

→体重・血液生化学・病理学的検査を定期的
に実施中

5：再生軟骨の大型動物総合的評価方法の標準化

1. 動物試験

動物試験は以下の写真のように実施され、各取り出しの時期まで飼育又は飼育中である (図 4)。

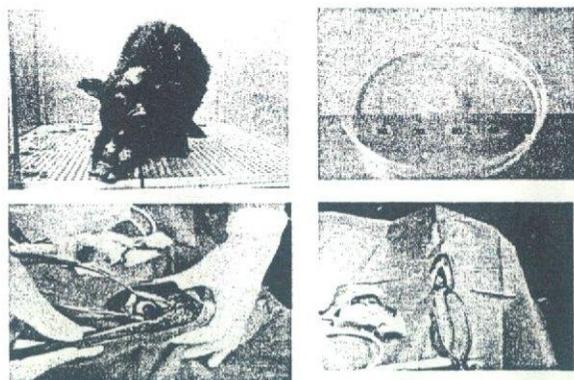


図 4. 埋植方法

2. 肉眼的所見

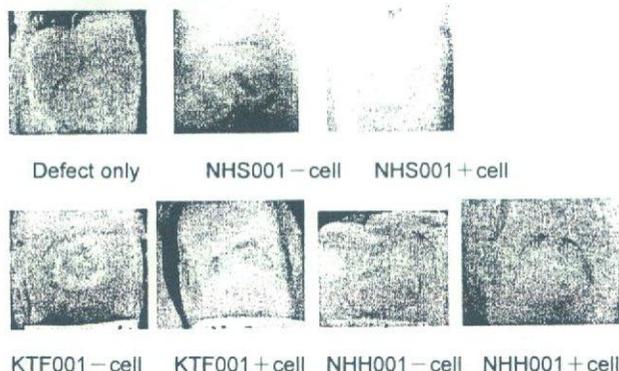


図 5. 6ヶ月後の埋植部位の表面像

Femoral groove 内の埋植部位(修復部位)の表面像(図 5)を見る限り、NHS001+cell を用いた場合の修復部位表面が最もスムーズであり、正常部分と同様の光沢を有しており、軟骨再生が良好であるまたはほぼ完了したと考えることもできる状態であった。細胞を播種しなかった NHS001-cell では修復部位が盛り上がり、凹凸のある表面構造を呈しており、修復が不完全であると思われる。KTF001-cell、+cell およびコントロールである Defect only は凹形状を有し、修復が不十分な状態であることが推測され

る。NHH00-cell および+cell は凹形状を有してはいるものの、凹形状は小さく修復がある程度進んでいると考えられる。

NHH001-cell では細胞が播種されていないにもかかわらず、欠損部分の修復が進んでいることより、NHH001 は有用な軟骨修復用多孔質体になる可能性があるといえる。

3. 組織学的所見

NHS001+cell を用いた場合の組織像は HE 染色、AB 染色および SO 染色のどの染色方法においても、周囲の正常組織と同様の組織構造および染色性が観察され、コラーゲン タイプ II および酸性ムコ多糖の存在が観察され、軟骨再生がほぼ完了しているように見える。細胞を播種しなかった NHS001-cell では欠損部分は充填されているが、周囲の正常組織とは異なる染色性を示し、硝子軟骨様組織ではないことが観察された。KTF001-cell および+cell においても周囲の正常組織とは異なる染色性を示し、硝子軟骨様組織ではないことが観察された。

Defect only では AB 染色および SO 染色で染まらない部分が広く、硝子軟骨様組織が形成されていると推定される。NHH00+cell では染色部分は周囲組織より厚みはあるが、染色性は周囲組織との違いは認められず、硝子軟骨様組織が再生されていると思われる。

軟骨欠損作製においては軟骨下骨まで欠損を作成しているが、NHS001+cell では軟骨下骨部分の緻密度が高いことより、軟骨下骨の欠損部分の修復が不十分であることが示唆されるが、NHH00+cell では軟骨下骨の海綿状構造も周囲組織と違いが認められなかった。

組織学的評価からは NHH00+cell での軟骨修復が最も進んでおり、次に NHS001+cell が良好であった。NHH00-cell では前記 2 群より修復は劣るものの、細胞を播種していなくても軟骨修復が進んでいることより、軟骨再生用の医療機器としての可能性が示唆された。

胞を骨芽細胞に分化させると、ヒト血清で培養した細胞でALP活性が高値を示した (data not shown)。

2. 骨分化時の細胞表面マーカーの変動

新鮮骨髄から得られた間葉系幹細胞を骨分化し、1、3、7日目に細胞を回収し、細胞表面マーカーの変動を確認した。その結果、CD73が骨分化開始1日目に陽性から弱陽性への推移が観察され、3日目には完全に弱陽性の発現に推移した。ただし、7日目の発現は3日目と変化が無かった。ALPは、抗体が骨型を特異的に認識するものではないため、間葉系幹細胞の状態でも弱陽性と陰性の集団が認められ、骨分化開始1日目では変化は認められなかった。しかし、3日目には陰性～弱陽性だった集団が弱陽性～陽性に推移するのが認められ、7日目にも一部弱陽性の集団が認められたが、陽性の集団の割合が高くなることが認められた。また、CD44、CD140bをはじめとするそれ以外の細胞表面マーカーでは、細胞密度により推移するものは認められたが、間葉系幹細胞を骨分化させることによる推移は認められなかった。

7: 角膜創傷治癒レンズの開発

1. インプリント効果の確認

EGFは酸性アミノ酸(負電荷)に富むため、ポリマーのホスト成分には正電荷のDMAPMAを用いた。DMAPMAの濃度の異なるモノマー混合液を作製し、鋳型としてPLSHDを加えたインプリントポリマーを作製した。同時に、PLSHDを加えない非インプリントポリマーを作製し、対照材料として用いた。作製したポリマーをEGF水溶液に浸漬し、吸着量を比較した。その結果、PLSHDがEGFの鋳型代替物として機能しており、特異的な吸着サイトがポリマー中に形成されている可能性が示唆された(図6)。

DLKWWELRを鋳型としたインプリントポリマーも同様に作製したが、EGFの吸着挙動を調べたところ、それらには非インプリントポリマーに対する優位性は見出せなかった。この結果から、DLKWWELRは鋳型代替物として適当でないと判断し、以降の断片インプリント法ではPLSHDのみを用いた。

2. 架橋成分の用量検討

ポリマーの空孔サイズがゲスト分子に対して適切でなければ高い吸着特性は得られないわけだが、架橋成分の用量はその空孔サイズに直接関係するため非常に重要である。架橋成分EGDMAの用量が与える影響を調べるために、EGDMA用量の異なるPLSHDインプリントポリマーを作製した(図6)。

EGF溶液に48時間浸漬後、この結果から、ポリマー中のEGF残量が最も多いNo.9と、次に多いNo.8をコンタクトレンズ材料として選択した。

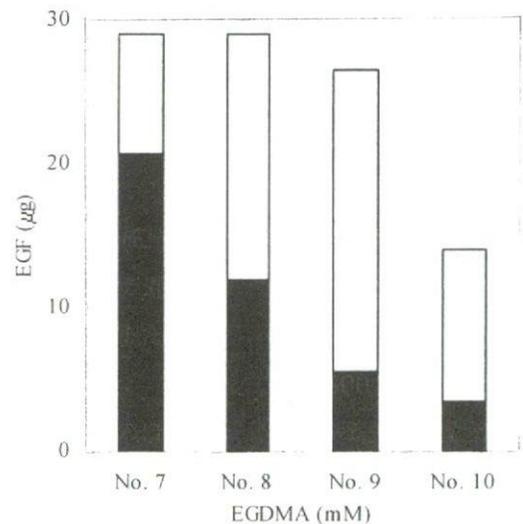


図6. EGFを吸着させたポリマーを生理食塩水に浸漬し、6時間後のEGF溶出量を調べた。■は溶出した量、□はポリマー中の残量。

3. コンタクトレンズの装用実験

ウサギ眼でのコンタクトレンズ装用実験を行った。ウサギは角膜の治癒が比較的早く、無処置であっても数日で完治することが知られているため、No.9よりも放出速度の速いNo.8の組成を使用した(図6)。No.8のインプリント/非インプリント両ポリマーをコンタクトレンズ形状に成型して作製し、創傷治癒効果の評価を行った。創傷を作製した眼を4つに群分けし(無処置群、EGF適時点眼群、レンズ①装用群、レンズ②装用群。ただしレンズ①は非インプリントポリマー、レンズ②はインプリントポリマー)、それぞれの処置を行って適時観察し、創傷治癒速度を算出した(表2)。その結果、レンズ②装用群とEGF点眼群は同等の治癒速度であり、無処置群

