性化が必要であるかもしれない。そこで本研究では、SFME 細胞を用い、神経幹細胞の分化誘導時におけるテロメラーゼの活性化及びテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 (TERT) の転写制御機構について解析を行った。

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

1-1. バイオヒト皮膚モデル材料

コラーゲンスポンジ ハニカム (高研株式会社)

大きさ : $3 \times 3 \times 2$ mm

成分 : タイプ 1 アテロコラーゲン

1-2. 細胞

1) NHDF (正常ヒト皮膚繊維芽細胞)

2) OM10.1 (HIV-1 持続感染細胞)

1) は 10% FBS (牛胎児血清) 添加 DMEM 培地、2) は 10% FBS 添加 RPMI1640 で培養した。

1-3. ヒト皮膚モデルの作製

コラーゲンスポンジハニカム 1 個当たり 10^5 個の NHDF を接種し、4 時間吸着後 10% FBS 添加 DMEM で一昼夜培養しヒト皮膚モデルを作製した。

1-4. ウイルス感染細胞の接種実験

NHDF またはヒト皮膚モデルに OM10.1 を 10^{10} 個接種し 10 日間培養した。ヒト皮膚モデル内の細胞の増殖能は、培養液に 1/10 の Alamar Blue 染色液 (wako Co.) を添加し 4 時間培養後、吸光度 570/600nm で測定した。

増殖率は、 10^{10} 個、各々の OM10.1 を接種した皮膚モデル 3 個の平均 O.D. 値を OM10.1 未接種時の O.D. 値で割った値を % として示した。

1-5. HIV-1 抗原の検出

培養上清中の HIV-1 抗原検出はルミパルス 1 HIV-1 p24 (富士レピオ株式会社) を用いて行った。OM10.1 を接種した培養上清を経時的に採取し、HIV-1 抗原を検出した。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)

1-6. RT-PCR 法

経時的に採取した培養上清からグアニジンチオシアネート法を用いて RNA を抽出し、Gag 領域のプライマーを用いて RT-PCR を行い HIV-1 を増幅した。

増幅産物は 5% ポリアクリルアミドゲル

を用いた電気泳動により検出した。

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

2-1. 動物

5 週齢の雌の BALB/cJ と SJL/J のマウスを用いた。標準の固形飼料及び水を自由摂取させた。

2-2. PLLA の埋植

PLLA は均一なプレート状のものを用いた。インプラント (20×10×1mm, MW 200,000) は使用前に酸化エチレンガスで滅菌した。ペントバルビタールナトリウム (4mg/Kg) を腹腔内投与して麻酔をかけた後、マウスの皮膚に約 2cm の切込みを入れ、皮下に平らなポケットを作成し、その中に PLLA プレートを一枚ずつ入れ、その後、切開部分を縫い合わせた。両系列とも、対照群にはシャムオペレーションを施した。手術後 30 日間飼育し、その後、埋植した PLLA プレートとそれに隣接した場所から皮下組織を摘出し、培養した。同時にシャムオペレーションを施した対照群についても、皮下組織を取り出した。

2-3. 皮下組織の培養

皮下組織は、10% FBS を添加した minimum essential medium (MEM) で培養した。

2-4. Scrape-loading and dye transfer (SLDT) 解析

SLDT は、El-Fouly らの方法で行った。直径 35mm の dish にコンフルエントの状態の単層の細胞を実験に供した。PBS(+) で洗浄後、dish 上の細胞をかみそりの刃で傷をつけ、直ちに 0.1% の Lucifer Yellow を入れた。37℃ で 5 分間インキュベート後、PBS(+) で 3 回洗浄したものを蛍光顕微鏡で

観察した。

2-5. Western blot 解析

直径60mmのdishにコンフルエントの状態の細胞を直接 100 μ L の 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 100mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)で溶解した。細胞溶解物のタンパク質量は、micro-plate BCA protein assay を用いて定量した。7.5% SDS-PAGE 後、Hybond-ECL nitrocellulose membrane にトランスファーした。Cx43 タンパク質は抗 Cx43 ポリクローナル抗体を用いて検出した。

2-6. RT-PCR

Cx43 mRNA 発現について RT-PCR を用いて検討した。細胞中の total RNA は Trizol 試薬を用いて抽出した。cDNA は First-Strand cDNA synthesis kit を用いて作成した。Taq polymerase を用いて以下のプライマーを使用して PCR を行った。

Forward:

5'-ACAGTCTGCCTTTCGCTCTAAC-3'

Reverse:

5'-GTAAGGATCGCTTCTCCCTTC-3'

PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C, 5 分間に続いて、94 $^{\circ}$ C, 1 分間; 60 $^{\circ}$ C, 1 分間; 72 $^{\circ}$ C, 1 分間を 25 サイクルの後、72 $^{\circ}$ C, 7 分間で行った。PCR 産物を 1.5%アガロースゲル電気泳動し、SYBR Green I で可視化した。内部標準として GAPDH を測定した。

