

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

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	589
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	636
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	656
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	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
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	691
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	707
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	720
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	728
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	740
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	761
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	772
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	783
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	795
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	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
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	836
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	839
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	919
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	939
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の確立に関する研究	乾 賢一	951
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	966

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 ……	979
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 ……	1000
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 ……	1021
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 ……	1042
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 ……	1054
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 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

## 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 軟骨再生・骨再生・心筋再生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・安全性と臨床評価を含む有効性評価技術の標準化を行う。眼科では、治療的レンズ材料の開発を行う。ガイドライン化は、心筋再生は、次世代医療機器評価指標事業で、軟骨再生、骨再生は、再生医療の早期ガイドライン化研究(土屋班)で作成している。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。特に、軟骨再生では、優れた担体を開発し、培養せず、縫合せず良好な組織像を示す非侵襲性軟骨再生治療をミニブタで成功した。

### 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       | 田村知明 |
| (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

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。幹細胞を用いた細胞・組織医療機器の実用化のためには、幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題となってくる。そこで本研究では、幹細胞におけるいくつかの(数個の)遺伝子等について調べることで、その安全性を迅速に低コストで評価できる系の確立を目的とした。

具体的には、以下の16の研究目的について検討した。

#### 1: ヒト間葉系幹細胞の染色体解析による安全性評価方法の標準化

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として、簡便で精度の高い染色体異常解析手法の開発を目的として、Fluorescence in situ hybridization (FISH)を用いて、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の染色体異常解析法を検討し、標準化試験法を提案することを目的とした。

#### 2: ヒト間葉系幹細胞の細胞周期に及ぼす TGF $\beta$ と FGF-2 の作用機構に基づく評価

DNAchipとRealtime RT-PCR法を用いた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ことを目的として、平成16年度から1) hMSCと癌細胞との比較、2) hMSCの継代数の増加による影響、の2点について、DNAchip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てきた。われわれは、これまでに、FGF-2はTGF $\beta$ からのシグナル伝達系へ作用し、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を見出した。そこで今年度は、hMSCの細胞周期に対してTGF $\beta$ やFGF-2が実際に作用するのかどうかを調べることにした。すなわち、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を明らかにし、安全性確保に有用な指標を明らかにすることを目的とした。

### 3：組織再生用材料評価方法の開発

3次元スキャホールド内部で培養された細胞の正確な生細胞数測定は、困難であることが知られている。そこで細胞の増殖・分化能を有する機能性多糖を合成し、3次元培養した細胞の数や活性に対する影響を検討し、精度の高い測定法を明らかにすることを目的とした。

### 4：循環器系の再生に関する安全性評価方法の標準化

異所性の細胞移植においては、治療すべき部位に移植された細胞がその部位にとどまり、機能を発現し、また癌化・異所性骨化などの望ましくない変化を起こさないことの確認が必要とされている。細胞移植に伴う腫瘍原性については、ヌードマウスにヒト由来細胞を用いた細胞を移植し腫瘍発生の有無を確認することを目的とした。

### 5：再生軟骨の大型動物総合的評価方法の標準化

軟骨再生に関しては、生分解性高分子材料に比べ安全性・有効性、非侵襲性の優れた担体の開発ならびに、汎用されるウサギに比べ、ヒトでの臨床評価に近い動物モデルであるミニブタを用いた軟骨再生評価方法の開発と標準化である。

### 6：培養骨の評価方法の開発

骨再生において、 $\beta$ TCP等からなる三次元培養骨の分化パラメーターの評価法は、困難であることか

ら、*in vitro* 評価法を開発し、標準化することである。平成16年度は、I型コラーゲンの生成過程で生じるプロペプチド(PINP)の測定、骨基質の石灰化に必要なとされるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、成熟骨芽細胞の指標となるGla型オステオカルシンの測定について検討し、測定方法を確立した。平成17年度は輸入骨髓液から細胞を培養し、培養骨を作製し(図1)、培養骨のALP活性を測定する方法を確立した。また、間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化を誘導した際の細胞表面マーカーの変化をフローサイトメトリーで検討し、ALP、CD44、CD140bにより評価が可能ではないかと予測した。フローサイトメトリーでの評価系は、ALP活性のように担体の影響を受けないと予想されるので、有用である。平成18年度はインフォームドコンセントを得た患者さんから新鮮骨髓を採取し、これまでの培養条件の確認を行うとともに、骨芽細胞の早期評価が可能な系の確立を目指した。

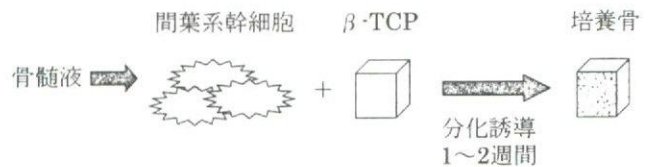


図1. 培養骨の作製方法

### 7：角膜創傷治癒レンズの開発

薬物に対する保持特性を向上させたコンタクトレンズ材料として、“分子インプリント法”によるポリマー作製を行ってきた。緑内障治療薬チモロールを対象とした昨年の検討においては、優れた薬効持続性を実現することに成功した。

平成18年度は、角膜創傷治癒コンタクトレンズとしての適用を目的として、EGFを徐放するポリマーの治癒レンズの開発である。

### 8：高機能性マトリックスの開発

細胞・組織との親和性に優れ、安全性と機能性の両面において優れた特性をもつ、高機能マトリックスの開発を目的とした。このような高機能マトリッ

クスとしての特性を実現するため、材質の合成法、加工法、およびその特性を補完する他成分との複合化について検討した。

### 9：3次元培養系での分化・増殖能評価技術の標準化

16～17年の2年間の研究で、*in vitro*の系で3次元培養をした間葉系幹細胞の細胞数変化、また分化誘導した時に目的とする細胞に分化しているかどうかを、培養液中の成分の変化として評価できることを明らかにした。平成18年度においては、由来の異なる間葉系幹細胞を用いて実験を行い、細胞の増殖や分化に差があるかを検討した。また、基材の種類による影響についても検討を行った。

### 10：骨補填材の評価方法の開発

骨補填材の安全性・有効性評価方法開発のために簡便で、再現性に優れた原料および最終製品の評価方法を開発することである。HAp/Col複合体のような有機無機複合体上で骨系細胞を培養し、増殖、分化特性を検討した例は少ない。前年度までは、出発原料であるコラーゲンの特性評価方法を検討した。HAp/Col複合体上でラット新生仔頭蓋骨由来骨芽細胞の培養方法について検討し、培地成分がHAp/Col複合体に吸着されるため増殖が阻害されることを見出し、HAp/Col複合体を培地に浸漬する前処理方法を考案した。本年度は正常ヒト骨芽細胞を用いた系の前処理法の最適化、培地中のタンパク質の吸着挙動、ヒト破骨前駆細胞の培養による吸収性の評価の可能性について検討を行った。

### 11：由来の異なるコラーゲンの特性評価

コラーゲンは、2001年、日本でもBSE（牛海綿状脳症）の感染牛が発見されたことに端を発した人畜共通感染症の問題から、安全性の確保が大きな課題となってきている。ウシおよび他の動物種のアテロコラーゲンを作製し、生化学的特性、免疫学的特性等について比較検討を行い、安全性および有効性等について評価する。平成18年度は、昨年の結果を

