

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成17(2005)年4月

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成17(2005)年4月

目 次

I	総括研究報告書	1
	骨髓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	3
II	分担研究報告書	9
	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	11
	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	14
	3, 治療実験を含む臨床応用への検討	
	戸口田 淳也	17
	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	21
	5, 遺伝子導入効率に関する基礎的研究	
	渡辺 研	23
	6, 足場の製剤化に関する研究	
	久保田 直樹	25
III	研究成果に関する一欄表	29
IV	研究成果の刊行物・別冊	37

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

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
(H14-トランス-003)

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 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。細胞を目的とする部位へ接着・集積させるため、足場（担体：Scaffold）が用いられるが、特に細胞移植においては再生組織の整形性、形状の維持が必須となるため、その重要性は高い。本研究では、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し、再生医療における有用性を明らかにした。われわれは、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することに成功し、特にここでは、骨髄間質細胞由来幹細胞を用い、新規複合化シートの形状制御を要する再生医療を具体的に推進することに成功した。

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

大串 始 独立行政法人産業技術総合研究所、セルエンジニアリング研究部門・研究グループ長

戸口田淳也 京都大学再生医科学研究所・教授

牛田多加志 東京大学大学院医学系研究科・教授

渡辺 研 国立療養所中部病院長寿医療研究センター・運動・感覚機能研究室長

久保田直樹 中外製薬株式会社・製品育成研究部・グループマネージャー

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が存在する。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、形状の維持が困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究が進んできたが、疎水性であるが故に細胞接着性に乏しいという欠点が存在する。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し、再生医療における有用性を報告してきた。我々は均一な細胞分布、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することに成功し、特に本研究では、骨髄間質細胞由来幹細胞を用い、新規複合化シートの形状制御を要する再生医療を具体的に推進する。

A. 研究目的

細胞を目的とする部位へ接着・集積させるため、足場（担体：Scaffold）が用いられるが、特に細胞移植においては再生組織の整形性、形状の維持が必須となるため、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が使われてが、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が選択肢のひ

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、サブクローニングを行う。サブ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、方法等を確立する。

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立する。

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 (梅澤、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、国立成育医療センター病院および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) の作製と安全性の確保

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、グルタルアルデヒドにて架橋し、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) 成体幹細胞の特性を決定

成体幹細胞に関する網羅的な遺伝子発現に関し、米国 NIH/NIA のグループとの共同研究を行い、国際誌に発表し (PLoS Biology, 1: 410-419, 2003)、その成果は Nature 誌の News に取り上げられた。また、その情報は Web 上に公開 (http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA_7_4k.html) しており、すべての医療関係者に共有可能となっている。

また、基盤研究としてヒト細胞を移植可能な免疫不全動物 (NOD/scid IL-2 受容体 γ knockout mouse) に径 4.3mm 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。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。

3) ヒト細胞の安全性ならびに治療プロトコル改善に関する組織内 Ad hoc 委員会 (委員長・秦研究所長) 設立と討議

本研究で得られた成果を基に、国立成育医療センター遺伝診療科・奥山虎之氏 (医長) を中心とした臨床チームにより、グリコサミノグリカン (デルマタン硫酸・ヘパラン硫酸・ケラタン硫酸・コンドロイチン硫酸・ヒアルロン酸など) の分解を触媒する酵素の欠損により引き起こされるライソゾーム

蓄積病の一つであるムコ多糖症 (mucopolysaccharidosis) を対象疾患とした臨床プロトコルを作製し、診断基準、治療適正条件、移植前評価項目、除外条件を明確にした。本研究の細胞の範囲には入らないけれども、骨髄由来幹細胞を用いた治療は既に開始した。

4) 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床研究

究に対する、倫理委員会 (IRB) の承認

骨髄由来間葉系幹細胞の有効性、安全性を検証する臨床研究に関する承認を平成 16 年 9 月に倫理委員会 (国立病院機構・東京医療センター) から得られ、ヒト間葉系幹細胞移植後の評価と移植細胞の培養および保存、ならびに実際に臨床応用開始が決定している。具体的には、細胞移植を行い、治療評価を 3 ヶ月後に行う。さらに、移植細胞を特徴付けられるよう細胞の保存を行う。

