

図7. hMSC, HOS, OUMS-27におけるWnt-5A mRNA発現

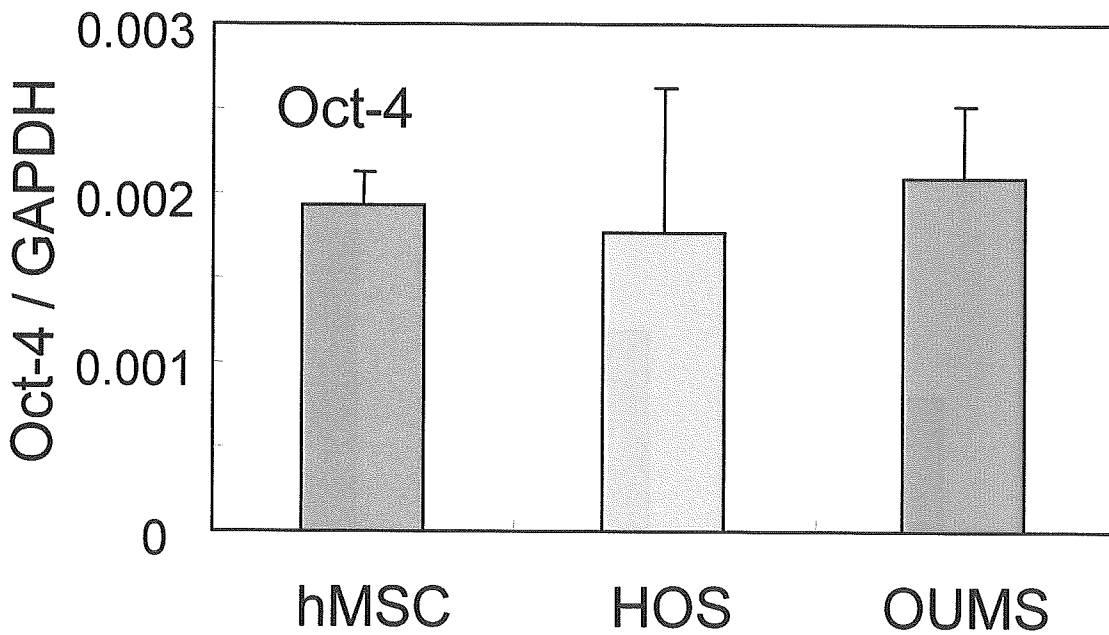


図8. hMSC, HOS, OUMS-27におけるOct-4 mRNA発現

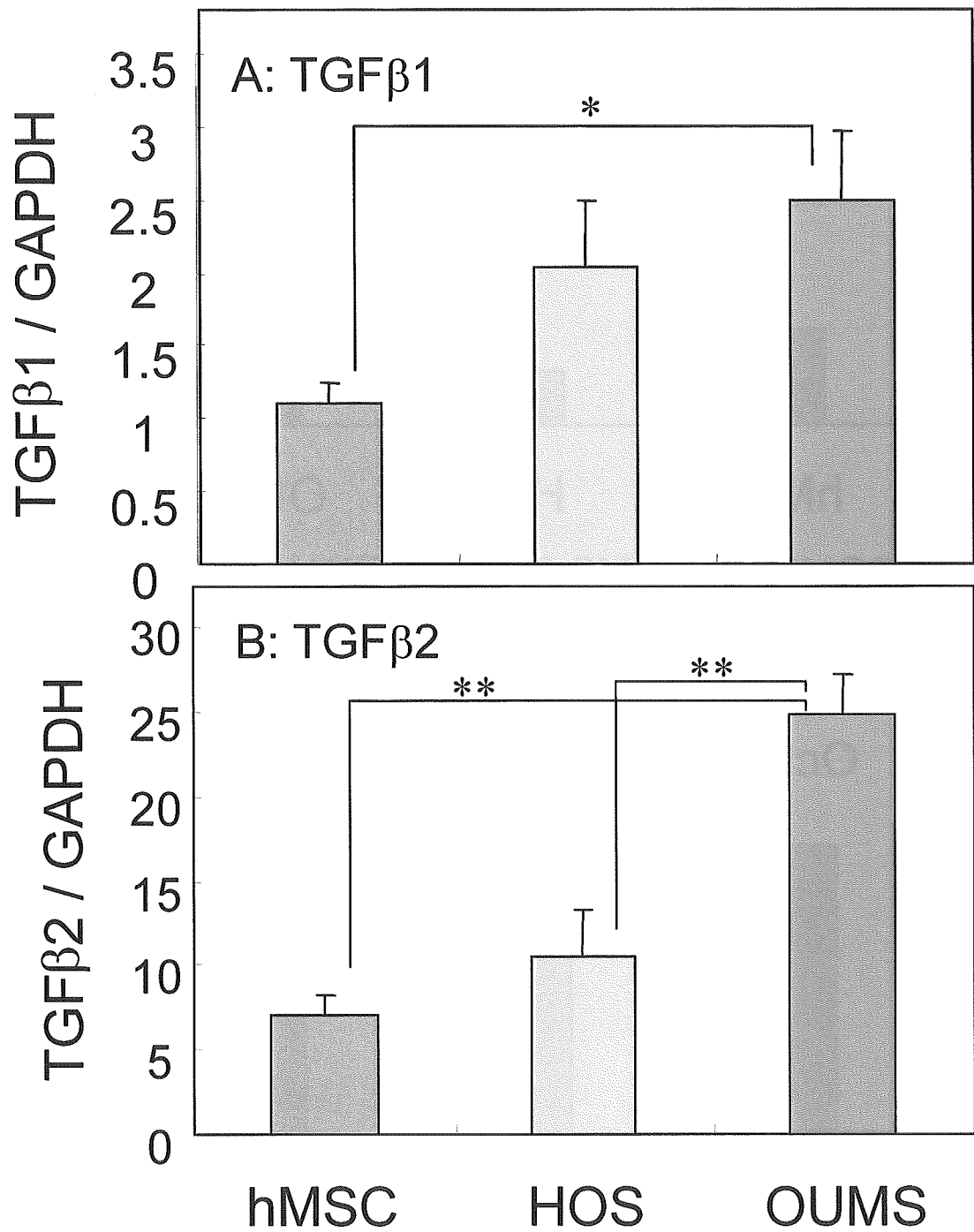


図9. hMSC, HOS, OUMS-27におけるTGFβ1(A)とTGFβ2(B)のmRNA発現

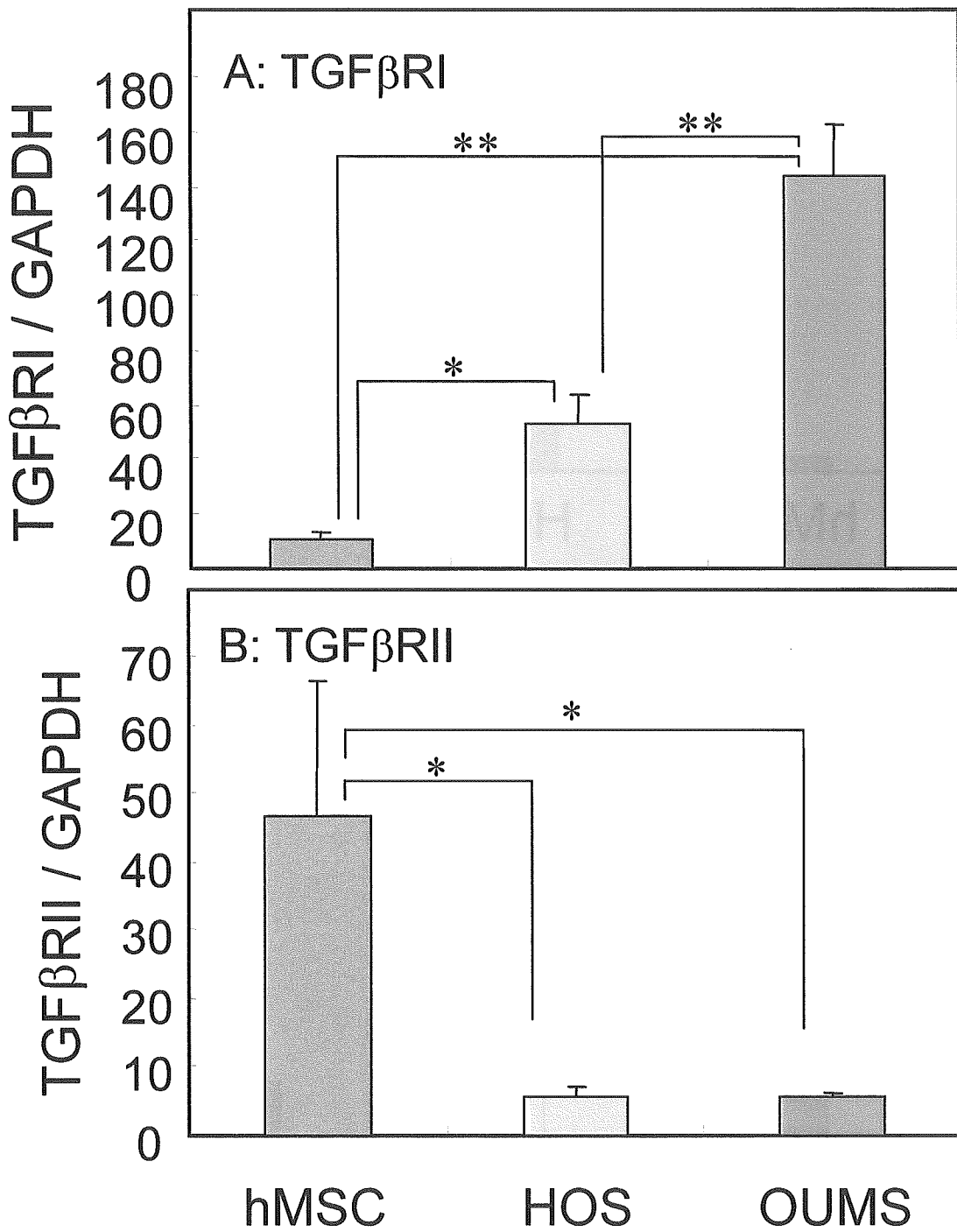


図10. hMSC, HOS, OUMS-27におけるTGFβRI(A) と TGFβRII(B)のmRNA発現

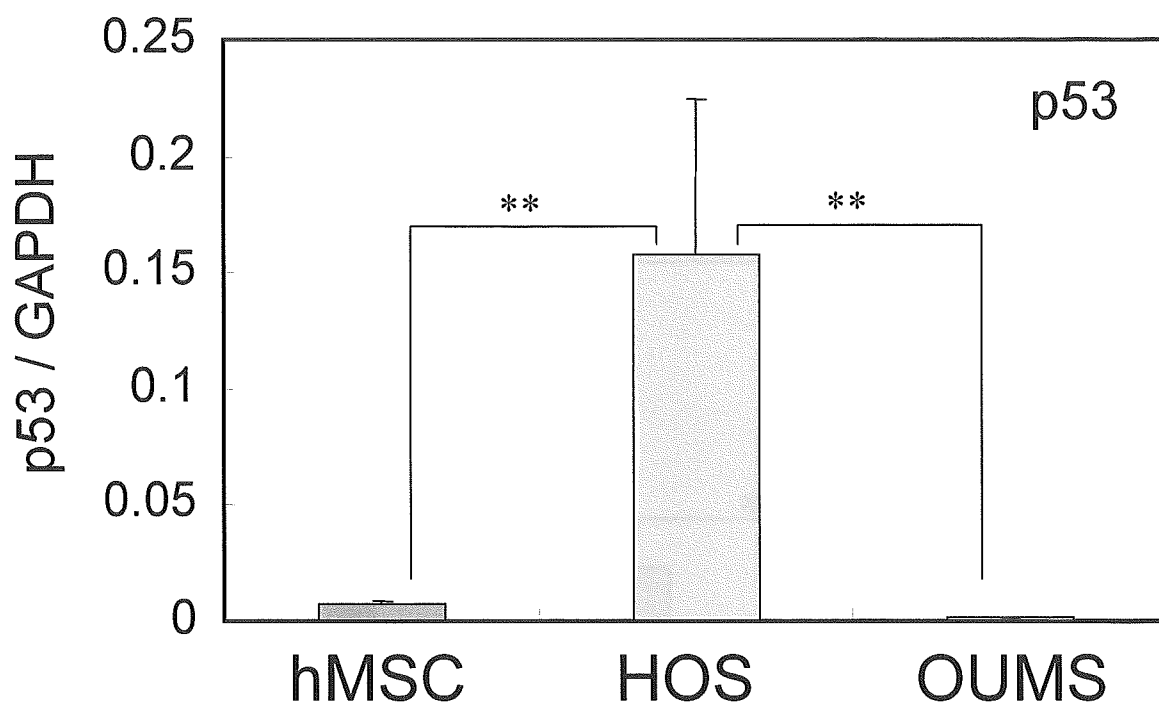


図11. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp53 mRNA発現

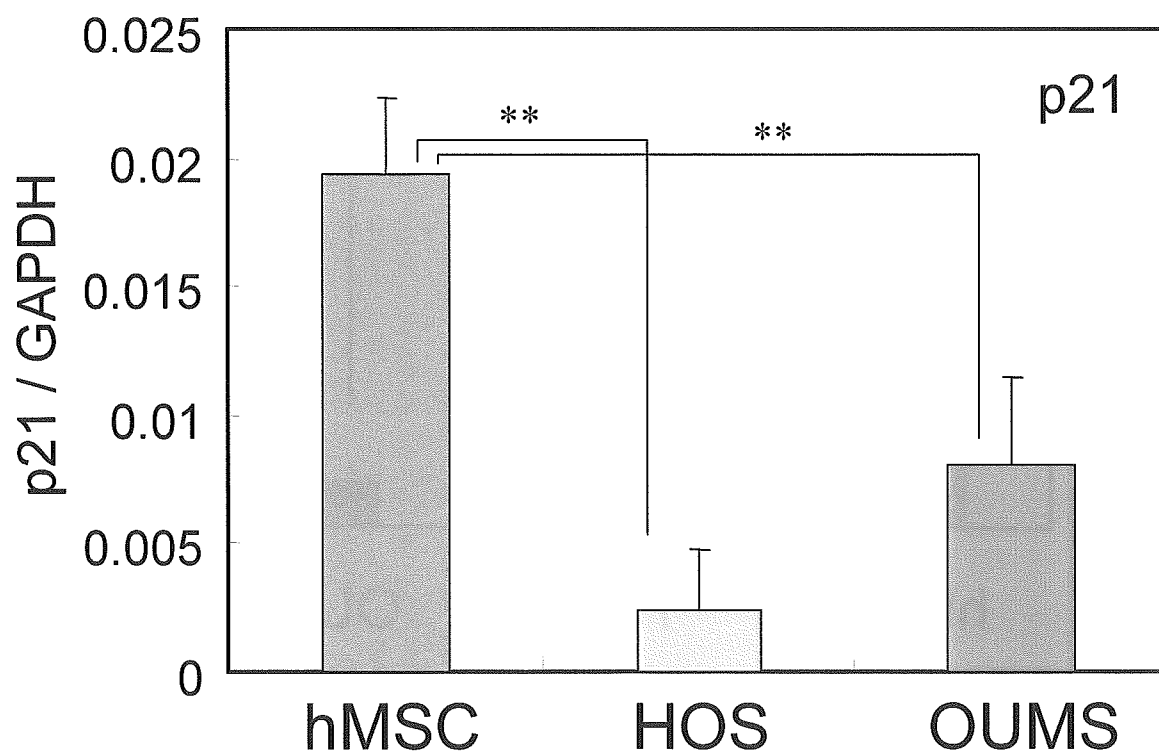


図12. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp21 mRNA発現

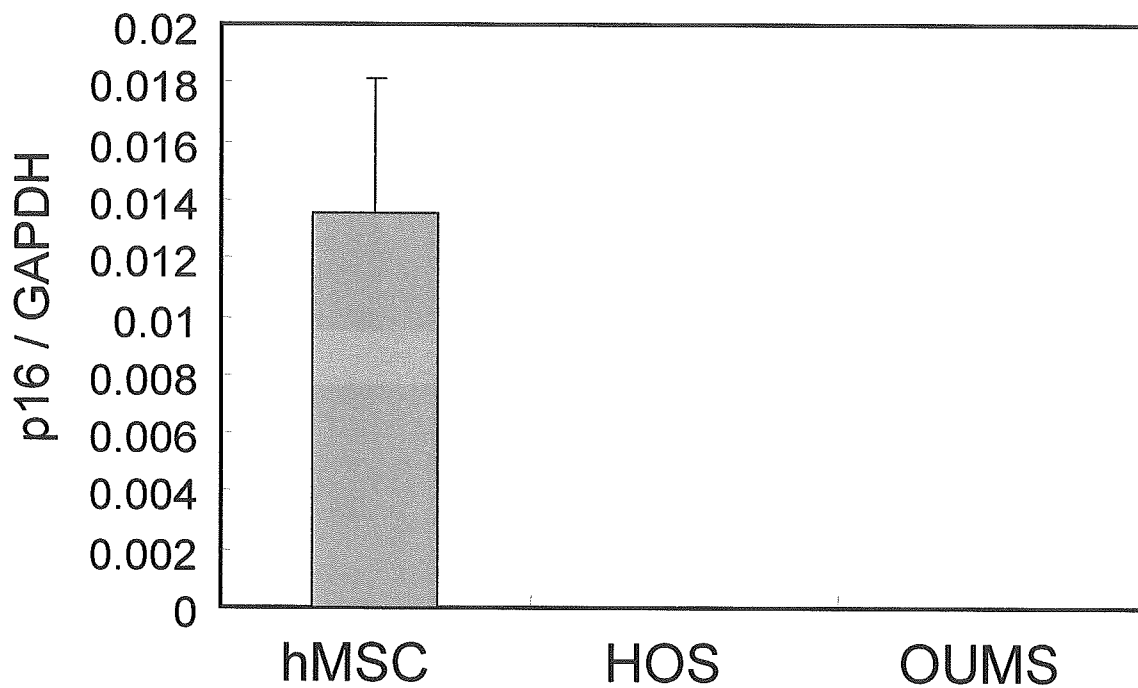


図13. hMSC, HOS, OUMS-27におけるp16 mRNA発現

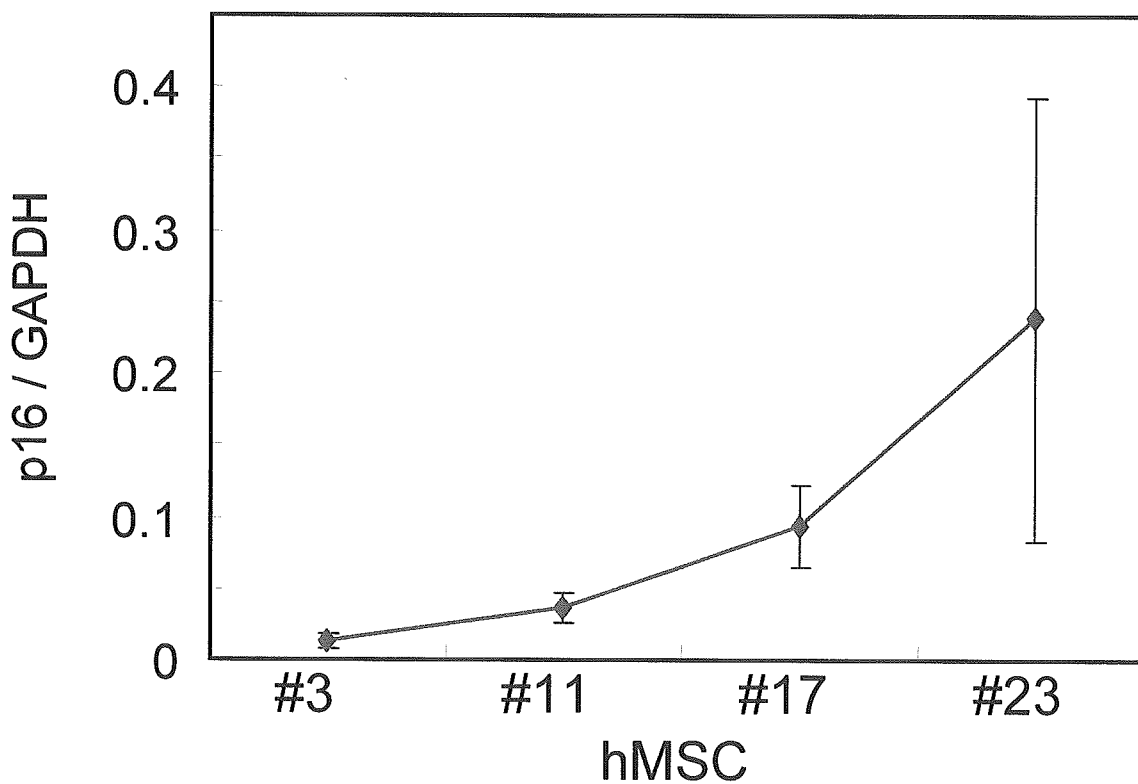


図14. hMSCのin vitro培養によるp16 mRNA発現レベルの変化

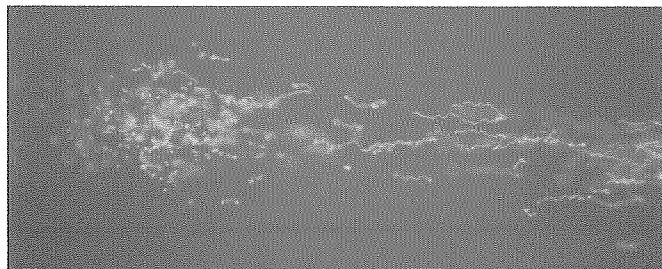
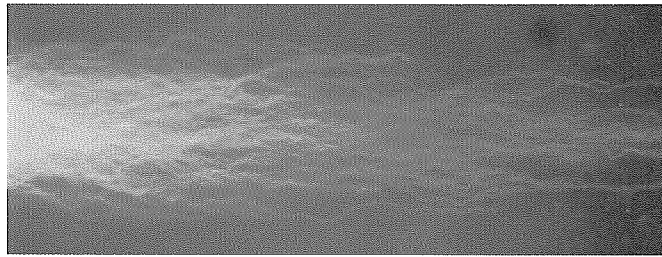


図15 SCPFGEにより展開したDNA fiberとその先に分離されたメガベースレベルのDNA断片

## II 分担研究報告

1. 幹細胞を用いた細胞組織医療機器の  
安全性評価に関する研究  
—ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について—

澤田 留美



幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究  
—ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について—

分担研究者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