4. 生化学所見

修復組織(埋植部位)におけるコラーゲン タイプ II および酸性ムコ多糖の含有量を測定した。コラーゲン タイプ II および酸性ムコ多糖の含有量は NHS001-cell または+cell の間に差は認められなかった。埋植期間が長くなれば(6 ヶ月および 12 ヶ月の比較)、コラーゲン タイプ II および酸性ムコ多糖の含有量の含有量が増加していることが、NHS001 において観察された。

5. 力学的所見

1)動的粘弾性

各再生軟骨部位より径2mm厚さ1mmの試験試料を採取し、初期ひずみ：10%、ひずみ振幅：0.5%、測定周波数：0.1,0.3,0.5,0.7,1,3,5,7,10 Hz、試験温度：室温、生理食塩中で測定を実施した。

NHS001 では貯蔵弾性率(E')、損失弾性率(E'')ともに、細胞有のほうが cell 無よりも正常軟骨に近い値を示していたが、その差はわずかであり、また測定値のバラツキも大きく、有意差は無かった。

NHH001 においても E' 、 E'' ともに細胞有のほうが cell 無よりも正常軟骨に近い値を示していたが、その差はわずかであり、また測定値のバラツキも大きく、有意差は無かった。

KTF001 では E' 、 E'' 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、試験片の形状がきれいな ϕ 2mm の円柱とならず、厚さの測定値誤差が大きくなった、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)超音波

Maximum Magnitude(強度)については NHS001、NHH001、KTF001 のいずれにおいても細胞有の方が測定値は高い数値を示したが、細胞の有り無しで差は認められなかった。

Echo Duration(表面粗さ)については試験試料で間による有意な差は認められなかった。

6. 構造学的所見

MR I 画像診断

通常MR I 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。

NHS001 (細胞あり) 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、NHS001 (細胞無し) では正常軟骨部位とは異なった配向を示した。

NHH001では細胞の有り無しに関わらずコラーゲン繊維の配向が確認された。

KTF001 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。

多孔質体の埋植手術では、軟骨の欠損だけではなく、下骨にも少しの欠損を作成している。下骨の欠損部分は通常修復された場合、まず皮質骨のように水分の少ない骨により修復されるため、MR I 画像では黒い部分として表される。KTF001 埋植群及び NHS001 (細胞無し) 埋植群では黒く表示される部分が多かったが、NHS001 (細胞あり) 埋植群では黒く表示される部分が小さくなっており、正常(骨)の状態に近くなっていることが示された。(組織学的評価においても同様のことが観察されている。)また、12 ヶ月後には黒く表示される部分がさらに小さくなっていった。

6 : 培養骨の評価方法の開発

1. 新鮮骨髓液から間葉系幹細胞の培養

新鮮骨髓から 10%FBS と 15%ヒト血清で間葉系幹細胞の培養を実施したところ、ヒト血清での培養で FBS と同等もしくはより多くの細胞の回収が可能であった。また、デキサメタゾンを添加した場合は、無添加の場合よりも多くコロニーが出現し、大量の細胞を回収することが可能であった。回収した間葉系幹細胞と思われる細胞を骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化させたところ、いずれの細胞にも分化したことから、この細胞が多分化能をもつ間葉系幹細胞であることが示された (data not shown)。また、FBS とヒト血清で培養して得られた間葉系幹細胞

と比較すると約 1.4 倍速かった。一方、レンズ①装用群の治癒速度には、無処置群との差は見られなかった。

表 2. 各群の創傷治癒速度

群名	創傷治癒速度 (単位: mm/h)
無処置群	0.134 ± 0.014
EGF 点眼群	0.189 ± 0.010
レンズ①装用群	0.144 ± 0.032
レンズ②装用群	0.184 ± 0.007

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

2 種の硫酸化剤を使用し、回収・精製方法を検討した。硫黄含量は適定法により測定した。SHa の組成から、硫酸化度を算出し、以下の通りであった。

	Ha	浸漬のみ	浸漬・脱気	
			TMA-SO ₃	Py-SO ₃
硫黄含量 (Wt%)	<0.01*	0.1*	0.30	2.42
硫酸化度	-	0.02	0.046	0.392

*: ICP により測定

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

架橋により多孔体を作製した。水に浸漬し、膨潤させたところ、いずれも 37°C での溶解は見られず、50°C でも 72 時間では変化が見られなかった。現在、生理食塩水中に浸漬して室温で観察しているが、架橋人工コラーゲン多孔体は 1 ヶ月、架橋 SHa 多孔体はほぼ 1 年間、それぞれ形状を維持していた。

9: 3 次元培養系での分化・増殖能評価技術の標準化

1) 二次元培養系

hMSC あるいは hADSC を二次元 (培養用ポリスチレンディッシュ) で分化用培養液を用いて培養すると、いずれの細胞もほとんど細胞数に変化がなかつ

た。

オイルレッド O 染色を行い脂肪への分化を確認したところ、いずれの細胞も培養後 5 日目あたりから経時的に細胞中の中性脂肪の量が増加していた。

培養液中のアディポネクチンの量は hMSC および hADSC どちらの細胞も増加していたが、レプチンの量は hADSC のみ増加して hMSC ではほとんど増加していなかった。

IGF-I は種々の細胞増殖に関与するサイトカインであり、脂肪細胞からも産生される。hMSC では分化培養初期から IGF-I の産生が認められたが、hADSC では hMSC と比較してかなり産生量が少なく、経時的に減少する傾向が観察された。

2) 三次元培養系

三次元培養にはコラーゲンスポンジ、フィブロインスポンジ、キチン不織布 (ベスキチン)、アルギン酸不織布 (アルゴダーム) を用いた。

hMSC および hADSC を三次元培養した場合のグルコース消費量を測定したところ、分化培養液で培養した場合には、三次元培養の場合でもほとんど経時変化は観察されなかった。

二次元培養系においてアディポネクチン産生量は hMSC の方が hADSC と比べて多かったが、三次元培養系ではいずれの細胞も経時的に産生量が増加しており、産生量に差は観察されなかった。また、キチンあるいはアルギン酸不織布と比べると、コラーゲンおよびフィブロインスポンジを用いた場合に産生量が多い傾向が観察された。

レプチンの産生量を測定したところ、hMSC では二次元培養系と同様にほとんど観察されなかった。一方で hADSC では二次元培養系で産生が観察されたが、三次元培養系ではコラーゲンスポンジを用いて培養した場合のみ非常に高い産生が観察され、培養基材による差が明らかであった。

IGF-I は hMSC、hADSC のいずれでも同程度産生されおり、分化培養 13 日目頃に産生のピークが認められる傾向があった。

以上のように、二次元および三次元培養系でグルコース消費量、アディポネクチン、レプチン、IGF-I

の産生量を非破壊的にかつ経時的に観察し、比較することが可能であった。

10：骨補填材の評価方法の開発

1) ヒト破骨前駆細胞の培養

ヒト破骨前駆細胞 (Osteoclast Precursor Cell : OCP) は培養7日目でコンフルエント状態になり、多核細胞化(破骨前駆細胞が破骨細胞に分化した状態)したことが確認された。また、細胞が付着していた部分にアパタイトが溶解して生じたエッチピットが観察された。

2) 二次元電気泳動によるタンパク吸着マップ

培地の二次元電気泳動により FCS(牛胎児血清)に含まれる血清タンパクであるアルブミンなどのスポットが主として観察された。HAp/Col 複合体と接触した群では、タンパクのスポット濃度が低下しており、HAp/Col 複合体がタンパクを吸着していることが確認された。微量タンパク質については銀染色等の条件を最適化する必要がある。

11：由来の異なるコラーゲンの特性評価

各種動物より得たアテロコラーゲンを凍結乾燥することにより、コラーゲンスポンジを作製した。凍結乾燥により、非常に細かな多孔質のコラーゲンスポンジを作製することが可能であり、凍結の条件によりポアサイズが約 200~300 μm 、と約 20~100 μm であった。

このスポンジ上に細胞を播種した場合、Alkaline Phosphatase 活性 (ALP 活性) および Procollagen type I C-peptide (PIP) にどのような影響が確認されるか検討した。昨年マウス由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) およびマウス由来軟骨細胞 (ATDC5) を用いて ALP 活性について評価したが、本年はヒト由来の細胞を用いて ALP 活性に加え PIP についても評価した。昨年の結果から、特にマウス由来骨芽細胞の場合、ポアサイズに起因すると考えられる ALP 活性に大きな違いが見られたが、今回用いた SaOS-2 細胞では、ポアサイズの大小や、コラーゲンの由来にかかわらず培養日数に伴って ALP 活性の増加が見

