

ら特に間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子メカニズムについては詳細な解析がなされていないのが現状である。この研究で Whole Human genome DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析の結果、定常状態の hMSC と抑制効果を発揮している hMSC の間で発現量が二倍以上異なる遺伝子を得られてきた。その中には既知の報告でサイトカインに特化したアレイでの解析結果で抑制効果を発揮している MSC で発現が高い遺伝子として同定されてきた IL-6 遺伝子が含まれており、この実験系が上手く動いていることが確認された。よって、この系で得られている候補遺伝子の中に MSC の免疫抑制効果に直接関与している遺伝子が含まれている可能性が高いと考えられる。今後これらの詳細な解析を進め、間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子機構が解明されれば、間葉系幹細胞が組織の修復・再生だけでなく、アロ移植の際、ドナーとレシピエント間の組織不適合性のため起こる拒絶反応 (HVG・GVHD) をその原因である免疫反応を減弱させることで軽減できるツールとして、安全に利用できる評価を行うことが可能になると思われる。

現在 MSC の培養にはウシの血清 (FBS) が入った培地を用いられていることが多い。ウシの血清にはロット差があるだけでなく、異種動物由来の血清タンパク質の混入が移植の際、免疫応答を引き起こしてしまうといった問題点がある。仮にヒトの血清の使用するにしても個体差、肉体的、経済的負担が大きい。より安全で安定した品質の MSC を供給するためにはその培養過程で無血清培地を用いるのが良いと考えられる。今回の結果から、STK2 培地で培養された hMSC は活性化した T 細胞の細胞増殖抑制効果は維持していることが確認できた。しかしながら、サイトカインの量は血清含有の培地で培養した系と異なるパターンを示していた。これは 1) サイトカインの検出に ELISA 法を用いているため、real time でのサイトカインの発現量を反映していないという検出法の問題が関わっている可能性、2) T 細胞の分化 (Th1, Th2, Th17, Treg) のプロファイルが変わっている可能性などが考えられる。今後、各サイトカインおよび各分化マーカーを用いた細胞内染色 FACS や RT-PCR を行い詳細な解析を行う必要があると思われる。

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では動物実験は必須となるが、国際的に動物実験代替法の実践が必要となってきた。このため世界各国における、この問題の考え方の情報収集は必須である。また BSE による生物由来材料の安全性確保には決定的な方法は見出さ

れていないため、ISO 文書を作成して国際協調することが重要となる。今回の研究において ISO 文書に我が国の政策にそった文章を入れることができた。また獲得した情報は国内外学協会にて論文で発表した。

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

細胞組織利用医療機器への使用を意図して hMSC を増殖培養する際使用する培地には、血清が不要であることが望ましい。本研究では、新しい無血清培地 STK2 の hMSC 培養能について従来の血清含有培地との比較を行った。加藤らは、STK2 と DMEM で hMSC の培養を行い、35 日間の培養の結果、STK2 では DMEM に対して 20 倍の細胞が得られたことを報告している。本研究では、4 日間の培養で、STK2 での細胞数は DMEM に対して 2 倍以上という結果が得られた。これは、35 日間に換算すると 20 倍を上回る値であり、加藤らの報告した細胞増加量は十分妥当であると考えられる。

本研究では、骨再生を想定して HAp を混合した培地でも培養を行い、各培地での hMSC 活性の相違を調べた。その結果、HAp を細胞と直接接触させて培養した場合、および HAp 混合培地の上澄みで培養した場合の両者において、STK2 での細胞活性は DMEM・MSCBM を上回る結果が得られた。このことから、STK2 の使用は、HAp に播種した hMSC を *in vitro* で培養するような際にも有効であることが予想される。

HAp 混合培地の上澄みを使用した培養では、HAp 粉末を各ウェルに入れた培養よりも全体的に細胞活性が高い結果が得られた。これは、ウェル底面に HAp 粉末が堆積すること自体による影響、あるいは培地成分の吸着やイオン溶出が両者で異なることによる影響、もしくはその両者によるものであろう。

今回、実験 2 では、TetraColor ONE を細胞活性の測定に使用した。TetraColor ONE は、細胞内での脱水素酵素の働きを利用した試薬であるため、組織工学において混在する材料の存在によって細胞の活性が変化する可能性がある状況では、正しく生細胞数を反映しない可能性がある。今回は細胞の活性も含めた影響を調べるために TetraColor ONE を使用することとした。実験 1 で使用した Crystal Violet 染色法ならば核数に比例した結果が得られるため、細胞活性の影響を受けずに細胞数を定量できる。しかし、HAp が Crystal Violet によって染色される可能性があったため、実験 2 では使用しなかった。ただし、予備的に実験 2 と同様の実験を行った際、TetraColor ONE での測定後に Crystal Violet 法でも測定を行ったが、両者で同様な結果が得られてい

る。

本研究では、HAp を粉末のまま培地に混合して実験を行ったが、HAp の応用では成型して焼成されたものに細胞を播種することになるであろう。焼成前の粉末は吸着性が焼成後よりも強いことが想定されるため、より影響が大きい状態で測定していることになる。今後、焼結した HAp プレート上での細胞増殖・骨分化能を調べることによって、より実使用に近いと考えられる条件下で同様の検討を行う。

今後、hMSC を含む各種細胞での増殖・分化に培地が及ぼす影響について、培地間の比較検討を行っていきたい。

E. 結論

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すること（ただし細胞の増殖能との兼ね合いも考慮する必要があると思われる。）と、*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ことは、*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

ヒト末梢血細胞は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。TLR2 及び TLR4 アゴニストに対して、MM6-CA8 細胞と同等以上の応答性を示した。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。MM6-CA8 細胞とヒト末梢血細胞は貪食作用により活性化されたことから、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、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 が最も優れていることが確認された。

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

同定した間葉系幹細胞の遺伝子マーカーセットは再生医療の安全性及び有効性の検証に有用であると期待できる。

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）

感染リスクの排除や品質管理のための安全性検査のプログラムは、再生医療の安全性及び有効性の検証に有用であると期待できる。

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

われわれは細胞を生体内における溶存酸素濃度により近い条件で培養することを目的とし、低酸素培養システムを開発した。細胞を生体内における溶存酸素濃度により近い条件で培養することは、活性酸素抵抗性の低い細胞種においても *in vitro* 増殖が可能、さらに DNA 変異等の防止等に有用である可能性が考えられる。

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

心筋梗塞急性期における骨格筋筋芽細胞移植において同種他家細胞の有用性を認めず、今後慎重に検討する必要があることが示唆された。

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

細胞を利用した治療に MSC を利用していく上で 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ると思われる。今回、MSC の免疫抑制効果に関わる因子の同定を試み、いくつかの候補遺伝子が得られてきた。今後、これらの遺伝子と免疫反応の関連性を検討し、免疫抑制機構カニズムの解明をめざしたい。ここで得られた結果は、MSC を用いた細胞組織医療機器を作製する際、より適切な細胞を選択する為のよい指標になるだけでなく、移植の際の拒絶反応の軽減に活用できると期待される。

さらに無血清培地による MSC の培養では、その免疫抑制効果は失われないことが確認され、無血清培地の有用性が示された。これらの結果から、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

医療機器の安全性に関する情報収を行うため ISO の会議に参加し、ISO 文書を作成し、その成果を国内外で公表した。

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. STK2 は、血清の使用に由来する問題が生じないだけでなく、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。

2. STK2 は HAp の影響を受けにくく、HAp 存在下でも細胞活性が良好で、HAp に播種した hMSC を培養するような場合でも、血清培地に比べ、STK2 の使用は有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Takashi Yamada, Rumi Sawada and Toshie Tsuchiya, The effect of sulfated hyaluronan on the morphological transformation and activity of cultured human astrocytes. *Biomaterials* accepted 2008
2. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Ryusuke Nakaoka, and Toshie Tsuchiya, Different effects of [60] fullerene brain injection and i.p. injection on the brain monoamine and behavior in the rats., *J. of Nanoscience and Nanotechnology* accepted 2008.
3. Saiffudin Ahmed, Toshie Tsuchiya, Misao Nagahata-Ishiguro, Rumi Sawada, Nasreen Banu and Tsutomu Nagira, Remarkable enhancing action by sulfated hyaluronan on Connexin-26, -32, and -43 gene expressions during the culture of normal human astrocytes, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.
4. Tomomi Ito, Rumi Sawada, Yoko Fujiwara, Toshie Tsuchiya, FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials

of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- β signaling. *Cytotechnology* 2008, 56, 1-7.

