

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

感染リスクの排除、同一性の確保、がん化等の抑制
及び培地等による有害作用の防止に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成20年（2008）年4月

目次

I. 総括研究報告

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、及び培地等による有害作用の防止に関する研究	総-1
土屋 利江	

II. 分担研究報告

1. 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-1
澤田 留美	
2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除	分-13
薮島 由二	
3. 間葉系幹細胞の均質性／同一性、および品質検査法の開発	分-23
加藤 幸夫	
4. 幹細胞の安全性に関する研究 (コンピューターによる品質管理支援システム)	分-27
辻 紘一郎	
5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法 (染色体異常、DNA 損傷単一細胞除去による安全性確保技術)	分-30
篠崎 尚史	
6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究	分-32
澤 芳樹	

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

(感染リスク排除、癌化等の精査、培地、培養工程、凍結保存等の高い安全性確保技術の開発)

分-39

高橋 恒夫

8. 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

—間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究—

分-42

加藤 玲子

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

分-56

黒澤 努

10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

分-57

石川 格

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I 総括研究報告

厚生科学研究費補助金
(再生医療等研究事業)

平成19年度総括研究報告書

感染リスクの排除、同一性の確保、免疫反応、がん化等の抑制、
及び培地等による有害作用の防止に関する研究

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部 療品部長

研究要旨

再生医療を広く臨床応用可能な医療に発展させるには、培養担体の感染リスクの排除、間葉系幹細胞の安全性、同一性の確保およびがん化、(アロにおける)免疫反応等の抑制といった様々な問題をクリアーする必要がある。本研究ではこれらの検査法、評価法を確立すべく次の9課題について取り組み、以下の研究成果を得た。

1. ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について

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、特に *in vitro* 培養過程における安全性(癌化の危険性)を評価できる系の確立を最終目的として検討を行っている。今年度は、1) 幹細胞と腫瘍細胞の比較検討と 2) hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発現の変化について検討を行い、hMSC の安全性(癌化の危険性)を評価するための指標となる遺伝子の候補を絞り込んだ。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞における p16 と Cx43 の遺伝子発現を細胞利用時に確認し、増殖能も確認すること、更に、*in vitro* 培養期間前後における *c-myc*、Bmi-1、PTEN、KLF4、STAT5、ATM の発現レベルの変化について確認する事は、*in vitro* 培養中に癌化のような不都合な変化が起こっていないかの判断基準の一つとなり得ると考えられた。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

TLR アゴニストに対するヒト末梢血細胞の反応特性を評価した。また、ヒト単球様 MM6-CA8 細胞及び同 THP-1 細胞の食食機能を評価したと共に、発熱マーカーの一斉解析を行った。

ヒト末梢血細胞は、MM6-CA8 及び THP-1 細胞と異なり、試験に供した全ての TLR アゴニスト (TLR2, 3, 4, 7, 9) を認識した。TLR4 アゴニストである LPS と種々の TLR アゴニストを持つ黄色ブドウ球菌乾燥菌体に対する応答性は MM6-CA8 細胞と同等であり、大腸菌乾燥菌体については同細胞より高い応答性を示した。また、感度低下は認められるが、凍結保存したヒト末梢血細胞も試験に利用できることが確認された。

サイトカイン、ケモカインを産生したことから、HCPT では異物による免疫応答も検出できることが明らかになった。MM6-CA8 細胞の発熱マーカーとしては IL-6 が最も優れ、単球遊走化能 CC ケモカイン MIP-1 α 及び MIP-1 β も有益なマーカーとなり得る。一方、ヒト末梢血細胞の発熱マーカーとして IL-6 又は IL-1b が優れて、MIP-1 α も有益なマーカーになる。

以上の結果を含め、ヒト細胞を利用した新しい発熱性物質試験法の実験系が確立された、組織工学製品の微生物学的安全性を評価できる。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

移植用間葉系幹細胞の品質検査のために、臨床的・実的に有用な遺伝子マーカーセットを選択した。選択基準は、各種分化細胞あるいは線維芽細胞と比較して間葉系幹細胞のみで著しく高レベルに発現していること、患者の年齢や性差による影響が少ないこと、培養期間による影響が少ないこと、個体差が少ないこと、絶対的 mRNA 発現レベルがバラツキなく検出できる程度に高い。選定した間葉系幹細胞のマーカー遺伝子は、体外増幅した間葉系幹細胞の均質性/同一性および品質を検査するために有用であると期待される。

4. 幹細胞の安全性に関する研究（コンピューターによる品質管理支援システム）

感染症否定試験やエンドトキシンの定量などの一般的な安全性をベースとし、加藤教授との共同研究により間葉系幹細胞の均質性／同一性などの品質検査法を加えて間葉系幹細胞の安全性検査を統合化（血液検査、血清検査、培養液検査、培養細胞検査）した。特に平成19年度は再生医療のための品質管理支援システムとしてコンピューターによるシステム化を行い、11例の臨床研究例での実証作業を行った。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

初代細胞、幹細胞培養において培養環境の精度向上、感染防御、取り違い防止の観点から複数症例の同時培養回避、培養過程の追跡性保証を図るため、低酸素培養が可能な使い捨て培養システムを開発した。小数例ではあるが、低酸素下にヒト胚を培養すると形態が高酸素下と異なることを認め、環境の酸素濃度が胚発生に影響する可能性が考えられた。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

心筋梗塞急性期に対する細胞移植療法におけるアロ骨格筋筋芽細胞（skMB）移植の有用性を検討するために、アロ skMB の免疫原性、梗塞心におけるドナーアロ skMB 数の推移、および治療効果を評価した。skMB は RT1A 陽性、RT1B 陰性、CD80 弱陽性、CD86 陰性で、インターフェロンガンマ（IFN γ ）刺激により RT1B の発現を認めた。細胞移植後7日で、アロ skMB 移植群（A 群）において IL2RA（インターロイキン2 受容体）および IFN γ の発現の上昇を認めた。同系 skMB 移植群（S 群）における発現量は細胞なしの対照群（C 群）と同程度であった。A 群は S 群と比して細胞の減少が早く、移植後28日では検出限界以下であった。細胞移植の治療効果は心臓超音波で評価した。S 群 C 群と比して移植後2週から8週で左室拡大が抑制され左室短縮率が高かったが、A 群は左室拡大の抑制を認めず、心機能は C 群と同程度であった。免疫抑制療法の併用を検討するための予備実験として、FK506 の心機能に対する影響を評価したところ、FK506 投与による心機能の低下を認めた。以上から虚血性心疾患におけるアロ skMB 移植を臨床に応用するためには慎重検討する必要があると考えられた

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

臍帯血中の間葉系幹細胞が安全性の高い非自己の細胞ソースに成りうるか、細胞を分離、分化誘導してその可能性を探る研究を進めてきた。これまでの研究において、臍帯血から間葉系幹細胞の単離、増殖法を確立し、それにより得られた細胞は線維化細胞の形態を示し、骨髄細胞と同じ間葉系細胞の表面マーカーを持っていた。臍帯血から間葉系幹細胞を効率良く分離するための条件を調べ、生体内の環境に近い低酸素での培養も検討した。臍帯血由来間葉細胞の安全性に関して、増殖した細胞の安全性について、核分析法を用いて染色体異常を引き起こす可能性について検討した。臍帯血由来間葉系幹細胞は軟骨細胞への分化能が高く、軟骨への分化と関連する遺伝子の発現を検討した。さらに、細胞の免疫抑制能に関しては、活性化したヒト末梢血リンパ球と共培養し、そのリンパ球細胞増殖抑制能を他の細胞と比較した。これらの検討の結果、臍帯血由来間葉系幹細胞が再生医療における非自己の間葉系幹細胞ソースとしての可能性が示唆された。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

間葉系幹細胞（MSC）の免疫抑制効果の分子メカニズムを解明することに焦点を当て、その機能に関わる因子の同定を試みている。昨年度ヒトの MSC（hMSC）がマウスの活性化脾臓細胞の増殖を抑制することを報告した。今年度は、MSC の免疫抑制効果に関与する分子を探索する目的で、定常状態の hMSC（コントロール）とマウス脾臓細胞を活性化させた状態と共培養した hMSC（＝抑制効果を発揮している hMSC）の間で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化のある遺伝子の同定を試みた。その結果、コントロールに対して抑制効果を発揮している MSC で発現が二倍以上になった遺伝子が数十個抽出されてきた。

