

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究



## 幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化

所属 国立医薬品食品衛生研究所 療品部

研究者 土屋 利江

研究要旨 再生医療製品として待ち望まれている各種(軟骨・骨・心筋・血管など)製品と製品に使用される組織工学材料の開発、およびそれらの製品の品質・有効性(臨床評価を含む)確保に重要な評価技術の標準化を行う。眼科では、コスト面から産業化が可能であり、開発が望まれる治療的レンズ材料の開発を行う。具体的には、16項目について研究を行い、以下に示す成果をあげた。平成17年度から移植細胞の生物学的評価に関する研究を開始した。

### 分担研究者

- |                            |      |
|----------------------------|------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所療品部        | 松岡厚子 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所療品部        | 澤田留美 |
| (3) 国立医薬品食品衛生研究所療品部        | 中岡竜介 |
| (4) テルモ(株)研究開発センター         | 片倉健男 |
| (5) (株)カネカ ライフサイエンス RDセンター | 増田茂樹 |
| (6) オリンパス(株)研究開発センター       | 森山 剛 |
| (7) (株)メニコン 基礎研究課          | 平谷治之 |
| (8) (株)ウベ循研                | 坂井正宗 |
| (9) グンゼ(株)研究開発センター         | 富畑賢司 |
| (10) ペンタックス(株)ニューセラミックス事業部 | 小川哲朗 |
| (11) 株式会社高研 バイオサイエンス研究所    | 阿蘇 雄 |
| (12) 京都大学国際融合創造センター        | 富田直秀 |
| (13) 信州大学医学部附属病院整形外科       | 脇谷滋之 |
| (14) 大阪大学大学院器官制御外科学        | 吉川秀樹 |
| (15) 東京女子医科大学心臓血管外科        | 新岡俊治 |
| (16) 大阪大学医学系研究科臓器制御外科      | 澤 芳樹 |

### A. 研究目的

材料とハイブリッドした培養皮膚や、軟骨の細胞治療が海外では、承認され臨床使用されている。

しかしながら、海外で数千例すでに臨床使用されている軟骨の細胞治療では、その有効性が疑問視され、学会で論争となっている。その原因は、採取したヒト軟骨細胞の単層培養による増殖過程で脱分化すること。さらに、細胞を軟骨再建部へ注入するのみで、固定できないため、注入した軟骨細胞が治療すべき部位に存在しているのかなど、有効性に関する疑問点があげられる。これらを解決するためには、分化機能を維持した細胞の培養方法、対象となる部位への固定方法、臨床使用されている幹細胞の分化発現機能の安定性確保、BSE リスクのない魚からのコラーゲン材料開発、遺伝毒性・神経毒性・免疫毒性のある有機錫以外の触媒で合成された安全安心生分解性材料開発、高機能性を付与した組織工学用材料開発、再生軟骨の動物モデル開発、再生軟骨の非侵襲的臨床評価手法開発、再生骨の定量的臨床評価手法開発、バイオ血管および心筋梗塞の細胞シート技術による先端的治療の安全性・有効性確保、など多くの課題がある。これらの課題への解決手法や評価技術の標準化が進めば、安全安心細胞組織医療機器開発が加速され、新しい先端医療技術と製品を日本から世界人類のために、提供できる。

具体的には、力学も考慮した再生軟骨・難治性骨欠損治療・骨髄幹細胞からの再生人工血管・心筋再生など緊急性のある研究内容を含む。従来の医工連

携や国研単独での枠組みでは得られなかった実用的で優れた細胞組織医療機器・医療材料開発を目的とする。すなわち、再生医療として期待されている製品の開発とそれらの製品の品質・有効性（臨床評価も含む）・確保に重要な評価技術の標準化を行う。研究項目としては、材料系、細胞系、これらを組み込んだ細胞組織医療機器系からなる。材料系は、DDS組込型を含むスキヤホールドの開発とその有効性評価。細胞系は、幹細胞の維持、幹細胞からの分化誘導、幹細胞から誘導した分化発現細胞の分離技術。細胞組織医療機器系は、骨髄細胞からの細胞組織医療機器の開発、細胞組織医療機器の品質評価技術の標準化、細胞組織医療機器の有効性評価指標の標準化、移植細胞の機能および安全性評価などである。

具体的な組織・臓器としては、軟骨、骨、血管、心臓、脂肪組織、角膜等を対象とする。

## B. 研究方法

幹細胞を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化を行うために以下の研究手法を用いて検討した。

### 材料開発

1) 魚（サメ、イソミダイ）、豚、牛由来アテロコラーゲンを調製し、コラーゲンコート材料、コラーゲンスポンジを調製し、軟骨、骨芽細胞株等を用いて、細胞増殖、細胞分化に及ぼす影響を測定した。各種コラーゲンの変成温度を調べた。

2) 緑内障治療薬であるチモロールおよび上皮成長因子（EGF）をゲスト薬物として使い、これを分子インプリントさせたヒドロゲル（新規ソフトコンタクトレンズ材料）を作製し、得られたゲルの含水率、チモロール吸着アフィニティ測定、EGF 放出実験を行った。

3) ヒアルロン酸を主骨格とした陰イオン導入多糖の合成を行い、それらのスポンジを調製した。生分解・生体吸収性の材料に含まれている触媒由来の成分が、その分解と吸収の過程において、細胞の増殖・分化に影響を及ぼす現象が見いだされている。これらについて、改変した候補材料の合成と延伸配向による高機能マトリックス開発について検討した。

### 評価技術の標準化

4) 正常ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、骨肉腫細胞（HOS）、軟骨肉腫細胞（OUMS-27）を入手し、昨年度確立したプロトコールに従って、染色体標本を作製した。1番染色体、4番染色体、c-mycのDNAプローブを購入し、Fluorescence in situ hybridization（FISH）を用いて、染色体異常解析法を検討した。

5) hMSCの癌化に対する安全性についての評価システムを開発するために、昨年度に引き続き i) hMSCと癌細胞との比較、ii) hMSCの継代数の増加による影響、の2点について、DNA tip解析とReal-time RT-PCR法を用いて遺伝子発現パターンを検討し、細胞老化にかかわる遺伝子とFGF-2による細胞老化抑制機構について、TGF- $\beta$ 添加実験や、BrdU取り込み量によるDNA複製能の検討およびウェスタンブロット解析などで検討した。

6) 2種のペプチドで修飾したアルギン酸から二次元、三次元マトリックスゲルを調製し、細胞数と細胞分化活性の測定方法の適切性について、各種MTT試薬、RT-PCR等で比較検討した。