骨髄由来の間葉系幹細胞は、幅広い医療分野での利用が期待されている。骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞組織医療機器の実現に向けての第一歩として、骨髄間葉系幹細胞の安全性評価が重要である。そこで本研究では、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の癌化の危険性について *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。まず、ヌードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ  $3 \times 10^6$  cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。さらに、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene 処理を施した hMSC についても同様の検討を行ったところ、hMSC を移植した場合と同様に、16 週間での腫瘍形成は認められなかった。以上の結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植しても、ただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS ; ヒト骨肉腫細胞、OUMS-27 ; ヒト軟骨肉腫細胞) におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討した。c-myc、Wnt-5A、Oct-4、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、p53、p21、p16 の 10 遺伝子について調べたところ、幹細胞と腫瘍細胞間で mRNA 発現に有意な差が見られた遺伝子は TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、p21、p16 であり、幹細胞の方が腫瘍細胞よりも発現レベルが高かったのは、TGF $\beta$ RII と p21、反対に低かったのは TGF $\beta$ RI であった。p16 は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認められなかった。さらに p16 は、hMSC の培養期間に依存してその発現レベルは上昇した。細胞周期制御因子である p16 が、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

A. 研究目的

幹細胞や人工素材を用いて、損傷を受けたり機能不全に陥ったりした細胞、組織、器官の再生または機能の回復を目指す「再生医療」が現在注目されている。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は全能性を持つが受精卵を用いることから倫理的問題が大きいのに対し、成体幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題がない。さらに実用的な面から、「再生医療」の研究分野の中で現在最も盛んに行われているのが「成体

