

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究

分担研究者 加藤幸夫 広島大学医歯薬学総合研究科教授

研究要旨：間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

A. 研究目的

間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、神経へと分化させることができ、成人患者からも分離できる。しかし臨床効果を保証するには、移植用の培養細胞が幹細胞としての同一性(均質性)と安全性を保持していることを検定する必要がある。そこで本研究では、再生能力が高くかつ均質な幹細胞を容易に安全に供給するためのプロトコルを3年間で確立し、さらにそれらに科学的根拠を与える。この研究は、将来的に我が国での再生医療の普及と発展に貢献することは確実である。

B. 研究方法

腸骨および歯槽骨からヒト間葉系幹細胞を分離して、FGF-2存在下で数代にわたって培養してRNAを抽出した。均質性を検討するためには、ヒト間葉系幹細胞の母集団から10-20個のクローンを分離してRNAを抽出した。さらに繊維芽細胞からもRNAを抽出した。これらのRNAをDNAマイクロアレイにて解析して、マーカー遺伝子を同定した。またマーカー遺伝子の発現レベルを定量的PCRで確認した。

C. 研究結果

幹細胞の均質性(同一性)を確保する培養方法をすでに開発した。また歯周病への自家間葉系幹細胞移植の有効性を実験的に明らかにして報告し、広島大学病院での臨床研究を開始した。さらに、幹細胞のマーカー遺伝子および蛋白を同定して報告した(Ishii et al., BBRC 2005)(2種類の特許)。マーカー遺伝子については、骨の種類に関わらず、骨髄由来間葉系幹細胞に共通なマーカー遺伝子を多数同定した。

D. 考察

移植用の細胞の均質性と同一性が簡単なテストで検定できるようになったので、科学的な根拠に準拠して細胞治療の治療効果を評価できるようになった。また腸骨および歯槽骨から分離したヒト間葉系幹細胞のマーカー遺伝子

について多くが共通していたものの20%-30%は共通していなかったことは、神経冠由来および中胚葉由来のヒト間葉系幹細胞の性質が異なることを示唆している。

E. 結論

間葉系幹細胞のマーカーが移植用細胞としての品質検査に役立つことが判明した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara,T., Suardita K., Ishii,M., Igarashi,A., Oda,R., Nishimura,M., Saito,M., Nakagawa,K., Yamanaka,K., Miyazaki,K., Shimizu,M., Tsuji,K., Nakamura,K., Kato,Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(3),399-409,2005.
2. Ishii,M., Koike,C., Igarashia,,A., Yamanaka,K., Pan,H., Higashi,Y., Kawaguchi,H., Sugiyama,M., Kamata,N., Iwata,T., Matsubara,T., Nakamura,K., Kurihara, H., Tsuji,K., and Kato,Y. Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 332(1),297-303,2005.

2. 学会発表

1. 五十嵐晃、河本健、栗原英見、河口浩之、東幸仁、鎌田伸之、杉山勝、邵金昌、辻紘一郎、加藤幸夫
再生医療における移植用間葉系幹細胞の検定の重要性と検定方法の検討
第4回日本再生医療学会総会 2005年3

月 1-2 日 吹田市

2. 山中克之、五十嵐晃、坂井将典、吉松真一郎、栗原英見、河口浩之、東幸仁、杉山勝、辻紘一郎、加藤幸夫
下顎骨からヒト間葉系幹細胞を採取・増幅するための骨髓液の質の評価方法
第4回日本再生医療学会総会 2005年3月1-2日 吹田市
3. 原真依子、瀬越和美、邵金昌、五十嵐晃、石井正和、辻紘一郎、加藤幸夫
ヒト間葉系幹細胞の特徴：未分化状態での骨、軟骨、脂肪関連遺伝子の発現及びVD3に対する応答性
第4回日本再生医療学会総会 2005年3月1-2日 吹田市 (ポスター発表)
4. 山中克之、山本克史、坂井裕大、金子正、辻紘一郎、加藤幸夫
間葉系幹細胞の増幅・分化に適した生分解性 Scaffold (ポリ乳酸系) の表面構造
第4回日本再生医療学会総会 2005年3月1-2日 吹田市 (ポスター発表)
5. 清水正和、河本健、五十嵐晃、阪恵美、山中克之、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫
間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析 I
第15回中国・四国骨代謝研究会 2005年7月9日 岡山市
6. 阪恵美、河本健、清水正和、五十嵐晃、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫
間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析 II
第15回中国・四国骨代謝研究会 2005年7月9日 岡山市