踏まえ、ウシ、ブタ、サメおよびイブミダイより医療用コラーゲンと同等の純度の標品を得て、3次元培養が可能なスポンジを作製し、ヒト由来の培養細胞株を用いて、アテロコラーゲンの由来によりどのような特性を示すか評価した。さらに、同スポンジを動物に移植しどのような経過をたどるか評価した。

### 12：再生軟骨の力学的評価

生体環境設計を基軸とした再生技術を開発し、その安全性・有効性を評価する。再生軟骨においては特にその力学的性質を考慮した評価法の開発、さらには、関節の機能に着目した評価概念の構築を目的とする。

### 13：損傷マーカーによる関節軟骨臨床診断・臨床評価法の開発

関節軟骨は組織学的に硝子軟骨と呼ばれる。細胞密度が低く、その間は豊富な軟骨基質で占められる。関節軟骨の約70%は水であり、残りの半分はコラーゲン、他の半分はプロテオグリカンである。正常な関節軟骨では軽度の代謝が行われているが、病的状態では代謝速度が亢進していると考えられる。関節軟骨のコラーゲンの90%はII型コラーゲンである。II型コラーゲンが軟骨細胞から分泌されるときに両端が切断される。そのC末端側はコンドロカルシンあるいはProcollagen Type II C-Propeptide (CP2)と呼ばれ産生マーカーと考えられている。また、II型コラーゲンがコラゲナーゼにより1:3に分解されるが、切断された部位にあらたにできる抗原としてCollagen Type II Cleavage (C2C)があり、これはII型コラーゲンの分解マーカーと考えられている。軟骨プロテグリアンの多くはアグリカンが占める。アグリカンの合成のマーカーとしてはAggrecan Chondroitin Sulfate 846 Epitope (CS-846)がある。またアグリカンにはkeratan sulfate (KS)、chondroitin sulfate (CS)、hyaluronic acid (HA)などのglycosaminoglycan (GAG)が多く含まれ、分解のマーカーとなる。さらに軟骨基質には非コラー

ゲン蛋白質として cartilage oligomeric protein (COMP)があり、これも軟骨基質の分解のマーカーと考えられている。

これらは関節軟骨から関節液に放出され、そこから滑膜を介して血液中に入り、一部は腎臓から尿へと排出される。その途中で測定することにより、関節軟骨代謝を反映する可能性がある。関節液中ではもっとも高濃度であると考えられるが、必ずしも大量の関節液がたまっているとは限らないこと、溜まった関節液の量によりそれらの物質の濃度が影響されること、さらに関節液は採取しにくいことなど問題がある。血液中の濃度は低いと考えられるが、体液量はほぼ一定であることから濃度が一定であること、さらには採取が容易であるというメリットがある。尿中ではさらに濃度が下がると考えられること、尿の量により濃度が変動する可能性があることが考えられる。

変形性関節症や関節リウマチにおけるこれらの物質の関節液あるいは血清中の濃度を調べ、軟骨破壊との関連を明らかにする。そのために、膝関節手術を受ける患者の血清、可能ならば関節液と尿を採取し、手術時の関節軟骨の状態と、各種軟骨代謝マーカーとの関連を調べ、関節軟骨損傷マーカーを明らかにし、新たな臨床診断、臨床評価法を開発する。

#### 14：再生骨組織の定量的・客観的臨床評価法の開発

整形外科における、骨腫瘍、骨折、骨髄炎などの大型骨欠損に対し、人工骨移植や自家骨髄由来間葉系細胞を用いた培養骨による骨再生医療が行われつつある。しかし、その臨床評価は、単純X線のみによることが多く、定量的かつ客観的な再生骨組織の臨床評価はなされていない。本研究では人工骨移植による再生骨の解析と臨床での骨再生評価方法の確立を目的とする。

#### 15：再生血管の安全性と有効性に関する47症例の臨床評価

骨髄細胞と生体吸収素材からバイオ血管を作成し、

先天性心疾患治療における手術補填材料として使用した。先天性心疾患患児では生来、血管欠損、弁欠損など様々な障害を有している。従来、人工物でこれらを補填・修復していたが、人工物には成長の可能性が無く、また石灰化や血栓などの有害事象を遠隔期において起こすことが少なくなく、また多くの症例で再手術、再々手術を余儀なくされている。バイオ血管は新しい手術材料として有望であるが、当研究では、現在まで47症例で使用したこれら臨床例での再生血管の安全性、有効性を評価することを目的とする。

#### 16：心筋再生治療法の開発と臨床評価

心不全に対する治療法として、内科的治療が奏功しないほど重症化した場合には、補助人工心臓や心臓移植等の置換型治療が有効で、我々も本邦における臨床的有用性を報告してきた。しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や移植後の免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。一方、最近、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が不可欠と考えられる。我々は、これまで報告してきた細胞注入とともに、細胞シートを用いた細胞組織移植を行い、心機能改善効果及びその組織学的検討を行う。

#### 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。

#### 1：ヒト間葉系幹細胞の染色体解析による安全性評価方法の標準化

1) 細胞：正常ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) は三光純薬を通して Cambrex 社 (米国) より購入した。使用した Lot. 10796 は 26 才黒人男性より、Lot. 10909 は 19 才黒人女性より、そして Lot. 11809 は 21 才大平洋諸島系男性より提供されたものである。

2) コロニー法を用いる細胞毒性試験：ポリ L-乳酸



(PLLA 3000, 数平均分子量 3000) は dimethyl sulfoxide (DMSO, 同仁化学、紫外外部吸収スペクトル用純溶媒) に溶解した。約 200 個の hMSC を直径 6 cm のプラスチックシャーレに播種し、翌日、PLLA 3000 の DMSO 溶液を添加した。9 日後に新鮮な培地と交換し、さらに 4 日間培養した。培地を除き、細胞を固定、ギムザ染色後コロニーを計数した。

3) 染色体標本作製: 細胞を播種後、細胞密度が 50% になった時に、コルセミド (0.02  $\mu$ g/ml) で一晩処理し、トリプシンで細胞を回収した。75 mM KCl 溶液で室温 20 分間処理したのち、カルノア液 (氷酢酸: メタノール=1:3 混液) で 3 回固定した。細胞懸濁液をスライドグラスに滴下し、自然乾燥させた。

4) Fluorescence in situ hybridization (FISH): 既報に従って実施した。1 番染色体、4 番染色体および c-myc の DNA プローブを VYSIS 社 (米国) より購入した。プローブ DNA を 70°C で 5 分間熱変性させ、すぐに氷冷した。染色体 DNA を変性させるために、スライドグラスを 70°C の 70% フォルムアミド溶液に 4 分間浸し、すぐに、氷冷した 70% エタノールに移し、その後続けて 85%, 100% エタノールに移し、自然乾燥させた。スライドグラスに熱変性したプローブ DNA 液をのせ、カバーグラスで覆い、回りをシールし、37°C で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ終了後、45°C の 50% フォルムアミド液で 3 回、2 x SSC 液で 1 回、0.1% NP-40 を含む 2 x SSC 液で 1 回洗浄した。その後、自然乾燥させて、DAPI Counterstain でマウントし、蛍光顕微鏡 (Nikon E600) で観察した。