骨髄に存在する幹細胞を用いて (移植して) 組織の機能を再生させる方法の開発」であろう。

骨髄には間葉系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞などが含まれている。中でも間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、筋肉へ分化可能な細胞として広く知られているが、さらに、神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚を越えた分化も報告されており、整形外科の分野のみならず動脈硬化症、心筋梗塞、肝硬変、糖尿病など

の治療への応用も期待されている。骨髄間葉系幹細胞は採取も比較的容易で *in vitro* での培養技術も確立されているため、細胞組織医療機器の材料として最も実用に近いものの一つであろう。しかしその反面、幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞であるため、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ともいえる。そのような背景の中、今年度に入って Rubio らにより脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞を長期間（4～5 ヶ月）*in vitro* で培養すると自然に形質転換（癌化）するという報告がなされた（*Cancer Res* 2005; 65(8): 3035-9）。このため、幹細胞を用いた細胞組織医療機器の実用化に向けて幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であると思われる。特に細胞組織医療機器に利用するために生体内から取り出し *in vitro* で培養した幹細胞の安全性についての検討は大変重要であろう。

そこで本研究では、今年度、幹細胞の癌化の危険性について *in vivo* と *in vitro* の両系で検討する事にした。まず、*in vivo* の系として、未分化の幹細胞を生体に移植した場合に癌化等の変化が起こるかどうかを調べるために、ヌードマウスの皮下にヒト骨髄由来の間葉系幹細胞（hMSC）を移植し、生体の環境下での腫瘍形成の有無について16週間観察した。さらに、*in vitro* の系で、細胞増殖という観点から幹細胞と腫瘍細胞の特性について調べ、癌化のキー遺伝子となりうる遺伝子の探索のために、それぞれの細胞におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討した。現在、幹細胞を用いた細胞

