図81 P19細胞はレチノイン酸でニューロンタイプの神経細胞に分化する

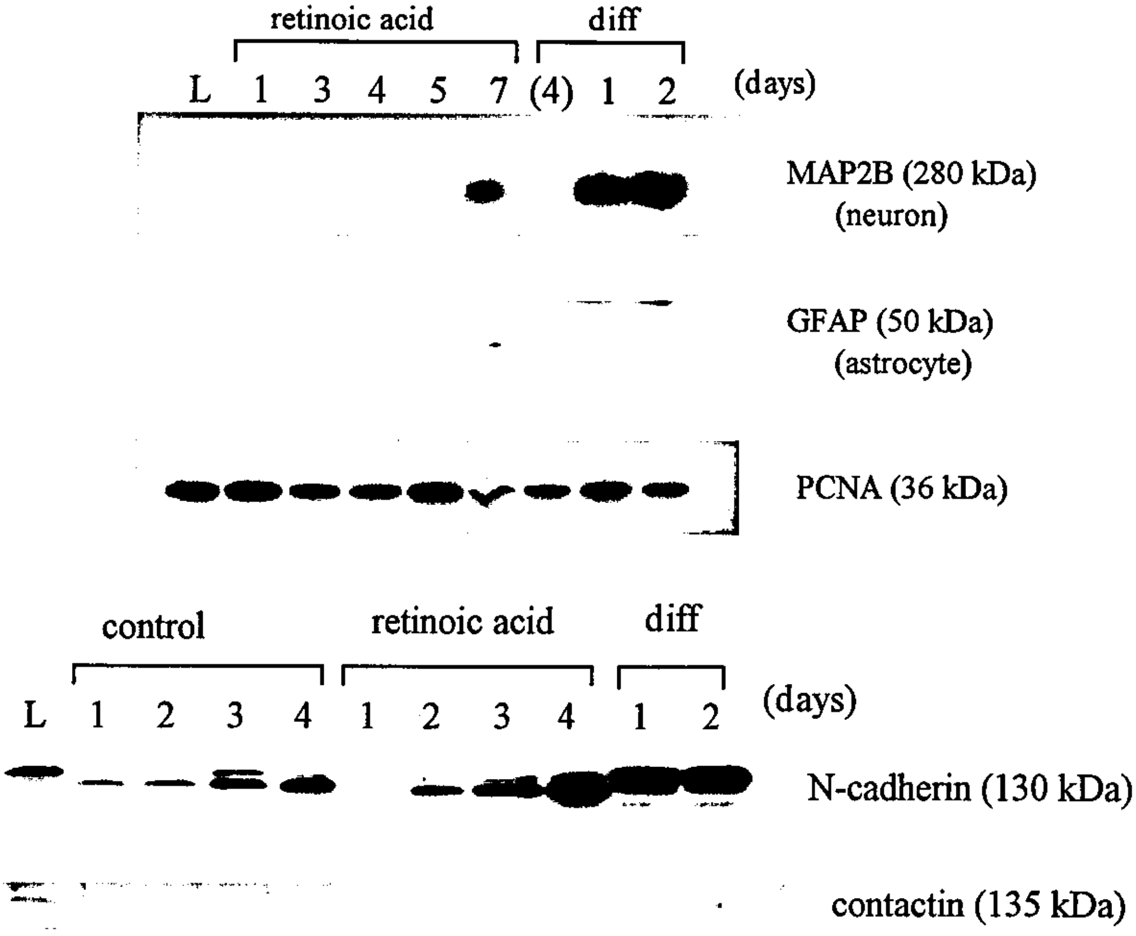



図82 P19細胞の分化誘導時のDNA複製関連因子の挙動

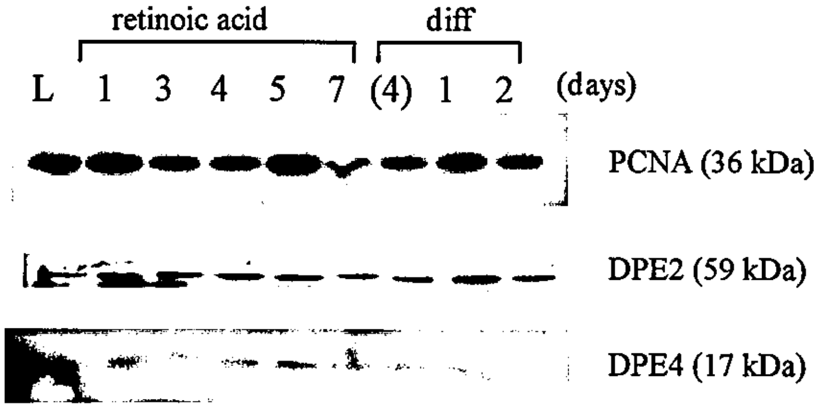


図83 P19細胞の分化誘導時の増殖関連因子の挙動