## 2: ヒト間葉系幹細胞の細胞周期に及ぼす TGF $\beta$ と FGF-2 の作用機構に基づく評価

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。また一部は、この培地中に FGF-2 (BD biosciences, Bedford, MA) を 1ng/mL の濃度になるように添加して培養を行った。培地交換は 2, 3 日ごとに行い、FGF-2

は培地交換をする際に添加した。細胞は 5,000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。

2) hMSC への TGF $\beta$  の添加: TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 (human recombinant) は SIGMA (Saint Louis, MO) から購入した。hMSC に TGF $\beta$ 1 または TGF $\beta$ 2 を培地に添加した。

3) 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。

4) 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 p53、p21、p16 の mRNA 発現レベルについて Real time RT-PCR 法にて検討した。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。

5) フローサイトメトリー解析: hMSC は TGF- $\beta$  処理後、または FGF-2 添加後に trypsin/EDTA 処理により回収し、CycleTEST™ PLUS DNA Reagent を用いて染色した。その後、Propidium iodide (PI) の蛍光量を FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) で測定した。それらのデータについて解析した。

## 3: 組織再生用材料評価方法の開発

機能性多糖材料の母体として、2 価のカチオンで架橋されゲル化する医薬品グレードのアルギン酸 (Pronova 社製) を選び、実験に用いた。このアルギン酸からなるゲルの細胞接着性を改善するため、アルギン酸に細胞接着ペプチド類の修飾を施した。修飾したペプチドは、細胞接着配列 RGD を含むもの及びその配列と協同作用する PHSRN を含み、N 末側に 4 連続グリシンをスペーサーとして含むものを用いた。細胞には、Cambrex 社製のヒト由来間葉系幹細胞を用いた。これらの細胞を調製したアルギン酸からなるゲル内に培養し、所定時間経過後に培養した細胞からの total RNA の回収を行い、mRNA の網羅的発現解析を行うことで、それらの細胞挙動に対してペプチド修飾アルギン酸及び培養状態が与

える影響の検討を試みた。共培養による細胞挙動変化を検討するために、ヒト正常骨芽細胞及び軟骨細胞を Cambrex 社より入手し、それぞれの単独培養及び骨芽細胞と軟骨細胞を混合して共培養を行い、骨及び軟骨分化の程度を検討した。

#### 4：循環器系の再生に関する安全性評価方法の標準化

##### 1) 移植細胞集団由来の腫瘍発生に関する検討

<軟寒天コロニー形成法> Bacto Agar (Difco) に 1.275% となるように蒸留水を加え、オートクレーブ滅菌した。この Agar 溶液 20mL に、2 倍濃度に調製した骨格筋芽細胞増殖用培地 20mL、FBS 10mL を加え寒天培地を作製し、45°C 程度に保温した。この寒天培地を 60mm ペトリ皿に 5mL ずつ分注し、約 1 時間室温で放置し、寒天ペトリ皿を作製した。前培養したヒト骨格筋芽細胞と CCL136 について、その細胞数比が 1:0、100:1、1000:1、10000:1、0:1 の混合比、となるように検査用培地に懸濁した。この細胞懸濁液 2mL に、上記と同様の方法で作製した寒天培地 5mL を加え攪拌した後、寒天ペトリ皿の上に 1.5mL を重層した。このシャーレを室温に 20 分程度放置し、重層した細胞懸濁液が固まるのを待ち、1mL の検査用培地を重層し、37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ中で培養した。培養開始 1、2、3 および 4 週後にコロニーの有無を顕微鏡で観察した。なお、試験は各混合比の細胞について、2well ずつ実施した。

##### 2) 免疫不全マウスを用いた異所性移植による腫瘍原性否定試験

次世代評価指標 17 年度報告書：『細胞シート移植に伴う腫瘍原性』については、ヌードマウスあるいは NOD/SCID マウスにヒト由来細胞を用いた細胞シートを移植し腫瘍発生の有無を確認する。移植部位に関しては、心筋梗塞あるいは拡張型心筋症モデル作成により障害を受けた心筋表面への移植により検討することが望ましいが、皮下移植でも代用可能とする。なお、観察期間は 1 年とする。と記載されているが、免疫不全動物を用いた長期実験は非常に難しいので、観察期間を一律で 1 年と決められ

るとデータの取扱いに不具合が生じる。今後は、国立衛研ですでに検討されている標準化案(次世代報告書 2007 年版に掲載予定)について、ヌードマウスを用いて検討することとした。

#### 5：再生軟骨の大型動物総合的評価方法の標準化

1) 評価項目：組織学的性状・生化学的分析により修復部位が正常軟骨(硝子軟骨)様になってきているのかどうかを判断するためにも大事ではあるが、せっかく修復した部位に分析用試料を採取する為に、欠損を作成することになり、ヒトでの評価(臨床研究及び治験において)方法としては問題があると言える。また、上記以外の評価として、関節軟骨の役割(滑膜関節の関節表面を覆い、衝撃を吸収するクッションの役割と、摩擦係数を低下させ滑動性をよくする役割)を組み入れる必要があると考える。

米国においては ASTM(American Society for Testing and Materials)において軟骨再生に係る内容が Active Standard (F2451-05) として発行されている。本 Standard には被験動物を用いた非臨床試験においての被験動物の種差、試験期間、評価方法(力学、組織学、生化学)等について記述されている。

しかしながら、汎用性、侵襲度に問題があるだけではなく、使用する支持体の特性により大きく影響を受けることも本 HS 研究で明らかとなっている。

国内においても多くの大学等研究機関において軟骨再生に関する研究を実施しており、臨床試験を行っている企業もある。組織学的評価方法及び生化学的評価方法以外に、関節軟骨の役割を評価する手段として、力学的測定を取り入れているところもある。独自の力学的評価方法を開発している研究機関もあるが、それぞれの力学的評価方法の相関などは調べられてはいない。

本 HS 研究においては国内において独自の評価方法・機器を研究開発している研究者の方々に協力いただき、基礎研究及び非臨床試験から臨床試験及び医療行為におけるまで、侵襲度を考慮した、つながりを持った(非臨床データと臨床データを相関付け

ることができる)評価方法(システム)を確立することを目指した。

具体的には、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することとした。実施評価方法として

力学

- ・ aggregate modulus (equilibrium modulus)
- ・ Poisson's ratio (dynamic stiffness)
- ・ 超音波

非侵襲的評価

- ・ MRI

生化学

- ・ Collagen type II
- ・ 酸性ムコ多糖

組織学

- ・ Hematoxylin and Eosin
- ・ Alcian blue
- ・ Saffranin-O

及び従来から用いられている Histological Grading Scale for the Defects of Cartilage(1994年脇谷らの方法)を用いることとした。

MRIは京都大学の協力を得て実施している。

aggregate modulus (equilibrium modulus)、Poisson's ratio (dynamic stiffness)は Seiko Instruments 社製 EXSTAR 6000 を用いた。

組織学的評価は被験動物から被験部位(後肢関節部分)を取り出し、EDTAを用いた脱灰を行った。脱灰操作が終了した被験部分を固定後、クリオスタットを用い薄切組織片を作成した。