組織医療機器として、再生骨、再生軟骨をターゲットとした研究がさかんに行われており、その実用化が近いと考えられるため、本研究では、幹細胞と比較する腫瘍細胞として、ヒト骨肉腫由来細胞（HOS）とヒト軟骨肉腫細胞（OUMS-27）を選択した。本研究の最終目的としては、幹細胞におけるいくつかの（数個の）遺伝子発現について調べることで、その安全性（癌化の危険性）を評価できる系の確立を目指す。

## B. 研究方法

### 1. ヌードマウスへの間葉系幹細胞移植試験について

#### 1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞：hMSC（Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.）は Mesenchymal Stem Cell Growth Medium（MSCGM）に Mesenchymal Cell Growth Supplement（MCGS）を加えた培地で培養した。hMSC は購入後17日間培養し増殖させた後ヌードマウスへの移植に用いた。また移植直前の3日間、一部の細胞を、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene（MC）を 0.1  $\mu\text{g/mL}$  添加した培地で培養した。

ヒト子宮頸癌由来細胞：HeLa S3（JCRB Cell Bank）は Ham's F-12 Nutrient Mixture に 10% fetal bovine serum（FBS）を加えた培地で培養した。

#### 2) ヌードマウスへの細胞移植

##### 2)-1. 動物

日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c AnNCrj-nu ヌードマウス（雄性）4週齢のものを24匹用いた。

## 2)-2. *in vivo*における細胞移植試験

ヌードマウスを1週間予備飼育後、以下の4群に分け、マウスの背部皮下に細胞 ( $3 \times 10^6$  cells / mouse) を移植し、移植部位の腫瘍形成について16週間観察した。a) Control群: PBSのみ皮下注射、b) hMSC群: hMSCを移植、c) hMSC (MC)群: hMSCの培地中に移植3日前より3-methylcholanthrene (MC) を添加した細胞を移植、d) HeLa S3群: ポジティブコントロールとしてヒト子宮頸癌由来のHeLa S3細胞を移植。hMSCは購入後約2週間の*in vitro*培養後に実験に供した。