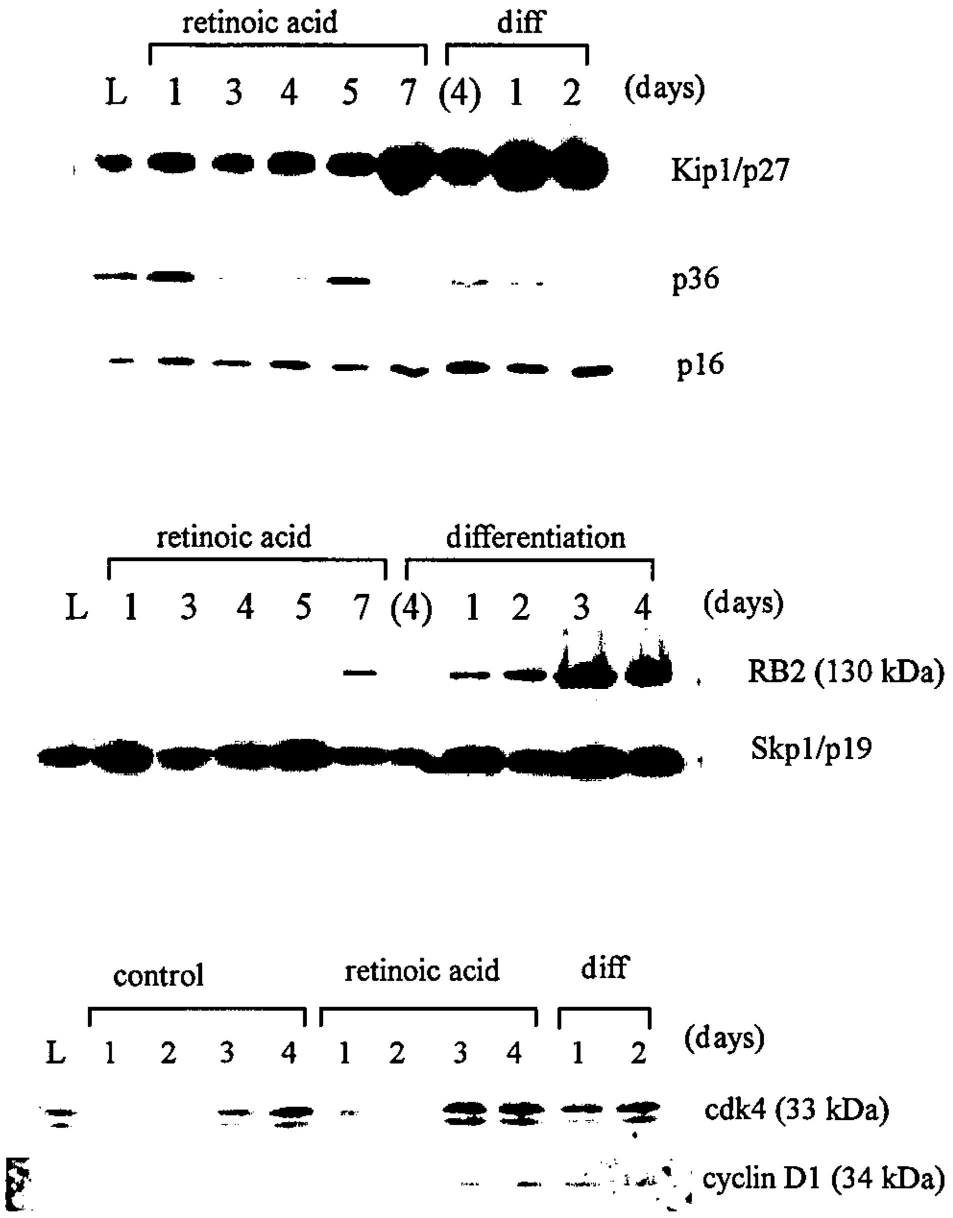
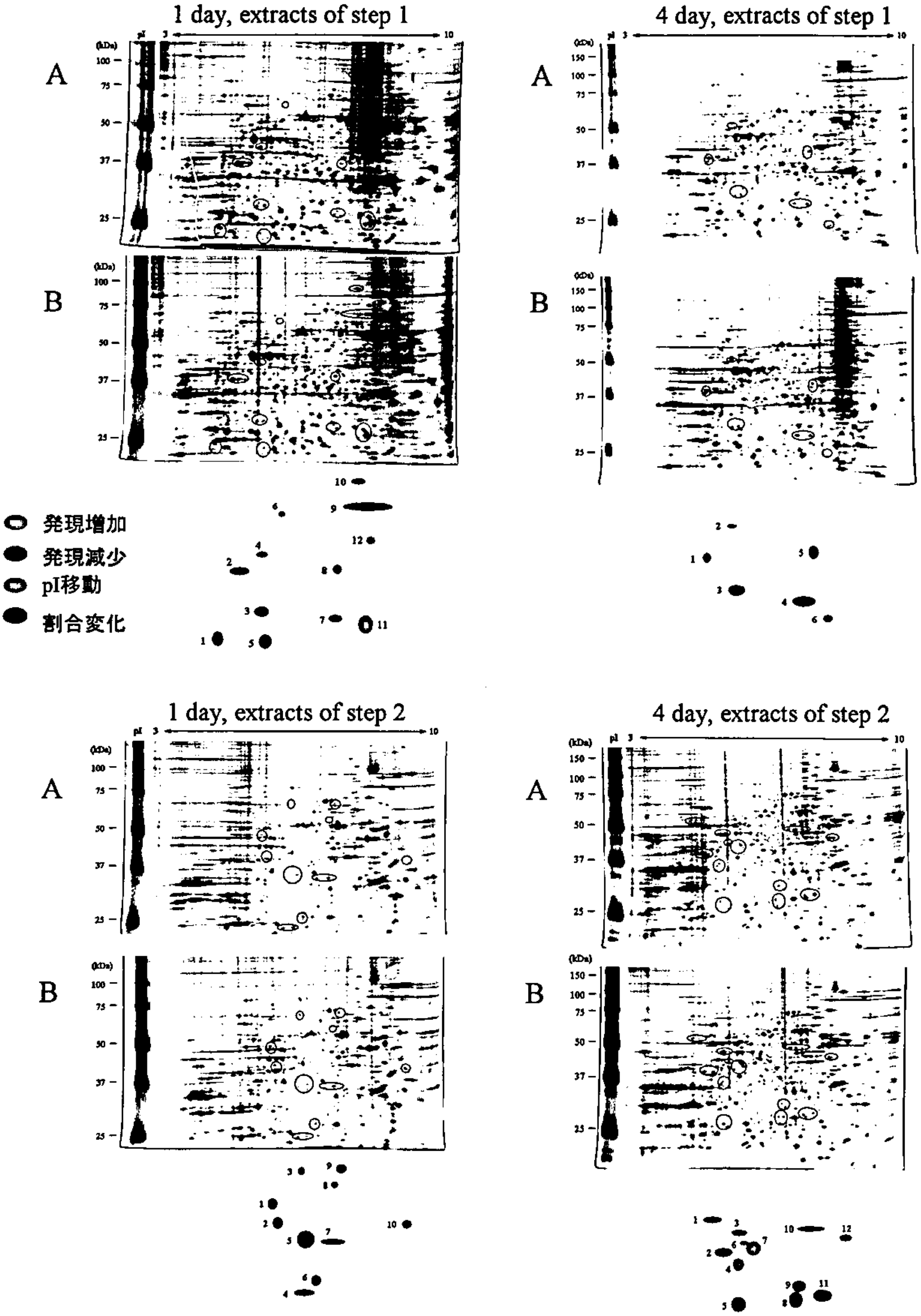


図84 P19細胞の神経細胞分化誘導時のプロテインプロファイル
(A --- control, B --- + retinoic acid)



