

表1. hMSCの*in vitro*培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった1,898遺伝子のうち機能や疾病に有意に関わる528遺伝子について

Category	Significance	Associated Genes
Relevant Functions & Diseases		528
Protein Synthesis	6.79E-16	96
Molecular Transport	1.06E-07	64
Protein Trafficking	1.06E-07	41
Protein Degradation	1.92E-05	32
Post-Translational Modification	2.67E-05	104
Cellular Assembly and Organization	4.68E-05	99
Lipid Metabolism	1.02E-04	29
Small Molecule Biochemistry	1.02E-04	85
Gene Expression	2.13E-04	28
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4.55E-04	39
Gastrointestinal Disease	5.57E-04	7
Nervous System Development and Function	5.57E-04	11
Organismal Injury and Abnormalities	5.57E-04	3
Cell Death	5.81E-04	132
Cell Morphology	5.98E-04	35
RNA Post-Transcriptional Modification	5.98E-04	27
Cancer	6.22E-04	75
Connective Tissue Disorders	6.22E-04	48
Cellular Compromise	1.30E-03	15
Hematological Disease	2.09E-03	17
Hematological System Development and Function	2.09E-03	10
Immune and Lymphatic System Development and Function	2.09E-03	7
Immunological Disease	2.09E-03	13
Cellular Function and Maintenance	2.66E-03	46
Connective Tissue Development and Function	2.91E-03	38
Protein Folding	4.15E-03	12
Skeletal and Muscular Disorders	5.31E-03	23
Tumor Morphology	6.40E-03	18
Amino Acid Metabolism	6.77E-03	50
Cardiovascular System Development and Function	6.77E-03	21
Cell Cycle	6.77E-03	84
Cellular Development	6.77E-03	25
Embryonic Development	6.77E-03	13
Genetic Disorder	6.77E-03	13
Tissue Development	6.77E-03	16
Viral Function	6.77E-03	11
Visual System Development and Function	6.77E-03	2
Respiratory Disease	9.21E-03	6
Metabolic Disease	9.42E-03	6
Cellular Movement	1.00E-02	41
Neurological Disease	1.00E-02	11
Reproductive System Disease	1.00E-02	38
Organ Development	1.51E-02	5
Organ Morphology	1.51E-02	18
Energy Production	1.64E-02	5
Immune Response	1.79E-02	4
Carbohydrate Metabolism	1.92E-02	2
Cardiovascular Disease	1.92E-02	9
Developmental Disorder	1.92E-02	4
Hepatic System Disease	1.92E-02	2
Reproductive System Development and Function	1.92E-02	5
Respiratory System Development and Function	1.92E-02	4
Vitamin and Mineral Metabolism	1.92E-02	2
DNA Replication, Recombination, and Repair	2.23E-02	15
Dermatological Diseases and Conditions	2.27E-02	3
Cellular Growth and Proliferation	2.55E-02	146
Renal and Urological Disease	2.99E-02	8
Cell Signaling	3.21E-02	5
Digestive System Development and Function	3.63E-02	2
Nucleic Acid Metabolism	3.63E-02	5
Tissue Morphology	3.63E-02	2
Renal and Urological System Development and Function	3.81E-02	6
RNA Damage and Repair	4.58E-02	4

表2. hMSCの*in vitro*培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった遺伝子のうち癌に有意に関わる75遺伝子について

Relevant Functions & Diseases (Cancer ; 75 genes)		Associated Genes	
tumorigenesis	tumorigenesis of fibroblast cell lines	8	8
size	size of leukemia cell lines	3	3
cell death	cell death of bone cancer cell lines	14	33
	cell death of breast cancer cell lines	22	
volume	volume of tumor	4	4
	volume of papilloma	2	
multiple hamartoma syndrome	multiple hamartoma syndrome	2	2
neoplasia	neoplasia of lymphoid organ	2	7
	neoplasia of organ	6	
	neoplasia of leukemia cell lines	2	
transformation	transformation of lymphoblastoid cell lines	2	4
	transformation of carcinoma cell lines	2	
vascularization	vascularization of papilloma	2	2
adhesion	adhesion of lung cancer cells	3	4
	adhesion of carcinoma cell lines	3	
	adhesion of lung cancer cell lines	3	
interphase	arrest in interphase of melanoma cell lines	3	3
cell movement	cell movement of cervical cancer cell lines	5	5
migration	migration of bone cancer cell lines	3	3
autophagy	autophagy of breast cancer cell lines	2	3
	autophagy of tumor cell lines	3	
cytostasis	cytostasis of hepatoma cell lines	2	2
detachment	detachment of cervical cancer cell lines	2	2
G1/S phase transition	G1/S phase transition of cervical cancer cell lines	2	2
juvenile intestinal polyposis	juvenile intestinal polyposis	2	2
latency	latency of lymphoma	2	2
formation	formation of lymphoma	6	6
binding	binding of tumor cells	5	5
	binding of cancer cells	4	
bladder tumor	bladder tumor	4	4
anoikis	anoikis of tumor cell lines	5	5
growth	delay in growth of tumor	3	3
apoptosis	delay in apoptosis of leukemia cell lines	2	21
	apoptosis of bone cancer cell lines	10	
	apoptosis of B cell lymphoma cells	3	
	apoptosis of prostate cancer cell lines	15	
attachment	attachment of melanoma cell lines	2	2
endometrioid carcinoma	endometrioid carcinoma	2	2
G1 phase	arrest in G1 phase of melanoma cell lines	2	2
gliosarcoma	gliosarcoma	2	2
invasion	invasion of kidney cancer cell lines	2	2
polarization	polarization of leukemia cell lines	2	2
progression	progression of gastric carcinoma	2	2
homing	homing of breast cancer cell lines	4	4
colonic polyposis	colonic polyposis	3	3
shape change	shape change of breast cancer cell lines	3	3
cell cycle progression	cell cycle progression of leukemia cell lines	4	4

