

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成16（2004）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	11
1 遺伝子導入による細胞の寿命延長に関する研究	13
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	17
大串 始	
3 治療実験を含む臨床応用への検討	21
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	27
牛田 多加志	
5 遺伝子導入効率に関する基盤的研究	31
渡辺 研	
6 足場の製剤化に関する研究	33
久保田 直樹	
III 研究成果に関する一欄表	37
IV 研究成果の刊行物・別冊	43

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

主任研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

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。また、生分解性ポリマー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い、ヒト細胞での骨の形成、動物移植の実験を行う。遺伝子を導入した細胞の解析から、さらなる寿命延長のメカニズムを介し臨床応用への模索を行う。さらに、安全基準に即した細胞供給施設を設立し、倫理性基準を確立し、細胞、足場を製剤化する。

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

1) ヒト骨髄間葉系細胞の調整とプロファイリング

ヒト骨髄間質細胞を分離培養し、サフクローニングを行う。サフクローニングされた各細胞からmRNAを抽出し、全長のcDNAライブラリーを作成し細胞の有する性格を詳細に検討する。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確認する。

2) 遺伝子導入による細胞寿命の延長

ヒト骨髄間質細胞に対し寿命の延長に関わる遺伝子を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討する。またその際の細胞の染色体、遺伝子レベルでの検討、遺伝子導入効率に対する基盤的研究を行う。

3) 足場への細胞応用、細胞分化誘導

メッシュ状の生体分解性ポリ乳酸からなる足場を作成し、さらにその表面にコラーゲンを添加した新規の足場を開発する。新規足場を用いた場合のヒト細胞の付着様式、骨再生方法を検討する。また各種条件下での足場の形態を確認する。

4) モデルマウスへの移植

- (a) 外傷、腫瘍切除後、奇形等の遺伝的疾患による区域または、部分骨欠損に対するモデルマウスを作成し、移植細胞

の骨形成、宿主の骨再生能を検討する。具体的には、大腿骨を区域切除、ピンによる創内固定後、周囲に細胞を播種した足場を適応する。

- (b) 閉経後、骨粗鬆症、リウマチ、偽関節症等の自己の骨再生能の低下した状態を想定したモデルマウスを作成する。具体的には、子宮摘出し低カルシウム餌で長期継続飼育されたマウスに対し部分骨欠損のモデルマウスと同様に骨形成・再生能を検討する。

- (c) 同種他家移植モデルの検討方法として、梅澤らにより分離培養されたマウス骨髄由来間葉系幹細胞 (KUSA/A1細胞) を他系統マウスへ移植し免疫抑制剤の応用下での骨再生能また免疫寛容についても検討する。

5) 臨床応用への具体的な検討 (大串、戸口田、久保田)

細胞および足場の製剤化を視野に臨床応用に対して医薬品GCP (平成9年厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」) と等しいレベルでの科学性および倫理性を確保する検討を、①細胞に関して共同研究者の大串、戸口田らを中心とし、②足場に関して戸口田、久保田らを中心として検討を行い、

上記を満たした上で新たな治療プロトコルを作成し京都大学整形外科にて治療の方向を決定する。

C 研究結果

1) 合成高分子ポリ乳酸-グリコール酸重合体 (PLGA) の網目状構造を持つ織布に、ウシ I 型コラーゲンのマイクロスポンジを複合化、クルタルアルテヒトにて架橋し、蜘蛛の巣様構造をしたシートを作成した。作製したコラーゲン複合化シートは、厚さ 200 μ m の織布に蜘蛛の巣様にコラーゲンのマイクロスポンジ構造をとる。このシートは操作性に優れ、容易に把持や形状を変化させることが可能であった。

2) 細胞接着性の向上

コラーゲン複合化の有無による接着細胞数の違いを、播種後 6 時間での付着細胞数にて計測し、比較した。また、複合化シートへ付着した細胞の状態を走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。コラーゲン複合化シートは非複合化シートに比較し 4 ~ 5 倍の細胞接着能を有することが確認された。走査電子顕微鏡像では PLGA ファイバー表層よりも、ファイバー間に張ったコラーゲンのマイクロスポンジに多く細胞が接着し、コラーゲンの有用性が示された。透過電子顕微鏡像にて多量のコラーゲ