5. Takashi Yamada, Duk-Young Jung, Rumi Sawada, Toshie Tsuchiya: Intracerebral microinjection of stannous 2-ethylhexanoate affects dopamine turnover in cerebral cortex and locomotor activity in rats. *Journal of Biomaterial Materials Research: Part B-Applied Biomaterials* accepted 2008
6. Kumada H., Haishima Y., Watanabe K., Hasegawa C., Tsuchiya T., Tanamoto K., Umemoto T., :Biological properties of the native and synthetic lipid A of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Oral Microbiology Immunology* 2008, 23, 60-69.
7. Matsuoka A., Haishima Y., Hasegawa C., Matsuda Y. and Tsuchiya T.: Organic-solvent extraction of model biomaterials for use in the in vitro chromosome aberration test. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, Oct. 16 (2007).
8. 土屋利江、粒子特性評価法及び毒性評価法—in vitro、「ナノ粒子・微粒子の毒性評価研究の動向と暴露対策の現状」技術情報協会、2007 pp371-380
9. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T., FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 1, 108-114.
10. Shigeyuki Wakitani, Masashi Nawata, Amu Kawaguchi, Takahiko Okabe, Kunio Takaoka, Toshie Tsuchiya, Ryusuke Nakaoka, Hiroya Madsuda, and Kyosuke Miyazaki, Serum Keratan sulfate is a promising marker of early articular cartilage breakdown. *Rheumatology* 46:1652-1656, 2007.
11. Masato Tamai, Ryusuke Nakaoka and Toshie Tsuchiya, SO4²⁻-substituted hydroxyapatite enhances in vitro osteogenic property of normal human osteoblasts, *Biomaterials*, ??
12. Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y.* and Tsuchiya, T.: TGF- β gene expression analysis in the human mesenchymal stem cells (hMSCs)-Relation between TGF- β and hMSCs multidifferentiation-, *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, in press
13. Ahmed, S. and Tsuchiya, T, In vitro

- cytotoxic effects of tin compounds on normal human astrocytes, *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, in press
14. Banu, N. and Tsuchiya, T., Effects of tin compounds on human chondrogenic activity in vitro, *Animal cell Technology: Basic & Applied Aspects*, in press
 15. Bayar Hexig, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya, Safety Evaluation of Surgical Materials by Cytotoxicity Test, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, ??
 16. 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、2007、241-244
 17. 土屋利江、再生医療の現状、再生医療品における幹細胞とバイオマテリアル=開発から臨床まで、土屋利江編、培風館、2008、印刷中
 18. 土屋利江、次世代医療機器審査WG平成17年度のまとめと18年度の間接報告、*日本歯科再生医学会誌*、2007、vol. 4、No. 2、132-133
 19. Nakaoka, R. and Tsuchiya, T., The responses of osteoblasts and chondrocytes cultured on an alginate gel modified with nano-patterned cell adhesive peptides, *Proceedings of the 5th International Symposium on Nanotechnology*, 34-35 (2007)
 20. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T., FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359, 1, 108-114.
 21. 澤田留美、伊藤友美、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および安全性評価について、*薬学雑誌*、2007、127、5、851-856
 22. 山口照英、土屋利江、細胞組織利用医薬品・医療機器の安全性とその有用性評価、*薬学雑誌*、2007、127、5、839-840
 23. 土屋利江：細胞組織医療機器開発総論、*薬学雑誌*、127、847-850 (2007)
 24. Banu N, Tsuchiya T, Sawada R., Effects of a biodegradable polymer synthesized with inorganic tin on the chondrogenesis of human articular chondrocytes., *J Biomed Mater Res A*. 2007, 82, 1, 263-264.
 25. 土屋利江、俵木登美子、スペシャル対談日本の医療機器の研究開発と制度の動向、*バイオテクノロジージャーナル*、2007、3-4、198-203
 26. 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.
 27. 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、再生医療技術の最前線、岡野光夫、大和雅之監修、2007、pp241-248.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 山越葉子、中澤憲一、土屋利江、原子間力顕微鏡(AFM)による蛋白質のイメージング、*日本臨床*、2007、二号、270-277
 31. 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 Artif Organs*. 2007;10(1):22-28.
 32. Sawada R., Ito T., and Tsuchiya T. : Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells, *YAKUGAKU ZASSHI*, 127(5), 851-856 (2007)
 33. Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., Seyama Y., and Tsuchiya T. : FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochem Biophys Res Commun.*, 359(1), 108-114 (2007).
 34. Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., and Tsuchiya T. : FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- β signaling, *Cytotechnology*, 56, 1-7 (2008).
 35. Ozaki Y., Nishimura M., Sekiya K., Suehiro F. Kanawa M., Nikawa H., Hamada T., Kato Y. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem

- cells. *Stem Cells and Development*, 2007 Feb;16(1):119-29.
36. Yunokawa M, Tanimoto K, Nakamura H, Nagai N, Kudo Y, Kawamoto T, Kato Y, Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M. Differential regulation of DEC2 among hypoxia-inducible genes in endometrial carcinomas. *Oncol Rep.* 2007 Apr;17(4):871-8.
 37. Fujimoto K., Hamaguchi H., Hashiba T., Nakamura T., Kawamoto T., Sato F., Noshiro M., Uk B., Suardita K., and Kato Y. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements. *International Journal of Molecular Medicine*, 2007 Jun;19(6):925-32.
 38. Fujita T, Iwata T, Shiba H, Igarashi A, Hirata R, Takeda K, Mizuno N, Tsuji K, Kawaguchi H, Kato Y, Kurihara H. Identification of marker genes distinguishing human periodontal ligament cells from human mesenchymal stem cells and human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2007 Jun;42(3):283-6
 39. Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Kubo H, Fujimoto K, Furukawa M, Honma S, Makishima M, Honma K, Kato Y. Multiple mechanisms regulate circadian expression of the gene for cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a), a key enzyme in hepatic bile acid biosynthesis. *J Biol Rhythms.* 2007 Aug;22(4):299-311.
 40. Igarashi A, Segoshi K, Sakai Y, Pan H, Kanawa M, Higashi Y, Sugiyama M, Nakamura K, Kurihara H, Yamaguchi S, Tsuji K, Kawamoto T, Kato Y. Selection of Common Markers for Bone Marrow Stromal Cells from Various Bones Using Real-Time RT-PCR: Effects of Passage Number and Donor Age. *Tissue Eng.* 2007 Oct;13(10):2405-17.
 41. Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Transforming Growth Factor- β Promotes Survival of Mammary Carcinoma Cells through Induction of Antiapoptotic Transcription Factor DEC1. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):9694-703.
 42. 加藤幸夫 軟骨/骨/脂肪/他組織での転写因子 DEC1/DEC2 の役割 *生体の科学* 58 (3), 171-174, 2007.
 43. 加藤幸夫、邵金昌、桂由紀、坂井将典、坂井裕大、久保裕嗣、辻紘一郎 再生医療 現在と未来 (Part2) - 歯科での再生医療の実現と普及への取り組み - *日本歯科技工学会雑誌* 28 (1), 30-33, 2007.
 44. 加藤幸夫、五十嵐晃、清水正和、久保裕嗣 第10章 間葉系幹細胞 3 間葉系幹細胞の特質「バイオテクノロジーシリーズ 再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性」大串始監修 シーエムシー出版 総ページ数 332, 226-236, 2007年6月29日発行
 45. 加藤幸夫、坂井裕大、本田清昌、五十嵐晃、辻紘一郎、西村正宏 間葉系幹細胞の遊走能、癌化リスク、病的変化 *Bio Clinica*, 22(12), 43-49, 2007.
 46. 河本健、加藤幸夫 生体時計に関する転写因子の機能制御とタンパク質間相互作用 *生体の科学*, 58(5), 468-470, 2007.
 47. 中内啓光、加藤幸夫、村上伸也、上田実、水上哲也 特別座談会 再生医療の新たな潮流 - 再生医療に歯科界の活路を見出せるか - *ザ・クインテッセンス* 26(12)別冊, 33-45, 2007.
 48. Individual tissue culture system in a disposable capsule with hypoxic atmosphere, Satoru Kaneko, Kiyoshi Takamatsu, Joji Yoshida, Keisuke Miyaji, Hiromichi Ishikawa, Toru Kawamata, Naoshi Shinozaki, *Ann. Cancer Res. Therap.*, 16: 8-11 2008
 49. Shoko Obora(1), Masaru Tajima(1), Tomomitsu Miyoshi(2), Hajime Swai(2), Tsutomu Kurosawa(1). The Depth of Ketamine Based Anesthesia Evaluated by Visual Evoked Potential in Mice The 19th Annual Meeting of JSAAE, AATEX II (Supplement). JSAAE (Japanese Society for alternative to Animal Experiments) Vol. 11 Supplement March 31 2006
 50. 黒澤努、麻薬を含む麻酔薬の管理と使用、*獣医畜産新報* 60(8):646-652, 2007
 51. 黒澤努、獣医学的管理、麻酔、安楽死処分は科学者の自主規制か、法的な規制か *実験動物と環境* 15(2):126-133, 2007
- 2) 学会発表
 1. 土屋利江 「再生医療の支援技術・基盤技術の概要」 第7回日本再生医療学会 (2008.3)
 2. 脇谷滋之、川口杏夢、徳原善雄、福永健治、今井祐記、高岡邦夫、増田茂樹、富田直秀、堤 定美、土屋利江 「軟骨修復の評価技術の検討」 日本再生医療学会総会 (2008.3)
 3. 藤井妙恵、江副幸子、松山章文、東谷賢児、長尾杏奈、武田香里、高岡文、大石晴樹、名井陽、土屋利江、澤芳樹 「細胞・組織治療におけるエンドトキシン測定法の有用性」 再生医療学