招待講演

1. 加藤幸夫
骨髓間葉系幹細胞の不均質性／均質性および遺伝子発現パターン
2. Y. Kato
Characterization of bone marrow mesenchymal stem cells using DNA microarrays: Application to regenerative medicine
The 4th Scientific Meeting in Dentistry 2005年8月12日 Surabaya, Indonesia
3. 加藤幸夫

間葉系幹細胞による再生医療：幹細胞としての特異的遺伝子発現と臨床応用

- 第7回鹿児島骨代謝研究会 2005年9月6日 鹿児島市
 4. 加藤幸夫、五十嵐晃、河本健、清水正和、Pan Haiou、阪恵美、金輪真佐美、辻紘一郎
ヒト腸骨、顎骨／歯槽骨、大腿骨由来の間葉系幹細胞の遺伝子発現パターンの特徴
口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム 2005年9月17-20日 岡山市
 5. 加藤幸夫
ヒト間葉系幹細胞のマーカー遺伝子を用いた品質検定
ナショナルバイオリソースプロジェクト「細胞」シンポジウム 2005年9月29日 東京都
 6. 加藤幸夫
間葉系幹細胞の分子マーカー、軟骨分化に伴う遺伝子発現の変化および軟骨概日リズム遺伝子の同定
第14回長崎骨粗鬆症研究会 2005年10月4日 長崎市
 7. 加藤幸夫
間葉系幹細胞：移植用細胞としての現実と幹細胞としての本質
第4回再生歯科シンポジウム 2005年11月20日 東京都
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許出願
 1. 加藤幸夫、河本健、辻紘一郎、五十嵐晃、清水正和：分子マーカーを用いた間葉系幹細胞の識別方法及びその利用
(出願番号：特願 2005-104563 号、2005)
(出願人：科学技術振興機構、広島大学、(株) ツーセル)
出願日：平成 17 年 3 月 31 日
 2. 二川浩樹、西村正宏、加藤幸夫、辻紘一郎：動物幹細胞培養用無血清培地
(出願番号：特願 2005-223242 号、2005)
(出願人：(株) ツーセル、二川浩樹、加藤幸夫)
出願日：平成 17 年 8 月 1 日

4. 幹細胞の安全性に関する研究
(免疫反応、感染リスク、癌化リスク、培地の有害作用)

辻 紘一郎

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究

分担研究者 辻 紘一郎 (株)ツーセル/広島大学

研究要旨：幹細胞の安全性に関する研究
(免疫反応、感染リスク、癌化リスク、培地の有害作用)

A. 研究目的

間葉系幹細胞を用いる再生医療では、間葉系幹細胞製品の安全性を評価する標準的な方法が求められている。そこで、本研究では、再生医療に用いる間葉系幹細胞の安全性を評価するために、基本的考え方、指針の要件を参考にして、また臨床研究や臨床治験に則するような時間的要件と培養方法を考慮して、標準安全性検査の手順と方法を提案する。

B. 研究方法

広島大学病院で行われている臨床研究〈歯周病への自家間葉系幹細胞移植〉において、安全性を評価するための手順を決定し、この手順に従って、細菌、ウィルス、マイコプラズマ、エンドトキシンの検査を実施した。

(倫理面への配慮)

提供者に対するインフォームドコンセント、安全性検査結果の開示を行っている。試験情報の個人情報保護のために、試験データ管理を周知徹底している。試料等の取扱いについては提供者の同意を得た範囲で行っている。

C. 研究結果

骨髓採取を行った9症例の間葉系幹細胞の安全性を評価した。歯周病への自家間葉系幹細胞移植における①登録前(血液)検査、②自己血清検査、③培養液検査、④培養細胞検査の結果は、10人の患者さんのうち1人の培養液検査でエンドトキシン値が高値(520000 EU/L)に検出された。しかし、同一試料の細菌検査結果は陰性であった。ウィルス検査に関して、登録前(血液)検査と培養細胞検査でウィルスは検出されなかった。