5) Cell processing center 設立と各種手順書・基準書作製

国立成育医療センター研究所が保有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養技術ならびに製造管理及び品質管理規則 (Good Manufacturing Practice, GMP 基準) を満たすセル・プロセッシング・センターを基盤として、動物由来成分を排除しヒト由来成分のみで構成される幹細胞培養法を確立した。平成 15 年度に「セル・プロセッシング・センター (CPC)」設立が承認され、厚生労働省直轄研究機関としては初の CPC として整備された。国立成育医療センターでは、上記 CPC を使用したヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養ならびに臨床研究への供給を課題として、研究部横断的な推進体制を構築した。

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が期待され

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が証明されている骨髄間質細胞が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) が用いられるが、特に硬組織においては再生組織の形成、形状の維持が必須となるため、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が使われてが、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が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が存在する。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、形状の維持が困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究が進んできたが、疎水性であるが故に細胞接着性に乏しいという欠点が存在する。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が明らかとなった。従来の合成高分子で作製したスポンジ形状体は、立方体内部への細胞播種が困難なため均一な組織を得にくいという欠点があった。形状をシート状にしたことで細胞の分布を均一化することが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が可能となるため手術中での操作が容易である。荷重に耐えう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。ヒト由来細胞を用いた研究に関しては、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された。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)。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウイルス等の汚染の危険性排除については、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討した。また、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針(未定

稿)」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮している。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

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どめ、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

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press 2005

Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T.: Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, 16 : 1491-1499 2005.

Correspondence to AU.

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A.: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004

Umezawa, A.: Mesenchymal stem cells and epigenetics, *Brain & Development*, 26: 417-418, 2004

Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Eto, Y.: Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Therapy*, 11(19):1475-1481, 2004

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and

Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press.

Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and 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*, 6(8): 833-845, 2004.

Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.: Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes, *Biomacromolecules*, 5(5): 1770-1774, 2004.

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. *Biol Reprod*, 70: 415-418, 2004

梅澤明弘：精子形成にかかわるエピジェネティクス、特集「精子」、*Hormone Frontier in Gynecology*, 11 (3): 24-28, 2004

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：*化学工学*, 2004

梅澤明弘：間葉系幹細胞を用いた細胞治療、7章再生治療モデル、「ヒト疾患モデル—難病の病態解明と診断・治療への応用」、秦順一編集、文光堂、2004年4月21日

梅澤明弘：遺伝子変異、病理と臨床「病理診断における分子生物学」、22:47-53, 2004

梅澤明弘：細胞分離・幹細胞工学、「図解 再生医療工学」第3章 再生医療のキーテクノロジー 技術編5、(株)工業調査会、2004

梅澤明弘：書評「絵でわかる 血液のはたらき」(八幡義人著)、*医学のあゆみ*, 209 (2): 115, 2004

梅澤明弘：再生医療とエピジェネティクス(6章)、「エピジェネティクス」、佐々木裕之編、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社、2004

梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療、*昭和医学会誌*, 64(1): , 2004

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

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13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礎的研究
渡辺 研
6. 足場の製剤化に関する研究
久保田 直樹

「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。今年度は臍帯血由来間葉系細胞の不死化とその性状の解析を試みた。また、ヒト細胞の不死化には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との仮説を基にbmi-1+TERTあるいはp16 shRNA+TERTの組み合わせでヒト乳腺上皮細胞の不死化と不死化機構の解析を試みた。初代ヒト培養細胞で安定にRNAi効果を発揮させるため改良型レトロウイルスshRNA発現ベクターを開発した。このうち最もRNAi効果の高いベクターを用い、乳腺上皮細胞にp16特異的shRNAを導入することでp16増加による細胞老化(MO)をバイパスすることに成功した。Bmi-1の導入と同様、レトロウイルス感染直後からp16の発現低下が観察された。この細胞はTERTを追加導入することにより高率に不死化した。このように、今年度は臍帯血が間葉系幹細胞の新たな供給源として有望であることを示すと共に、がん遺伝子を用いずにヒト細胞を不死化するための基盤技術を確立した。