ンフィブリル、多数の拡大した粗面小胞体が観察され、接着した細胞が旺盛な蛋白合成、細胞外器質産生を行っていた。

3) 生体への移植

C3H/He または NOD/sc1d IL-2 受容体 γ knockout mouse に径 4.3 mm の頭蓋骨欠損を作製、細胞を播種した複合化シート 5 枚を重ねて移植した。対照として、細胞を播種しないシートのみおよび骨欠損のみの群を作製し、各 10 匹の観察を行った。4 および 8 週において移植部位の観察を行った。また、シリコンにて作製した任意形状の表面に細胞を播種したシートを設置しマウス皮下に移植、移植後 4 週にて摘出し任意形状の作製および維持が可能な否か確認した。マウス頭蓋に作製した骨欠損は、対照群（非移植群および細胞未播種シート群）において組織学的に骨の形成が観察されなかったのに対し、重層化し移植した細胞播種シート群においては 4 週にて良好な骨形成と豊富な血管形成を認めた。

4) 生体内での形状制御

形状作製および維持が可能などうかを確認するため、シートを丸め管状骨を模倣した円管形態を作製、また丸めたシートにて結び目を作製、さらにシリコンにシートを巻き付け指骨形態を模倣しマウス皮下に移植し

た。4週において目的とした形態そのままの骨が形成されることが証明された。

D 考察

骨は再生能力に富んだ組織である。しかし、生体の自然治癒能力を超えた欠損、障害に対しては積極的な治療が必要とされる。骨欠損に対する標準的治療法である自家骨移植は、優れた方法であるものの、骨採取部位における合併症の危険性は避けられない。近年、細胞を用いた組織再生研究が進み、骨組織再生においても自家骨移植に代わる重要な治療戦略となることか期待されている。骨再生の細胞源としては軟骨、脂肪、筋細胞の他に骨芽細胞へ分化することか証明されている骨髄間質細胞かその有力候補である。目的とする部位へ細胞を接着・集積させるため、細胞の足場（担体 Scaffold）か用いられるか、特に硬組織においては再生組織の形成、形状の維持か必須となるため、その重要性は高い。骨再生の担体としては従来よりハイドロキシアパタイトや三リン酸カルシウムなどの無機材料か使われてか、細胞接着性、形状の制御、生体親和性の観点から生分解性高分子か選択肢のひとつとなる。

高分子担体には天然高分子と合成

高分子のふたつか存在する。天然であるコラーゲンは細胞保持性に優れているものの、形状の維持か困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究か進んできたか、疎水性であるか故に細胞接着性に乏しいという欠点か存在する。両者の問題点を解決するため、合成高分子にて作製したスポンジ形状をした培養担体にコラーゲンを複合化することで初期強度に優れ、かつ細胞接着性に優れた培養担体を開発、骨・軟骨再生における有用性を報告してきた。均一な細胞分布、形状制御の簡便さを目的として新たにシート形状をした複合培養担体を作製し、さらに骨髄間質細胞由来骨芽細胞を用い、新規複合化シートの形状制御を要する骨再生への有用性を明確にすることは新規医療ビジネス戦略として妥当であると同時に社会への責務を果たすことになるものである。

本研究によって、適度な強度を有する合成高分子シートに、コラーゲンマイクロスポンジを複合化することで高い細胞接着性が得られることか明らかとなった。従来の合成高分子にて作製したスポンジ形状体は、立方体内部への細胞播種か困難なため均一な組織を得にくいという欠点かあった。形状をシート状にしたことか細胞の分布を均一化することか可

能となったものと考えられる。頭蓋骨欠損モデルでの移植においては、本シートのみでの骨形成が起こらなかったことより、細胞治療の有用性が示された。

可塑性のある複合化シートは細胞播種後に重層化することで厚みを持たせたり、丸めることで管状構造を作製、さらに既成の構造物に貼り付けることで任意の形状を作製することか可能となるため手術中での操作が容易である。荷重に耐える強度には至らないため、骨基質のひとつであるハイドロキシアパタイトの表面に用いたり、早期の骨分化を促すために成長因子の固相化も可能である。さらに使用する細胞の接着に有用な細胞接着因子を付加することでより高い接着性も期待できるなどその応用範囲は広いと思われる。本複合化シートに用いた PLGA およびアテロ化コラーゲンはそれぞれ FDA 基準を満たし既に臨床にて使用されているものであるため早期の臨床化が見込まれる。また、この新規培養担体は骨再生のみならず、軟骨再生や他細胞移植に用いる培養担体として優れているものと考えられる。