染色はヘマトキシリン-エオシン(HE)染色、サフランin-O染色、トルイジンブルー染色を実施した。

生化学的評価は酸性ムコ多糖、コラーゲン type II を常法により、抽出・定量を行った。

## 2.)動物試験

<被験動物の選択>ブタ及び若齢のミニブタは被験動物としては動物個体が成長し体格が大きくなる段階で、関節のサイズも大きくなっていった。関節が大

きくなる場合はそれに併せて関節軟骨の増殖も活発であると推測されるため、人疾患モデルには適さないため、被験動物としてミニブタを用いた。週齢は ASTM のドラフトガイドラインに準じ 10~12 ヶ月のものを使用した。

<骨髄採取及び培養>ミニブタ(adult 10ヶ月齢以上、25~30kg)への麻酔をした。骨髄液は腸骨部分より骨髄穿刺針を通し、採取した骨髄液を遠沈した。血球成分を含む画分を培地(10%ウシ胎児血清含有培地:)と共にシャーレに播種し、37℃で培養した。培養期間中は 2~3 日の間隔で培地を交換した。接着細胞をトリプシンまたは rProtease で 37℃、5min 処理することにより遊離細胞として取得した。遠沈・洗浄後、遊離細胞を無血清培地で細胞懸濁調製した。

<多孔質体への細胞播種>細胞懸濁液を無血清培地で脱気置換した多孔質性支持体に必要量播種し、動物埋植用試験試料とした。細胞播種の条件は 16 年度に報告した播種性試験の結果より、細胞播種後 30 分以上静置することとした。

<ミニブタへの埋植>ミニブタを骨髄採取時と同じ方法で麻酔を施行した後、後肢膝関節を露出するように施術した。露出させた Femoral groove に  $\phi$ 12mm 深さ 3mm の欠損を作成した後、多孔質体または細胞を播種した多孔質体を埋植した。コントロールとして欠損作成のみの群を作成した。NHS001 および NHH001 に対しては固定手段は講じず、KTF001 のみに対して縫合糸で固定を実施した。関節を復元させた後、切開部位を縫合し、埋植術を終了した。埋植期間は、軟骨修復までには最低 6~12 ヶ月以上観察する必要があると ASTM 等で報告されていること及び著者らの研究結果より、6 ヶ月および 12 ヶ月間とした。

<関節の取り出し及び評価>麻酔を施行した後、下大動脈より失血死させた後、関節部位を取り出し、評価に供した。

評価は MRI、Diffusion Tensor、肉眼的観察、超音波評価の順で実施した。超音波評価の後、埋植部分(修復部分)より少量の試料を切り出し体積弾性率

を測定し、切り出した試料で粘弾性および Indentation を測定した。肉眼観察、構造学評価、力学評価を実施後、生化学評価に必要な試験試料を切り出した後の関節を脱灰した。脱灰した関節よりクリオスタットを用い組織切片を作成し、HE 染色、AB 染色および SO 染色に供し、組織評価を行った。生化学評価は切り出した試験試料を凍結乾燥後、Native Type II Collagen または、簡易型・酸性ムコ多糖(株式会社セルガレージ)について抽出・定量を行った。

(倫理面への配慮)

埋植試験としてミニブタを使用した。動物の使用に関しては、細胞採取、埋植、剖検においては苦痛を伴わないように麻酔を使用する等とし、また不必要な犠牲を伴わないように注意して実施した。また飼育環境においても注意を払い、動物愛護に配慮して研究を実施した。

## 6：培養骨の評価方法の開発

### 1) 新鮮骨髄液から間葉系幹細胞の培養

新鮮骨髄液から間葉系幹細胞を培養し、年齢や性別により回収できる細胞数になんらかの関連性が認められるか検討を行った。共同研究先から入手した新鮮骨髄液を 0.5 mL/25 cm<sup>2</sup> になるように増殖因子を添加した DME 培地に懸濁し、フラスコに播種した。その際、10%ウシ胎児血清 (FBS) と 15%ヒト血清 (アロ AB 型複数ドナー市販品) で培養する群を作製し、回収細胞数を比較した (可能であれば n=3 で実施する)。更に、それぞれの群に低濃度のデキサメタゾンを追加する群としない群を作製し、回収細胞数を比較した (可能であれば n=3 で実施する)。間葉系幹細胞への培養は、3~4 日毎に培地交換を実施し、コロニーが増えなくなった状態、またはサブコンフルエントの状態 で細胞をトリプシンで回収した。また、回収した間葉系幹細胞を骨分化させ、初年度に決定した方法で ALP 活性を測定することで、得られた細胞の多分化能を確認した。

### 2) 骨分化時の細胞表面マーカーの変動

新鮮骨髄液から培養した間葉系幹細胞と、骨分化

させた骨芽細胞における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 1 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、CD117 (c-kit)、CD34、CD271 (LNGFR)、骨芽細胞のマーカーである ALP (骨型に特異的ではない抗体)、そのほか CD13、CD14、CD29、CD45、CD54、CD73、CD90、CD106、CD140a、CD140b、HLA-DR、HLA-ABC について検討を行った。細胞には、平板培養した間葉系幹細胞、骨分化を開始して 1、3、7 日間培養した骨芽細胞を回収し、前述の細胞表面マーカーで染色を行い、フローサイトメーター (Becton Dickinson 社、FACS Aria) で測定を行い、推移を解析した。

(倫理面への配慮)

使用した輸入骨髄液は AllCells 社 (輸入販売元: 株式会社ベリタス) から購入した。AllCells 社は、感染症がなく、既往症のない 18~45 歳のドナーよりインフォームドコンセントを取り、骨髄を採取している。AllCells 社からは、ドナーの性別、年齢、身長、体重、人種が示されるのみで、これ以外の個人を特定する情報は開示されない。また、共同研究先の病院からの新鮮骨髄の入手においては、共同研究先および社内の倫理委員会で協議し、共同研究契約を締結し、それに従いインフォームドコンセントの取れた患者さんから手術の際に骨髄液を採取させていただいた。患者さんの情報は、性別、年齢のみを入手し、それ以外の個人を特定する情報は開示されないことになっている。このことから、倫理面への配慮はなされていると考える。

## 7：角膜創傷治癒レンズの開発

### 1) インプリント方法の概要

分子インプリント法とは、ゲスト分子を“鑄型”としてモノマーに混合し、鑄型分子とモノマー中のホスト部位が相互作用 (静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用などの非共有結合、あるいは共有結合) した状態で重合した後、鑄型分子を除去するポリマー調製法である。鑄型分子が除去された後の空

孔は、鑄型分子の形状及び電荷分布に対する相補的な構造を有するため、鑄型あるいはそれに類似した分子に対する高いホスト効果を示す。

昨年検討したチモロールは比較的小さな分子でありモノマー（有機溶媒層）にも可溶であったが、今回ゲスト分子とする EGF は水溶性ポリペプチドであり水系環境中で特異的な立体構造を形成する。有機溶媒に対しては難溶であり、また水中とは異なる立体構造をとるため適切な鑄型/ホスト相互作用が形成できないなど、チモロールの例をそのまま応用するには問題がある。これらの問題点を回避するために、我々は EGF の一部に相当するペプチドを鑄型とする方法をとった。抗体が抗原分子全体を認識するわけではなく部分的な決定基を認識して結合するように、分子の断片をインプリントすることで親分子（EGF）に対する選択性をポリマーに付与できないかという考えに基づき、我々は2種類の EGF 断片ペプチドを合成した。ペプチド配列の選択基準は、EGF の分子表面に露出していること、特異的な高次構造を形成しないループ部であること（有機層で重合するため）、酸性アミノ酸残基を含むこと、（ホスト部位との相互作用のため）、疎水性アミノ酸残基を含むこと（有機層への溶解性を考慮）、及び合成困難とされる配列でないこととし、Pro-Leu-Ser-His-Asp（7位-11位。以下、PLSHD と略す）及び Asp-Leu-Lys-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg（46位-53位。以下、DLKWWELR と略す）を選択した（図2）。