A. 研究目的

骨髄や臍帯血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

TERTに加えHPVのE6やE7あるいはbmi-1などの遺伝子導入によってヒト臍帯血由来間葉系細胞を延命、不死化し、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、不死化した細胞が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が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RNA干渉法により行いモデル細胞の不死化とその有効性を確かめる。

（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の承認(承認番号13-11)を得ている。ヒト細胞全般の不死化研究については国立がんセンター倫理審査委員会の承認(承認番号14-69)を得ている。

C. 研究結果

不死化した臍帯血由来間葉系細胞2株につき解析した結果、1株はp16プロモーターのメチル化がないにもかかわらずp16の発現が継代によっても増加せず、TERTの導入のみで不死化された例外的な細胞株であることが分かった。他の1株は、他の細胞種と同様継代と共にp16の発現が増加し老化し、TERTの導入に加え、E6E7の導入が必要であった。これらの細胞は梅澤らにより間葉系幹細胞としての多分化能を有していることが確認されている。

次に、が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、改良型shRNA発現レトロウイルスベクターを開発しモデル細胞である乳腺上皮細胞の不死化に応用した。Bmi-1導入時と同様、レトロウイルス感染直後からp16の発現低下が観察された。この細胞はTERTを

追加導入することにより高率に不死化した。また、これらの不死化細胞のp16プロモーターはメチル化されておらず、5AzaCやTSA処理によってもp16の増加は見られなかったことから、不死化細胞においてもp16 shRNAが持続して効果を発揮していることが確認された。今後、骨髄由来ヒト間葉系幹細胞へ応用し、同細胞をがん遺伝子の導入なしで不死化する計画である。

D. 考察

昨年度までにHPVのE6やE7あるいはbmi-1といったがん遺伝子ならびにTERTの導入によって不死化したヒト骨髄間葉系幹細胞の多分化能と不死化機構を明らかにしてきた。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モデル細胞である乳腺上皮細胞の不死化に成功し、その有効性を確認出来た。間葉系幹細胞などTERT導入のみで不死化出来ない多くのヒト細胞を不死化するのに有効な手段である。一方、臍帯血由来間葉系細胞からTERTの導入のみで不死化した細胞株を得ることができた。この細胞のp16プロモーターはメチル化しておらずp16発現増加機構を解明する上で有用な材料となる。p16発現増加機構が解明されればRNA干渉法によるp16の発現抑制すら不用となる可能性がある。すなわち、遺伝子導入によらないp16の発現増加の回避が可能となる。遺伝子導入によらないテロメラーゼの活性化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ことが実現可能であることを強く示唆することができた。これが実現すれば、不死化細胞の臨床応用に向け大きなステップとなることは間違いない。

E. 結論

ヒト臍帯血由来間葉系細胞をテロメラーゼ活性の誘導のみで不死化した1株を得ることができた。しかし、他の1株ではRb/p16経路の活性化阻害が必要であった。また、RNA干渉法を利用したがん遺伝子導入によらない細胞の不死化にも成功し、その有効性が証明された。将来、遺伝子導入によら

ない細胞不死化技術の開発は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安全委員会の承認のもと、適切な計画が基準に従った施設において行われている。

G. 研究発表

英雑誌等

1. Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., **Kivono, T.**, Nishiyama, Y., and Tsurumi T. Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J. Virol.*, 78:104-115, 2004.
2. Takeda, Y., Mori, T. Imabayashi, H., **Kivono, T.**, Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and 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.*, 6:833-45, 2004.
3. Sawada, M., **Kivono, T.**, Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., and Sakai, N. Molecular mechanisms of TNF- α -Induced ceramide formation in human glioma cells. *Cell Death Differ.*, 11:997-1008, 2004.
4. Hara, S., Nakashima, S., **Kivono, T.**, Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 11: 853-61, 2004.
5. Oikawa, K., Ohbayashi, T., **Kivono, T.**, Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K. Expression of a novel human gene, *hWAPL*, is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.*, 64:3545-9, 2004.
6. Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, **Kivono T.**, Nishitani H, Fujita M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem*, 279:19691-7,