E 結 論

コラーゲン複合化合成高分子シートが作製可能であった。本シートは

細胞接着性、形状維持に優れ、自在な形状の骨を生体内にて作製可能であり、骨再生のための有用な培養担体である。

F 健康危険情報

なし

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。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（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、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 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動物実験指針に準拠して研究を実施している。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とめ、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っている。

H 研究発表

1 論文発表

Tsuchiya, K, Mori, T, Chen, G, Ushida, T, Tateishi, T, Matsuno T, Sakamoto, M, and **Akihiro Umezawa, A** A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet *Cell Tissue Res*, in press

Takeda, Y, Mori, T, Imabayashi, H, Kiyono, T, Gojo, S, Miyoshi, S, Ita, M, Segawa, K, Ogawa, S, Sakamoto, M, Nakamura, S, **Umezawa, A** Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7 and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?", *J Gene Med* in press

Gojo S, **Umezawa A** Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts *Hum Cell* 16(1) 23-30, 2003

Kato, Y, Imabayashi, H, Mori, M, Tani, T, Taniguchi, M, **Umezawa, A**, and Tsunoda, Y Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells *Biology of Reproduction*, 70 415-418, 2004

Sharov A A, Piao, Y, Matoba, R, Dudekula D B, Qian, Y, VanBuren V, Falco, G, Martin, P R, Stagg, C A, Bassey U C, Wang, Y, Carter, M G, Hamatani T, Aiba, K, Akutsu, H, Sharova, L, Tanaka, T S, Kimber, W L, Yoshikawa, T, Jaradat S A, Pantano, S, Nagaraja, R, Boheler, K R, Taub, D, Hodes, R J, Longo, D L, Schlessinger D, Keller, J, Klotz, E, Kelsoe, G, **Umezawa, A**, Vescovi, A L, Rossant, J, Kunath, T, Hogan, B L M, Curci, A, D'Urso, M, Kelso, J, Hide, W, and Ko, M S H Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos *PLoS Biology*, 1(3) 410-419 2003

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*, 288 35-50 2003

Gojo, S, Gojo, N, Takeda, Y, Mori, T, Abe, H, Kyo, S, Hata, J, and **Umezawa, A** In vivo Cardiovasculogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells *Exp Cell Res*, 288 51-59, 2003

Allan, E H, Ho PW, **Umezawa, A**, Hata, J, Makishima, F, Gillespie, M T, Martin, T J Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line *J Cell Biochem*, 90(1) 158-169 2003

Shundo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, **Umezawa A**, Takagi M, Katsube K, Suda H Osteogenic differentiation of the mesenchymal

progenitor cells, Kusa is suppressed by notch signaling *Exp Cell Res* 290(2) 370-80, 2003

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* 203 105-116 2003

Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, **Umezawa A**, Ohya K, Ohya T, Kasugai S The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect *J Periodontal Res* 38(3) 333-342, 2003

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-1, 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, 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* 53 214-220, 2003

Shibata, R, **Umezawa, A**, Takehara K, Aoki, D, Nozawa, S, Hata, J Primary carcinosarcoma of the vagina *Pathol Int*, 53 106-110, 2003

梅澤明弘 骨芽細胞から神経細胞への分化、再生医療、3(1) 61-68, 2004

梅澤明弘、五條理志 間葉系幹細胞の基礎と臨床、40(12), *Molecular Medicine*, 2004

梅澤明弘、竹田征治 骨髄間質細胞の可塑性、実験医学、22(1) 12-16, 2004

梅澤明弘 第一章「幹細胞の増殖・

分化機構とその制御」3) 骨髄由来の多能性細胞 1 骨髄間質による骨・軟骨形成、実験医学増刊、「再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端」, 21(8) 94-100, 2003

梅澤明弘 再生医療—病理解剖ならひに病理検体から学ぶこと—、病理と臨床、特集「再生医療」、編集 梅澤明弘/前田盛、21(7) 725-731, 2003

竹田征治、**梅澤明弘** 多能性幹細胞としての間葉系幹細胞研究、分子呼吸器病、7(4) 94-96, 2003

伊澤良兼、**梅澤明弘** 骨髄間質細胞、Molecular Medicine Vol 40、臨時増刊号、再生医学、編集 須田年生/岡野栄之

梅澤明弘 再生医療、城西放射線・医療同窓会報、26号、2003年5月26日

梅澤明弘：神経幹細胞の供給源 骨髄—骨芽細胞、神経疾患の再生医療—その現状と将来、Clinical Neuroscience, 21(10) 1127-1130, 2003