Geneの中にMYCが含まれているもの

表3. hMSCの *in vitro* 培養50日以内にmRNA発現に変化のなかった遺伝子のうち細胞周期に有意に関わる84遺伝子について

Relevant Functions & Diseases (Cell Cycle ; 84 genes)		Associated Genes
cell cycle progression	arrest in cell cycle progression of B lymphocytes	2
	arrest in cell cycle progression of blood platelets	2
	cell cycle progression of leukemia cell lines	4
duplication	duplication of cells	3
	G1/S phase transition of cervical cancer cell lines	2
remodeling	remodeling of chromatin	8
	modification of chromatin	9
G1 phase	arrest in G1 phase of melanoma cell lines	2
	initiation of cell stage	7
cell stage	cell stage	70
	length of telomeres	5



Geneの中にMYCが含まれているもの

表4. MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の LPS 応答性

細胞株	LPS 濃度 (pg/ml)	IL-6 産生量 (pg/ml)
MM6-CA8	0	34.0 ± 0.4
	0.1	36.5 ± 1.1
	0.5	36.9 ± 1.0
	1.0	37.4 ± 2.4
	5.0	44.7 ± 3.8
	10	83.5 ± 4.4
	50	5773 ± 375
	100	14325 ± 389
THP-1	0	7.20 ± 0.1
	50	12.2 ± 1.6
	100	24.1 ± 2.9
	1 × 10 ³	51.6 ± 5.4
	5 × 10 ³	97.5 ± 2.2
	1 × 10 ⁴	131 ± 18
	5 × 10 ⁴	217 ± 12
	1 × 10 ⁵	258 ± 15
	5 × 10 ⁵	602 ± 69
	1 × 10 ⁶	854 ± 32
	5 × 10 ⁶	1369 ± 68
1 × 10 ⁷	1313 ± 121	

表5 LPS (TLR4)以外の TLR リガンドに対する MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞の応答性

	レセプター	LPS 含量 (EU/mg)	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	IL-6 産生量 (pg/ml)	
				MM6-CA8	THP-1
大腸菌 乾燥菌体	TLR2, 2/1, 2/6, 4, 5, 9	159×10^3	0	34.0 \pm 0.4	9.30 \pm 3.8
			0.0001	44.0 \pm 6.9	7.80 \pm 5.3
			0.0005	44.5 \pm 1.3	12.8 \pm 4.5
			0.001	51.3 \pm 3.5	14.2 \pm 6.4
			0.005	280 \pm 19	84.1 \pm 13
			0.01	1513 \pm 13	137 \pm 87
			0.05	13575 \pm 537	560 \pm 4.5
			0.1	15675 \pm 671	962 \pm 228
黄色ブドウ球菌 乾燥菌体	TLR2, 2/1, 2/6, 9	0.48	0	34.0 \pm 0.4	9.30 \pm 3.8
			0.001	34.7 \pm 0.7	8.10 \pm 0.1
			0.005	40.6 \pm 2.8	9.60 \pm 0.7
			0.01	70.5 \pm 0.6	11.1 \pm 1.6
			0.05	78.6 \pm 2.1	11.8 \pm 2.4
			0.1	213 \pm 7.1	12.8 \pm 1.1
			0.5	600 \pm 24	22.4 \pm 1.1
			10	12500 \pm 424	663 \pm 164
ペプチドグリカン	TLR2, Nod1	2.20	0	4.80 \pm 0.1	9.30 \pm 3.8
			0.001	1.20 \pm 0.1	11.6 \pm 3.5
			0.005	4.30 \pm 2.6	15.2 \pm 1.7
			0.01	13.2 \pm 3.1	18.5 \pm 1.0
			0.05	33.7 \pm 3.6	33.8 \pm 4.2
			0.1	113 \pm 31	72.3 \pm 26
			0.5	392 \pm 363	224 \pm 35
リポタイコ酸*	TLR2	18300	—	nt	nt
合成リポ蛋白質	TLR2/1	1.90	0	1.5 \pm 0.5	7.20 \pm 0.2
			0.1	468 \pm 3.5	1395 \pm 52
			1	6189 \pm 69.6	nt
			10	23735 \pm 516	2600 \pm 149
Poly (I:C)	TLR3	0.04	0	20.0 \pm 0.03	16.4 \pm 3.7
			1	25.9 \pm 0.13	nt
			10	29.5 \pm 0.08	23.3 \pm 4.8
			100	29.0 \pm 0.15	>500
R837	TLR7	nd**	0	20.0 \pm 0.03	16.4 \pm 3.7
			0.1	21.7 \pm 0.05	nt
			1	24.5 \pm 0.15	nt
			10	22.7 \pm 0.03	11.4 \pm 4.5
大腸菌 DNA	TLR9	3.44	0	20.0 \pm 0.03	16.4 \pm 3.7
			0.1	27.2 \pm 0.17	nt
			1	16.7 \pm 0.02	nt
			10	17.7 \pm 0.09	11.9 \pm 2.5

*EndoTrap 精製標品. **nd, not detect. ***nt, not tested.