- 会 (2007.11)
4. 土屋利江 「細胞治療等の安全性検証システム」第 80 回日本整形外科学会総会 (2007.5)
 5. 伊藤友実、澤田留美、藤原葉子、土屋利江「ヒト間葉系幹細胞において低酸素培養は p21 を介して酸化ストレスを減少させる」第 10 回日本組織工学会 (2007. 11)
 6. 澤田留美、土屋利江「幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器の安全性評価に関する研究」第 7 回日本再生医療学会 (2008. 3)
 7. 石川格、澤田留美、加藤幸夫、辻紘一郎、邵金昌、山田貴史、佐藤道夫、土屋利江「新規無血清培地 STK2 におけるヒト間葉系幹細胞の増殖能評価」第 7 回日本再生医療学会 (2008. 3)
 8. 齋島由二、長谷川千恵、岡野理紗、村松知明、村井敏美、中川ゆかり、土屋利江. ヒト細胞を使用した新規 *in vitro* 発熱性物質試験法の有用性評価. 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007 年 11 月・大阪).
 9. 齋島由二、長谷川千恵、小園 知、佐々木和夫、中川ゆかり、村井敏美、土屋利江. エンドトキシン汚染と生物学的安全性：規格値の設定と定量法について. 平成 19 年度厚生科学研究成果発表会 (2008 年 2 月・東京).
 10. 田井雅子、辻紘一郎、加来真人、當麻愉衣子、坂井裕大、河田俊嗣、加藤幸夫、丹根一夫. ラット頭蓋骨欠損における骨髄由来間葉系幹細胞の骨再生誘導能. 第 31 回日本口蓋裂学会・学術集会：平成 19 年 5 月 24 日～25 日
 11. 坂井将典、邵金昌、桂由紀、パワール ウジャール、加藤幸夫、辻紘一郎：間葉系幹細胞を用いた再生療法による骨粗鬆症治療の可能性：第 54 回日本実験動物学会総会：平成 19 年 5 月 23 日
 12. 坂井裕大、瀬越和美、金輪真佐美、久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫：滑膜由来間葉系幹細胞の特徴：中四国骨代謝研究会：平成 19 年 7 月 7 日
 13. 久保裕嗣、五十嵐晃、河本健、清水正和、辻紘一郎、加藤幸夫：間葉系幹細胞 (MSC) の分化過程における遺伝子の変動～ECM に対する考察も含めて～ 第 28 回日本炎症・再生医学会：平成 19 年 7 月 17 日～18 日
 14. 坂井宣之、武田克浩、河野秀之、柴 秀樹、河口浩之、辻紘一郎、栗原英見：脳由来神経栄養因子 (BDNF) とヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発：第 46 回広島県歯科医学会 併催：第 91 回広島大学歯学会：平成 19 年 10 月 21 日
 15. 坂井将典、原真依子、桂由紀、中村大吉、山縣敏彦、森下強、竹田美佳加藤幸夫、辻紘一郎：間葉系幹細胞 (MSC) のための自動培養装置「ゆりかご」の開発・改良：第 10 回日本組織工学会：平成 19 年 11 月 8 日～9 日
 16. 金輪真佐美：間葉系幹細胞 (MSC) の特長を示す遺伝子群の同定：広島中央サイエンスパーク研究公開フォーラム：平成 19 年 12 月 20 日
 17. 辻紘一郎：火傷・褥瘡など皮膚再生治療材 (Graft-Aid) の開発：平成 19 年度第 2 回医療・福祉機器研究交流会：平成 19 年 12 月 20 日
 18. 石川格、澤田留美、加藤幸夫、辻紘一郎、土屋利江：感染リスクの低い無血清培地によるヒト間葉系幹細胞増殖能：平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 医療機器・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究：平成 20 年 2 月 7 日
 19. 辻紘一郎：間葉系幹細胞を用いた治療の事業化：平成 19 年度山口大学大学院応用分子生命科学産学公連携セミナー「再生医療の実用化への展開、産学公の取り組み」：平成 20 年 3 月 1 日：宇部全日空ホテル (国際会議場)
 20. Takahashi TA. Mesenchymal stem cell derived from human placenta and cord blood. 2nd Korea Mesenchymal Stem Cell Symposium Nov..2007 Seoul, Korea.
 21. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, and Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. March 2007, Brescia, Italy.
 22. Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Bai Y, Mitsuru A, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A, and Takahashi TA. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. March 2007, Brescia, Italy.
 23. 張曉紅、平井雅子、伊倉宏一、高橋恒夫. ALDEFLUOR Kit による臍帯血の造血幹、前駆細胞の同定. 第 29 回日本造血細胞移植学会総会, p173 2007

24. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, and Strom SC. Isolation and characterization of cell from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cell. Stem Cell. Online, Nov. 8, 2007.
25. 加藤玲子、土屋利江 「間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC)の免疫調節に関わる因子の解析」 第7回日本再生医療学会 (2008. 3)
26. 石川 格, 澤田 留美, 加藤 幸夫, 辻 紘一郎, 邵 金昌, 山田 貴史, 松岡 厚子, 土屋 利江. 新規無血清培地 STK2 におけるヒト間葉系幹細胞の増殖能評価. 第7回日本再生医療学会総会, 名古屋, 2008年3月.
- 月27日:出願人:広島大学、ツーセル、クリオカプス
6. 加藤幸夫、西村正宏、関谷健祐、久保裕嗣、辻紘一郎:骨分化状態を測定する組成物および骨分化を調整する組成物:特願:2007-120305 :出願日:平成19年6月29日:出願人:広島大学、ツーセル
7. 加藤幸夫、河本健、中島歩、辻紘一郎:低酸素応答を制御する物質のスクリーニング方法及び低酸素応答を制御する医薬組成物:特願:2007-173127:出願日:平成19年6月29日:出願人:広島大学、ツーセル
8. 加藤幸夫、邵金昌、桂由紀、辻紘一郎:動物細胞を無血清培養するための培地用添加剤、キット及びこれらの利用:PCT出願:PCT/JP2007/050232:出願日:平成19年1月11日:出願人:科学技術振興機構、ツーセル
9. 加藤幸夫、金輪真佐美、五十嵐晃、原真依子:間葉系幹細胞の均質性識別方法、および、その方法を利用して単離された均質な間葉系幹細胞:PCT出願:PCT/JP2007/054869:出願日:平成19年3月12日:出願人:広島大学、ツーセル
10. 二川浩樹、西村正宏、辻紘一郎、廣本延枝、川端涼子:抗菌性ペプチドを用いた細胞増殖促進剤及び該細胞増殖促進剤を含有する無血清培地を用いる細胞増殖促進方法:PCT出願:PCT/JP2007/73912:出願日:平成19年2月12日:出願人:科学技術振興機構、広島大学、ツーセル

H. 知的財産の出願・登録状況

1). 特許出願

1. 加藤幸夫、河本健、上嶋太一、能城光秀、後藤修:軟骨・骨概日リズム遺伝子および時計モチーフ
(出願番号:特願2007-48189号、2007)
(出願人:広島大学、(株)ツーセル)
出願日:平成19年2月27日
2. 加藤幸夫、西村正宏、関谷健祐、久保裕嗣、辻紘一郎:骨分化状態を測定する組成物および骨分化を調整する組成物
(出願番号:特願2007-120305号、2007)
(出願人:広島大学、(株)ツーセル)
出願日:平成19年4月27日
3. 加藤幸夫、河本健、中島歩、辻紘一郎:低酸素応答を制御する物質のスクリーニング方法及び低酸素応答を制御する医薬組成物
(出願番号:特願2007-173127号、2007)
(出願人:広島大学、(株)ツーセル)
出願日:平成19年6月29日
4. 二川浩樹、西村正宏、辻紘一郎、廣本延枝、川端涼子:抗菌性ペプチドを用いた細胞増殖促進剤及び該足棒増殖促進剤を含有する無血清培地を用いる細胞増殖促進方法:特願:2007-33318 :出願日:平成19年2月14日:出願人:科学技術新興機構、広島大学、ツーセル
5. 西村正宏、辻紘一郎、梶尾信治:生体再生カプセル:特願:2007-048174 :出願日:平成19年2

