

200400230B

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14年度－16年度
総合研究報告書

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14年度－16年度
総合研究報告書

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
骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植	3
梅澤 明弘	
II. 研究成果に関する一欄表	31
III. 研究成果の刊行物・別冊	43

I. 総括研究報告書

骨髄由来の間葉系細胞と生分解性ポリマーを用いた細胞移植

梅澤 明弘

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 骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。先天性・後天性の難治性骨欠損に加え加齢・閉経による骨粗鬆症、炎症性疾患による骨形成能低下など骨組織の再生医療が待ち望まれている疾患が多々存在する。多くの骨再生に関する治療法が検討されているものの、既に骨形成能の低下した病態への画期的な治療法は未だないのが現状である。近年の再生医学研究より組織構成要素である細胞が治療材料となり得る可能性が示されている。しかし、臨床応用のためには移植細胞のコントロール、移植方法の確立といった問題を解決する必要がある。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した。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ことを社会に提示できた。

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

A. 研究目的

骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。多

くの骨再生に関する治療法が検討されているものの、既に骨形成能の低下した病態への画期的な治療法は未だないのが現状である。近年の再生医学研究より組織構成要素である細胞が治療材料となり得る可能性が示されている。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。

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ールを作成し、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

合成高分子ポリ乳酸-グリコール酸重合体(PLGA)の網目状構造を持つ織布に、ウシI型コラーゲンのマイクロスポンジを複合化、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) 細胞接着性の向上

コラーゲン複合化の有無による接着細胞数の違いを、播種後6時間での付着細胞数

にて計測し、比較した。また、複合化シートへ付着した細胞の状態を走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。コラーゲン複合化シートは非複合化シートに比較し4～5倍の細胞接着能を有することが確認された。走査電子顕微鏡像では PLGA ファイバー表層よりも、ファイバー間に張ったコラーゲンのマイクロスポンジに多く細胞が接着し、コラーゲンの有用性が示された。透過電子顕微鏡像にて多量のコラーゲンフィブリル、多数の拡大した粗面小胞体が観察され、接着した細胞が旺盛な蛋白合成、細胞外物質産生を行っていた。

3) 生体への移植

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

4) 生体内での形状制御

形状作製および維持が可能かどうかを確認するため、シートを丸め管状骨を模倣した円管形態を作製、また丸めたシートにて結び目を作製、さらにシリコンにシートを巻き付け指骨形態を模倣しマウス皮下に移植した。4 週において目的とした形態そのままの骨が形成されることが証明された。

5) 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。

6) ヒト細胞の安全性ならびに治療プロトコー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ールを作製し、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。

7) 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床研究に対する、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。

8) 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. **Correspondence to AU:** 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

Tschiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and **Akihiro Umezawa, A.**: A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316:141-153.2004

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

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

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

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

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

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

Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., Kiyono, T., Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., and **Umezawa, A.**: Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp Cell Res*, 288: 35-50, 2003

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

59, 2003

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

Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H.: Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells. Kusa is suppressed by notch signaling. *Exp Cell Res*, 290(2):370-80, 2003

Matsushita, K., Okita, H., Suzuki, A., Shimoda, K., Fukuma, M., Yamada, T., Urano, F., Honda, T., Sano, M., Iwanaga, S., Ogawa, S., Hata, J., and Umezawa, A.: Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene. *Mol Cell Endocr.* 203 105-116, 2003

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

Fukuma, M., Okita, H., Hata, J., and Umezawa, A.: Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 22(1): 1-9, 2003.

Ochi, K., Chen, G., Ushida, T., Gojo, S., Segawa, K., Tai, H., Ueno, K., Ohkawa, H., Mori, T., Toyama, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A.: The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic- co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J. Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003

Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology international*, 53: 214-220, 2003

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

Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, and Kasugai S.

Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62(2): 292-298. 2002

Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J., Yamada, T., Umezawa, A., and Hata, J.: Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (Wt1) mutation and the histological findings in Wilms tumor (WT), *J Med Genet.* 39 (12): E83. 2002

Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Umezawa, A.,

Hata, J., and Fukuuchi, Y. : Expression of interleukin-6 in cerebral neurons and ovarian cancer tissue in Trousseau syndrome. *Clin Neuropathol.* 21 (5) 232-235. 2002

Ogawa, S., Matsumura, S., Yoshikawa, T., Satoh, T., Kumagai, H., Mitamura, H., Iwanaga, S., and Umezawa, A. : A case of dilated cardiomyopathy with end-stage heart failure treated by prolonged continuous hemodiafiltration. *Keio J Med.* 51 (3): 165-177. 2002

Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Toyama, Y., Hata, J., and Umezawa, A. **Correspondence to AU.** : Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing's sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo, (Tables are corrected in *BBRC*, 295: 573-574, 2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 61-71. 2002

Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H: Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 277 (46): 43730-43734. 2002

Itoh D, Yoneda S, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. : Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62(2): 292-8. 2002

Hakuno, D., Fukuda, D., Makino, S., Konishi, F., Tomita, Y., Manabe, T., Suzuki, Y., Umezawa, A. and Ogawa, S. : Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, 105: 380-386. 2002

Ohyama, M., Amagai, M., Tsunoda, K., Ota, T., Koyasu, S., Hata, J., Umezawa, A. and Nishikawa, T. : Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol*, 118: 199-204, 2002

Kohyama, J., Abe, H., Shimazaki, T., Koizumi, A., Nakashima, K., Gojo, S., Taga, T., Okano, H., Hata, J. and Umezawa, A. **Correspondence to AU.** : Brain from Bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. *Differentiation (Special issue on stem cells)* 68 : 235-244. 2001

Shinoda, K., Nakamura, Y., Matsushita, K., Shimoda, K., Okita, H., Fukuma, M., Yamada, T., Ohde, H., Oguchi, Y., Hata, J. and Umezawa, A. **Correspondence to AU.** : Light-induced apoptosis is accelerated in transgenic retina overexpressing human EAT/mcl-1, an anti-apoptotic bcl-2-related gene. *Br J Ophthalmol* 85 : 1237-1243. 2001

Muto A, Kizaki M, Kawamura C, Matsushita H, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Yamato K, Ito M, Ueyama Y, Ikeda Y. : A novel differentiation-inducing therapy for acute promyelocytic leukemia with a combination of arsenic trioxide and GM-CSF. *Leukemia*. 15(8) : 1176-1184. 2001

Sano, M., Umezawa, A., Abe, H., Akatsuka, A., Nonaka, S., Shimizu, H., Fukuma, M., Hata, J-i. : EAT/mcl-1 expression in the human embryonal carcinoma cells undergoing differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res*, 266(1): 114-125. 2001

Fukuzawa, R., Umezawa, A., Morikawa, Y., Chang Kim, K., Nagai, T., Hata, J-I : Nesidioblastosis and mixed hamartoma of the liver in Beckwith-Wiedemann syndrome: a case study including analysis of H19 methylation and insulin-like growth factor 2 genotyping and imprinting. *Pediatr Dev Pathol*. 4(4) : 381-390. 2001

Hamatani, T., Sasaki, H., Ishihara, K., Hida, N., Maruyama, T., Yoshimura, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A. **Correspondence to AU.** : Epigenetic mark sequence of the H19 gene in human sperm. *Biochim Biophys Acta*. 1518(1-2): 137-144. 2001

Ochi, K., Nozaki, H., Tanaka, F., Kato, K., Fukuzawa, F., Sobue, G., Fukuuchi, F., Toyama, Y., Hata, J-i., and Umezawa, A. **Correspondence to AU.** : Specific bisulfite modification of CTG triplet repeats of the androgen receptor gene, a gene associated with the triplet repeat disease X-linked spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy Disease), *Neuroscience Research Communications* 28(1): 1-10. 2001

Fukuchi, Y., Kizaki, M., Yamato, K., Kawamura, C., Umezawa, A., Hata, J-i., Nishihara, T. and Ikeda, Y. : Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* 20 : 704-713. 2001

梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療、昭和学会誌、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

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：⑥再生医療とエピジネティクス エピジネティクス 佐々木裕之編 シュプリンガー・フェアラーク東京、229-234、2004