D. 考察

検査手順において、時間的要件と検査試料量を考慮し、移植前に評価できる方法と移植後に評価する方法の組み合わせを決定した。エンドトキシン検査は、バリデーションをとることが必要と考えられた。培養液と培養細胞の検査は、移植前後のそれぞれに評価できる検査方法と検査回数を選択することがより良いと考えられた。

E. 結論

自家間葉系幹細胞移植に際して、術前から術後までの各検査の時期と方法を検討し、病原体の否定試験等の手順を決定し、提案した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara, T., Suardita K., Ishii, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Tsuji, K., Nakamura, K., Kato, Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(3), 399-409, 2005.
2. Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., and Kato, Y. *Molecular*

Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communication. 332(1), 297-303,2005.

3. 歯周組織の細胞移植療法、骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法
河口浩之、林秀昭、水野智仁、藤田剛、長谷川直彦、柴秀樹、中村茂夫、日野孝宗、吉野宏、栗原英見、田中英夫、木村明朗、辻紘一郎、加藤幸夫. 株式会社医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM,第15巻7号99-104,2005

2. 学会発表

1. 清水正和、河本健、五十嵐晃、阪恵美、山中克之、西村正宏、辻紘一郎、加藤幸夫
間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析 I
第15回中国・四国骨代謝研究会
2005年7月9日 岡山市

2. Y.Kato, M.Shimizu, A.Igarashi, M.Ishii, H.Kawaguchi, N.Kamata, M.Sugiyama, H.Kurihara, K.Tsuji, and T.Kawamoto.

Application of Mesenchymal Stem Cells (MSC) to Regenerative Dentistry and

Identification of Molecular Markers for MSC

Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006, 2006年1月9日 広島市 広島国際会議場

3. H.Kawaguchi, H.Hayashi, T.Mizuno, T.Iwata, T.Fujita, N.Hasegawa, H.Shiba, S.Nakamura, T.Hino, H.Yoshino, H.Tanaka, A.Kimura, K.Tsuji, Y.Kato, and H.Kurihara.
Basic and Clinical Studies of Periodontal Tissue Regeneration by Transplantation of Own Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.
Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, 2006, 2006年1月9日 広島市 広島国際会議場

招待講演

1. 加藤幸夫、五十嵐晃、河本健、清水正和、Pan Haiou、阪恵美、金輪真佐美、

辻紘一郎

ヒト腸骨、顎骨/歯槽骨、大腿骨由来の間葉系幹細胞の遺伝子発現パターンの特徴

口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム 2005年9月17~20日 岡山市

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 加藤幸夫、河本健、辻紘一郎、五十嵐晃、清水正和:分子マーカーを用いた間葉系幹細胞の識別方法及びその利用
(出願番号:特願2005-104563号、2005)
(出願人:科学技術振興機構、広島大学、(株) ツーセル)

出願日:平成17年3月31日

2. 二川浩樹、西村正宏、加藤幸夫、辻紘一郎:動物幹細胞培養用無血清培地
(出願番号:特願2005-223242号、2005)
(出願人:(株) ツーセル、二川浩樹、加藤幸夫)

出願日:平成17年8月1日

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立と
その評価法
(染色体異常、DNA 損傷単一細胞除去による
安全性確保技術)

篠崎 尚史

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究
「再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法」
(染色体異常、DNA 損傷単一細胞除去による安全性確保技術)

分担研究者 篠崎 尚史 東京歯科大学市川総合病院角膜センター センター長
研究協力者 兼子 智 東京歯科大学市川総合病院婦人科講師

研究要旨

単一細胞の染色体 DNA 損傷、とくに 2 重鎖切断による DNA 断片化を高精度に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFGE)を開発した。本法は位相を 90 度ずらした 2 組の電極を用い、直交電場を印加することにより長鎖 DNA を分離する。ヒト精子は極めて多様な DNA 断片化パターンを示した。