## 2. 幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) との遺伝子発現の比較

### 1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞: hMSC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) は Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地で培養した。

ヒト骨肉腫細胞: HOS (大日本住友製薬(株)) は minimum essential medium (MEM; Eagle) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10%FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

ヒト軟骨肉腫細胞: OUMS-27 (JCRB Cell Bank) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日水製薬(株)) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10% FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

### 2) Total RNA の調製

hMSC、HOS、OUMS-27 から ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を調製した。

### 3) Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total 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、Wnt-5A、Oct-4、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII、p53、p21、p16 の mRNA 発現量について Real time (RT) -PCR 法にて検討した。

c-myc、Wnt-5A、Oct-4、p21、p16 の mRNA 発現を測定するための 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。c-myc、Wnt-5A、Oct-4 の PCR 反応は、95°Cで5秒、それぞれのアニーリング温度で10秒、72°Cで12秒を40サイクル行った。p21のPCR反応は、95°Cで10秒、60°Cで10秒、72°Cで10秒を40サイクル行った。p16のPCR反応は、95°Cで10秒、60°Cで10秒、72°Cで6秒を40サイクル行った。一方、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2、TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII の mRNA 発現の検討のためのPCR反応はそれぞれライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて、PCR条件もこのキットのプロトコールに従って行った。

Wnt-5A、Oct-4 の PCR 反応は、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用い、それ以外のものの 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。

## C. 研究結果

### 1. ノードマウスへの間葉系幹細胞移植試験について

マウスの成長に対して、hMSC, HeLa S3 の移植による影響は見られなかった (図1)。マウスの背部皮下にそれぞれの細胞 ( $3 \times 10^6$  cells / mouse) を移植して1週間後に、HeLa S3 群では全てのノードマウス (6/6) に腫瘍形成が認められたが、hMSC 群またはhMSC (MC) 群では腫瘍形成は認められなかった。(図2)

さらに 16 週間後でも hMSC 群、hMSC (MC) 群両群とも腫瘍形成は観察されなかった (図 3、表 2)。

### 2. 幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) との遺伝子発現の比較

c-myc の mRNA 発現については、骨肉腫由来細胞である HOS での発現が、幹細胞である hMSC と軟骨肉腫由来細胞である OUMS-27 に比べて有意に低かった (図 4)。Wnt-5A は OUMS-27 での発現が、hMSC、HOS に比べて有意に高かった (図 5)。Oct-4 は、3 細胞間でその mRNA 発現に有意な差は認められなかった (図 6)。TGF $\beta$ 1 は、OUMS-27 での発現が、hMSC に比べて有意に高かったが、HOS と hMSC 間では有意な差はなかった (図 7A)。TGF $\beta$ 2 は、OUMS-27 での発現が、hMSC、HOS に比べて有意に高かった (図 7B)。TGF $\beta$ RI は、その mRNA 発現が OUMS-27 >HOS > hMSC の順で有意に高かった (図 8A)。TGF $\beta$ RII は、hMSC での発現が、HOS、OUMS-27 に比べて有意に高かった (図 8B)。p53 は、HOS での発現が、hMSC、OUMS-27 に比べて有意に高かった (図 9)。p21 は、hMSC

での発現が、HOS、OUMS-27 に比べて有意に高かった (図 10)。p16 は、hMSC ではその mRNA 発現が認められたが、HOS、OUMS-27 では発現が認められなかった (図 11)。さらに、hMSC の培養期間による p16 の mRNA 発現の変化について検討したところ、培養期間に依存してその発現は有意に上昇した (図 12)。

## D. 考察

幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発を目指し、現在多くの研究が行われている。骨髄由来の間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉への分化能を持つだけでなく、神経細胞や肝細胞、心筋などへの分化も示唆されており、幅広い医療現場での利用が期待されている。骨髄間葉系幹細胞はその取り扱いが比較的容易で、*in vitro* での培養方法も確立されていることから、最も実用化に近い細胞組織医療機器の材料の 1 つであろう。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。そのような背景の中、2005 年の Rubio らの報告 (Cancer Res 2005; 65(8): 3035-9) は、幹細胞の癌化という可能性を否定できないものであった。このため、本研究では、今年度は幹細胞の癌化の危険性についてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。

まず、ノードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ  $3 \times 10^6$  cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。今回、発癌イニシエーターである

3-methylcholanthrene 処理を施した hMSC についても同様の検討を行った。3-methylcholanthrene は、マウスの BALB/c 3T3 細胞を用いた *in vitro* の発癌試験であるトランスフォーメーション試験のポジティブコントロールとして用いられる発癌イニシエーターであり、イニシエーションの方法もこのトランスフォーメーション試験に準じて行った。この発癌のイニシエーションを施した細胞を用いた hMSC (MC) 群も hMSC を移植した群と同様に、16 週間で腫瘍形成は認められなかった。以上の結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植しても、ただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。

さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞と腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討し、両者の違いを示す遺伝子の探索を試みた。幹細胞と比較する腫瘍細胞としては、ヒト骨肉腫由来細胞 (HOS) とヒト軟骨肉腫細胞 (OUMS-27) を選択した。なぜならば、幹細胞を用いた細胞組織医療機器として、再生骨、再生軟骨をめざした研究が現在盛んに行われており、その実用化が近いと考えられるため、本研究では比較対象とした。

まず、癌化と細胞増殖という観点から、細胞増殖に関わり、癌遺伝子でもある *c-myc*、逆に癌抑制遺伝子であり種々のシグナル伝達系にも関わる *Wnt-5A* の mRNA 発現について検討したところ、3 細胞間での発現レベルの差はあるものの、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) との間での差は認められな

った (図 4, 5)。さらに、幹細胞の未分化マーカーとなるのではないかと考えられ、癌細胞でもその発現が確認されている *Oct-4* についても検討したところ、3 細胞間でその発現に有意な差は認められなかった (図 6)。以上の 3 遺伝子に関する検討からは、幹細胞と腫瘍細胞との間での違いは示されなかった。

そこで次に、細胞周期の制御に関わる遺伝子についての検討を行った。まず、*TGFβ1,2* について比較したところ、どちらも個々の細胞間での発現レベルの差はあるが、幹細胞と腫瘍細胞間での違いは認められなかった (図 7A,B)。*TGFβ* のレセプターについては、*TGFβRI* は幹細胞 (hMSC) に比べて腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) の方がその mRNA 発現レベルは有意に高かった (図 8A)。反対に *TGFβRII* は幹細胞に比べて腫瘍細胞の方が有意に発現レベルは低かった (図 8B)。次に、細胞周期の制御やアポトーシスなどに関与し癌抑制遺伝子として知られる *p53* については、HOS が他の 2 細胞に比べて有意に発現レベルが高く、幹細胞と腫瘍細胞間での違いは見られなかった (図 9)。*p53* に誘導され細胞周期制御因子の一つである *p21* については、幹細胞 (hMSC) の方が腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) に比べて有意に発現レベルが高かった (図 10)。さらに、細胞周期制御因子であり細胞老化に関わる *p16* については、幹細胞 (hMSC) では発現していたが、腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27) では発現が認められなかった (図 11)。この様に、*p16* は幹細胞と腫瘍細胞とで発現の有無という大きな違いが示された。幹細