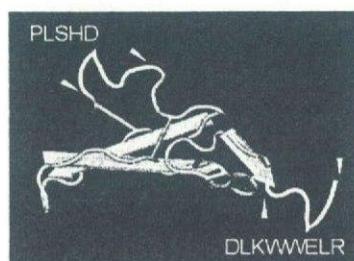


図2. EGF 分子の立体構造 (PDB: 1HVO より)。EGF は 53 アミノ酸残基よりなるポリペプチドである。このうち PLSHD (7-11) は N 末端ループ上に位置し、また DLKWWELR (46-53) は C 末端ループ上に位置する。

## 2) ポリマーの組成

ポリマー作製に用いた成分を表1に示す。昨年度と同様、ポリマー主成分にはジメチルアクリルアミ

ド (DMAA) とシロキサニル系メタクリレート (SiMA) の混合液を使用した。鑄型の溶解性とポリマーの機械的特性を両立できる混合比を検討した結果、DMAA: SiMA = 6: 4 とした。これを主成分として、(ジメチルアミノ)プロピルメタクリルアミド (DMPMA、ホスト部位) 及びエチレングリコールジメタクリレート (EGDMA、架橋部位) を混合したものを重合してポリマーを作製した。インプリントポリマーの作製は、モノマー混合液に EGF の断片である PLSHD または DLKWWELR を添加し、これを重合して行った。

表1 ポリマー作製に用いた成分

成分名	役割
DMAA	主成分
SiMA	主成分
DMPMA	ホスト成分
EGDMA	架橋成分
PLSHD	鑄型分子
DLKWWELR	鑄型分子

## 3) EGF 吸着/放出実験

ポリマーを EGF 水溶液に一定時間浸漬した後、水溶液の EGF 濃度を測定し、ポリマーへの吸着量を濃度の減少量から算出した。このポリマーを生理食塩水に浸漬し、EGF 濃度を適時測定し、ポリマーからの放出量を算出した。EGF 濃度の測定には BCA 法を用いた。

## 4) 角膜創傷治癒実験

コンタクトレンズ形状に成型したポリマーを動物眼に装用する評価実験を行った。動物はウサギ（日本白色種、雄、体重  $3.6 \pm 0.2$  kg）を使用した。ウサギを全身麻酔及び点眼麻酔し、円形のヤスリ（直径 6 mm）をハンドドリルに備え付け、角膜中央部に接触させて直径約 6 mm の上皮欠損創傷を作製した。この創傷眼に EGF を吸着させたコンタクトレンズを装用させた。対照実験として、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGF 溶液を適時点眼したものと、コンタクトレンズ装用や EGF 点眼等の処置を行わないものを実施した。創傷

作製から 48 時間後まで適時観察し、創傷直径を測定した。観察時間に対して創傷直径をプロットし、近似直線の傾きから創傷治癒速度を求めて比較した。

## 8：高機能性マトリックスの開発

### 1) 硫酸化ヒアルロン酸の製造・評価技術の確立

硫酸化ヒアルロン酸 (SHa) は、ヒアルロン酸 Na (Ha) を人工的に硫酸化して得られる硫酸化多糖の一種である。Ha と同様に生体内の細胞外マトリックスとして適した特性を有している。複合化することによって高機能化が可能と考え、その検討をすすめてきた。

SHa の合成は、硫酸化反応は固相と液相との不均一系にて反応させる必要があり、安定した反応を行うための条件を検討した。

### 反応前処理

反応前の前処理として、溶媒と原体の水分除去や、浸漬が重要であることが既報にて知られている。しかしながら、単なる浸漬では粉粒の深部にまで溶剤が浸透しにくいと考えられたため、ここではさらに脱気操作を行い、より確実な溶剤の浸透を試みた。

### 硫酸化剤

硫酸化剤としては、これまでトリメチルアミン-SO<sub>3</sub> 錯体 (TMA-SO<sub>3</sub>) が用いられていた。硫酸化度が上がりにくかったため、反応機構はそのままに、より高い反応性を持つ硫酸化剤として、ピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体 (Py-SO<sub>3</sub>) についても検討した。

### 回収・精製

反応後の回収・精製処理においても、すみやかな中和などの迅速な後処理が必須である。

反応後、蒸留水により希釈し均一な溶液とし、これに TMA-SO<sub>3</sub> 1.0g に対し 0.31g, Py-SO<sub>3</sub> 1.0g に対し 0.25g の NaOH を 1N 水溶液として加え、中和した。アセトンにて再沈殿し、得られた個体を再度蒸留水に溶解して透析処理をおこなった。

### 評価・分析

硫酸化多糖の染色に用いられる色素であるトルイジンブルーを用いた、メタクロマジーの利用による、UV 吸光による硫酸化度の評価を検討した。

2) 硫酸化ヒアルロン酸及び人工コラーゲン単独でのマトリックス化

SHa により被覆された生分解性材料基材からなる複合化マトリックスは前年に報告したが、今回は、硫酸化ヒアルロン酸単独での多孔体形成と化学架橋による不溶化を実施した。また、トリペプチドの縮重合により合成された人工コラーゲンについても、マトリックス基材としての応用を検討した。

### 多孔体の作製

それぞれ SHa および人工コラーゲンの水溶液を調製し、凍結乾燥により多孔体を得ることができる。これを架橋し、不溶化した。

架橋については、エポキシ系の架橋剤である、1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテルを用いた。

多孔体 0.1g をアセトン 10mL に浸漬し、軽く減圧して脱気した。さらに架橋剤 0.1g をアセトン 10mL に溶解した反応液を加え、37°C で 72 時間反応させた。その後、アセトンによる置換と洗浄を繰り返し、減圧乾燥した。

### 複合多孔体の作製

上記多孔体の複合化をおこなった。前述のように作製された架橋人工コラーゲン多孔体を、SHa の水溶液に浸漬し、その状態で凍結乾燥して複合化された多孔体を得て、これをさらに架橋することで不溶化した。こうした操作により、複数の成分がそれぞれ相互に浸入し、絡み合っている、相互浸入網目構造 (Interpenetrating Polymer Network) 構造を持つ多孔体の形成をこころみた。

## 9：3次元培養系での分化・増殖能評価技術の標準化

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、Cambrex Bio Science Walkersville 社より、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hADSC) は Zen-Bio 社より購入し、15% 濃度のウシ胎児血清 (FCS) (Invitrogen) を添加した  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) を用いて培養増殖させ、3 継代したものを実験に使用した。

