



図66. PLLA の発癌メカニズムの仮説

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品部長

〔研究要旨〕

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

本研究では幹細胞の安全性の評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞（hMSC）の継代数の違いや硬組織用材料であるポリ-L-乳酸（PLLA）との相互作用によるhMSCの遺伝子発現の変化についてDNAチップを用いて検討した。さらに、細胞増殖や発癌に関わる遺伝子の発現についても幹細胞と癌細胞とを比較検討した。方法としては、継代数4と9（#4, #9）のhMSC及びPLLA plate dishで培養したhMSCからtotal RNAを調製し、DNAチップを用いてhMSCの遺伝子発現について検討した。さらに、継代数1,3,5,10（#1, #3, #5, #10）のhMSCと癌細胞であるHeLa S3（ヒト子宮頸癌由来）、HepG2（ヒト子宮頸癌由来）におけるc-myc、Wnt-8B、nucleosteminのmRNA発現量についてReal time RT-PCRを用いて検討した。その結果、DNAチップの解析結果より、細胞の増殖能低下に伴いc-mycの発現は低下するものの、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子は全体的に上昇しており、Wnt-8B及びそのレセプターであるfrizzled homolog 9の上昇やDNAミスマッチ修復遺伝子であるmutS homolog 2の上昇などが見られた。一方、PLLAの影響については、oncogenes and tumor suppressors 遺伝子は全体的に低下したものの、frizzled homolog 9の上昇などが観察された。c-myc、Wnt-8B、nucleosteminについては、どの遺伝子についても癌細胞（HeLa S3, HepG2）では幹細胞に比べてかなり高い発現を示した。c-myc、nucleosteminについては、継代数の増加に伴う発現レベルの低下が認められた。

以上のことから、増殖能の低下に伴う遺伝子発現の変化は、癌化の可能性の上昇と直結するものではないが、上記の遺伝子の発現を確認することによって、様々な患者由来の間葉系幹細胞の有効性・安全性・品質について、効率的に総合評価できる一つの指標となりうるかもしれない。

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

ポリ-L-乳酸（PLLA）インプラントは、過去10年間において骨折の治療といった外科的手術の場で頻りに利用されている。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、in vivoでの影響について評価することを目的とした。BALB/cJマウスでは、PLLAを埋植していない対照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）分泌及び細胞外マトリックス（ECM）、insulin-like growth

factor binding protein (IGFBP) 3、cystein-rich intestinal protein (CRIP) は有意に上昇した。最終的に、BALB/cJ マウスへの PLLA の埋植により、腫瘍の形成が確認されたが、SJL/J マウスでは、一部の動物の組織は腫瘍性変化が観察されたが、発生率は低かった。

これらの腫瘍細胞は、軟寒天コロニー形成能がなく、ヌードマウスへの移植では早期に大きな腫瘍を形成した。本研究の目的である試験法のガイドライン化に必要な科学的データを示すことができた。

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

本研究では、採取年齢の異なるヒト骨芽細胞を用いて、骨分化能の違いについて検討を行った。増殖度について年齢の違いは見られなかったが、分化マーカーの発現は高年齢になると低い値を示した。マウス由来株化細胞は継代数が増えると分化マーカーの発現が低下することが報告されており、ラット骨芽細胞においても、若年と成体では分化能が 40 倍程度高いことが報告されている。本研究結果においても、ヒト骨芽細胞は年齢が高くなると、骨分化能が低下することが示唆された。これより、ラット、マウス、ヒトの骨芽細胞は種に関係なく、年齢が上がると骨形成能は低下することが明らかとなった。

従って、細胞組織医療機器の有効性・安全性を確保するためには、年齢の異なる多様な患者の治療目的を個別に達成できる細胞・組織を選択し、増殖能のみでなく、設計された細胞組織医療機器について、適切な動物モデルによる *in vivo* での治療と組織再生過程を確認し、有効性・安全性・品質を前臨床試験として評価する必要がある。

A. 研究目的

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

現在、再生医療の分野においてヒト幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発が注目を集めている。骨髄中の間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、心臓、神経、肝臓の細胞へ分化することが確認されており、患者自身の骨髄を利用することにより、ヒト受精卵を使用する胚性幹細胞 (ES 細胞) のような倫理的問題がないことからその利用に対する期待は大きい。しかしその反面、幹細胞は正常細胞でありながら増殖能力を持つという点で、癌細胞と共通の性質を持つ。そのため幹細胞の治療への利用は倫理的問題のみならず安全性についても考慮すべきである。そこで本研究では幹細胞の安全

性の評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代数の違いや硬組織用材料であるポリ-L-乳酸 (PLLA) との相互作用による hMSC の癌関連遺伝子の発現の変化について DNA チップを用いて検討した。さらに、hMSC と癌細胞 (HeLa S3, HepG2) との遺伝子発現の比較及び hMSC の継代数の違いによる細胞の増殖や発癌に関わる遺伝子の mRNA 発現の変化について検討した。

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

バイオマテリアルの表面における形態学的、化学的、電気的特徴は細胞のインプラントへの細胞の反応の程度に対して影響を及ぼすが、宿主側の因子も関係していると思われる。そのため、違う種または異なる