梅澤明弘 再生医療の展望 1 細胞移植による再生医療、日本内科学会誌 第92巻 第9号 平成15年9月10日 1758-1762

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

植谷宏平、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** 筋シ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

2) 学会発表

Umezawa, A Cellular synchronization during the cardiomyogenic differentiation of human marrow stromal cells The Second International Symposium on Molecular Synchronization for Design of New Materials System, Yokohama, Japan July 18 2003

Umezawa, A In vivo and in vitro cardiomyogenesis of human marrow stromal cells with a prolonged life span by BMI E6, E7 and/or telomerase, Tenth N A T Meeting, Stem cells and Transplantation NANTES, France, June 19-20, 2003

I 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

(a) 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内 (第372826号、平成11年12月28日)

「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/001148、平成13年2月28日)

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際 (PCT/JP00/07741、平成13年11月2日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際 (PCT/JP00/09323、

平成 13 年 12 月 27 日)

出願人 協和醗酵株式会社

(b) 「骨の再生方法」

発明者 梅澤明弘、秦順一、立
石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日 第 251365 号、平成 13
年 8 月 22 日

出願人 梅澤明弘、牛田多加志、
独立行政法人産業技術総合研究
所

(c) 「間葉系細胞から膵β細胞
を形成する方法」

発明者 梅澤明弘、伊澤良兼

出願日 平成 14 年 4 月 17 日

出願番号 特願 2002-115201、

出願人 大塚製薬株式会社

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

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盤的研究
渡辺 研
- 6 足場の製剤化に関する研究
久保田 直樹

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

遺伝子導入による細胞寿命の延長

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。昨年度HPVのE6やE7あるいはbm1-1に加えTERTの導入によって延命しているヒト骨髄由来間葉系幹細胞をさらに継代、解析し、本細胞の不死化にはp16/RB経路の不活化と、テロメラーゼの活性化が必須であることを確認した。昨年度、梅澤らにより確認された多分化能は2年以上に渡る継代後も維持されていること、腫瘍原性などを獲得していないことか確認されている。本研究で不死化された細胞は梅澤らにより新たに心筋、神経細胞への分化能をも維持していることか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。しかし、E6, E7やbm1-1はがん遺伝子であり、これらを導入した細胞の再生医療への応用は倫理的に極めて難しい。そこで今年度はがん遺伝子を用いずに不死化するための基礎技術を確立した。

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

HPVのE6やE7あるいはbm1-1に加えてTERTの遺伝子導入によって延命

したヒト骨髄由来の間葉系細胞を用いて細胞周期関連遺伝子群の発現、テロメア長などを調べ増殖停止に至る分子機構を検討すると共に、不死化した細胞か間葉系幹細胞の性質を維持しているかどうか、腫瘍原性を獲得していないことなどを梅澤らに既に確立した方法を用いて確認する。また、p16/RB経路の不活化をかん遺伝子によらずRNA干渉法により達成すべく方法論の確立とモデル細胞を用いた不死化を試みた。

(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

HPVのE6およびE7の導入により骨髄由来ヒト間葉系幹細胞は長期延命できることか示されたかテロメラーゼの活性化はおきず、テロメア短縮によりクライシスを迎えることか確認された。さらにTERTを導入しテロメラーゼ活性を誘導することにより細胞は800日以上安定に増殖し事実上不死化していることか示された。また、E7とTERTやbm1-1とTERTなどの細胞も800日以上安定に増殖し、これらの細胞は梅澤らにより間葉系幹細胞の多分化能を有していることか確認

されている。

次に、かん遺伝子を導入せずにRNA干渉法を用いてp16/RB経路の活性化を抑制するため、レトロウイルスによる効率良く、持続的にsiRNAを細胞内で産生させるヘクターの開発に成功した。このヘクターによりp16か高発現しているHeLa細胞でその発現を平均5%以下に抑えることかできた。さらにモデル細胞として皮膚角化細胞や、乳腺上皮細胞でも同様にp16の発現を抑え、延命することに成功した。これらの細胞にさらにTERTを導入することて事実上不死化細胞を得ることも成功している。今後、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞へ応用し、同細胞をかん遺伝子の導入なして不死化する計画である。