7) hMSCを二次元、三次元（コラーゲンスポンジ）に播種し、15%FCS- $\alpha$ MEM培地を増殖用培地とし、脂肪分化用培地（Poietics社）あるいは、増殖用培地にサプリメント添加した培地を使用した。細胞数は、DNA抽出後、Hoechst33258による蛍光強度により、培地中のアジポネクチン濃度は、AssayMax HumanAdiponectin Elisa kitを用いて測定した。

8) 再生軟骨用の力学的評価のための、一方向往復摩擦、摩擦試験機を試作・改良した。絹の主要蛋白成分であるフィブロインを担体として軟骨を再生し、その摩擦試験、摩擦試験を行った。各種環境下で培養した軟骨組織の評価を行った。

9) 同一試験サンプル（被験動物に埋植された軟骨再生モジュールの経時的摘出品）を用い、下記の評価方法を実施・比較検討することにより、実用性も考慮に入れた有用な評価方法を選出した。

実施評価方法として、

力学：aggregate modulus (equilibrium modulus)・Poisson's ratio (dynamic stiffness)・MRI・超音波を選出した。

生化学 : collagen type II, 酸性ムコ多糖、  
組織学 : Hematoxylin and Eosin, Alcian blue, Saffranin-0 及び Histological Grading Scale for the Defects of Cartilage (1994 年脇谷らの方法) を用いた。ミニブタの骨髄由来細胞を 13 日間培養し、プロテアーゼで遊離細胞を得た後、無血清培地で洗浄後、多孔質支持体に播種し、30 分間静置した後、採取被験と同じ個体の下肢膝関節内軟骨組織に欠損を作成し、細胞を播種した多孔質支持体を埋植した。SZ 及び SHS は縫合糸による固定は実施しなかった。一方、FG は剛性が SZ 等より高いため、ナイロン糸により欠損部位への固定を実施した。

10) 三次元培養した骨芽細胞の ALP 活性の測定方法を検討した。輸入骨髄液から得られた間葉系幹細胞を 5mm 角の  $\beta$  TCP に播種し、骨分化への誘導を 1 ~ 2 週間実施し、培養骨を作製した。0.5% NonidetP-40 抽出液に培養骨、コントロールとして  $\beta$  TCP を添加し、スパーテルで培養骨、もしくは  $\beta$  TCP を破碎した。その後、遠心した上清を ALP 活性測定に使用した。また、細胞抽出液を 10% ギ酸とし、ALP 活性と同じように培養骨から Gla type Osteocalcin EIA kit で測定した。

骨髄液から培養した間葉系幹細胞、これを骨分化させた骨芽細胞の表面マーカーの変動を検討した。細胞表面マーカーには、幹細胞のマーカーといわれているヒアルロン酸レセプターの一つである CD44、多分化能を有する間葉系幹細胞のマーカーといわれている STRO-1、繊維芽細胞・平滑筋・単球マーカーで PDGF レセプターの一つである CD140b、骨芽細胞のマーカーである ALP について検討を行った。平板培養した間葉系幹細胞、および 7 日間骨分化を誘導した骨芽細胞を回収し、上述の細胞表面マーカーの抗体にて常法にて染色を行い、フローサイトメーター (FACS) で解析を行った。

11) 細胞培養担体として用いたアパタイト・コラーゲン複合体は、菊池らの方法で合成したアパタイト・コラーゲン複合繊維を用いてペレット状に作製された。前処理に用いた培地は、DMEM (血清含) と OBM (正常ヒト骨芽細胞培養用培地) である。ペレット 3 個を培地 25ml に含浸させ、3 日間毎日全量を培

地交換した。培地の分析は、ICP を用い培地中の Ca、Mg、P のイオン濃度を測定し、無機イオンの吸着量を測定した。前処理の有効性を調べるために、ヒト骨原性肉腫細胞 MG63、正常ヒト骨芽細胞を用いて細胞培養を行い、ALP 活性の測定を行った。

12) 骨格筋芽細胞のブタ同種移植、ヒト骨格筋芽細胞の免疫不全マウス心臓への移植による移植細胞の滞留確認試験、軟寒天コロニー形成法について検討した。

### 臨床評価

13) 膝関節の手術を受ける患者さんの血清、関節液および尿を採取し、II 型コラーゲンの分解、産生指標となる蛋白や glycosaminoglycan (GAG) を測定するプロトコールを倫理委員会に申請し、認可された。全部で 202 例の手術患者が登録され、サンプルが採取され、凍結保存された。以下の評価を行う。

i) 臨床評価 ii) 血清、関節液の測定

iii) 手術時のデータ採取 : 手術時年齢、部位、手術時の関節軟骨の状態の評価

14) 良性骨腫瘍 5 例に対し病巣搔爬、人工骨 (NEOBONE) 移植を行った症例で経時的に、単純 X 線、CT、造影 MRI、骨密度、 $^{99m}\text{Tc}$ -MDP 骨シンチ (SPECT) を施行した。自家骨髄培養細胞導入人工骨移植を行った 2 例についても、同様の画像解析を行った。

15) 根治手術時、全身麻酔下に骨髄穿刺を行い、体重あたり 2-5cc の骨髄液を採取する。全て自己血清を細胞浮遊液とする。血液成分分離装置により完全清潔下に操作を施行する。直ちに生分解性ポリマーの導管に播種した後、フィブリン凝を塗布した血管壁に細胞を固定後、自己血清に浸漬する。細胞播種後、約 2-3 時間のインキュベーションで移植手術を行う。術後約 1 ヶ月後に、心臓カテーテル、造影検査、心臓超音波検査を行いフォローアップは 6 ヶ月毎に心臓超音波検査を用いて形態学的検索及び組織過形成の有無等を経過観察する。術後長期遠隔期にも心臓超音波検査を施行する。

16) i) 心筋梗塞モデルラットに対する治療  
8 weeks の Lewis ラットを用い、全身麻酔下にて開胸。心臓を露出し、左前下行枝を結索し、心筋梗塞モデ