られ、分化の進行が確認された。

さらに、変性温度が比較的低いサメアテロコラーゲンで作製したスポンジであっても、細胞から分泌された細胞外マトリックスが蓄積してくるにより変性、溶解が起こりにくくなり、形状を維持できる事が確認された。

次にラット背部皮下に各コラーゲンスポンジを埋植し、1、2、4 週目でサンプルを採取し、観察評価した。埋植後1週間ではコラーゲンスポンジも肉眼的に観察された。埋植後4週目では、ウシおよびブタ由来のスポンジは、縮小はしているが肉眼的に確認された。一方、イズミダイおよびサメ由来では確認出来なかった。ブタ由来スポンジでは、4週目には薄くなり、ほぼ組織に取り込まれた状態となったが、若干の炎症は見られるものの、比較的良好な状態で推移したと考えられる。

12：再生軟骨の力学的評価

フィブロインスポンジ内では培養後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。一般に軟骨細胞は材料表面に接着するとよく増殖するが、脱分化によって基質産生量は減少する。しかし、フィブロインスポンジ内では軟骨細胞はよく増殖し、基質産生も盛んである。

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

変形性関節症のレントゲングレードが進むにつれて SFA は大きくなる。一方、外傷では SFA は小さい。

明確な正常の値を示すことができないが、我々の測定した何名かの正常人の値と比較する。

CS846 は変形性関節症のグレード I と IV、受傷2ヶ月以内の外傷においても上昇しており、これらでは関節軟骨のプロテオグリカンの産生が亢進していると考えられる。

C2C は全体に一定でやや低下している。

CP2 も全体で低下している。
COMP は全体に亢進していた。

1 4 : 再生骨組織の定量的・客観的臨床評価法の開発

人工骨 (NEOBONE) 移植のみを行った症例の造影 MRI で、人工骨充填領域に内部に向かって術後 6 ヶ月で 5mm、12 ヶ月で 10mm 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 18 ヶ月後には、充填領域最深部までほぼ均一に造影された。自家骨髄培養細胞導入人工骨移植の症例では、術後 6 ヶ月で 8mm、12 ヶ月で 12mm であり、骨再生の促進が認められた。自家骨髄培養細胞導入人工骨移植での ^{99m}Tc -MDP 骨シンチ (SPECT) では、術後 6 ヶ月で集積がピークに、12 ヶ月で集積が減少し、骨再生がプラトーに達していることが評価できた。

1 5 : 再生血管の安全性と有効性に関する 47 症例の臨床評価

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 4 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、多臓器不全などによる遠隔死亡であった。再手術は 2 例に認めた。この際に採取した組織片より、内皮化、中膜の形成を認めた。1 例は、再生血管に関連しない再手術例であった。遠隔期に狭窄増を認めたものは 6 例で 5 例にバルーン血管形成術を施行した。平均 4.1 ± 1.0 年の経過観察で、瘤化、破裂、石灰化、悪性新生物の発生は認めていない。遠隔死亡 4 例以外は元気に外来に通院中である。

1 6 : 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。

2) 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、 α 、 β -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。

3) 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。

4) 虚血性心筋症ブタに対する治療

心臓超音波検査にてシート+大網 (SN) 群は他の 3 群に比して有意な心収縮能の改善および心拡大抑制効果を認めた。また、心プールシンチにおいても

コントロール群に比して SN 群において血流の改善を認め、さらに FDG-PET による評価では、糖代謝能の改善を認めた。

D. 考察

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

組織工学材料の hMSC 継代に及ぼす影響をみるために、今回、平均分子量 3000 の PLLA を用いたが、DMSO に溶解し、培養液に添加した時点で若干の析出が起き、長期に継代しているうちに析出物が蓄積してきた。において、#10 での PLLA 添加群での異常頻度が上昇しているが、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より明らかに高い濃度の PLLA の影響をうけていることは否定できない。

hMSC は市販品であるが、Cambrex 社によるとドナーから採取後、細胞を増殖させ、製品とするまでに約 3 週間 (2-3 代の継代) を要しているということである。従って、本研究で 1 ヶ月の培養を行なった細胞は、ヒトから採取直後からではすでに 2 ヶ月近く培養していることになる。

現在臨床研究で行なわれている培養は、採取後長くて 1 ヶ月といわれており、実際的にはその期間では、異常細胞頻度が有意に増加することはないであろうと考えている。

また、ロット差は、臨床での個人差に相当すると考えられるが、3 ロットの間でも差が認められる。例えば、Lot. 11809 の 1 代目での異常細胞数を基準にすると、Lot. 10796 は 1 代目からすでに有意差のある異常細胞数を示していることになる。In vitro 継代培養による異常頻度の変化の有無を判定するには、患者本人の採取直後の細胞の異常を慎重に観察する必要があると考えられる。

十分な数の分裂中期像があっても、4 番染色体は誘発される異常頻度が低く、解析細胞数を多くする必要が考えられることから、本目的の解析には適切ではないと考えられる。2 例の健常人の末梢血リンパ球で同じ手法で 4 番染色体プローブでの解析を行なった経験があるが、異常頻度は 0.13%あるいは 0.11%であり、現実的には約 800 細胞を観察してやっ

と 1 個の異常細胞を検出できる程度であった。今回は hMSC で、細胞は異なるが、200 細胞観察しても 1 個の異常も検出できなかったことは、末梢血リンパ球のデータからも納得できる数字である。また、癌細胞でさえも、4 番の異常頻度は極端に低いものがあつた (平成 17 年度研究成果)。

一方、1 番染色体では、60 細胞の観察ですでに、1 個の異常を検出できており、4 番染色体より、異常頻度が高いことが予想され、100 細胞程度の観察でも異常頻度を算出でき、in vitro 培養前後の比較が可能だと考えられる。評価指標としては 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られる。

しかし、根本的に hMSC の標本では安定した数の分裂中期像を集めることが困難という事実から、染色体を観察対象とする評価は困難だと考えられた。

そこで、c-myc 以外の評価指標として、p53 を追加したいと考え予備検討を行なった。p53 はヒト正常 17 番染色体短腕の先端 (17p13.1) に位置し、その欠失および増幅が観察対象となる。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た。しかし、従来の、染色体標本を作製し、 -20 度に保管した標本では、17 番染色体特異的動原体プローブがハイブリシにくいことが判明した。同時にハイブリした作製直後の標本では、動原体も良く染まっていた。p53 の欠失解析用の標本は、作製直後のものを準備することに注意しなければならない。Lot. 11809 1 代目の作製直後の標本を用いて 300 細胞観察した結果、3.3%の増幅と 1.3%の欠失が検出された。

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

昨年度までの研究から、hMSC を in vitro で培養を続けると細胞の増殖能が低下し、細胞が老化してくることがわかった。また、それは TGF β の発現上昇を伴うことが確認された。そこでさらに、細胞老化にも関わると考えられる細胞周期制御因子の p53、p21、p16 の mRNA 発現の変化について、TGF β の影響を調べた。p53 は、細胞周期の制御やアポトーシス

などに関与し癌抑制遺伝子として知られており、p21はそのp53に誘導される。p16は、p53→p21の経路とは別経路で細胞老化に関わるとされている。TGFβを添加する事によってhMSCにおけるp53、p21、p16のmRNA発現は有意に上昇した。またこれは、hMSCを*in vitro*で培養し続ける事によって起こる遺伝子発現の変化と同様であったことから、hMSCの細胞老化を伴った増殖能低下にTGFβシグナル伝達系を経た細胞周期の制御が関与している可能性が示唆された。

そこで今年度は、TGFβが実際にhMSCの細胞周期に影響を及ぼすのかを確かめるために、フローサイトメトリーを用いて検討した。hMSCにTGFβ1、TGFβ2を添加し、それぞれの細胞周期に属する細胞数を比較した所、TGFβ1、TGFβ2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G₂期の細胞が減少し、G₁期の細胞が増加していることが確認された。このことから、TGFβはhMSCの細胞周期においてG₁期→S期への移行を抑え、細胞の増殖を抑制していることがわかった。以上のことから、hMSCの細胞老化を伴った増殖能低下はTGFβシグナル伝達系が関与する細胞周期制御によって起こる可能性が示唆された。hMSCにTGFβを添加することによる細胞周期制御因子の遺伝子発現レベルの変化と細胞周期への影響が明らかになった。

これまで述べてきたように、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。細胞組織利用医療機器の材料としてhMSCを有効に利用するためには、この様な細胞増殖能低下を抑えた方が良いであろう。そこで現在幹細胞の培養の際に用いられることのある細胞増殖因子fibroblast growth factor (FGF)-2について、hMSCへの影響を検討した。昨年度までに得られた知見として、まず、hMSCは継代培養を続ける事によってその増殖は低下してくるが、FGF-2を添加することによって増殖低下が抑制されることを確認した。さらに、SA-β-Gal染色法やBrdUの取り込み量の検討から、FGF-2はhMSCの継代培養によって起こる老化を抑制する可能性が示唆された。