表1. Donor information of hMSCs

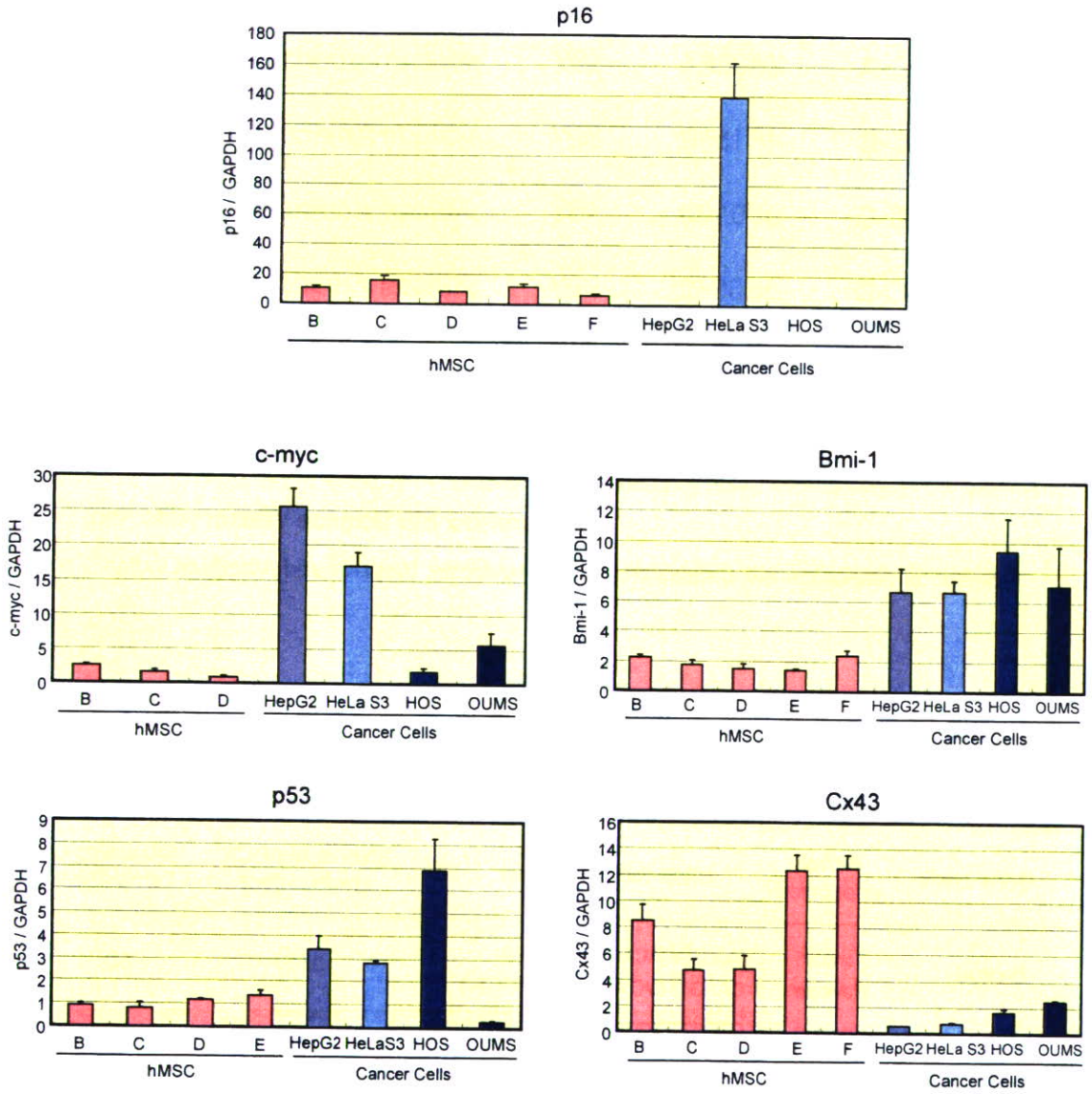
	Lot No.	Age	Race	Sex
hMSC-A	3F0664	19Y	African American	F
hMSC-B	4F1560	23Y	African American	F
hMSC-C	5F0138	19Y	African American	M
hMSC-D	5F0972	20Y	African American	M
hMSC-E	4F0218	21Y	Other*	M
hMSC-F	4F0312	27Y	African American	F

Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.

*Except for Asian/Oriental, Caucasian, African American, Hispanic and American Indian

表2. リアルタイム(RT)-PCRに用いたプライマーの配列とアニーリング温度

Gene name	Primer orientation	Nucleotide sequence	Size for the PCR amplicon(bp)	Annealing Temp (°C)
c-myc	Forward	5'-GCGAACACACAACGTC-3'	315	50
	Reverse	5'-CAAGTTCATAGGTGATTGCT-3'		
Bmi-1	Forward	5'-CTGATGTGTGTGCTTTGTGGAG-3'	149	65
	Reverse	5'-GGTCTGGTCTTGTGAACCTGGA-3'		
Cx43	Forward	5'-GGGCTAATTACAGTGCAG-3'	126	62
	Reverse	5'-CATGTCCAGCAGCTAGTT-3'		
p16	Forward	5'-CACTCACGCCCTAAGC-3'	138	60
	Reverse	5'-GCAGTGTGACTCAAGAGAA-3'		
PTEN	Forward	5'-GTTGCACAATATCCTTTTGAAGACC-3'	138	62
	Reverse	5'-CATTACACCAGTTCGTCCCTTTC-3'		
STAT5B	Forward	5'-CGTGAAGCCTGGAAGTTGG-3'	150	62
	Reverse	5'-GCACATGTGCTTTCTCCTCCCTT-3'		



☒ 1. The mRNA expressions of p16, c-myc, Bmi-1, p53 and Cx43 in hMSCs and cancer cells

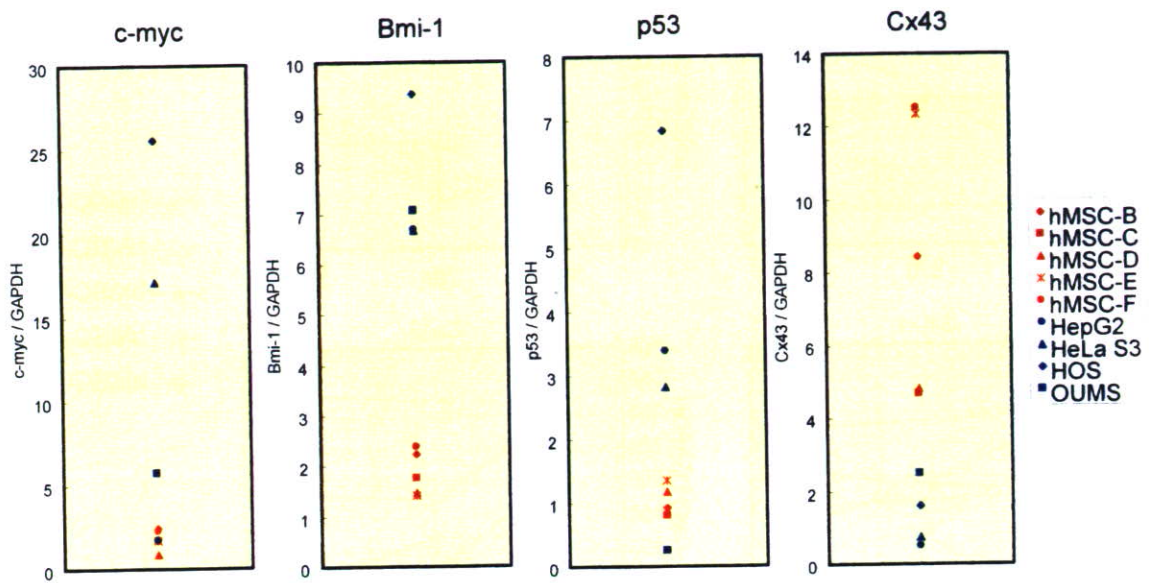


図2. The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, p53 and Cx43 in hMSCs and cancer cells

