

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JAG 1 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	網脇祥子 …… 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 龍兒 …… 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法の確立に関する研究	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－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－（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

賞受賞講演（3月28日、日本薬学会

第128年会、仙台）

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

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

所属 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部

研究者 梅澤 明弘

研究要旨 ヒト細胞を供給源とした再生医療が循環器領域、整形外科領域、皮膚形成外科領域、口腔外科領域で始められた。このような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ためにそれぞれの細胞移植における有効性、安全性の検証システムを確立する。安全性の検証システム確立のために、遺伝子改変技術を用いた新規プローブの作成に成功した。

分担研究者

- (1) 東京医科大学医学部 黒田雅彦
- (2) サミット・グライコリサーチ株式会社
伊藤潤平
- (3) 徳島大学ゲノム機能研究センター 原英二
- (4) 株式会社ピリオドック 小杉好紀
- (5) 株式会社TMセルリサーチ 石橋卓也
- (6) 中外製薬株式会社 黒丸 修
- (7) 大塚製薬株式会社 澁谷 功

A. 研究目的

ヒト間葉系細胞を供給源とした再生医療が循環器領域、整形外科領域、皮膚形成外科領域、口腔外科領域で始められた。このような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ためにそれぞれの細胞移植における有効性、安全性の検証システムを確立することを推進する。そのための基盤として、新規プローブを開発し、その医療への応用可能性について検証する。

手術検体に由来する細胞が極めて高い増殖能・分化能を認めていることから、バイオソースとして独自の細胞供給源の集団として考えている。これらの細胞は、日本国内で進められている様々な幹細胞に対するフィーダー能を有するのみならず、その細胞自身が多分化能を有していることは極めて重要な意義を有する。このヒト細胞を用い、生体内で骨組織を形成するヒト骨芽細胞を調整し、その表現型の解析、骨芽細胞移植の方法を確立する。また、時間的・空間的に、生理的な運動機能を提供できる生物学的材料の実現に向けての細胞移植における有効性、安全性の検証システムを確立する。

また、心臓・血管系においては、心筋梗塞、狭心症等の冠状動脈性心疾患が重篤な障害を引き起こす重大な問題となっている。米国では、冠状動脈性心疾患に 1240 万人が罹患しており (AHA statcal update)、虚血性心疾患が心臓病における死因の第 1 位となっている。日本国においては、心臓病は癌とならぶ死亡率を示しており、高齢化社会に伴い年々増加している。心臓病のうち、虚血性心疾患患者数は年間 100 万人以上と報告されている。このような疾患治療にかかる費用は膨大であり、効率的な治療が求められる所以である。米国における心臓血管疾患患者に対して再生医療により治療したとすると、おおよそ 70 億ドルの市場があるとされ (Cardiovascular Device Update)、同様に日本国内では 700 億円の市場規模となる。このような状況下において、生物学的材料としてヒト細胞により代償する応用面での可能性を特に追求したい。それぞれの細胞移植における有効性、安全性の検証システムを確立する面から必要となることは主に 3 点ある。第一は、収縮しているヒト骨髄間質細胞が、心筋組織に移植する際に「本来の心臓が有するポンプ機能を果たすための、細胞の収縮の位相がずれることによる、周期的に絞り出すようなシステム」に対して同期して機能するか。第二は、ヒトにおいて、全く同様の「生物学的材料システム」として再現性の高い系を確立できるか。第三は、時間的な同調だけでなく心筋組織 (心臓そのもの) として空間的に適切な構造をとった上で、正確に情報伝達を担うようにシステム化できるか。以上の点を鑑み、時間的・空間的に生理的な運動リズムを提供できる生物学的材料を、本研究ではヒトに内在する材料に求め、その実現性に向けて細胞移植における有効性、安全性の検証システムを確立する。

ヒト正常細胞の分裂寿命を規定する分子メカニズムを明らかにし、正常な細胞機能を保持したまま分裂寿命の延長を可能にする薬剤等のスクリーニングシステムを構築することにより、細胞移植における特に安全性の検証システムを確立する。

B. 研究方法

培養担体および細胞播種

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。骨髄由来のヒト間葉系細胞を 10%ウシ血清加 DMEM 培地に懸濁、 1×10^7 個の細胞を 4cm^2 の複合化シートに播種し 37°C にて培養を行った。

細胞接着性評価

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、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。

動物モデルへの移植

国立成育医療センター動物実験規約に従い、C3H/He または NOD-scid IL-2R 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。