そこで今年度は、細胞周期制御因子であるp53、p21、p16のmRNA発現に及ぼすFGF-2の影響について検討した。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。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。このようなhMSCの継代数に伴う発現レベルの上昇は、TGFβ1またはTGFβ2をhMSCに添加した場合の変化と同様であった。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。これらのことから、p21やp16のような老化に伴って上昇する遺伝子の発現に対し、FGF-2はそれらの発現が上昇する時期を遅らせることがわかった。つまり、FGF-2は、hMSCの老化を完全に止めるわけではなく、遅延させているのではないだろうか。

さらにhMSCの細胞周期に及ぼす*in vitro*培養期間とFGF-2の影響について検討した。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)G₁期の細胞が増えS期、G₂期の細胞が減少した。これはTGFβを添加した場合と同様な変化であった。しかし、FGF-2によって、増加したG₁期の細胞が減少し、反対にS期、G₂期の細胞が増えた。以上のことから、hMSCを*in vitro*で培養し続けると、G₁期→S期への移行が抑えられ細胞が増殖しなくなってくるが、FGF-2によりその細胞周期停止を抑えることがわかった。以上のことから、FGF-2はhMSCの*in vitro*培養によって起こる細胞周期停止を抑えることによって、老化を遅らせているのではないかと考えられた。

これまでにhMSCの*in vitro*培養によるTGFβ2、p53、p21、p16の発現レベルの上昇をFGF-2によって抑えることが確認していることから、FGF-2はTGFβ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の増殖能維持や老化遅延など

の効果を発揮する可能性が示唆された。

3：組織再生用材料評価方法の開発

昨年度の検討において、GAPDH が従来通り細胞の分化マーカーの発現を評価する際の housekeeping gene としてふさわしいかどうかに関して、我々は疑問を示した。GAPDH の適当性に関しては今年度検討を行っていないが、本年度の検討において、回収した total RNA 量が修飾アルギン酸の細胞接着性と比例する傾向があることを改めて見いだした。このことは、アルギン酸内部に封入されていた細胞数と total RNA 量とが比例することを示唆している。発現遺伝子量の規格化にはどのような値を用いるべきかに関しては数多くの議論があり、その中には回収した total RNA 量による規格化を提案しているグループも存在する。規格化用のパラメーターとして適当かどうか議論の余地はあるが、昨年度の結果と比較しても、total RNA 量のほうが GAPDH 発現量よりも実際の細胞数を反映していることが予想される。現在、解析中の遺伝子発現検討と合わせて、この点に関しても今後検討すべきであろう。

今後、様々な組織の再生を試みていく上で、幹細胞と増殖因子類のみを利用するだけでなく、予め一定の割合で分化細胞を組み合わせることで組織再生の誘導能を高める手法も有用になってくると我々は考えている。その基盤的な検討として、骨軟骨複合組織の再生を念頭に置いて、骨芽細胞と軟骨細胞との共培養が各々の細胞の分化にどのような影響を与えるかの検討を試みた。既に、我々はウシ軟骨細胞とラット骨芽細胞との共培養により、各々の分化が促進されることを見いだしており、その分化促進には液性因子による間接的な相互作用と両者の接触を介した直接的な相互作用とが影響していることを明らかにしてきた。今年度は、そのモデルを基に、ヒト細胞を用いて同様の検討を試みた。その結果、モデル系で見られたような単純な共培養による分化促進は見られず、骨芽細胞の分化を促進する目的で骨分化誘導因子類を添加した系においてのみ、軟骨細胞の分化促進が観察された。詳細な検討は必要であ

るが、予備検討を行ったところ、培養4週間経過しても軟骨細胞の肥大化は認められていない。よって、ヒト系ではその分化は促進されているものの、軟骨が肥大化し生体内の成長板などの組織に見られるような細胞の傾斜的な分化連続組織が形成されるためにはより時間がかかることが想像される。また、骨芽細胞の分化の指標であるオステオカルシン産生量を測定したところ、骨分化誘導因子類を添加した場合、共培養系からの産生量のほうが骨芽細胞単独培養の場合より大きくなっていった。このことから、共培養によって、軟骨細胞のみでなく骨芽細胞の分化も促進されていることが示唆された。これらのことより、単純な共培養ではなく、今回添加したような骨分化誘導因子やそれ以外の液性因子を加える、あるいは幹細胞やそれ以外の細胞を系に加えることにより、各々の細胞分化はより効率よく促進されると考えている。さらに詳細な検討の余地はあるものの、ヒト細胞を用いても、骨軟骨複合組織を再生できる可能性を見いだしたことは、今後の再生医療技術の発展に大きく貢献すると考えられる。

4：循環器系の再生に関する安全性評価方法の標準化

1) .軟寒天コロニー形成法による移植細胞集団由来の腫瘍発生に関する検討

今回の検討の結果、軟寒天コロニー形成法で、腫瘍細胞の検出が可能であることが示された。しかし、本試験方法は抜き取り検査であり、培養細胞中に含まれる腫瘍化細胞を100%検出できる方法ではない。また、腫瘍細胞の種類によっては検出できない場合も考えられ、Tremblayらの報告においても、免疫不全マウスへの移植法と軟寒天コロニー形成法の併用を推奨している。このように、腫瘍化細胞の検出試験を実施しても、完全に安全性を担保できるわけではないが、より安全性を高めるために本試験方法は有用であると考えられた。

しかしながら、さらに新規な培養細胞を用いた手法として、継体した培養細胞の核酸を用いた腫瘍化否定試験についても検討を開始した。以下に概念図

を添付した。

核酸レベルでの腫瘍化否定試験

アレイCGH解析による核酸レベルでの評価 (CGH=Comparative Genomic Hybridization)

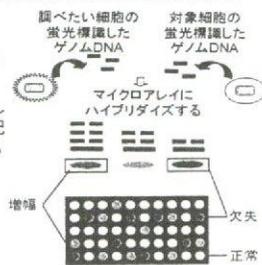
・アレイCGH

→ゲノムコピー数変化(DNAの欠失・増幅)を短時間で解析する方法
ハイブリダイゼーション・ターゲットとしてゲノム上にマッピングされたDNA配列をスライドガラス上にスポットしている小さい領域の異常も検出可能

核酸レベルで移植細胞に
変化がないかを検討

継代前の細胞に対して

継代数通常の細胞と継代数過剰の細胞を解析



これらの評価方法は動物を用いた、使用模擬試験において使用が可能なのであるとともに、複雑な系と長い時間が係るという欠点がある。動物での評価の段階までに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。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。

本研究においては国内で研究開発されている試験評価方法も加えて、同一試験試料で評価を開始した。

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MR I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。

6：培養骨の評価方法の開発

今回初めて新鮮な骨髄を用いたが、輸入骨髄とほぼ同様の扱いができることがわかった。輸入骨髄液には、骨髄のほかに1×PBS(-)とヘパリンが一定の割合で含まれているが、新鮮骨髄ではヘパリン液のみを添加して搬送したが、特に変化はなかった。また、研究成果ではふれなかったが、骨髄搬送時の温度についても検討を行った結果、冷蔵だと細胞にダメージがあるらしく、室温や37℃搬送のものに比べ、初代培養時のコロニー数が減ることが観察された。このため、骨髄を搬送する時の温度は、室温が

2) .免疫不全マウスによる腫瘍原性否定試験

現在進めている予備実験をもとに、下記内容の試験を予定している。

本試験として

腫瘍の自然発生 : NOD, CB17-Prkdcscid/J の長期飼育により腫瘍の自然発生について、時期・割合・部位・腫瘍の種類を把握し、発生した腫瘍が被験物質(細胞)に起因するのかを明確にする。さらに、免疫不全マウスの寿命や免疫不全の長期維持を含め移植期間の妥当性を検討し、移植細胞腫瘍化の有無を評価していく。

5：再生軟骨の大型動物総合的評価方法の標準化

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分もの時間が必要となる(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る。

良いと考えられた。

今までの輸入骨髄は、様々な人種の年齢の若いドナー（30歳以下）が中心であるため、日本人の高齢者の骨髄から細胞が培養できるかが問題と考えられた。検討した結果から、O社の培養条件では、細胞は問題なく増殖することがわかり、骨髄に含まれる間葉系幹細胞の数は、性別や年齢よりも個人差が大きく影響することが示された。データには載せていないが80歳女性の骨髄でも間葉系幹細胞は増殖し、骨芽細胞への分化を示したことから、年齢の影響はあまり大きくないと思われた。