ルを作製した。心筋梗塞の確認は、肉眼的、心臓超音波にて行った。このモデルを無治療群(C群、n=14)と治療群に分け、経時的に心臓超音波にて心機能を測定した。治療群においては、予め、両前脛骨から骨格筋を採取し、骨格筋芽細胞を単離、培養する。培養された骨格筋芽細胞を梗塞後2週間のモデルラットの心臓に直接Needle injection法で注入した群(MI群、n=15)、温度応答性培養皿上に移し培養し、骨格筋芽細胞シートを移植した群(MS群、n=15)にわけ、移植後、2週、4週、8週において心臓超音波検査にて心機能を測定した。また、C、MI、MS群における組織学的な比較検討を行った。

ii) 拡張型心筋症 (DCM) に対する自己細胞による治療 27週令のDCMハムスターを用い、これらを無治療群(C群)と治療群に分け、経時的に心臓超音波検査にて心機能を測定した。治療群においては、予め、ハムスターの前脛骨筋から骨格筋を採取し、骨格筋芽細胞を単離、培養する。培養された筋芽細胞をNeedle injection法による筋芽細胞移植群(T群)と温度応答性培養皿上に移し培養し、骨格筋芽細胞シート移植群(S群)に分け術後の心機能・組織および予後について検討を行った。

iii) DCM大動物モデルに対する自己細胞による治療 雌ビーグル犬を用い、全身麻酔下にて開胸し、ペースメーカーを留置し、230/minで4週間心室ペーシングすることによりDCMモデルを作製した。このモデルを無治療群と治療群に分け、経時的に心臓超音波を用い心機能を測定した。治療群においては、予め、大腿筋から骨格筋を採取し、骨格筋芽細胞を単離、培養。培養された骨格筋芽細胞を温度応答性培養皿上で培養し、骨格筋芽細胞シートを作製した。この自己骨格筋芽細胞シートをDCMモデル犬の左室前壁から側壁に数層に重ねて移植し、心室ペーシングを継続した状態で、経時的に心機能を計測した。手術後4週間目に、無治療群と治療群において、組織学的検討を行った。

## C. 研究結果

### 材料開発

1) 各種動物より得たアテロコラーゲンをコート

したプレート上でヒト線維芽細胞の場合、アテロコラーゲンの由来に関わりなく良好な増殖を示した。マウス骨芽細胞の場合はコラーゲンが存在することにより若干増殖能が増加する傾向を示したが、マウス軟骨細胞については、逆にコラーゲンが存在することにより増殖能が低下した。得られたアテロコラーゲンを凍結乾燥することにより、非常に細かな多孔質のコラーゲンスポンジを作成することが可能であった。凍結の条件によりポアサイズが異なるスポンジを作成できた。サメおよびイズムダイ由来アテロコラーゲンの酸性条件での変成温度30℃、35℃に比べ凍結乾燥して中和することによりおよそ5℃高かった。骨芽細胞の場合、アテロコラーゲンスポンジのポアサイズ200~300 $\mu$ mによりALP活性に大きな違いが見られ、対照の1/2~1/10まで低下した。20~100 $\mu$ mのスポンジ上で培養するとウシ以外は対照と同等かそれ以上に増加した。一方、軟骨細胞の場合、いずれのコラーゲンスポンジ上でも対照とほぼ同じような傾向であった。

### 2) i) チモロール放出コンタクトレンズ

得られたコンタクトレンズはすべて優れた透明性および強度を維持していた。今回作製したレンズはすべてホストモノマー(MMA)と架橋剤(EGDMA)の仕込み比率を1:1.5に固定し、ホスト・ゲスト(MAA:チモロール)の仕込み比率を1:4~32と変化させたものを用意した。得られたレンズの含水率は同等であった。架橋剤(EGDMA)濃度が高くなるにつれ、レンズの含水率は低くなっていることも確認された。レンズ中のMAAが100mM(EGDMA:150mM)の場合、分子インプリントの有無、チモロール/MAAの仕込み比率に関わらず、チモロールは5時間以内にすべてレンズから放出された。MAAが200mM(EGDMA:300mM)の場合、チモロールの放出パターンに差が認められ、コントロールであるノンインプリントレンズに対して、チモロール/MAA仕込み比率が小さい(1/32)場合、チモロールの放出が緩やかに起こり、その放出持続性も24時間と大幅に伸びた。MAAが400mM(EGDMA:600mM)の場合、著しく長いチモロール持続的放出を実現できた。コントロールの

ノンインプリントレンズの場合、約8時間でチモロールの放出が終了したのに対し、チモロール/MAA仕込み比率が1/16、1/32とチモロールの仕込み量を減らした場合、100%放出には30日間を費やした。チモロールの放出挙動が遅いほど拡散係数が小さくなった。

ii)EGF 放出コンタクトレンズ 架橋剤濃度は固定し、レンズの主成分(DMAA, SiMA)を変化させ含水率の異なる2種類のレンズ材料を合成し、EGFを取り込ませ、その後放出させた。EGFは、特定のレンズ成分と相互作用するため、含水率が高くても比較的長い放出持続性を示した。

3) i) 成分の添加・担持などにより生理活性を高めた複合化マトリックスの開発 断片化せず表面から分解する特性を有し、安定な放出を期待できるポリマーとして、トリメチレンカーボネートと乳酸との共重合体を見いだした。物性も柔軟であり、様々な基材の被覆が可能である。前年度有望な合成結果が得られた鉄系の触媒を使用し、重合体を得た。

ii) 延伸配向による高機能マトリックスの検討 多孔と機械強度を併せ持つマトリックスの開発にあたり、分子配向技術に着目した。配向性の高い生分解材料であるポリ(ε-カプロラクトン)(PCL)を用いた。一般的な造孔法である溶出法を用いてPCLの多孔体を得、その後、延伸配向を行なった。多孔率の度合いは、造孔剤の混合比によって制御可能であるが、安定した延伸が可能な延伸率は、120%程度が上限であった。このようにして延伸配向による多孔体を得た。

## 評価技術の標準化

### 4) ヒト癌細胞株の染色体数分布

3種類の癌細胞株の染色体数の分布は、HeLa細胞は67本に、またHOS細胞は48本にピークを示す分布を示した。対照的にOUMS-27細胞では目立ったピークはなく、66本から78本にまで広がった分布を示した。

### ヒト癌細胞株のFISHを用いる染色体異常解析

1番染色体プローブを用いた染色体構造異常の解析を行った。正常な細胞では、1番染色体は2本あ

り、プローブで間接的にピンクに染まった染色体2本(2シグナル)が観察される。HOS細胞では正常の1番染色体が1本、転座を起こした染色体および染色体の途中にシグナルがわずかに観察される挿入を検出できた。OUMS-27細胞では正常な1番染色体が3本と、1番染色体の一部と他の染色体が結合した転座染色体が観察された。これらの結果を集計すると、両細胞とも4個あるいは5個の異常シグナルを持つ細胞の頻度が高かった。