組織学的評価

評価は検体採取時におけるレントゲン像、パラフィン切片による H-E 染色、血管侵入評価のため Factor VIII, CD31, CD34 の免疫染色を行った。

子宮内膜幹細胞を利用した子宮内膜症原因遺伝子の単離と治療への応用

細胞治療用ヒト月経血由来の間葉系細胞の調製と細胞表面マーカーの検討を行い、遺伝子発現プロファイリングを HRF 処理及び非処理

の細胞にて gene chip (Affymetrix) を用いて行い、細胞の有する性格を詳細に検討した。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、方法等を検討した。さらに、抗アレルギー剤や、抗炎症薬の有効性を子宮内膜幹細胞をもちいることで検討した。

移植の供給源となる細胞のラベル

ヒト骨髄液より樹立した骨髄間質細胞を用いた。細胞培養液に Resovist を添加、細胞を一定時間暴露後することで細胞への導入を行った。導入の確認は鉄染色 (Berlin Blue 染色) にて行った。SPIO でラベルした細胞の T2 短縮効果の発現は、NMR spectrometer (NMS 120 Minispec, 0.47T) にて細胞 suspension の T2 を CPMG 法で測定し確認した。SPIO ラベル細胞 1×10^6 個 / 0.2mL を免疫不全マウスの大腿部筋層内に注入、T2-weighted fast spin-echo (TR/TE = 3000/80) にて MR イメージングを行うとともに、組織像との比較を行った。

また、細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。ヒト骨髄間質細胞のラベルならびに通常の病理学的評価に耐えられるマーカーの同定を行った。マーカーはクラゲ由来の蛍光色素 (Green fluorescent protein)、 β -ガラクトシダーゼ、Y 染色体、BrdU を候補に考えている。しかし、発現が低くとも検出感度が高いものであり、毒性を鑑み、病理検査に耐えられるものであれば検討対象とする。

分化した骨格筋細胞、心筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞を、それぞれの組織に移植し、生体内での生着を明らかにすること。全ての研究は、医療を念頭においた場合の妥当性を検討することである。

1. 我々が独自に開発した分化誘導プロトコールに従い、骨髄間質細胞から目的とした分化した細胞を作製する。その作製された細胞においても発現が見られるような転写調節領域を準備する (ミオシン軽鎖, トロポニン, ネスチンなどのプロモーター)。

2. 細胞分化プロトコールの更なる改良を目指す。特に分化効率の向上および生着後脱分化しないことにしぼり、検討を加える。

3. 移植したマーカーが日常業務で使用する免疫組織化学により、同定可能かどうかを検討する。最終的には、組織における分化を病理学的に検討する。

4. 長期間にわたる組織への生着の有無を検討できるようなマーカーを同定する。
5. マーカー自体の細胞毒性を検討する。

ヒト細胞における p16 転写阻害による安全性の確保

1). ヒト正常線維芽細胞における細胞老化の誘導に重要な働きをしている p16/RB-経路の作用機序を様々な分子生物学および細胞生物学的手法により調べる。

2). p16INK^{4a} 遺伝子の発現を化学発光により正確かつ高感度に検出出来るベクターを開発し、そのベクターを組み込んだ細胞を用いて薬剤スクリーニングに応用できる系の確立を行う。

子宮内膜症動物モデルの作成

動物モデルとして一般的に用いられるマウスやラットにおいては内膜症モデルを作ることは不可能とされてきた。そこで、今年度我々は、ヒト子宮内膜由来細胞に DIF-1/HRF を高発現させた細胞を樹立した。その後、本細胞をヌードマウスに移植することで動物モデルの作成を試みた。

リコンビナント MAH レクチンの精製

MAH の等電点 pI が 4.2 であることから、予備検討を実施し、陽イオン交換樹脂 (SP Sepharose) を用いた精製をおこなった。バキュロウイルス培養上清を 50mM クエン酸バッファー pH3.0 で透析した後、SP Sepharose に吸着させた。50mM リン酸バッファー pH6.0 1M NaCl の 20、40、60、80、100% 溶液でステップワイズに溶出した。その回収液を SDS-PAGE に供した。

リコンビナント MAH レクチンの糖結合活性の測定

リコンビナントレクチンの糖結合活性を常法に従い赤血球凝集反応および ELISA 法で測定した。また、各種の糖鎖基相化し表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、各レクチンの結合特異性を調べた。