表6. LPS 吸着材料(コラーゲン/HA 人工骨)からの LPS 回収方法

測定法	抽出法	希釈溶媒	LPS 実測値 (EU/mg)	LPS 回収率 (%)
エンドトキシ ン試験	精製コラーゲン / 1 mM 塩酸法	H ₂ O	0.20 ± 0.01	0.07
		H ₂ O Tris Buffer	5.6 ± 0.7 8.5 ± 0.4	2.0 3.0
	0.01M 塩酸法	H ₂ O	23.1 ± 1.6	8.1
		Tris Buffer	42.2 ± 0.8	14.8
	0.1M 塩酸法	H ₂ O	41.1 ± 2.7	14.4
		Tris Buffer	75.3 ± 5.4	26.3
HCPT	direct	—	68.0 ± 12	23.8

表7. Direct HCPT | による創傷被覆剤の微生物学的安全性評価及び過去のサーベイ試験結果との相関性

原材料	製品名	過去のサーベイ試験結果									
		エンドトキシン試験 (EU/g)					ウサギ 発熱試験** ($\Delta T_{max}, ^\circ C$)	HCPT with extracts**		Direct HCPT****	
		ガイドライン法	温水抽出 (50°C, 24 hr)	精製コラゲナーゼ /塩酸法	ホモジナイズ法	抽出濃度 (mg/ml)		IL-6 産生能 (pg/ml)	試料重量 (mg)	IL-6 産生能 (pg/ml)	LPS換算値 (EU/g)
コラーゲン	アピテン	nd*	nd	604	—	nt**	34.5	nt	1.08	2.10 ± 0.99	3.80
	インテグラン	1.32	3.70	18101	—	nt	22.7	nt	1.17	303 ± 32	431
	ヘリテン	nd	nd	1971	—	0.1	35.7	nt	1.22	5.90 ± 3.0	24.7
	バイオブレン	nd	nd	nd	—	nt	33.3	nt	1.06	7.40 ± 0.42	38.0
	ウレザック	1.29	2.58	21.5	—	nt	33.3	nt	1.29	5.10 ± 0.99	19.1
	テルダーミス	nd	98.2	1014	—	1.05	41.7	16960 ± 793	1.31	394 ± 34	449
	テルプラグ	2.01	320	7083	—	1.68	33.3	9850 ± 336	1.23	165 ± 14	311
	ノバコール	0.63	12.6	3.77	—	nt	14.3	1.6 ± 0.40	1.28	3.30 ± 0.71	9.64
	アロアスク	20.6	22.0	37.9	—	nt	50.0	74.9 ± 15	1.15	158 ± 16	328
	アロアスクD	2.88	4.60	3.07	—	nt	50.0	nt	1.18	15.5 ± 14	81.4
	インスタット	nd	1.80	nd	—	nt	11.1	nt	1.07	3.45 ± 0.92	12.5
アルギン酸	ソープサン	1168	2169	—	30308	1.06	25.0	1047 ± 262	1.18	8725 ± 879	11673
	アルゴダーム	152	894	—	12948	0.56	25.0	4640 ± 1392	1.29	47023 ± 5739	59949
	カルスタット	39.2	4440	—	848	1.15	25.0	9.5 ± 3.0	1.27	28.3 ± 9.3	144

* nd, not detect.