4番染色体プローブを用いてHOS細胞の解析を行なった。正常な4番染色体1本と、転座、挿入に関与した3本の染色体がみられた。

c-mycを用いた解析では、染色体(分裂中期像)での解析と、間期細胞での解析とを行なった。HOS細胞では、8番染色体の長腕の先端に観察される正常な2シグナルに加えて、異常な2シグナルが観察されている。OUMS-27細胞では、間期細胞での異常シグナルを示しているが、比較的近い距離に位置する4対のシグナルが観察される。シグナルが近い距離を保っていることは、同じ染色体内でのc-mycの増幅が示唆される。結果を集計したグラフから、両細胞において、染色体と間期細胞で観察した場合とで、異常頻度および型は比較的良く一致していた。

HOS細胞では、1番染色体、4番染色体での解析結果、すべての細胞がなんからの異常を呈していることが判明した。一方、c-mycでは、正常なシグナル構成を有している細胞の方が多かった。OUMS-27細胞では、1番染色体とc-mycでは約100%の細胞に異常が観察されたのに対し、4番染色体の異常を有する細胞は13%であった。

### hMSCの染色体異常解析

Lot. 10796のhMSCの3種のプローブでの染色体異常解析の途中経過は、1番染色体では、継代1代目も5代目も異常頻度は2%であった。4番染色体では何れも異常は検出されなかった。c-mycについては、信頼性の高い基礎データとするため、3096個の間期細胞の観察を行なったところ、3%の異常が観察された。一方、継代5代目では、まだ観察細胞数が少ないが、9%の異常が確認された。

長期継代培養による影響を、5ヵ月まで継代でき

た Lot 10909 の染色体標本を使い、c-myc プローブで間期細胞の観察を行なった。標準化に向けての観察細胞数の設定も目的に、同じ標本上の異なる場所の細胞を 100 個単位で観察した。

継代 1、3、5 代目の染色体数の分布は、いずれも 46 本にピークが認められ、継代間に特に大きな変化は認められなかった。

また、染色体標本の 1 スポット当たりの分裂期細胞数と間期細胞数をおおよその分裂指数を算出するために計数した。継代 5 代目までは、ある程度の分裂期細胞が観察され、1 番および 4 番染色体プローブを用いる染色体構造異常解析も可能と考えられた。

#### c-myc プローブを用いる場合の観察細胞数の検討

100 細胞観察時の異常頻度のデータを用いて、解析に必要な観察細胞数を検討した。解析法を標準化する場合には一定の観察細胞数で 1 回観察した結果を用いて、培養時期の異なる細胞の比較を行なうことから、検定には  $\chi^2$  検定を用いることにした。300 細胞と細胞数を増やして検討した結果、300 細胞以上で #1 と #14 の間には必ず有意差がつくことが判明した。ヒト間葉系幹細胞を培養した細胞からの染色体標本作製最適プロトコルを検討した。ヒト間葉系幹細胞の染色体標本では、1 番染色体、4 番染色体、c-myc を蛍光染色したところ正常であった。HeLa 細胞では、異常なシグナルを検出した。組織工学材料が染色体に与える影響評価系の標準化を目指す。

5) 昨年度は、正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) における細胞増殖に関わる遺伝子の発現について調べた。特に hMSC の *in vitro* での継代培養期間における細胞の増殖能の変化やそれに伴う遺伝子発現等の変化について検討した。その結果、*in vitro* で hMSC の継代培養を続けると次第に増殖能が下がっていくことが分かった。そこで今年度は、このような培養中の細胞の変化について、細胞老化という観点から検討を行った hMSC の継代数 1, 7, 13 代目のものについて、細胞老化の指標となる Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) についてそれぞれ染色したところ、#7, #13 で青く染まっている細胞が認められた。TGF $\beta$ 3 と TGF $\beta$ RIII について hMSC の *in vitro* での継代培養

期間におけるそれぞれの mRNA 発現レベルの変化について検討した。その結果、どちらも継代培養による変化は認められなかった。

hMSC を *in vitro* で継代培養することによって、TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 の mRNA 発現が上昇し、それに伴いレセプターの TGF $\beta$ RI が上昇して、さらに Smad3 を介して核内に影響を及ぼし、老化を伴う細胞増殖抑制が起こる可能性が示唆された。

TGF $\beta$ 1 と TGF $\beta$ 2 (それぞれ 5ng/mL) を細胞に添加し、それぞれの細胞を SA- $\beta$ -Gal 染色した結果、老化細胞の増加が認められた。さらに、5-bromo-2'細胞中の DNA 複製能を調べたところ、BrdU の取り込み量は低下しており、細胞老化を引き起こすことが示された。TGF $\beta$ 1 と TGF $\beta$ 2 を添加する事によって hMSC における細胞周期制御因子である p53、p21、p16 の mRNA 発現は有意に上昇した。

hMSC の増殖能に及ぼす FGF-2 の影響について、FGF-2 を添加した細胞では同じ培養期間のものでもほとんど老化細胞は認められなかった。さらに、BrdU の取り込み量については、FGF-2 を添加していない細胞では継代培養を続ける事によってその取り込み量は低下したのに対し、FGF-2 を添加する事によってその低下を抑制し、FGF-2 は hMSC の老化を抑制することが示唆された。

TGF $\beta$  のレセプターである TGF $\beta$ RI と TGF $\beta$ RII の mRNA 発現レベルは、hMSC の培養期間が長くなるにつれて上昇したが、FGF-2 による影響は見られなかった。FGF-2 の影響としては、p53 の発現レベルを有意に低下させた。p21 及び p16 については、細胞の継代培養を続ける事によっておこる mRNA 発現レベルの上昇が FGF-2 によって抑制された。以上の事から、FGF-2 は hMSC における TGF $\beta$ 2 及び細胞周期制御因子である p53、p21、p16 の発現上昇を抑える事によって、つまり、FGF-2 は TGF $\beta$  からのシグナル伝達系へ作用して細胞周期に影響を与える事によって hMSC の増殖能上昇や老化抑制などの効果を発揮する可能性が示唆された。

6) 三次元アルギン酸ゲル中に増殖した細胞数の測定において、Tetracolor one と Nakalai SF が比較的实际の細胞数に近い結果を得た。

6) 3次元培養を行う際に、RGD と PHSRN が共存したアルギン酸ゲルを用いるとウシ軟骨細胞の2次元培養とは異なり、ヒト軟骨細胞の分化が促進し、且つ肥大化を生じない事を示した。3次元培養下の細胞数測定方法の標準化を目指す。

7) 間葉系幹細胞を脂肪分化培地中で3次元培養し、脂肪細胞が特異的に産生し培地中に放出されるアジポネクチン量の定量を行った。細胞中の中性脂肪量との高い相関関係が得られた。3次元培養物の分化過程を非破壊的かつ連続的に評価できることを見いだした。