一方、MSC を再生医療の細胞ソースとして用いるには培養過程で異種動物由来である血清タンパク質の混入が少ない方がより安全であると考えられる。そこで、従来の 10% FBS 含有の培地と無血清培地での培養による比較を行い MSC の免疫抑制効果に変化がないかの確認を行ったところ、無血清培地で MSC を培養しても活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制する機能は維持されていることが確認できた。この結果から特に臨床応用をめざした MSC の培養では無血清培地を使用することで、より安全で安定した品質の細胞を提供できるようになると考えられる。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

医療機器の安全性試験における国際情報の収集と分析を行った。特に、動物組織由来製品の安全性に
ならびに動物福祉に関する国際標準化関連情報の収集を行った。

10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究 分担研究者である広
島大学加藤幸夫らのより新規に開発された無血清培地 STK2 のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の増殖能につ
いて検討した。hMSC の培養に汎用されている血清含有培地 2 種 (DMEM, MSCBM) との比較を行った。その
結果、STK2 は、従来の血清含有培地を上回る細胞数が得られ、短期間で必要な細胞数を得る上でも、従
来の培地に対して優位にあるといえる。次に、hMSC の応用例として骨再生を想定し、ハイドロキシアパ
タイト (HAp) が存在する環境下でも STK2 の優れた hMSC 増殖能が維持できるかを調べる実験を行った。
その結果、STK2 は各種因子を吸着しやすい材料である HAp の影響を受けにくく、HAp 存在下でも、血清
含有培地に比べ、細胞活性が良好であった。従って、HAp に播種した hMSC を *in vitro* 培養するような
場合でも STK2 の使用は有効であることが示唆された。

分担研究者	
土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究員
靱島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長
加藤 幸夫	広島大学大学院医歯薬学 総合研究科 教授
辻 紘一郎	(株)ソーセル/広島大学 口腔生化 講師
篠崎 尚史	東京歯科大学市川総合病院 角膜センター センター長
澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 教授
高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門 客員教授
加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 療品部 研究員
黒澤 努	大阪大学医学系研究科 実験動物医学教室 助教授
石川 格	国立医薬品食品衛生研究所 療品部 研究員

A. 研究目的

再生医療の発展に必要な種々の検査法、評価法の
開発を目的とする。具体的には、以下の 10 課題につ
いて取り組む。

1. ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性につ いて

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、特に *in vitro* 培養過程にお
ける安全性 (癌化の危険性) を評価できる系の確立

である。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、*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観
察したところ、16 週間では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ところ、細胞周期制御因子であ
る p16 が細胞増殖能という観点から幹細胞と腫瘍細
胞との違いを示す指標の候補遺伝子の一つであらう
との見解を得た。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 発現に変化のなかつ
た遺伝子を抽出し、さらに細胞機能や疾病に関わる
遺伝子を絞込み、その中から 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、c-myc が 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
られると示唆した。

今年度は、引き続き 1) 幹細胞と腫瘍細胞の比較
検討と 2) hMSC の *in vitro* 培養期間による遺伝子発
現の変化についてさらに解析を進め、hMSC の安全性
(癌化の危険性) を評価するための指標となる遺伝
子の候補を絞り込んでいく。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試 験法の確立と感染リスクの排除

組織工学スキャホールドの機能については開発段階において活発な研究が成されているが、その品質は十分に評価されていないのが現状である。

グラム陰性細菌の表層抗原であるエンドトキシン (lipopolysaccharide, LPS) は極微量で発熱や炎症反応を惹起する強力な生理活性物質であり、組織工学製品の安全性を評価する上で重要な感染因子の1つとなる。天然材料から構成されるスキャホールドには、その起源上、LPS を初めとした様々な菌体成分が混入している可能性が高いことに加え、合成高分子や無機材料の LPS 汚染は未知な部分が多い。また、細胞培養時に使用する血清に含まれる LPS の材料への吸着性については全く検討されていない。

医用材料の発熱原性を評価する手法として、現在、ウサギ発熱試験とエンドトキシン試験を利用することができる。ウサギ発熱試験は発熱性物質によって誘導される生体発熱反応の真の強度を測定する *in vivo* 試験法であり、基本的に全ての発熱性物質の検出に利用できる反面、動物を使用する点と検出感度が比較的低い欠点を持っている。エンドトキシン試験は、カプトガニ血清中に存在する凝固系蛋白質のゲル化をマーカーとして、LPS を高感度で検出する *in vitro* 試験法であり、手軽に測定できるメリットがある反面、LPS 以外の発熱性物質を検出できない欠点を持っている。

現在、動物愛護の観点から、動物を利用した幾つかの試験法は *in vitro* 代替法に移行される方向にある。ウサギを使用する発熱性物質試験に関しても欧州を中心にヒト末梢血細胞又はヒト由来のライン化細胞を利用した新しい評価法 (Human Cell-based Pyrogen Test, HCPT) の開発が進められている。エンドトキシン試験において検出される発熱性物質は LPS のみであるのに対し、HCPT では微生物感染などに対する生体応答を制御する Toll-like Receptor (TLR) family により認識される全ての発熱性物質を検出できる利点がある。この評価法では、発熱性物質により活性化されたマクロファージや単球細胞から遊離される炎症性サイトカインを発熱指標として定量的に測定するため、検出感度も比較的高い。

本研究では、組織工学製品の上市化に寄与することを目的とし、我々の過去の研究成果を基礎として、HCPT を利用した微生物学的安全性評価法の確立を目指す。この試験法はウサギ発熱試験の代替法としてヨーロッパを中心に使用され始めていると共に、ISO/TC194 において国際標準化作業が進められていることから、その有効性を事前に評価しておくことにも大きな意義がある。

現在までの本研究により、LPS を初めとした種々の TLR アゴニストに対する MM6-CA8 細胞及び THP-1

細胞の応答性と MM6-CA8 細胞の継代安定性が明らかになっている。また、HCPT による LPS 添加回収実験のほか、市販創傷被覆剤に HCPT を適用し、過去に実施した LPS 汚染サーベイ試験の成績と比較検討した結果、HCPT では煩雑な抽出操作を行うことなく、ヒトに対する発熱性を容易に評価できることを確認している。

平成 19 年度の本研究では、TLR アゴニストに対するヒト末梢血細胞の反応特性を評価した。また、ヒト単球様 MM6-CA8 細胞及び同 THP-1 細胞の食食機能を評価したと共に、発熱マーカーの一斉解析を行い、過去の成績と合わせて HCPT の有用性を総合的に評価した。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、神経へと分化させることができ、成人患者からも分離できる。しかし臨床効果を保証するには、移植用の培養細胞が幹細胞としての同一性 (均質性) と安全性を保持していることを検定する必要がある。そこで本研究では、再生能力が高くかつ均質な幹細胞を容易に安全に供給するためのプロトコールを3年間で確立し、さらにそれらに科学的根拠を与える。この研究は、将来的に我が国での再生医療の普及と発展に貢献することは確実である。

4. 幹細胞の安全性に関する研究 (コンピューターによる品質管理支援システム)

再生医療に用いる間葉系幹細胞の安全性を評価するために、基本的考え方、指針の要件を参考にし、また臨床研究や臨床治験に則するような時間的要件と培養方法を考慮して、標準安全性検査の手順と方法を提案しコンピューターによる支援システム案を作成する。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

初代細胞、幹細胞の組織培養において、培養環境の精度向上、特に低酸素培養が可能な使い捨て培養システムを開発する。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

細胞移植による再生治療は将来有望な治療法であるが、より広く臨床応用可能な医療に発展させるには、治療用細胞の安定供給、質的保証や緊急時対応の面での問題を克服する必要がある。移植細胞源に同種細胞を使用する事が可能になれば、これらの問題が緩和されると考えられる

心臓組織に対する細胞移植では移植細胞の多くが

脱落していることが報告されている。さらに昨今では、細胞移植による治療効果の理由として、当初考えられていた細胞自身の心筋細胞への分化転換が否定されつつある。このことは治療効果に必ずしも細胞の生着が必要でないことを示唆しており、自己細胞に拘泥する根拠が失われるものである。

我々は昨年度までに他家骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) において、心筋梗塞急性期に対する細胞移植で、自己細胞と同等の安全性および治療効果が得られることを報告した。本年度は MSC と同じく有望な細胞源であるアロ骨格筋芽細胞 (skMB) について、他家移植における免疫原性、生着細胞数、および治療効果を評価し、その有用性を検討することを試みた。

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪などに分化することが知られている。臍帯血から間葉系幹細胞を回収して分化誘導することで安全性の高い細胞ソースになりうると考えられる。最近では臍帯血の 20-40% の確立で得られるという報告が多いが、われわれは臍帯血由来間葉系細胞を効率的に得るには採取から分離までの時間と臍帯血の容量に影響をうける結果を得た。今回われわれは臍帯血から間葉系細胞の単離と増殖を生体内の環境に近い低酸素条件で培養を検討する。また、分化に関する遺伝子と免疫特性に関して骨髄、脂肪由来間葉系細胞と比較する。さらに、臍帯血由来分離増殖した細胞の安全性の指標として、増幅細胞の核分析を行う。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究