リコンビナント MAH の安定性の検討

リコンビナントレクチンを 0.5mg/ml in 50mM リン酸バッファーに調整し、-20℃、4℃、37℃で

の安定性を調べた。さらにプロテアーゼ阻害剤、DTT(還元剤)を添加し、安定性への影響を調べた。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、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、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「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する。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う予定である。

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研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。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る。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う。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 結果

培養担体および細胞播種と細胞移植

C3H/He または NOD-scid IL-2R 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。

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。

間葉系細胞の心筋への分化と生体内の心拍動に関する検討

マウス骨髄より CD34・CD117 陽性、CD45 陰性の細胞株 KUM2 を取得し、本細胞が心筋に対する分化能を有することを見出した。間葉系に対する分化能のみを有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞は CD90 陽性、CD34・CD45 陰性である。また同様のマウス骨髄間葉系幹細胞 (KUM9) は CD34・CD117・CD45 陰性である。これらの結果は、間葉系組織を誘導する幹細胞には階層構造が存在することを示している。また間葉系幹細胞は成体組織において、骨髄だけではなく骨格筋や真皮などの結合組織にも存在することを示している。

心筋細胞が *in vitro* で大量に確保できるという状況が現れれば、それらの細胞を用いた細胞移植という方法論で、末期重症心不全の治療に用いることが可能であろう。*In vivo* において、胎児心筋細胞を用いて心臓への移植の可能性が証明されて以来、遺伝子を導入した細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、無処置の骨髄細胞などがドナー細胞として用いられてきた。また、胎児性幹細胞を用いた実験も報告されているが、倫理的問題を含んでいる。現在、ヒト胎児由来の間葉系細胞および間質由来の間葉系細胞の培養に成功し、転写因子を導入することで細胞移植の供給源として提供できるよう研究をすすめている。

移植細胞の生着に関する生着の検討

細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。鉄を含む SPIO を用いることで、新しいナノバイオ・トレーサシステムを確立した。日常の診断検査に有用であることを特に念頭におき、再生医療・細胞移植における MRI (磁気共鳴画像診断装置) で撮影する際の造影剤として SPIO を、移植する細胞のトレーサーとして用いた。

従来の MRI の造影剤である SPIO を、目的の細胞に試験管内にて導入した。細胞移植後、SPIO による MRI 造影剤を用いることにより、細胞移植の妥当性を検討した。Resovist 添加培地 48 時間の暴露で 98% の細胞に Berlin Blue 陽性を確認した。spectrometer にて細胞量に依存した T2 短縮効果を認めた。移植後 3 時間の T2 強調像にて移植部位に境界明瞭な低信号領域が確認され、組織学的に同領域に生存する移植細胞の局在を認めた。低信号領域は移植後 8 週にても確認可能であった。しかし、組織学的には移植後 2 週以降においてレシピエント由来の Berlin Blue 陽性細胞出現が確認され、4 週では移植部位にて大多数を占める結果であった。また非ラベル細胞を移植したコントロール群では MR 信号の変化を認めなかった。

子宮内膜幹細胞を利用した子宮内膜症原因遺伝子の単離と治療への応用

DIF-1/HRF の子宮内膜症における標的因子の同定を試み、数種類の遺伝子候補を挙げる事ができた。用いた細胞は、月経血由来の培養細胞であり、その形態から間葉系細胞であることがうかがわれた。DIF-1/HRF により、発現量が大きく変動する遺伝子は数種類程度であり、その数は極めて少ない。DNA チップの精度から考えると誤差による可能性があり、半定量的な RT-PCR によりそれらの遺伝子の変動を確定する必要がある。

ヒト細胞における p16 転写阻害による安全性確保

1) ヒト正常線維芽細胞において p16INK4a の発現上昇が起こり細胞老化が誘導されると、DNA 複製のみならず、細胞質分裂に必要な蛋白質の発現も抑制されることを見出した。

2) BAC ベクターに組み込まれた完全長のヒト p16INK^{4a} 遺伝子にインフレームでルシフェラーゼ遺伝子を融合させることにより、遺伝子構造を変えずに p16INK^{4a} 遺伝子の発現を化学発光でモニターできるベクターを開発し、そのベクターを組み込んだヒト細胞株を樹立した。

ヒト子宮内膜を有する動物モデルの作成

ヒト子宮内膜由来の細胞に DIF-1/HRF の導入を行った。その後、本細胞をヌードマウスの腹腔内に移植し、ヒト子宮内膜由来細胞の生着率を検討した。その結果、コントロールの細胞、DIF-1/HRF を高発現した細胞ともに生着が確認できなかった。このような結果をふまえて、現在子宮内膜特異的に DIF-1/HRF 及び aromatase