8) フィブロインスポンジ内の組織学的所見は培養後3日目から細胞外基質の産生が認められ、培養日数に伴いフィブロインスポンジの表層及び pore 内に細胞外基質に取り囲まれた細胞の増殖が見られた。Magnetic Stirring System を用いることによって、異染色性の高い良好な軟骨組織を得ることができた。

9) ミニブタの軟骨欠損部位への埋植試験のうち、FG埋植(細胞有り、無し)6ヶ月、SZ埋植(細胞有り、無し)6ヶ月の埋植及び取出が終了している。肉眼的所見では、SZ(細胞有り)では、埋植部分の表面は比較的スムーズであり光沢も周囲正常軟骨部分と遜色はなかった。SZ(細胞無し)では表面部分に凹凸が観察されるとともに、中心部に亀裂が生じている個体もあった。FGでは細胞のあり無しのどちらにおいても、光沢は認められず、へこみが観察された。また、縫合糸の後と考えられる痕跡が周囲正常軟骨に認められた。組織学的所見では、SZ(細胞有り)では、アルシアンブルー及びサフラニンO染色陽性部分が大半を占めていた。SZ(細胞無し)ではアルシアンブルー及びサフラニンO染色陽性部分が少なく、軟骨再生が不十分であると示唆された。FGでは細胞のあり無しのどちらにおいても、アルシアンブルー及びサフラニンO染色陽性部分が殆どなく、軟骨再生が生じていない事が示唆された。力学的所見では、1)動的粘弾性は、各再生軟骨部位より試験試料を採取し測定した。SZでは貯蔵弾性率( $E'$ )、損失弾性率( $E''$ )とともに、細胞有のほうがcell無しよりも正常軟骨に近い値を示していた。FGでは $E'$ 、 $E''$ とともに、正常部位よりも再生部位の値が高くなってい

た。これは再生部の状態が良くなかったため、厚さの測定値誤差が大きく動的粘弾性試験における圧縮ジグとの接触状態が十分確保できなかったことが原因となった可能性がある。2) Indentation は、室温、生理食塩中で測定した。正常軟骨が最もひずみが小さく、次いでSZ(細胞有り)、SZ(細胞無し)となっている。FGでは、正常部位より再生部のひずみ量が低くなっていたにもかかわらず、動的粘弾性試験の $E'$ および $E''$ がその逆となっており、再生された組織が軟骨のようにスムーズな水の移動を可能とするような構造ではなくなっていた。3) 超音波は、Maximum Magnitude(強度)についてはSZ及びFGのどちらも細胞有りの方が測定値は高く、SZ(細胞有り)は正常軟骨と同等の数値を示した。4) Echo Duration(表面粗さ)については試験試料間による有意な差は認められなかった。

5) 構造学的所見 MRI 画像診断 通常 MRI 及び Diffusion Tensor 法により埋植部位の構造を画像化し、軟骨修復の状況評価を行った。SZ(細胞有り)では正常軟骨部位と同様のコラーゲン繊維の配向が確認されたが、SZ(細胞無し)では正常軟骨部位とは異なった配向を示した。FGにおいては細胞のあり無しに関わらず、コラーゲン繊維の配向は殆ど観察されず、軟骨の再生は進行しなかったと考えられた。FG埋植群及びSZ(細胞無し)埋植群に比べ、SZ(細胞有り)埋植群ではMRI画像からも、正常(骨)の状態に近くなっていることが示された。

#### 10) i) ALP 活性測定における $\beta$ -TCP の影響

間葉系幹細胞を2次元培養で骨分化させ、経時的に回収した細胞抽出液を $\beta$ -TCP添加群と $\beta$ -TCP無添加群に分け、ALP活性を測定した。その結果、細胞抽出液に $\beta$ -TCPを添加すると35~85%のALP活性の低下が認められた。

#### ii) 3次元培養した骨芽細胞のALP活性の測定

間葉系幹細胞を $\beta$ -TCPに播種し、14日間骨分化した培養骨のALP活性を測定した結果、ALP活性が測定可能であった。培養骨のDNA量によりALP活性値を補正しようと考えたが、DNA量の測定がうまく実施できなかったため、培養骨1個あたりのp-nitrophenol量で活性を示した。また、培養骨の

オステオカルシンを測定しようとしたが、10%ギ酸で抽出を行うと、 $\beta$ -TCP も一緒に溶解してしまい、中和ができなかった。また、イオン除去カラムによりカルシウムイオンの除去を行ったが、それでも測定ができなかった。

iii) フローサイトメーターによる間葉系幹細胞、および骨芽細胞の細胞表面マーカーの解析。

骨髄から得られた間葉系幹細胞、およびこれを骨芽細胞へ分化誘導した際の細胞表面マーカーの解析を行った。フローサイトメーターで解析の結果、間葉系幹細胞では CD44 が陽性、CD140b が弱陽性、STRO-1 と ALP が陰性を示した。この細胞を骨分化させた 7 日目の初期骨芽細胞 (ALP 活性陽性) では、CD44 が弱陽性に、CD140b も弱陽性に变化した。STRO-1 には変化が認められなかったが、骨芽細胞のマーカーである ALP は陽性にシフトした。

1 1) 前処理に用いる前の培地を 0 日目とし、3 日間交換した培地の成分を経時的に比較した。

D-MEM と OBM を使用した結果、両結果とも Ca・Mg・P のイオン濃度は有意に減少しており、これらの無機イオンがアパタイト・コラーゲン複合体に吸着したことが示唆された。特に、Ca イオンの吸着量が多かった。前処理後のアパタイト・コラーゲン複合体上で MG63 を培養し、前処理の有効性を確認できた。本前処理を施すことでアパタイト・コラーゲン複合体上での細胞培養が可能になった。正常ヒト骨芽細胞 (生後 1 日女性) をアパタイト・コラーゲン複合体上で培養した方がハイドロキシアパタイト上で培養するより高い ALP 活性を示した。また、別のロット (35 歳男性) の NHOst を用いた場合、増殖能が低く評価できなかった。

12) 細胞の生着を確認するための細胞ラベルの方法を検討し、細胞染色時の至適蛍光色素濃度を 25ug/ml とし、ラベルした細胞の増殖・分化能を in vitro で評価できた。In vivo での検討を行った結果、3 週後にラベルを確認できたが、10 週後では、確認できなかった。軟寒天コロニー形成法で、腫瘍細胞の検出が可能であった。腫瘍細胞の検出限界を明らかにした。