培養骨の製造の際、FBSではなく、より安全性の高い自己血清を用いて培養する可能性も考慮し、今回は市販アロヒト血清を用いて初代培養を検討した。その結果、10%FBSに比較し、15%ヒト血清での培養で細胞を多く回収することが示された。更に、初代培養時にデキサメタゾンを経口投与することで、コロニーの数が増加することを確認できた。この作用機序は不明であるが、デキサメタゾンが間葉系幹細胞の接着を促進する役目を果たすと考えられた。デキサメタゾンを添加して得られた細胞は、骨芽細胞以外にも軟骨細胞や脂肪細胞に分化することを確認し、多分化能を有することから、間葉系幹細胞であると考えられた。また、それぞれの血清で培養してきた間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させると、15%ヒト血清で培養した細胞においてALP活性が高い傾向が認められた。このことから、ヒト血清で培養した間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させるほうが、培養骨を製造する上でも有用ではないかと考えられた。

新鮮骨髄から得られた間葉系幹細胞を骨分化させ、1、3、7日目に細胞を回収し、フローサイトメトリーで測定を実施した。昨年度までは輸入骨髄で今年度から新鮮骨髄であるため、すべてのデータを取り直したいと考え、試す価値があると考えられた抗体すべてについて解析を実施した。その結果、昨年度はCD44、CD140b、ALPで評価できると述べたが、異なる結果が得られてきた。CD44、CD140bの発現を詳細に解析したところ、これらは細胞密度により影響

を受けることがわかり、昨年度変化したのは骨分化ではなく、細胞密度が密になったための変動であることが確認された。そこで、それらに変わる早期評価に利用できる細胞表面マーカーを探索したところ、CD73が骨分化開始1日目から推移することが示された。また、ALPは昨年度同様に推移することが確認された。このため、骨分化開始3日目の細胞のCD73とALPの発現を解析することで、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化することが予測可能であることが示された。以上のことから、CD73、ALPにより、骨芽細胞の早期評価が可能である。

今年度は、幹細胞のマーカーと考えられているSTRO-1のほか、CD271 (LNGFR)、CD117 (c-kit)、CD34について解析を実施した。しかし、これらのマーカーは弊社で培養している間葉系幹細胞には、いずれも発現しないことが確認された。STRO-1やCD117は、論文を調べると発現しない場合とする場合が報告されており、培養条件によって細胞表面マーカーの発現が変化することが考えられた。また細胞密度によってもマーカーの発現が変わることから、弊社と違う条件で培養した間葉系幹細胞では、細胞表面マーカーの発現状態が異なっている可能性がある。そこで、細胞表面マーカーを評価として用いる場合には、必ず予備検討が必要である。また、フローサイトメトリーで評価を実施する場合、一定数以上の細胞が必要になる。フローサイトメトリーはALP活性測定とは異なり、担体などの影響を受けずに解析が可能である有利な方法である。しかし、3次元培養では評価に利用できる細胞数を得ることが難しいので、フローサイトメトリーでの評価は平板培養時に有効な評価方法であると考えられた。

7：角膜創傷治療レンズの開発

分子インプリント法は、特定のゲスト分子に対する選択的な吸着サイトをポリマー中に形成させる有効な手段であり、広く研究されている。今回、EGFに対する吸着特性を高めたポリマーの作製を目的として、EGFの断片を用いてインプリント重合を行った。

断片として2種類のペプチドを検討したところ、PLSHD を添加して作製したポリマーは添加せずに作製したポリマーよりも EGF に対する優れた吸着特性を示し、PLSHD は EGF の代替鑄型分子となり得ると考えられた。一方、DLKWWELR は代替鑄型分子として充分ではなかった (図 2)。

3 種類のレンズの拡散係数を以下に示す。

拡散係数	
	拡散係数 (cm ² /sec)
No. 8 (非インプリント)	1.16×10^{-9}
No. 8 (インプリント)	3.20×10^{-11}
No. 9 (インプリント)	1.47×10^{-11}

No. 8 の 2 種類は、レンズポリマーの組成は全く同じであるにも関わらず、鑄型分子を加えたことで拡散係数は 36 分の 1 となり、ホスト成分の多い No. 9 では更に小さな値となった。この結果は、鑄型分子を加えることでポリマーに適切な吸着サイトが形成され得ること、また鑄型に対するホスト成分の比率を高くするとポリマーの吸着特性を強化できることを示唆する。この吸着特性の強化は次のように説明できる。鑄型分子が複数のホスト成分と相互作用できる場合、鑄型分子に対するホスト成分の比率が高いほど、鑄型分子 1 個と相互作用するホスト成分の数が多くなる。そのため、ホスト成分が多いほど (または鑄型分子が少ないほど)、より強固に結合する吸着サイトが形成できると考えられる。

創傷治癒実験の結果より、徐放性レンズ装用群は無処置群よりも治癒速度が速く、EGF を適時点眼した群と同等であること、また、非徐放性レンズ装用群の治癒速度は無処置群と変わらないことがわかった。このことから、EGF には治癒促進効果があるが、そのためには EGF 濃度を適切なレベルに保つ必要があり、一過性の過剰投与では十分な効果が得られないと考えられ、徐放性レンズはそのためのデバイスとして有用であることが示唆された。今回作製した創傷は、無処置であっても比較的短時間 (2~3 日) で治癒が完了したため、徐放性レンズの効果を調べ

るにはやや不適切であったかもしれない。治癒に要する期間が長いほどレンズの徐放性の寄与は大きくなるため、より規模の大きい創傷であれば今回の結果 (治癒速度が無処置群に対して 1.4 倍) よりも明確な差が現れると考えられる。

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

硫酸化剤については、従来の TMA-SO₃ 系での分子量低下が少なく、良好であったが、硫酸化度は 0.1 以下と、依然として低い水準であった。一方、より高い反応性を有する Py-SO₃ 系では硫酸化度 0.4 近くが得られており、反応性の高さが確認された。溶液粘度は H a もしくは TMA-SO₃ 系の反応物よりも下がっている。しかし得られた試料は繊維質の固形を維持しており、また着色も見られなかった。架橋によるマトリックス化やコーティングなどの実用途には問題ない範囲と考えられる。

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

これまでに、生吸収性ポリマーなどの合成基材への、S H a による被覆を実施してきた。今回は、S H a および人工コラーゲンそれぞれを多孔体とし、架橋することで不溶化することができた。また、これらを組み合わせ、複合化した基材を得ることができた。

生体と親和性の高いコラーゲン基材と、細胞の分化を促進する S H a との複合化により、細胞・組織との親和性および治癒などの効果の高い、高機能性マトリックスなることが期待される。特に、S H a の特徴である神経細胞の分化作用を生かした用途として、神経再生誘導のガイドや硬膜などへの応用が期待される。

9 : 3次元培養系での分化・増殖能評価技術の標準化

細胞数の変化については、二次元培養系、三次元培養系のいずれも、分化誘導を行った後ではほとんど増殖することはなく、むしろ減少傾向であること

が確認された。

脂肪への分化の指標としてアディポネクチン産生量の変化を観察したところ、二次元培養系ではhADSCと比較してhMSCの産生量が多かったが、三次元培養では逆にhADSCのアディポネクチン産生量が多い傾向が観察された。これは、培養環境の違いに起因すると考えられ、臨床応用にあたっては三次元培養のデータが必要であると考えられる。

培養基材による差については、不織布よりもスポンジを用いた場合にアディポネクチン産生量が多く、脂肪への分化を行うにはスポンジ形状がより適していることが示唆された。蛍光顕微鏡で観察をしたところ、キチン不織布およびアルギン酸不織布の場合、基材に細胞が接着しておらず凝集塊を作っていた。このことから、間葉系幹細胞の分化には、基材への細胞接着が重要であることが示唆された。

二次元培養系においてhADSCのみがレプチンを産生していた。三次元培養系では、hADSCであってもコラーゲンスポンジで培養した場合のみレプチン産生が観察された。このことは、三次元培養に用いる基材が大きく影響したものと考えられた。

以上のことから、間葉系幹細胞を脂肪に分化させた場合に、本試験方法を用いて細胞数の変化や分化の程度を評価できるばかりでなく、培養基材の評価も可能であることが明らかになった。

10：骨補填材の評価方法の開発

アパタイト・コラーゲン複合体の作製には未焼結のアパタイトを用いているため焼結体アパタイトと比べ比表面積が大きい。そのため、培地中の増殖・分化に影響を与える無機イオンが多く吸着し細胞の生育に不利な環境を引き起こしたと考えられる。そのため、本前処理法により無機イオンの吸着を飽和状態にすることによって、細胞培養が可能になった。