D 考察

昨年度はHPVのE6やE7あるいはbm1-1といったかん遺伝子ならびにTERTの導入によってヒト骨髄間葉系幹細胞の延命に成功し、今年度はこれらの細胞か事実上不死化していることと、その不死化機構をさらに明らかにした。また、その背景となる主たる分子機構はテロメア長の短縮とp16の発現増加によるものであることからRNA干渉法によるp16の発現抑制法を開発した。このRNA干渉法によるp16の発現抑制とTERTの導入のみで

本細胞が不死化できるかどうかは大変興味深い。これが成功すれば、不死化細胞の臨床応用に向け大きなステップとなる。また、遺伝子導入によらないp16の発現抑制と、同しく遺伝子導入によらないテロメラーゼの活性化が次の目標となる。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強く示唆することかてきた。

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、がん遺伝子とTERTの導入による方法は本研究により確立された。また、がん遺伝子導入によらない細胞の不死化技術も開発し、本細胞への応用が待たれる。将来、遺伝子導入によらない技術の開発も現実味を帯びてきた。

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か承認されている

G 研究発表

1 論文発表

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

Fujita M, Ichinose, S, **Kiyono, T.** Tsurumi, T Omori, A Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant β -actin *Oncogene*, 22 627-631, 2003

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*, 462 15-23, 2003

Nagata KI, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, **Kiyono T.** Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M Filament formation of MSF-A a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules *J Biol Chem*, 278 18538-43, 2003

Bruemmer D, Yin F, Liu J, **Kiyono T.** Fleck E, Van Herle AJ, Law RE Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells *Biochem Biophys Res Commun*, 303 251-258 2003

Bruemmer D, Yin F, Liu J, Berger JP, **Kiyono T.** Chen J, Fleck E, Van Herle AJ, Forman BM Law RE Peroxisome proliferator-activated receptor α inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells *Mol Endocrinol*, 17 1005-18, 2003

Imabayashi, H, Mori, T Gojo, S, **Kiyono, T.** Sugiyama, T Irie, R, Isogai, T, Hata, J, Toyama, Y, 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*, 288 35-50, 2003

Bruemmer D, Yin F, Liu J, **Kiyono T.** Fleck E Van Herle AJ, Law RE Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent *Exp Cell Res* 290 28-37 2003

Kyo S, Nakamura M, **Kiyono T.** Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Yatabe N, Inoue M Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics *Am J Pathol* 163 2259-69 2003

清野 透 「新世紀の感染症学」下
巻 ヒトパピローマウイルス，日本
臨床社 pp562-567，2003

2) 学会発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む。）

1 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞
株及びその作製方法」 出願中

2 実用新案登録

なし

3 その他

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

分担研究者 大串 始 産業技術総合研究所、研究チーム長

研究要旨

ヒト間葉系幹細胞を臨床に用いられる足場材料であるアルミナセラミック上で培養し、間葉系細胞が効率よく骨芽細胞に分化し骨基質を産生しうる事を見いだした。この結果は、ヒト間葉系細胞由来の再生培養骨をアルミナセラミック上で作製可能であり、この培養骨が種々疾患に用いられることを示した。

A 研究目的

骨髄中には間葉系幹細胞が含まれており、骨、軟骨、脂肪、筋、腱など様々な組織の細胞へ分化することが明らかになっている。我々は患者骨髄由来間葉系細胞を各種セラミックス材料上で骨芽細胞や骨マトリックスへ分化誘導し、骨形成能を有するハイブリット（培養骨/マテリアル）を構築しているかこれらのマテリアルで荷重に耐えうるセラミックを足場として用いる基礎研究の詳細はおこなっていない。そこで、本年は種々セラミックスの中からアルミナセラミックに言及して培養骨形成に関する研究をおこなった。

B 研究方法

当センターで冷凍保存されている、ヒト間葉系幹細胞を用いた。この細胞は多少の個人差はあるものの10日前後で75cm²フラスコにコンフルエントとなった。これらを一旦トリプシン処理にて回収した後、本研究用に作製した多結晶アルミナディスク（京セラ社提供）上に播種し、2次培養を行った。2次培養期間中は培地中にβ-グリセロリン酸、ヒタミンC、テキサメサゾン（Dex）を添加した。コントロールには組