MSC は骨髄、脂肪細胞、歯根膜、頭皮細胞といった成人の組織からだけでなく胎盤、臍帯血、胎児の種々の細胞などから単離することができ、しかも *ex vivo* (生体外) で培養し増幅できる。さらに複数の間葉系 (骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞) だけでなく、非間葉系 (神経前駆細胞、肝細胞) の系譜の細胞に分化可能であることから、再生医療への MSC の応用が期待されている。

その一方で、MSC はそれ自身の免疫原性が低だけでなく、様々な免疫エフェクター細胞 (T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞) の機能に影響を及ぼすことが示されてきており、免疫反応に関わる種々の疾患の治療への MSC の応用も期待されるようになってきている。それにもかかわらず、観察されている現象の根底にある分子基盤の解明は未だになされていない。MSC を細胞利用した治療に利用していく上で MSC の機能とそのメカニズムを明らかにすることは

その有効性、安全性の面からも必須であり今後の課題である。

今年度、MSC の免疫抑制作用について *in vitro* の系で検証し、その分子メカニズムに関わる因子の探索を試みる。また MSC を臨床応用に用いる場合、より安全で安定した MSC を供給するためには培養過程で異種動物由来のタンパク質の混入は少ない方がよい。つまり無血清で培養できるにこしたことはないと考えられる。これまでの研究から hMSC を無血清倍で培養すると、10% FBS 含有培地培養と比べて、1: 増殖促進効果、2: 多分化能の維持 (亢進) が確認されている。しかしながら MSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対して無血清培地がどのような影響を与えるかは調べられていない。そこで MSC を無血清培地 SKT2 で培養した際の MSC の免疫抑制効果に変化があるか検討する。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究 医療機器の安全性とりわけ生物由来材料をもちいた医療機器についての感染リスクはいまだ明らかとなっていない。国際標準化機構ではこのための国際標準を策定中であり、その策定作業に参画し、国際的情報収集を行う。さらに一部確認すべき安全性試験法に関しての確認を行う。

10. 新規無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

現在 hMSC 培養用の培地には、ウシ血清あるいは自家ヒト血清が用いられている。しかし、ウシ血清にはプリオンや病原性ウイルス等が存在する危険性がある。また、ヒト血清を得るためには患者から大量の血液を採取してさらに血清を閉鎖系で分離しなければならないため、患者の肉体的・経済的負担が大きい。さらにヒト血清では、個体差によって、得られた血清で良好な hMSC 増殖が得られない場合もある。したがって、理想的には、成分が安定している無血清培地で hMSC を増殖培養できることが望ましい。

分担研究者である広島大学の加藤幸雄教授らは、新しい hMSC 用の無血清培地 STK2 を開発した。この培地は、現在少数の動物由来の化合物を含有しているようであるが、血清は全く使用されていない。

今回、この STK2 を用いて hMSC の培養を行い、hMSC の培養に従来用いられてきた血清含有培地 2 種 (DMEM, MSCBM) と細胞増殖速度について比較検討した。

また、細胞組織利用医療機器への応用を考慮すると、組織再生の足場となるような物質に hMSC を播種した状態で培養するような場合が想定される。今回

そのようなケースとして骨再生を想定し、それぞれの培地にハイドロキシアパタイト (Hydroxylapatite, HAp) 粉末を混合した状態での hMSC 増殖・活性についても調べた。HAp は、血清成分や培地成分を吸着する性質があり、細胞の増殖や細胞機能に影響を及ぼすことがこれまでの研究で明らかになっている。また、HAp 由来のイオンが培地中に溶出することも知られている。このように、HAp の存在によって培地の組成が変化し、hMSC の細胞活性が低下する可能性が考えられる。そこで、開発された無血清培地 STK2 の優れた効果が、HAp 存在下でも維持できるかどうか検討する。

B. 研究方法

1. ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について

1. 幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27, HeLaS3, HepG2) との遺伝子発現の比較

1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞: hMSC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) を 6 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 1 に示す。

ヒト骨肉腫細胞: HOS (大日本住友製薬株) は minimum essential medium (MEM; Eagle) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10% FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

ヒト軟骨肉腫細胞: OUMS-27 (JCRB Cell Bank) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日本製薬株) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10% FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

ヒト子宮頸癌由来細胞: HeLa S3 (JCRB Cell Bank) は Ham's F-12 Nutrient Mixture に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた培地で培養した。

ヒト肝癌由来細胞: HepG2 (Riken cell bank) は minimum essential medium (MEM) に 0.1mM non-essential amino acid (NEAA) と 10% FBS を加えた培地で培養した。

2) Total RNA の調製

hMSC, HOS, OUMS-27, HeLaS3, HepG2 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

3) 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の c-myc, Bmi-1, p53, Cx43, p16 の mRNA 発現レベルについて Real time RT-PCR 法にて検討した。c-myc, Bmi-1, Cx43, p16 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 2 に示した。一方、p53 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。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. 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

6 ドナー由来の hMSC の培養は 1 - 1) と同様に行った。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

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

3) DNA アレイ解析

6 ドナーのうち 4 ドナー (hMSC-A~D; 表 2) の hMSC から調製した total RNA を用いて、Affimitorix 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

それぞれの hMSC から抽出した 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の c-myc, Bmi-1, Cx43, p16, KLF4, ATM, PTEN, STAT5B の mRNA 発現レベルについて Real time (RT) -PCR 法にて検討した。

c-myc, Bmi-1, Cx43, p16, PTEN, STAT5B 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 2 に示した。一方、KLF4, ATM 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。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. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除 藪島 由二

ガラス製、金属製、テフロン製器具、プラスチック製器具はパイロジェンフリーの製品を使用した。

(1) 乾燥菌体及び大腸菌 03 株 LPS の調製

大腸菌 03 K2a, K2b:H3 ATCC 23501 株及び黄色ブドウ球菌 209P 株を普通ブイヨン培地中、37°Cで16時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100°C、10 分間加熱して殺菌した。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で3回洗浄した後、エタノール、アセトン及びジエチルエーテルにより順次脱脂し、乾燥菌体とした。

大腸菌 03 株 LPS は、乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し、Dnase/RNase 処理後、超遠心分離の反復により精製した (LPS 比活性: 27.5 EU/ng)。

(2) TLR アゴニスト

菌体成分としては、種々の TLR アゴニストを持つ大腸菌及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体のほか、合成リポ蛋白質 Pam (TLR2 アゴニスト)、大腸菌 03 株 LPS (TLR4 アゴニスト)、ウイルス由来の二本鎖 RNAPoly(I:C) (TLR3 アゴニスト)、合成抗ウイルス分子 R837 (TLR7 アゴニスト) 及び大腸菌 CpG DNA (TLR9 アゴニスト) を使用した。大腸菌乾燥菌体及び大腸菌 03 株 LPS 以外の TLR アゴニストは LPS の影響が観察されない濃度範囲で使用した。

(3) 細胞培養

細胞としては、ヒト末梢血細胞のほか、ヒト単球様 THP-1 細胞と MM6-CA8 細胞を用いた。

MM6-CA8 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸 (1 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、ウシインシュリン (9 μ g/ml)、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (10 μ g/ml) 及びアンホテリシン B (0.25 μ g/ml) を含む RPMI1640 培地を用いた。同細胞を calcitriol (1, 25-dihydroxy-vitamin D₃; 10 ng/ml) により 72 時間刺激した後、 1×10^6 cells / 0.9 ml / well となるように 24-well プレートに分注し、試料を 0.1 ml 又は 1 mg 添加して 24 又は 48 時間培養した。

医薬基盤研究所から購入及び国立医療センターから分与された THP-1 細胞 (NIBIO 株、IMCJ 株) の培養には、10%ウシ胎児血清、2-メルカプトエタノール (50 μ M)、HEPES (5 mM)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む

RPMI1640 培地を使用した。2 x 10⁵ cells/ml/ well となるように同細胞を 24-well プレートに分注し、PMA (100 μ g/ml) 及び calcitriol (0.1 μ M) を添加した。37°Cで72時間培養した後、培地で2回洗浄し、培地 (0.9 ml) 及び試料 (0.1 ml 又は 1 mg) を添加して 24 時間培養した。