胞は、細胞組織医療機器の材料として利用する場合、生体外で *in vitro* での培養過程を経なければならぬため、次に、培養期間による p16 の発現レベルの変化について調べた。hMSC は、培養期間が長くなると徐々にその増殖能が低下していく事を我々はこれまでに確認している。増殖が盛んな継代数 3 代目 (#3) のものからほとんど増殖が停止した 23 代目 (#23) までについて hMSC の p16 の発現レベルの変化を調べたところ、培養期間に依存してその発現レベルは上昇した (図 12)。このことから、hMSC における p16 の mRNA 発現レベルの上昇は、細胞増殖能の低下を示す一つの指標となりうる事が示唆された。さらに、細胞の無限増殖能を持つ腫瘍細胞では p16 の発現が認められないことから、細胞周期制御因子である p16 が、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

幹細胞と腫瘍細胞の遺伝子発現を比較した以上の結果をまとめると、幹細胞と腫瘍細胞間で mRNA 発現に有意な差が見られた遺伝子は TGFβRI, TGFβRII, p21, p16 であり、幹細胞の方が腫瘍細胞よりも発現レベルが高かったのは、TGFβRII と p21、反対に低かったのは TGFβRI であった。p16 は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認められなかった。このことから、幹細胞の癌化の危険性を簡便に評価するための指標の候補として p16 が挙げられるであろう。

## E. 結論

本研究では、幹細胞の癌化の危険性についてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。

まず、ヌードマウスを用いた細胞移植試験では hMSC をマウスの背部皮下へ  $3 \times 10^6$  cells / mouse 移植し 16 週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。さらに、発癌イニシエーターである 3-methylcholanthrene 処理を施した hMSC についても同様の検討を行ったところ、hMSC を移植した場合と同様に、16 週間での腫瘍形成は認められなかった。以上の結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植しても、ただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。

さらに、幹細胞の癌化の危険性について、*in vitro* の系で簡便に調べる方法を探るために、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS ; ヒト骨肉腫細胞、OUMS-27 ; ヒト軟骨肉腫細胞) におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討し、両者の違いを示す遺伝子の探索を試みた。今回調べた遺伝子は、c-myc、Wnt-5A、Oct-4、TGFβ1、TGFβ2、TGFβRI、TGFβRII、p53、p21、p16 の 10 遺伝子。c-myc、Wnt-5A、TGFβ1、TGFβ2、p53 は、3 細胞間での発現レベルの差はあるものの、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS、OUMS-27) との間での差は認められなかった。Oct-4 は、3 細胞間でその発現に有意な差は認められなかった。幹細胞と腫瘍細胞間で mRNA 発現に有意な差が見られた遺伝子は TGFβ のレセプターである TGFβRI、TGFβRII と p53 に誘導され細胞周期制御因子の一つである p21、細

胞周期制御因子であり細胞老化に関わる p16 であり、幹細胞の方が腫瘍細胞よりも発現レベルが高かったのは、TGFβRII と p21、反対に低かったのは TGFβRI であった。p16 は、幹細胞でのみその発現が認められ、腫瘍細胞では発現が認められなかった。さらに p16 は、hMSC の培養期間に依存してその発現レベルは上昇した。hMSC は、培養期間が長くなると徐々にその増殖能が低下するため、hMSC における p16 の mRNA 発現レベルの上昇は、細胞増殖能の低下を示す一つの指標となりうる事が示唆された。さらに、細胞の無限増殖能を持つ腫瘍細胞では p16 の発現が認められないことから、細胞周期制御因子である p16 が、細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) R. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells", *Animal cell technology*, in press
- 2) N. Bauu, T. Tsuchiya, and R. Sawada "Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes, *J. Biomed.*

*Mater. Res*, in press

### 2. 学会発表

- 1) 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化におけるFGF-2のTGF-β発現への影響」第8回日本組織工学会 (2005. 9)
- 2) 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の安全性評価に関する研究」第42回幹細胞研究会 (2005. 11)
- 3) 伊藤友実、澤田留美、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞の細胞老化に関する研究—FGF-2による増殖能上昇機構の解明—」第27回日本バイオマテリアル学会 (2005. 11)
- 4) 澤田留美、土屋利江「医療機器に併用される抗血栓薬の適合性評価手法の開発—ワーファリンの薬効関連遺伝子に関するSNP解析—」第43回日本人工臓器学会 (2005. 12)
- 5) 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、脊山洋右、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞におけるTGF-βの関与する増殖機構に関する研究」第5回日本再生医療学会 (2006. 3)
- 6) 澤田留美、伊藤友実、土屋利江「細胞組織医療機器に利用される幹細胞の品質及び安全性評価」日本薬学会第126年会 (2006. 3)

協力研究者

- 伊藤 友実 (国立医薬品食品衛生研究所)  
 松岡 厚子 (国立医薬品食品衛生研究所)  
 松田 良枝 (国立医薬品食品衛生研究所)

表1. リアルタイム(RT)-PCRに用いたプライマーの配列とアニーリング温度

Gene name	Primer orientation	Nucleotide sequence	Annealing Temp (°C)
c-myc	Forward	5'- GCG AAC ACA CAA CGT C -3'	50
	Reverse	5'- CAA GTT CAT AGG TGA TTG CT -3'	
Wnt-5A	Forward	5'- TTCACAGGTTCTCAGCCCAAG -3'	65
	Reverse	5'- ATCACATCACAACACGGAGGAAT -3'	
Oct-4	Forward	5'- CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A -3'	65
	Reverse	5'- CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA -3'	
p21	Forward	5'- TTG ATT AGC AGC GGA ACA -3'	60
	Reverse	5'- GGA GAA ACG GGA ACC AG -3'	
p16	Forward	5'- CAC TCA CGC CCT AAG C -3'	60
	Reverse	5'- GCA GTG TGA CTC AAG AGA A -3'	