正常ヒト骨芽細胞は、骨補填材の安全性・有効性を評価するうえで、株化細胞とは異なりより生体内における分化能を維持していると考えられる。また、本実験に用いた正常ヒト骨芽細胞はドナーの年齢や人種が明確にされており、容易に購入できるので骨

補填材の評価として用いる標準細胞に適している。しかしながら、ロットにより増殖や分化能が異なるため、今後はロットの選択など取り扱いに注意する必要がある。

11：由来の異なるコラーゲンの特性評価

今回は、4種類の動物種よりアテロコラーゲンを抽出・精製して2種類の凍結法によりスポンジを作製した。そのスポンジ上に2種類のヒト由来細胞を用いた培養による評価、および動物に各種スポンジを埋植して基本的な特性の評価を行った。

コラーゲンスポンジを用いた立体培養では、コラーゲンの由来による細胞活性への影響はほとんど見られなかった。それに比べ、細胞種によっては、コラーゲンスポンジのポアサイズにより、細胞活性に違いが見られた。この事は、どの組織に向けたスキヤフォールドを開発するかによって考慮すべき重要な要素であると考えられる。また、今回本研究に使用したコラーゲンスポンジは1%溶液より作製したもので、気孔率が高く、やわらかいものであった。ゆえに、特に*in vivo*での評価では比較的短期間に吸収されたと考えられる。さらに、昨年度の結果から、コラーゲンスポンジの示差熱量計で得られた変性温度は、ウシ44.2℃、ブタ43.6℃、サメ34.5℃、イヅミダイ39.7℃であった。これらの値から推察される熱安定性の結果とも良く一致するのではないかと考えられる。これらの結果を考慮すると、目的の組織により至適なコラーゲン濃度、至適なポアサイズ、組織中での至適な消化時間が重要なファクターとなって来ることを示唆するものと考えられた。

12：再生軟骨の力学的評価

関節軟骨の摩擦・摩耗機構にはまだ不明な事項が多い。その低い摩擦係数と高い耐摩耗性から、流体圧によって荷重を支える流体潤滑の関与があることに間違いはないが、軟骨のように水をよく透過するゲル状の基質を有している場合には流体圧のみで荷重支持機構を説明するのは不可能である。親水性の高分子と相互作用を考慮して軟骨の摩擦・摩耗機能を

説明する水和潤滑機構が笹田らによって提唱されている。その表面構造の概要を図7に示す。

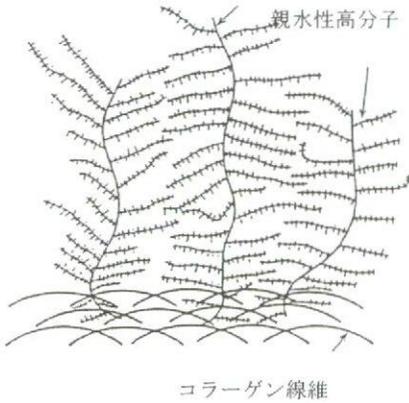


図7. 笹田らの提唱した水和潤滑のイメージ図

我々の採用した、摩擦力測定条件は以下のごとくである。

対面：SUS304ステンレススチール平板
($Ra=0,06\mu$)

荷重：29 mN

相対速度：0.8 mm/s

潤滑液：生理食塩液

この条件は、以下の事項を考慮して定めた。

- 1) 変形抵抗の誤差を最小とする
- 2) 水和潤滑（ニュートンの粘性摩擦式で表現し得る）の範囲での摩擦
- 3) 潤滑液の影響が比較的小さい

このときの摩擦係数は比較的高値(≈ 1)となる場合があるが、再生軟骨が未熟な構造から成熟していく様子を比較的再現性よく表現し得る条件である。基本的には、水和層厚の非常に薄い条件下での水和潤滑状態を計測していることになる。

フィブロインに播種して得られる軟骨組織や遠心刺激が加わった軟骨組織の摩擦機能を評価すると、その摩擦係数は環境設定によりかえって上昇していた。つまり、軟骨の基質産生量と軟骨の摩擦機能との間には必ずしも一致が見られない。

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

関節軟骨構成成分の解析から、早期変形性関節症、

あるいは受傷後まもない関節軟骨欠損症例において、これらの血清中濃度が上昇する可能性が示唆された。しかし、関節は損傷関節以外にもたくさん存在すること、脊椎にも椎間関節、椎間板がありそれらにも含まれること、あるいはこれらの中には関節軟骨以外の部位にも含まれる物質もあることから、明らかに損傷関節の状態を示しているとはいえない。今後、脊椎疾患患者など、他の疾患の患者でのこれらのマーカーの変化を検討する必要がある。

もし、本当に関節軟骨損傷のマーカーとなるのであれば、関節軟骨損傷を見つけるスクリーニング法として有用である。すなわち、血液検査のときにこれらのマーカーを検査し、高値を示す場合にはMRIあるいは関節鏡検査で精査する。これにより、はじめからむやみにMRIをするよりは経済的にも安価であるし、多くの患者さんのスクリーニングが可能になる。また、軟骨損傷の経過を調べる有効であるとともに、関節軟骨欠損修復方法の効果を調べるにも有用な手段となると考える。

本研究ではCS846は変形性関節症のグレードIとIV、および外傷の早期で亢進しており、アグリカンの産生の亢進を示唆している。C2C、CP2はいずれにおいても低下しており、その意義は不明である。COMPはすべてで上昇している。特に初期と末期の変形性関節症、および外傷の早期に上昇しており、軟骨損傷のマーカーとなる可能性がある。

1.4：再生骨組織の定量的・客観的臨床評価法の開発

臨床での再生骨の評価方法として造影MRI、 ^{99m}Tc -MDP骨シンチ(SPECT)が期待される。MRIによる造影所見は血流のある組織が新生していることを示しており、組織再生の重要な指標となりうる。 ^{99m}Tc -MDP骨シンチ(SPECT)は、骨代謝を反映しており、実際に骨再生が起こっている部位の評価が可能である。骨再生が完成すると、集積が低下することが示唆された。現時点では、対象部位、対象疾患、骨再生の方法とくにスキヤフォールドなどを考慮して、これらの評価法を組み合わせる用いるのが最も

有効な手段であると考えられた。

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

中期遠隔期までの経過観察で、再生血管は他に選択枝の無い複雑心奇形症例において有用であり、現在まで安全性にも問題ないと考えている。全国的に本方法が使用可能となる準備として、「医療用具の安全性に関する非臨床試験の実施の基準について」(平成14年9月30日 医薬発第0930001号)の別添「医療用具の安全性に関する非臨床試験の実施基準」(医療用具G L P)に基づき本吸収材料の生物学的安全性試験を行っている。臨床の場でこれらの方法が広く普及するために、さらなる研究と本治療に関する安全性の追求、評価法の確立、産官学の協同体制が不可欠である。

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を用いた検討

MS群において、MI群よりも有意に心機能が改善したのは、injection法の場合、注入直後から70-80%の細胞が失われるとされており、シート群ではそのlossが少ないことが挙げられる。また、MI群の組織学的な結果、筋肉様組織が島状に見られたことは、梗塞部におけるcell deliveryが、MS群ではよりhomogeneousに起こることが、心室壁肥厚の一因であろうと思われる。

さらに、MS群において、HGF、VEGFが有意に増加していたことから、HGFの抗アポトーシス効果、VEGFの血管新生効果が梗塞部の繊維化率の減少、血管新生の増生がみられた原因であろうと思われる。

2) 拡張型心筋症ハムスターを用いた検討

S群における拡大傾向の抑制は、T群以上に十分なcell deliveryが行え、さらに、全周にわたる均一な細胞接着が一因である。また、組織学的に、重要な骨格蛋白の欠損が原因であるDCMに、一部ではあるが骨格蛋白の再構築が認められたことも大きな要因である。

3) DCMモデル犬を用いた治療

これら効果の発現メカニズムの詳細は現在検討中であるが、移植細胞による物理的補強に加え、筋芽細胞からの各種増殖因子やサイトカインの液性分泌効果が関与していると考えられている。シート移植群は、移植後早期に心機能が改善した。このことは、これまでの単層シート以上の効果を挙げている。Deliveryされた細胞数の増加、分泌される増殖因子の増加によると考えられた。

4) 虚血性心筋症ブタに対する治療

これまでのシートのみでの治療に比して大網を併用することで、心機能改善効果が得られた。これは、大網移植によって血管新生が誘導され、シンチでの血流増加やFDG-PETでの糖代謝の増加がみられたと考えられる。今後、組織学的検討を行ってメカニズムを解明する方針である。

以上、上記の実験では、心機能評価法としてエコーを用いたが、血流シンチやFDG-PET評価の有用性も示唆された。今後、臨床応用を視野に入れ、心電図同期でのMRIやCT、H2O-PET等での評価を併用していく予定である。