を高発現するトランスジェニックマウスの作成を試みている。具体的には、子宮内膜に特異的に発現する hydroxysteroid(17- β) dehydrogenase 2 遺伝子のプロモーターを使って DIF-1/HRF 及び aromatase を高発現するマウスを作成を行っている。

精製したリコンビナント MAH レクチンの安定性

リコンビナントレクチンの -20°C 、 4°C 、 37°C での安定性を調べた。また、プロテアーゼ阻害剤、還元剤添加の安定性に与える影響を調べた。 -20°C 、 4°C で 2 週間保存した場合には添加剤の有無にかかわらず活性の低下は見られなかった。しかし、 37°C 保存では全ての条件で 3 日保存で活性が完全に消失した。このサンプルを SDS-PAGE で見てみると、 -20°C 、 4°C では 36kDa 付近に安定したバンドが観察された。 37°C 保存でも同じ位置にバンドが観察されたが、一部多量体化したと考えられる高分子位置にもバンドが観察された。この結果は、 37°C 保存による急速な活性の低下は、リコンビナント蛋白の分解によるものではなく、保存に伴い三次構造の変化が起き活性が低下したものと考えられた。

D. 考察

骨髄間質細胞は、臨床において、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に移植が行われ始めている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。そのような状況の中で、近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、*in vivo* において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。本研究の成果によって、これらの間葉系細胞を用いた細胞治療の実現化に向けて、月経血、臍帯血、末梢血を供給源として示されたことは骨髄のみならず、他の組織を利用して細胞を得ることができることを意味している。また、本研究は骨髄間葉系細胞を用いた研究成果を生かす点でも極めて重要な意味をもち、政策医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題である。

成育バイオリソースに由来する細胞のみで骨形成可能である。細胞と足場を組み合わせることにより、任意の形状・大きさの骨を形成することが可能となっている。整形外科領域のみならず、心筋への細胞移植が次々と進められている現在、新たな供給源を次々と増やしており、提供可能な状態としている。高分子担体には天然

高分子と合成高分子のふたつが存在する。天然であるコラーゲンは細胞保持性に優れているものの、形状の維持が困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究が進んできたが、疎水性であるが故に細胞接着性に乏しいという欠点が存在する。両者の問題点を解決するため、合成高分子にて作製したスポンジ形状をした培養担体にコラーゲンを複合化することで初期強度に優れ、かつ細胞接着性に優れた培養担体を開発、骨・軟骨再生における有用性を報告してきた。均一な細胞分布、形状制御の簡便さを目的として新たにシート形状をした複合培養担体を作製し、さらに骨髄間質細胞由来骨芽細胞を用い、新規複合化シートの形状制御を要する骨再生への有用性を明確にすることは新規医療ビジネス戦略として妥当であると同時に社会への責務を果たすことになるものである。本研究によって、適度な強度を有する合成高分子シートに、コラーゲンマイクロスポンジを複合化することで高い細胞接着性が得られることが明らかとなった。従来の合成高分子で作製したスポンジ形状体は、立方体内部への細胞播種が困難なため均一な組織を得にくいという欠点があった。形状をシート状にしたことで細胞の分布を均一化することが可能となったものと考えられる。頭蓋骨欠損モデルでの移植においては、本シートのみでの骨形成が起こらなかったことより、細胞治療の有用性が示された。可塑性のある複合化シートは細胞播種後に重層化することで厚みを持たせたり、丸めることで管状構造を作製、さらに既成の構造物に貼り付けることで任意の形状を作製することが可能となるため手術中での操作が容易である。荷重に耐えうる強度には至らないため、骨基質のひとつであるハイドロキシアパタイトの表面に用いたり、早期の骨分化を促すために成長因子の固相化も可能である。さらに使用する細胞の接着に有用な細胞接着因子を付加することでより高い接着性も期待できるなどその応用範囲は広いと思われる。本複合化シートに用いた PLGA およびアテロ化コラーゲンはそれぞれ FDA 基準を満たし既に臨床にて使用されているものであるため早期の臨床化が見込まれる。また、この新規培養担体は骨再生のみならず、軟骨再生や他細胞移植に用いる培養担体として優れているものと考えられる。

細胞移植を行う場合、細胞培養することが要求され、その過程で生じる細胞老化では単に DNA 合成が阻害されているだけと考えられていたが、実は細胞質分裂も阻害されていることが示され、このことがより安定に増殖停止を起