組織に同一のマテリアルを埋植することによって細胞の反応の程度に違いが見られるかもしれない。高い生体親和性を示す生分解性の合成ポリマーとしてポリ-L-乳酸 (PLLA) は外科的なインプラントや生体に吸収される縫合糸用の有望なマテリアルとして広く使用されている。PLLA の長期間に渡る埋植はラットにおいて腫瘍形成を引き起こし、別の動物実験においてもいくつかの有害な影響を及ぼすことが報告されている。全ての腫瘍は、細胞外シグナルへの細胞の反応能力の恒常的な制御の崩壊の結果であり、さらに細胞内シグナル伝達異常を引き起こすと一般的に考えられている。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 (Cx) と呼ばれる6つのタンパク質のサブユニットで構成されている。約20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 の崩壊は腫瘍形成における多くのステップやメカニズムに関与していると考えられる。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。昨年度の検討で、BALB/cJ マウスでは、PLLA によって transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) 分泌が上昇し、Cx43 タンパク質の mRNA 発現の低下と GJIC の阻害が観察され、腫瘍形成が促進されることがわかった。そこで今年度

の本研究では、腫瘍形成し易い BALB/cJ マウスと腫瘍形成しにくい SJL/J マウスの2系統のマウスにおける長期間の PLLA プレート埋植が及ぼす新たな影響について検討した。

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

医薬品や生体材料を評価する上で、動物モデルからヒト臨床使用するとき、分化・増殖機能が両種間で異なる可能性を考慮する必要がある。一般に、治療効果の高い動物モデルを用いた論文が多いが、骨疾患の治療を必要とするのは高齢者が多いため、高齢者に治療効果の高い材料の開発と評価を行う必要がある。

骨は常に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返して、再構築を営み続けている。骨量はこの2つの異なる細胞系列間の機能的平衡状態により維持されている。骨代謝は、ホルモン、環境因子、成長、加齢などにより大きく変化するが、ヒトにおける骨芽細胞の機能発現と年齢に関する論文はほとんどない。

本研究では、採取年齢の異なるヒト骨芽細胞を用いて、骨芽細胞の分化機能発現について検討を行った。

B. 研究方法

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

1-1. PLLA plate dish の調製

UV 照射滅菌した PLLA のシートを直径 60mm の dish の底面に合わせて切り抜き、dish 上に貼り付け、PLLA plate dish を調製した。そして hMSC をこの dish 上で培養し実験に供した。

1-2. DNA チップによる hMSC の遺伝子発現解析

通常のプラスチック dish を用いて培養した継代数 4 と 9 (#4, #9) の hMSC 及び PLLA plate dish を用いて培養した hMSC から total RNA を調製し、DNA チップ (BD Atlas™ Human Cancer 1.2 Array) を用いて、hMSC の継代による影響や、PLLA との相互作用による hMSC の遺伝子発現の変化について検討した。

1-3. Real time RT-PCR による mRNA 発現量の定量的解析

継代数 1,3,5,10 (#1, #3, #5, #10) の hMSC と癌細胞である HeLa S3 及び HepG2 から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を調製した。抽出した RNA の cDNA への逆転写は First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics) を用いて行った。そしてそれぞれの細胞中の c-myc oncogene、Wnt-8B、nucleostemin の mRNA 発現量について Real time RT-PCR 法にて検討した。PCR に用いたプライマー及びアニーリング温度は表 1 に示した。PCR 反応は、95℃で 10 秒、それぞれのアニーリング温度で 15 秒、72℃で 12 秒を 40 サイクル行った。PCR 反応は、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

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 のマウス及び 5 週齢の雄の BALB/cAnCrj-nu ノードマウスを用いた。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 10 ヶ月間飼育し、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. ギムザ染色

細胞が confluent になったら固定し、ギムザ染色を行い、細胞の形態について検討した。

2-5. 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 confluent 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。

2-6. Western blot 解析

直径 60mm の dish に confluent の状態の細胞を直接 100 μ L の 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer 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。

2-7. 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'-ACAGTCTGCCTTTTCGCTCTAAC-3'

Reverse:

5'-GTAAGGATCGCTTCTTCCCTTC-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。

2-8. 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。

2-9. ノードマウスを用いた腫瘍形成の確認
それぞれの細胞 ($2 \times 10^6 / 0.2$ mL PBS) をノードマウスの背部皮下に注入した。その

後、腫瘍の形成について観察した。細胞注入後 10 週間以内に明らかな塊が現れ、その後そのサイズが大きくなったものを腫瘍が形成されたとみなした。腫瘍形成がなされないとの判断は、注入後少なくとも 5 ヶ月後に行った。

2-10. 軟寒天培養法

およそ 10^5 の細胞を 2 mL の 0.3% 軟寒天培養液で培養した。4 週間培養後、*propidium iodide* で 48 時間染色し測定した。コロニーのサイズが $10 \mu\text{m}^2$ 以上のものを陽性とみなした。

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

3-1. 細胞の培養

採取年齢の異なる [生後 1 日 (1D), 16 才 (16Y), 41 才 (41Y)] 正常ヒト骨芽細胞 (Normal Human Osteoblast : NHost cells,) は、10% fetal bovine serum (FBS) を含む α MEM (GIBCO) 培地で培養した。 2×10^6 cells/ml の細胞懸濁液 20 μ l を 24 well multiplate の各 well の中央にスポット状に播種した。細胞が接着した後、分化誘導培地 1 ml を静かに添加し、14 日間培養した。

3-2. 細胞増殖

NHost cells の増殖は、Tetracolor ONE (Seikagaku Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。2 週間培養後、2% TetraColor ONE を含む α MEM 培地 1 ml と交換して、2 時間、37 $^{\circ}$ C でインキュベートし、450nm (対照波長 600nm) での吸光度を測定して、細胞の増殖度を求めた。

3-3. 細胞溶解液の調整

2 週間培養した NHost cells の総タンパク質量、alkaline phosphatase (ALPase) 活性は以下の方法に従って、細胞溶解液を用

いて測定した。細胞を PBS で洗浄し、nonidet P-40 を含む 0.25 ml PBS を各 well に添加し、37℃でインキュベートした。懸濁液をホモジナイズした後、遠心を行った。この上澄み液を細胞溶液として、総タンパク質量は、Bio-Rad protein assay (protein assay, Bio-Rad Lab.) 法により、595nm の吸光度を EIA READER を使って測定した。細胞溶解液は、測定まで-20℃で保存した。