## 臨床評価

13) 再生軟骨 i) 軟骨代謝マーカー

II 型コラーゲンの分解の指標 : Collagen Type II Cleavage (C2C)、Procollagen Type II C-Propeptide (CPII)

アグリカンの分解の指標である Aggrecan Chondroitin Sulfate 846 Epitope (CS-846) cartilage oligomeric protein (COMP)

関節液中の測定のためのヒアルロニダーゼ処理条件を決定した。現在、サンプル測定中である。

ii) 総アグリカン量、コンドロイチン 6 硫酸、コンドロイチン 4 硫酸、ヒアルロン酸、ケラタン 1 硫酸、ケラタン 2 硫酸の、尿中および血清中濃度を測定 データ処理中である。上記のうちいくつかは、レントゲン上の変形性関節症性変化を出現していないが、関節鏡で関節軟骨表面の損傷が認められた症例で、血清中で上昇していた。

14) 再生骨組織: 通常の人骨 (NEOBONE) 移植のみを行った症例の造影 MRI 所見で、術後 6 ヶ月では、造影 MRI で人工骨充填領域に内部に向かって約 1cm の環状の造影所見を認めた。その内側の非造影範囲は経時的に縮小し、術後約 1 年以後に撮影した MRI では充填領域最深部までほぼ均一に造影された。<sup>99m</sup>Tc-MDP 骨シンチ (SPECT) でも、経時的に、周辺部から内部に向かって、集積が広がり、骨再生が進行することが明らかとなった。自家骨髄培養細胞導入人工骨移植の症例でも、同様の結果を示した。

15) バイオ血管: 現在まで 47 症例での移植が終了している。手術死亡例は無いが、遠隔死亡を一例認めた。これは再生血管に起因するものではなく術後心機能不全による遠隔死亡であった。再手術は一例に認めた。この際に採取した組織片より、良好な内皮化、中膜の形成を認めた。遠隔期に狭窄増を認めたものは 4 例で 3 例にバルーン血管形成術を施行した。最長 4 年半の経過観察で、癌化、破裂、石灰化、悪性新生物の発生は認めていない。遠隔死亡 1 例以外は元気に外来に通院中である。

16) 心筋再生: i) 心筋梗塞モデルラットを用いた治療 MI 群は、C 群に比し、有意に左室収縮率 (EF) の改善を認めたが、MS 群は MI 群よりも有意に EF の改善を認めた。また、MS 群においてのみ左室収縮末



期面積、拡張末期面積の有意な縮小を認めた。組織学的には、C群における梗塞部は、繊維化し非薄化していたのに対し、MI群では、細胞を注入した部位に筋肉様の組織が島状に見られ、その部における径の増大は見られたが、注入部以外の場所では繊維化し非薄化していた。MS群では、梗塞部上に均一に細胞が分布し、有意に壁厚の増大が見られた。また、3群を比較した繊維化率では、C群に比し有意にMI、MS群での減少が見られたが、MS群の減少率が顕著であった。梗塞部における血管数の比較では、C群に比し、MI群、MS群ともに有意に増加していたが、MS群において顕著であった。免疫染色では、c-kit、Sca-1、CD34+細胞が、MS群において有意に増加していた。また、HGFやVEGFの増殖因子は、MS群で有意に増加していた。

ii) 拡張型心筋症ハムスターを用いた治療 心臓超音波検査にて、左室拡張末期径(LVDd)はC、T群で拡大傾向を示したが、S群において有意に拡大傾向は抑制された。収縮率(EF)はC群に比べT、S群で有意に改善したが、S群では長期にEFの改善が維持された。免疫組織染色では、 $\alpha$ 、 $\beta$ -sarcoglycan、dystroglycanの発現が認められたのはS群のみであった。また、S群で有意に生命予後の延長が認められた。以上よりDCM hamsterに対し、筋芽細胞シート移植により心筋組織および心機能が改善し、生存が延長されたことより、筋芽細胞シート移植によりDCMの組織再生の可能性が示唆された。

iii) DCMモデル犬を用いた治療 心臓超音波検査にて治療群において術後早期より有意に良好な収縮能、左室壁厚の増大、内腔の縮小を認めた。また、Color Kinesisによる左室機能評価では、特に拡張能において治療群が有意に改善を認めた。組織学的検討では、筋芽細胞シート移植群において、移植細胞の生着が確認された。シート移植群では線維化の抑制、新生血管の増加、心筋細胞のアポトーシスの抑制などの心筋リモデリング抑制効果が認められた。

## D. 考察

### 材料開発

牛由来コラーゲンと同等の原料となる他の生物種

コラーゲンについては、有効性等について代替しうる医療用コラーゲンを得ることにより、BSEフリーの医療用コラーゲン開発が可能となる。成長因子を特殊ゲルに含有させコンタクトレンズ形状とし、角膜上皮欠損家兎で治癒効果のある新規材料開発となりうる。陰イオン修飾多糖は、各種医療材料および組織工学材料として、安全性と有効性の高い生分解性材料としての候補材料となる可能性がある。

### 評価技術の標準化

#### 細胞組織医療機器に用いられる幹細胞等の細胞遺伝学的安全性評価法の開発

解析プローブの選定 ヒト癌細胞株の染色体異常解析で示すように、同じ細胞でも使用するプローブによってその検出異常頻度は大きく異なる。従って、陽性結果の見落としをなくするためには、少なくとも2種類のプローブによる評価が必要と考えている。

1番染色体特異的DNAプローブ 癌細胞株3種だけではあるが、1番染色体では100細胞前後の観察で100%の異常を検出できている。また、予備的検討を行なったhMSCにおいても、2%の異常を検出しており、4番染色体よりは異常をより検出し易いと考えられ、構造異常の解析の観点からは1番染色体の方が解析プローブとして適切であると考えている。

4番染色体特異的DNAプローブ 昨年度に実施したHeLa細胞を用いた解析結果から、癌細胞株において4番染色体では異常が誘発されにくい傾向にある、すなわち、4番染色体は解析プローブとして適切ではないのではないかと考えられたが、本年度にさらに2種類の癌細胞株の解析を行なった結果、4番染色体の異常頻度は細胞の種類によって異なるのであり、4番染色体特異的な傾向ではないことが判明した。しかしながら、hMSC細胞の解析を行なった結果、観察細胞数は異なるものの、異常が全く検出されていない。同程度の数の観察で1番染色体を用いる解析では、2%の異常が検出されている。健常人では4番染色体に異常がおきにくい傾向があるため、統計学的解析を行なうには観察細胞数を増やす必要がある。hMSCの増殖速度はin vitro継代培養とともに低下し、十分な数の分裂中期像を得ることが難しい。