2-7. TGF- β_1 の測定

直径60mmのdishに播種した細胞を用いた。BALB/cJ の対照群の細胞を TGF- β_1 (2ng/mL と 10ng/mL) 処理した。培養液

中の TGF- β_1 レベルは Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)で測定した。

3. in vitro 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

3-1. 細胞の調製

Brown Norway (BN) ラットからリンパ球を採取し、RPMI 1640 培地で培養した。Lewis ラットの上腕骨と頸骨から採取した骨髄リンパ球 (BML) はナイロンメッシュでろ過した後 RPMI 1640 培地で培養した。2 $\times 10^6$ cells/0.5 mL medium の BML を SPU コートしたバッグとしていないバッグにそれぞれ入れた。バッグを 0.867 $\times 10^6$ の BN リンパ球を含む 2mL の培地で浸し、37 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。

3-2. 抗体

抗体は、ラット mAb FITC-抗 CD4 と PE-抗 CD8 を用いた。

3-3. 細胞の生存率測定

バッグの内部の細胞 (BML) の生存率は、3 日間培養後、SPU コートしたバッグとしていないバッグの内部から同数の細胞を取り、24 穴の culture plate で培養した後、alamar blue を用いて測定した。

3-4. サイトカイン測定

3 日間培養後、それぞれのバッグを dish から取出し、残った培養液中の細胞 (リンパ球) について、細胞中の IL-4、IL-13、TNF- α 、IFN- γ 存在量を ELISA で測定した。

3-5. Fluorescence-activated cell-sorting (FACS)分析

3-4.と同様に、それぞれのバッグを取り出した後の培養液中の細胞 (リンパ球) について、CD8 陽性細胞と CD4 陽性細胞の細胞数についてフローサイトメトリーを用い

て測定した。

4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

4-1. 細胞の調製

股関節（約 85%）と肩関節（約 15%）の関節軟骨からの初代培養のヒト関節軟骨細胞（HAC）を実験に供した。培地に添加するために、滅菌済みの bFGF を蒸留水に溶解して使用し、FeSO₄ は蒸留水に溶解後、ろ過滅菌して使用した。サブコンフルエントの状態の HAC を 2 回継代し、3 代目の細胞を実験に供した。20 μL 中に 4×10⁶ cells になるように調製した細胞を 24 穴のプレートにスポットし、高密度の微小集積培養を行った。細胞がプレートにきちんと接着させるために 2 時間 37°C でインキュベーションした。その後、その上に bFGF（終濃度 10ng/mL）または FeSO₄（終濃度 50 μg/mL）もしくは bFGF+FeSO₄ 両者を添加した培養液を 1mL 入れた。培養液のみをいれたものを control とした。その後、37°C で 4 週間培養した。2-3 日毎に培地交換を行った。

4-2. 細胞の形態について

細胞の形態については倒立顕微鏡で観察した。

4-3. 細胞の増殖に関する検討

細胞増殖については、4 週間の細胞培養後、alamer blue を用いて測定した。培養液を取り除いた後 alamer blue 溶液を入れ、37°C で 4 時間インキュベーションした後、吸光度を測定した。

4-4. 細胞の分化に関する検討

プロテオグリカンは軟骨の基質に含まれる典型的な成分である。軟骨形成の程度は alcian blue を用いて軟骨特異的なプロテオ

グリカンを染めることによって測定した。

1% の alcian blue 溶液（pH 1.0）を 0.5mL/well 入れ、4°C で一晩インキュベーションした。その後、alcian blue 溶液を取り除き、3% 酢酸と蒸留水で洗浄した。軟骨のプロテオグリカンは 4M のグアニジン塩酸塩によって抽出し、吸光度を測定した。

5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

5-1. SFME 細胞の培養方法

SFME 細胞は 16 日目の BALB/c マウス胎児より単離された細胞であり現 American Type Culture Collections の David Barnes 博士より供与された。SFME 細胞の培養については、まず、10~20 μg/mL フィブロネクチンをコーティングした dish を準備し、Dullbecco's modified Eagle's medium / F12 に増殖因子としてインスリン（100 μg/mL, Sigma）、アポトランスフェリン（10 μg/mL）、HDL（10 μg/mL）、EGF（50ng/mL）、セレナイト・ナトリウム（10nM）、また、抗生物質としてアンピシリン（25 μg/mL）、ペニシリン（200 U/mL）、ストレプトマイシン（200 μg/mL）を添加した培地にて、5% CO₂、37°C 制御下で継代培養を行った。また、SFME 細胞の分化誘導実験のために、10ng/mL の濃度になるように TGF-β を培地中に添加した。