ヒト末梢血細胞を使用した実験では、日本薬局方ヘパリン含有試験管に採取したヒト血液を生理食塩液又は RPMI1640 培地により 10 倍希釈した後、24-well プレートの各 well に 0.9 ml ずつ分注し、試料 0.1 ml を添加して 24 又は 48 時間培養した。また、表 1 に従って調製した凍結ヒト血液を使用して同様の試験を行った。尚、ヒト血液を利用した実験は国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

(4) 食食機能の評価

ガラスボトムディッシュ (松浪硝子) を用いて、前述した方法に従って培養、分化誘導した MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞に FluoSphere 2% 懸濁液 (粒径 1 μ m, Ex=580 nm, Em=605 nm, Molecular Probes) を 0.1 μ l 添加して 24 時間培養し、PBS で 3 回洗浄後、ホルマリン固定し、再度、PBS で 3 回洗浄した。同細胞に 5 μ l の Rhodamine phalloidin (Ex=540 nm, Em=565 nm, Invitrogen) を含む PBS 200 μ l を添加し、室温下、20 分間インキュベートしてアクチンを蛍光染色した後、再度、PBS で 3 回洗浄した。FluoSphere の食食状況は共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) を用いて観察した。

(5) IL-6 産生量の測定

TLR アゴニスト刺激により MM6-CA8 細胞、THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞から培養上清中に遊離される IL-6 量は市販 ELISA キット (BIOSOURCE) を用いて測定した。

(6) 発熱マーカーの一斉分析

TLR アゴニスト刺激後 24 及び 48 時間後に MM6-CA8 細胞及びヒト末梢血細胞から培養上清中に遊離される 27 種類のサイトカインとケモカイン (表 4) を BioPlex サスペンションアレイシステム (Human 27-Plex Panel, BIO-RAD) 及び Bio-Plex システム (BIO-RAD) を使用して一斉解析した。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

1 および 2 年目に、線維芽細胞と比較して間葉系幹細胞で高レベルに発現しているマーカーを選択した。またクローン化した間葉系幹細胞で全てのクロ

ーンで共通して発現しているマーカーを同定した。これらは線維芽細胞の混入や体外増幅した間葉系幹細胞の均質性を検査するために有用である。本年度は、線維芽細胞以外に、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨前駆細胞、軟骨前駆細胞、脂肪前駆細胞とも区別できるマーカーを選択するために、これらの細胞から RNA を抽出してその発現レベルを DNA microarray にて比較する。さらに間葉系幹細胞で選択的に高レベルに発現している遺伝子の mRNA レベルを定量的 RT-PCR 法でも確認する。

4. 幹細胞の安全性に関する研究 (コンピューターによる品質管理支援システム)

広島大学病院で行われている臨床研究 (歯周病への自家間葉系幹細胞移植治療) において、作業管理とデータ管理のため、富士通(株)に協力を得て再生医療のための品質管理システムを作出する。

(倫理面への配慮)

提供者に対するインフォームドコンセント、安全性検査結果の開示を行っている。試験情報の個人情報保護のために、試験データ管理を周知徹底している。試料等の取扱いについては提供者の同意を得た範囲で行っている。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

CO₂クリーンベンチ: クリーンベンチは気密化して実態顕微鏡を組み込み、ガスセンサーにより5.0%CO₂-空気を維持、一部に低酸素環境を設置したガス循環型クリーンベンチを開発する。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

動物実験は、National Institute of Healthにより刊行された”Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”に従い、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

オスの LEW ラットおよび ACI ラットから既に報告されている方法で skMB を単離、培養した。skMB における MHC class I、II、B7.1、B7.2 の発現をフローサイトメトリーで解析した。メスの LEW ラットで冠状動脈前下降枝結紮による心筋梗塞モデルを作成し、急性期に細胞移植を施行した。移植細胞 5×10⁶ 個をハンクス緩衝液に懸濁し、梗塞部周縁の 5 か所に 30G 針で注入した。LEW 由来 SKMB をドナーとする細胞移植 (S 群) は MHC 完全一致の同系細胞移植であり、自家移植を模擬している。ACI 由来 SKMB をドナーとする細胞移植 (A 群) は MHC 完全不一致の異系細胞移植であり、他家細胞移植を模擬している。細胞なしの緩衝液のみ注入した対照群 (C 群) は無

治療を模擬している。細胞移植による免疫応答は処置後 0、1、4、7、28 日の左心室組織における IL2R および IFN γ の転写量を定量 RT-PCR で解析した。移植細胞数の推移は処置後 0、1、4、7、28 日の左心室組織における雄性特異的遺伝子の定量 PCR で算出した。細胞移植後 14 日で左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs) を心臓超音波で測定し、以下の式から左室駆出率 (LVEF) を算出した。

$$LVEF (\%) = (LVDd^3 - LVDs^3) / LVDd^3 \times 100$$

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

臍帯血は移植に不適な臍帯血のインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血をフィコールに重層し、比重遠心後に単核球層を回収した。WBC の数が 2×10⁸ 以上の場合は 2 枚の 100mm シャーレ上に接種し、20%と 5%酸素の培養条件でそれぞれ培養した。WBC の数が 2×10⁸ 以下の場合は、1 枚の 100mm シャーレに接種し 5%酸素条件下で培養した。培養 3-4 週間後、形成コロニーを回収して計数後、増殖細胞の形態を観察し、5%酸素濃度で単離、増殖した細胞は in vitro での骨、軟骨分化能を調べた。また、臍血由来間葉系細胞は分化に関連する遺伝子発現を RT-PCR で調べ、骨髄および脂肪由来間葉系細胞と比較した。免疫抑制能については、マイトジェン (PHA) で処理したヒト末梢血由来 T 細胞と臍帯血由来間葉系細胞と共培養し、活性化した T 細胞の増殖を ³H-チミジンの取り込みにより調べた。さらに、増殖した細胞の安全性を確認するために、20 から 40 PDL まで増殖した細胞の核分析を行い染色体異常の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は実地に際して「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、その内容を本研究所倫理審査委員会に申請し、審査承認を受けている。提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認を受けている。また、採取に際しては、東京臍帯血バンクにおいてドナーに対して問診および家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴のあるドナーからの臍帯血の採取は行わない。なお、問診および家族歴等の個人情報は東京臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処置を講じている。以上より、提供を受けた試料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に研究従事者の安全性も確保されている。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究

1 抑制に関わる因子の探索

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。

マウス splenocyte は日本チャールズリバー(株)より購入した C3H(H-2k)の脾臓をすりつぶし、溶血させた後 1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)に懸濁したものを実験に用いた。

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)は日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c (H-2d)から骨髄細胞を回収し、溶血させた後 GM-CSF を入れた 1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)で一日おきに培地交換をし、培養6日目に LPS で刺激を与え一晩培養した後、洗浄しガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

2) T細胞の活性化

I : Mixed Lymphocyte culture Reaction (MLR)

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内でマウス splenocytes (2.5×10^6)と BMDC (4.125×10^5)を共培養した。

II : Mitogenによる刺激

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内にマウス splenocytes (2.5×10^6)をまき、PMA, ionomycin (2.5 ng/ml, 125 ng/ml)で刺激した。

III : anti-CD3/anti-CD28による刺激

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内にマウス splenocytes (2.5×10^6)をまき、anti-CD3/anti-CD28(2.5 ug/ml, 0.5 ug/ml)で刺激した。

3) 活性化 T細胞と hMSC の共培養

hMSC の前処理

6 well plate の各ウェルに hMSC (2.5×10^5)を播種し、張り付いたのを確認してからガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂を阻害した。その上に2)の方法で活性化させた T細胞を共培養させた。

4) RNA 回収

培養3,4(MLRのみ)日目に、RNeasy (QIAGEN)を用いて RNA を精製した。

5) DNA マイクロアレイ解析

a : ハイブリダイゼーション

Agilent 社製 Whole Human Genome 4 x 44 を用いて行った。

b : データ解析

GeneSpring を用いて、コントロールに対して二倍

以上発現の異なるものを抽出した。

2 無血培地の MSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討

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、もしくは STK2 培地 (ツーセル) 培養した。

マウス splenocyte は日本チャールズリバー(株)より購入した C3H(H-2k)の脾臓をすりつぶし、溶血させた後 1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)に懸濁したものを実験に用いた。

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)は日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c (H-2d)から骨髄細胞を回収し、溶血させた後 GM-CSF を入れた 1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)で一日おきに培地交換をし、培養6日目に LPS で刺激を与え一晩培養した後、洗浄しガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

2) T細胞の活性化

I : Mixed Lymphocyte culture Reaction (MLR)

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes (2×10^5)と BMDC (3.3×10^4)を共培養した。

II : Mitogenによる刺激

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes (1×10^5)をまき PMA, ionomycin (2.5 ng/ml, 125 ng/ml)で刺激した。