従って、4 番染色体特異的 DNA プローブの使用は本目的には適当ではないと考えられる。

c-myc プローブ 本年度追加した2種の癌細胞株の解析結果より、c-myc をプローブとした時の染色体と間期細胞で検出される異常の頻度と型は比較的良く一致しており、c-myc の解析は間期細胞でのみの解析で代表できると考えられた。間期細胞で観察できることの利点を応用したのが、本研究の hMSC を用いた c-myc による解析である。5 ヶ月もの長期に亘って継代を続けた hMSC では、当然分裂中期像は殆どなく、1 番あるいは4 番染色体による解析は不可能である。間期細胞で観察可能であったため、継代数 14 (#14)においても十分な細胞数のもと明らかな陽性結果を検出することができたものと考えられる。c-myc は本目的に合った解析プローブと考えられる。観察細胞数の検討 c-myc の解析事例を用いて、観察細胞数の検討を行なった結果、最低 300 細胞の観察が必要であることが判明した。300 細胞観察すれば、培養開始直後の細胞集団に対して、培養 5 ヶ月後の細胞集団での高い異常頻度を確実に陽性と判定できるからである。

継代 5 代目の標本で、c-myc をプローブに解析した結果 9%の異常が観察されたが、100 細胞の観察では判定を下せないことがわかった。しかしながら、一つ問題点が生じた。培養開始直後の細胞集団の中で、陽性と判定してしまう場合があり得ることである。いわゆる False positive が生じるわけである。今回の検討は、c-myc のデータについてのみのであり、他のプローブ、また、他のロットの hMSC の結果も含めて、総合的に検討する必要があると考えられる。昨年度の増殖、細胞形態に関する研究、および本年度の hMSC の FISH 解析の結果から、1 ヶ月までの培養期間であれば染色体異常が増加することはないのではないかと、すなわち「細胞遺伝学的には安全である」といえるのではないかとこの感触を得ている。今後、p53 についても検討を加える予定である。c-myc では増幅が観察対象であったが、p53 では欠失が観察対象となる。本年度の研究で c-myc 観察を行なったのと同じ標本で p-53 の欠失を観察し、検出感度等を比較検討したいと考えている。また、実際に

標準化されて実施する側にたてば、解析プローブ数は少なく、観察細胞数も少ない方が、経費、時間とも節約でき実施し易いことになる。プローブ、観察細胞数についても、更に検討を加えていく予定である。

ヒト間葉系幹細胞への増殖因子の影響について hMSC の細胞老化を伴った増殖能低下に TGF $\beta$  が関与している可能性が示唆された。hMSC は *in vitro* で培養を続けると次第に増殖能が低下してくる。細胞組織医療機器の材料として幹細胞 (hMSC) を有効に利用するためには、このような細胞増殖能低下を抑える必要性があり、培養に細胞の増殖因子が利用されている。FGF-2 は hMSC における TGF $\beta$  2 及び細胞周期制御因子である p53、p21、p16 の発現上昇を抑える事によって、つまり、FGF-2 は TGF $\beta$  からのシグナル伝達系へ作用して細胞周期に影響を与える事によって hMSC の増殖能上昇や老化抑制などの効果を発揮する可能性が示唆された。この様に、hMSC を効率的に増殖させるために FGF-2 は有効である事が分かった。また、本研究においてその作用メカニズムの一端を明らかに出来たと考えられる。今後は、この FGF-2 の作用が決して hMSC に無限増殖能を与えるものではなく、細胞の老化を遅らせるものである事を証明していく予定である。また、今年度の成果により、hMSC における TGF $\beta$  の発現の制御が細胞の増殖能へ関与する事が示されたので、さらに FGF-2 以外にも hMSC の TGF $\beta$  発現を制御する因子という観点から新たな増殖因子の探索を試みていきたい。

組織再生材料評価方法の開発に関する研究 幹細胞等を用いて再生医療への応用を行う場合には、殆どの場合、細胞を播種し体内で組織再生を行うための足場である Scaffold を必要とする。再生医療を利用した製品を研究開発するにおいては、細胞や培養時の培地のみならず、その Scaffold も含めての安全性、有効性を検討しなければならない。効率よく調製した細胞-Scaffold 複合体の検討を行うためには、非侵襲的な手法を用いてその複合体を破壊すること無しに様々な検討を行うことが理想である。しかし、複合体内の細胞数を非侵襲的に測定できる一般的な

手法ですら、未だに開発されていない。組織再生を速やかに行うために様々な Scaffold の開発研究が行われており、材料が非侵襲的な測定方法に与える影響も考えなければならない。そのような研究に用いる材料としては、細胞接着性ペプチドである RGD と PHSRN を修飾したアルギン酸からなるゲルは最適と考えられた。第 1 に、そのゲル上で培養した細胞の分化が促進されること、次に、細胞をゲル内に簡単に包含できるので細胞の 3 次元培養が可能であること、さらには、調製したゲルは架橋に用いたカルシウムイオンをキレートすることで簡単に溶解でき細胞の回収が簡便であること。これらがその理由である。平面培養で、しかも動物細胞を用いた実験で細胞の分化促進が確認され、ヒト細胞を 3 次元培養した場合にも同様の分化促進効果が認められるかは定かではない。そこで、非侵襲的な細胞数測定法に関する検討を行う前に、ヒト軟骨及び骨芽細胞を用いて、調製したアルギン酸ゲルを用いての 3 次元培養を行い、各細胞分化マーカーの発現変化の検討を行った。平面培養において分化促進機能を発揮する最適な RGD:PHSRN 存在比で調製したアルギン酸ゲル内で 3 次元培養を行った場合には、ヒト軟骨、骨芽細胞いずれの細胞を用いた場合でも、分化マーカーの発現が増強された。ウシ軟骨細胞と比較して、ヒト軟骨細胞を用いた場合にはその肥大化を示す結果は得られなかったことから、同じ細胞でもその由来となる動物種が異なる場合には、ゲルから受ける影響が異なった。今回の目的である、Scaffold 中の細胞数を非侵襲的に測定出来る手法を見いだすため、今回調製した修飾アルギン酸を用いて検討した。

非侵襲的な細胞数の評価方法として有望と思われた MTT 法ではあるが、いずれの試薬を用いても、培養 1 週間後においては実際の細胞数を反映した正確な結果は得られなかった。しかしながら、テトラゾリウム塩で電子キャリアー試薬とを含んだ試薬である Tetracolor One と Nakalai SF とを使用した場合には、使用したアルギン酸ゲルの種類に関わらず、培養 2 週間後は比較的实际の細胞数に近い結果を得た。事前に、使用する材料で細胞数を特定の MTT 試薬で測定すると、どの程度実際の細胞数とズレが生