- 2004.
7. Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., **Kiyono, T.**, and Imamura, M. Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells. *Life Sci* 75: 21-34, 2004.
 8. Hara S, Nakashima S, Kiyono T, Sawada M, Yoshimura S, Iwama T, Sakai N. Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53. *Oncol Rep.*, 12:119-23, 2004.
 9. Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway D.A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.*, 18:2269-2282, 2004.
 10. Kuroda, M., Kiyono, T., Oikawa, K., Yoshida, K., and Mukai, K. The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, *hWAPL*, exhibits potential as a therapeutic target. *Br. J. Cancer Res.*, in press.
 11. Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T. Immortalization of Cementoblast Progenitor Cells With Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res.* 20:50-7, 2005.
 12. Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T. Immortalization of Human Fetal Cells: The Life Span of Umbilical-Cord-Blood-derived Cells Can Be Prolonged without Manipulating p16INK4a/RB Braking Pathway. *Mol Biol Cell.*, in press.

和雑誌等

1. 清野 透 上皮系細胞の増殖制御と不死化: 細胞, 36, 437-440, 2004.
2. 清野 透 遺伝子導入によるヒト細胞寿命の延長: 医学のあゆみ, 209, 931-936, 2004.
3. 清野 透 「再生医療へのブレイクスルー」 遺伝子医学MOOK 1 第1章1-3), 細胞周期と細胞の不死化, 田畑泰彦編, メディカルドゥ pp37-41, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及び

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 研究グループ長

研究要旨本年度は間葉系幹細胞からのin vitro骨形成（再生培養骨）の3次元での高次構造解析ならびにハイドロキシアパタイトセラミック上での骨芽細胞への分化と骨基質生成過程について調べた。ラット間葉系細胞を用いて、再生培養骨を培養プレート上で構築し、この構造が体内と同様の3次元構造（骨芽細胞層、骨基質層、骨細胞層）を有することを観察した。また、ハイドロキシアパタイトセラミックの上で間葉系幹細胞が効率よく増殖ならびに骨芽細胞へ分化することも観察され、我々が開発した方法による再生培養骨を用いることにより、種々難治性の骨関節疾患の治療が可能となることが判明した。

A. 研究目的

骨髄有核細胞に含まれる間葉系幹細胞の割合は非常に少なく、新生児では1/10,000で大人では1/2,000,000とされている。しかし、新鮮骨髄細胞を培養する事により、間葉系幹細胞を増殖する事が可能である。さらに、昨年度の本研究で報告したように、この培養幹細胞を用いてin vitroで再生培養骨を形成できうる。この点において、この再生培養骨が果たしてin vivoでの骨形成と同様の過程をへて形成され、形態的ならびに機能的に生体の骨と同等であるかの検証が必要である。また、これらの再生培養骨がバイオマテリアル上で効率良く形成されうる事の確認も重要である。そこで、本研究目的はin vitroの再生培養骨の3次元構造解析ならびに人工骨としてよく利用されているハイドロキシアパタイト上での再生培養骨形成をこころみ、生体の骨との相違を研究することを目的とした。

B. 研究方法

ラット間葉系幹細胞をビタミンC、磷酸、デキサメサゾン等の骨分化因子の存在下に培養プレートで約10日間培養した。また、培養中にカルセインを添加することにより骨基質を青色に染め、細胞骨格をアクチン染色により染めた。また、以上の培養は培養プレート上、また透明ハイドロキシアパ

タイトセラミック上でもおこなった。

（倫理面への配慮）

本研究で用いられたヒト細胞はすべて産業技術総合研究所の倫理委員会での審議をふまえ、研究に用いることが承認されている。

C. 研究結果

培養プレート上での間葉系幹細胞の培養により、共焦点レーザー顕微鏡による観察で緑色に染まっている骨基質が赤色部分（アクチン染色）による骨芽細胞層の下に存在しているのが判った。また、この骨基質には骨芽細胞より分化した骨細胞が骨小腔内に存在した。このように、in vitroにおいても、培養間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞により正常の骨と同様の3次元構造を有する骨構造を培養プレート表面に形成されることが判った。