こしている理由の一つと考えられる。

子宮内膜症の動物モデルも、病態の解析や治療薬の開発に大きな意義を持つと考えられる。我々も今年度様々な試みを行ったが、内膜症マウスモデルに関しては成功していない。今後は、特に DIF-1/HRF に注目しトランスジェニックマウスの作成を目指していく。

本年度の研究でリコンビナントレクチンを再現性よく生産・精製する技術が確立された。この研究によって得られるリコンビナントレクチン、改変レクチンを用いることで再生医療に用いられる幹細胞のプロファイリング、クラスタ解析などが加速されることが期待できる。

植物レクチンのリコンビナント蛋白に関しては、その発現・精製は困難と言われてきた。過去にも大腸菌などで限られた報告を見るに過ぎない。我々はバキュロウイルス発現系を用いることで十分な活性を持つリコンビナントレクチンを発現、生産、精製する技術が確立することができた。また生産されたリコンビナント体の安定性も充分実用に耐えるものであった。バキュロウイルス発現系での残された課題は発現量の向上である。本研究では 2-3mg/L レベルの最終精製品を得ることができるが、ウイルス液の調整の改良、培養方法の改良等を加えることで更に収量をあげることが次年度の課題と考えられた。また今回目的は達成されなかったが、大腸菌での発現・生産はまだ改良余地があると考えられ、これも次年度の課題である。精製法はほぼ確立されたがその精製度にはまだ改良余地も残されている。より再現性の高い糖鎖解析データを得るためには純度の高いリコンビナントレクチンを用いることが好ましいことは言うまでもない。幸いなことに我々のリコンビナントレクチンには FLAG タグが負荷されており、これを利用した更なる精製が可能である。次年度には FLAG タグに対する抗体を用いたアフィニティークロマトによる精製を加えることで精製度の改善を図る予定である。得られたリコンビナントレクチンの安定性は実用に耐えるものと予想されるが、研究期間が短かったため十分な経時変化を追えていない。次年度はこの経時変化観察を延長し、安定性を確認し、実用に耐えるリコンビナントレクチンの規格を確立する予定である。

E. 結論

再生医療における細胞供給システムとして幹細胞の分離、分化誘導、寿命延長技術、移植材料の開発、細胞の規格設定、医薬品 GMP 基準に

準ずる施設立ち上げが、精力的に進められている。再生医療は整形外科領域で始まっており、再生医療・細胞移植を確固たるものとするうえでも、骨への分化と生体内における足場の開発は極めて重要な意味を持つ。本研究の最終的なゴールは、骨機能の発現のために生物学的材料として確立することである。そのためには、ヒト細胞の材料システムの確立は急務である。ヒトの材料研究の開発は必要不可欠であり、マウスと同様の材料システムの確立を実現すべきである。マウス骨芽細胞の研究は、その細胞の樹立から生物学的特性さらにその細胞を用いた生体への移植まで主任研究者らが独自に行ってきた。骨髄間質を生物学的材料とする研究グループは多数存在するが、骨への分化を利用し、材料システムの確立までを視野に入れた点が重要となる。

心筋分化に関する研究開発の特色は、ヒト幹細胞を用いた研究であり、*ex vivo* で医療を念頭にした、ヒト細胞の安全な増殖・分化誘導を行うため、臨床応用に極めて近い。同時に *in vitro* における検証系を有する。また、研究室内で得られている細胞の心筋分化能力はほぼ 90%と異常に高く、日本国内で進められている心疾患に対する細胞移植が加速度的に増加することが予想される。さらに、本研究開発の遂行により心筋分化誘導法を改善させ、心筋誘導率の低い間葉系幹細胞であっても心筋誘導率を改善し、心臓分野のヒト幹細胞治療の壁であった低い心筋誘導率を克服し、動物実験で観察されたような、生体心移植に取って代わるほど高い心機能改善効果を得られることになる。

細胞培養過程に生じる細胞老化、細胞形質転換の点は今後の課題となっている。様々なストレスにより p16 遺伝子の発現が上昇すると、DNA 合成のみならず、細胞質分裂を阻害する機構が働くことを明らかにした。また、BAC ベクターを用いたシステムにより、ヒトの p16INK4a 遺伝子の発現を正確にかつ、高感度にモニター出来るベクターを開発し、そのベクターを組み込んだヒト細胞の樹立に成功した。