織培養用のポリスチレンティッシュを用い、また、材料上の細胞観察を可能にするため、透明な単結晶アルミナディスク上でも同様の培養を行った。

（倫理面への配慮）

用いる細胞はすでに冷凍保存されていた細胞でこの研究の為に提供者に危害をあたえることはない。さらに、冷凍細胞を用いての培養をおこなう承諾を得ている。すなわち、このような基礎研究に患者骨髄を用いる事は文章により提供者のインフォームトコンセントを得ている。また、産業技術総合研究所の倫理委員会でも審議をおこない、承諾を得ている。

C 研究結果

多結晶アルミナ上で培養したヒト骨髄間葉系細胞が実際に骨芽細胞へ分化したことを証明するために、培養2週間後に細胞を回収し各種定性的、定量的評価を行った。まず、多結晶アルミナ上の細胞かコントロールと同様に増殖することか出来たかを調べるため、DNA量の測定を行った。多結晶アルミナのDNA量はコントロールティッシュに劣ることはなく、ヒト骨髄間葉系細胞はアルミナ上でも良好に増殖しうるのか

明らかになった。骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (ALP) 及び、骨芽細胞に特異的な分泌蛋白であるオステオカルシンを指標とした。ALP 活性の測定を行うと多結晶アルミナ上の細胞はコントロールディッシュとほぼ同レベルの活性を認めた。さらに骨芽細胞に特異的な分化マーカーであるオステオカルシンの定量値もコントロールと同様に高値を示していた。

D 考察

本研究は、ヒト培養骨髄間葉系細胞がアルミナセラミックス上で骨形成を伴う骨芽細胞へ分化したことを実証している。つまり、われわれはディッシュエンシニアリング的手法を用いて *in vitro* で未分化なヒト骨髄細胞とハイオイナートな性質を持つアルミナセラミックスを組み合わせて、骨形成能を有するハイブリッド (培養骨/アルミナ) を作製し得たことになる。しかし、アルミナ表面と培養骨の間には化学的結合は得られないためより強固な物理的な固着が必要である。今回用いたアルミナセラミックスは表面平滑であるか、もし表面がポラス状のアルミナセラミックスを用いれば孔の中に形成された培養骨は生体内で著明な骨形成能を有し、ホスト由来の新生骨組織と共にインプラント-生体骨間により安定した固着をもたらすであろう。われわれは実際に表面がポラス状のアルミナ製人工関節上でヒト骨髄間葉系細胞の培養が可能なことも証明している。本研究において、われわれはアルミナセラミックス上でのヒト骨髄間葉系細胞の骨分化能を立証したか、興味深いのは高齢者から得られた細胞も若、中年者の細胞と同様に骨分化能を有していたことである。また、本研究に用いた培地には牛血清を添加したか、自己血清を添加した培地でも培養骨の作製が可能であることも確認している。さらに骨髄細胞は穿刺吸引という最小侵襲で採取可能であり、われわれの手法は大きな臨床的意義をもつものと考えられる。

E 結論

自己骨髄間葉系細胞とアルミナセラミックスのハイブリッドが *in vitro* 骨形成を

すことを確認した。すなわち、ヒト間葉系細胞由来の再生培養骨をアルミナセラミックス上で作製可能であり、この培養骨が種々疾患に用いられることを示した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

Kitamura, S, Ohgushi, H, Hirose, M, Funaoka, H, Takakura, Y and Ito, H Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Cultured on Alumina Ceramics Artificial Organs, Vol 28 No 1 72-82, 2004

Kotobuki, N, Hirose, M, Takakura, Y and Ohgushi, H Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow Artificial Organs, Vol 28 No 1 33-39, 2004

Shimaoka H, Dohi, Y, Ohgushi, H, Ikeuchi M, Okamoto, M, Kudo, A, Kirita, T and Yonemasu, K Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal cells in porous hydroxyapatite ceramics Journal of Biomedical Materials Research, Vol 68A Issue 1 168-176, 2004

Higashiyama S, Noda, M, Muraoka, S, Hirose, M, Ohgushi, H, Kawase M and Yagi, K Transplantation of Hepatocytes Cultured on Hydroxyapatite into Nagase Analbuminemia Rats Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol 96 No 1 83-85, 2003