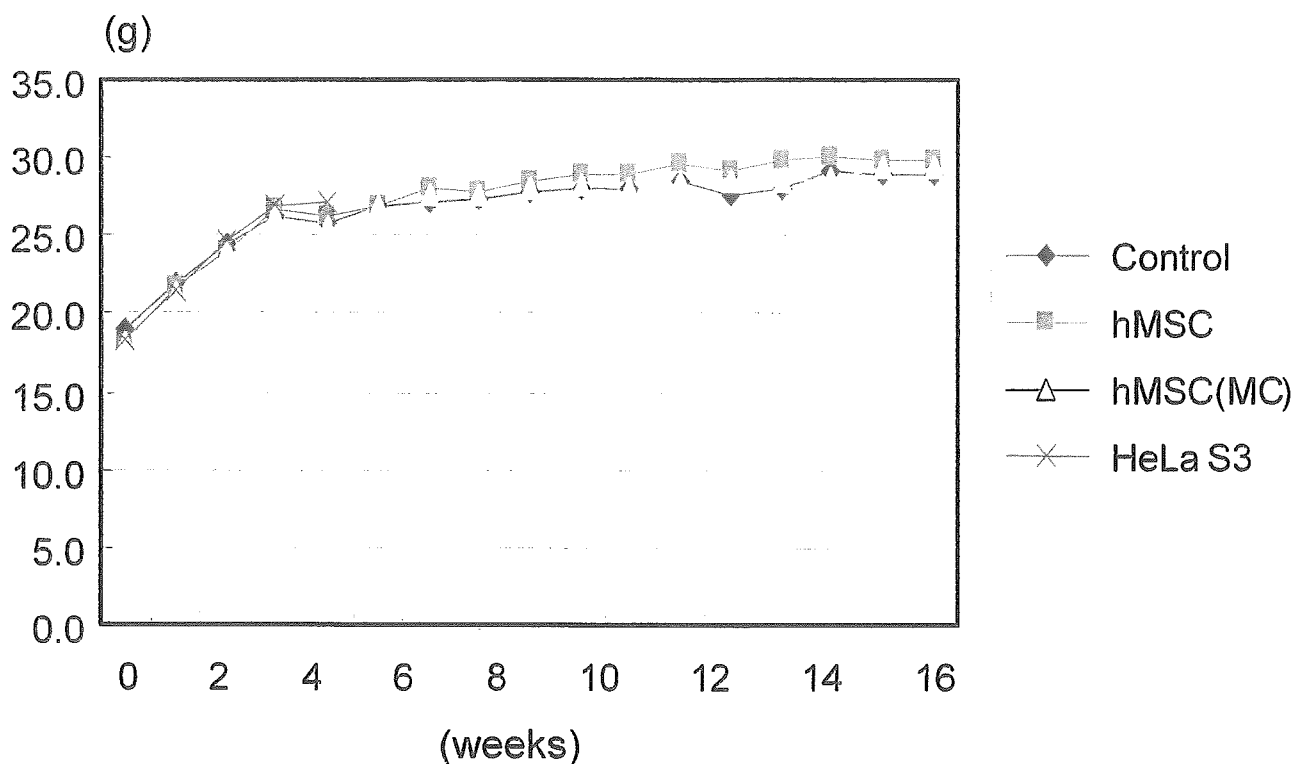
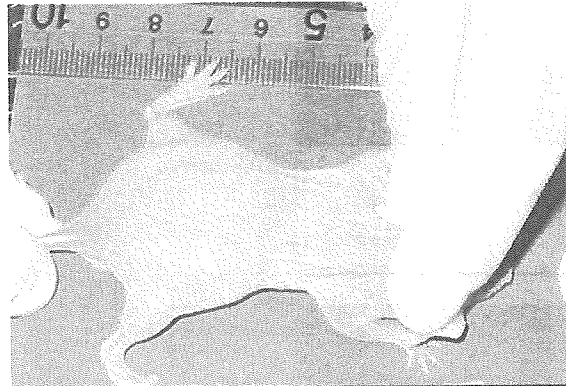
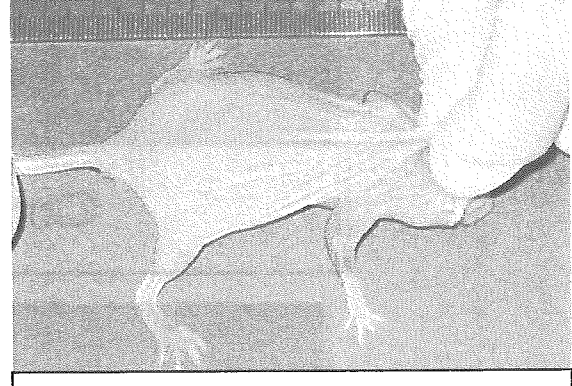


図1. ノードマウスの体重変化

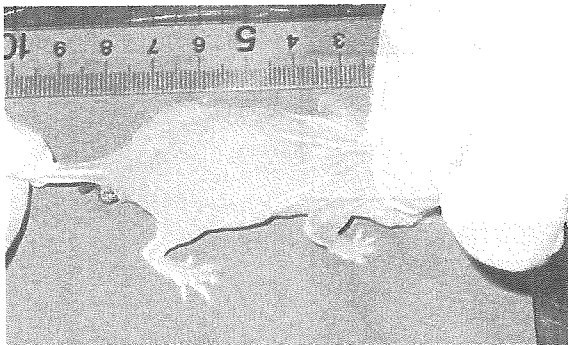




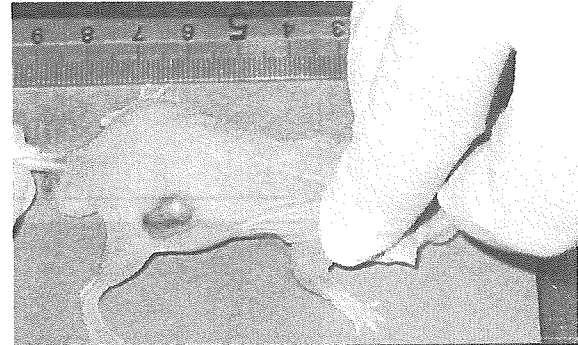
Control



hMSC

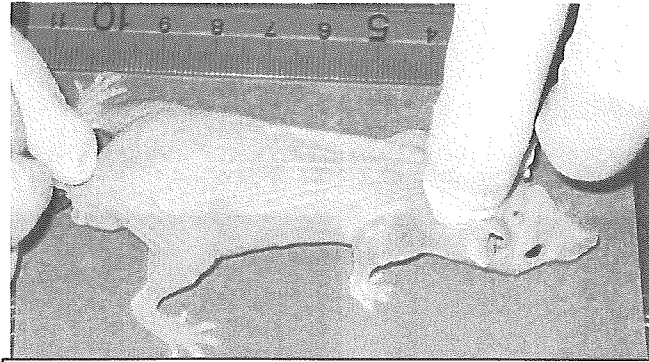


hMSC(MC)



HeLa S3

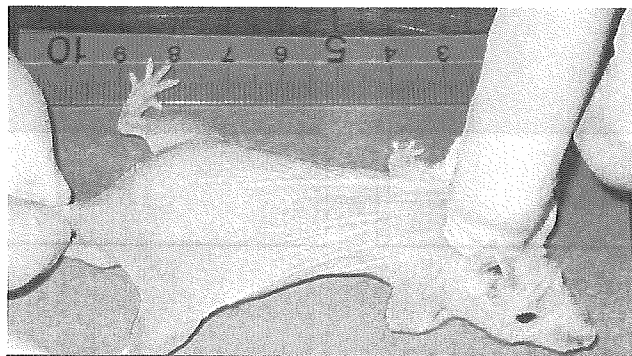
図2. 細胞移植1週間後のヌードマウスの様子



Control



hMSC



hMSC(MC)

図3. 細胞移植16週間後のヌードマウスの様子

表2. ノードマウスにおける腫瘍形成

groups	1W	4W	16W
Control	0/6	0/6	0/6
hMSC	0/5	0/5	0/5
hMSC(MC)	0/5	0/5	0/5
HeLa S3	6/6	6/6	

