

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

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	脇田隆宇 ……	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

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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、間葉系幹細胞由来の分化細胞の細胞表面糖鎖のプロファイリングに用いるレクチンの組換え体化の生産基本技術確立の検討を行った。バキュロウイルス発現系にてFLAGタグ付加の遺伝子改変型を含む組換え体MAHの発現を行い、affinity精製法により高純度に精製することに成功した。また、ヒト正常細胞を用いて細胞老化における増殖抑制機構について解析した結果、p16遺伝子の発現誘導によりRB蛋白が十分に活性化されると、DNA合成を抑制するのみならず活性酸素種（ROS）の産生を促進し細胞質分裂も抑制されることを見出した。このことは、再生医療を念頭におく場合、細胞老化(senescence)に至ったときではなく、p16発現が少ない段階でヒト細胞を移植に供することが肝要であることを意味する。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。このことは、再生医療の安全性を担保するための基礎データとして極めて重要な意味を有する。すなわち、p16をモニターすることで、細胞老化および細胞形質転換を判断することが可能であり、より客観的な科学的指標を提供できたことになる。

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 | 岡本英治 |
| (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) 東洋紡績株式会社 | 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。我々のこれまでの研究から、天然レクチンを用いた細胞表面糖鎖のプロファイリングは、間葉系幹細胞由来の分化細胞の規格・品質管理に有望であることが示唆されている。天然レクチンは糖鎖検出の優れたプローブであるが、天然原料からの抽出・精製品であるゆえの品質ロット差が認められており、解析結果への影響が指摘されている。また糖鎖の多様性と比して利用できる天然レクチンの数は非常に限られている。この課題を

解決するために、この細胞表面糖鎖解析に用いるレクチンの組換え体化並びに遺伝子改変の研究を進める。

また、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、バイオリ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。

その他にも、間葉系幹細胞が用いられる対象疾患のひとつに心不全がある。心不全は現在、欧米では最も多い疾患で、1,000人当たり約7人とされている。生活習慣の欧米化や、高齢化社会が進む日本でも、ほぼ同程度に勢いで、それに伴う治療費の激増が予想される。心不全に対する治療法として、薬剤による内科治療が行われるが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、最終的な治療法として、心臓移植や補助人工心臓などが行われている。全世界では年間3000例の心臓移植が行われているのに対し、日本で行われた心臓移植は、「臓器移植に関する法律」が施行された1997年10月から2006年末までに39例である。国内の心臓移植適応患者数は年間228～670人であると推定されているが、その半数は1年以

内に死亡しているのが現状である（日本移植学会、臓器移植ファクトブック2006）。また、永久使用が可能な補助人工心臓の開発までには至っておらず、移植を受けるまでの橋渡しとして使用させるが、最終的には心臓移植でしか救命しえない。よって、心臓移植や人工心臓などの置換型治療は、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のが現状である。一方で最近、重症心不全治療の解決策として細胞組織工学、再生医学等を用いた再生型治療法の展開が不可欠と考えられてきている。既存の技術では組織や臓器の代替が難しい機能を、細胞を移植することで再建できる可能性が報告され、新しい治療法として期待されている。移植に用いる細胞源としてES細胞を含めて様々な細胞が研究されているが、異種や他家の細胞を用いた場合には、拒絶反応や感染症の問題は避けられない。それに対して、自己の細胞を用いることは、安全性、倫理性においても社会的に許容可能な細胞源であり、世界的にも自己細胞を用いた心臓再生の研究が積極的に進められている。自己の細胞源として間葉系幹細胞等が考えられ、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。またさらに、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

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的および細胞生物学的手法により調べる。

2). p16^{INK4a} 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。

組換え体レクチンの作成

1) FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH のバキュロウイルス発現系での発現

Bac-To-Bac Baculovirus System を用いて Sf9 細胞に MAH 及び遺伝子改変 MAH を発現させた。まず、Wild-type MAH 及び改変 MAH (Mutant 2~10) の cDNA を pFastBact 1 に組み込みドナーベクターとし、DH10Bac を形質転換した。インサートが確認されたコロニーより組み替え Bacmid DNA を単離した。この Bacmid DNA を常法に従い Sf9 細胞にトランスフェクションし 72 時間培養後ウイルス液を回収し、これをさらに 4 日間培養・増幅したものを最終ウイルス液とした。このウイルス液を Sf9 細胞に感染させ 3 日間培養し、その培養上清を組換え体レクチンの精製に供した。

2) FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の糖結合力の確認

レクチンの糖結合力は表面プラズモン共鳴法

(SPR)を用いて測定した。また、細胞表面糖鎖への結合能は赤血球凝集活性及びフローサイトメトリー (FACS) で測定した。

3)-1 SPR 測定

ビオチン化 Sialyl-T 抗原をストレプトアビジン固相化チップに結合させ、0.1mg/ml に調製した天然 MAH 及び組換え体 MAH をアナライトとし、ピアコア 3000 (ピアコア) にて測定した。

3)-2 赤血球凝集活性

赤血球凝集活性は 2% ヒト O 型血液とレクチンの希釈系列を混合し、室温 1 時間反応後凝集の有無を観察した。

3)-3 FACS

組換え体レクチン (改変体) を ECL Protein Biotinylation Module (GE ヘルスケア社) を用いてビオチン標識し、ヒト白血病由来細胞 U937 と反応させた。さらにストレプトアビジン-Alexa488 と反応させ、FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン) で測定した。

3) FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の保存安定性の確認

組換え体レクチンを 0.5mg/ml in 50mM リン酸カリウムバッファー (pH7.4) に調整し、-20°C、4°C、37°C で 7 ヶ月まで保存し、SDS-PAGE と銀染色で一次構造の変化を、SPR により糖結合力を測定し保存安定性を検討した。また、マメ科レクチンに必須であるカルシウムイオン (CaCl₂)、マンガンイオン (MnCl₂) の添加による安定性への効果を検討した。

移植の供給源となる細胞のラベル

ヒト骨髓液より樹立した骨髓間質細胞を用いた。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。SPI0 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。SPI0 ラベル細胞 1x10⁶ 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髓間質細胞のマーキング法を決定した。ヒト骨髓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、骨髓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ほり、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。

間葉系幹細胞の心筋分化アッセイ

マウス細胞に対しては脱メチル化剤を処理することにより、心筋分化を誘導する。ヒト細胞に対しては、マウス胎児心筋細胞との共培養により、心筋分化誘導する。心筋分化は、拍動、心筋関連遺伝子発現、活動電位測定、免疫細胞化学によって行う。

(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」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

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

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の細胞老化では p16/RB-経路と増殖因子が協調して ROS の産生を促進するために染色体分配並びに細胞質分裂の進行も抑制されていることを見出した。このため、一旦細胞老化が誘導されると、その後で p16/RB-経路を遮断しても老化細胞は増殖を再開出来ないことが分かった。

2) p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることにより、様々な DNA 障害を誘発する刺激が p16 蛋白の発現を誘導することを見出した。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH のバキュロウイ

ルス発現系での発現

組換え体レクチンをバキュロウイルス発現系で安定的に発現することが可能となり、0.5~1L/回の培養スケールで数回の発現培養を行い、Wild Type MAH 及びその改変体を、それぞれ約 10mg 発現させることに成功した。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の affinity 精製

陽イオン交換精製では発現上清を酸性(pH3.0)に調製する必要があるが、酸による活性への影響を赤血球凝集活性で検討したところ、pH 依存的に、また時間依存的に糖結合活性が失われることがわかった。そこで、培養上清を直接 anti-FLAG agarose を使った affinity 精製で処理する方法について検討した。その結果培養上清の濃縮や pH、塩濃度の至適化により、迅速・大量に、かつ高純度で精製する方法を確立することができた。また、天然 MAH と同様に糖結合活性を利用した Fetuin agarose への結合と EDTA 溶出による精製が可能であり、anti-FLAG agarose と同等の純度で精製品が得られた。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の糖結合活性の確認

チップ上に固相化した Sialyl-T への結合を SPR で測定したところ、すべての組換え体レクチンで結合活性が確認された。特に改変体 Mutant 2、5、6、10 では Wild Type よりも高い結合能を示した。FACS 測定においても、ビオチン化組換え体レクチンの濃度依存的に蛍光強度が上昇し、細胞表面への結合が確認された。