梅澤明弘：書評「絵で分かる 血液のはたらき」 医学のあゆみ、209 (2) 115、2004

梅澤明弘：第1部必要な基礎知識⑨遺伝子変異 病理と臨床臨時増刊号、22、47-53、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、「ヒト疾患モデルー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、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：骨再生・形状システムの構築ー生分解性ハイブリッドシートを用いて。 医学のあゆみ、209 (12) 964-967、2004

梅澤明弘：骨をつくるー細胞移植の基盤研究とバイオマテリアルによる臨床応用 医学の歩み、209 (12) 929、2004

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：再生医療の現状と化学工学への期待 化学工学、68(8)414-417、2004

梅澤明弘、竹田征二：単離間葉系幹細胞心筋細胞への分化 生体の科学、55 (4) 329-333、2004

梅澤明弘：骨髄間葉系幹細胞を用いた再生医療 顕微鏡、39 (2) 84-87、2004

梅澤明弘：精子形成に関わるエピジネティクス *Hormone frontier in genecology* 11(3)231-234、2004

梅澤明弘：骨髄間葉細胞の現状と展望 治療学、38(10):1056-1060、2004

小室一成、山下潤、桜田一洋、梅澤明弘：「座談会」細胞移植 細胞移植の現状と課題ー基

- 礎から臨床へー 治療学 38(10):1133-1143、2004
- 梅澤明弘：再生医療ー病理解剖ならびに病理検体から学ぶことー、病理と臨床、特集「再生医療」、編集 梅澤明弘/前田盛、21 (7): 725-731, 2003
- 伊澤良兼、梅澤明弘：骨髄間質細胞、Molecular Medicine Vol.40、臨時増刊号、再生医学、編集 須田年生/岡野栄之
- 梅澤明弘：再生医療、城西放射線・医療同窓会報、26号、2003年5月26日
- 竹田征治、梅澤明弘：多能性幹細胞としての間葉系幹細胞研究、分子呼吸器病、7(4): 94-96, 2003
- 梅澤明弘：第一章「幹細胞の増殖・分化機構とその制御」3) 骨髄由来の多能性細胞 1. 骨髄間質による骨・軟骨形成、実験医学増刊、「再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端」、21(8): 94-100, 2003
- 梅澤明弘：神経幹細胞の供給源 骨髄ー骨芽細胞、神経疾患の再生医療ーその現状と将来、Clinical Neuroscience, 21(10): 1127-1130, 2003
- 梅澤明弘・五條理志 間葉系細胞の基礎と臨床応用 Molecular Medicine、40(12):1432-1440.2003
- 梅澤明弘：再生医療の展望 1. 細胞移植による再生医療、日本内科学会誌 第92巻 第9号 平成15年9月10日 1758-1762.
- 森泰昌、今林英明、梅澤明弘：再生医学と幹細胞ー成体幹細胞、日医雑誌、129(3): 307-312, 2003
- 槌谷宏平、松野丈夫、梅澤明弘：間葉系幹細胞、日本医学会新聞 (2523), 2003年2月17日 (4)
- 橋口明典、坂本亨宇、梅澤明弘：体性幹細胞(組織幹細胞)の分裂、増殖、分化誘導 日本臨床、61 (3) : 390-395, 2003
- 梅澤明弘：骨折の再生医療に研究者人生をかけます 日経バイオビジネス,4 : 111,2003
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞と生殖医療ー生物学的特性からみた治療戦略を意識してー 医学のあゆみ、204 (13) 943-948, 2003
- 梅澤明弘：エピジェネティックの臨床応用ー幹細胞と臓器再生 現代医療 別冊、30 (5) 1081-1087, 2003
- 梅澤明弘：骨髄由来の多能性細胞ー骨髄間質による骨・軟骨形成 実験医学、21 (8) 1062-1068, 2003
- 梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医療、慶應医学部新聞 (615), 2003
- 竹田征治、梅澤明弘：筋ジストロフィーに対する再生医療、医学のあゆみ、204(3): 179-182, 2003
- 梅澤明弘：幹細胞とエピジェネティクス、Molecular Medicine,39 (7), 816-822, 2002
- 梅澤明弘：再生医療、小児科臨床、55 (5): 844-846, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞、「生活習慣と遺伝子疾患」メディカルレビュー社、pp255-257, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞による臓器再生-その表面マーカーに着目する- 化学と生物、40(6): 362-369, 2002
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞、再生医学再生医療、現代化学増刊、41: 16-23, 2002
- 梅澤明弘：骨芽細胞から神経への転換、最新医学、57 (7): 1640-1647, 2002