III : anti-CD3/anti-CD28による刺激

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes (1×10^5)をまき anti-CD3/anti-CD28 (2.5 ug/ml, 0.5 ug/ml)で刺激した。

3) 活性化 T細胞と hMSC の共培養

hMSC の前処理

96 well plate の各ウェルに hMSC を播種し、張り付いたのを確認してからガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂を阻害した。その上に2)の方法で活性化させた T細胞を共培養させた。

4) 細胞増殖測定

培養2,3,4日目に各ウェルに³H-Thymidine を加え培養した。Thymidine の取り込みは細胞をガラスフィルターに吸着させた後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

5) サイトカイン測定

培養2,3,4日目に細胞上清を回収し、各種サイトカインの測定をするまで-80℃で保存した。サイトカ

インの測定は Mouse IL-2 および Mouse IFN- γ (DouSet ELISA Development kit: R&D SYSTEM)で行った。

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

ISO/TC194の策定会議に参加し、情報を収集する。

(倫理面への配慮)

確認すべき安全性試験法確認では動物愛護法等関連法を遵守して行う。

10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

1. 無血清培地 STK2 と血清含有培地 DMEM・MSCBM との hMSC 増殖比較

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., 以下 Cambrex 社) を以下の 3 培地で培養し、細胞増殖速度を比較した。

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を添加した培地 (MSCBM, MCGS 共に Cambrex 社、以下 MSCBM と略記)

無血清培地 STK2

DMEM および MSCBM は、10%のウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を含む状態で使用した。

STK2 の使用可能量が限られていたため、各培地での培養に際しては 96 ウェルプレートを使用した。各ウェルに 100 μ l の培地が入った状態で 2000 cells/well (約 6000 cells/cm²) となるように hMSC を入れた。hMSC は事前に DMEM (10% FBS) で培養していたものを用い、血清の入っていない DMEM で細胞を洗浄した後、それぞれの培地へ再濁液した。そして、4 日間培養した時点での細胞数を比較した。細胞数の定量は、Crystal Violet 染色法にて行った。

2. ハイドロキシアパタイト (HAp) 存在下での細胞増殖・活性の比較

ハイドロキシアパタイト (HAp) 粉末を各培地 (DMEM, MSCBM, STK2) に混合し、HAp 粉末と hMSC が直接接触する状態で培養して、細胞増殖・活性を比較した。

また、HAp 混合培地の上澄みでも hMSC を培養し、HAp 粉末と細胞とを直接接触させた場合と比較した。上澄みでも培養を行ったのは、固形粉末が培養環境に加わることを影響を排除するためである。

まず、実験 1 と同様に 96 ウェルプレートに hMSC の培養状態を用意した。1 日培養した後、アパタイト粉末を混合した各培地の懸濁液およびその上澄みに培地を交換した。培地に対する HAp の混合割合は、0, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml とし、各ウェルに対し 200 μ l ずつ注入した。さらに 4 日間培養した後、

TetraColor ONE (生化学バイオビジネス (株), 800560) を用いて細胞増殖・活性を比較した。

C. 研究結果

1. ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について

1. 幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27, HeLaS3, HepG2) との遺伝子発現の比較

p16, c-myc, p53, Bmi-1, Cx43 の mRNA 発現レベルについて、複数のドナー由来の hMSC と腫瘍細胞 4 種 (HOS, OUMS-27, HeLaS3, HepG2) とで比較した (図 1)。p16 は、hMSC は全てのドナーで発現が認められ、腫瘍細胞である HepG2, HOS, OUMS にはその発現が認められなかったが、HeLaS3 における発現レベルはかなり高かった。c-myc, p53, Bmi-1 は hMSC よりも腫瘍細胞 4 種での発現レベルが高く、Cx43 は逆に hMSC の方が腫瘍細胞よりもその発現レベルが高かった (図 1, 2)。

2. 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

6 ドナー (hMSC-A, B, C, D, E, F) 由来の hMSC の増殖を図 3 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) DNA マイクロアレイ解析によるターゲット遺伝子の抽出

4 ドナー (hMSC-A, B, C, D) 由来の hMSC について DNA マイクロアレイ解析を行った。hMSC-A, B, C, D 全てにおいて、#1 と比較して 20days, 50days と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 in vitro 培養期間中に mRNA 発現レベルの変化がなかったものとみなし、GeneSpring (Agilent Technologies) を用いて抽出した。条件を満たしたものは 1,898 遺伝子であった。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 遺伝子であった。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。Cancer, Cell Cycle に関わる上記遺伝子群から、両者に共通し多くのカテゴリーの中に含まれている遺伝子として、c-myc, Bmi-1, PTEN に着目した。

3) Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

DNA マイクロアレイ解析により抽出した遺伝子 (c-myc, Bmi-1, PTEN) について、mRNA 発現レベルを Real-time PCR にて測定し比較した。さらに、幹

細胞の自己複製制御と発癌制御に関与するとこれまでに報告されている分子から、KLF4、ATM、STAT5、p16、Cx43 についても同様に検討した。それぞれの発現レベルを図4に、培養期間中の変化を#1における発現レベルを1として図5に示した。c-myc、Bmi-1、KLF4、ATM は、ドナーによる発現レベルの差は見られるものの(図4)どの遺伝子も培養期間(50日)内においてその発現レベルに大きな変化が見られないことが確認された(図5)。PTEN、STAT5Bはドナー間の発現レベルにもあまり差が無く(図4)、培養期間(50日)内における発現レベルもほとんど変化が見られなかった(図5)。一方、p16、Cx43はドナーによる発現レベルの差が見られ(図4)、さらにp16は培養期間に依存してその発現レベルが上昇する傾向があり(図5)、逆にCx43は減少する傾向が見られた(図5)。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除 藪島 由二)

(1) LPS 応答性

IL-6 産生誘導能を指標としてヒト末梢血細胞のLPS 応答性を MM6-CA8 細胞及び THP-1 細胞と比較検討した。図6Aに示したように、MM6-CA8 細胞は過去の成績と同様、5 pg/ml 以上の濃度でLPSを認識し、同細胞からのIL-6産生量は用量依存的に増加した。一方、THP-1 細胞 IMCJ 株のLPS 応答性は MM6-CA8 細胞と比較して1,000倍程度低く、特にTHP-1 細胞 NIBIO 株ではIL-6産生誘導量自体も低値を示した。

図6Bに示したように、RPMI1640 培地で希釈したヒト末梢血細胞(ヒト血液)はMM6-CA8 細胞と同等のLPS 応答性を示し、5 pg/ml 以上のLPS濃度範囲において用量依存的にIL-6産生量が増加したが、各用量におけるIL-6産生量はMM6-CA8細胞と比較して、若干低値を示した。また、ヒト血液の希釈溶液としてはRPMI1640 培地が優れており、生理食塩液により希釈したヒト血液と比較して、IL-6産生量が5倍程度増加することが確認された。

表3に示した第1法により調製した凍結血液(セルバンカー非添加の凍結保存血液をRPMI1640 培地で希釈した血液)は新鮮ヒト血液を生理食塩液で希釈した時と同等のLPS 応答性を示した(図6B)。また、ヒト末梢血細胞のIL-6産生誘導能は、セルバンカーを添加して凍結保存することにより効率良く保持されることが判明し、表3に示した第2法により調製した凍結血液は、新鮮血液をRPMI1640 培地又は生理食塩液で希釈した時と比較して、それぞれ0.7倍及び3倍程度のLPS 応答性を示した。一方、第3法及び第4法(表3)により調製した凍結血液のIL-6産生量は、RPMI1640 培地で希釈した新鮮血液と比較

して1/15 -1/30 程度まで低下した。

(2) TLR アゴニストに対する応答性

種々のTLRアゴニストに対するヒト末梢血細胞の応答性を評価し、MM6-CA8 細胞及びTHP-1 細胞 NIBIO 株と比較検討した(表5)。大腸菌乾燥菌体を除き、いずれのアゴニストも混入しているLPSの影響が観測されない濃度範囲において試験を実施した。

昨年度の本研究において、MM6-CA8 細胞とTHP-1 細胞 NIBIO 株は、種々のTLRアゴニストを持つ大腸菌及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体とTLR2 (TLR2/1) アゴニストであるPamを認識するが、THP-1 細胞 NIBIO 株と比較して、MM6-CA8 細胞は高い応答性を示すことが確認されている。また、MM6-CA8 細胞は使用した濃度範囲において、Poly(I:C) (TLR3 アゴニスト)、R837 (TLR7 アゴニスト) 及び大腸菌 CpG DNA (TLR9 アゴニスト) を認識しないが、THP-1 細胞 NIBIO 株はPoly(I:C)に対する応答性を有していることも確認されている。