5-2. RT-PCR

逆転写反応物 1 μL についてマウス *TERT* (*mTERT*)、マウス *c-myc*、マウス *GFAP* (glial fibrillary acidic protein)、マウス *GAPDH* (mouse glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の内部プライマーを用いて、PCR 反応を行った。また、PCR 反応は

それぞれ、*mTERT* (94℃、30 秒; 55℃、30 秒; 72℃、1 分を 27 サイクル)、マウス *c-myc* (94℃、30 秒; 58℃、30 秒; 72℃、1 分を 27 サイクル)、*mGFAP* 及び *mGAPDH*(94℃、30 秒; 55℃、30 秒; 72℃、1 分を 27 サイクル) の条件下で実施した。全ての PCR 産物について 3%アガロースゲル電気泳動を行った。また、泳動に使用したゲルには SYBR Gold を添加した。電気泳動後、UV 照射によって視覚化し、バンドの濃淡を比較することによって、それぞれの mRNA の発現量の差を評価した。Table5-1.にプライマーの配列を記す。

5-3. テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性の測定は Kim らによって開発された TRAP アッセイ (Teromeric Repeat Amplification Protocol assay) に、多少の改変を加えた方法にて実施した。まず、細胞の抽出液に対し、テロメラーゼの鋳型配列を持つ TS プライマーを加え、このテロメラーゼにより合成されてテロメア配列を PCR により増幅させた。この PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、SYBR Green I 染色により視覚化した。

TS primer : 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'

CX primer : 5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'

5-4. *mTERT*プロモーター領域の取得

マウスゲノム DNA を、DNAExtractor WB Kit を用いて、SFME 細胞より抽出した。このマウスゲノム DNA を鋳型として、*mTERT* (mouse TERT) プロモーター領域 (-1560bp~-27bp) を LA PCR 法により取得した。プライマーは、Greenberg らによ

って報告された *mTERT*ゲノム配列の情報 (GenBank accession No. AF121949) をもとに、*mTERT* プロモーター領域 (-1560bp~-27bp) を増幅することのできる 5'及び 3'両末端の配列 (20 塩基) を決定し、このオリゴ核酸の 5'末端側に無作為な 4 塩基に続き *Xho* I の認識配列を付加したものをプライマー (*mTERT*-F, *mTERT*-R) として合成した (下記参照)。PCR の反応条件は、94℃、1 分間の後、98℃、20 秒; 65℃、3 分を 30 サイクル行い、最終的に 72℃、10 分間の伸長反応を行った。

mTERT-F : 5'-ACTACTCGAGCCCCTCCCTCCTCTTCTTTG-3'

mTERT-R : 5'-ACTACTCGAGCACGTGCGGGAACCAAGATG-3'

LA PCR によって得られた *mTERT*プロモーター断片は、pGEM-T Easy vector へ TA クローニングした。pGEM-T Easy vector に組み込まれた *mTERT*プロモーター断片を *Xho* I 消化によって切り出し、pGL3-Basic の *Xho* I 部位へ挿入し、pGL3-*mTERT*p を構築した。

5-5. TGF-β 処理 SFME 細胞における *mTERT*プロモーター活性の測定

トランスフェクションには、LipifectAMINE PLUS Reagent を使用した。SFME 細胞を 1×10^5 cells/well の細胞密度になるように、24-well プレートに播いた。次の日、pGL3-*mTERT*p (300ng/well) 及び pRL-TK (150ng/well) を最終容量が 21 μ L になるように無血清 DME/F12 培地で希釈した後、4 μ L の PLUS-Reagent を加えた。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。この間、前日準備したSFME細胞の培養培地を除去し、200 μ Lの増殖因子含有無血清DME/F12培地を各ウェルへ加えた。1 μ LのLipifectAMINE PLUS Reagentを24 μ LのDME/F12培地で希釈し、DNA-PLUS-Reagent混合溶液(25 μ L)に加えた。このDNA-PLUS-LipifectAMINE Reagent(50 μ L)を室温で15分間インキュベートした。その後、DNA-PLUS-LipifectAMINE Reagent(50 μ L)を200 μ Lの培地が入ったウェルへ添加し、3時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後、DNA-PLUS-LipifectAMINE Reagentを含む培地を各ウェルから除去し、新鮮な増殖因子含有無血清DME/F12培地を1mL加えた。この時、TGF- β 処理を行うSFME細胞においては、最終濃度が10 ng/mLになるように1 μ g/mLのTGF- β ストック溶液を各ウェルへ10 μ Lずつ添加した。TGF- β 処理は毎日行い、トランスフェクション後2日目に、ルシフェラーゼアッセイを実施した。また、ルシフェラーゼレポータープラスミドの陽性対照として、チミジンキナーゼ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-TK)を用いた。

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

1-1. NHDFへのOM10.1接種(コラーゲン非存在下の場合)