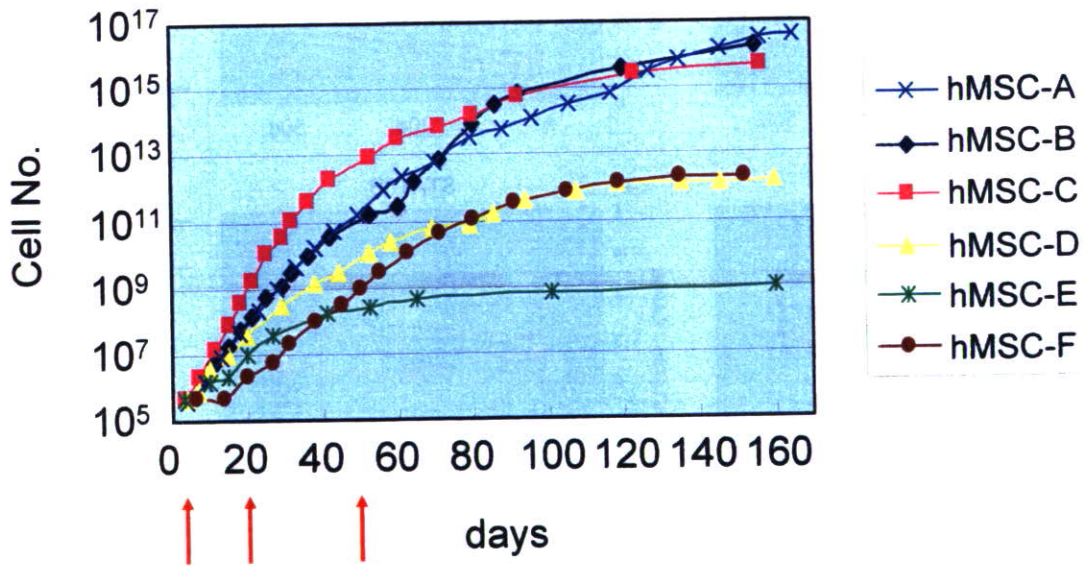


図3. hMSC growth curves

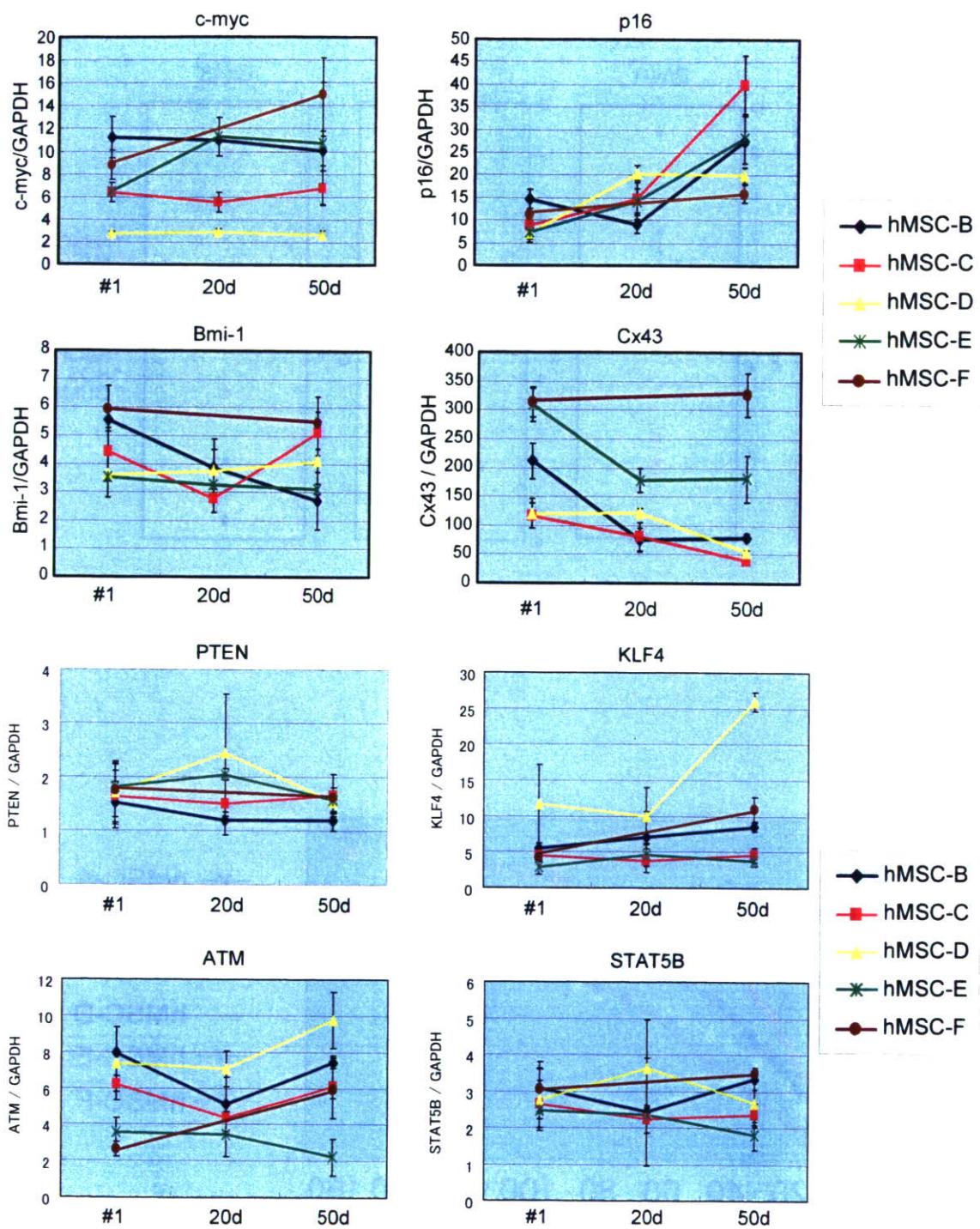


図 4. The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, PTEN, ATM, p16, Cx43, KLF4, and STAT5B in hMSCs

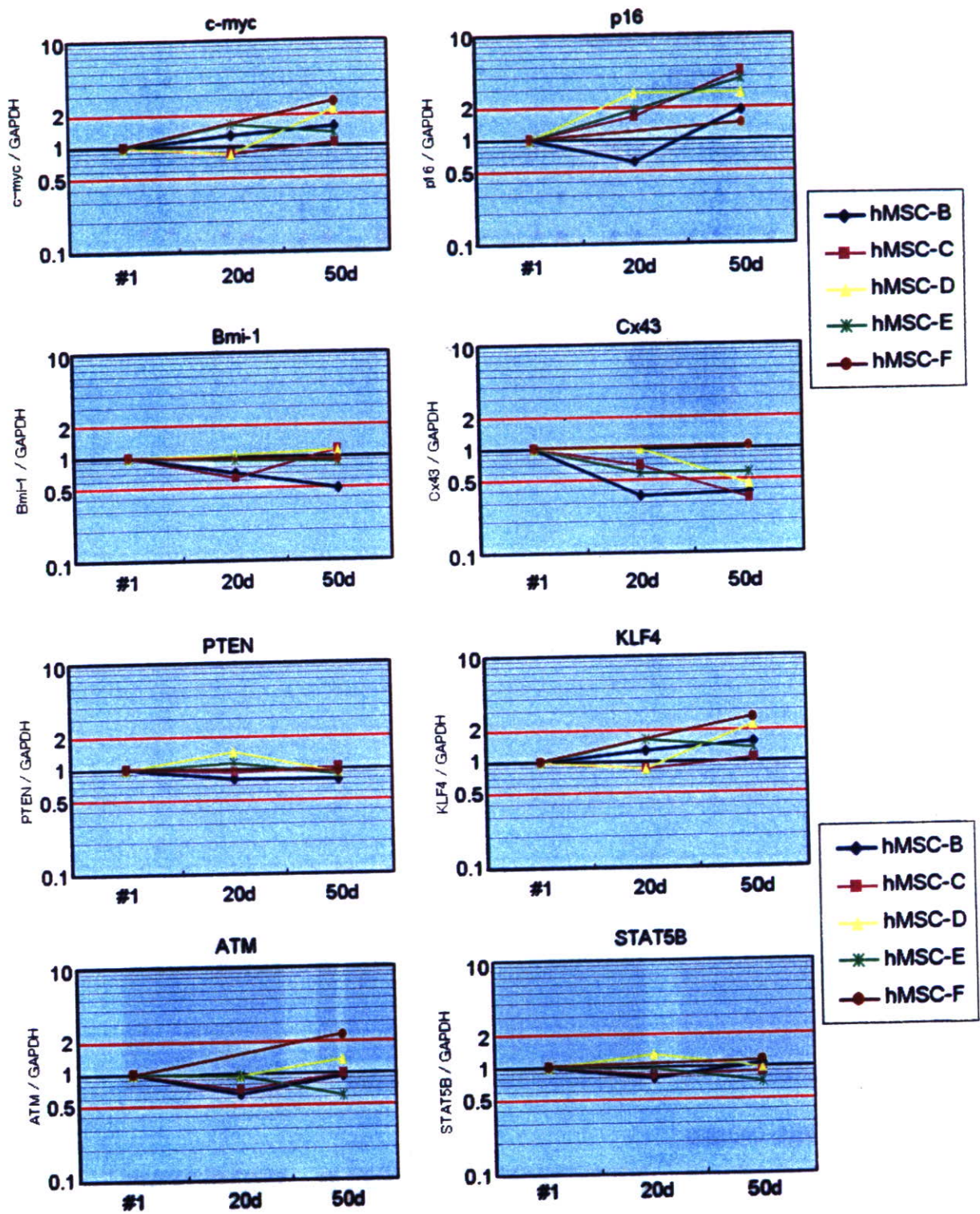


図 5. The changes of the mRNA expressions in hMSCs

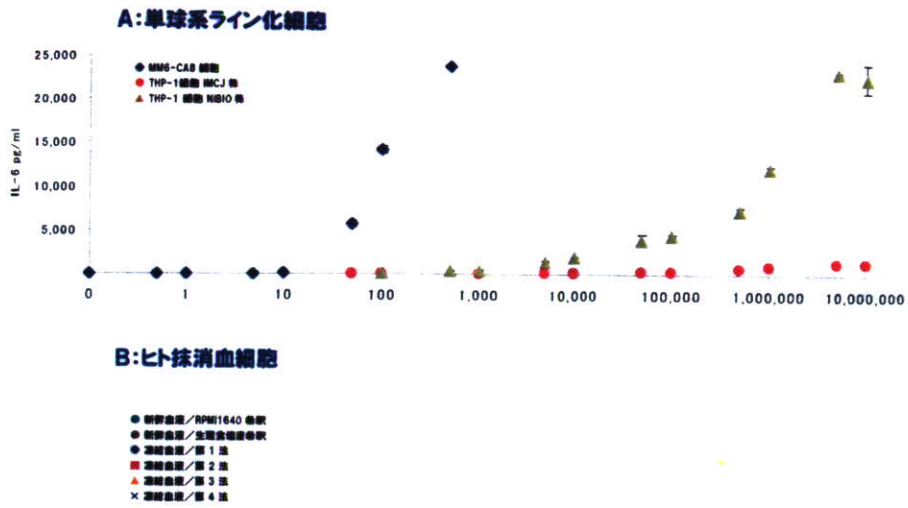


図6. MM6-CA8 細胞、THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞の LPS 応答性
A: 単球系ライン化細胞. B: ヒト末梢血細胞.