Ikeuchi, M, Ito, A, Dohi, Y, Ohgushi, H, Shimaoka, H, Yonemasu, K and Tateishi, T Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics Journal of Biomedical Materials Research Vol 67A Issue 4 1115-1122, 2003

Uchimura, E Machida, H Kotobuki, N, Kihara, T, Kitamura, S, Ikeuchi, M, Hirose, M, Miyake, J and Ohgushi, H In-Situ Visualization and Quantification of Mineralization of Cultured Osteogenic Cells Calcified Tissue International, issued online, 2003

2 学会発表

Nishikawa, M, Myoui, A, Tamai, N, Yoshikawa, H Ikeuchi M and Ohgushi, H Bone Tissue Engineering Using Novel Interconnected Hydroxyapatite Ceramics Loaded Marrow Mesenchymal Cell the 8th IUMRS-ICAM2003 (The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), 2003 10 12, Yokohama

Kotobuki, N, Ioku K, Kawagoe, D Goto, S and Ohgushi, H Rat Bone Marrows Cultured on Transparent Hydroxyapatite the 8th IUMRS-ICAM2003 (The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), 2003 10 12, Yokohama

Hirose, M, Kotobuki N Machida, H, Kitamura, S,

Takakura, Y and Ohgushi, H Bone Formation by Cryopreserved Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells on Bioceramics Surfaces the 8th IUMRS-ICAM2003(The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), 2003 10 12 , Yokohama

Kotobuki N, Ioku, K, Kawagoe, D, Fujimori, H, Goto, S and Ohgushi H In Vitro Osteogenic Activity of Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured on Transparent Hydroxyapatite Ceramics Bioceramics 16(16th International Symposium on Ceramics in Medicine) , 2003 11 7 , Porto

Hirose, M, Kotobuki, N, Machida, H, Kitamura, S, Takakura, Y and Ohgushi, H Osteogenic Potential of Cryopreserved/ thawed Human Bone Marrow-derived

Mesenchymal Stem Cells Bioceramics 16(16th International Symposium on Ceramics in Medicine), 2003 11 7 Porto

Tanaka, Y, Ohgushi, H, Kitamura, S, Taniguchi, A, Hayashi, K, Isomoto, S Tohma, Y and Takakura, Y Osteogenic Activity of Human Marrow Cells on Alumina Ceramics Bioceramics 16(16th International Symposium on Ceramics in Medicine), 2003 11 8 , Porto

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

治療実験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

骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell、MSC) を用いた組織再生の臨床応用を目指して、基礎となる MSC の増殖分化能に関する *in vitro* の解析及び臨床病態動物モデルによる治療実験を行った。

1 ヒト MSC の増殖能の解析

ヒト腸骨骨髄より単離した MSC は継代を重ねることで p16 遺伝子の発現が誘導され、細胞増殖を阻止する。p16 遺伝子を蛋白レベルで不活化する目的で hTERT 導入 MSC に Bmi-1 遺伝子を導入発現させて不死化 MSC を樹立してきた。不死化後も分化能は維持されており、その形質は長期に 1 年以上にわたって安定していた。臨床応用を目的に p16 遺伝子に対する siRNA により一過性にその機能を不活化すると MSC の増殖が促進されることか判明し、増殖因子に依存しない増殖促進法となる可能性が示唆された。

2 ヒト MSC の多分化能の解析

異なる分化能をもつクローン化 MSC を用いて軟骨分化決定因子の単離を目指した。骨、脂肪、軟骨へ分化するクローン (AOC クローン) と骨、脂肪のみに分化するクローン (AO クローン) より、平板通常培養条件、三次元培養条件及び三次元培養に軟骨分化誘導条件で培養したものから RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、2 群間で軟骨分化誘導した際に異なる反応を示す遺伝子を約 30 種類同定してきた。これらには転写因子、クロマチンリモテリング因子、及びイオンチャンネル関連因子が含まれていた。

無腐性骨壊死の動物モデルの作成と治療実験

イヌの舟状月状骨を液体窒素処理することで骨壊死モデルを作成し、腸骨より採取し、培養増殖させた MSC と人工骨基質製材を充填し、血管柄付き骨膜移植を併用した治療モデルを作成した。