

図 19 HAp と細胞を直接接触させて培養した際の細胞増殖・活性比較.

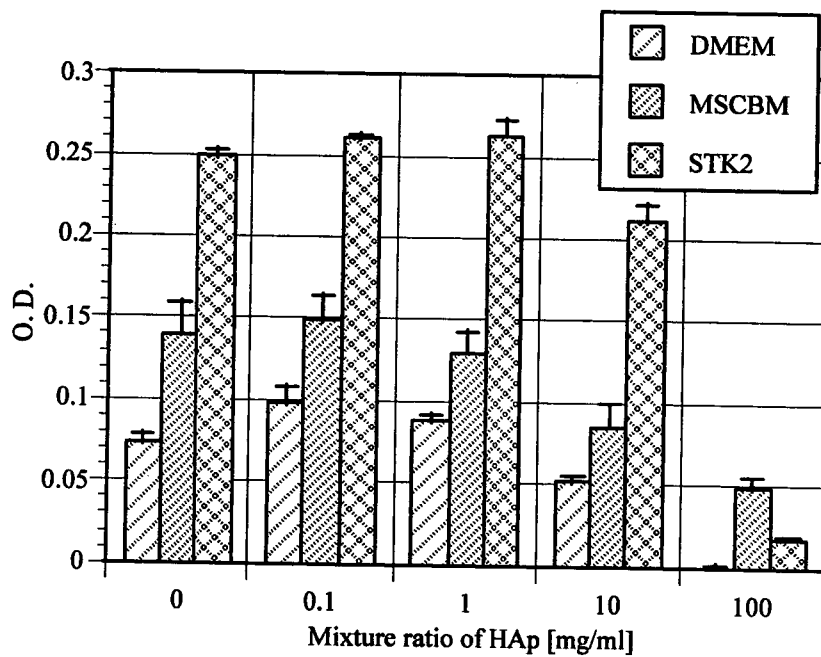


図 20 HAp 混合培地の上澄みで培養した際の細胞増殖・活性比較.

## 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—

澤田留美

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—

分担研究者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所療品部

### 研究要旨

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幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であると思われる。特に細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であろう。そこで本研究では、幹細胞におけるいくつかの(数個の)遺伝子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。

#### A. 研究目的

「再生医療」の実現を目指して、細胞組織利用医療機器の研究開発が現在盛んに行われている。その材料となる細胞として、胚性幹細胞(ES細胞)は全能性を持つためにその期待は大きいものの、受精卵を用いることによる倫理的問題やテラトーマ形成など安全性の問題からこれまでのところ実用化には至っていない。一方で、最近、新たな万能細胞である「人工多能性幹細胞(iPS細胞)」がヒトの自己の皮膚細胞から樹立されたことが報告され脚光を浴びている。今まさにその実用化に向けて国を挙げての取り組みが始まっている。その有効性はもちろん安全性についての検討が必要となってくるで

あろうが、この iPS 細胞の樹立をきっかけに今後ますます「再生医療」への期待が高まる事は必至であろう。

このような背景の中、成体幹細胞の一種である間葉系幹細胞は、ES細胞のような倫理的問題がなく、また、骨、軟骨、脂肪、筋肉、さらには神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も報告されているため幅広い再生医療分野での利用が期待されている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術及び *in vitro* での培養技術も確立されている。それぞれの由来による細胞の性質の違いなども示されつつあり、間葉系幹細胞は細胞組織利用医療機器の材料として現段階で最も実用に近い

ものの一つであると考えられる。

しかしその反面、幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞であるため、正常細胞でありながら増殖能力を持つという点で癌細胞と共通の性質を持つともいえる。このため、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幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であると思われる。特に細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であろう。

本研究の最終目的としては、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。そこで昨年度までに下記のような検討を行ってきた。まず、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ろうとの見解を得た。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 発現に変化のなかった遺伝子を抽出し、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。

今年度も引き続き 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。

## B. 研究方法

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; 日水製薬(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、Affimetrix 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。

### C. 研究結果

#### 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 *in vitro* 培養開始後最初の継代時 (#1)、培養期間 20days 及び 50days の各 3 点の培養期間サンプル計 12 サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。そして、4 ドナー由来の hMSC 全てに共通して、*in vitro* 培養期間 (~50 日) 中に mRNA 発現レベルの変化がなかった遺伝子を抽出することにした。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) を用いて抽出したところ、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 5 ドナー由来の hMSC (hMSC-B~F) のそれぞれの培養期間における 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 (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)。

#### D. 考察

骨髓由来間葉系幹細胞を細胞組織利用医療機器に利用するためには幹細胞を生

体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならない。そのため、*in vitro* での培養期間中の幹細胞の安全性の確保についての検討は大変重要であると思われる。

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。

#### E. 結論

本研究では、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きた。最終年度である今年度は、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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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)

2) 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).