** 試料: 温水抽出液. *** nt, not tested.

**** 試料濃度: 固形試料 1 mg/ml-培地

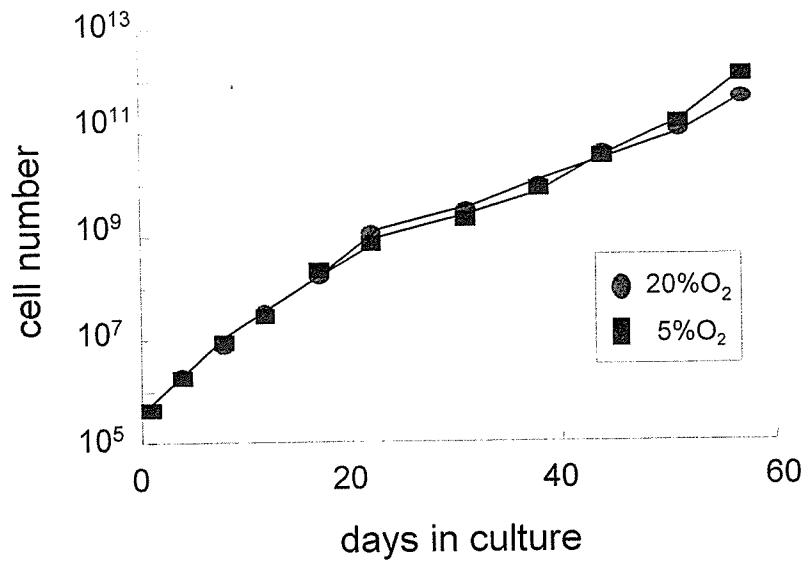


図1. hMSCの増殖に及ぼす酸素濃度の影響

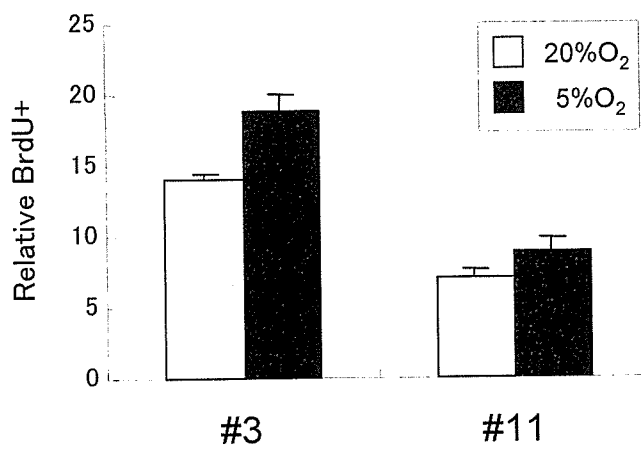


図2. hMSCのDNA複製能に及ぼす酸素濃度の影響

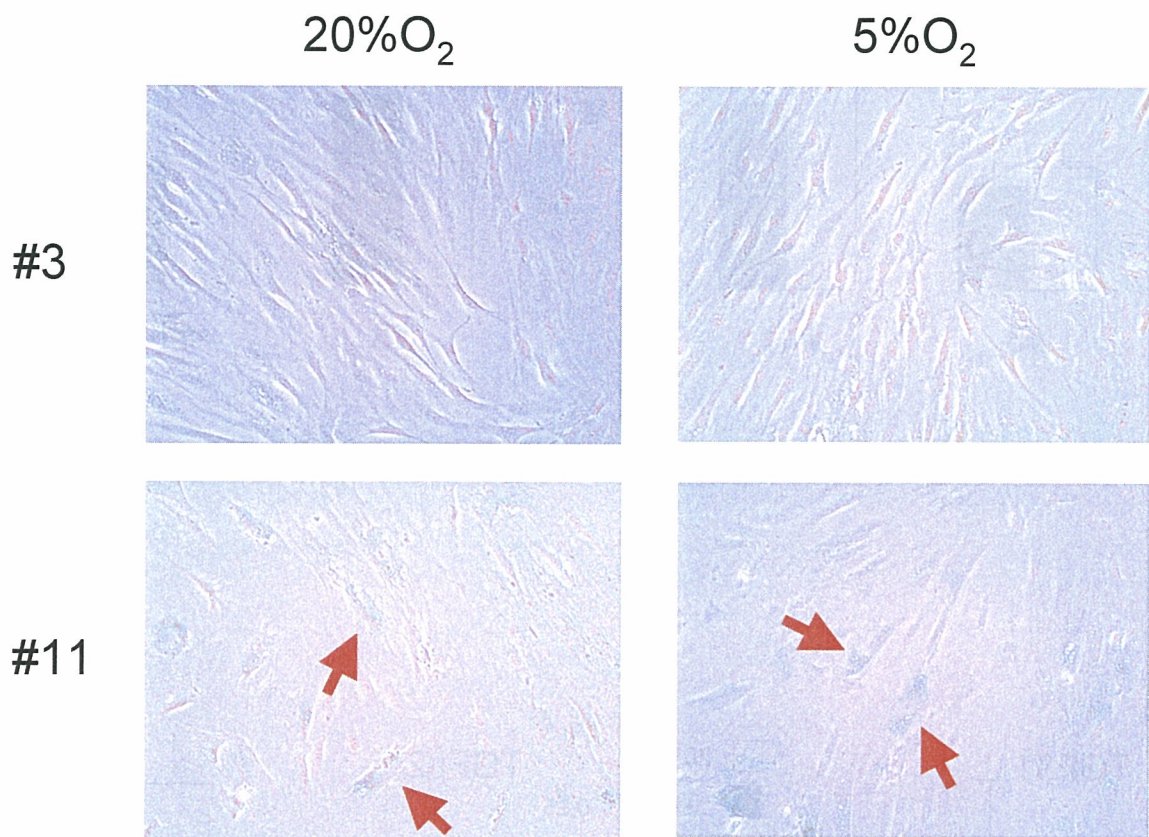


図3. hMSCの細胞老化に及ぼす酸素濃度の影響

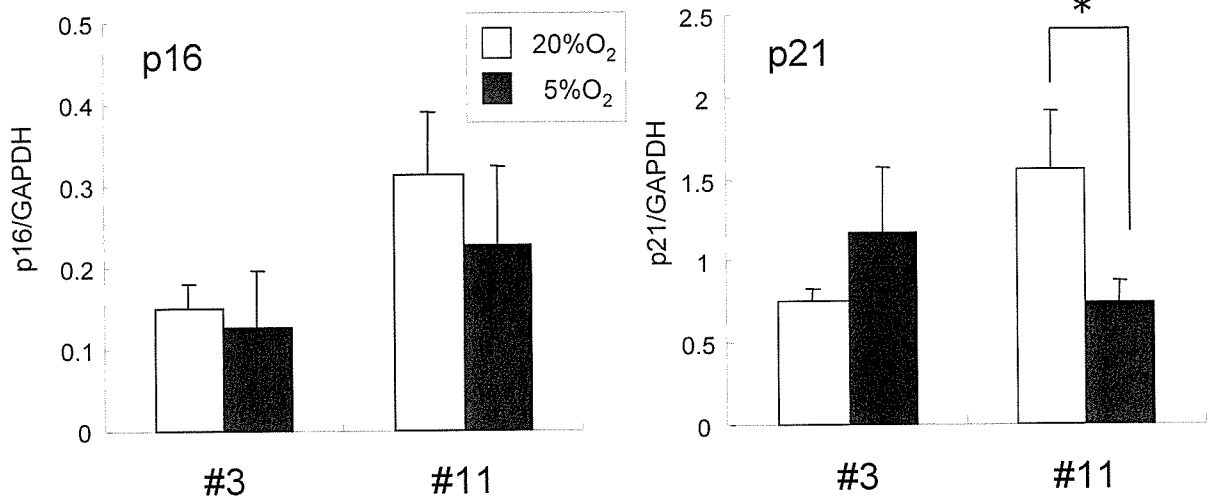


図4. hMSCのp16, p21のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

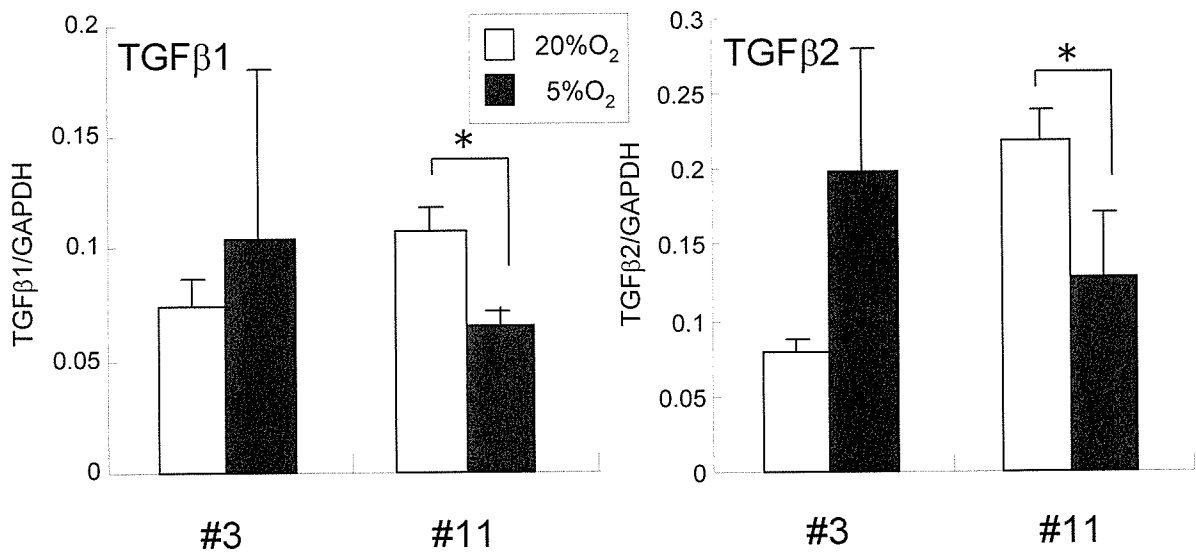


図5. hMSCのTGFβ1, TGFβ2のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

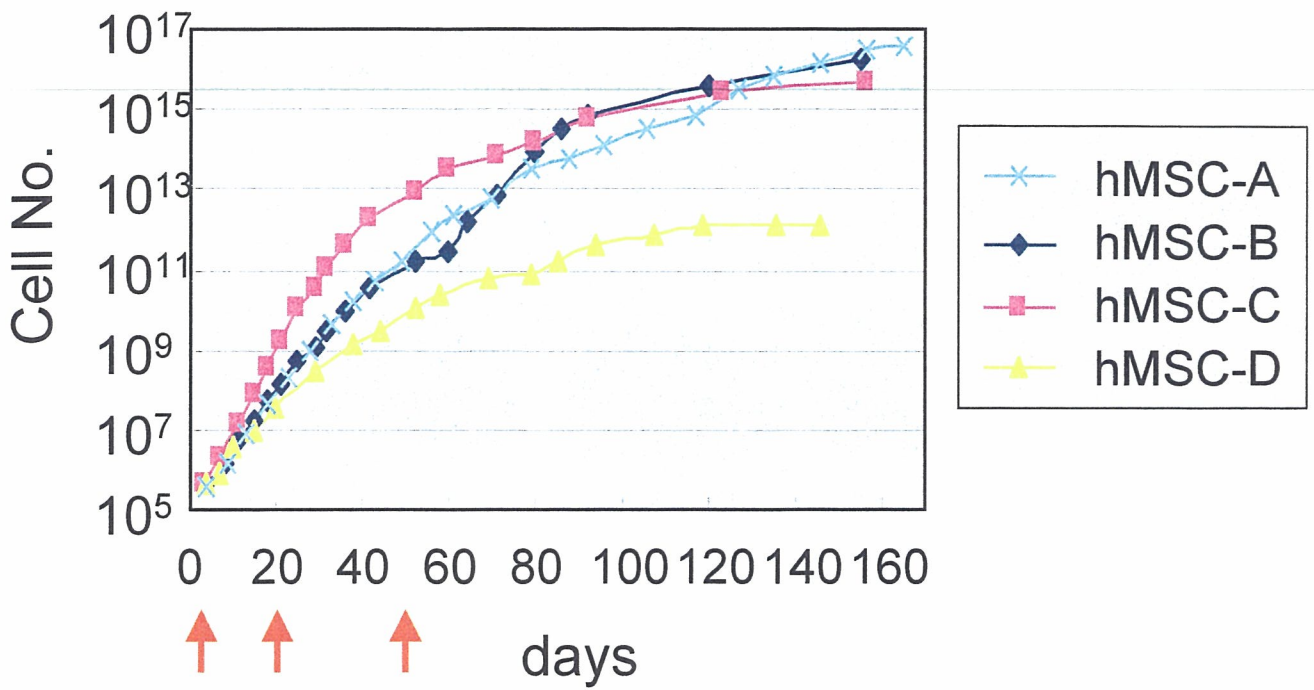


図6. 4ドナー由来のhMSCの増殖

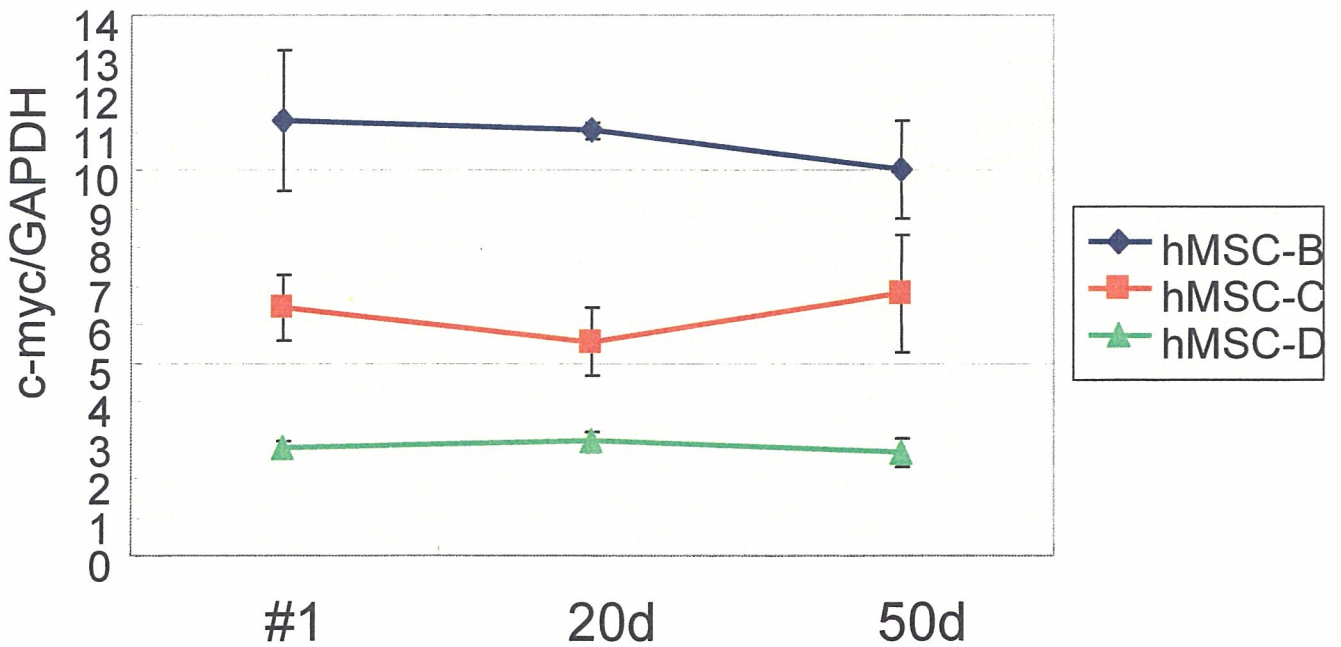