3-4. ALPase 活性

細胞溶解液の ALPase 活性は、以下の方法で測定した。細胞溶解液 50 μ l に、MgCl₂ を含有する 0.1 M carbonate buffer (pH 10.2) 0.5 ml 及び p-nitrophenylphosphate 0.5 ml を加えて、30 分間反応させ、NaOH 2ml を加えて反応を停止した後、410nm での吸光度を測定して求めた。

3-5. Calcium content

細胞内の石灰化度は、細胞を PBS で洗浄後、HCl 水溶液 0.4 ml を各 well に添加し、静置して、塩酸抽出液を得た。塩酸抽出液 10 μ l に monoethanolamine buffer (pH 11.0) 1ml を加え、つぎに o-cresolphthalein complexon と 8-hydroxyquinoline を含む発色試薬 100 μ l を加えた。室温で反応後、570nm での吸光度を測定し、細胞当たりのカルシウム含量を定量した。

C. 研究結果

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

1-1. DNA チップを用いた遺伝子発現の網羅的解析

1-1-a. hMSC の継代による遺伝子発現に及ぼす影響について

継代数の異なる hMSC (#4 と#9) における癌関連遺伝子の発現について比較した結果を表 2 に示した。継代数が増える事によって、以下の機能に関わる遺伝子発現が上昇した。

- cell cycle
- cell adhesion receptors/proteins
- immune system proteins
- oncogenes and tumor suppressors
- stress response proteins
- DNA binding and chromatin proteins
- cell receptors (by ligands)
- cell receptors (by activities)
- intracellular transducers / effectors / modulators
- DNA synthesis, recombination, and repair

一方、以下の機能に関わる遺伝子発現が低下した。

- membrane channels and transporters
- metabolism
- translation
- apoptosis associated proteins
- RNA processing, turnover, and transport
- protein turnover
- cytoskeleton/motility proteins

1-1-b. hMSC における PLLA による遺伝子発現の変化について

PLLA のシート上で hMSC を培養することによって変化した癌関連遺伝子の発現についても比較した。PLLA によって、以下の機能に関わる遺伝子発現が上昇した。

- cell cycle
- cell adhesion receptors/proteins
- immune system proteins
- metabolism

- cell receptors (by ligands)
 - cell receptors (by activities)
 - cytoskeleton/motility proteins
- 一方、以下の機能に関わる遺伝子発現が低下した。

- cell surface antigen
- transcription
- oncogenes and tumor suppressors
- stress response proteins
- membrane channels and transporters
- translation
- intracellular transducers / effectors / modulators
- protein turnover
- DNA synthesis, recombination, and repair

1-2. Real time RT-PCR による mRNA 発現量の定量的解析

DNA チップによる解析結果から、転写因子であり細胞の増殖に関わる *c-myc* oncogene、またシグナル伝達系で重要な働きを持ち発癌にも関わると考えられている *Wnt-8B* について着目し、mRNA 発現量の定量的解析を行った。さらに、幹細胞と癌細胞の増殖に関わるとされているタンパク質 *nucleostemin* の mRNA 発現量についても検討を加えた。*hMSC* (#1, #3, #5, #10) と癌細胞である *HeLa S3*, *HepG2* を用いて検討した。

まず、*hMSC* の継代が進むにつれて *hMSC* の増殖能が下がることを確認した。(図 1)

1-2-a. *c-myc*

癌細胞である *HeLa S3* (ヒト子宮頸癌由来) 及び *HepG2* (ヒト肝癌由来) では、幹細胞である *hMSC* に比べて *c-myc* の

mRNA レベルが有意に高かった。(図 2) *hMSC* については、継代 3 及び 5 代目は 1 及び 10 代目に比べて高かった。(図 3)

1-2-b. *nucleostemin*

c-myc と同様に、癌細胞である *HeLa S3* 及び *HepG2* では、*hMSC* に比べて *nucleostemin* の mRNA レベルが有意に高かった。(図 4) *hMSC* については、継代数が増加するのに伴い発現が低下した。(図 5)

1-2-c. *Wnt-8B*

癌細胞である *HeLa S3* 及び *HepG2* では *Wnt-8B* の mRNA 発現が認められたものの、*hMSC* ではどの継代数においても発現が認められなかった (図 6)。

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. ギムザ染色による細胞の形質の検討

BALB/cJ において PLLA プレートを埋植していない対照群の皮下組織の細胞ではほんの少しくロスが見られるのに対して PLLA 埋植群の皮下組織ではクロス模様が見られ、また、接触障害が減少した結果広範囲で *pile up* が観察された (図 7-A, B)。反対に、*SJL/J* では、皮下組織の細胞は平行方向に並び、接触障害により平らで単層を示した (図 7-C, D)。

2-2. GJIC 機能の評価

SLDT アッセイにて検討した。*BALB/cJ* において、PLLA プレートを埋植していない対照群と埋植した群間で GJIC 機能に有意な差が見られた (図 8)。また、*SJL/J* は *BALB/cJ* に比べて、GJIC 機能が低い傾向が見られた (図 8)。

2-3. *BALB/cJ* マウスにおける *Cx43* のタンパク質及び mRNA 発現について

Cx43 のタンパク質及び mRNA の発現は共

に PLLA を埋植することによって低下した (図 9, 10)。

2-4. TGF- β_1 分泌について

TGF- β_1 分泌レベルは、BALB/cJ において PLLA プレート埋植していない対照群に比べて埋植した群では有意に上昇した。反対に、SJL/J においては TGF- β_1 分泌レベルは、PLLA プレート埋植していない対照群に比べて埋植した群では減少する傾向が見られた (図 11)。