皮膚モデルにOM10.1を接種する予備実験としてNHDFに直接OM10.1を接種して、co-cultureし、コラーゲン非存在下で

の細胞の増殖性及びHIVについて検討した。96ウェルプレートにNHDF(10⁴個/well)を播き、10¹⁻⁵個のOM10.1をNHDFに各々接種し10日間培養した。図1はその時の増殖率を示している。OM10.1を10⁵個接種した場合、3日目から増殖率が急速に低下し10日目には10%以下になった。それ以外の10¹⁻⁴個のOM10.1を接種した場合は10日間増殖率が90%以上で、増殖性に殆ど変動が見られなかった。

次にHIV-1 p24抗原の検出及びRT-PCR法を行い、それらの結果を表1に示した。HIV-1 p24抗原は、10⁴及び10⁵個のOM10.1接種では1日目から、10³個接種では6日目から、10²個接種では10日目に検出できた。10¹個接種ではHIV-1 p24抗原は検出できなかった。またHIV-1 p24抗原量は抗原検出後10日まで増加した。RT-PCR法では、10¹個接種の1日目を除く全ての場合でHIV-1を検出できた。OM10.1接種後3日目は、HIV-1 p24抗原とRT-PCR法の検出感度差が最も大きく千倍であった。

1-2. ヒト皮膚モデルへのOM10.1接種(1)

10¹⁻⁵個のOM10.1をヒト皮膚モデルに接種し、細胞の増殖性を検討した。

図2は各々OM10.1接種時の3個の皮膚モデルでの平均増殖率を示したものである。全例でOM10.1接種により、接種細胞数が10⁵個では3日目以降、10⁴個では6日目以降急速に増殖率が下がった。10¹⁻³個のOM10.1接種の場合も6日目以降増殖率が下がった。接種細胞数が多いほど増殖率の低下が激しかった。

この時のHIV-1 p24抗原の検出及びRT-PCR法の結果を表2に示した。

HIV-1P24抗原は 10^5 個のOM10.1接種では1日目から、 10^4 個接種では3日目から、 10^3 個接種では10日目に検出できた。 10^1 個及び 10^2 個接種ではHIV-1p24抗原は検出できなかった。p24抗原量は 10^4 個及び 10^5 個接種では6日目まで増加したが10日目には減少した。

RT-PCR法では、 10^3 、 10^4 及び 10^5 個接種では接種後1日目から、 10^2 個接種では3日目からHIV-1を検出できた。 10^1 個接種では3日目のみHIV-1を検出でき、1日目、6日目及び10日目は検出できなかった。またPCRの結果は表2の下に泳動の写真でも示した。3日目に全例(10^{1-5} 個のOM10.1接種)でHIVが検出された。HIV-1P24抗原とRT-PCR法の検出感度差は、OM10.1接種後3日目に最も大きく千倍であった。

1-3. ヒト皮膚モデルへのOM10.1接種(2)

RT-PCR法によりヒト皮膚モデルにHIV感染細胞が10個以上あれば検出可能であることがわかったので、更にHIV感染細胞が1個でも皮膚モデルに存在すれば検出できるかどうかを試みた。できるだけ一つの皮膚モデルに一つのOM10.1が接種されるように10個/ $100\mu\text{l}$ に希釈した。その希釈液を、各々 $10\mu\text{l}$ ずつ96ウェルプレートの各ウェルに滴下し、細胞が1ウェルに1個以上分注されているのを顕微鏡で確認後、10個の皮膚モデルに $10\mu\text{l}$ ずつ接種し10日間培養した。

図3はその時の増殖率を示している。接種後10日目に増殖率が20%ほど低下したが、6日目までは増殖率の変化は認められなかった。表3はRT-PCR法の結果である。HIVは、1日目、3日目及び10日

目には検出されず6日目に10個中2個の皮膚モデルで検出された。

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

2-1. GJICに対するPLLA埋植の影響

これまでに行った、PLLAプレートを10ヶ月間埋植したin vivo実験で、BALB/cJマウスでは100%腫瘍が形成されたのに対してSJL/Jマウスでは発生しなかった。PLLAによる腫瘍形成の機構について調べるために、腫瘍形成の早い段階におけるGJICに対する阻害効果に着目した。GJICもまたニューロンなどの細胞の正常な分化にとって重要である。GJICの機能について検討するために、SLDT解析を行った。その結果、30日間PLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では対照のBALB/cJマウス由来の細胞に比べてGJICが有意に阻害された。一方、SJL/JマウスではPLLAを埋植したものとしなかったものでGJICについての変化は見られなかった(図4)。また、蛍光物質の移動(dye migration)がSJL/Jマウスに比べてBALB/cJマウスの方が高い傾向が見られた。