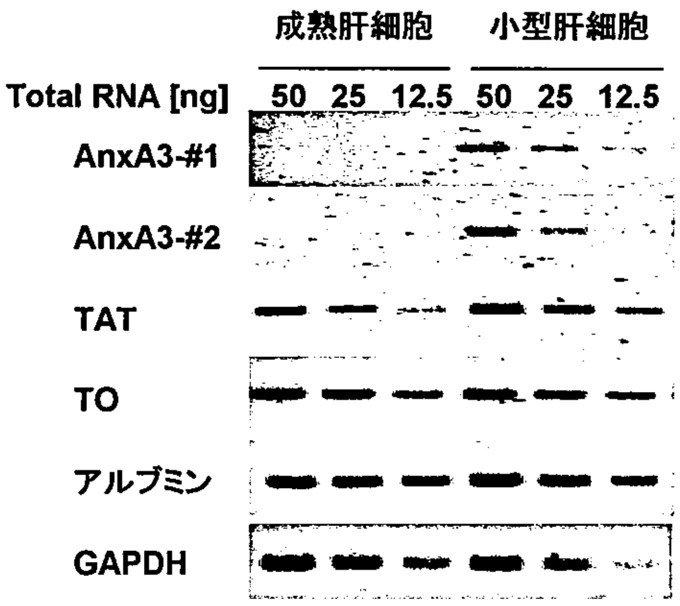
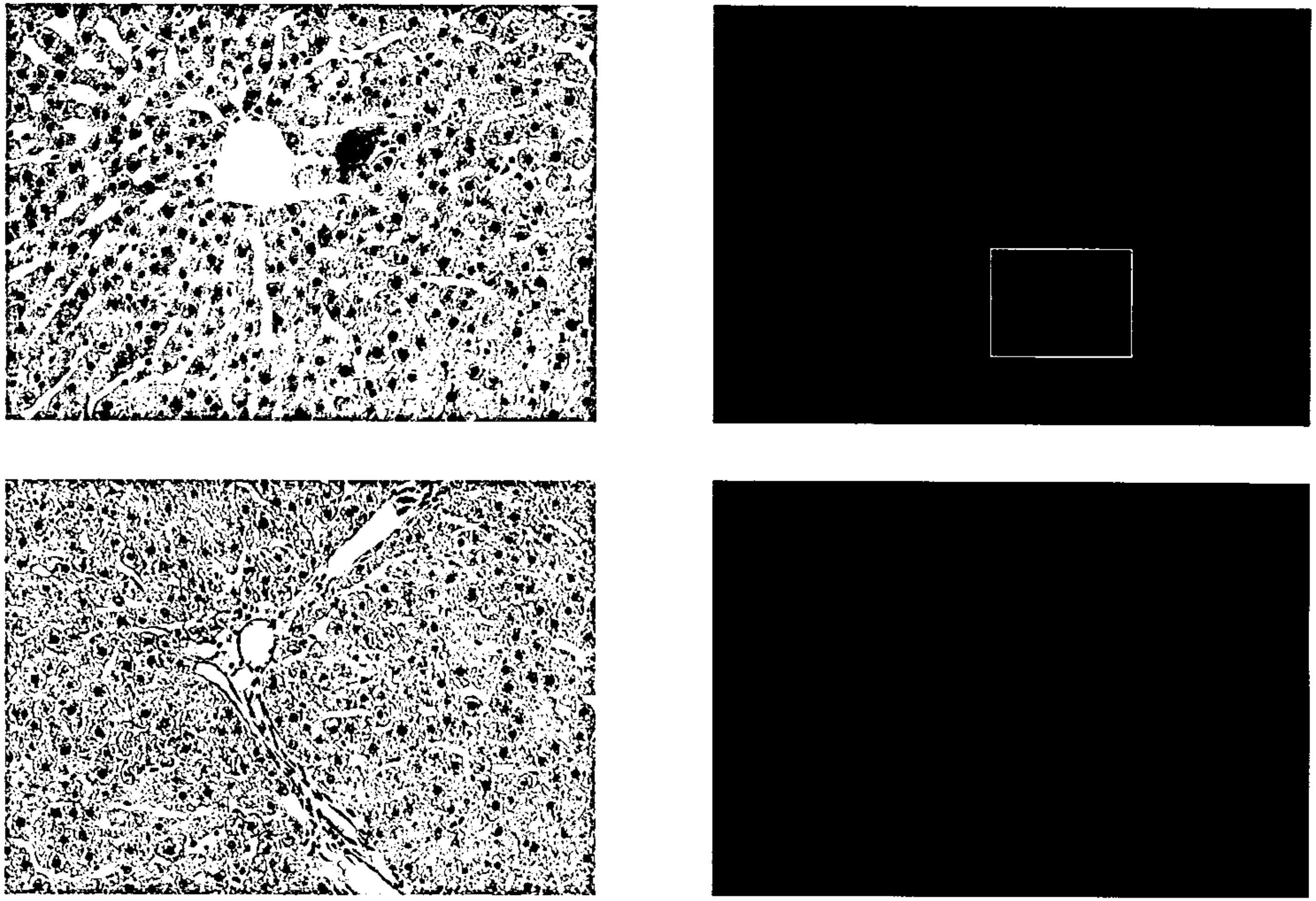



図85. 分離直後のラット小型肝細胞および成熟肝細胞における
AnxA3、TAT、TOのRT-PCR解析



中心静脈域

門脈域

図86. vehicleを投与したラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図：H&E染色、右図：免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×200）