SCPFGE 電気泳動像を指標として、DNA 断片化精子を分画、除去した。Percoll 沈降速度差遠心分離法。オプチデント沈降平衡法により精子を分画し、最終的に swim up 法により運動精子を分離すると、DNA 損傷比率は 1%以下に低下した。

Single strand break (SSB)の観察には、アルカリ処理を行って DNA 2 重鎖を開裂させ、その後電気泳動をする方法（コメット電気泳動法）が用いられてきたが、本条件では人工的に DNA 断片化が発生し、本法では精子 SSB の観察はできないことが示された。本研究では、SSB の定量的観察を目的としてヨーイングモーション電気泳動法を開発し、現在検出条件を詳細に検討している。

A. 研究目的

不妊治療は組織、細胞移植による再生医療の嚆矢であり、すでに本邦における出生数の 1-2%は不妊治療によるものである。不妊治療により出生した児の健全性保証が、重要な課題となっている。In vitro で授精、初期発生を行った胚の移植は本質的には染色体の移植医療であり、われわれは配偶子（卵、精子）、胚の DNA 非特異的構造異常（DNA 2 重鎖切断、片側の開裂、塩基変異）、遺伝子などを多面的に解析する必要があると考えている。

近年、移植を目的とした組織培養が行われるようになり、これらの領域においても in vitro で増殖させた細胞の質的評価が不可欠であり、形態学的観察に加えて分子

生物学的な機能評価が求められる。従来、DNA 評価は数百万個の細胞から抽出した DNA 標品の解析が中心であったが、移植細胞評価においては細胞 1 個の DNA を解析する必要がある。

B. 研究方法

われわれはヒト精子を対象とし、個々の細胞における 2 重鎖切断 (DSB) に伴う DNA 損傷を定量的に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFGE)を開発した。装置は位相を 90 度ずらした 2 組の電極を有し、3 秒インターバルで直交電場 (2.0V/cm、10 分間) を印加する。表面親水化処理したスライドガラス上に

100 μ g/mlのアフィニティークロマトグラフィ精製トリプシンを含むアガロースに懸濁した細胞(30万/ml)を滴下し、薄膜ゲルを作成した。これを界面活性剤、トリプシン溶液に浸漬して、細胞融解、核蛋白の除去を行った。

(倫理面への配慮)

検査に供した精液をインフォームドコンセントを得た後、研究に使用した。

C. 研究結果

SCPFGEにより泳動を行うと、1.連続するDNAファイバーが原点から伸展する、2.DNAファイバーの先に断片化DNA、3.鎖長が異なるDNA断片が展開する、4.原点が消失し、高度断片のみを認める、など多様な像が得られた。これまで報告されたアルカリコメット法によるDNA断片化研究は、粒子状の断片化DNA像の有無でDNA損傷を判定していた。一般的にDNAはアルカリ条件に安定であるとされてきたが、本研究で取り扱う1000万baseレベルのDNAは酸、アルカリに脆弱であり、その取り扱いに関しては、pH、活性酸素等に十分な注意が必要であることが明らかになった。この結果は、汎用されるアルカリコメット法がDNA断片化研究には不適であることを示唆しており、さらに定量性の高い検出法の開発を続ける必要がある。

上述したSCPFGEにより射精精液を観察すると、DNA断片化像を呈する精子の比率は20-70%程度であった。本研究で開発した方法を指標としてDNA損傷精子の排除を試みた。Percollを密度勾配担体とする沈降速度差遠心分離法で精子を分離した後、オプチデントを担体とする沈降平衡法を行う

と、精子は2峰性に分布した。上層のDNA損傷比率は1%以下に低下したが、下層ではほとんどがDNA高度断片化像を示した。この結果はDNA損傷に伴い、細胞性状、特に密度が変化することが明らかとなった。上層の精子分画は運動率が高く、先体反応誘起能が高かった。さらに電顕による形態観察の結果、超微形態も良好であった。