2-2. コネキシン(Cx)43の発現に対するPLLA埋植の影響

ギャップ結合もまたCx分子のC末端領域の翻訳後リン酸化によって制御されている。そして、Cx分子のリン酸化はGJICの阻害に密接に関連していることが示されている。Cxのリン酸化による機能調節については多く報告されている。そこで、本研究ではCx43のmRNAとタンパク質発現について検討を行った。Cx43 mRNA発現はPLLAを埋植したBALB/cJマウス由来の細胞では対照のBALB/cJマウス由来の細胞

に比べて抑制された(図 5(A))。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので mRNA 発現について変化は見られなかった(図 5(B))。Cx43 のタンパク質レベルもまた PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に減少した(図 6)。

2-3. TGF- β_1 分泌に対する PLLA 埋植の影響及び *in vitro* の系における TGF- β_1 処理の作用について

TGF- β_1 は、Cx43 のリン酸化型を減少させることによって GJIC を阻害し、また Cx43 のリン酸化はギャップ結合集合などに関連しているため、TGF- β_1 が PLLA 埋植 BALB/cJ マウスにおいて重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、TGF- β_1 レベルについて検討した。TGF- β_1 の分泌レベルは、PLLA を埋植した BALB/cJ マウスの皮下組織細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に増加した(図 7)。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので TGF- β_1 の分泌レベルの変化は見られなかった(図 7)。TGF- β_2 と TGF- β_3 についても検討したが、TGF- β_2 分泌には PLLA 埋植による影響は見られず、また TGF- β_3 については検出限界以下であった(data not shown)。さらに、*in vitro* の実験系で、PLLA 埋植していない BALB/cJ マウスの皮下組織細胞を TGF- β_1 処理の影響について検討したところ、細胞間情報伝達と Cx43 mRNA 発現が有意に抑制されたことを示した(図 8)。

3. *in vitro* 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

3-1. 骨髄リンパ球(BML)細胞の生存率

図 9 に示したように、SPU コートしていないバッグ中の骨髄リンパ球(BML)細胞は、SPU コートしたバッグ中の細胞に比べて、生存率が有意に低下した(74%, $p < 0.05$)。

3-2. リンパ球細胞中のサイトカイン産生

IL-4 の産生量は、SPU コートしたバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞と SPU コートしていないバッグを入れてあったものとでほとんど差が見られなかった(図 10(a))。IL-13 産生量は、SPU コートしたバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞は、SPU コートしていないバッグを入れてあった培養液中の細胞よりも高い傾向が見られた(図 10(b))。反対に、TNF- α と IFN- γ の産生量は、SPU コートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞は、SPU コートしたバッグを入れてあった培養液中の細胞よりも高い傾向が見られた(図 10(c,d))。

3-3. リンパ球細胞中の CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の測定

CD4 と CD8 が陽性の細胞数についてフローサイトメトリーを用いて測定し、SPU コートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞の数を 100%として図 11 に示した。CD4 (図 11(a)) 及び CD8 (図 11(b)) とともに、SPU コートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞に比べて、SPU コートしたバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞の方が高い傾向を示した。さらに、CD4 と CD8 の両者が同時に発現しているリンパ球細胞の数もまた、SPU コートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞に比べて、SPU コートしたバッグを入れてあ

った培養液中のリンパ球細胞の方が高い傾向を示した。(図 11(c))。

4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

4-1. ヒト軟骨細胞の形態に及ぼす液性因子等の影響について

細胞を高密度でスポットし微小集積培養を 2 時間行った後の細胞は凝集した(図 12a)。その後 4 週間培養することによって、軟骨細胞は顕著に均一な薄板状の軟骨形成細胞となった。control 細胞はクラスター形成がほとんど見られなかった(図 12b)。軟骨の小塊は、通常、微小集積培養用のスポットをしてから 1 週間以内に視覚化される。bFGF を添加した細胞は、細胞外マトリックス (ECM) 成分がわずかに高かった。FeSO₄ を添加した細胞(図 12c)及び bFGF+FeSO₄ を添加した細胞(図 12d)は ECM 成分がより高密度に存在した。これらの因子による小塊の形成はほとんど見られなかった。また細胞の形態に対してもこれらの因子は影響を与えず、細胞は丸みのある形を保っていた。全ての群において、微小集積培養の端から細胞が広がっており、広がった部分の細胞は細長い形をしていた。

4-2. ヒト軟骨細胞の増殖に及ぼす液性因子等の影響について

ヒト軟骨細胞の増殖は、4 週間細胞培養後 alamar blue を用いて測定し、その結果を図 13 に示した。Control を 100%として表した。bFGF と FeSO₄ をそれぞれ単独または両者同時に添加すると、細胞の増殖は多少下がる傾向はあるものの、有意な低下ではなかった。