二次元用培養基材として、培養用ポリスチレンディッシュを用いた。三次元用培養基材として、コラ

ーゲンスポンジ、キチン不織布、アルギン酸不織布、フィブリンスポンジを用いた。コラーゲンスポンジの作製は、ブタ腱由来のアテロコラーゲン溶液（0.3%濃度、pH 3.0）を凍結乾燥させた後、熱脱水架橋ならびにグルタルアルデヒド架橋させることにより行った。

hMSC あるいは hADSC を二次元（培養用ポリスチレンディッシュ）または三次元培養基材に播種し、37°C、5%炭酸ガスインキュベータ中にて培養を行った。初期播種密度は、二次元の場合は  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、三次元の場合は  $6.93 \times 10^5$  cells/12mm  $\phi$ 、とした。増殖用の培養液は15%濃度のFCSを添加した $\alpha$ -MEMを使用し、脂肪分化用培養液としては15%濃度のFCSを添加した $\alpha$ -MEMに dexamethasone 等を添加したものを使用した。培養液の交換は2、3日毎に行った。一定期間経過後、培養上清を回収して保存した。また、同時に hMSC あるいは hADSC が接着した培養用ディッシュまたは三次元培養基材はPBS(-)にて2回洗浄後、細胞数測定時まで保存した。

培養上清中のグルコース濃度は、市販の測定キットを用いて測定した。新鮮培養液中のグルコースとの差から、単位日数当たりのグルコース消費量を算出し、細胞数との比較を行った。

培養液中のアディポネクチンの定量は AssayMax Human Adiponectin ELISA Kit、レプチンの定量は Human Leptin Immunoassay、IGF-I の定量は Human IGF-I Immunoassay を用いてそれぞれ測定した。

細胞中の中性脂肪量は以下の方法で測定した。細胞あるいは培養した基材ごと PBS で2回洗浄をした後に、10%中性ホルマリンで固定、60%イソプロパノール水溶液で洗浄、オイルレッドO染色（15min）を行った。その後、水で洗浄し、イソプロパノールで赤色素を抽出、抽出液の吸光度（520nm）測定を行った。

## 10：骨補填材の評価方法の開発

### 1) 前処理方法

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（Kikuchi M, et al., Biomaterials, 2001;22, 1705-11）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（気孔率95%,  $\phi=12$ ,  $t=2$ mm）に作製された。また、前処理に用いた培地はD-MEM（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。

### (2) ヒト破骨細胞を用いた材料の吸収性評価

ヒト破骨前駆細胞（Osteoclast Precursor Cell：OCP, Cambrex社）および培養基材としてハイドロキシアパタイト緻密体（セルヤードペレット：ペンタックス株）を使用した。凍結細胞を96ウェル培養プレートに撒き、各種添加剤を添加したOPBM培養液（破骨前駆細胞基礎培地）で95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養した。

### (3) 二次元電気泳動による培地中のタンパク質の吸着挙動の解析

HAp/Co複合体を培地に浸漬後、培地を回収し、変性剤を加えない条件でポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動を行い、培地のタンパク質マップの浸漬前後での変化を検討した。タンパク質スポットはCBB（クーマシーブリリアントブルー）または銀染色で検出した

## 11：由来の異なるコラーゲンの特性評価

### 1) アテロコラーゲンの調製

原料としてウシ、ブタ、サメおよびイヅミダイの原皮を、供給元より新鮮な状態で入手し、原皮、洗浄、消毒、酵素溶解、沈殿精製、ろ過精製、のフローに準じ、アテロコラーゲンの標品を得た。

### 2) 評価方法

#### ・アテロコラーゲンスポンジによる評価

得られた各種アテロコラーゲンから以下の方法によりポアサイズが異なる2種類のスポンジを作製し評価に用いた。すなわち、1%のアテロコラーゲン溶液（pH3.0）を調製し、24ウェルプレートに0.5mlずつ加えた後、凍結乾燥機の棚冷却により冷却し、

凍結乾燥した (A 法)。他方、同様にアテロコラーゲン溶液を充填したプレートをメタノールドライアイス中で凍結後、凍結乾燥機にて乾燥した (B 法)。この後、中和し、滅菌後細胞培養および動物実験に供した。

細胞は、細胞外マトリックスの発現機構等に関する研究で良く用いられる①ヒト骨肉腫由来細胞株 (SaOS-2) ②ヒト軟骨肉腫由来細胞株 (OUMS-27) を使用した。培養方法は、24 ウェルプレートに滅菌したアテロコラーゲンスポンジを入れ、培地に十分交換した後、細胞数として  $2 \times 10^6$  個/ウェル播種した。対照は、スポンジを使用しない平板培養したウェルとした。2 週間培養の際、1 日おきに培地交換を行った。回収した培地を用いて Alkaline Phosphatase 活性 (ALP 活性) および Procollagen type I C-peptide (PIP) の測定を行った。培養終了後、各スポンジはホルマリン固定した後、乾燥し、走査型電子顕微鏡にて培養の状態について観察した。

動物への埋植試験は以下のように実施した。Wistar 系ラット (オス、200g、日本 SLC) を麻酔下にて背部を剃毛し、消毒後、皮下にポケットを作製し各スポンジを挿入し縫合した。1 週、2 週、4 週目に麻酔過剰投与により安楽死させた後、埋植部位を観察、標本の採取を行った。組織標本はホルマリン固定後切片を作製し HE 染色により評価観察した。

(倫理面への配慮)

細胞は市販の細胞を購入して実験に供した。また、動物実験では、動物の愛護及び管理に関する法律に基づき動物の飼育、実験、実験後に至るまで科学的かつ倫理的に対処し、動物への苦痛を極力避けるよう配慮に務めた。

## 1 2 : 再生軟骨の力学的評価

絹から抽出したフィブリンを胆体として用いて再生軟骨を作成し、その機能評価を行った。4 週齢、体重 0.5kg の日本白色家兎の上腕骨、大腿骨、脛骨から関節軟骨片を採取したのち、酵素処理にて軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞を直径 6 mm、厚さ 1mm のフィブリンスポンジ内に、細胞の密度が

$5 \times 10^7$  個/ml となるように播種し、培養を行った。次に、再生軟骨摩擦測定装置 (第 12 の考察参照) を用いて、様々な条件下で摩擦試験を行った。

## 1 3 : 損傷マーカーによる関節軟骨臨床診断・臨床評価法の開発

1) 同意の取得：手術患者に対しあらかじめ説明し、同意が得られた場合には入院時の採血で約 5ml 採血し、血清を分離し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

1. 臨床症状：臨床症状を記録、レントゲンを撮影し、Kellgren-Larurence のレントゲングレード分類を行った。

Kellgren-Laurence Grading system for OA

Grade 0: no feature

Grade 1: doubtful: minimal osteophyte

Grade 2: minimal: definite osteophyte

Grade 3: moderate: moderate diminution of JS

Grade 4: severe: JS greatly impaired

JS (joint space)

2) 手術時の評価：関節鏡のときには関節軟骨を観察し、損傷の広さ、程度を計測し、Societe Francaise Arthroscopie (SFA) scaling system で計算した。

まず、軟骨損傷の程度を SFA grading scale により 0 から 4 に分類した。

SFA scaling system

Grade 0: normal

Grade 1: chondromalacia

Grade 2: superficial fissures

Grade 3: deep fissures, down to SB

Grade 4: exposure of SB

SB (subchondral bone)