ヒト精子核DNAにおけるsingle strand break(SSB)観察の基礎的検討として、単一細胞のDNA fiberをできるだけ伸展する、fiber中のnickを検出する方法を検討した。新たにヨーイングモーション電気泳動法を開発し、位相を120度づつずらして3回泳動することにより各DNA fiberを0.5-1.0mm程度伸展させることができた。DNAポリメラーゼ-FITC-dATPを用いるnick translation変法によりDNA fiber中のnick部位を検出できた。大腸菌(DNA base数:約430万base)をマーカーとして、伸展ヒト精子DNA鎖長を推定したところ、最長のもので1000万base程度の連続したDNA fiberが得られた。

D. 考察

本年度は、ヒト精子を材料として、DSB、SSB観察法の基礎的検討を行い、個々の細胞においてこれらを観察できるようになった。また数メガベースのDNAを電気泳動的に展開することが可能となり、次年度においてはDNA fiber上における遺伝子の解析法確立に取り組みたい。

E. 結論

ヒト精子のDNA損傷は極めて多様であり、構造正常性(DSB、SSB観察)、遺伝子など

多面的な解析が必要であることが示唆された。

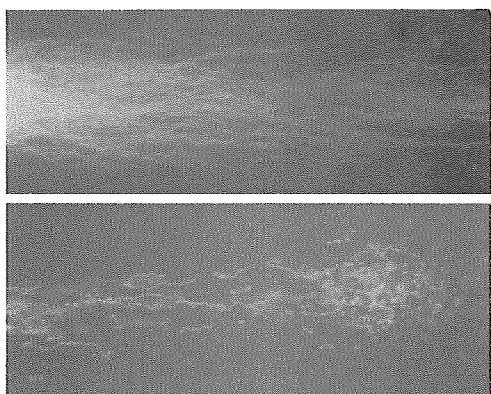


図1 SCPFGEにより展開したDNA fiberとその先に分離されたメガベースレベルのDNA断片

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 46:1653-1658.
2. Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. Br J Ophthalmol. 2005 89:134-137.
3. Kaneko, S., Human sperm processing in assisted reproduction technology. J. Mamm. Ova Res. 22:224-228, 2005

2. 学会発表

兼子智 1、小林健介 2、片山昌勅 2、松田兆史 2、中川博之 1、宮地系典 3、富永英一郎 1、岸郁子 1、北岡芳久 1、谷垣伸治 1、岡崎雅子 4、石川博通 3、高松潔 1、細胞外 DNA を指標とする造精機能評価に関する基礎的検討、東京歯科大学市川総合病院産婦人科、2. 明治薬科大学生体機能分析、3. 東京歯科大学市川総合病院泌尿器科、4. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、第 23 回 日本受精着床学会学術講演会、2005 年 8 月 4 日 ~ 8 月 5 日、大阪 大阪国際会議場

郡山純子 1、兼子智 2、中川博之 2、宮地系典 3、富永英一郎 2、岸郁子 2、北岡芳久 2、谷垣伸治 2、岡崎雅子 4、石川博通 3、高松潔 2、アルカリコメット法では、精子 DNA 損傷を観察できない

1. 石塚産婦人科、2. 東京歯科大学市川総合病院産婦人科、3. 東京歯科大学市川総合病院泌尿器科、4. 東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター、第 23 回 日本受精着床学会学術講演会、2005 年 8 月 4 日 ~ 8 月 5 日、大阪 大阪国際会議場

G. 知的財産権の出願・登録取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関する
モニタリングと制御に関する研究

澤 芳樹

細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 教授

研究要旨

心臓移植患者を対象に、移植待機中と移植後の抗 HLA 抗体（PRA 値）を測定し、移植後の拒絶反応を含めた臨床的パラメータとの関係を検討した。同種細胞移植による再生医療を安全かつ効果的に試行するには、アロ免疫応答のモニタリングと制御が必要となる事が示唆された。

A. 研究背景と目的

細胞移植による「再生治療」の効果と安全性を向上させ、広く臨床応用可能な医療に発展させるには、治療用細胞の安定供給、質的保証や緊急時対応の面での問題を克服する必要がある。移植細胞源に同種細胞を使用する事が可能になれば、これらの問題が緩和され倫理的にも容認可能と考えられるが、アロ免疫応答による拒絶反応への対処が必要になる。

