

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—埋植1ヶ月短期予測

生体適合材料は常に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に関与している。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。ポリウ

レタン (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 といった生体適合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。全て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外シグナルへの応答のための細胞能力に対する恒常的な制御が崩壊した結果見られる。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、主にこれらの生体適合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や代謝性の合併症の発症率の上昇は、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悪性の白血球を含む。初代の T 細胞中のこれらの抗原が発現している細胞の自動免疫が関与する作用によって、移植前にそれらを除去するように働いている。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生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、ポリウレタン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¹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多くの組織中に見られ、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FeSO₄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と言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。

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

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。

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—ヌードマウス移植

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。

8. 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. 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: 3×3×2mm

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 10^0-5 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、 10^0-5 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—埋植1ヶ月短期予測

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) は使用前にエチレンオキサイドガスで滅菌した。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 回洗浄したものの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 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 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℃, 5 分間に続いて、94℃, 1 分間; 60℃, 1 分間; 72℃, 1 分間を 25 サイクルの後、72℃, 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髓リンパ球 (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。 2×10^6 cells/0.5 mL medium の BML をポリウレタン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 0.867×10^6 の BN リンパ球を含む 2mL の培地で浸し、37°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、ポリウレタン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とり、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 μ L 中に 4×10^5 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 μ g/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、alamar blue を用いて測定した。培養液を取り除いた後 alamar 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 溶液を 0.5mL/well 入れ、インキュベーションした。その後、alcian blue 溶液を取り除き、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 μ g/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 μ g/mL, Sigma)、アポトランスフェリン (10 μ g/mL)、HDL (10 μ g/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 μ g/mL)、ペニシリン (200 U/mL)、ストレプトマイシン (200 μ g/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 μ L 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°C、30 秒; 55°C、30 秒; 72°C、1 分を 27 サイクル)、マウス *c-myc* (94°C、30 秒; 58°C、30 秒; 72°C、1 分を 27 サイクル)、*mGFAP* 及び *mGAPDH* (94°C、30 秒; 55°C、30 秒; 72°C、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。Table 5-1 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、テロメラーゼの鑄型配列を持つ 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、DNA Extractor WB Kit を用いて、SFME 細胞より抽出した。このマウスゲノム DNA を鑄型として、*mTERT* (mouse TERT) プロモーター領域 (-1560bp~-27bp) を LAPCR 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°C、1 分間の後、98°C、20 秒; 65°C、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'-ACTACTCGAGCCCCTCCCTCCTCTT
CTTTG-3'

mTERT-R :
5'-ACTACTCGAGCACGTGCGGGAACC
AAGATG-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-*mTERTp* 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-*mTERTp* (300ng/well) 及び pRL-TK (150ng/well) を最終容量が 21 μL になるように DME/F12 培地で希釈した後、PLUS-Reagent を加えた。この DNA・PLUS-Reagent 混合溶液を室温で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 μL の DME/F12 培地を各ウェルへ加えた。LipifectAMINE PLUS Reagent を DME/F12 培地で希釈し、DNA・PLUS-Reagent 混合溶液に加えた。この DNA・PLUS・LipifectAMINE Reagent (50 μL) を室温でインキュベートした。その後、DNA・PLUS・LipifectAMINE Reagent を培地が入ったウェルへ添加し、37℃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、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 μg/mL の TGF-βストック溶液を各ウェルへ 10 μL 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。

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

6-1. 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、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。

6-2. 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。

6-3. 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。

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—ヌードマウス移植

7-1. 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ヌ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。

7-2. 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)は使用前にエチレンオキサイドガスで滅菌した。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。

7-3. 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。

7-4. 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。

7-5. 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。

7-6. Western blot 解析

直径60mmのdishにconfluentの状態の細胞を直接100μL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 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。

7-7. 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'-ACAGTCTGCCTTTCGCTCTAAC-3'

Reverse:

5'-GTAAGGATCGCTTCTTCCCTTC-3'

PCR の条件は、94°C, 5 分間に続いて、94°C, 1 分間; 60°C, 1 分間; 72°C, 1 分間を 25 サイクルの後、72°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。

7-8. 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。

7-9. ノードマウスを用いた腫瘍形成の確認
それぞれの細胞 ($2 \times 10^6 / 0.2\text{mL}$ 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。