一方、表5に示したように、ヒト末梢血細胞は本実験で使用した全てのTLRアゴニストを認識したことから、同細胞のTLR発現状況はMM6-CA8 細胞及びTHP-1 細胞と異なることが明らかになった。黄色ブドウ球菌乾燥菌体及びPamの検出感度はヒト末梢血細胞、MM6-CA8 細胞ともにほぼ同等であったが、大腸菌乾燥菌体に対してはヒト末梢血細胞の方が高い応答性を示すことが確認された。

(3) 貪食作用の確認

マクロファージ系の細胞は生体内に侵入した異物を貪食し、活性化されることが知られている。そこで、本研究において使用したMM6-CA8 細胞とTHP-1 細胞の貪食機能を評価した結果、図7に示したように、粒径1 μm のFluosphereが細胞内に取り込まれていることが共焦点レーザー顕微鏡解析により確認されたことから、両細胞ともに貪食機能を持つことが示された。

(4) 発熱マーカーの検索

ヒト末梢血細胞及びMM6-CA8 細胞を種々のTLRアゴニスト及びMicro sphere (粒径1 μm) により刺激し、24又は48時間培養した時に産生される27種類のサイトカインとケモカインの発現パターンを解析した。

従来、発熱マーカーとしてはIL-1 β 、IL-6やTNF α が利用されていたが、ヒト末梢血細胞の場合、図8に示したように、MCP-1の産生誘導が最も高く、その他にもIL-1ra、IL-8、MIP-1 α 及びMIP-1 β も発熱マーカー候補になり得ることが確認された。MM6-CA8 細胞においても、IL-1 β 、IL-6、TNF α のほか、IL-1ra、

MCP-1、MIP-1 α 及びMIP-1 β が発熱マーカーになり得るが、同細胞はヒト末梢血細胞と異なるサイトカイン、ケモカインの誘導パターンを示し、IL-8及びRANTESの誘導能が高いことが確認された(図8)。

検出感度はS/N比に依存するため、産生量が多くてもバックグラウンドが高い場合、結果として検出感度が低下する。そこで、種々のTLRアゴニスト及びMicro sphere 刺激により誘導されるサイトカイン、ケモカインのS/N比を考慮して発熱マーカーを検索した。その結果、表6に示したように、24時間刺激後のMM6-CA8細胞では、IL-6が最も高いS/N比を示すことが明らかとなり、また、MIP-1 α 及びMIP-1 β もIL-1 β やTNF α よりも高いS/N比を持つことが確認された。一方、24時間刺激後のヒト末梢血細胞の場合、表7に示したように、IL-1 β とIL-6が発熱マーカーの第一候補になり得ると共に、MIP-1 α も利用できることが明らかになった。産生量の多いMCP-1も発熱マーカーとして利用できるS/N比を示したが、Poly(I:C)とMicro sphereの検出感度が劣っていた。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

線維芽細胞以外に、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨前駆細胞、軟骨前駆細胞、脂肪前駆細胞とも区別できる間葉系幹細胞特徴的マーカー遺伝子を148個同定した。しかしこれらがすべて良いマーカーであるのではなく、患者の年齢や性差による影響が少ないこと、培養期間による影響が少ないこと、個体差が少ないことなどの条件を充たすマーカー遺伝子は少数であった。なおマーカー発現レベルに及ぼす培養期間の影響については、広島大学および国立医薬品食品衛生研究所においてそれぞれ異なる培養条件で検討した。その結果、少数の有用マーカーを選択することができた。

4. 幹細胞の安全性に関する研究(コンピューターによる品質管理支援システム)

支援システムによるデータ管理上で、骨髓採取を行った11症例の間葉系幹細胞の安全性を評価した。歯周病への自家間葉系幹細胞移植における①登録前(血液)検査、②自己血清検査、③培養液検査、④培養細胞検査の結果は、10人(1人は2度の治療を実施したため延べ例数は11例)の患者さんのうち1人の培養液検査でエンドトキシン値が高値(520000 EU/L)に検出された。しかし、同一試料の細菌検査結果は陰性であった。ウィルス検査に関して、登録前(血液)検査と培養細胞検査でウィルスは検出されなかった。コンピューターによる支援システムは実用化が可能である。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

CO₂ クリーンベンチ: クリーンベンチは気密化して実態顕微鏡を組み込み、ガスセンサーにより5.0%CO₂-空気を維持、一部に低酸素環境を設置した。チャンバー内雰囲気は繰り返し濾過(HEPAフィルター)により、運転開始5分後にはほぼ無塵(class 0)となった。また温度センサーで雰囲気を34-37°Cに保持した。作業面は使い捨てプラスチックフィルムで覆い、感染性因子(体液等)による機器汚染を防止した。画像記録、作動記録等を可能とした。使い捨てカプセル培養装置: ガス、温度環境の攪乱防止、感染防御、取り違え防止に配慮した使い捨て培養装置を開発した。恒温ドライブロックに着脱可能なプラスチック容器(容量500ml、以下ボトル)を16個設置し、培養槽とした。症例毎に1ボトルを使用してセキュリティの向上を図り、使い捨てとした。ボトル内には混合ガス(5.0%CO₂、2.0%O₂、93%N₂)を少量通気して陽圧とし、ガス平衡を維持した。本システムではCO₂センサーによるガス制御は不要であり、センサー劣化によるガス濃度誤差を考慮する必要がなくなった。容器開閉時にボトル内に流入した空気は5.0%CO₂、95%N₂でパージすることにより、3分以内にO₂濃度2.0%に復帰させ、組織が高酸素に暴露される時間を最小限とした。ボトル内にいれたgas buffer(220ml)は環境全体をガス緩衝系とするとともに蓄熱し、培養環境の攪乱を最小限とした。ボトル毎にガス平衡状態が視認できるようにするとともに、gas bufferのpH、温度を常時モニターすることにより精度管理が可能となった。

小数例ではあるが、低酸素下にヒト胚を培養すると形態が高酸素下と異なることを認め、環境の酸素濃度が胚発生に影響する可能性が考えられた。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

1. アロ筋芽細胞移植の免疫原性に関する検討

skMBはRT1A陽性、RT1B陰性、CD80弱陽性、CD86陰性で、インターフェロンガンマ(IFN γ)刺激によりRT1Aの発現増強およびRT1Bの発現を認めた。CD80、86の発現は変わらなかった。

細胞移植部位へ免疫担当細胞の浸潤程度を評価するために、直接的な指標であるインターロイキン受容体(IL2R)および間接的な指標であるIFN γ について経時的に定量RT-PCRを行った。移植後7日のA群においてIL2R、IFN γ ともに顕著な発現の上昇を認めた。

2. 心筋梗塞移植部位におけるアロ筋芽細胞数

心筋梗塞の左室組織における移植細胞数は、移植後 15 分 (day 0) では A 群および S 群と同程度であるが、その後 1、4、7、28 日でいずれも A 群は S 群と比して有意に低い値であった。移植後 28 日で A 群のドナー細胞は検出限界以下であった。

3. 心筋梗塞急性期に対するアロ細胞移植の治療効果

S 群において C 群と比して LVDs、LVDs が小さい傾向をみとめたが、A 群においては C 群と比して有意に大きかった。EF は S 群において移植後 4 週から高い傾向を認め、移植後 8 週で有意に高かったが、A 群では C 群と同程度であった。

4. 心筋梗塞に対する FK506 投与

心筋梗塞ラットに対し FK506 を投与したところ、C 群と比して顕著な左室内腔拡大および EF の低下を認めた。

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

5%酸素の培養条件で培養した場合、コロニーを形成する間葉系幹細胞の回収は採取した臍帯血ユニットの 42%から可能であり、20%酸素の通常の培養条件に比べやや高い傾向が見られた。また同じ臍帯血ユニット由来の間葉系細胞では 5%酸素培養は 20%培養より良く増殖した。この 5%酸素の培養条件で得られ細胞は *in vitro* での骨、軟骨細胞へ分化能も維持していた。臍帯血由来間葉系細胞の分化に関わる遺伝子発現は Oct4, Runx-2, PPAR- γ 1, BMP receptor, Smad などは骨髄あるいは脂肪由来間葉系細胞と同様に発現していたが、臍帯血由来間葉系細胞は軟骨細胞分化関連遺伝子 SOX9 の発現は高かった。免疫寛容実験において、臍帯血由来間葉系細胞は骨髄あるいは脂肪由来間葉系細胞と同様に PHA 刺激リンパ球に添加、間葉系細胞はリンパ球増幅を濃度依存的に抑制し、また ConA 刺激、混合リンパ球培養試験でも同様な増殖抑制効果が示された。増殖間葉系細胞の安全性について 20 から 4 O PDL まで増殖した間葉系細胞に染色体の異常は見られなかった。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究