図7. hMSCの*in vitro*培養期間におけるc-mycのmRNA発現の変化

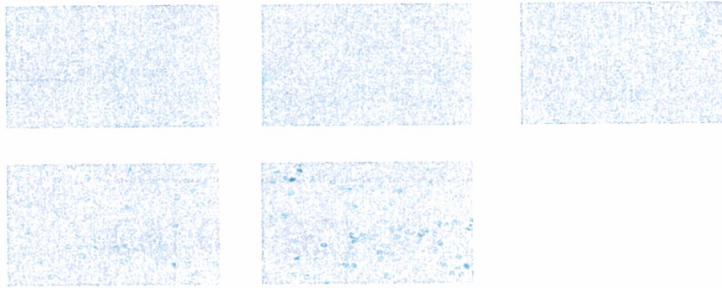


図8. 継代に伴う細胞形態と β -ガラクトシダーゼ染色性の変化

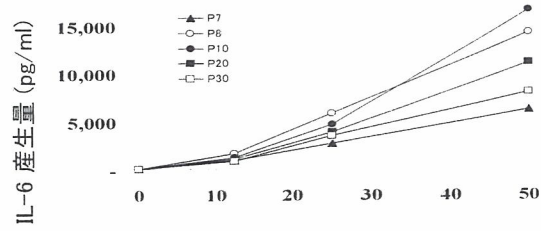


図9. 継代に伴う MM6-CA 細胞の LPS 応答性変化

II 分担研究報告

1. 幹細胞の癌化等の抑制・培地等による
有害作用の防止

澤田 留美

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）
分担研究報告書

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

幹細胞を用いた細胞組織利用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。特に細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であろう。そこで今年度は、まずヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）の *in vitro* 培養時における酸化ストレスの影響について検討することにした。hMSC を通常の培養条件（20%O₂）下と生体内環境に近い培養条件（5%O₂）下とでそれぞれ培養し、増殖や老化及び細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。その結果、hMSC の増殖や老化には培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。このことから、hMSC の培養において、通常の培養条件である 20%O₂ 濃度では 5%O₂ 濃度に比べて明らかな酸化ストレスは認められないことがわかった。次に hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。hMSC の *in vitro* での培養期間中に 4 ドナー全てにおいて mRNA 発現に変化のなかった遺伝子を抽出したところ、1,898 遺伝子あり、そのうち機能や疾病に関わる遺伝子は 528 遺伝子であった。その 528 遺伝子のうち、cancer と cell cycle における多くのカテゴリーに含まれる c-myc に着目し、定量的リアルタイム PCR にて c-myc の mRNA 発現レベルを測定したところ、各ドナーとも培養期間における発現レベルに変化は見られなかった。このことから c-myc は hMSC の *in vitro* 培養期間中の安全性評価系に用いられる遺伝子の候補の一つとして挙げられると考えられた。