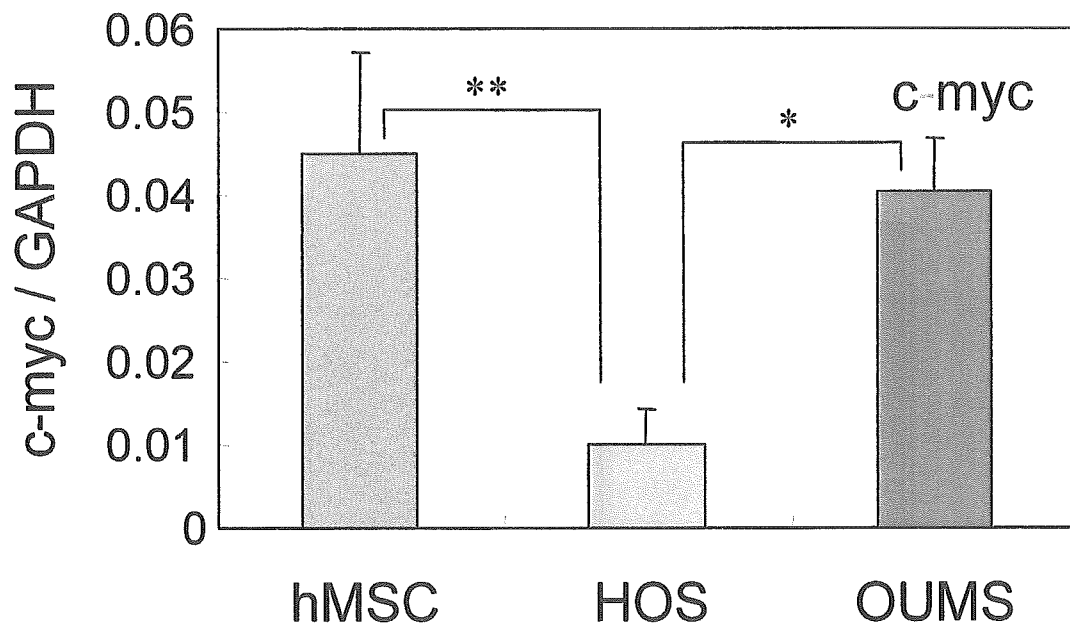


図4. hMSC, HOS, OUMS-27におけるc-myc mRNA発現

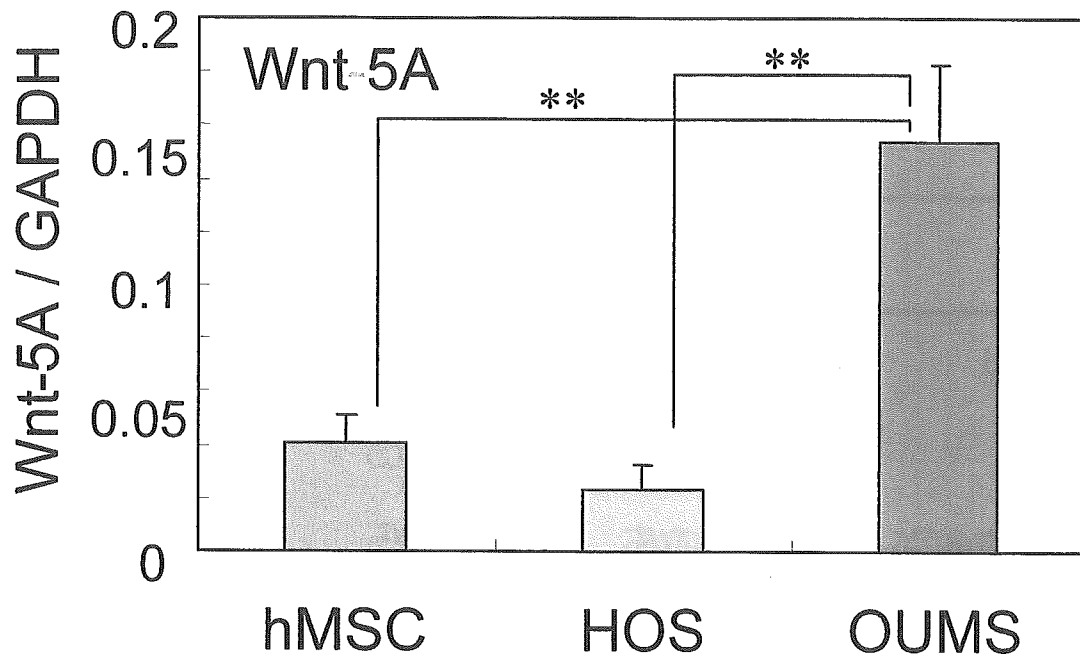


図5. hMSC, HOS, OUMS-27におけるWnt-5A mRNA発現

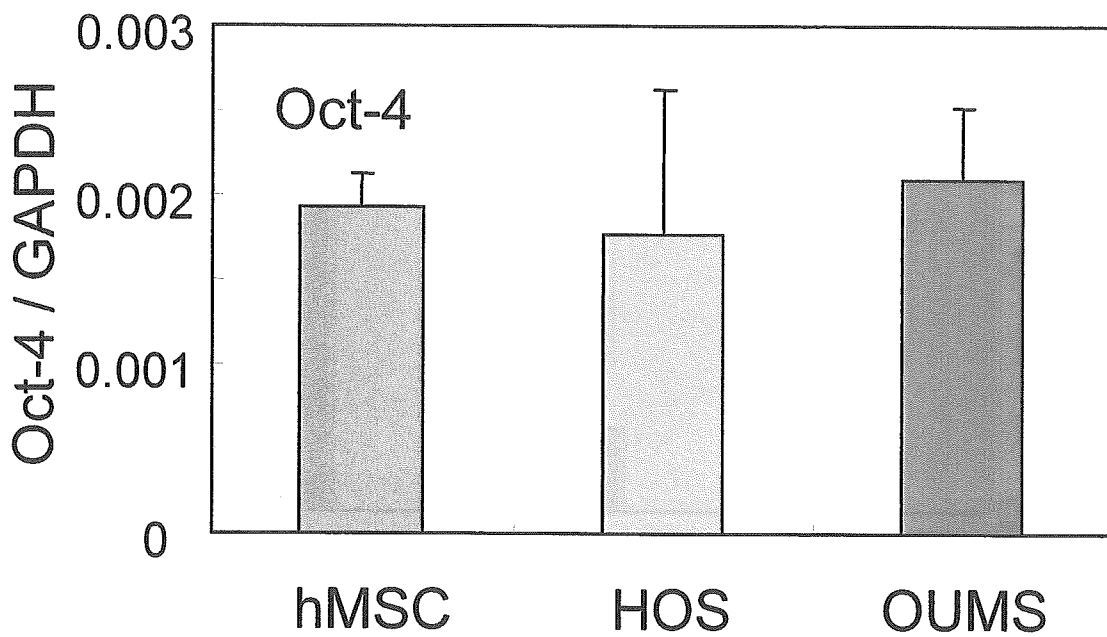


図6. hMSC, HOS, OUMS-27におけるOct-4 mRNA発現