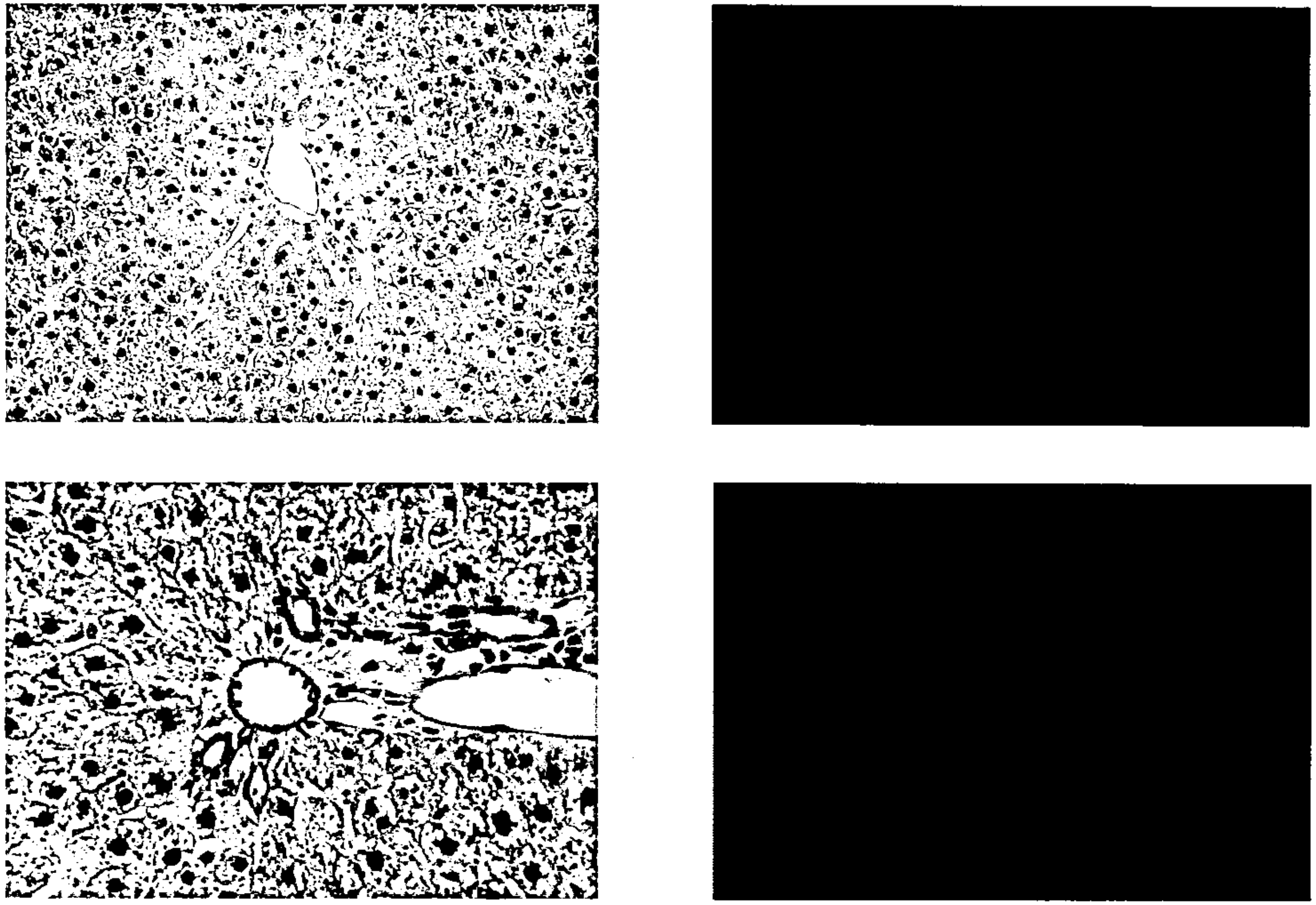



図87. 2-AAFを投与したラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図：H&E染色、右図：免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×200）

## 中心静脈域

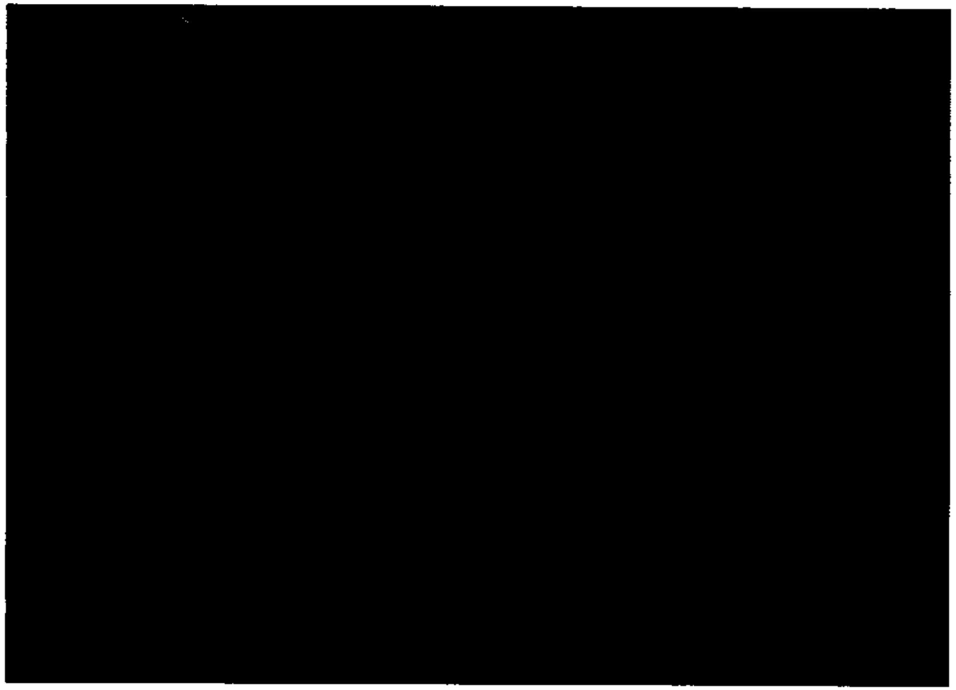


図88. vehicleを投与したラット肝臓における
免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×1,000）