1. 抑制効果に関わる因子の探索

これまでに、MSC の免疫抑制効果には液性因子が関与しているという報告と、細胞間の相互作用が関係しているとの報告があるが、今回は液性因子による抑制効果に着目して解析を行っていった。MSC の活性化 T 細胞に対する抑制効果は MSC と T 細胞の種が異なる場合でも維持されていることを昨年の研究により確認済みであったので、定常状態の hMSC (コントロール) とマウス脾臓細胞を活性化させた状態

と共培養した hMSC (=抑制効果を発揮している hMSC) の間で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化のある遺伝子の同定を試みた。GeneSpring を用いてコントロールに対して抑制効果を発揮している MSC で発現が二倍以上になった遺伝子を抽出したところ、数十個の候補遺伝子を得ることができた。

(図 9, 10) 現在、これらの遺伝子と免疫抑制効果の関連性を検討している。

2. 無血清培地の hMSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討

hMSC と活性化 T 細胞の共培養の系を 10% FBS 含有の MSCGM 培地もしくは無血清培地である STK2 で培養してみたところ、Mitogen 刺激および anti-CD3/anti-CD28 刺激で T 細胞を活性化させた系では hMSC による細胞増殖抑制効果は MSCGM での培養でも、STK2 での培養でも大きな変化はなかった。一方、MLR の系では STK2 で培養すると MLR の反応自体がほとんど起こらなくなり、hMSC による抑制効果を観察することができなかった。(図 11) STK2 培地の培養過程で抗原提示能を有している DC が不活性化されている可能性がある。そこで、hMSC を MSCGM および STK2 で前培養し、活性化 T 細胞との共培養の過程では MSCGM で培養することにした。(図 12) その結果、MLR の系でも前培養が MSCGM であろうが STK2 であろうが hMSC の細胞増殖抑制効果は維持されることが確認できた。また、mitogen 刺激および anti-CD3/anti-CD28 刺激の系でも増殖抑制効果が維持されていることが確認された。(図 13) しかも、MLR の系および Mitogen 刺激の系では細胞増殖抑制が STK2 で前培養していた方が早期に始まっていることがわかった。(図 13) 一方、サイトカインに関しては MSCGM 培養、STK2 培養で異なった結果を得ている。MLR の系では前培養を STK2 で行った方が IL2 は多く、IFN- γ は逆に少なくなっていた。(図 14) Mitogen 刺激の系では前培養を STK2 で行った方が IL2、IFN- γ ともに多くなっていた。(図 15) これに対し、anti-CD3/anti-CD28 刺激の系では IL2、IFN- γ ともにどちらの培地で培養してもその量に差がなかった。(図 16)

9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

2006 年にロンドンで開催された ISO/TC194 SC1 に参加し、BSE による医療機器の安全性に関する標準化文書を作成するとともに情報を収集した。また 2007 年に韓国済州島にて開催された ISO/TC194 に参加し医療機器の安全性に関する情報を獲得した。とくに我が国で改訂された動物愛護法では実験動物使用数の削減を求めたことから、我が国の政策に沿っ

た国際標準を提案し、採用された原案を作成した。

10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

1. 無血清培地 STK2 と血清含有培地 DMEM・MSCBM との hMSC 増殖比較

DMEM・MSCBM・STK2 のそれぞれで hMSC を 4 日間培養した結果、Crystal Violet 法による結果においては、STK2 は DMEM に対して 2 倍以上、MSCBM に対しては 1.5 倍以上増殖率が上昇した (図エラー! 参照元が見つかりません。7)。各培地で培養中の hMSC の位相差顕微鏡像を図 18 に示す。いずれの細胞でも細胞の形態に大きな違いは見られなかったが、STK2 の細胞数が DMEM・MSCBM を上回っていることが確認できる。

2. ハイドロキシアパタイト (HAp) 存在下での細胞増殖・活性の比較

HAp 粉末と hMSC を直接接触させた培養では、10 mg/ml を超える混合量では、すべての培地で顕著な細胞活性の低下が見られた (図 19)。一方、1 mg/ml までの添加では、DMEM および MSCBM の細胞活性は、HAp 添加量に応じて阻害された。DMEM での低下は特に顕著であった。しかし、STK2 での hMSC 細胞活性は、同条件下でまったく阻害されず、良好であった。

HAp 混合培地の上澄みによる培養結果では、全体的に度数が高くなっているものの、依然として濃度依存性が見られた (図 20)。また、10 mg/ml までの濃度において、STK2 での細胞活性は、DMEM・MSCBM を大きく上回る結果が得られた。

D. 考察

1. ヒト間葉系幹細胞の癌化に対する危険性について

昨年度までの検討から、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の一つとして、幹細胞では発現しその培養期間に依存して発現レベルが上昇するが腫瘍細胞での発現が認められなかった細胞周期制御因子である p16 が挙げられるとの見解を示したが、検討に用いた細胞が、幹細胞としては hMSC を 1 ロットのみ、腫瘍細胞としては HOS (ヒト骨肉腫細胞) と OUMS-27 (ヒト軟骨肉腫細胞) であったため、今年度は複数のドナー由来の幹細胞と腫瘍細胞としてさらに HeLa S3 (ヒト子宮頸癌由来細胞) と HepG2 (ヒト肝癌由来細胞) についても比較検討した。その結果、p16 は、hMSC は全てのドナーで発現が認められ、一方で腫瘍細胞である HepG2、HOS、OUMS にはその発現が認められなかったものの、HeLaS3 での発現レベルは幹細胞を遥かに超える高いものであった (図 1)。

しかしながら、p16 は細胞老化を引き起こす因子であり幹細胞において培養期間に依存して細胞老化に伴うその発現レベルの上昇も確認していることから、やはり p16 が正常に働かなくなることが幹細胞の癌化につながる可能性があり、幹細胞における p16 の mRNA 発現レベルの検討は、安全性評価指標となり得るものと思われる。ただし、HeLaS3 のようにその発現が認められる腫瘍細胞株が存在するという点も踏まえた上で、細胞増殖能との兼ね合い等も検討する必要はあるかもしれない。今年度はさらに c-myc、p53、Bmi-1、Cx43 の mRNA 発現レベルについても同様に検討した。その結果、c-myc、p53、Bmi-1 は hMSC よりも腫瘍細胞 4 種での発現レベルが高く、Cx43 は逆に hMSC の方が腫瘍細胞よりもその発現レベルが高かった (図 1)。特に Bmi-1、Cx43 は今回検討した細胞種では幹細胞と腫瘍細胞での発現レベルに明らかな差が見られた (図 2)。

さらに、hMSC における *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しその共通性を探った。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。まず、DNA アレイを用いた網羅的解析を行い、*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 とともにその発現レベルが 0.8~1.2 倍であった遺伝子を「発現レベルに変化なし」とであるとみなして抽出したところ、1,898 遺伝子が抽出された。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。そこで、cancer、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、Bmi-1、PTEN に着目した。そして、定量的リアルタイム PCR にて c-myc、Bmi-1、PTEN の mRNA 発現レベルを測定した。さらに、幹細胞の自己複製制御と発癌制御に関与するとこれまでに報告されている分子から、KLF4、ATM、STAT5B、p16、Cx43 についても同様に検討した。c-myc、Bmi-1、KLF4、ATM は、ドナーによる発現レベルの差は見られるものの (図 4) どの遺伝子も培養期間 (50 日) 内においてその発現レベルに

大きな変化が見られないことが確認された(図5)。PTEN、STAT5Bはドナー間の発現レベルにもあまり差が無く(図4)、培養期間(50日)内における発現レベルもほとんど変化が見られなかった(図5)。一方、p16は培養期間に依存してその発現レベルが上昇する傾向があり(図5)、逆にCx43は減少する傾向が見られた(図5)。通常、発現レベルの有意な変化とみなされるのは、変化率2倍以上か0.5倍以下であるため、全てのhMSCの培養期間(50日)内の変化がほぼ0.5~2倍の範囲内に収まっているc-myc、Bmi-1、KLF4、ATM、PTEN、STAT5Bは、複数のドナーに共通して培養期間(50日)内の発現レベルにほとんど変化がない遺伝子であると思われる。特に、PTEN、STAT5Bは、発現レベルにおけるhMSCの個体差も小さく、その変化も非常に小さいため安全性評価指標として利用できる可能性は高い。つまり*in vitro*培養の前後において、通常は上記遺伝子の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。