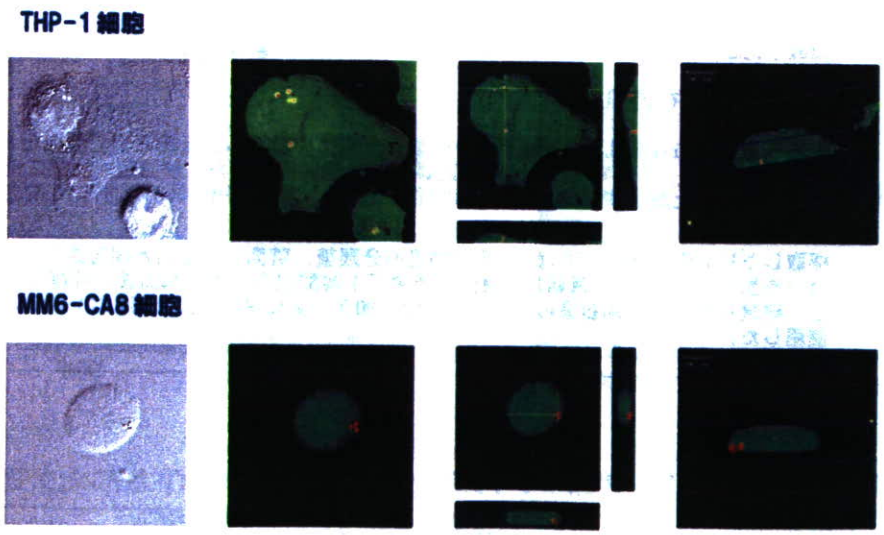


図7. THP-1 細胞及びMM6-CA8 細胞の Micro Sphere 貪食機能評価

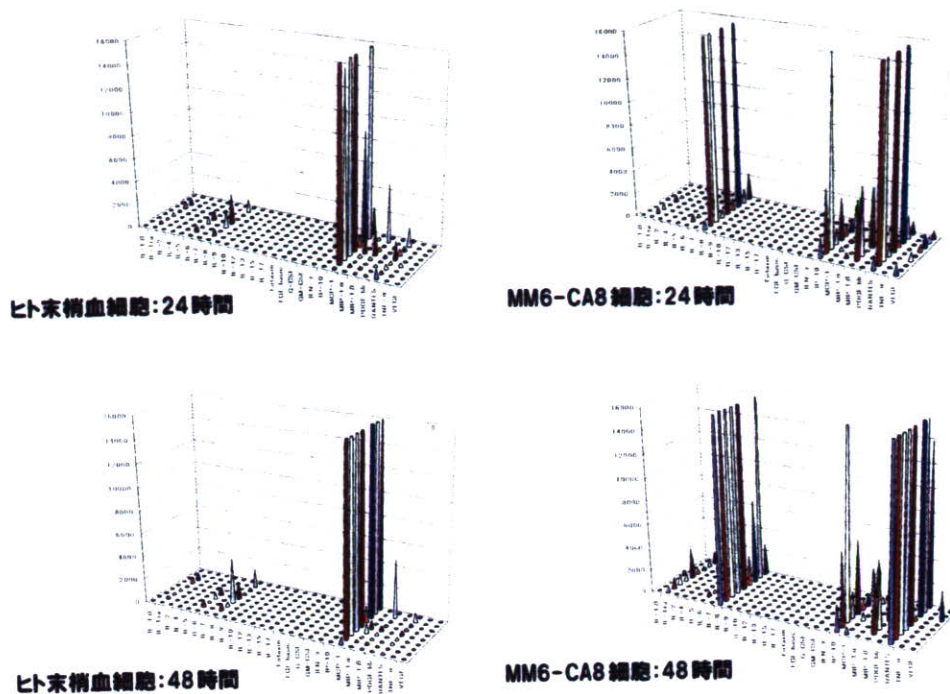


図8. Bio-Plex による発熱マーカーの一斉解析 (サイトカイン・ケモカインの発現パターン)

表8. 凍結ヒト血液の調製方法

方法番号	試験用血液の調製手順
第1法	採取したヒト血液を-80℃で凍結し、液体窒素中で1週間保存した後、解冻し、RPMI1640培地で10倍希釈して使用した。
第2法	採取したヒト血液を3,000 rpmで5分間遠心分離後、破棄した上清と同容量のセルバンカーを加えて、-80℃で凍結し、液体窒素中で1週間保存した後、解冻し、RPMI1640培地で10倍希釈して使用した。
第3法	採取したヒト血液を3,000 rpmで5分間遠心分離後、破棄した上清と同容量のセルバンカーを加えて、-80℃で凍結し、液体窒素中で1週間保存した。解冻後、同様に遠心分離し、破棄した上清と同容量のRPMI1640培地を加え、更にRPMI1640培地で10倍希釈して使用した。
第4法	採取したヒト血液を3,000 rpmで5分間遠心分離後、破棄した上清と同容量のセルバンカーを加えて、-80℃で凍結し、液体窒素中で1週間保存した。解冻後、同様に遠心分離し、破棄した上清と同容量のウシ胎児血清を加え、更にRPMI1640培地で10倍希釈して使用した。

表4. Bio-Plex Human 27-Plex アレイシステムで測定できるサイトカインとケモカイン

測定項目	IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-bb, RANTES, TNF- α , VEGF
------	---

表5. LPS 以外の TLR アゴニストに対する応答性評価

TLR リガンド	TLR	LPS 含量 (EU/mg)	濃度 (µg/ml)	IL-6 産生量 (pg/ml)		
				MM6-CA8	THP-1	ヒト末梢血細胞
大腸菌 乾燥菌体	TLR2/1, 2/6, 4, 5, 9	150 x 10 ³	0	34.0 ± 0.4	9.30 ± 3.8	nd
			0.0005	44.5 ± 1.3	12.8 ± 4.5	nt
			0.001	51.3 ± 3.5	14.2 ± 6.4	450.3 ± 11.5
			0.005	280 ± 19	84.1 ± 13	3818.0 ± 236.2
			0.01	1513 ± 13	137 ± 87	7119.0 ± 12.7
			0.05	13375 ± 537	560 ± 4.5	nt
黄色ブドウ球菌 乾燥菌体	TLR2/1, 2/6, 9	0.48	0	34.0 ± 0.4	9.30 ± 3.8	nt
			0.005	40.8 ± 2.8	9.80 ± 0.7	nt
			0.01	70.5 ± 0.6	11.1 ± 1.8	nd
			0.05	78.6 ± 2.1	11.8 ± 2.4	45.9 ± 2.3
			0.1	219 ± 7.1	12.8 ± 1.1	85.8 ± 5.9
			0.5	600 ± 24	22.4 ± 1.1	1883.5 ± 217.1
合標り家鼠白質 (Pam)	TLR2/1	1.80	0	1.5 ± 0.5	7.20 ± 0.2	nt
			0.1	468 ± 3.5	1395 ± 52	358.4 ± 34.9
			1	6189 ± 89.8	nt	1140.0 ± 124.5
			10	23735 ± 516	2800 ± 149	2615.0 ± 487.9
			100	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7	nt
			1000	25.9 ± 0.13	nt	nt
Poly (I:C)	TLR3	0.04	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7	nt
			1	25.9 ± 0.13	nt	nt
			10	29.5 ± 0.08	23.3 ± 4.8	nt
			100	29.0 ± 0.15	>500	153.9 ± 13.9
R837	TLR7	nd ¹⁾	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7	nt
			0.1	21.7 ± 0.05	nt	nt
			1	24.5 ± 0.15	nt	nt
			10	22.7 ± 0.03	11.4 ± 4.5	2520.0 ± 1688.8
大腸菌 DNA	TLR9	3.44	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7	nt
			0.1	27.2 ± 0.17	nt	nt
			1	16.7 ± 0.02	nt	nt
			10	17.7 ± 0.09	11.9 ± 2.5	63.9 ± 38.8

¹⁾EndoTrap 検出限界。 ²⁾nd, not detect. ³⁾nt, not tested.