中心静脈域

門脈域

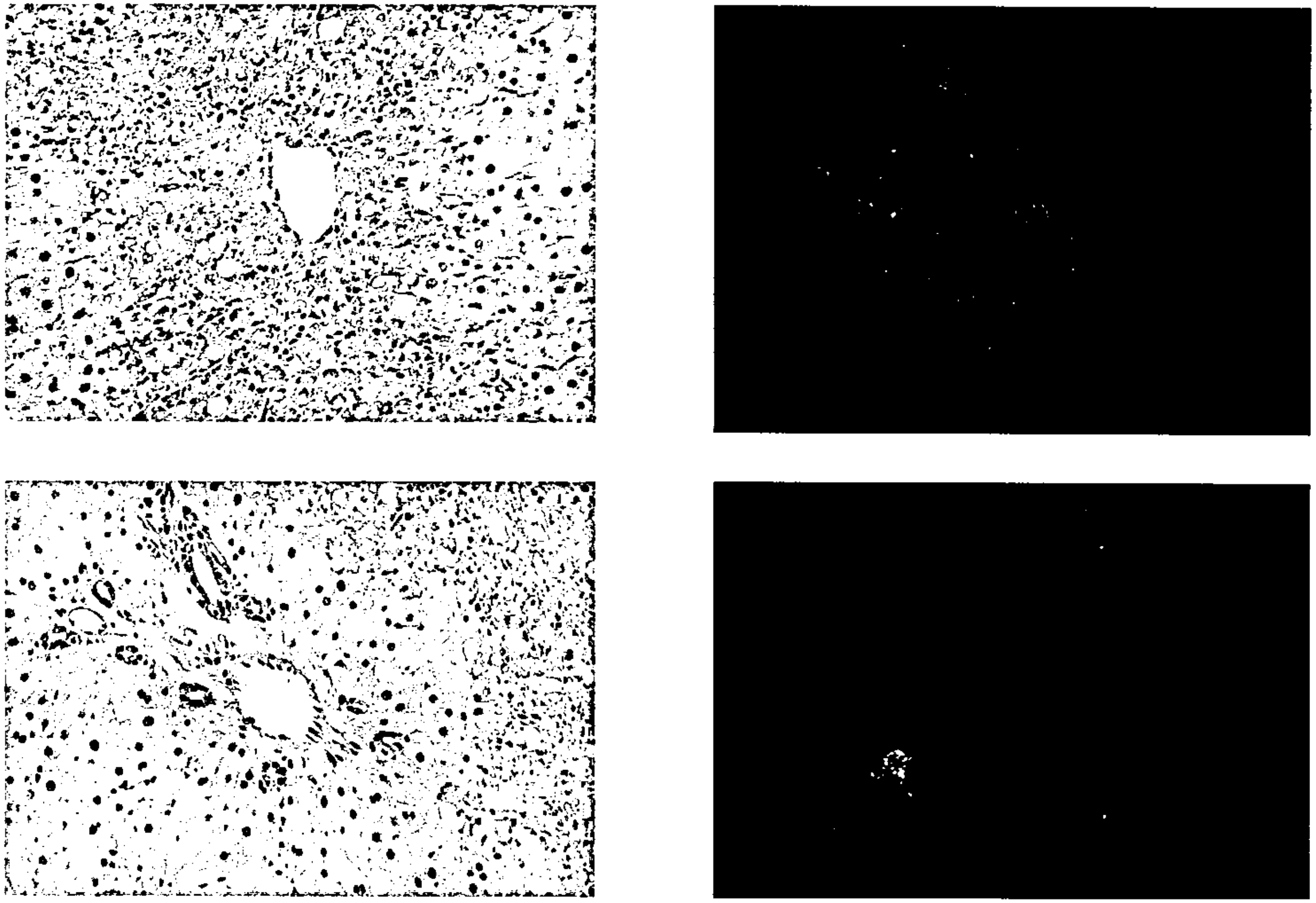


図89. 2-AAF/$CCl_4$投与2日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図：H&E染色、右図：免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×200）

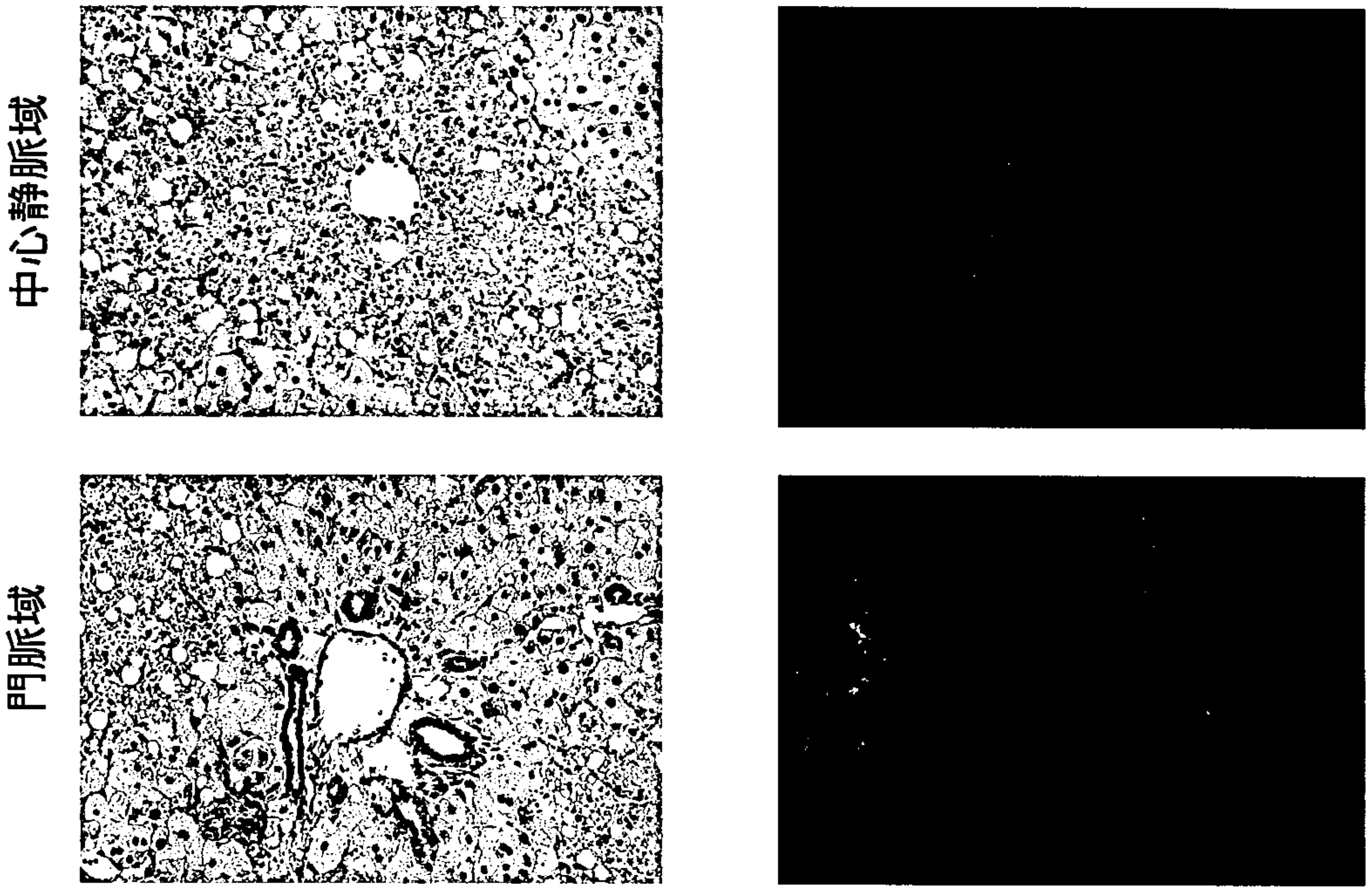



図90. 2-AAF/$CCl_4$投与3日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3及びアルブミンの局在
左図：H&E染色、右図：免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×200）