7-10. 軟寒天培養法

およそ 10^5 の細胞を 2mL の 0.3%軟寒天培養液で培養した。4 週間培養後、*prodotetrazolium violet* 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。

8. ヒト骨芽細胞の骨分化における年齢の違いについて

8-1. 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 (α MEM containing 10mM β -glycerophosphate (SIGMA) and 20% FBS) 1ml を静かに添加し、14 日間培養した。

8-2. 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 1ml と交換して、2 時間、37°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。

8-3. 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 3 回洗浄し、0.2% nonidet P-40 (NP-40, Nacalaitesque) を含む 0.25 ml PBS を各 well に添加し、37°C で 10 分間インキュベートした。懸濁液を超音波破砕機を用いてホモジナイズした後、1000rpm、4°C、5 分間遠心を行った。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°C で保存した。

8-4. 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、2 mM $MgCl_2$ を含有する 0.1 M carbonate buffer (pH 10.2) 0.5 ml 及び 20mM p-nitrophenylphosphate 0.5 ml を加えて、37°C で 30 分間反応させ、0.25 N 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。

8-5. Calcium content

細胞内の石灰化度は、Calcium C-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて測定した。細胞を PBS で洗浄後、HCl 水溶液を各 well に添加し、静置して、塩酸抽出液を得た。塩酸抽出液に monoethanolamine buffer 1ml を加え、つぎに o-cresolphthalein complexon と 8-hydroxyquinoline を含む発色試薬を加えた。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. 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 2 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 日目まで増加した。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 3 に示した。

HIV-1 p24 抗原は 10⁵ 個の OM10.1 接種では 1 日目から、10⁴ 個接種では 3 日目から、10³ 個接種では 10 日目に検出できた。10¹ 個及び 10² 個接種では HIV-1 p24 抗原は検出できなかった。p24 抗原量は 10⁴ 個及び 10⁵ 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、10³、10⁴ 及び 10⁵

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3の下に泳動の写真でも示した。3日目に全例 ($10^1 \sim 5$ 個の OM10.1 接種) で HIV が検出された。HIV-1P 24 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4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—埋植1ヶ月短期予測

2-1. GJIC に対する PLLA 埋植の影響

これまでに行った、PLLA プレートをも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(図4)。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と関連しているため、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、修飾ポリウレタンコートしていないバッグ中の骨髄リンパ球 (BML) 細胞は、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタンコートしたバッグを入れてあった培養液中のリ

ンパ球細胞と修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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 Fig.3-3 に示した。CD4 (図 11(a)) 及び CD8 (図 11(b)) とともに、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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、修飾ポリウレタン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で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。

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

6-1. DNA チップを用いた遺伝子発現の網羅的解析

6-1-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 5 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

6-1-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表 6 に示した。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

6-2. 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 21)

6-2-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 22) 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 23)

6-2-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 24) 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 25)

6-2-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 26)。

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—ヌードマウス移植

7-1. 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ではほんの少しク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が大量に見られ、また、接触障害が減少した結果広範囲で pile up していた (図 27-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 27-C, D)。

7-2. 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 28)。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 28)。

7-3. 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 29, 30)。

7-4. 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 プレートを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 プレートを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 31)。

7-5. 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 α 1 サブユニット、オステオポンチン (OPN) 前駆体) (図 32-A, B, C) と、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) 3 (図 32-D)

と、cystein-rich intestinal protein (CRIP) (図 32・E) は、PLLA プレートを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。

7-6. 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 33・A)。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 33・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 33・D, G)。

7-7. 軟寒天培養法による発癌の評価

全ての群において、軟寒天中に癌細胞のコロニー形成は認められなかった。(data not shown)

7-8. 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 34・A) と Herring-bone-pattern (図 34・B, C) を持つ腫瘍細胞であることが分かった。

8. 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 35)。図 36 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 37)。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. 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 した場合とヒト皮膚モデルに 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た (表 2)。

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 抗原量も少なくなかった。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 3)。

表 2,3 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 4 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—埋植 1 ヶ月短期予測

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係すると思われる。そのため、PLLA による GJIC の阻害効果は Cx43 タンパク質の変化