E. 結論

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

In vitro培養ヒト間葉系幹細胞の安全性評価法として、下記の方法を提案する。

提案の前提：採取された幹細胞の本来使用目的以外の使用量を最小限にする。臨床手順を妨げない。

観察対象：ヒトから採取直後の細胞(陰性対照)と、in vitroで培養増殖させ生体に移植直前の細胞とで、異常頻度の比較を行なう。

評価手法：1) 細胞形態(位相差顕微鏡)

2) FISH法による染色体異常解析

c-myc、p53、RB1、p16等の遺伝子座プローブのうち2種以上を用いて、間期細胞で観察。

観察細胞数および統計処理：300細胞、 χ^2 検定

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

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、まず幹細胞の自己複製制御機構について調べる事によって幹細胞を安全にそして有効に利用するための方法を探ることを目的として検討を行った。特に、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) に対する増殖因子 TGFβ 及び FGF-2 の影響について調べた所、以下の点が判明した。

TGFβ

- ・ hMSC を *in vitro* で培養を続けることによる細胞の増殖能低下に伴い、TGFβ の発現が上昇した。
- ・ TGFβ により、hMSC の老化が引き起こされた。
- ・ TGFβ により、hMSC における p53、p21、p16 の mRNA 発現が上昇した。
- ・ TGFβ は hMSC の細胞周期において G₁ 期→S 期への移行を抑えた。

FGF-2

- ・ hMSC を *in vitro* で培養を続けることによる細胞の増殖能低下及び細胞老化を FGF-2 が抑制した。
- ・ hMSC を *in vitro* で培養を続けることによる p53、p21、p16 の mRNA 発現上昇の時期を遅らせた。
- ・ hMSC を *in vitro* で培養し続けることによる G₁ 期→S 期への移行停止が、FGF-2 によって抑えられた。

以上の結果から、FGF-2 が、hMSC の TGFβ シグナル伝達系が関与する細胞周期停止を抑制し、細胞組織利用医療機器の材料としてヒト間葉系幹細胞を用いる際に細胞を効率的に増殖させるために有効な増殖因子であることがわかった。FGF-2 がヒト間葉系幹細胞の増殖能を上昇させるメカニズムの一端を明らかにできた。

3：組織再生用材料評価方法の開発

各種ペプチド修飾アルギン酸ゲルを用いてヒト間葉系幹細胞を3次元培養した場合、その細胞接着性に応じて細胞から回収できる total RNA 量が変化すること、その量は細胞の生存数と関連があることが明らかとなった。現在、解析中の遺伝子発現と培養条件 (2次元 or 3次元) 及び細胞接着性との関連性

に関する詳細な検討結果が待たれる。

骨分化誘導分子類を添加してヒト由来の骨芽細胞と軟骨細胞とを共培養することで、骨分化及び軟骨分化が促進されることを見いだした。この軟骨分化は軟骨肥大を伴わない可能性があることも示唆された。どのような培養条件が、各々の細胞の分化促進に有効であるか、また、軟骨分化促進の機構はどのようなものであるかについて、今後検討を行っていく。

4：循環器系の再生に関する安全性評価方法の標準化

骨格筋芽細胞を心筋梗塞部位に注入する異所性移植の安全性試験として、腫瘍原性否定試験を行った。具体的には、培養細胞を用いた軟寒天コロニー形成試験および免疫不全マウスへの細胞移植試験である。軟寒天コロニー形成試験では、腫瘍細胞の存在確認のための評価手法の確立は出来たが、これも評価方法として定まったものではなく、さらに追加して培養細胞の核酸の変化を評価する手法の検討も開始した。

免疫不全マウスを用いた腫瘍原性評価についても、長期飼育による評価手法として定まったものがなく、まず長期移植の可能性評価および移植による変化の大枠を把握した上での本試験を考えており、今年度報告では中途報告となっている。

腫瘍原性否定試験は重要な試験として認識しているが、既に臨床例数も重ねられ始めており、特段腫瘍発生に関する報告も出されていない。また、標準的手法がないために、基礎データの積み重ねのちでないと、データ考察も出来ない状況である、と考えていた。しかしながら、本研究報告にあたり、免疫不全マウスを用いた腫瘍原性否定試験の観察期間が短縮されたとの情報を得た。また、国立医薬品食品衛生研究所内においても、すでに特定の免疫不全マウスにおいてはバックグランドデータがとっていることが明らかとなったので、上記実験系の見直しを行い、短期でのデータ取得を行っていく。

今回の研究により、多少の基盤整備には貢献でき

るものと考えられ、継続して蓄積されるデータについては、可能な範囲で公表していく予定である。

5：再生軟骨の大型動物総合的評価方法の標準化

NHH001, NHS001, KTF001 の 3 種類の多孔質支持体を用い、それぞれ細胞播種の有無、欠損及び正常部分を評価試料とすることにより、異なった状況の状態を得ることができた。

肉眼的観察において、すべての埋植部位で周囲正常組織との境界を識別することが可能であった。連続性の必要性については別途議論する必要があると考える。

再生状況の良好な試験試料(NHH001 + cell, NHS001 + cell)における組織学的観察においては、肉眼的観察で確認されたような非連続性は確認されず、周囲正常組織と同等の組織像が確認されている。また、NHH001(-cell)の使用においても良好な再生が確認されている。

今年度においては、埋植試験が進行中(途中)であるため、結果を十分に示すことができないが、試験が更に進行及び試験数が増加させることにより、軟骨再生における非臨床データと臨床データを相関付けることができる有用な有効性評価方法が導き出せるものと考えられる。

6：培養骨の評価方法の開発

培養骨の品質評価の標準化を目的として、今年度は実際の臨床サンプルと同じものとなる新鮮骨髄を用いて基礎研究を進めた。この3年間で、培養骨を評価するための基礎研究として、骨芽細胞の分化パラメータである ALP 活性、I 型コラーゲンプロペプチド、Gla 型オステオカルシンの測定方法を確立した。これらの分化パラメータの測定により、骨芽細胞としての品質評価が可能と考えられた。三次元培養した骨芽細胞(培養骨)の分化パラメータの測定は担体の影響を大きく受け、難しいことが予想されたので、担体の影響を受けないフローサイトメーターでの解析を行った。その結果、CD73、ALP の変化により、骨芽細胞への分化が評価可能であることを

確認した。これは骨分化開始後3日目までに確認できる方法であることから、早期の評価に使用しうる細胞表面マーカーである。しかし、フローサイトメーターでは一定数以上の細胞数が必要なことから、更に簡便な方法の開発を目指す必要がある。

7：角膜創傷治癒レンズの開発

成長因子である EGF を強く吸着するポリマーを、分子インプリント法を応用して作製した。EGF の断片を鋳型とする手法で作製したところ、適切な断片を用いることで吸着特性を強化できることがわかった。このポリマーを材料としてコンタクトレンズを作製し、EGF を取り込ませて創傷眼に装用すると、無処置と比較して治癒に要する時間を短縮することが可能であった。これらの結果から、優れた薬効を得るためのドラッグデリバリーデバイスの作製法として、分子インプリント法は有効な手法である可能性が示唆された。

8：高機能性マトリックスの開発

本研究では、安全性と有効性とを兼ね備えた、高機能性マトリックスの開発を検討した。SHa の合成法を確立し、またそのマトリックスとしての加工法および複合化をおこない、動物由来ではない合成材料からなる、生体組織の組成・構造を模倣したマトリックスを作製できた。これらは、安全性と機能とを兼ね備えた高機能マトリックスとなることが期待される。

9：3次元培養系での分化・増殖能評価技術の標準化

昨年までの2年間に、細胞数の変化は培養液中のグルコース消費量と乳酸産生量によって、脂肪への分化はアディポネクチンの産生量によって評価できることを明らかにしてきた。今年度は、これらの指標を用いて、由来の異なる間葉系幹細胞を用いて、比較することが可能であるかを検証した。今回の研究で、従来行われていた二次元培養と実際に再生医療に用いられる三次元培養で、細胞への影

響が異なることが明らかになった。本方法を用いることにより、経時的にかつ非破壊的に培養組織を観察することが可能になり、今後、再生医工学技術を用いて作製した培養組織を臨床に用いるにあたって、品質確保の為の試験方法として利用することが期待される。

10：骨補填材の評価方法の開発

アパタイト・コラーゲン複合体を培地に含浸させ培地中の無機イオンを十分に吸着させることで細胞培養が可能である。それにより、正常ヒト骨芽細胞を用いて骨補填材の評価は可能であるが、ロット間格差があるため評価システムにさらなる工夫が必要である。