- 梅澤明弘：発生・細胞分化過程におけるクロマチン構造と遺伝子発現、実験医学「細胞分化機構とエピジェネティクスの解明」、20(15): 2206-2211, 2002
- 浦野文彦, 梅澤明弘, 秦順一：Ewing 肉腫と PNET 病理と臨床 14 臨時増刊号：188-192, 2002
- 梅澤明弘：組織幹細胞と生殖細胞の再生医学 DOCTOR'S MAGAZINE (33)：40-41, 2002
- 今林英明, 梅澤明弘：RA 臨床の Q and A RA & セラピー、7(1): 58-59, 2001
- 梅澤明弘, 慶応義塾大学医学部病理学教室：骨髄間質細胞から神経細胞を作る Science & Technology Journal, page 48-49, June, 2001
- 梅澤明弘：骨髄間質を用いた臓器再生と細胞治療 第 117 回日本医学会シンポジウム 記録集「幹細胞と細胞療法」(2000 年 8 月) 107-113, 2001
- 五條理志, 梅澤明弘：間葉系幹細胞を用いた細胞移植による心臓再生 組織培養工学、27(1): 22-27, 2001
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞研究の現状と展望 実験医学、19(3): 350-356, 2001
- 梅澤明弘：骨髄間質細胞 分子細胞治療、2(1): 17-24, 2001
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞による「臓器」再構築—新しい生体マイクロデバイスとしての骨髄間質細胞の可塑性を用いた細胞移植— Biotherapy、15(2): 119-125, 2001
- 梅澤明弘, 五條理志, 秦順一：細胞移植と臓器再生 病理と臨床、19(6): 641-647, 2001
- 越智健介, 戸山芳昭, 秦順一, 梅澤明弘：未分化幹細胞による骨・軟骨再生の試み Rheumatology Clinical Update、6: 40-41, 2001
- 森泰昌, 梅澤明弘, 秦順一：骨髄間質細胞 治療学、35(35): 21-24, 2001
- 五條理志, 梅澤明弘：骨髄間葉系幹細胞—生物学的役割からの新たな治療戦略 臨床検査、45(10): 1135-1138, 2001
- 梅澤明弘：間葉系幹細胞の応用展望—細胞移植に対する病理組織学的な評価システムの提言— 遺伝子医学、5(4): 53-58, 2001
- 梅澤明弘：骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞を用いた臓器再生・細胞移植およびその評価システムの確立 実験医学、19(15): 151-158, 2001
- 梅澤明弘：臓器再生—骨髄細胞の場合 生物の科学 遺伝、別冊 No. 13: 100-110, 2001
- 越智健介, 今林英明, 戸山芳昭, 秦順一, 梅澤明弘：骨髄間質細胞—再生医療における新たな治療戦略— 臨床整形外科、36(9): 1034-1036, 2001
- 梅澤明弘：骨髄間質による骨形成 現代医療 (特集：幹細胞の基礎と臨床応用への挑戦、須田年生編集)、33(8): 125-130, 2001
- 梅澤明弘, 神山淳, 阿部仁, 秦順一：間葉系幹細胞-新しい生体マイクロデバイス・骨髄間質細胞の可塑性を利用したグローバルな"臓器"再構築- 医学のあゆみ、199(13): 973-979, 2001

2) 学会発表

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

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

I. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

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

「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際

(PCT/JP00/001148、平成 13 年 2 月 28 日)

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

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際（PCT/JP00/09323、平成 13 年 12 月 27 日）

出願人：協和醗酵株式会社

(b) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第 251365 号、平成 13 年 8 月 22 日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産業技術総合研究所

(c) 「間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法」

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成 14 年 4 月 17 日

出願番号 特願 2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

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

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（倫理面の配慮含む）

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骨髄ならびに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