4-3. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等の影響について

alcian blue と結合したプロテオグリカンは 4M のグアニジン塩酸塩によって抽出された。その量について control を 100%として示した(図 14)。液性因子を加えることによって、プロテオグリカン産生量が高まっており、細胞の分化が促進されることがわかった。bFGF 添加によってわずかにプロテオグリカン産生量が高まった(115.9%)ものの、control と比べて有意な差ではなかった。一方、FeSO₄ と bFGF +FeSO₄ を添加することによってプロテオグリカン産生量は control に比べて、それぞれ 195.5%と 218.1%と有意に上昇した。ただし、FeSO₄ 添加と bFGF +FeSO₄ 添加の間では有意差は見られなかった。

4-4. 細胞の分化 index の検討

Control、bFGF、FeSO₄、bFGF+FeSO₄ 添加培養細胞の分化 index (細胞分化/細胞増殖) は、それぞれ 1, 1.38, 2.09, 2.40 であった(図 15)。FeSO₄ または bFGF +FeSO₄ 添加により、分化 index は control に比べて有意に上昇した。

5. マウス幹細胞の神経分化とテロメラーゼ活性との関係についての評価

5-1. TGF- β によるアストロサイトへの分化誘導

TGF- β (10ng/mL) を添加した増殖因子含有無血清 DME/F12 培地にて SFME 細胞を培養したところ、添加 4 日目より SFME 細胞の増殖抑制が誘導され、9 日目には、未処理の SFME 細胞と比較し、約 50%の増殖抑制効果が認められた(図 16)。また、細胞の形態は、TGF- β 処理により細長く伸張し、SFME 細胞はアストロサイト様の細胞へと分化したことが観察された(図 17)。次に、SFME 細胞が TGF- β によってアスト

ロサイトへと分化したことを確認するために、アストロサイトの特異的マーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) の発現量を、RT-PCR 法により解析した。その結果、未処理の SFME 細胞では GFAP の発現は検出されなかったのに対し、TGF- β 処理した SFME 細胞においては GFAP の発現が検出された (図 17)。以上の結果より、SFME 細胞は TGF- β 刺激に反応してアストロサイトへと分化したことが判明した。

5-2. アストロサイトへの分化誘導に伴ったテロメラーゼ活性の抑制

テロメラーゼは、幹細胞や生殖細胞において高発現しており、正常体細胞ではその活性は認められない。従って、正常体細胞におけるテロメラーゼ活性の抑制は、幹細胞の分化誘導時に厳密に制御されていると考えられる。実際に、いくつかの研究グループによって、テロメラーゼ活性は、分化に伴って抑制されることが報告されている。よって5-1.で示された SFME 細胞の分化誘導時にも、テロメラーゼ活性が抑制されていると推測される。そこで TGF- β 処理によってアストロサイトへと分化した SFME 細胞におけるテロメラーゼ活性を TRAP アッセイによって解析したところ、著しい活性の減退が示された (図 18)。その一方で、未処理の SFME 細胞では、高いテロメラーゼ活性が検出された。すなわち、アストロサイトへの分化に伴ったテロメラーゼ活性の消失は無限増殖性の SFME 細胞に有限寿命が付与されたことを示唆している。

5-3. アストロサイトへの分化誘導に伴った *mTERT* 及び *c-myc* の発現抑制

5-2.において TGF- β は SFME 細胞の分化

誘導を促す共に、SFME 細胞のもつテロメラーゼ活性をも低下させることが判明した。そこで、この現象をより詳細に調べるために、テロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子である *mTERT* の発現量の変化を RT-PCR 法によって解析を行った。その結果、TGF- β で2日間処理した SFME 細胞において、*mTERT* の著しい発現抑制が認められた (図 19)。従って、TGF- β によるテロメラーゼの活性抑制は、*mTERT* の発現低下に伴って誘導された現象であることが示唆された。また、テロメラーゼの活性化に重要とされている *c-myc* の発現も、TGF- β 処理によって低下していたことが示された (図 19)。以上の結果より、テロメラーゼ活性の減退は、*c-myc* の発現低下に依存して誘導された現象であると推定された。

5-4. アストロサイトへの分化誘導に伴った *mTERT* の転写抑制

5-3.において、TGF- β は SFME 細胞における *mTERT* 及び *c-myc* の発現を抑制することを示した。そこで、この TGF- β による *mTERT* の発現抑制機構を転写レベルで解析するために、まず、*mTERT* プロモーター領域 (-1560bp ~ -27bp) の取得を行った。また、取得した *mTERT* プロモーター領域内の転写因子結合部位を、MatInspector V2.2 のデータベースにより検索したところ、-1560bp ~ -27bp までの領域内には *c-Myc* の結合部位 (E-box) が2つ存在していたことも判明した (図 20)。ヒトの *TERT* の転写活性化には *c-Myc* の E-box への直接的な作用が必要であることは明らかにされている。これらの結果より、マウス *TERT* プロモーター領域内の E-box の存在は、マウスの *TERT* 転写活性化においても *c-myc*