従来、細胞移植の妥当性については、移植された組織を採取することにより、病理組織学的に検討をすすめてきた。しかし、患者さんの侵襲は大きく、さらに移植する細胞に対して、遺伝子を導入することでラベルする必要が存在した。遺伝子を導入することは、そのランダムなクロマチンへの導入により、細胞の形質転換の可能性を完全に否定できず、その医療への応用は否定的に考えられてきた。さらに導入する遺

伝子がクラゲ由来の蛍光色素および細菌由来の酵素であったために、その安全性・妥当性に関し、医療現場での使用が難しい面は否定できない。本研究において SPI0 による MRI 造影剤の可能性を追求し、再生医療にむけてナノテクノロジーを用いた新素材を応用することにより、医療面における安全性を保持したままで、移植後、数時間から 1 日といった治療後極めて早期に、MRI により検証できる。このことは、極めて低侵襲性の、再生医療に対する検証システムが開発されることを意味する。

また、ヒト細胞を増殖させ、疾病に対する新たな細胞治療法の開発に関する基盤的情報を得ることができ、それらについての情報を米国・欧州のデータベースに登録できた。再生医療・細胞治療に用いる細胞の安全性の検証システムはこのような基盤的情報のデータベース構築からそれを利用するバイオインフォマティクスの確立、さらに実際に細胞を取り扱う際の作業工程におけるバリデーション項目を医薬品製造レベルまで高めていくことが必要不可欠であるとともに、生命倫理に照らし合わせた一つ一つの手続きを踏むことが重要である。

細胞移植に供する培養細胞の検証システムに関する新規プローブについては、本年度の研究でリコンビナントレクチンを再現性よく生産・精製する技術が確立された。この研究によって得られるリコンビナントレクチン、改変レクチンを用いることで再生医療に用いられる幹細胞のプロファイリング、クラスター解析などが加速されることが期待できる。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto, S., Shibuyaa, I., Kusakari, K., Segawa, K., Uyama, T., Shimada, A., **Umezawa, A.** "Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts." *Biochim Biophys Acta.*, 1725:57-63.2005
2. Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, **Umezawa A**, Li XK. "Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood." *J Lab Clin Med.* 146(5): 271-8.2005
3. Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, **Umezawa A**, Hata J, Ogawa S. "Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis." *Lab Invest.* 85(10): 1210-23. 2005
4. Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, **Umezawa A.** "Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential." *Mol Cell Biol.* 25(12): 5183-95. 2005
5. Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, **Umezawa A**, Fujimoto J. "Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2." *Biochem Biophys Res Commun.* 15;332(4): 1004-11. 2005
6. Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, **Umezawa A.** "Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 74(1): 511-9. 2005
7. Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, **Umezawa A**, Mukai K. "Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL." *Cancer Lett.* 18: 221(1):21-8. 2005
8. Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, **Umezawa A**, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K. "Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa." *J Bone Miner Metab.* 23(2): 123-33. 2005
9. 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.* 16(3): 1491-9. 2005
10. Laman, H. et al., *EMBO J.*, 24, 3014-3116, 2005.
11. Han, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 280, 31548-31556, 2005.
12. Oikawa, K, Ishida, T, Imamura, T, Yoshida, K, Takanashi, M, Hattori, H, Ishikawa, A, Fujita, K, Yamamoto, K, Matsubayashi, J, Kuroda, M, Mukai, K: Generation of the novel monoclonal antibody against TLS/EWS-CHOP chimeric oncoproteins that is applicable to one of the most sensitive assays for myxoid and round cell liposarcomas. *Am J Surg Pathol* in press
13. Kuroda, M, Oikawa, K, Ohbayashi, T, Yoshida, K, Yamada, K, Mimura, J, Matsuda, Y, Fujii-Kuriyama, Y and Mukai, K: A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett*, 579: 167-172, 2005.
14. 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*, 92: 290-293, 2005.
15. Oshiro, H, Ebihara, Y, Serizawa, H, Shimizu, T, Teshima, S, Kuroda, M and Kudo, M: Idiopathic Retroperitoneal Fibrosis Associated with Immunohematological Abnormalities. *Am J Med*, 118:782-786, 2005.
16. Kuroda, M, Oikawa, K, Yoshida, K, Takeuchi, A, Takeuchi, M, Usui, M, Umezawa, A and Mukai, K: Effects of 3-Methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer Lett*, 221:21-28, 2005.
17. Yoshida K, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M: Detection of fusion genes in sarcomas using paraffin-embedded tissues. *Neuropathology*, 25:263-268,2005.

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

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18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社