さて、このように再生培養骨作製が少量の骨髄を用いて可能であるが、本年度の研究の目的の一つであるハイドロキシアパタイトセラミック上での培養骨は作製可能であるか、またその作製が可能なら、その効率も検定した。上記に述べたように、再生培養骨は未分化間葉系細胞が骨芽細胞へ分化する過程を必要とする。この過程において重要なのは、間葉系細胞の培養基盤における接着性である。通常、培養基盤におけ

る接着性は培養プレート上で観察される。組織培養に用いられる培養用プレートはプラズマ処理をおこない、炭酸基ならびにヒドロキシル基が導入されたポリスチレンからなり、表面が弱い親水性の性質を有する。この表面性質のため、疎水性の強い細菌培養に用いられるプレートと異なり、細胞接着性に優れている。この様に、組織培養プレートは動物細胞の培養に良く用いられる。このプレートは光透過性であり、細胞の観察に適している。しかし、ハイドロキシアパタイトセラミック等のリン酸カルシウム系セラミックは通常不透過性であり、細胞の観察は困難である。最近、井奥等は SPS 焼結法 (spark plasma sintering process) を用いてこのハイドロキシアパタイトを透明化できうることを報告した。この透明セラミックを用いて、ラット間葉系細胞の接着を観察したところ、播種後わずか1時間で細胞が接着性を示し初め、5時間ではかなりの数の細胞は伸展して強固に接着し、一日後にはほとんどの細胞が間葉系細胞としての fibroblastic な細胞形態をしめした。この過程は培養プレート上でも同様にみられた。さらに、これらの接着細胞は骨分化因子存在の下に骨芽細胞まで分化し、骨基質をセラミック上で産生し、再生培養骨形成をしめした。また、以上は透明セラミックを用いた解析であるが、通常のハイドロキシアパタイトセラミック上での細胞の接着を見るために、緑色蛍光タンパク質 (GFP : Green Fluorescent Protein) 遺伝子を組み込んだ間葉系細胞を播種した。この場合、セラミックは不透明なため、通常の顕微鏡では観察できないが、落射型の蛍光顕微鏡により観察した。細胞は GFP 蛋白を発現するため、たとえセラミックが不透過性であっても容易に細胞の形態が観察できる。この実験により、通常のセラミック上でも間葉系細胞は容易に接着し約7日でセラミック表面を覆うように増殖した。以上のように、ハイドロキシアパタイト表面は間葉系細胞の接着ならびに増殖に適していて、これらの細胞の挙動は組織培養プレート上に匹敵しうるものであった。

D. 考察

我々は *in vitro* で形成された骨芽細胞・骨基質、すなわち再生培養骨は生体への移植により、さらなる新生骨形成を生じる事を報告している。すなわち、種々バイオマテリアル上で形成された再生培養骨は新生骨形成能を有する生体材料である。本年度の研究により、この再生培養骨は *in vitro* で生体の骨に類似する3次元構造を有することが判明した。また、臨床によく利用されているハイドロキシアパタイトセラミック上で効率よく再生培養骨が形成されることが観察され、間葉系細胞からの培養骨を骨再生医療に用いる方法論の重要性を確認できた。

E. 結論

ラット間葉系細胞を用いて、*in vitro* 骨形成がハイドロキシアパタイトセラミック上で効率よく形成されることが、さらにこの *in vitro* 骨形成 (再生培養骨) が骨芽細胞層、骨基質層、骨基質にとりこまれる骨細胞等の構成要素よりなり、生体の骨に匹敵することが判明した。以上より、再生培養骨を用いての骨再生は理にかなったものであり、臨床応用における有用性を確認できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H., Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics., *Biomaterials* 2005;26(7):779-85.

Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H, Ikeuchi M, Tamai N, Yoshikawa H., Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: quantitative and three-dimensional image analysis., *Cell Transplant* 2004;13(4):367-76.