が深く関与していることを示唆している。従って 5-3. で示された TGF- β による *mTERT* の発現抑制は、*c-myc* の発現低下に起因した *mTERT* 転写抑制機構によって誘導された現象であるものと考えられる。そこで、SFME 細胞の分化に伴った *mTERT* の発現抑制機構を転写レベルで解明するために、pGL3-*mTERT*p を SFME 細胞へ導入し、TGF- β で2日間処理した時のルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、*mTERT* の転写は、TGF- β 処理によって約50%抑制されたことが確認された (図 20)。以上の結果より、TGF- β による *mTERT* の発現抑制は、主に転写レベルで誘導されていること、さらにはこの転写抑制には、少なくとも *c-myc* の発現低下が関与していることが示唆された。

D. 考察

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

NHDF と OM10.1 を co-culture した場合とバイオヒト皮膚モデル(HDM)に OM10.1 を接種した場合では細胞の増殖率の推移に違いが見られた。OM10.1 の 10^5 個接種ではその違いが見られなかったが、 10^4 個以下の OM10.1 接種では、皮膚モデルに OM10.1 を接種した場合に6日目以降急速な増殖率の低下が見られた。これは、NHDF と OM10.1 の共存 (co-culture) の場合とは異なり、皮膚モデル内では細胞増殖が抑制されるためであろうと考えられた (図 1,2)。

以上の増殖率の推移は、HIV-1P 2 4 抗原量に影響した。NHDF と OM10.1 の共存の場合は、特に OM10.1 の 10^4 個接種では

3日目から6日目にかけて、 10^3 個接種においては6日目から10日目にかけて急速にP 2 4 抗原量が増加した。これはプレートに接着して増殖する NHDF と培養液に浮遊性して増殖する OM10.1 が、お互いの増殖に影響を及ぼさないためであると思われる (表 1)。

これに対してヒト皮膚モデルの場合は増殖率が低下し、NHDF と OM10.1 の共存の場合に比べて、HIV-1P 2 4 抗原量も少なくなった。このことからコラーゲンスポンジハニカムの存在は、細胞増殖及びウイルス産生に影響を与えると考えられた。(表 2)。

表 1,2 より RT-PCR 法は培養後3日目には HIV-1P 2 4 抗原検出よりも感度が千倍良かった。さらに表 3 より皮膚モデル中に感染細胞が一個から数個存在した場合も、HIV 検出が可能であったので、現状の検査法の中で PCR 法は少量のウイルス汚染物質の検出には最適の検査法であることが確認された。

PCR 法を用いたウイルスの検出は、高感度で優れた検査法であるが、ウイルスの種類により遺伝子配列が異なるために、目的のウイルスのみの検査となる。将来、全てのウイルス感染の共通の指標となるようなものが見つかり、PCR 法を用いてそれに対する遺伝子検出を行うことができればさらによりよい検査法が確立されるだろう。

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

腫瘍形成誘導因子は数多く知られている。多くのプラスチックはラットやマウスの皮下に埋植した際に悪性腫瘍を引き起こすことがすでに報告されている。PLLA はゆっ

くりと分解していくため、骨折時に使用するプレート、釘、ネジといった整形外科用の医療用具用の生体適合材料に適用されている。ラットにおいて PEU、PE、PLLA によって腫瘍を形成したといういくつかの報告がある。これまでにを行った、PLLA プレートを10ヶ月間埋植した *in vivo* 実験で、BALB/cJ マウスでは100%腫瘍が形成したのに対して SJL/J マウスでは発生しなかった。PLLA による腫瘍形成の機構を理解するために、腫瘍形成の早い段階における GJIC に対する阻害効果に着目した。GJIC の機能について検討するために、SLDT 解析を行った結果、30日間 PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて GJIC が有意に阻害された。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので GJIC についての変化は見られなかった。このことから、腫瘍形成に感受性の高い動物は GJIC 機能と Cx 発現の両者が容易に起こる動物である可能性が考えられた。このギャップ結合の不安定さは PLLA 誘導性の腫瘍形成において主要な役割を果たしているであろう。Cx のリン酸化による機能調節については多く報告されているが、Cx 分子のリン酸化は GJIC の阻害に密接に関連していることが示されている。そこで、Cx43 の mRNA とタンパク質発現について検討を行ったところ、Cx43 mRNA とタンパク質発現はともに PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて抑制された。一方、SJL/J マウスでは PLLA を埋植したものとしなかったもので mRNA 発現について変化は見られなかった。Cx43