2-5. ジーンチップ解析

BALB/cJ において、主な ECM (ファイブロネクチン、プロコラーゲン VIII $\alpha 1$ サブユニット、オステオポンチン (OPN) 前駆体) (図 12・A, B, C) と、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) 3 (図 12・D) と、cystein-rich intestinal protein (CRIP) (図 12・E) は、PLLA プレート埋植していない対照群に比べて埋植した群では上昇した。SJL/J においては、PLLA プレート埋植によるそのような違いは見られなかった。

2-6. ヌードマウスへの皮下組織細胞の移植による腫瘍形成の評価

PBS(-)を注入した陰性対照群では腫瘍形成は認められなかった (図 13・A)。PLLA プレート埋植した BALB/cJ マウス由来の皮下組織の細胞を注入したヌードマウスは、注入後 2 週間以内に急速にそして大きな腫瘍の形成が認められた (図 13・B, C, E, F)。HeLa 細胞を注入した陽性対照群では、細胞注入後 4 週間後から徐々に腫瘍形成が認められた (図 13・D, G)。

2-7. 軟寒天培養法による発癌の評価

PLLA および陰性対照群では、軟寒天中に細胞のコロニー形成は認められなかった。

HeLa 細胞は、軟寒天中で多数のコロニーを形成した。(data not shown)

2-8. 組織病理学的評価

PLLA プレートを埋植した BALB/cJ マウス由来の皮下組織の細胞を注入したヌードマウスにおいて形成された腫瘍は、monophasic fibrous synovial sarcoma であることが H&E と Keratin AE1/AE3 染色による組織病理学的評価によって示された。また、Staghorn pattern (図 14・A) と Herring-bone-pattern (図 14・B, C) を持つ腫瘍細胞であることが分かった。

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

本研究では採取年齢の異なる NH0st cells の増殖、ALPase 活性、石灰化の違いについて検討した。NH0st cells の増殖は採取年齢の違いで大きな変化が見られず、1D, 16Y, 41Y はほぼ同程度の増殖度であった (図 15)。図 16 に骨芽細胞の初期分化マーカーである ALPase 活性の結果を示した。NH0st cells の ALPase 活性は、採取年齢の違いによって、大きな変化が見られた。1D の NH0st cells は ALPase 活性が高い値を示したが、16Y, 41Y は活性が低かった。NH0st cell の石灰化度も、ALPase 活性と同様に、年齢の差が大きく現れた (図 17)。1D は石灰化度が高く、16Y, 41Y は非常に低い値を示した。

D. 考察

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

本研究では、細胞組織医療機器の材料として期待されるヒト間葉系幹細胞 (hMSC) についてその有効性、安全性及び品質評価に関する検討を *in vitro* の系で行った。同

時にやはり細胞組織医療機器の材料として現在すでに臨床の場で用いられている PLLA が幹細胞に及ぼす影響についても検討した。

幹細胞は無限増殖能を持つと言われているが、実際、hMSC は継代が進むにつれてその増殖能が低下することが確認された (図 1)。この様な細胞の増殖能の変化が細胞の癌関連遺伝子の発現に及ぼす影響について DNA チップを用いて検討した (表 2)。その結果、細胞の増殖能低下に伴い c-myc oncogene の発現は低下するものの、oncogenes and tumor suppressors genes は全体的に上昇しており、シグナル伝達系で重要な働きを持ち発癌にも関わると考えられている Wnt-8B 及びそのレセプターである frizzled homolog 9 の上昇や DNA ミスマッチ修復遺伝子である mutS homolog 2 の上昇などが見られた。以上のことから、幹細胞の増殖能は徐々に低下していくため無限増殖を続ける癌細胞とは異なる特性を持つと思われる一方で癌化の危険性が高まる可能性も否定できないことがわかった。

一方、hMSC の癌関連遺伝子の発現に及ぼす PLLA の影響について検討したところ、oncogenes and tumor suppressors 遺伝子は全体的に低下したものの、frizzled homolog 9 の上昇などは観察され、PLLA によって hMSC の遺伝子発現に様々な変化が起こることがわかった。

hMSC の継代数の違いによる遺伝子発現の変化について検討した DNA チップ解析の結果 (図 1) から、c-myc oncogene 及び Wnt-8B についてさらに詳細に調べるために、hMSC の継代数を 4 点 (#1,3,5,10) 取

り、それぞれの mRNA 発現量について Real time RT-PCR による定量的解析を行った。同時に癌細胞 (HeLa S3 と HepG2) と比較検討した。また、幹細胞と癌細胞の増殖に関わるとされているタンパク質 nucleostemin の mRNA 発現量についても検討した。その結果、c-myc oncogene、nucleostemin、Wnt-8B とともに幹細胞では癌細胞 (HeLa S3, HepG2) に比べてかなり発現が低かった (図 2,4,6)。c-myc oncogene、nucleostemin については、継代数の増加に伴う発現レベルの低下が認められた (図 3,5)。以上のことから、増殖能の低下に伴う遺伝子発現の変化は、癌化の可能性の上昇と直結するものではないが、上記の遺伝子の発現を確認することによって、幹細胞の安全性・有効性・品質を評価できる指標となりうるかもしれない。