Kihara T, Oshima A, Hirose M, Ohgushi H., Three-dimensional visualization analysis of *in*

vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells., Biochem Biophys Res Commun 2004;316(3):943-8.

2. 学会発表

Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H, Ikeuchi M, Tamai N, Yoshikawa H., Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells -Quantitative and three-dimensional image analysis-, Frontiers of Skeletal Biology, 10th Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, Mar.21,2004; Switzerland

Kihara T, Hirose M, Machida H, Kotobuki N, Yoshida A, Oshima A, Ohgushi H., Real time three-dimensional analysis of *in vitro* bone formation by marrow mesenchymal stem cells., 7th World Biomaterials Congress, May.20, 2004; Sydney

Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Nomura D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H., In-vitro osteogenic activity of rat mesenchymal stem cells cultured on transparent b-tricalcium phosphate ceramics., 17th International Symposium on Ceramics in Medicine, Dec.9,004; New Orleans, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

治療応用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. MSC の増殖及び分化能の解析

12 例のヒト腸骨骨髄より MSC を単離し、増殖能、分化能及び細胞表面マーカー等を解析した。いずれも一定期間（一定継代数）後、増殖は停止し、細胞は老化徴候を示したが、1 例のみ 280 日以上、分化能を維持したまま培養継続可能な細胞系を樹立することに成功し、更にこの細胞の細胞表面マーカー解析から MSC 特異的マーカーの候補の一つを同定した。また MSC の分化能維持に関連した因子として、クロマチンリモデリング因子の一つを同定し、その機能解析を行った。

2. 無腐性骨壊死の動物モデルの作成と治療実験

家兎大腿骨骨幹部を用いて、処理骨再利用治療モデルを作成し、液体窒素処理により骨再生が著しく阻害されることを示した。更にイヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成及び治療実験を行った。対照群は圧潰変形、遠位手根列の亜脱臼及び軟骨面の変形性関節症変化などヒトのキーンベック病に類似した所見を呈した。一方 MSC と人工骨材料混合体による壊死部補填及び血管柄付き骨片移植を施行した群では、早期に骨組織が再生され、圧潰変形することなく治癒することが判明し、壊死骨病態に対する MSC を用いた治療の臨床応用に直結する結果が得られた。

A. 研究目的

MSC の多分化能は多くの実験結果から明らかではあるが、MSC を用いた組織再生治療を Evidence Based Medicine として確立するためには、その増殖・分化能の基本的現象を分子レベルで把握する必要がある。このような背景のもと、京都大学医学部附属病院において、腸骨より骨移植を受ける患者より、骨髄液を採取し、MSC の増殖能を解析した。分化能に関しては前年度までの研究により同定された因子に関する解析を行った。更に MSC を用いた難治性骨病態の治療法の開発を目的として、家兎を用いた骨幹部凍結処理骨モデルの作成、及び犬を用いたキーンベック病モデルを作成し、MSC を用いた治療法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. MSC の増殖・分化能の解析

1-1. 初代培養 MSC の増殖・分化能解析

京都大学医学部附属病院において、腸骨より骨移植を受ける患者より骨髄液を採取し、MSC を単離し、増殖及び分化能を解析した。分化能に関しては骨、軟骨及び脂肪への分化能を培養初期とその後定期的に、分化誘導培地での遺伝子発現及び組織化学染色等で解析した。増殖は 3T3 様の継代で継続した。

1-2. クロマチンリモデリング因子の分化能への関与

前年度までの解析により、MSC の分化誘導刺激に伴い、発現が低下する遺伝子として単離されたクロマチンリモデリング因子に関して初代培養 MSC を用いて解析した。培養開始後、経時的な遺伝子発現の変化を観察し、細胞周期調節遺伝子など増殖関連

遺伝子あるいは各系統の分化形質関連遺伝子の発現との相関性を解析した。機能的解析としては、siRNA を用いた発現抑制系及び発現ベクターを用いた強制発現系を用いて、MSC の分化能への影響を解析した。