11：由来の異なるコラーゲンの特性評

ヒト由来細胞を用いた細胞培養による評価および動物への埋植試験による評価の結果、コラーゲンの由来による差異は殆どなく、細胞培養においては培養時の立体的な環境の方がより重要なファクターとなる事が確認された。また、由来が異なるコラーゲンを動物に埋植した際には、コラーゲンの生分解性に顕著な差がみられた。この現象は、それらを複合化する事により再生を目指す組織の特性や要求されるスキヤフォールドの生分解性速度等のコントロールに応用出来ると考えられる。

12：再生軟骨の力学的評価

再生組織、特に再生軟骨の機能は基質産生量で評価される事が多いが、実際に摩擦摩耗特性を測定すると、基質産生能ばかりではなく、その立体構造が重要な役割を演じている。本実験では、特に水和潤滑状態を再現して摩擦機能を測定する点に重点を置き、その評価方法を確立した。

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

血清中の COMP が関節軟骨損傷あるいは変形性関節症のマーカーになる可能性が示された。

14：再生骨組織の定量的・客観的臨床評価法の開発

臨床での骨再生の画像評価では、造影 MRI、^{99m}Tc-MDP 骨シンチ (SPECT) が再生骨組織の臨床評価に有用であった。

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

過去6年半の臨床例の経験から、自己細胞と生体吸収性素材を使用し作成した再生血管は、ヒト臨床例において有用であり、安全性には問題がないと考えられた。

16：心筋再生治療法の開発と臨床評価

心機能の低下した不全心筋に対し細胞治療を行い、心機能の改善が得られた。また、組織工学的技術を駆使した細胞シート移植や大網移植を行うことで、より効果的な再生治療が可能であった。今後は、さらなる機能評価法を確立して、上記再生治療の臨床応用に役立てたいと考える。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. 土屋利江、再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について、岡野光夫編、CMC出版 印刷中
2. 土屋利江、ティッシュエンジニアリングとガイドライン、ティッシュエンジニアリング2007、岡野光夫、田畑泰彦編、印刷中
3. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Markedly different effects of hyaluronic acid and chondroitin sulfate-A on the differentiation of human articular chondrocytes in micromass and 3-D honeycomb rotation culture. J. Biomed. Mater. Res. 2007, 80, 257-267.
4. 土屋利江 編集、再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル、培風館、2007 印刷中
5. 土屋利江、細胞組織医療機器開発総論、薬学雑誌、印刷中

6. 澤田留美、伊藤友実、土屋利江、細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について、薬学雑誌、印刷中
7. 土屋利江、俵木登美子、特別対談、医療機器開発の推進を目指した日本の動向、バイオテクノロジージャーナル、羊土社、2007
8. D.Y. Jung, Y.B. Kang, T. Tsuchiya, S. Tsutsumi, A novel non-destructive method for measuring elastic moduli of cultivated cartilage tissues Key Engineering 2007, 342-343, 853-856.
9. Tsutomu Nagira, Misao Nagahata-Ishiguro and Toshie Tsuchiya, Effects of sulfated hyaluronan on keratinocyte differentiation and Wnt and Notch gene expression. Biomaterials 2007, 28, 844-850.
10. 山越葉子、中澤憲一、土屋利江、原子間力顕微鏡、特集号 分子イメージング—現状と展望、日本臨床 印刷中
11. Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, Synthesis of novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of osteogenic properties. J. Artificial Organs イン press..
12. Rumi Sawada, Tomomi Ito and Toshie Tsuchiya, Changes in expression of genes related to cell population in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. J. Artificial Organs, 2006, Vol. 9, 179-184.
13. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, A mouse strain difference in tumorigenesis induced by biodegradable polymers, J. Biomed. Mater. Res. 2006, 79A, 409-417.
14. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Cytotoxicity of Various Calcium Phosphate Ceramics, Bioceramics, Key Material Eng. 2006, Vol. 309-311, 263-266.
15. Masato Tamai, Ryusuke nakaoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Novel calcium phosphate ceramics: The remarkable promoting action on the differentiation of the normal human osteoblasts, Bioceramics, Key Material Eng. 2006. Vol. 309-311, 97-100..
16. Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Enhancement of differentiation and homeostasis of human osteoblasts by interaction with hydroxyapatite in microsphere form, Bioceramics, Key Material Eng. 2006, Vol. 309-311, 1293-1296.
17. Yuping Li, Tsutomu Nagira, Toshie Tsuchiya, The effect of hyaluronic acid on insulin secretion in HIT-T15 cells through the enhancement of gap junctional intercellular communication, Biomaterial, 2006. 27, 1437-1443.
18. Ahmed, S., Tsuchiya, T., Kariya, Y*1.: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: Enhancement of proliferation of human mesenchymal stem cells by the new polysaccharides Animal Cell Technology, 14, 81-85 (2006)
19. Banu, N., Tsuchiya, T., Ahmed, S., Sawada, R.: Studies on the efficacy, safety and quality of the tissue engineered products: effects of a catalyst used in the synthesis of biodegradable polymer on the chondrogenesis of human articular cartilage Animal Cell Technology, 14, 87-92 (2006)
20. Li, Y.P., Nagira, T., Tsuchiya, T.: Increase in the insulin secretion of HIT-T15 cells: Gap Junctional Intercellular Communications Enhanced by Hyaluronic Acid Animal Cell Technology, 14, 263-269 (2006)
21. Sawada, R., Ito, T., Matsuda, Y., Tsuchiya, T.: Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem

- cells *Animal Cell Technology*, 14, 325-329 (2006)
22. Nakamura, N., Tsuchiya, T.: Effect of biodegradable polymer poly(L-LACTIC ACID) on the cellular function of human astrocytes *Animal Cell Technology*, 14, 331-337(2006)
 23. 盛英三、望月直樹、武田壮一、井上裕美、中村俊、土屋利江、ナノレベルイメージングによる分子構造と機能解析、*日本臨床*、2006、64巻、358-364.
 24. Nasreen Banu, Toshie Tsuchiya, Rumi Sawada, Effects of biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular cartilage, *J Biomed Mater Res*, 2006, 77, 84-89.
 25. Nasreen Banu, Yasmin Banu, Masamune Sakai, Tadahiko Mashino, Toshie Tsuchiya, Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes, *J Artif Organs*, 2005, 8(3), 184-191.
 26. Atsuko Matsuoka, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, In vitro induction of polyploidy and chromatid exchanges by culture medium extracts of natural rubbers compounded with 2-mercaptobenzothiazole as a positive control candidate for genotoxicity tests, *J Biomed Mater Res*, 2005, 75(2), 439-444.
 27. Tsutomu Nagira, Susan Bijoo Matthew, Yoko Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Enhancement of Gap Junctional Intercellular Communication of Normal Human Dermal Fibroblasts Cultured on Polystyrene Dishes Grafted with Poly-N-isopropylacrylamide (PIPAAm), *Tissue Engineering*, 2005, 11(9-10), 1392-1397.
 28. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, In vitro study on the osteogenesis of normal human osteoblasts cultured on the discs of various kinds of calcium phosphate ceramics, *Archives of Bioceramics Research*, 2005, 5, 158-161.
 29. Sadami tsutsumi, Duck-Young JUNG, Yu-Bong KANG, Toshie Tsuchiya, A Novel Non-Destructive Method To Measure Elastic Moduli Of Cartilage Cell In Situ, *IFMBE*, 2005, in press.
 30. Ryusuke Nakaoka Saifuddin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Hydroxy apatite microspheres enhance gap junctional intercellular communication of human osteoblasts composed of connexin 43 and 45, *J Biomed Mater Res A*, 2005, 74(2), 181-6.
 31. Misao Nagahata, Ryusuke Nakaoka, Akira Teramoto, Koji Abe, Toshie Tsuchiya, The response of normal human osteoblasts to anionic polysaccharide polyelectrolyte complexes, *Biomaterials*, 2005, 26(25), 5138-44.
 32. Ken Nakazawa, Yoko Yamakoshi, Toshie Tsuchiya, Yasuo Ohno, Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 518, 107-110.
 33. Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya, Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets, *Key Engineering Materials*, 2005 288-289, 409-412
 34. 石黒(長幡)操, 寺本彰, 阿部康次, 中岡竜介, 土屋利江, ラット頭蓋冠由来骨芽細胞のALPase活性を促進する硫酸化ヒアルロン酸の効果, *繊維学会誌(報文)*, 2005, 61, 98-102
 35. 土屋利江, 再生医療・繊維工学・人工臓器に使用される医療用材料の安全性・有効性に関する基本的考え方, *繊維学会誌(繊維と工業)*, 2005, 61, 148-149
 36. Sawada, T. Ito, Y. Matsuda, and T. Tsuchiya "Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells", *Animal cell technology*
 37. M. Nagahata, R. Nakaoka, A. Teramoto, K. Abe,