H14年度には骨髄由来ヒト間葉系幹細胞はES細胞などと異なりテロメラーゼ活性が存在せず理論的にテロメア短縮による絶対寿命が存在することが確認された。また、テロメラーゼ触媒サブユニットTERTを導入しテロメラーゼ活性を誘導しても、延命できないことが示された。この際p16Ink4aの発現増加が見られ、p16の発現上昇によるRb経路の活性化が培養皿上での寿命を規定していることが示された。Rb/p16経路に拮抗するHPVのE7の導入や内在性遺伝子であるbmi-1の高発現により細胞は延命しさらにp53経路に拮抗するHPVのE6の導入により細胞は長期間安定に増殖できるようになった。延命した細胞に予めTERTを導入しテロメラーゼを活性化した細胞は長期延命した。

H15年度にはHPVのE6E7の導入により長期延命した骨髄由来ヒト間葉系幹細胞ではテロメラーゼの活性化はおきず、テロメア短縮によりクライシスを迎えることが確認された。さらにTERTを導入しテロメラーゼ活性を誘導す

ることにより細胞は800日以上安定に増殖し事実上不死化していることが示された。また、E7とTERTやbmi-1とTERTなどの細胞も800日以上安定に増殖し、梅澤らにより間葉系幹細胞の多分化能を有していることが確認された。また、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、レトロウイルスによる効率良く、持続的にshort hairpin RNA (shRNA)を細胞内で産生させるベクターを開発した。

H16年度にはそのベクターを用い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。また、臍帯血由来間葉系細胞2株を不死化樹立し解析した結果、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の発現増加と老化が見られ、TERTの導入に加え、E6E7の導入が不死化に必要であった。これらの細胞は梅澤らにより間葉系幹細胞の多分化能を有していることが確認された。

D. 考察

本研究では、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の導入によってヒト骨髄間葉系幹細胞を不死化し、そ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と考えられる。一方、臍帯血由来間葉系幹細胞からTERTの導入のみで不死化した細胞株を得ることができた。この細胞株のp16プロモーターはメチル化されておらず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

ヒト骨髄ならびに臍帯血には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在することを、それらを不死化することにより詳細に解析証明することができた。これらの細胞を含むヒト細胞の不死化にはテロメラーゼ活性の誘導に加えRb/p16経路の活性化阻害が必要であり、がん遺伝子とTERTの導入による方法がまず確立された。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本研究成果により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基、適切な計画が基準に従った施設において行われた。