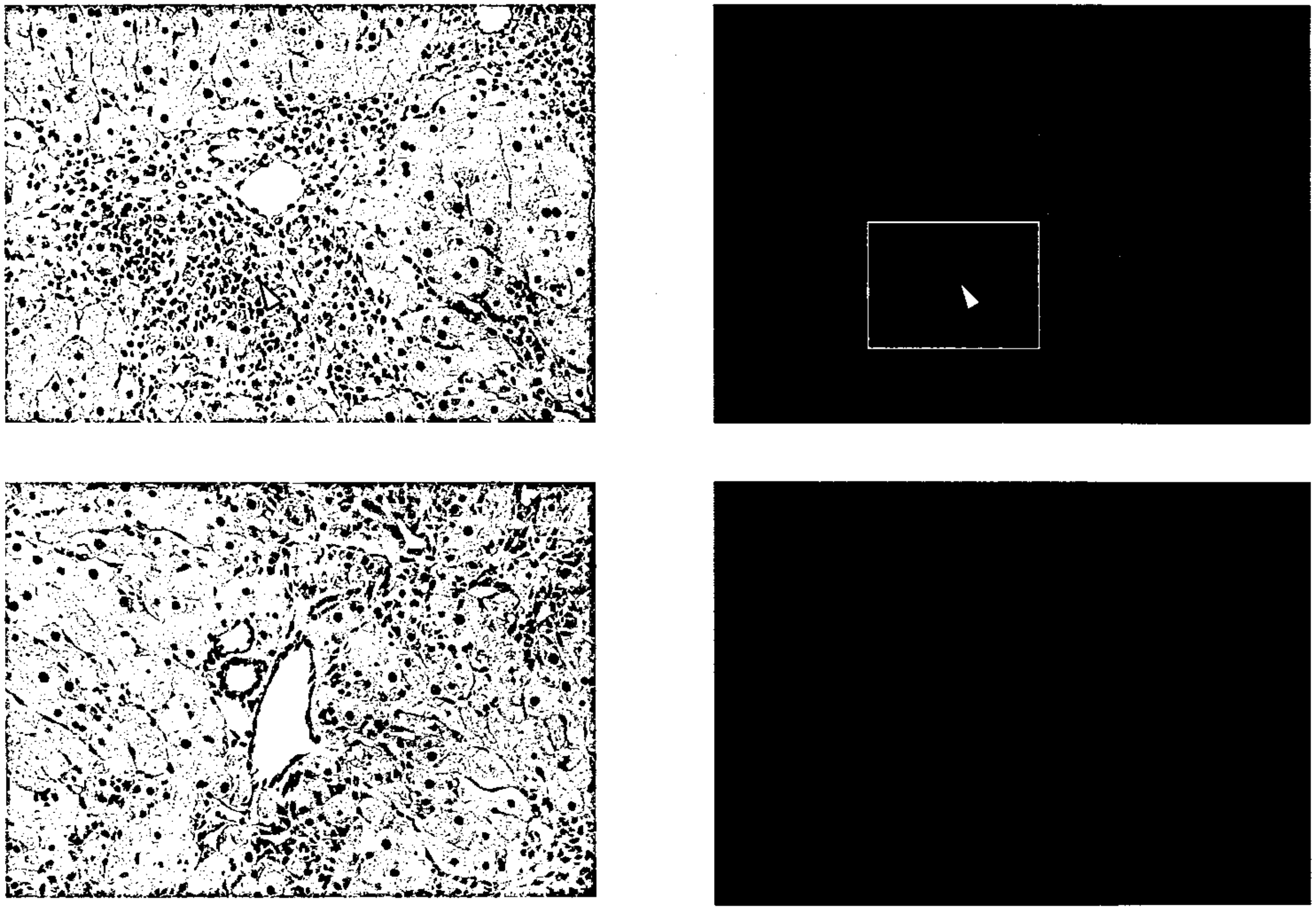



図91. 2-AAF/$CCl_4$投与4日目のラット肝臓における
H&E染色と免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
左図：H&E染色、右図：免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×200）

中心静脈域

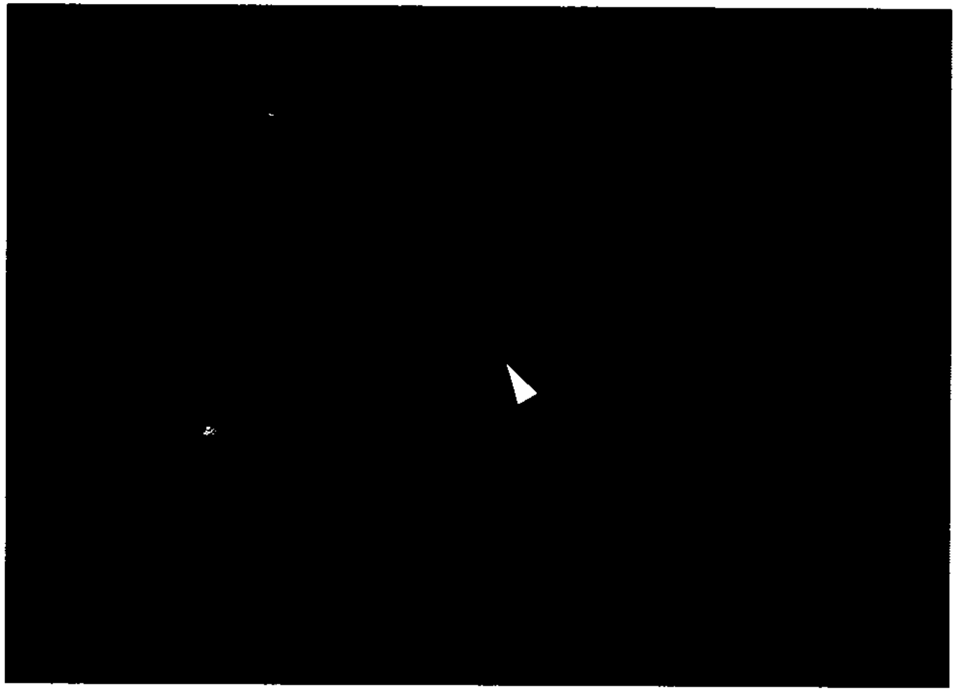


図92．2-AAF/$CCl_4$投与4日目のラット肝臓における
免疫蛍光によるAnxA3およびアルブミンの局在
免疫蛍光 AnxA3（緑）、アルブミン（赤）（倍率×1,000）