軟骨損傷の広さは内側、外側大腿骨頸骨、および膝蓋大腿の 3 つのコンパートメントに分けた、それぞれ % で表した。SFA score は軟骨変性のグレードとその広さ (%) と係数を掛けて算出する。したがって、SFA score は軟骨表面の損傷程度のみならず、広さも反映している。人工関節置換術の時には、肉眼的に所見から、SFA score を計算した。

2) 測定：サンプルの中の、CPII、C2C、CS846、COMP



の濃度は ELISA キットにて測定した。

3) 検討：外傷患者は、外傷から手術までの期間を計算し、2ヶ月以内とそれ以上の群に分類した。

変形性関節症はレントゲンでグレード分類し、各群のマーカーの値を比較した。

(倫理面への配慮)

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、蛋白および GAG を測定するプロトコルを、信州大学および丸の内病院の倫理審査委員会に申請し、認可された。

#### 14：再生骨組織の定量的・客観的臨床評価法の開発

H17年度に引き続き、良性骨腫瘍12例に対し病巣搔爬、通常の人工骨(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、<sup>99m</sup>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5例についても、同様の画像解析を行った。

(倫理面への配慮)

人工骨移植による骨再生治療は、厚生労働省の認可を受けており、保険診療として行っている。患者本人への造影MRI、骨密度、<sup>99m</sup>Tc-MDP骨シンチ(SPECT)の意義と有用性について十分なインフォームドコンセントを得ている。

#### 15：再生血管の安全性と有効性に関する47症例の臨床評価

根治手術時、全身麻酔下に骨髄穿刺を行い、体重あたり3-10 ml/kgの骨髄液を採取する。骨髄単核球性分を密度勾配液により完全清潔下に骨髄単核球成分および自己血清を分離する。直ちに生分解性ポリマーの導管に播種した後、分離した自己血清中に浸漬し、手術室内の細胞培養室にて細胞のviabilityを維持しつつ保存する。細胞培養液は使用せず、全て自己血清を細胞浮遊液とする。生分解性ポリマーはあらかじめフィブリン糊を塗布し、できるだけ多くの播種後の細胞がポリマー繊維に残存するように工夫をした。播種前にポリマーをフィブ

リン糊で処理することにより細胞とポリマーの接着性は向上する。播種細胞数は $10^6$ 個/cm<sup>2</sup>とし、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CT、MRIないし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。今後、再手術例ができれば、再手術時に肺動脈移植部の組織片を客観的に評価した後、小組織を採取し、再生肺動脈組織と自己心臓動脈組織を生化学的、生力学的、免疫組織学的に比較検討する。

#### 16：心筋再生治療法の開発と臨床評価

1)心筋梗塞モデルラットに対する治療：8weeks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、骨格筋筋芽細胞を単離、培養する。培養された骨格筋筋芽細胞を梗塞後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。

2)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、これらは無治療群(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。

3) 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、骨格筋筋芽細胞を単離、培養。培養された骨格筋筋芽細胞を温度応答性培養皿上で培養し、骨格筋筋芽細胞シートを作製した。この自己骨格筋筋芽細胞シートを 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。

4) 虚血性心筋症に対する自己細胞+大網による治療：ミニプタ (BW15kg) を用いて全身麻酔下にて開胸し、左前下行枝にアメロイドリングを装着した。手術後6週後に再開胸を行い、大腿筋より採取し、培養した骨格筋筋芽細胞シートを作製し、大網とともに移植した。治療効果を判定すべく、シート+大網群 (SN 群)、シート群 (S 群)、大網群 (N 群)、コントロール (無治療) (C 群) の4群を設定して各5頭ずつ移植を行い、エコーによる心機能評価、心血流シンチ、FDG-PET による機能評価を行った。

## C. 研究結果

1 : ヒト間葉系幹細胞の染色体解析による安全性評価方法の標準化

1) PLLA 3000 の細胞毒性試験：コロニー法細胞毒性試験に繁用される V79 細胞の形態も示す。hMSC は V79 (24-well プレート使用) と異なり細胞が密集することなく、疎に増殖するため、コロニーも淡く染色されるが、コロニーとしての判別は可能であった。コロニー数を3枚のシャーレの平均値を用いてプロットし、溶媒 DMSO に対して 80% の生存率を示す濃度として約 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を算出した。hMSC を長期に処理するために、わずかな、しかし、明らかな毒性を示す濃度として選択した。

2) hMSC の c-myc 異常解析：昨年度、Lot. 10909 を

用いた c-myc での詳細な解析の結果、300 細胞の観察で  $\chi^2$  検定を行なう方法を提唱した。そこで、Lot. 10796 および Lot. 11809 の観察を追加した。Lot. 11809 では組織工学材料 PLLA の影響をみるため、PLLA 3000 を 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加した群も設定した。観察細胞数は 300 であるが、その中でのばらつきも確認したいと考え、100 細胞毎の異常頻度をプロットした。hMSC 10909 は、昨年度の結果を 10796 と同様の形式で表示したものである。10796 は 5 代目、約 1 ヶ月まで継代した細胞の結果であるが、100 細胞間でのばらつきはほとんどなく、また、継代によって異常細胞が増加する傾向も見られなかった。10909 では 10 代目から異常頻度が増加する傾向にあり、14 代目では明らかに増加していた。Lot. 11809 では、Non がこれまでと同様に培養液での継代を行なった結果であるが、継代につれて異常頻度は増加する傾向にある。また、再生医療においてスキャフォールドに細胞を播種し、その材料からの溶出物の影響を調べる目的で、生分解性材料 PLLA の添加実験を行なった。溶媒対照として DMSO のみ添加した群を設定した。DMSO 添加群は、いずれの継代時期においても未処理群より異常頻度は高くなかった。PLLA 添加群も 8 代目までは未処理群より高くはなかったが、10 代目では、未処理群および DMSO 群より高い傾向にあった。

上記 3 ロットの結果を、提唱している安全性評価法に従って 300 細胞の観察を行ない、 $\chi^2$  検定で解析した結果を表 2 にまとめる。Lot. 10796 では、5 代目までしか解析できなかったが、c-myc 異常細胞の有意な増加は認められなかった。Lot. 11809 では、1 ヶ月で有意差のある異常細胞の増加が認められた。

遺伝子座プローブだけでなく、染色体特異的 DNA プローブを用いる構造異常の解析も安全性評価指標の候補としていたが、分裂指数から判断して、ロットによっては培養初期の標本でさえ十分な数の分裂期細胞を集めることは困難であることが判明した。しかしながら、基礎データとして染色体構造異常の頻度に関するデータも確認しておく必要があると考え、hMSC 10796 の 1 代目の標本で 1 番と 4 番染色体

プローブ、比較的増殖が良かった hMSC 10909 で 1 番染色体での 5 代目までの解析を試みた。1 番染色体プローブを用いた解析では Lot. 10796 は 1.6%の細胞が転座という異常を示し、また 3 ロット以外の別のロットでの予備検討でも継代 5 代目で、2%の異常が観察された。4 番染色体では何れも異常は検出されなかった。Lot. 10909 では 1、3、5 代目の細胞を 200 個以上観察したが、継代による異常頻度の増加は認められなかった。