G. 研究発表

1. Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Yamada, J., Hara, S., Nakagawa, M., Shinoda, J., Sakai, N. Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Exp. Cell Res.* 273:157-168, 2002.
2. Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T., Tsurumi, T. Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *J Biol Chem* 277:10354-10361, 2002
3. Okamoto, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Nakamata, T., Hosaka, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Kiyono, T., and Toguchida, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* 295:354-61,2002.
4. Nakamura, H., Fukami, H., Hayashi, Y., **Kiyono, T.**, Nakatsugawa, S., Hamaguchi, M., Ishizaki, K. Establishment of Immortal Normal and Ataxia Telangiectasia Fibroblast Cell Lines by Introduction of the *hTERT* Gene. *J Radiat. Res.* 43: 167-174, 2002.
 5. Handa, K., Saito, M., Yamaguchi, M., **Kiyono, T.**, Sato, S., Teranaka, T., Narayanan, A.S. Cementum matrix formation in vitro by cultured dental follicle cells. *Bone*, 31: 606-11, 2002.
 6. Kudoh, A., Fujita, M., **Kiyono, T.**, Kuzushima, K., Sugaya, Y., Izuta, S., Nishiyama, Y., Tsurumi, T. Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication. *J. Virol.* 77: 851-861, 2003.
 7. Fujita, M., Ichinose, S., **Kiyono, T.**, Tsurumi, T., Omori, A. Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant β -actin. *Oncogene*, 22: 627-631, 2003.
 8. Bruemmer, D, Yin, F, Liu, J., **Kiyono, T.**, Fleck, E., van Herle, A., Graf, K., Law, R. E. Atorvastatin inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.* 462:15-23, 2003.
 9. Nagata KI, Kawajiri A, Matsui S, Takagishi M, Shiromizu T, Saitoh N, Izawa I, **Kiyono T.**, Itoh TJ, Hotani H, Inagaki M. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules. *J. Biol. Chem.*, 278: 18538-43, 2003.
 10. Bruemmer D, Yin F, Liu J, **Kiyono T.**, Fleck E, Van Herle AJ, Law RE. Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303:251-258, 2003.
 11. Bruemmer D, Yin F, Liu J, Berger JP, **Kiyono T.**, Chen J, Fleck E, Van Herle AJ, Forman BM, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol. Endocrinol.*, 17:1005-18, 2003.
 12. Imabayashi, H., Mori, T., Gojo, S., **Kiyono, T.**, Sugiyama, T., Irie, R., Isogai, T., Hata, J., Toyama, Y., Umezawa, A. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis. *Exp. Cell Res.*, 288: 35-50, 2003.
 13. Bruemmer D, Yin F, Liu J, **Kiyono T.**, Fleck E, Van Herle AJ, Law RE. Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent. *Exp Cell Res.* 290:28-37, 2003.
 14. Kyo S, Nakamura M, **Kiyono T.**, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Yatabe N, Inoue M. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol.* 163:2259-69. 2003.
 15. Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., **Kiyono, 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.
 16. 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.*, 6:833-45, 2004.
 17. Sawada, M., **Kiyono, 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.
 18. Hara, S., Nakashima, S., **Kiyono, 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.
19. Oikawa, K., Ohbayashi, T., **Kiyono, 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.
20. Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, **Kiyono 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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** 「老化研究の最前線」第6章 DNAウイルスと老化 石川冬木編, シュプリンガー・フェアラーク東京, pp59-66, 2002.
 2. **清野 透** 「新世紀の感染症学」下巻 ヒトパピローマウイルス, 日本臨床社 pp562-567, 2003.
 3. **清野 透** 上皮系細胞の増殖制御と不死化: 細胞, 36, 437-440, 2004.
 4. **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.
 5. **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その作製方法」 出願中
-
- 分担研究者 大串 始
産業技術総合研究所 研究グループ長
- A. 研究目的
間葉系幹細胞は骨髄に存在するが、古くからこの幹細胞の骨への分化能を指摘されていた。例えば、新鮮骨髄を多孔体のハイドロキシアパタイトセラミックスやガラスセラミックスと混和することにより、生体内で新鮮骨髄に含まれる間葉系幹細胞が骨芽細胞への分化をへて骨形成を生じることが可能である。しかし、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い。その為、本研究では間葉系細胞を培養により増殖する研究、培養細胞から骨芽細胞を選択的に採取する研究、培養間葉系細胞の種々生体材料上での骨芽細胞の分化および骨基質形成研究をおこない、

骨疾患に対する間葉系細胞と種々セラミック（特にアルミナセラミックとハイドロキシアパタイトセラミック）の役割とその意義について探索することを目的とした。

B. 研究方法

14年度では細胞分取のモデル細胞としてHOS等の市販のセルラインを使用した。他はすべて、骨髄からの間葉系幹細胞を用いて研究をおこなった。新鮮ラットあるいはヒト骨髄細胞を培養し、間葉系幹細胞が多く含まれる付着性の細胞を増殖させた。この細胞を培養皿よりはがして燐酸、ビタミンC、ホルモンの一種のデキサメサゾン(Dex)の存在のもとでプレート上で2週間さらなる培養（二次培養）をおこなった。Dex非存在下では細胞の形態は細長い形態を保ち、ALP活性は低値を示し遺伝子の発現実験ではオステオカルシンのシグナルは検出できなかった。しかし、Dexを加えることにより、豊富な細胞外基質に取り囲まれた立方体の形状の骨芽細胞様細胞が二次培養後約一週間で出現した。また、この細胞外基質には培養後10日ごろよりミネラルの沈着がおり、これはカルセインという色素を取り込むことよりカルシウムの沈着が明らかであった。また、これらの細胞培養は培養プレート上での培養を基本としたが、15年度ではアルミナセラミック、16年度ではハイドロキシアパタイトセラミックを使用最多。なお、これらのセラミックは細胞の観察を容易にするため、特殊な製造方法による透明体を使用した。