本研究の最終目的は、同種細胞移植（骨格筋・骨髄細胞など）による循環器系疾患に対する再生医療に、如何なるアロ免疫応答モニタリングが必要で、どのような方法で拒絶反応制御が可能かを明らかにすることにある。17年（初年）度は、まず現行のアロ免疫応答モニタリングと心臓移植臨床経過の関係を明らかにすることを主眼に研究を行った。

B. 研究方法

31例の心臓移植適応患者から登録時とその後の経過中に血清を採取し、Panel Reactive Activity (PRA)の測定を行った。PRA 値の推移と他の臨床的パラメーター（登録前治療、輸血歴、人工心臓装着の有

無、心臓移植後の拒絶反応、血行動態など）の関係を検討した。血清は治療上必要な採血の余剰部分を使用し、総ての対象患者に、血清を含めた採取標本が研究目的に使用され得る事を含めた心臓移植に関するインフォームドコンセントが行われた。また、これら一連の心臓移植治療は大阪大学医学部倫理委員会の承認と第三者評価委員会の監視下に行われている。

C. 結果

1. 心臓移植登録時、3例のPRA陽性患者を認めた。全例に血小板輸血歴があり、2例は左心補助人工心臓装着後の患者であった。

2. PRA陽性2例に心臓移植を行った。ともに移植直前の対ドナー直接クロスマッチ試験は陰性であった。1例のPRA値は登録中に低下したが、他例は低下不十分で、シクロフォスファミドとIVIgによるPRA抑制治療を行った。両例ともに心臓移植後に液性拒絶反応が強く疑われ、血行動態の悪化を見た。液性拒絶反応の臨床的治療において、ドナー抗体の検出と生検材料の免疫組織検査が有用であった。

D. 考察・結論

重症心不全に対する同種移植治療では、対象患者が免疫学的に感作されている場合が多く、綿密なアロ免疫応答モニタリングと巧妙な拒絶反応治療が必要になると考えられた。

E. 研究発表

Current status and future perspectives of intrathoracic organ transplantation in Japan. 日本胸部外科学会シンポジウム
2005年10月5-7日、岡山

7. 臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導と
その評価に関する研究

高橋 恒夫

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

（総括・分担）研究報告書

臍帯血間葉系細胞の骨、軟骨細胞への分化誘導とその評価に関する研究

分担研究者 高橋 恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

研究協力者：張 曉紅、伊倉宏一 同上

研究要旨

骨、軟骨の再生において骨髄の間葉系細胞を用いての臨床研究がすすんでおり再生医療の細胞ソースとして注目されているが、その採取は患者への負担があり、遺伝性疾患を持っていたり、年齢が高い場合には採取や細胞の分化増殖能が保証されず、自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられる。最近、臍帯血に多分化能を有する細胞が存在することが多く報告されている。我々は臍帯血由来間葉系細胞が骨、軟骨の再生医療に有用な細胞ソースとして可能性を検討する。

A. 研究目的

骨・軟骨再生医療が必要な疾患は変形性関節症、外傷や腫瘍切除後の骨、軟骨の欠損、先天性の変形、奇形など数多く存在する。骨・軟骨の欠損に対して自己組織移植が現在行われているが、移植できる組織の量は制限があることから幹細胞の移植医療での有用性が注目されている。骨・軟骨の再生において骨髄の間葉系細胞を用いての臨床研究がすすんでおり再生医療の細胞ソースとしてもっとも注目されているが、その採取は患者への負担があり、遺伝性疾患を持っていたり、年齢が高い場合には採取や細胞の分化増殖能が保証されず、自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己（アロ）細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられる。臍帯血はドナーに負担やリスクが無く、血液製剤と同じレベルで安全性が高い、また臍帯血

バンクにおいてHLAが調べられたユニット

が保存されており、アロの細胞ソースとして有力である。この臍帯血の中の細胞を再生医療に使用できるかを検討する。

B. 研究方法

東京臍帯血バンクにて研究用と判断された臍帯血のインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血は通常の方法で採取した後、フィコールに重層し、遠心後分離した。単核球層を回収後シャーレにてDMEM+20%FBS+ 10^{-7} M dexamethsoneの培養基で接着させ、3-4週間後、形成されたコロニーを回収、DMEM+20%FBS培養液で増殖させた。増殖させた細胞は骨・軟骨への分化能を検討した。骨細胞への誘導は dexamethsone, ascorbic acid-2-phosphate, β -glycerophosphateの存在下で誘導培養を21日間行い、コッサ染色で確認した。軟骨細胞への分化