1-3. 細胞表面マーカーの同定

CD 抗原、増殖因子受容体などの細胞表面マーカーに関して、骨、軟骨、脂肪に分化できる不死化 MSC クローンと他のクローン及び初代培養 MSC における発現を比較し、不死化 MSC で発現している表面マーカーの検索を行った。方法は、RT-PCR 法、FACS 及び当研究所岩田研究室で開発された抗体アレイを用いた。

2. MSC を用いた壊死骨再建

2-1. 家兎大腿骨骨幹部処理骨モデルの作成

腫瘍性疾患の治療を想定し、家兎大腿骨中央骨幹部を切除、液体窒素により凍結処理を行い、壊死骨を作成したのち、キュルシュナー鋼線により元の位置に固定。経時的に X 線撮影を行い、6 週間後に屠殺、組織学的評価を行った。

2-2. イヌ腸骨よりの MSC の採取、増殖及び標識

イヌ腸骨より骨髓液を採取、ヒト MSC の場合と同様な操作を経て、単層培養を開始。初代あるいは継代 2 代目の時点で、 β ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ細胞を標識した。その後は選択用の薬剤添加の状態、3T3 様の継代により増殖させた。

2-3. イヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成と治療実験

イヌ月状舟状骨を手背部より展開し開窓、約 80% を搔爬したのち液体窒素による凍結処理を行い、壊死骨モデルを作成した。培養増殖させたイヌ MSC を有孔人工骨基質 (β -TCP 製剤) に吸着させたものを、作成した壊死骨へ充填したのち、橈骨遠位端より血管柄付骨片を挙上し、開窓部を被覆した。術後は外固定を施行せず、自由に運動させた。定期的に X 線及び MRI 検査を施行し、術後 4W の時点で、犠死させ、マイクロ CT による評価の後、組織学的評価を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト MSC に関する実験は京都大学医の倫理

委員会に申請、承認されたプロトコール(受付番号:第 515 番)に基づき、インフォームドコンセントを取得し、連結不可能匿名化を行った上で施行した。家兎及びイヌの実験に関しては京都大学再生医科学研究所動物実験委員会に申請、承認されたプロトコール(受付番号:平成 15 年度 P-10 及び平成 16 年度 P-13)に基づいて施行した。

C. 研究結果

1. MSC の増殖及び分化能の解析

1-1. 初代培養 MSC の増殖・分化能解析

これまで 12 例のヒト腸骨骨髓より MSC を単離、増殖させた。うち 8 例は既に増殖が停止し、停止までの時間は 48 日~196 日で平均 121 日であった。増殖中 4 例のうち 3 例は培養開始後 60 日以内と短期間であるが、他の 1 例は 280 日を経過してもまだ旺盛な増殖能を示している。この細胞は 24 才、女性より樹立されたものであり継代 3 代目の時点で骨、軟骨、脂肪への分化能が確認され、継代 24 代目の時点でも同様な分化能が確認された。

1-2. クロマチンリモデリング因子の分化能への関与解析

単離されたクロマチンリモデリング因子に関して、各初代培養 MSC での継代毎の遺伝子発現をみると、特定の方向への分化を誘導しない場合、その発現レベルはほぼ一定に保たれていた。一方、分化誘導後、特に軟骨分化誘導後に発現レベルが著しく低下した。詳細な解析により、この遺伝子にはこれまで報告されていないスプライシングバリエーションが存在することが判明した。siRNA を用いた発現抑制を試みたが、作成した複数の siRNA の中で最も有効であったものでも蛋白レベルで 25% 程度の抑制であったため、抑制による影響に関しては結論が得られていない。一方、強制発現系に関しては、一過性の強発現により MSC の分化関連遺伝子の発現が低下することが観察された。以上の解析よりこのクロマチンリモデリング因子は MSC を未分化な状態に維持しておく上で、重要な役割を果たしていることが想定された。