（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

本研究の大きな目的として、細胞の培養による *in vitro* での骨形成研究がある。この骨形成の結果を述べる前に、生体の骨の微細構造につきまず簡単に述べる。骨組織は他の組織と異なり細胞成分に乏しく、カルシウムと燐の結晶であるハイドロキシアパタイトを主成分とする細胞外基質の豊富な組織である。このアパタイトの存在のため、骨は他の組織に比し非常に硬いのである。このハイドロキシアパタイトはランダムに存在するのではなく、コラーゲンという生体の高分子繊維の上に存在する。細胞成分としては骨組織の

中には骨小孔があり、その中に骨細胞(Osteocyte)が存在する。骨組織の表面には骨芽細胞(Osteoblast)が存在する。以上が簡単に述べた生体内での骨組織構造である。以上の構造をもつ *in vitro* 骨（再生培養骨）の作製をおこなった。上記方法に書かれているように、新鮮ラットあるいはヒト骨髄細胞を培養し、間葉系幹細胞が多く含まれる付着性の細胞を増殖後、2週間さらなる培養（二次培養）をおこなった。共焦点レーザー顕微鏡による観察で培養プレート底面に接するように骨基質が沈着し、その中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。さらに、骨基質の最表層には骨芽細胞層が検出され、正常の骨と同様の3次元構造を有する骨形成を培養皿表面に形成されることが判った。このように、間葉系幹細胞を用いて骨芽細胞を *in vitro* で出現させることが可能になり、さらにこの骨芽細胞による骨基質を生産できる。骨基質の成分としてリン酸カルシウム結晶が存在し、さらに骨基質内に Bone morphogenetic protein(BMP)を含む種々の機能分子が含まれることを考えると、この培養結果は重要な知見である。さらに、これらの再生培養骨は効率良くアルミナあるいはハイドロキシアパタイトセラミック上でも形成されることがわかった。これらのセラミックが現在医用応用されていることを考えると、これらの知見は臨床的にみて貴重である。

D. 考察

骨髄間葉系細胞を用いての再生培養骨形成の利点を整理すると、

(1) セラミック上で骨芽細胞が自ら種々の有用な機能分子を生産する。

(2) アルミナセラミックにリン酸カルシウム結晶をコーティング（骨基質生産）出来る為生体骨との結合親和性を増強できる

(3) 分化誘導剤を加えた培養法によって老化や個人差の影響を抑え再生培養骨を構築できるなどが挙げられる。

(1) は、*in vitro* 培養骨には骨芽細胞のみならず、細胞が合成・分泌する種々のサイトカイン等も含まれるため、優れた新生骨形成能を有し種々骨疾患の治療には有効な再生組織といえる。(2) は、培養骨の物理化学的解析で証明されたように正常の骨と同様の組成のミネラルを主成分とする細胞外基質を含むことである。このミネラルは不定形リン酸カルシウムがハイドロキシアパタイトの結

品に成長したものである。通常、人工関節は金属やチタンあるいはアルミナといった生体不活性な材料が使用されているが、これらの材料は生体において直接骨との結合性がないため、結果として固着せず、人工関節の緩みを生じる原因にもなる。この生体不活性な材料に比し、ハイドロキシアパタイト等のリン酸カルシウム系材料は骨と直接結合する性質を示す。すなわち、この再生培養骨を人工関節上に形成させることは、たとえばアルミナ人工関節自身が新生骨形成能を有するのみならず、周囲の既存の骨との結合親和性を増強することにもなり、人工関節の緩みの問題も解決できる。

(3) は、老化により分化能の低下あるいは幹細胞数の減少をきたしたとしても今回の技術により間葉系幹細胞は増殖可能であり、骨誘導培地を用いて培養することによって骨化能を上げることができる。以上のように、骨髄から間葉系幹細胞を増殖させ、さらに *in vitro* 骨（再生培養骨）を形成できることにより、種々の骨疾患の新規治療が出来ることを示した。

E. 結論

この3年間にわたる間葉系幹細胞を用いた再生培養骨作製研究について概略した。この間葉系幹細胞は培養条件やバイオマテリアルによって、骨芽細胞のみならず軟骨細胞へも分化可能であり、この幹細胞の利用範囲は広い。さらに構造的に骨基質に近く細胞の支持体のみならず骨形成の促進因子などの徐放担体としての機能をもつバイオマテリアルの開発も期待される。自分の細胞を用いて骨軟骨を再生修復させることが免疫原性、倫理面、供給面などから最も望ましい方法であることに変わりはない。より早く効率よく確実に骨芽細胞や軟骨細胞に分化誘導させるための抗炎症剤も含めた骨誘導因子の開発やその骨誘導効果については臨床応用に結びつけた基礎研究としてもますます重要になってくるであろう。

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.