以上の結果から、骨髄由来間葉系幹細胞におけるp16とCx43の遺伝子発現確認と、*in vitro*培養期間前後におけるc-myc、Bmi-1、PTEN、KLF4、STAT5B、ATMのmRNA発現レベルの変化について確認する事は、*in vitro*培養中に癌化のような不都合な変化が起こっていないかの判断基準の一つとなり得ると考えられた。

2. 組織工学用スキャホールドのエンドトキシン試験法の確立と感染リスクの排除

TLR familyは微生物感染に対する宿主の初期免疫応答を制御する生体防御蛋白質であり、肺、胃腸管のような外部環境に接する組織やマクロファージのような免疫応答細胞に優先的に発現している。生体内におけるLPSの一次標的はマクロファージであり、血中に投与されたLPSはLBP(LPS Binding Protein)及びCD14分子と複合体を形成し、TLR4を介して発熱をはじめとした様々な生理活性を発現する。TLR2はTLR1やTLR6と二量体を形成することにより、グラム陽性細菌の細胞外膜に局在するリポタイコ酸や細胞膜の構成成分であるリポ蛋白質などを認識し、その他、ウイルス由来の二本鎖RNA、細菌鞭毛、細菌DNAはそれぞれTLR3、TLR5及びTLR9を介して生物活性を発現することが知られている。TLR7及びTLR8のアゴニストは同定されていないが、合成抗ウイルス分子に対する親和性を持つことが知られている。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカン

はTLR2アゴニストとして作用すると考えられていたが、近年、精製したペプチドグリカンはTLR2を介さずに活性を発現することが報告され、NOD1やNOD2などのその他の蛋白質の関与が示唆されている。

これらの菌体成分がTLRに認識されると、セリンキナーゼ(IL-1-R-associated kinase, IRAK)の活性化やNF- κ -B転写因子の活性化など一連のシグナルカスケードを経て、最終的にTNF α 、IL-1 β やIL-6などの炎症性サイトカインの産生が誘導される。活性発現の強度はそれぞれ異なるが、TLR familyに認識されるこれらの菌体成分はいずれも発熱性物質となる。

HCPTにおいては、ヒト血液(末梢血細胞)とライオン化細胞を使用することができる。末梢血は発熱性物質と反応する全ての血中成分を通常の生理学的比率で含んでいる利点があるが、その安全性、品質管理、供給面での問題が課題となる。一方、ヒト由来単球様細胞であるMM6、THP-1、U937及びHL-60ライオン化細胞の場合、供給面や安全性に関する障壁はないが、試験に供するまでに数週間の培養期間が必要であると共に、継代による性状変化や発熱性物質に対する反応性などを確認する必要が生じる欠点を持っている。また、本研究において確認されたように、同種の細胞であっても、由来の相違により、発熱性物質に対して異なる応答性を示す場合もある。

現在までの本研究において、MM6-CA8細胞はTLR2及びTLR4アゴニストに対して高感度で応答するが、その他のTLRアゴニストを認識しないことが確認されている。また、THP-1細胞はTLR2、TLR3及びTLR4以外のTLRsを発現していない可能性が示唆されている。材料の微生物汚染が細菌類に由来する場合、TLR5、TLR7、TLR8及びTLR9を発現していなくとも、TLR2、TLR2/1、TLR2/6及びTLR4を介して微生物の混入を検出することは可能である。ウイルスの場合、核酸を保護するカプシドとそれを取り巻くエンベロープは一般的にそれぞれ蛋白質及びリポ多糖体蛋白質から構成されている。それ故、HCPTにおいて使用する細胞がウイルス由来の2本鎖RNAを認識するTLR3を欠損していても、材料のウイルス汚染はTLR2を介して検出することが可能と思われる。しかし、HCPTにおいては、各種の微生物成分を包括的に検出することができれば理想的であり、その点、本研究において使用した全てのTLRアゴニストを認識したヒト末梢血細胞の有用性は高い。TLR2及びTLR4に対するヒト末梢血細胞の応答性はMM6-CA8細胞と同等又はそれ以上であり、感度的な問題がないと共に、ヒト末梢血細胞の活性は適切な条件により血液を冷凍保存することにより保持されるため、供給面の問題を解決できる可能性もある。

MM6-CA8 細胞は Micro sphere を細胞内に取り込むが、食食作用によって誘導されるサイトカイン、ケモカインの産生量は、TLR アゴニスト刺激時と比較して低値を示した。一方、ヒト末梢血細胞の食食機能は評価していないが、発熱マーカー検索の結果から、同細胞も Micro sphere を食食し、MM6-CA8 細胞より高いサイトカイン、ケモカイン誘導能を示すことが確認された。これらの結果から、HCPT では異物による免疫応答も検出できることが明らかになった。

MM6-CA8 細胞の発熱マーカーとしては、過去の研究において発熱活性と最も良好な相関性を持つ IL-6 が優れていることが確認された。その他、単球遊走化能を持つ CC ケモカインである MIP-1 α 及び MIP-1 β も従来利用されていた発熱マーカーである IL-1 β 及び TNF α より有益なマーカーとなり得ることが判明した。一方、ヒト末梢血細胞の発熱マーカーとしては IL-6 又は IL-1 β が優れており、MIP-1 α も有益なマーカーになることが確認された。

以上の結果を含め、平成 17 年度から実施した本研究により、ヒト細胞を利用した新しい発熱性物質試験法の実験系が確立されたと共に、同試験法は組織工学製品のヒトに対する微生物学的安全性を評価する上で大きな利点を持つことも確認された。

3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

間葉系幹細胞に発現して他細胞での発現が低い遺伝子マーカーを多数同定して、さらに臨床的に使用しやすい少数のマーカーセットを選択した。今後は、これらの間葉系幹細胞マーカーの中で、幹細胞としての性質（自己増幅と多分化能）と直接連結するマーカーがどれなのかを明らかにすれば、マーカーの使用法が拡大し、かつ一般にマーカーの有用性が理解されやすくなると考えている。

4. 幹細胞の安全性に関する研究（コンピューターによる品質管理支援システム）

支援システムに作業管理をもたせるため、時間的要件と検査試料量を考慮し、移植前に評価できる方法と移植後に評価する方法の組み合わせを決定した。エンドトキシン検査は、バリデーションをとることが必要と考えられた。培養液と培養細胞の検査は、移植前後のそれぞれに評価できる検査方法と検査回数を選択することがより良いと考えられた。支援システムはバリデーションを行って、将来は、GCP に対応する必要がある。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

従来型の株化細胞継代培養用システム（空気相下における細胞取扱、5.0%CO₂-air 培養装置）は、培養条件に耐える変異（株化）細胞のみが継代培養可能であった。初代細胞の培養システムは、細胞が生体内で存在した環境を出きる限り再現する必要がある。これまで培養液の組成に関しては詳細な検討加えられてきたが、培養環境を規定する装置側に配慮する例は皆無であった。

6. 細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究

skMB は MHC 分子 (RT1A, RT1B) を発現し、かつ B7.1 を発現することから免疫応答を惹起しうる細胞であることが示唆された。アロ skMB 移植実験により、活性化 T 細胞のマーカーである IL2R の発現上昇を認めたことから、アロ skMB 移植により免疫拒絶反応を惹起したことが示唆された。

心筋梗塞部における移植 skMB 数を経時的に測定した。移植直後の 0 日では A 群の検出細胞数は S 群と同程度であるが、移植後 1 日以降は有意に低く脱落が早いことが示唆された。

心機能評価より A 群は心機能増悪抑制効果を有しないことが示唆された。

以上よりアロ skMB 細胞は免疫原性を有し、心筋梗塞急性期に対する細胞移植において、免疫拒絶を惹起すること、その結果移植細胞の脱落が早く、治療効果が無いことが示唆された。また、FK506 投与により心機能が著しく増悪したことから虚血性心不全に対するアロ細胞移植療法における使用は慎重に検討する必要がある。

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究

低酸素培養条件は臍帯血由来間葉系細胞の単離と増殖へある程度影響することがわかった。また臍帯血由来間葉系細胞は骨髄由来細胞と同じように免疫抑制能を示し、長期間培養後細胞にも染色体の異常がみられなかった。また高い SOX9 の遺伝子発現はこの細胞が軟骨細胞へ分化しやすいことと関連する可能性が考えられた。今後 *in vivo* での分化能実験を追加するとともに、臍帯血間葉系細胞を恒常的に分離増幅し凍結保存するシステムを開発し、既存の臍帯血バンクを利用して臍帯血が再生医療におけるアロの細胞ソースにするよう検討をすすめていく予定である。

8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

再生医療への間葉系幹細胞の応用はこれまでの様々な研究から期待はされてきている。しかしなが