3) 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- $\beta$  signaling, *Cytotechnology*, 56, 1-7 (2008).

##### 2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

表1. Donor information of hMSCs

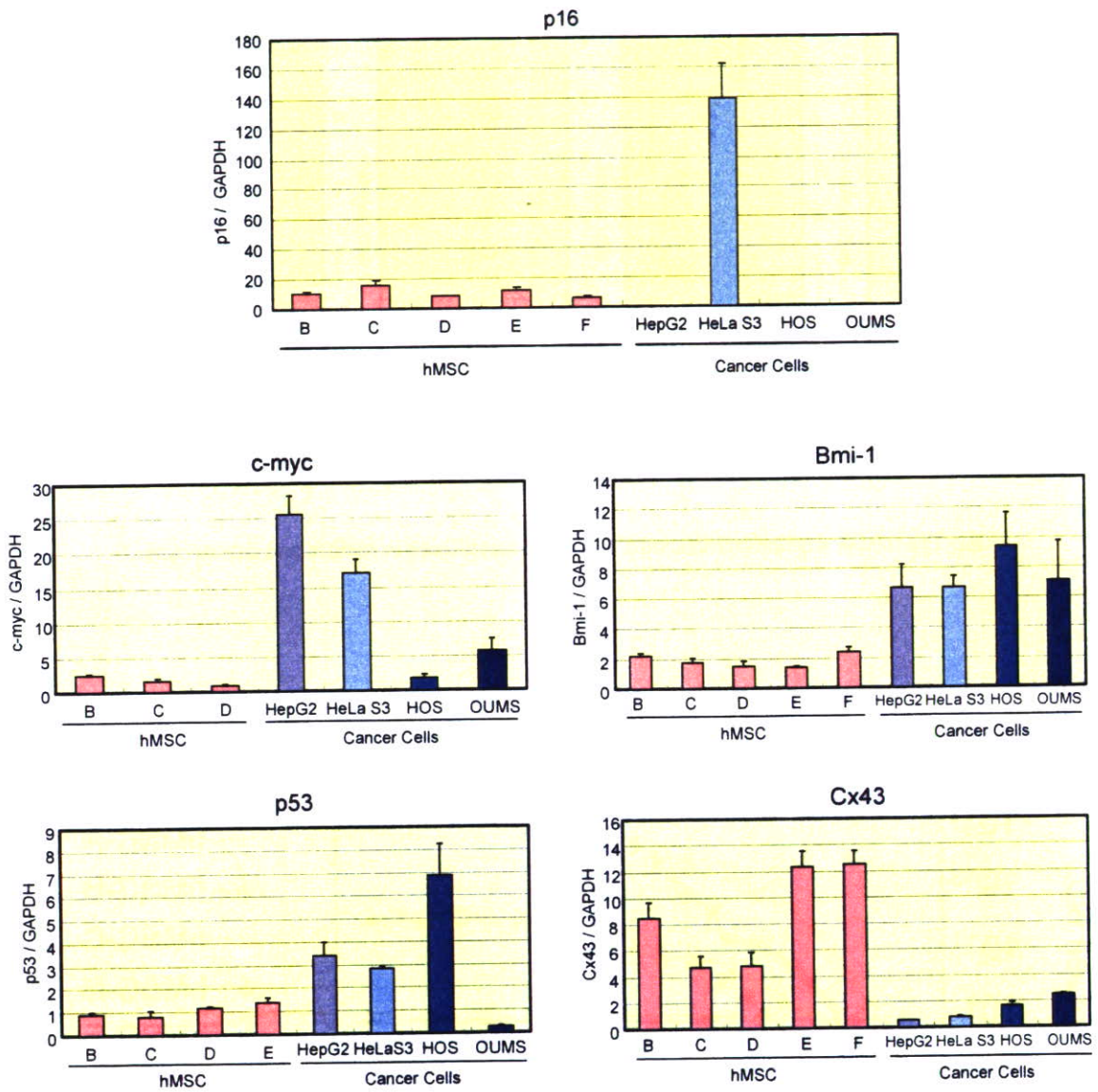
	Lot No.	Age	Race	Sex
hMSC-A	3F0664	19Y	African American	F
hMSC-B	4F1560	23Y	African American	F
hMSC-C	5F0138	19Y	African American	M
hMSC-D	5F0972	20Y	African American	M
hMSC-E	4F0218	21Y	Other*	M
hMSC-F	4F0312	27Y	African American	F