表6. MM6-CA8 細胞の Bio-Plex 解析における発熱マーカーの S/N 比

TLR ligand	TLR ligand conc. (ng/ml)	S/N ratio for the detection of induced-cytokine (sample/control)									
		IL-1β	IL-1ra	IL-6	IL-8	IFN-γ	MCP-1	MIP-1α	MIP-1β	RANTES	TNF-α
LPS	0.05	14.66	3.58	167.97	>25.62	10.29	2.80	108.37	>76.71	>15.47	21.69
E. Coli O111	10	7.32	3.41	83.16	>25.62	7.14	6.75	33.89	>76.71	>15.47	6.02
209P	100	0.93	0.91	1.29	0.88	0.85	0.95	1.01	1.29	0.79	0.58
Pam	1000	45.13	4.07	995.60	>25.62	20.12	3.60	>426.41	>76.71	15.47	33.89
Poly I:c	100000	1.25	1.58	0.80	1.37	0.90	0.84	1.38	0.91	0.58	0.45
R837	10000	1.47	0.67	1.77	>25.62	1.34	0.27	1.54	2.52	>15.47	0.86
E. Coli DNA	10000	1.33	0.90	3.23	1.58	1.00	1.06	1.25	4.39	1.68	0.97
Micro Sphere	10000	1.19	0.87	3.41	3.09	1.19	0.96	1.07	4.80	0.98	0.93

産生量 : IL-8, RANTES >> MIP-1β, IL-6, IL-1ra, MCP-1, MIP-1α > IL-1β, TNF-α, IFN-γ

表7. ヒト末梢血細胞の Bio-Plex 解析における発熱マーカーの S/N 比

TLR ligand	TLR ligand conc. (ng/ml)	S/N ratio for the detection of induced-cytokine (sample/control)								
		IL-1β	IL-1ra	IL-6	IL-8	IFN-γ	MCP-1	MIP-1α	MIP-1β	TNF-α
LPS	0.1	605.67	5.56	>517.28	40.85	14.42	>124.97	263.87	21.04	68.67
E. Coli O111	5	199.17	3.89	>120.69	11.35	6.07	90.40	76.29	11.94	18.97
209P	500	1114.17	6.20	>583.56	103.05	18.03	>124.97	260.40	20.26	231.21
Pam	1000	243.00	3.93	>801.13	200.13	13.12	>124.97	1508.13	216.16	21.12
Poly I:c	100000	90.67	12.92	>75.61	1.90	6.28	5.22	28.44	24.87	12.29
R837	10000	380.33	13.17	>157.55	15.11	7.07	55.17	83.34	12.72	15.94
E. Coli DNA	10000	35.50	1.87	>70.37	88.16	3.20	>124.97	208.86	216.12	22.87
Micro Sphere	10000	81.00	1.89	>47.71	8.14	2.92	13.93	32.35	8.75	8.67

産生量 : MCP-1 >> IL-6, IL-8, MIP-1αβ, IL-1ra > IL-1β, TNF-α, IFN-γ

図9: MSCの免疫抑制効果に関与する分子の探索

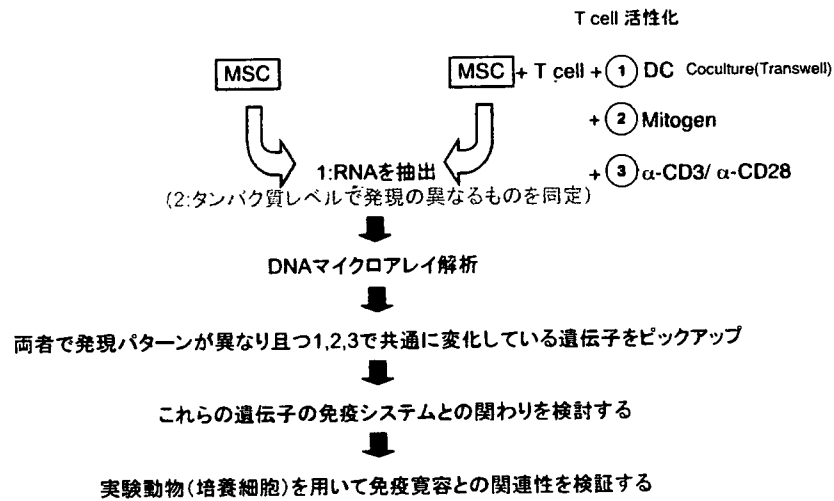
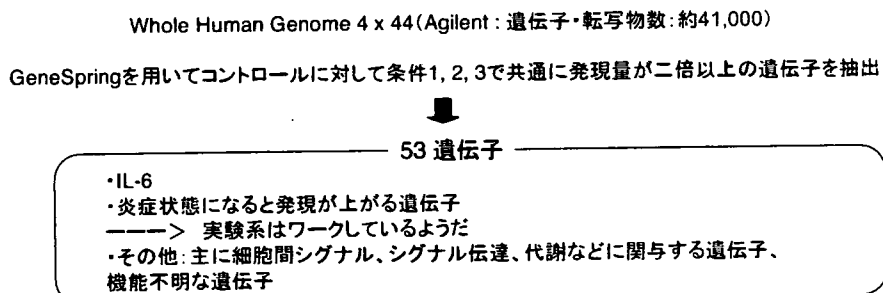


図10: DNAマイクロアレイ解析(途中経過)



参考:
Stem Cell 2007, 25; 2025-32
Primary human MSC
MLR: mouse splenocytes
Human Cytokine/Receptor Atlas Nylon cDNA Expression Array
(BD Biosciences)
Upregulated gene: IL-6 precursor, VEGF B precursor, IL-2Rγ

今後、得られたデータの詳細な解析を行い免疫抑制機能との関連性を明らかにする

図11: 活性化T細胞へのhMSCの影響
 - MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
 proliferation

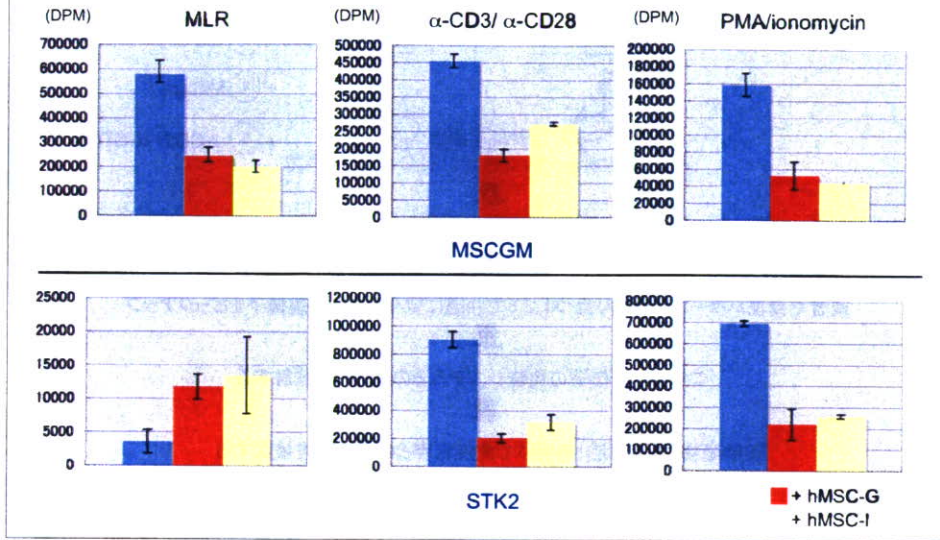


図12: 活性化T細胞へのhMSCの影響
 - MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -

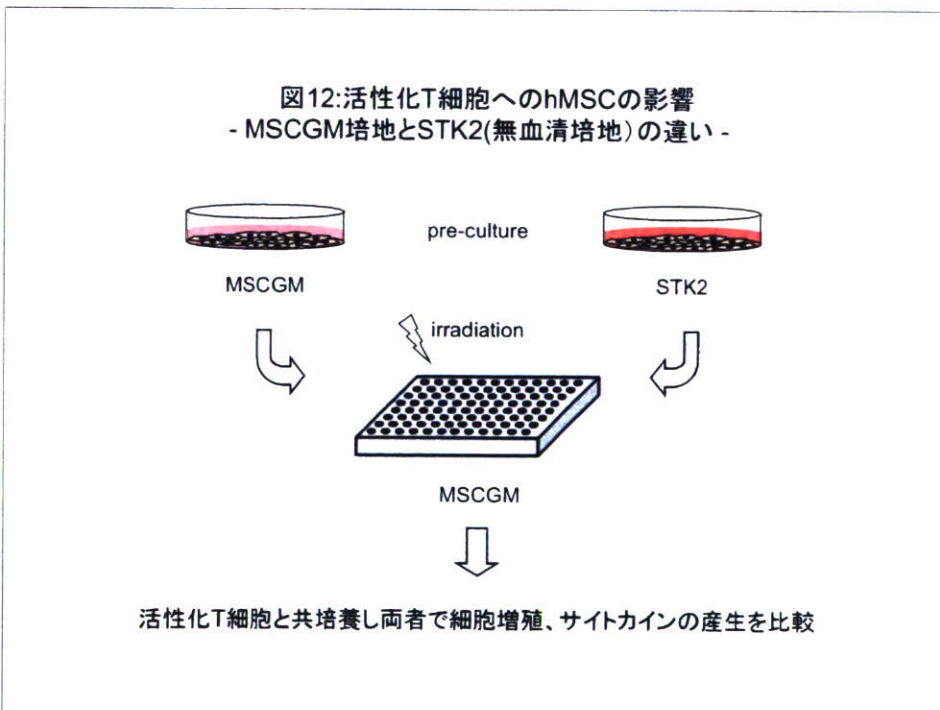


図13:活性化T細胞へのhMSCの影響
- MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
proliferation