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

ポリラクチドは、広く臨床の場で用いられている生体吸収性のポリエステルである。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。本研究において、PLLA プレートを埋植することによって BALB/cJ マウスではクロス模様を形成し接触障害を抑制するといった細胞の形態に違いが出ることを明らかにした (図 7-B)。その原因を確かめるために、GJIC 機能への影響について着目した。本研究では (PLLA プレート埋植後 10 ヶ月の細胞を用いた) これまでの著者らの研究結果と同様に PLLA

埋植によって GJIC 機能もまた有意に阻害される事がわかった(図 8)。ギャップジャンクションは Cx 分子の C 末端領域の翻訳後のリン酸化によって制御されており、Cx 分子のリン酸化は GJIC の阻害と密接に関わっている。そのため、ギャップジャンクションは PLLA 誘導性腫瘍形成において主な役割を果たしているようである。Cx43 のタンパク質と mRNA の発現について検討を行ったところ、Cx43 のタンパク質発現は 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 9)。Cx43 の mRNA 発現もまた、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抑制された(図 10)。Cx43 のアンチセンス RNA によって Cx43 のタンパク質発現を低下させると腫瘍形成能が増したとの報告がある。遺伝子の変化や Cx43 のタンパク質の翻訳後の変化によって GJIC の機能低下と腫瘍形成が関連するかもしれない。そのため、PLLA による GJIC 阻害効果と Cx43 タンパク質量の低下を誘導し、腫瘍形成能を高めるのかもしれない。TGF- β 1 はリン酸化型 Cx43 を減少することによって GJIC 機能を弱め、また ECM の発現を上昇させる。本研究では、4 種類の細胞における TGF- β 1 の産生量を検討した。その結果、TGF- β 1 分泌量は 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有意に上昇した。しかし、SJL/J マウスでは PLLA 埋植によって TGF- β 1 分泌量は逆に減少した(図 11)。さらに、これら 4 種類の細胞(埋植後 1 ヶ月と 10 ヶ月に採取したもの)についてのジーンチップ解析に

おいて、主な ECM タンパク質(ファイブロネクチン、プロコラーゲン VIII α 1 サブユニット、OPN)、IGFBP3、CRIP は PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞では上昇することを見出した(図 12)。これらのタンパク質は直接腫瘍形成を引き起こすという報告もある。

BALB/cJ マウスにおいて、PLLA プレート埋植 10 ヶ月後に埋植部位に増殖した組織が形成された。この増殖した組織が腫瘍なのかそれとも体内異物(PLLA)による炎症反応の結果形成されたものなのかを確かめるために、著者らはヌードマウスを用いて腫瘍形成試験を行った。PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞を注入したヌードマウスにおいて大きくて急速な腫瘍増殖が観察された(図 13)。組織病理学的評価によってこの腫瘍は monophasic fibrous synovial sarcoma であることがわかった(図 14)。しかしながら、これらの腫瘍細胞は軟寒天培養法ではコロニー形成は認められなかったが、これはテロメラーゼ活性が低いからかもしれない。

以上のことから、PLLA は TGF- β 1 の分泌を上昇させ、GJIC の阻害、ECM タンパク質と IGFBP の発現の上昇を引き起こし、腫瘍を形成することが示唆された。さらに、PLLA は CRIP と OPN の発現も上昇させた。最終的にこれら全ての因子が腫瘍形成を亢進させるのであろう。(図 18)

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

加齢に伴う骨形成能の低下のメカニズムについては、未だ明かとなっていない。この骨形成能の低下に関わる分子や遺伝子を解析することは、骨再生能の低い患者に効

果のある医薬品、生体材料の開発にとって重要である。そこで本研究では、年齢の異なるヒト骨芽細胞の分化機能発現について微小集積培養法を用いて検討した。

骨芽細胞の増殖能について検討したところ、増殖における年齢の差は認められなかった。初期分化マーカーである ALPase 活性を評価したところ、1D は活性が高く、16Y、41Y は活性が低く、年齢の差が顕著に認められた。マウス由来骨芽細胞 MC3T3-E1 は継代数が増えると、ALPase 活性や最終分化マーカーのオステオカルシンの発現が低下することが報告されている。また、ラット骨芽細胞においても、juvenile (若年) の石灰化能は adult (成体) の 40 倍程度高いことが報告されている。本実験結果でも、ヒト骨芽細胞は年齢が高くなると、骨分化能が低下することが示唆された。これより、ラット、マウス、ヒトの骨芽細胞は種に関係なく、年齢が上がると骨形成能は低下することが明らかとなった。以上のことから、ヒト骨芽細胞の石灰化は初期分化マーカーの ALPase 活性が大きく関与していると考えられる。

E. 結論

1. 細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究

再生医療の臨床で実際に使用されている幹細胞の有効性・安全性・品質評価を目的として、正常ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の継代数の違いや実使用されている硬組織用材料であるポリ-L-乳酸 (PLLA) との相互作用による hMSC の遺伝子発現の変化について DNA チップを用いて検討した。また、細胞増殖や発癌に関わる遺伝子の発

現についても幹細胞と癌細胞とを比較検討した。DNA チップの解析結果より、細胞の増殖能低下に伴い c-myc の発現は低下するものの、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子は全体的に上昇しており、Wnt-8B 及びそのレセプターである frizzled homolog 9 の上昇や DNA ミスマッチ修復遺伝子である mutS homolog 2 の上昇などが見られた。

一方、PLLA の影響については、oncogenes and tumor suppressors 遺伝子は全体的に低下したものの、frizzled homolog 9 の上昇などが観察された。c-myc、Wnt-8B、nucleostemin については、どの遺伝子についても癌細胞 (HeLa S3, HepG2) では幹細胞に比べてかなり高い発現を示した。c-myc、nucleostemin については、継代数の増加に伴う発現レベルの低下が認められた。