A. 研究目的

「再生医療」を目指して、細胞組織利用医療機器の研究開発が現在盛んに行われている。

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ことから「再生

医療」への利用が期待されている。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であり、さらに神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も報告されているため幅広い医療分野での利用が期待されている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術及び *in vitro* での

培養技術も確立されている。それぞれの由来によって分化能などの細胞の性質の違いなども示されつつあり、間葉系幹細胞は細胞組織利用医療機器の材料として最も実用に近いものの一つであると考えられる。

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。このため、幹細胞を用いた細胞組織利用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。特に細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であろう。

本研究の最終目的として、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している。そこでまず昨年度は、幹細胞の癌化の危険性について *in vivo* と *in vitro* の両系で検討した。*in vivo* の系としては、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週間観察したところ、腫瘍の形成は認められなかった。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行った。

また、幹細胞（hMSC）は *in vitro* 培養を続けることによってその増殖能が下がり老化してくることをすでに確認している。そこで今年度は、まず hMSC の *in vitro* 培養時における酸化ストレスの影響について検討することにした。さらに、昨年度における検討により、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 が挙げられるとの見解を示したが、昨年度の検討は1ドナーからのMSCを用いた実験であったため、今年度は、hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。

B. 研究方法

1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）の *in vitro* 培養時の酸素濃度の影響について

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、5%CO₂、95%Air 中の a) 20%O₂（通常の状態）、b) 5%O₂（生体内に近い状態）の2条件下で培養した。そして、それぞれの条件で培養し、継代3

代目と 11 代目の細胞を用いて検討した。

2) SA- β -Gal 染色による細胞老化の検討

SA- β -Gal 染色は Senescence Detection Kit (Oncogene Research Products, San Diego, CA)を用いて行った。

3) BrdU 取り込み量による DNA 複製能の検討

BrdU 取り込み量の測定は Cell Proliferation ELISA, BrdU (Chemiluminescence) (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany)を用いて行った。

4) Total RNA の調製

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

5) Real time RT-PCR による mRNA 発現レベルの定量的解析

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 hMSC の p16、p21、TGF β 1、TGF β 2 の mRNA 発現レベルについて Real time RT-PCR 法にて検討した。

p16、p21 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。それらの PCR 反応は、95°C で 10 秒、それぞれのアニーリング温度で 15 秒、72°C で 12 秒を 40 サイクル行った。一方、TGF β 1、TGF β 2 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。

全ての 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。

2. 複数のドナー由来の hMSC における *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化の比較

1) 細胞培養

hMSC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) を 4 ロット用いて、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地でそれぞれ培養した。それぞれのドナー情報は表 2 に示す。そして、*in vitro* 培養開始後最初の継代時 (#1)、培養期間 20 日及び 50 日の hMSC を用いて検討した。実際に幹細胞を臨床で用いることを考慮し、比較的妥当な培養期間を選択した。

2) Total RNA の調製

4 ドナー由来の hMSC のそれぞれの培養期間の細胞から、RAeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

3) DNA アレイ解析

それぞれの hMSC から調製した total RNA を用いて、Affimetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。Technical duplicate にて行った。

4) 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 の mRNA 発現量について Real time (RT)

PCR法にて測定した。forwardプライマーとして 5'-GCGAACACACAACGTC-3'、reverseプライマーとして 5'-CAAGTTCATAGGTGATTGCT-3'を用いた。PCR反応は、Roche Light Cycler (version 4.0)にて 95°Cで5秒、50°Cで10秒、72°Cで12秒を40サイクル行った。

C. 研究結果

1. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の *in vitro* 培養時の酸素濃度の影響について

1) 細胞の増殖に及ぼす影響

20%O₂、5%O₂のどちらの条件下でも、*in vitro*培養60日までのhMSCの増殖に有意な差は認められなかった。(図1)

2) DNA複製能に及ぼす影響

それぞれの酸素濃度で培養した3代目(#3)と11代目(#11)のhMSCのBrdUの取り込み量を測定した(図2)。20%O₂、5%O₂のどちらの条件下でも、#3に比べて#11ではBrdUの取り込み量は下がり、酸素濃度による有意な差は見られなかった。

3) 細胞の老化に及ぼす影響

SA-β-Gal染色によって細胞老化について検討した(図3)。20%O₂、5%O₂のどちらの条件下でも、11継代目では青く染まっている細胞が認められた。

4) 細胞周期に関わる遺伝子の mRNA 発現に及ぼす影響

p16、p21のmRNA発現は、20%O₂条件下において3継代目(#3)に比べて11継代目(#11)では両者とも上昇した(図4)。p21は、#11において5%O₂条件下では20%O₂に比べて有意に発現が低下した(図4)。

TGFβ1、TGFβ2のmRNA発現について

は、両者とも#11において5%O₂条件下では20%O₂に比べて有意に発現が低下した(図5)。

2. 複数のドナー由来のhMSCにおける *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化の比較

1) 細胞の増殖について

4ドナー(hMSC-A, B, C, D)由来のhMSCの増殖を図6に示した。増殖速度に個人差がみられたが、どの細胞も培養期間50日以内では概ねその増殖は良く、50日以降は増殖能が下がってくるのが確認された。