1-3. 細胞表面マーカーの同定

不死化した MSC クローンは、これまで報告されている細胞表面マーカーである CD44、

105、106、156 のいずれも陽性であった。一群のファミリーを形成する細胞表面マーカーの解析過程で、不死化 MSC においてそのうちの一つのみが非常に明確に発現していることを見出した。一方初代培養 MSC ではファミリーの他の遺伝子の発現も検出された。これは初代培養 MSC が異なる発現パターンを示すヘテロな細胞の集合である可能性を考慮すると、この細胞表面マーカーの MSC に対する親和性が伺われる。興味深い点は、1-1 項で述べた長期培養が可能となった細胞では、このマーカーのみが陽性であった。

2. MSC を用いた壊死骨再建

2-1. 大腿骨骨幹部処理骨モデルの作成

対照群が術後 2 週より仮骨形成を認め、6 週では全周性の骨癒合を認めたのに対し、液体窒素処理群では仮骨形成は乏しく、6 週でも周囲の仮骨で連絡性はあるものの、骨切断端は偽関節の状態であった。また処理骨皮質内には骨細胞が認められず empty lacunae の状態であった。以上より、このモデルは処理骨再利用に対する MSC の応用モデルとして妥当であると考えられた。

2-2. イヌ腸骨よりの MSC の採取、増殖及びレトロウィスルによる標識

骨髓液より採取、培養した MSC は、ヒトの場合と同様に骨、軟骨及び脂肪へ分化誘導することが可能であった。ヒトと同様に、比較的初期に p16 遺伝子の発現が亢進し、増殖速度が低下したが、約 5ml の骨髓液から培養を開始し、4 週間後に 1×10^7 の細胞を得ることができた。初代培養細胞におけるレンチウィスルベクター pLenti6/V5-GW/lacZ による標識の効率は約 50% とほぼ満足できるものであった。

2-3. イヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成と治療実験

実験群を三群に分けた。開窓後、海綿骨搔爬及び液体窒素処理のみを行った例を C 群、液体窒素処理後、予め皮下組織から樹立した線維芽細胞を β -TCP とともに、搔爬部に充填し、その上を血管柄付き骨片で被覆したものを F 群、そして線維芽細胞の代わりに MSC を用いたものを M 群とした。C 群は術後 2 週で既に X 線上、圧潰が認められ、4 週で摘出した時点では、搔爬部に骨再生は全く認められず、完全に圧潰した

状態であり、それに伴い遠位手根列の亜脱臼及び橈骨関節面での変形性関節症変化が認められた。F 群では画像上 C 群に比べて軽度であるが、やはり徐々に圧潰が進行し、切除標本でも明確な変形が認められた。一方 M 群では画像上、形態は維持されており、切除標本のサイズ、重量ともに F 群を上回っていた。内部の骨再生像をマイクロ CT で観察すると、F 群と M 群の間には明確な差が認められ、F 群では繊維組織と思われる壊死部が多く残存しているのに対し、M 群ではほぼ全域にわたる骨梁の再構築が認められ、壊死骨再生の所見が得られた。

D. 考察

1. MSC の増殖及び分化能の解析

MSC の単離法に関しては未だに理論に基づいた方法が確立されていない。初代 MSC は明らかにヘテロな集団であり、その中には上述したように長期にわたり培養可能な細胞が含まれていることが判明した。この細胞が真の MSC であるかについては、今後更に解析が必要であるが、他の細胞系との比較による細胞表面マーカーの同定などに有用な試料となることが期待される。多分化能維持機構についても多くは不明のままである。現在解析しているクロマチンリモデリング因子は、ES 細胞の多分化能の維持にも関与していることが報告されており、広く幹細胞の分化能維持機構に関与している因子である可能性があり、非常に興味深い因子であると考えている。今後は誘導可能な発現系を構築するなどして、解析を進めたい。

2. MSC を用いた壊死骨再建

イヌ月状舟状骨を用いたキーンベック病モデルの作成及び治療実験は、臨床病態及び現行の治療法に非常に近いモデルであり、かつ術後の安静が不可能な大型動物を用いたモデルである。このような実験モデルにおいて MSC を用いた治療により、変形が生ずることなく完全に骨再生が得られたことは、臨床応用に向けて大きな成果と考える。これらのデータをもとに、MSC を用いた壊死骨再生治療を京都大学に申請する予定である。

E. 結論