実際に臨床使用されるヒト間葉系幹細胞の有効性・安全性・品質評価に関する研究として、遺伝子発現解析を行った。その結果、ヒト間葉系幹細胞は、継代により増殖能が次第に低下し、有効性および品質低下が懸念されること、更に、安全性が懸念される遺伝子群の発現上昇を明らかにした。

また、典型的な組織工学用材料との相互作用によっても、これらの一部の遺伝子群と同様な変化がみられるものの、間葉系幹細胞の継代培養による発現低下とは逆に発現上昇がみとめられる遺伝子もあり、その遺伝子の機能から組織工学材料の化学組成に起因する発現上昇が示唆された。

様々な患者由来のヒト間葉系幹細胞からなる細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価において、効率的かつ見落としの少ない評価方法として、DNA tip による

網羅的解析が短期試験法の一つとして有用性が高い事を示すことができた。

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、その1ヶ月及び10ヶ月後に埋植部位の皮下組織を採取し評価した。BALB/cJ マウスでは、PLLA を埋植していない対照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) 分泌及び細胞外マトリックス (ECM)、insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) 3、cystein-rich intestinal protein (CRIP) は有意に上昇した。さらに、PLLA は CRIP と OPN の発現も上昇させた。また PLLA を埋植した BALB/cJ マウス由来の細胞を注入したヌードマウスにおいて腫瘍が形成された。組織病理学的評価によってこの腫瘍は monophasic fibrous synovial sarcoma であることがわかった。

Okabe らが最近報告(2004)しているテロメア結合たんぱく質 (Telomere Repeat Binding Factor Telomere Repeat Binding Factor TRF1/TRF1) のがん化指標としての有用性について検討した。各種がん細胞や正常細胞での発現レベルを比較することにより総合的に評価した結果、両者間で一定の関係が得られず、TRF1 は癌化指標とならないことが明らかになった。(data not shown)。

一方、コネキシンと TGF β の発現動態、複

数の癌関連遺伝子の gene tip 解析、ヌードマウス移植実験で発ガン性を予測できる事を示した。また、癌細胞は、必ずしも軟寒天コロニー形成試験でコロニーを形成しない。この試験法による細胞の癌化能評価では、擬陰性になることを示した。ガイドライン作成の上で重要な根拠となる科学的データを示すことができた。

3. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

本研究では、採取年齢の異なるヒト骨芽細胞を用いて、骨芽細胞の分化機能発現について検討を行った。骨芽細胞は年齢が上がるほど骨分化能の低下が認められた。従って、細胞組織医療機器の有効性・安全性を評価するためには、患者の年齢に応じた適切な細胞・組織および治療法の選択が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 長幡 操、寺本 彰、阿部康次、中岡竜介、土屋利江、ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果 繊維学会誌、印刷中
2. Nagahata M, Nakaoka R, Teramoto A, Abe K, Tsuchiya T, The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes. Biomaterials, accepted.
3. Nakaoka R, Ahmed S, Tsuchiya T, Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45. J. Biomed. Mater. Res. A, accepted.

4. Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya and Yutaka Kariya, Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Enhancement of proliferation of Human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides. *Animal Cell Technology* accepted.
- 5 . Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda, and Toshie Tsuchiya, Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. *Animal Cell Technology* accepted.
- 6 . Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifuddin Ahmed, and Rumi Sawada, Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage. *Animal Cell Technology* accepted.
7. Yuping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya, Increase of the insulin secretion in hit-t15 cells: Gap Junctional Intercellular communications Enhanced by Hyaluronic Acid. *Animal Cell Technology* accepted.
8. Nasreen Banu and Toshie Tsuchiya, Markedly different action of the Hyaluronic acids and Chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes between micromass and 3-D honeycomb rotation cultures. *Biomaterials*, Submitted
9. Tsutomu Nagira, Susan Matthew, Yoko Yamakoshi and Toshie Tsuchiya, A Remarkable Enhancement of Gap junctional Intracellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide (PIPAAm). *Tissue Engineering*. Submitted
10. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Toshie Tsuchiya, Studies on the development of evaluation method and the biocompatibility of functional biomaterials. *J. Artificial Organs*. Submitted
11. Toshie Tsuchiya A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products. *ASTM, STP1452*, 254-261, 2004.
12. Misao Nagahata, Toshie Tsuchiya et. al, A novel function of N-cadherin and Connexin43 :Marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed with sulfated hyaluronan, *Biochem. Biophys. Res. Commun* , 315(3), 603-611, 2004
13. 土屋利江, 第 7 章 再生医療とその周辺 再生医療をとりまく規制とその現状・今後, 立石 哲也, 田中 順三, 図解 再生医療工学, 工業調査会, 296-303, 2004.
14. 柳楽 勤, 土屋利江, メカニカルストレスに対する細胞応答の分子機構, 大森豊明, 生体物理刺激と生体反応, フジテクノシステム, 667-677, 2004
15. 土屋利江, バイオマテリアルの安全性を考える, バイオマテリアル-生体材料-, 22-2, 69-70, 2004