じるかを予め測定しておけば、製品の同一性を証明するためには、この手法は十分有用であると考えられる。来年度も検討を行う。

二次元及び三次元培養時における細胞中のオイルレッド O 染色量と、培地中に放出される細胞が産生したアジポネクチンの量と高い相関関係を有していることから、hMSC を脂肪に分化培養したときの分化の指標として培地中のアジポネクチン量の定量が有用であると考えられた。本方法は従来の破壊的な方法とは異なり、酵素処理などの煩雑な操作が不要な簡易的な手法である。基材への初期細胞播種密度の影響を調べる実験を行ったところ、hMSC から脂肪への分化にはある程度の細胞播種密度が必要である。低血清濃度で培養した結果、血清濃度に依存して分化の程度が変化したことなどから、種々の三次元培養基材が細胞増殖に与える影響についても評価可能であることが示唆された。

軟骨の機能は関節の可動性を維持すること及び衝撃に対する抵抗性を獲得維持することである。衝撃と一言で入っても幾つかのパターンがあり、そのパターンにより抵抗性の獲得メカニズムには違いがあると考えられている。Static Loading, Dynamic Loading, Impact or Excess Loading がそれぞれである。ASTM においては Static Loading に対する評価のために aggregate modulus、Dynamic Loading に対する評価のために Poisson's ratio、Impact or Excess Loading に対する評価のために permeability の測定を当てていると考える。ただ aggregate modulus を正確に測定しようとする、1 点の測定で 120 分も必要となる (equilibrium stress が一定になるために 120 分必要であった)。また、これらの測定には軟骨又は再生部分を摘出し評価する必要があり、更に、複雑な系と長い時間が係るという欠点がある。このように動物での評価の段階までのみしか使用できない方法であれば、動物での評価結果を基に人への外挿が難しくなってしまうことになる。動物での評価方法が人においても使用でき、患者にとって侵襲度が低くならなければ、有用な評価とは言えないと考える。

国内の大学等研究機関において研究開発されている評価方法及び装置については、海外で行われているものに比べ種々の利点を持っているものが多く、臨床（臨床研究・治験及び実用）に耐えうるものもあり、非常に有望であると考えられる。ただ、他の評価方法との関連性については検討されていないのが現状である。現時点までの評価結果から考えると、力学試験では個体差及び測定誤差が比較的大きいこと、また多孔質体の特性により再生過程での数値変動が異なることが問題となると考える。（各々の多孔質体での軟骨再生過程での数値変動を把握する必要が生じてくる。）一方 MRI 及び Diffusion Tensor 法は被験動物又は患者への侵襲度は無いこと、コラーゲンの配向まで画像化されることより、軟骨再生の評価としては有用であると考えられる。

昨年度決定した分化パラメータの分析方法を用いて、培養骨の評価を実施した。予備実験として  $\beta$ -TCP が ALP 活性に対して影響があるか確認したところ、ALP 活性に対して負の作用を持つことが示された。これは、ALP がカルシウムやリン酸によって活性阻害を受けるためであることと、 $\beta$ -TCP が多孔質であるために、タンパク質が吸着することが考えられた。実際に 2 週間骨分化した培養骨から ALP を抽出し、活性測定を行ったところ、ALP 活性の上昇が認められた。しかし、先に述べたように、この値はイオン類によって負の影響を受けている可能性があるため、細胞抽出液からスピンカラムを用いて試料を濃縮し、イオン類を除去した。その試料を改めて希釈することでイオン濃度を下げてから、活性測定を行った。その結果、1.2~1.5 倍の ALP 活性の上昇が認められた（data not shown）。このため、スピンカラム等の処理をせず測定した培養骨の ALP 活性値は、 $\beta$ -TCP により負の影響を受けたものである。今回は  $\beta$ -TCP を使用しているが、ほかのカルシウムやリン酸を含む担体でも、ALP 活性に負の影響を与えることが考えられる。今後は、予備的な試験を事前に行い、担体が ALP 活性に対して影響がないことを確認してから、実験を行う必要がある。

培養骨から 10%ギ酸で Gla 型オステオカルシンを溶出させ、測定を行おうとした。しかし、培養骨の

担体自体が 10%ギ酸で溶解し、大過剰のカルシウムが溶出した。このため、単純に中和という作業では、水酸化カルシウムが析出するため、測定が不可能であった。そこで、イオン除去カラムを用いて、カルシウムを除去した後に中和を行い、オステオカルシンの測定を行おうとした。しかし、もともと分化培養 14 日目では Gla 型オステオカルシンの分泌量は少なめであり、カラムを通すことで 2.5 倍の希釈を受けるので、いずれの方法でも測定限界以下になってしまった。また、オステオカルシンは分化培養 10 日目以降にならないと顕著な上昇が認められない（昨年度報告書）ので、早期の分化評価マーカーとしては不適切であると考え、これ以上の検討は中止した。

このように担体である  $\beta$ -TCP が、分化パラメータの分析に影響を及ぼしたことから、担体の影響を受けない分化パラメータの検討を行うことにした。 $\beta$ -TCP の場合、担体を破砕することで細胞を完全に抽出することができるため、分化に伴い変化すると考えられるマーカーについて解析を行うことにした。骨分化に伴い、細胞表面マーカーが変化すると考えられたので、まず平板培養した間葉系幹細胞と骨芽細胞をフローサイトメーターにより解析を行った。その結果、間葉系幹細胞では、一般的な幹細胞マーカーと言われている CD44 陽性、CD140b 弱陽性、STRO-1 陰性、骨芽細胞マーカーである ALP 陰性であった。STRO-1 は、間葉系幹細胞のマーカーとして論文で提唱されている表面マーカーであるが、今回解析した数ロットの細胞ではいずれも確認できなかった。そこで、Cambrex 社より購入したヒト間葉系幹細胞について、上記のマーカーおよびそれ以外の幹細胞マーカーで解析を行ったところ、弊社培養の間葉系幹細胞と一致した結果が得られなかった（data not shown）。これは、弊社では骨髄から間葉系幹細胞を増殖させる際に増殖因子類を添加しているために、幹細胞表面の表現系が変化しているためではないかと考えられた。なお、弊社の幹細胞は多分化能を維持していることは確認してある。このため、多分化能を有している間葉系幹細胞でも初期の培養条件によってかなり違った形質を持つことが考えられ、