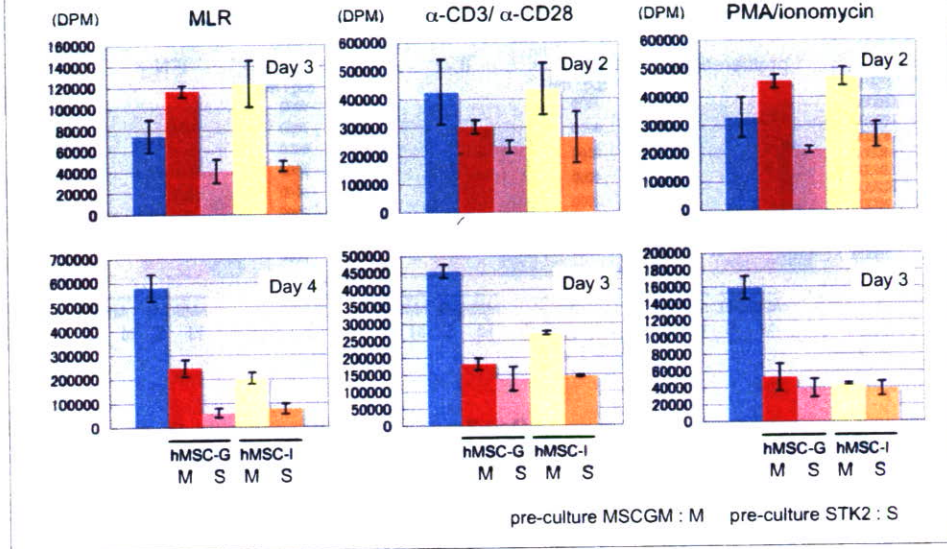


図14:活性化T細胞へのhMSCの影響
- MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
アロ反応 (MLR)

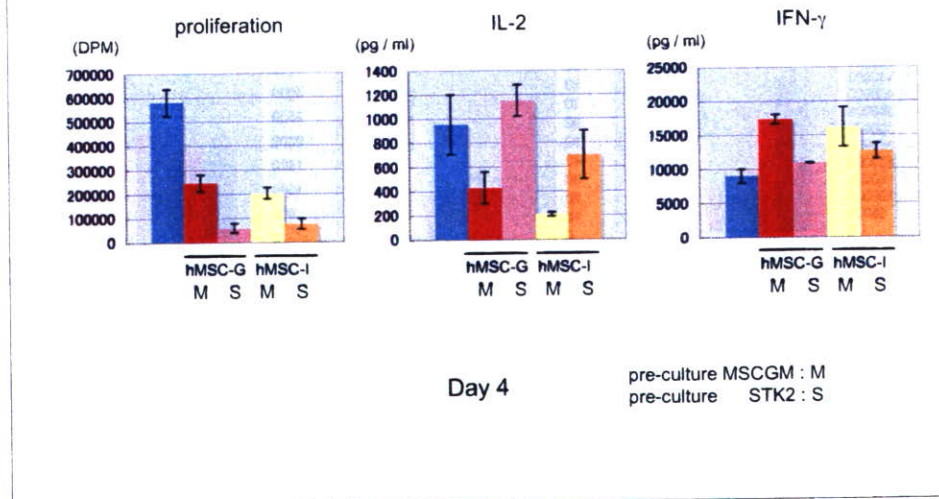


図15:活性化T細胞へのhMSCの影響
 - MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
 PMA/ ionomycin

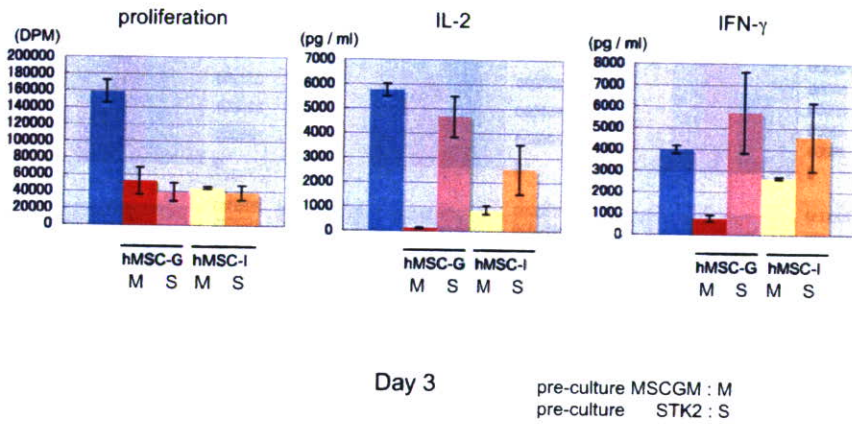
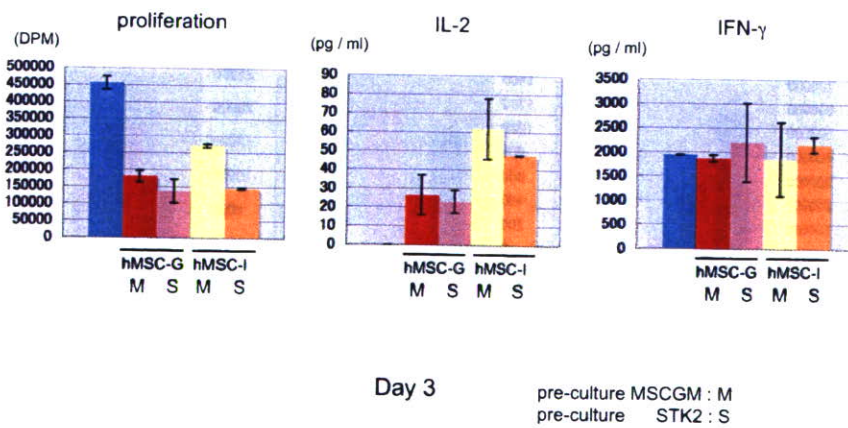


図16:活性化T細胞へのhMSCの影響
 - MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
 anti-CD3/anti-CD28



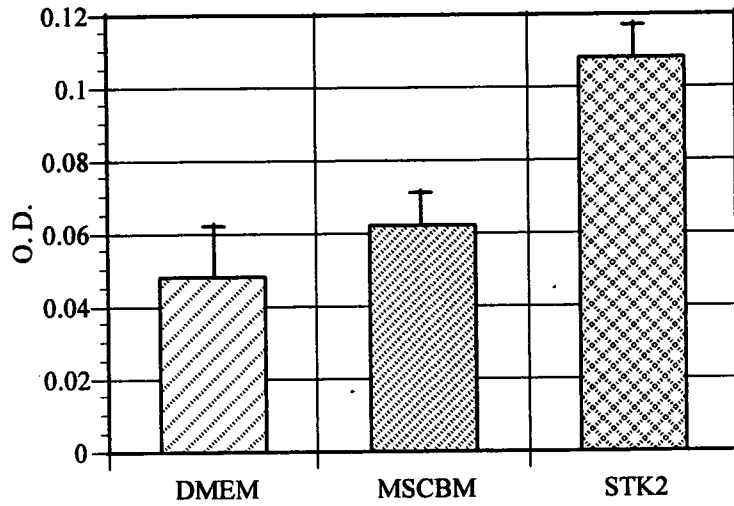


図 17 培地間での hMSC 増殖の比較. Crystal Violet 染色法による測定結果.

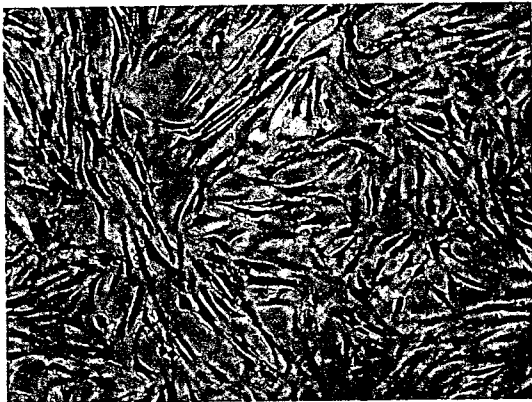


図 18(a) DMEM .



図 18(b) MSCBM .

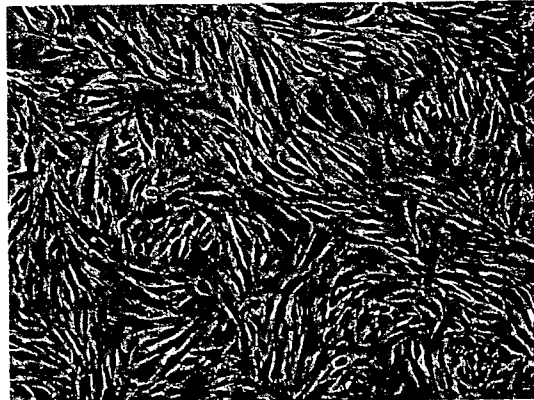


図 18(c) STK2 .

図 18 各培地で培養中の hMSC の位相差像 (培養 4 日目)