精製した組換え体 MAH レクチンの安定性

組換え体レクチンの -20°C、4°C、37°Cでの安定性を調べた。その結果 50mM リン酸ナトリウムバッファ (pH7.4) 中で、-20°C、4°Cでは 7ヶ月保存で一次構造及び糖結合活性が保たれ、少なくとも半年間は安定であることが明らかとなった。また 37°C保存では、添加物が無い状態では 2時間で活性が 50%まで低下したが、保存溶液に 0.1mM CaCl₂ 及び 0.1mM MnCl₂ を添加したところ 72時間後でも活性を保っていた。

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は CD34・CD117・CD45 陰性である。ヒト間葉系細胞に関しては、CD

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。鉄を含有する SPIO を用いることで、新しいナノバイオ・トレース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。

D. 考察

細胞移植を行う場合、移植する細胞数を多くするために、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。しかし、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。その細胞老化が誘導されるとROSの産生が上昇するため細胞周期の複数のチェックポイントが活性化される。このことは老化細胞が安定に増殖停止を起こす原因となっていると考えられるが、もしかすると様々な遺伝子異常を引き起こす原因にもなっている可能性も考えられる。

我々の組換え体レクチンにはFLAGタグが付加されていたので、ひとつはanti-FLAG agaroseを利用した方法、もうひとつはMAHレクチンが結合できる糖蛋白のひとつであるFetuin agaroseを利用した方法である。その結果、イオン交換クロマト法よりも高純度で且つ高活性に精製することに成功した。なお本法での収率は2~3mg/Lであった。これはコストなどを考え合わせると収量のアップが望ましく、ウイルス液の調整や培養方法などの工夫・改良による更なる収率向上や、大腸菌等での発現・生産の検討などが今後の課題のひとつとして考えられる。得られた高純度組換え体レクチンの保存安定性を調べたところ、現時点で4°C保存7ヶ月までの安定性が確認できており、天然レクチンと同等であることが期待され、十分実用レベルにあると考えられる。また本法で作出された組換え体レクチンは赤血球凝集法やSPR, FACSで糖結合能を有することが確認され、細胞表面糖鎖のプロファイリングに使用できると考えられる。遺伝子改変型を含む組換え体レクチンの利用は、天然レクチンを用いた従来法よりも再現性や結合性に優れた糖鎖解析を可能にすると思われる。

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。

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。

外骨腫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。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の操作が容易である。荷重に耐え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。

E. 結論

正常細胞において一旦 p16/RB-経路が活性化されると、ROS を介して様々な細胞内生理状態が変化することを明らかにした。また、p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることにより、細胞老化を誘導する因子の同定が可能となった。特に多くの細胞を得る際に、増殖因子を用いる場合に、パラドキシカルに細胞老化が誘導されることが分かっており、これらの経過を明確にできることは極めて価値がある。また、p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることで、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ができることになり、当初の目的が達成された。

間葉系細胞を規定する表面抗原として、CD13, CD29, CD44, CD59, CD105, CD166 が挙げられる。これらは抗体を用いたマーカーの検証となる。造血系幹細胞においては、CD34, CD133 で規定する前では、WGA を用いており、間葉系細胞においても MAH によって規定されることは再生医療におけるバリエーションシステム構築の一助になる。本研究では、バキュロウイルス発現系にて FLAG タグ付加の遺伝子改変型を含むリコンビナント MAH を発現させ、Anti-FLAG agarose や Fetuin agarose を用いたアフィニティー精製で高純度に精製する方法を確立した。これらは赤血球凝集法や SPR, FACS で糖結合同活性が認められた。また 4°C で 7 ヶ月の保存安定性が確認された。本技術によって作出されるリコンビトレクチンの利用により、天然レクチンを用いた従来法よりも再現性や結合性に優れた糖鎖解析が可能になることが期待される。

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ある。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 SPIO 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。

F. 研究発表

論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and **Umezawa A** Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells *Mol. Biol. Cell*, in press.2007
2. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, **Umezawa A**. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res.* in press.2007
3. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, **Umezawa A**. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* in press.2007
4. **Umezawa A**, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, **Umezawa A**, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells.* 24(10):2270-8. 2006
6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and **Umezawa A** Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J. Cellular Physiology* 208:188-194.2006

7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology*. 147(9):4104-11. 2006

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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