Shimaoka H, Dohi Y, Ohgushi H, Ikeuchi M, Okamoto M, Kudo A, et al. Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells in porous hydroxyapatite ceramic. *J Biomed Mater Res* 2004;68A(1):168-76.

Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004;28(1):33-9.

Kitamura S, Ohgushi H, Hirose M, Funaoka H, Takakura Y, Ito H. Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artif Organs* 2004;28(1):72-82.

Kotobuki N, Hirose M, Funaoka H, Ohgushi H. Flowcytometric analysis of human osteoblastic cells expressing bone specific alkaline phosphatase. *Key Eng Mater* 2003;240-242:729-731.

Higashiyama S, Noda M, Muraoka S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, et al. Transplantation of hepatocytes cultured on hydroxyapatite into Nagase analbuminemia rats. *J Biosci Bioeng* 2003;96(1):83-85.

Uchimura E, Machida H, Kotobuki N, Kihara T, Kitamura S, Ikeuchi M, et al. In-situ visualization and quantification of mineralization of cultured osteogenetic cells. *Calcif Tissue Int* 2003;73(6):575-83.

Ikeuchi M, Ito A, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Yonemasu K, et al. Osteogenic

differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. J Biomed Mater Res 2003;67A(4):1115-22.

Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, et al. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. Mat Sci Eng C-Bio S 2002;22(1):21-25.

Ikeuchi M, Dohi Y, Horiuchi K, Ohgushi H, Noshi T, Yoshikawa T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. J Biomed Mater Res 2002;60(1):61-9.

Akahane M, Ohgushi H, Kuriyama S, Akahane T, Takakura Y. Hydroxyapatite ceramics as a carrier of gene-transduced bone marrow cells. J Orthop Sci 2002;7(6):677-82.

著書 (分担)

Ohgushi H, Akahane M., Biochemical and biological analysis of bone viability., Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery (Eds. Tamai, S., Springer-Verlag Tokyo): 70-74; 2003.1

Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. Novartis Found Sympo.249: 118-27, discussion 127-32, 170-4, 239-41; 2003.4

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.9,2004; New Orleans, USA

Nishikawa M, Myoui A, Tamai N, Yoshikawa H, Ikeuchi M, Ohgushi H., Bone tissue engineering using novel interconnected hydroxyapatite ceramics loaded marrow mesenchymal cell., The 8th IUMRS-ICAM2003(The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), Oct.12, 2003, Yokohama

Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Goto S, Ohgushi H., Rat bone marrows cultured on transparent hydroxyapatite., The 8th IUMRS-ICAM2003(The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), Oct.12, 2003; Yokohama

Hirose M, Kotobuki N, Machida H, Kitamura S, Takakura Y, Ohgushi H., Bone formation by cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on bioceramics surfaces., The 8th IUMRS-ICAM2003(The 8th International Union of Materials Research Society, International Conference on Advanced Materials), Oct.12, 2003; Yokohama

Kotobuki N, Ioku K, Kawagoe D, Fujimori H, Goto S, Ohgushi H., *In vitro* osteogenic activity of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured on transparent hydroxyapatite ceramics., 16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Nov.7, 2003; Porto, Portugal

Hirose M, Kotobuki N, Machida H, Kitamura S, Takakura Y, Ohgushi H., Osteogenic potential of cryopreserved/thawed human bone marrow-derived mesenchymal stem cells., 16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Nov.7, 2003; Porto, Portugal

Tanaka Y, Ohgushi H, Kitamura S, Taniguchi A, Hayashi K, Isomoto S, Tohma Y, Takakura Y., Osteogenic activity of human marrow cells on alumina ceramics., 16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Nov.7, 2003; Porto, Portugal

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。