はペレット法を用いた。誘導因子 bone morphogenic protein-2, transforming growth factor-の存在下で3週間培養後、ペレットの paraffin 切片で toluidine blue 染色と 軟骨特異的 type II collagen 免疫染色を行った。また、軟骨細胞へ誘導した ペレットの大きさは骨髄由来間葉系細胞と比較した。

(倫理面への配慮)

研究に用いる臍帯血は、東京臍帯血バンクより細胞数などの面から移植用としては適さない臍帯血について、ドナーの同意を得た上で提供を受けている。なお、提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認をうけている。

C. 研究結果

培養後コロニーを形成する間葉系細胞の回収率は、採取後の臍帯血をフィコール分離するまでの時間 (>5 hr) と容量 (<50ml) に影響を受けた。得られた細胞の表面マーカーは骨髄間葉系細胞と同じく、また胎盤由来間葉系細胞とも差がなかった。コッサ染色の結果、calcium の沈殿を確認されて骨細胞への分化が確認された。軟骨細胞に関して3週間培養後、ペレットは白くまた大きくなり、透明度を増した。paraffin 切片で toluidine blue 染色と type II collagen 免疫染色が陽性であった。臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較して多量の軟骨基質を合成することを示された。臍帯血由来間葉系細胞は骨、軟骨細胞への分化誘導の in vivo での詳細をさらに検討する必要がある。

D. 考察

臍帯血由来間葉系細胞の最適な採取に関わる要因、時間、容量条件を得た。また骨、軟骨細胞へ分化しうる細胞が存在していることを明らかにした。今後、in vivo での骨、軟骨形成の詳細を検討する必要がある。

E. 結論

ヒトの骨髄間葉系細胞では分離後に増殖させ、目的とする組織細胞に in vitro で分化させたて移植に使用するという方法が可能であると考えられている。臍帯血間葉系細胞も骨髄と同様な手法が可能である。臍帯血由来間葉系細胞はドナーへの負担や危険性がなく、また免疫源性も低いとされる。臍帯血由来間葉系細胞は骨、軟骨の再生医療において間葉系細胞ソースとして期待される。

F. 健康危険情報

臍帯血は採集医療機関施設（東京臍帯血バンク採集医療機関）において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で、分娩後に採取する。採取に際してドナーの安全性は完全に確保されている。また、採取に際しては、東京臍帯血バンクにおいてはドナーに対して問診及び家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴あるドナーから臍帯血の採取を行わない。臍帯血そのものの安全性については、東京臍帯血バンクにおいてすべて感染症の検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診及び家族歴等個人情報 は東京臍帯血バンクにおいて管

理し、匿名化の処理を講じている。以上により、提供を受けた材料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に、研究従事者の安全性も確保されている。

45, 1899-1908, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Tsuneo A. Takahashi. Mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun.* 340, 944-952, 2006.

Okada H, Nagamura-Inoue T, Mori Y, Takahashi TA. V \cdot 24+V \cdot 11+ NKT cells expanded from Cord blood mononuclear cells under Interleukin-15, IL-7 and Flt3-L depend on monocytes. *Eur. J. Immunol.* 36, 236-244, 2006

Yasurake M, Zheng Y, Nagamura-Inoue T, Akagawa E, Tokushima Y, Terashima S and Takahashi TA. SCID repopulating activity of human umbilical cord blood derived hematopoietic stem and progenitor cells in a nonobese diabetiv/Shi SCID mice serial xenotransplantation model and immune cell activities in vitro: a comparative study of the filter method and the hydroxyethyl starch method. *Transfusion*