- 16.土屋利江、バイオマテリアルの許認可と留意点、バイオマテリアル-生体材料-、22-4、258-264、2004
- 17.Haishima Y, Matsuda R, Hayashi Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 119-129, 2004
- 18.Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Novel mechanism of tumorigenesis: Increased transforming growth factor-beta 1 suppresses the expression of connexin 43 in BALB/cJ mice after implantation of poly-L-lactic acid. *J Biomed Mater Res*, 70, 335-340, 2004
- 19.Takeshi Yagami, Yuji Haishima, Toshie Tsuchiya, Akiko Tomitaka-Yagami, Hisao Kano, Kayoko Matsunaga, Proteomic Analysis of Putative Latex Allergens. *Allergy and Immunology*, 135, 3-11, 2004
- 20.土屋利江、バイオマテリアルの安全性について組織工学用材料を中心として、日本再生歯科医学会誌、2、1-8、2004
- 21.土屋利江、ティッシュエンジニアリング用マテリアルの製品化条件と国際標準化、再生医療、3巻、5月号、71-75、2004
- 22.Eiji Okada, Yuka Komazawa, Masaki Kirihara, Hideshi Inoue, Naoki Miyato, haruhiro Okuda, Toshie Tsuchiya, Yoko Ymamakoshi, Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling, *Tetrahedron Letters*, 45, 527-529, 2004
- 23.Tsuchiya T, Sakai M, Ikeda H, Mashino T, Banu Y, Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method, *Animal cell technology*, 13, 475-479, 2004
- 24.Saifuddin Ahmed and Toshie Tsuchiya, Different expression on Gap junctional protein connexin43 in two strains of mice after one-month Implantation of Poly-L-Lactic acid, *Animal cell technology*, 13, 481-485, 2004
- 25.Rahman MS, Banu Y, Matsuoka A, Ichikawa A, Sakai M, Ikeda H, Tsuchiya T, Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using ELISA- and FACS-analysis, *Animal cell technology*, 13, 277-280, 2004
- 26.土屋利江、細胞組織医療機器等の製品化のためのガイドライン・環境整備について高分子、53巻、3月号、144-146、2004
- 27.土屋利江、細胞組織医療機器等の品質・安全性確保について、再生医療、3巻、2月号、107-110、2004
- 28.Atsubo Matsuoka, Toshie Tsuchiya, Gene expression changes in Balb/3T3 transformants induced by poly(L-lactic acid) or polyurethane film, *J. Biomed. Mater. Res*, 68A, 376-382, 2004

2. 学会発表

- 1.土屋利江:「教育講演」再生医療実用化への道、第4回日本再生医療学会
2. 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操:陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞の分化促進効果、第6回日本組織工学会大会(12-13June,2003)
3. 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操, 陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表

- 皮角化細胞の分化促進及び細胞間連絡機構充進効果, 第25回日本バイオマテリアル学会, (16-17, Dec. 2003)
4. 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土屋利江: 高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004(つくば、2004年11月)
 5. 中岡竜介、Susan Hsiung、土屋利江、David J. Mooney: 細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004(つくば、2004年11月)
 6. 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操、陰イオン修飾ヒアルロン酸による正常ヒト表皮角化細胞およびヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第3回日本再生医療学会総会, (May. 2004)
 7. 柳楽 勤、土屋利江、阿部康次、長幡 操、陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果 第26回日本バイオマテリアル学会, (Dec. 2004)
 8. Tsutomu Nagira, Misao Nagahata, Toshie Tsuchiya.: Enhancement of cell differentiation in Normal Human Epidermal Keratinocytes and Human Mesenchymal Stem Cells by the anionic-modified hyaluronan. 第3回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2005), (Feb, 2005)
 9. 土屋利江: 再生医療デバイス実用化のために みらいせん展健康系イベントシンポジウム(11, Aug. 2004)
 10. 土屋利江: 医療機器としての人工臓器の開発 みらいせん展健康系イベントシンポジウム(7, Aug. 2004).
 11. 土屋利江: 「ISO TC194 医療機器の生物学的評価と動物福祉」第27回日本学術会議 トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム (2004. 11) 東京
 12. Saifuddin Afmed, Toshie Tsuchiya and Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
 13. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, SaifUddin Afmed and Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: toxic effects of catalyst used in chondrogenesis of human articular cartilage. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
 14. Y uping Li, Tsutomu Nagira and Toshie Tsuchiya: Increase of the insulin secretion in HIT-T15 cells enhancement of gap functional intercellular communication caused by hyaluronic acid. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya
 15. Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda and Toshie Tsuchiya: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. 国際動物細胞工学会 2004 11. Nagoya
 16. N. Nakamura and T. Tsuchiya: Effect of biodegradable polymer plla on the cellular function of human astrocyte. 国際動物細胞工学会. 2004 11. Nagoya

17. Toshie Tsuchiya: Regulation and Activities of Standardization for Tissue Engineered Products and Medical Devices in Japan. 4th ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUSION OF NANO AND BIO TECHNOLOGIES (FNB) 2004 11. Tsukuba
18. 柳楽勤、土屋利江、阿部康次、長幡操: 「陰イオン修飾ヒアルロン酸によるヒト間葉系幹細胞の分化促進効果」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
19. 中岡竜介、Susan Hsiong、土屋利江、David J. Mooney: 「細胞接着ペプチド修飾アルギン酸ゲル上での細胞機能変化 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
20. 松岡厚子、松田良枝、齋島由二、長谷川千恵、土屋利江: 「医療機器の生物学的安全性試験の標準化に関する研究: 医用材料関連物質による染色体数異常の誘発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
21. 齋島由二、樋口多恵、瀬下文恵、長谷川千恵、矢上健、土屋利江、中橋敬輔、井之上浩一、伊藤里恵、中澤裕之: 「PVC 製医療機器からの DEHP 溶出リスクを予測する簡易分析法の開発」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
22. 齋島由二、瀬下文恵、伊佐間和郎、長谷川千恵、矢上健、土屋利江、中橋敬輔、井之上浩一、伊藤里恵、中澤裕之: 「PVC 製医療機器の光照射・熱処理による DEHP 溶出挙動の解析」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
23. 齋島由二、長谷川千恵、小園知、伊佐間和郎、佐々木和夫、矢上健、土屋利江: 「エンドトキシン不活化処理を施した天然医用材料の生体親和性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
24. 伊佐間和郎、齋島由二、長谷川千恵、小園知、佐々木和夫、土屋利江: 「ガンマ線照射天然医療材料の生体適合性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
25. 伊佐間和郎、土屋利江: 「ガンマ線照射ポリ乳酸のアパタイト形成能」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
26. 五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江: 「マウスを用いたタンパク材料の即時型アレルギー性評価」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
27. 中岡竜介、長幡操、寺本彰、阿部康次、土屋利江: 「高分子電解質錯体上での骨芽細胞の機能変化とその安全性の予測」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004. 11) つくば
28. Toshie Tsuchiya: Evaluation of Cell and tissue Based Products in Japan. The 2nd KFPA-KRIBB Joint International Symposium International Harmonization on Biopharmaceuticals. 2004 10. Korea
29. 土屋利江: 「前臨床試験としての動物モデル(特徴と限界)総論」第2回医療機器フォーラム 医療機器・細胞組織医療機器の前臨床試験等について (2004. 10) 東京