## 2 : ヒト間葉系幹細胞の細胞周期に及ぼす TGF $\beta$ と FGF-2 の作用機構に基づく評価

### 1) hMSC の細胞周期に及ぼす TGF $\beta$ の影響について

hMSC に TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 を添加し、それぞれの細胞周期に属する細胞数をフローサイトメトリーを用いて比較した所、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ 2 のどちらを添加した場合にも、DNA 複製期である S 期とそれに続く G<sub>2</sub> 期の細胞が減少し、G<sub>1</sub> 期の細胞が増加していることが確認された。

### 2) 細胞周期制御因子 (p53、p21、p16) の mRNA 発現に及ぼす FGF-2 の影響について

hMSC の培地中に FGF-2 を添加したものと添加していないもので 5 ヶ月以上継代培養 (23 継代まで) した際のそれぞれの発現レベルを比較した。hMSC の継代培養により p53 は 17 代目まで、p21 と p16 は 23 代目までそれぞれの発現が有意に上昇した。FGF-2 の影響としては、p53、p21、p16 とも hMSC の 11 代目において、mRNA 発現レベルの上昇を有意に抑制したが、その後は上昇抑制作用を示さなかった。

### 3) hMSC の細胞周期に及ぼす *in vitro* 培養期間と FGF-2 の影響について

hMSC を継代培養し、3 代目と 11 代目の細胞について比較した。細胞の継代培養を続ける事によって (3 代目の hMSC に比べて 11 代目では) G<sub>1</sub> 期の細胞が増え S 期、G<sub>2</sub> 期の細胞が減少した。しかし、FGF-2 によって、増加した G<sub>1</sub> 期の細胞が減少し、反対に S 期、G<sub>2</sub> 期の細胞が増加した。

## 3 : 組織再生用材料評価方法の開発

本年度は、ヒト由来間葉系幹細胞をアルギン酸ゲル内に封入して 3 次元培養できるかどうかを検討した。昨年度と同様に、調製したアルギン酸溶液中に細胞を懸濁させた後、カルシウムイオンを含む溶液を用いてゲルを調製した。今回は、これまでの手法とは異なり、調製した細胞懸濁アルギン酸溶液を、pH を中性域に調製した塩化カルシウム水溶液中に滴下して細胞を含むアルギン酸ゲルビーズを調製した。所定期間培養後、EDTA 溶液にビーズを浸漬することで架橋剤として働いていたカルシウムイオンを取り除き、ゲルをゾル化させて細胞を回収した。回収した細胞を光学顕微鏡で観察したところ、1 週間の培養後の間葉系幹細胞数はほとんど増えておらず、むしろ一部の細胞は死んでいることが認められた。実際、培養 1 週間後に EDTA 処理後すぐに、回収した細胞から total RNA を回収したところ、アルギン酸からはディッシュ上で培養していたものから回収した場合の約 1/20 から 1/40 程度しか回収できなかった。これに対して、細胞接着性を高めた RGD 修飾アルギン酸、さらにはそれと PHSRN アルギン酸との混合物から調製したゲルを用いて 3 次元培養した場合には、回収 RNA はディッシュの場合と比較して 1/2 から 1/4 の量が回収することができた。現在は、種々のアルギン酸ゲル中で培養した間葉系幹細胞より回収した total RNA の DNA Microarray を用いての網羅的解析を試みているが、3 次元培養を行うことで特定の遺伝子の発現が促進あるいは抑制されていることが示唆されている。この結果に関しては、さらなる詳細な検討を加えた後に報告したい。

ヒト軟骨細胞と骨芽細胞とを共培養したところ、4 週間経過しても骨及び軟骨分化の増強は認められなかった。しかしながら、培地中に骨分化誘導因子として  $\beta$ -グリセロリン酸、アスコルビン酸及びデキサメタゾンを追加すると、共培養した場合の軟骨分化が促進することが認められた。

#### 4：循環器系の再生に関する安全性評価方法の標準化

##### 1. 移植細胞集団由来の腫瘍発生に関する検討

培養したヒト骨格筋芽細胞中に腫瘍化細胞が混入していたことを想定し、ヒト骨格筋芽細胞と CCL136 の細胞数比が 1:0、100:1、1000:1、10000:1、0:1 となるように混合し、軟寒天コロニー形成法での検出を検討した。

また、今回検討するにあたって、コロニーを次の判定基準で分類した。

- ：コロニーが確認されない
- ±：コロニーは確認できるが、明確ではない
- +
- ++：顕微鏡を使用せず、目視でコロニーが確認できる

腫瘍細胞によるコロニーは、下図のように観察される。



図 3. 軟寒天コロニー形成法による正常細胞（左図）と腫瘍細胞（右図）

培養開始 1 週後では、100:1 および 1000:1 で培養した場合に、コロニーが確認された。しかし、確認されたコロニーは小さく（±）、明確な判断は困難と考えられた。培養開始 2 週後には 100:1 で培養した場合には、明確なコロニー（+）が 8-13/well (n=2 で実施し、8-13/well は、1 例は 8 個のコロニーが観察され、もう 1 例では 13 個のコロニーが観察されたことを示す) 確認された。1000:1、10000:1 の場合にも、明確なコロニーが確認されたが、コロニー数はそれぞれ 1-1/well、0-1/well であった。3 週間培養した場合には、100:1 の場合に明確なコロニーが 10-16/well、目視で確認できるコロニー（++）が 6-16/well 存在した。1000:1 の場合には、明確なコロニーが 1-3/well、目視で確認でき

るコロニーが 1-1/well 存在した。また、10000:1 の場合にも、目視で確認できるコロニーが 0-1/well 存在した。さらに 4 週間培養した場合には、1000:1 の場合に明確なコロニーは 1-3/well、目視で確認できるコロニーは 1-1/well であり、10000:1 の場合には、目視で確認できるコロニーが 0-1/well であった。以上のことから、3 週目までは培養期間を長くすると、明確に検出されるコロニー数が増加するが、それ以上培養期間を長くしても、明確に検出できるコロニー数が増加しないことが確認された。また、10000:1 で培養した場合にも、コロニーは確認されたが、2well で実施したうちの 1well でしかコロニーは確認されていない。また、前回の検討では 3 週間の培養でコロニーは確認されておらず、10000:1 の場合には腫瘍細胞の混入を検出できない場合もあることが予想された。

以上、今回の検討結果から、試験期間は 3 週間でも十分であり、検出限界は、腫瘍化細胞が 1000:1 の割合で混入していた場合であることが判明した。

（次世代評価指標

##### 2. 免疫不全マウスを用いた異所性移植による腫瘍原性否定試験

免疫不全マウスによる腫瘍原性否定試験は、方法論で述べたようにまだ標準化された評価手法がなく、そのため選択した免疫不全マウスの長期飼育の影響確認などバックグラウンドデータの取得より開始した。現在までに確認された内容は以下のごとくである。

- ・通常の GLP 施設で免疫不全動物の長期飼育は可能か？  
→クラス 1 万の施設で NOD.CB17-Prkdcscid/J を通常の飼育方法で飼育中であるが、現在のところ（飼育 3 ヶ月）問題はない
- ・長期飼育による影響は？  
→胸腺腫・Leaky（正常 T、B 細胞の出現）・腫瘍発生率・腫瘍発生部位など、腫瘍の種類のパックグラウンドデータ収集  
（現在飼育中の NOD.CB17-Prkdcscid/J は 6 ヶ月で胸腺腫が出始める）定期的に検査を実施中。
- ・バックグラウンドデータ（血液・病理）取得