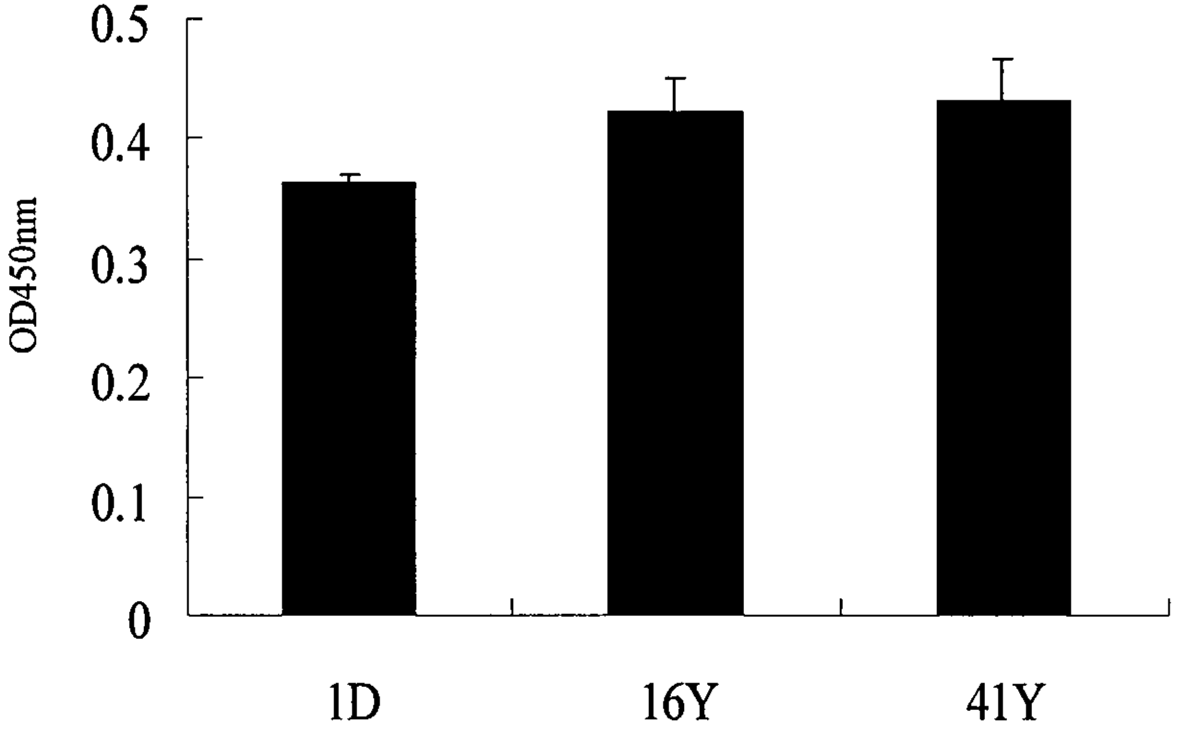



図93．年齢の異なるヒト骨芽細胞の増殖性

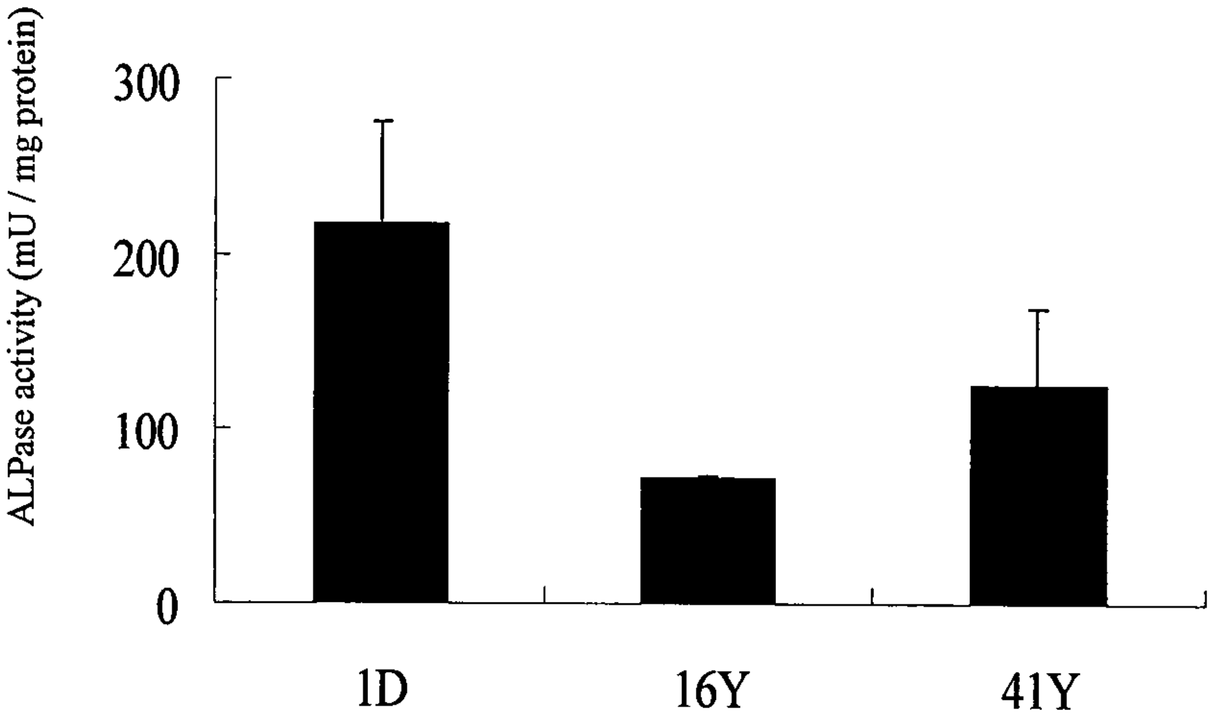



図 94. 年齢の異なるヒト骨芽細胞のALPase活性の違い

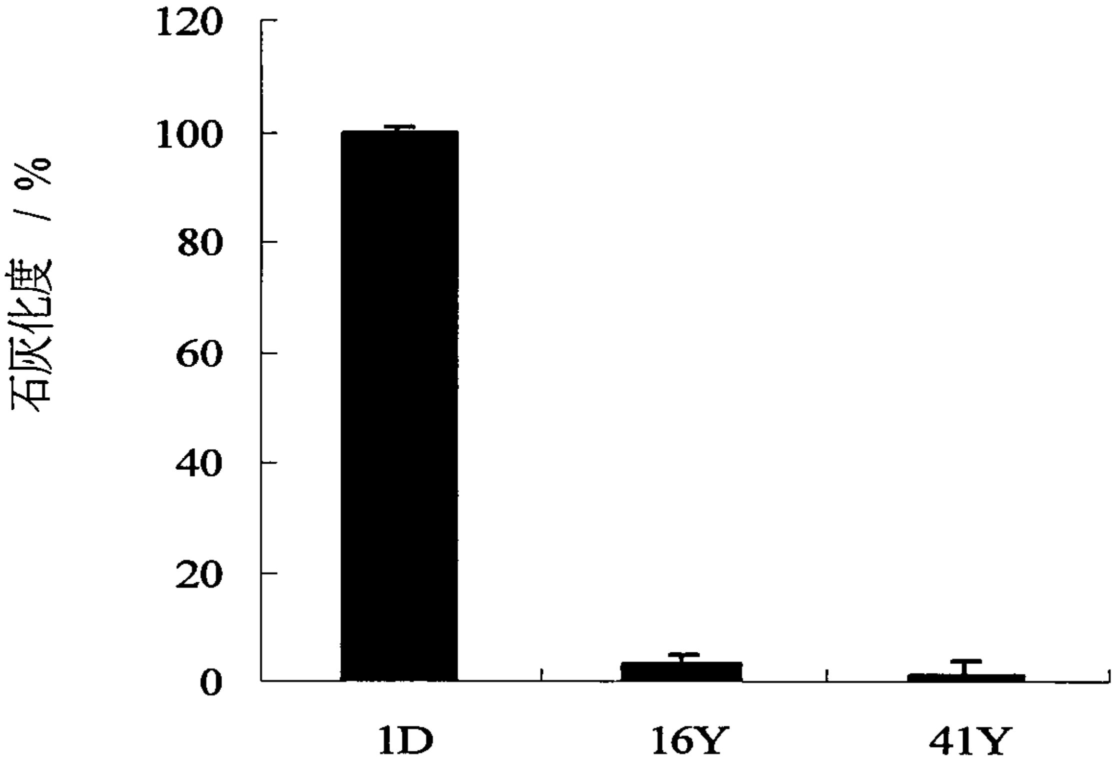
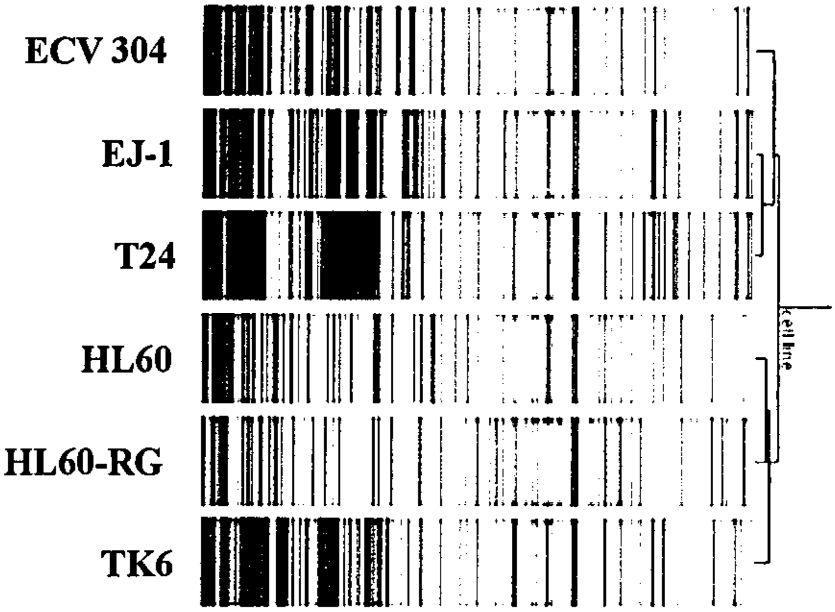