III 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya	A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers	J. Biomed. Mater. Res	accepted		
盛英三, 望月直樹, 武田壮一, 井上裕康, 中村俊, 土屋利江	ナノレベルイメージングによる分子構造と機能の解析	日本臨床	64巻2号	358-364	2006
米山隆之, 川端隆司, 岡野光夫, 明石満, 土屋利江, 堤定美, 松下富春	バイオマテリアルと未来社会	バイオマテリアル-生体材料	24-1	11-24	2006
土屋利江	再生医療・繊維工学・人工臓器に使用される医療用材料の安全性・有効性に関する基本的考え方	繊維学会誌(繊維と工業)	61	148-149	2005
Yoshiaki Ikarashi, Kazuhiro Toyoda, Equo Kobayashi, Hisashi Doi, Takayuki Yoneyama, Hitoshi Hamanaka, Toshie Tsuchiya	Improved Biocompatibility of Titanium-Zircon (Ti-Zr) Alloy: Tissue Reaction and Sensitization to Ti-Zr Alloy Compared with Pure Tin and Zr in Rat Implantation Study	Materials Transactions	46(10)	2260-2267	2005
Nasreen Banu, Yasmin Banu, Masamune Sakai, Tadahiko Mashino, Toshie Tsuchiya	Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes	J Artif Organs	8(3)	184-191	2005
Yoshiaki Ikarashi, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya	Determination of Benzo [a] anthracene and Dibenz[a,h]anthracene in reosotes and Creosote Treated Woods	J of Health Science	51(5)	597-606	2005
Atsuko Matsuoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests	J Biomed Mater Res	75(2)	439-444	2005
Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi, Toshie Tsuchiya	Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide(PIPAAm)	Tissue Engineering	11(9-10)	1392-1397	2005

Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics	Archives of Bioceramics Research	5	158-161	2005
Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics	Key Material Eng	309-311	263-266	2005
Masato Tamai, Ryusuke nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts	Key Material Eng	309-311	97-100	2005
Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya	Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form	Key Material Eng	309-311	1293-1296	2005
Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya	The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap junctional intercellular communication	Biomaterial	27	1437-1443	2005
Ryusuke Nakaoka Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya	Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45	J Biomed Mater Res A	74(2)	181-186	2005
Misao Nagahata, Ryusuke Nakaoka, Akira Teramoto, Koji Abe, Toshie Tsuchiya	The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes	Biomaterials	26(25)	5138-5144	2005
Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya	Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets	Key Engineering Materials	288-289	409-412	2005
Matsuoka A, Isama K, Tsuchiya T	In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests	Journal of biomedical materials research, Part A	75	439-444	2005

Yoshiaki Ikarashi, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya	Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons and water-extractable phenols in creosotes and creosote-treated woods made and procurable in Japan	Chemosphere	60	1279-1287	2005
石黒(長幡)操, 寺本彰, 阿部康次, 中岡竜介, 土屋利江	ラット頭蓋冠由来骨芽細胞のALPase活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果	繊維学会誌(報文)	61	98-102	2005
Rumi Sawada, Tomomi Ito, Yoshie Matsuda, Toshie Tsuchiya	Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells	Animal cell Technology	in press		
Nasreen Bauu, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada	Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes	Animal cell Technology	in press		
Matsubara, T., Suardita K., Ishii, M., Igarashi, A., Oda, R., Nishimura, M., Saito, M., Nakagawa, K., Yamanaka, K., Miyazaki, K., Shimizu, M., Tsuji, K., Nakamura, K., Kato, Y.	Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells.	Journal of Bone and Mineral Research	20(3)	399-409	2005
Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., Kawaguchi, H., Sugiyama, M., Kamata, N., Iwata, T., Matsubara, T., Nakamura, K., Kurihara, H., Tsuji, K., and Kato, Y.	Molecular Markers Distinguish Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Fibroblasts.	Biochemical and Biophysical Research Communication.	332(1)	297-303	2005
河口浩之、林秀昭、水野智仁、藤田剛、長谷川直彦、柴秀樹、中村茂夫、日野孝宗、吉野宏、栗原英見、田中英夫、木村明朝、辻紘一郎、加藤幸夫	歯周組織の細胞移植療法、骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織生療法	株式会社医薬ジャーナル社 CLINICAL CALCIUM	Vol.15 No.7	99-104	2005