タンパク質の発現が抑制されると腫瘍形成が高まるという報告があるが、同様の傾向が本研究でも見られた。Cx43 タンパク質において遺伝子レベルでの変化や翻訳後の制限は GJIC の機能低下や腫瘍形成と関わりと考えられる。そのため、PLLA による GJIC の阻害効果は Cx43 タンパク質の変化を引き起こし、その結果腫瘍形成が高まったと考えられる。TGF- β_1 は、Cx43 のリン酸化型を減少させることによって GJIC を阻害し、また Cx43 のリン酸化はギャップ結合集合などに関連しているため、TGF- β_1 が PLLA 埋植 BALB/cJ マウスにおいて重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、TGF- β_1 レベルについて検討したところ、TGF- β_1 の分泌レベルは、PLLA を埋植した BALB/cJ マウスの皮下組織細胞では対照の BALB/cJ マウス由来の細胞に比べて有意に増加した。さらに、*in vitro* の実験系で、PLLA 埋植していない BALB/cJ マウスの皮下組織細胞を TGF- β_1 処理の影響について検討したところ、細胞間情報伝達と Cx43 mRNA 発現が有意に抑制されたことを示した。以上の結果から BALB/cJ マウスの皮下に PLLA を埋植した後の早い段階で、TGF- β_1 の分泌レベルの増加に依存してギャップ結合タンパク質 Cx43 の発現が抑制された結果、GJIC の機能が低下したと考えられた。

3. *in vitro* 系での免疫隔離膜の機能に関する研究

TNF- α と IFN- γ は Th1 細胞が産生するサイトカインであり、細胞の免疫反応を伝達し、同種移植片に対する拒絶反応に関与することが示されている。これまでの研究から、TNF- α の血漿レベルは肝臓、心臓、腎臓で

の急性の拒絶反応時に上昇することが示されている。IFN- γ の上昇もまた、肝臓移植時に起こることが報告されている。一方、Th2細胞が産生するサイトカインであるIL-4は動物モデルにおいて移植片正着を上昇させる役割を果たすことが示されている。Th2細胞が産生する別のサイトカインであるIL-13の産生量はそれぞれの状況によって様々であり、急性の肝臓の拒絶反応時にはIL-13の産生は低レベルであるという報告がある一方で、腎臓において同種移植片による拒絶反応が起こらない時と移植による拒絶反応時でその産生量に差がないことが示されている。これらのことから、同種移植片に対する拒絶反応とTh1細胞産生のサイトカインの免疫反応上昇、及び、同種移植片による移植の成功とTh2細胞産生のサイトカインの免疫反応上昇、との間には関連があると考えられた。本研究において、SPUコーティングがドナー細胞の生存率を高めることを示した。また、SPUコートしていないバッグを入れてあった培養液中のリンパ球細胞（レシピエントリンパ球）は、SPUコートしたバッグを入れてあった培養液中の細胞よりもTNF- α とIFN- γ の産生量の上昇傾向を見出しており、このことから、SPUコートしていないバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球とドナーBMLの間で高レベルの免疫反応が起こっていると考えられた。このことから、SPUコートしたバッグがドナーとレシピエントのリンパ球間での免疫反応のいくつかの効果を抑える働きをしていると考えられた。CD4はヘルパーT細胞の表面に発現している分子であり、CD8はキラーT細胞の表面に発現している分子である。CD4

とCD8はどちらも細胞同士が抗原情報のやり取りをするときに重要な働きをされている。本研究の結果から、CD4陽性とCD8陽性のそれぞれのレシピエント細胞の数が、SPUコートしたバッグでドナー細胞を隔離した細胞の方が高い傾向が見られた。さらに、CD4とCD8の両者が同時に発現しているリンパ球細胞の数もまた、SPUコートしていないバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球に比べて、SPUコートしたバッグを入れてあった培養液中のレシピエントリンパ球の方が高い傾向を見出した。以上のことから、SPUコートによってドナーとレシピエントのリンパ球間の免疫反応を最小限に抑えていると考えられる。本研究の結果から、SPUコートが移植時における拒絶反応を抑制するのに役立つ可能性を見出した。今後はさらに、SPUコーティングが抗炎症性の治療力のある因子として、または、生体適合材料用のコーティング材料として利用できる可能性を見出していく必要があるであろう。

4. ヒト軟骨細胞の分化に及ぼす液性因子等についての評価

自家移植の軟骨移植は、軟骨欠損の再生のために整形外科の治療において一般的に行われる処置である。新鮮な自家移植の軟骨の供給は限られているため、多くの研究者達はin vitroでの軟骨組織の生産に力を入れている。いくつかの成長因子は軟骨細胞の代謝や分化を制御している。本研究において、FeSO₄単独やbFGFとの組み合わせによって軟骨細胞の分化が有意に促進され、両者とも細胞増殖はcontrolレベルを保っていた。細胞は高密度の微小集積培養（3Dの組織に見立てた）によって培養され