図95. 年齢の異なるヒト骨芽細胞の石灰化度の違い

図９６　遺伝子発現データのクラスタリング解析



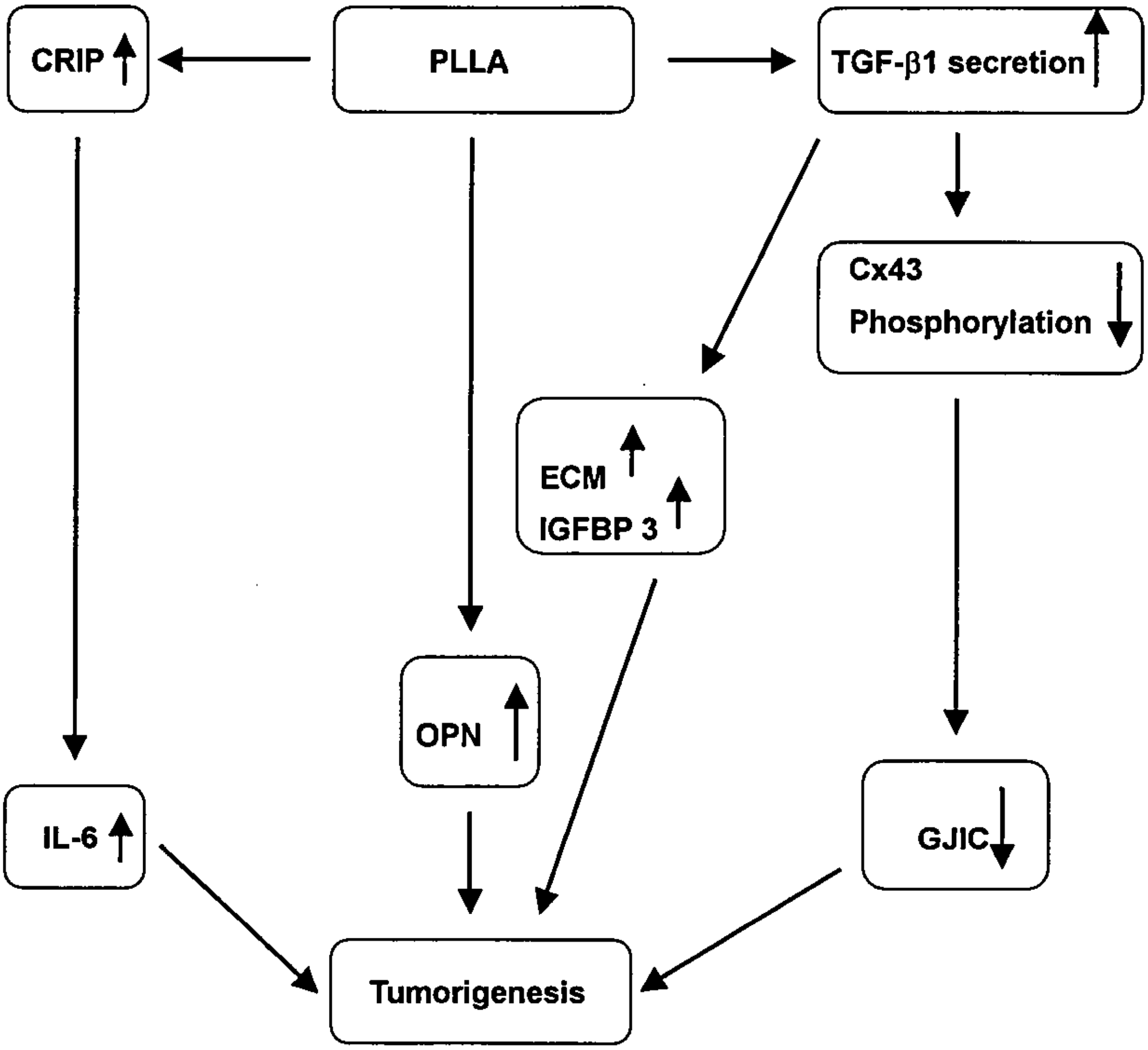



図97. PLLA の発癌メカニズムの仮説

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. 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 $10^{1\sim4}$ 個接種では６日目から増殖率が急速に低下した。ＨＩＶ-１p 24 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 $10^{1\sim5}$ 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-１Ｐ２４抗原検出の千倍であった。さらにＨＩＶ-１Ｐ２４抗原検出では検出できない $10^1$ 個未満（1 個ー数個）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-$\beta_1$）分泌は有意に上昇した。一方、SJL/J マウスでは TGF-$\beta_1$ 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修飾ポリウレタン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）を修飾ポリウレタン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、リンパ球中 CD4 陽性と CD8 陽性の細胞数を測定した。その結果、BML の生存率は修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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) と硫酸第一鉄 ($FeSO_4$) 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。

6. 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、幹細胞の癌化の可能性を評価できる一つの指標となりうるかもしれない。

7. 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、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繁に利用されているポリ-L-乳酸（PLLA）のプレートを埋植し、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-$\beta_1$）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において腫瘍性変化を観察したもののその発生率は低かった。

8. 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・品質を評価するためには、治療対象患者の年齢を考慮した動物モデルを用いて、治癒・組織再生過程の解析・評価を行う必要がある。