- 30.土屋利江:招待講演「国内における医療用具の安全性対策について」第42回日本人工臓器学会大会 (2004. 10) 東京
- 31.土屋利江:招待講演「金属材料等の評価について」第44回日本歯科理工学会学術講演会 (2004. 9) 京都
- 32.土屋利江:「期待される材料開発」交流連携推進委員会 医療準備会 (2004. 8) 東京
- 33.土屋利江:「医療機器としての人工臓器の開発」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 人工臓器とファイバー (2004. 8) 東京
- 34.土屋利江:「再生医療デバイス実用化のために」みらいせんい展健康系イベントシンポジウム 再生量を切りひらくファイバーエンジニアリング (2004. 8) 東京
- 35.五十嵐良明、鹿庭正昭、土屋利江:「マウスを用いた医用材料のアレルギー性評価法に関する検討」日本トキシコロジー学会学術年会 (2004. 7) 大阪
- 36.土屋利江:「医療用具の安全性」第35回バイオメディカルカリキュラム講義 (2004. 7) 東京女子医科大学
- 37.土屋利江:「医療機器、医療材料の薬事法改正による安全性確保対策等について」第20回日本人工臓器学会 教育セミナー (2004. 7) 東京
- 38.Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Saifddin Ahmed, Rumi Sawada: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products:Influence of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on chondrogenesis of human articular cartilage. 第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 39.Saifddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Yutaka Kariya: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Effect of new polysaccharides in Human mesenchymal stem cells. 第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 40.澤田留美、伊藤友実、松田良枝、土屋利江:「細胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(2) 遺伝子発現解析によるヒト間葉系幹細胞とポリ乳酸の相互作用について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 41.伊藤友実、澤田留美、松田良枝、松岡厚子、土屋利江:「胞組織医療機器の有効性・安全性・品質評価に関する研究(3)・ヒト間葉系幹細胞におけるTGF- β の遺伝子発現解析について」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 42.長幡操、柳楽勤、土屋利江、阿部康次「採取年齢の違いによるヒト骨芽細胞の分化の顕著な違いと硫酸化ヒアルロン酸に応答する細胞内シグナル伝達分子の探索」第7回日本組織工学会 (2004. 7) 東京
- 43.土屋利江:「なぜ医療機器は海外で開発されるのか? -日本の現状と課題」次世代医療システム産業化フォーラム 2004 (2004. 6) 大阪
- 44.Toshie Tsuchiya, Nasreen Banu, Sadami Tsutsumi: Different action on the chondrogenesis of human articular chondrocytes with hyaluronic acid and collagen matrix. 7th World Biomaterial Congress (2004,5) Sydney
- 45.Toshie Tsuchiya: Recent Activities of

Standards of Medical Devices and Tissue Engineered Products in Japan. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur. (invited lecture)

46. Toshie Tsuchiya: Overview on Biological and Clinical Evaluation. International Conference on Biomaterials and Tissue Engineering 2004 (2004,5) Kuala Lumpur. (invited lecture).

47. 土屋利江:「医療機器、細胞組織医療機器の製品化のための規制環境の整備について」東京大学医科学研究所 講演(2004.4) 東京

48. 土屋利江:「再生医療に関わる評価技術とその標準化」第3回 CERES 研究会・講演会 (2004.4) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得予定

特願 2003-8855 ギャップ機能抑制剤

特願 2004-1932332 ギャップ機能抑制剤、細胞増殖促進剤および硫酸化ポリフコース

特願 2004-167632 生体吸収性を有する新規材料、の製造方法、及びその用途

特願 2004-330417 生体組織補填材および生体組織補填体

特願準備中：生体組織補填材の製造方法

協力研究者

澤田 留美

石黒 操

伊藤 友美

サイフデイン・アーメド

(国立医薬品食品衛生研究所 療品部)

表 1. Real time RT-PCRに用いたプライマーとアニーリング温度

Gene name	GenBank™ accession number	Primer orientation	Nucleotide sequence	Starting sequence position	Size for the PCR amplicon(bp)	Annealing Temp (°C)
c-myc	V00568	Forward	5'- GCG AAC ACA CAA CGT C -3'	1626	315	50
		Reverse	5'- CAA GTT CAT AGG TGA TTG CT -3'	1940		
nucleostemin	X91940	Forward	5'- CCA TTC GGG TTG GAG TAA -3'	782	284	50
		Reverse	5'- CTG TCG AGC ATC AGC C -3'	1065		
Wnt-8B	NM_014366	Forward	5'- AGT GAC AAT GTG GGC T -3'	331	244	60
		Reverse	5'- CGT GGT ACT TCT CCT TCA G -3'	574		

図 1. hMSCの継代数の違いによる増殖曲線の比較