2) 遺伝子の抽出

4ドナー(hMSC-A, B, C, D)由来のhMSC全てに共通して、*in vitro*培養期間(~50日)中にmRNA発現レベルの変化がなかった遺伝子を抽出した。hMSC-A, B, C, D全てにおいて、#1と比較して20days, 50daysともにその発現レベルが0.8倍~1.2倍であった遺伝子をGeneSpring (Agilent Technologies)を用いて抽出したところ、1,898遺伝子あった。さらに、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)を用いて、1,898遺伝子の中で、機能や疾病と関わる遺伝子を抽出したところ528遺伝子あった。そのうち、Cancerに関わるものが75遺伝子、Cell Cycleに関わるものが84遺伝子含まれていることがわかった(表3)。Cancerについて表4に、Cell Cycleについては表5にその詳細を示した。どちらも多くのカテゴリーの中にc-mycが含まれていることがわかったので、実際に各hMSCにおけるc-mycのmRNA発現をRT-PCRで測定したところ、ドナーによ

って発現レベルに差は見られるものの、各ドナーとも培養期間（50日）内において発現レベルに変化は見られないことが確認された（図7）。

D. 考察

骨髄由来間葉系幹細胞を細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならない。そのため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であると思われる。

本研究では、まず細胞の培養条件の一つとして、酸素濃度に着目した。通常の培養条件では大気中の酸素濃度と同様に20%であるが、生体内における酸素濃度は2%~5%程度であると言われている。そのため、通常の培養条件では酸化ストレスを受けている可能性も高い。またその影響で、培養期間が長くなるにつれ増殖能が低下し細胞が老化するのかもしれない。そこで本研究では、hMSC を通常の培養条件（20%O₂）下と生体内環境に近い培養条件（5%O₂）下とでそれぞれ培養し、増殖や老化及び細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。その結果、細胞周期制御に関わる遺伝子の mRNA 発現レベルは、11 継代目において酸素濃度の違いによる変化が多少見られるものの、hMSC の増殖や老化には培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。このことから、hMSC の培養において、通常の培養条件である20%O₂濃度では5%O₂濃度に比べて明らかな酸化ストレスは認められないことがわ

かった。

さらに昨年度、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 が挙げられるとの見解を示したが、昨年度の検討は1ドナーからのMSCを用いた実験であったため、今年度は、hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。培養期間としては、実際に細胞組織利用医療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し、妥当な期間内（~50日）で検討した。

4 ドナー由来の hMSC についてその増殖について比較した所、その増殖速度に個人差がみられた。今年度はこの様に個人差のある4ドナー全てにおいて、*in vitro* で培養期間中にその mRNA 発現に変化のなかった遺伝子の抽出を試みた。#1, 20days, 50days の時間軸3点を Technical duplicate で行ったため計6点全てで発現しているとみなされた遺伝子の中から、#1と比較して20days, 50days ともにその発現レベルが0.8~1.2倍であった遺伝子を「変化なし」の遺伝子として抽出したところ、1,898遺伝子抽出された。さらに抽出された1,898遺伝子の中から様々な機能や疾病と関連している遺伝子を抽出したところ、528遺伝子あった。そのうち cancer と cell cycle に関わるものはのべ159遺伝子含まれていた。そこでこの159遺伝子の中から癌化の危険性を評価するための指標の候補を探索していくことにした。まず、cancer と cell cycle のどちらにおいても、多くのカテゴリーに含まれる c-myc に着目した。そこ

で、定量的リアルタイム PCR にて *c-myc* の mRNA 発現レベルを測定したところ、各ドナーとも DNA アレイの結果と同様に培養期間における発現レベルに変化は見られなかったため、*c-myc* は候補遺伝子の一つとして挙げられると考えられた。つまり *in vitro* 培養の前後において、通常は *c-myc* の mRNA 発現レベルに有意な変化が見られないと考えられるので、発現レベルに大きな差が見られた場合は培養中に何か不都合な変化が起こった可能性が示唆される。この様な判断基準の一つとして *c-myc* が利用できることを期待している。

今後にもさらに解析を進め、*c-myc* 以外にもいくつかの候補遺伝子を挙げて、最終年度となる来年度には安全性評価系としての確立を目指していきたい。

E. 結論

1) hMSC を通常の培養条件 (20%O₂) 下と生体内環境に近い培養条件 (5%O₂) 下とでそれぞれ培養し、増殖や老化及び細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。その結果、hMSC の増殖や老化には培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。このことから、hMSC の培養において、通常の培養条件である 20%O₂ 濃度では 5%O₂ 濃度に比べて明らかな酸化ストレスは認められないことがわかった。

2) hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について、複数のドナー由来の幹細胞を用いて比較することにより、その共通性について検討した。培養期間としては、実際に細胞組織利用医

療機器の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し、妥当な期間内 (~50 日) で検討した。4 ドナー全てにおいて、*in vitro* での培養期間中にその mRNA 発現に変化のなかった遺伝子を抽出したところ、1,898 遺伝子あり、そのうち機能や疾病に関わる遺伝子は 528 遺伝子であった。そのうち、cancer と cell cycle における多くのカテゴリーに含まれる *c-myc* に着目し、定量的リアルタイム PCR にて *c-myc* の mRNA 発現レベルを測定したところ、各ドナーとも培養期間における発現レベルに変化は見られなかったため、*c-myc* は hMSC の *in vitro* 培養期間中の安全性評価系に用いられる遺伝子の候補の一つとして挙げられると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) R. Sawada, T. Ito, and T. Tsuchiya "Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture in comparison with cancer cells", *J. Artif. Organs*, 9: 179-184 (2006)

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.* 77A, 84-89 (2006).

2. 学会発表

1) T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, T. Tsuchiya 「TGF-β gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs) —Relation between