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'-CATTACACCAGTTCGTCCTTTC-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

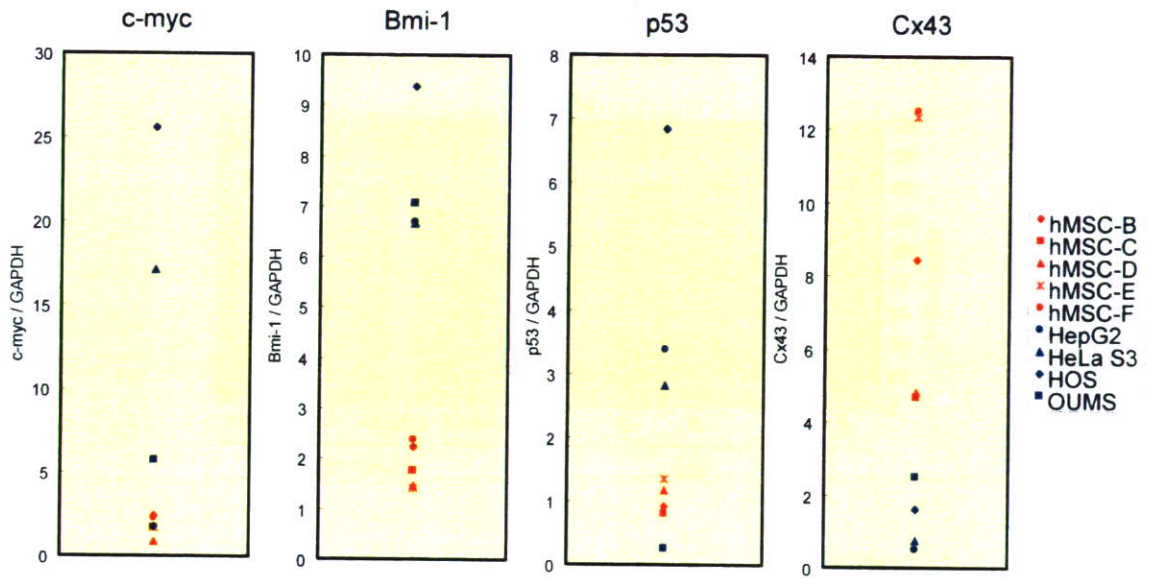


图2. The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, p53 and Cx43 in hMSCs and cancer cells

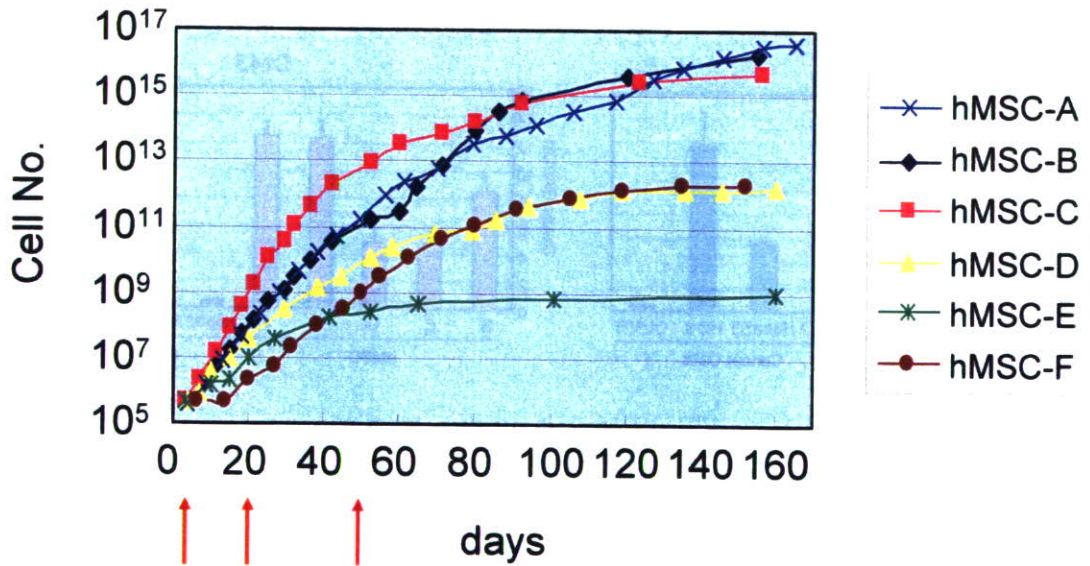


图3. hMSC growth curves

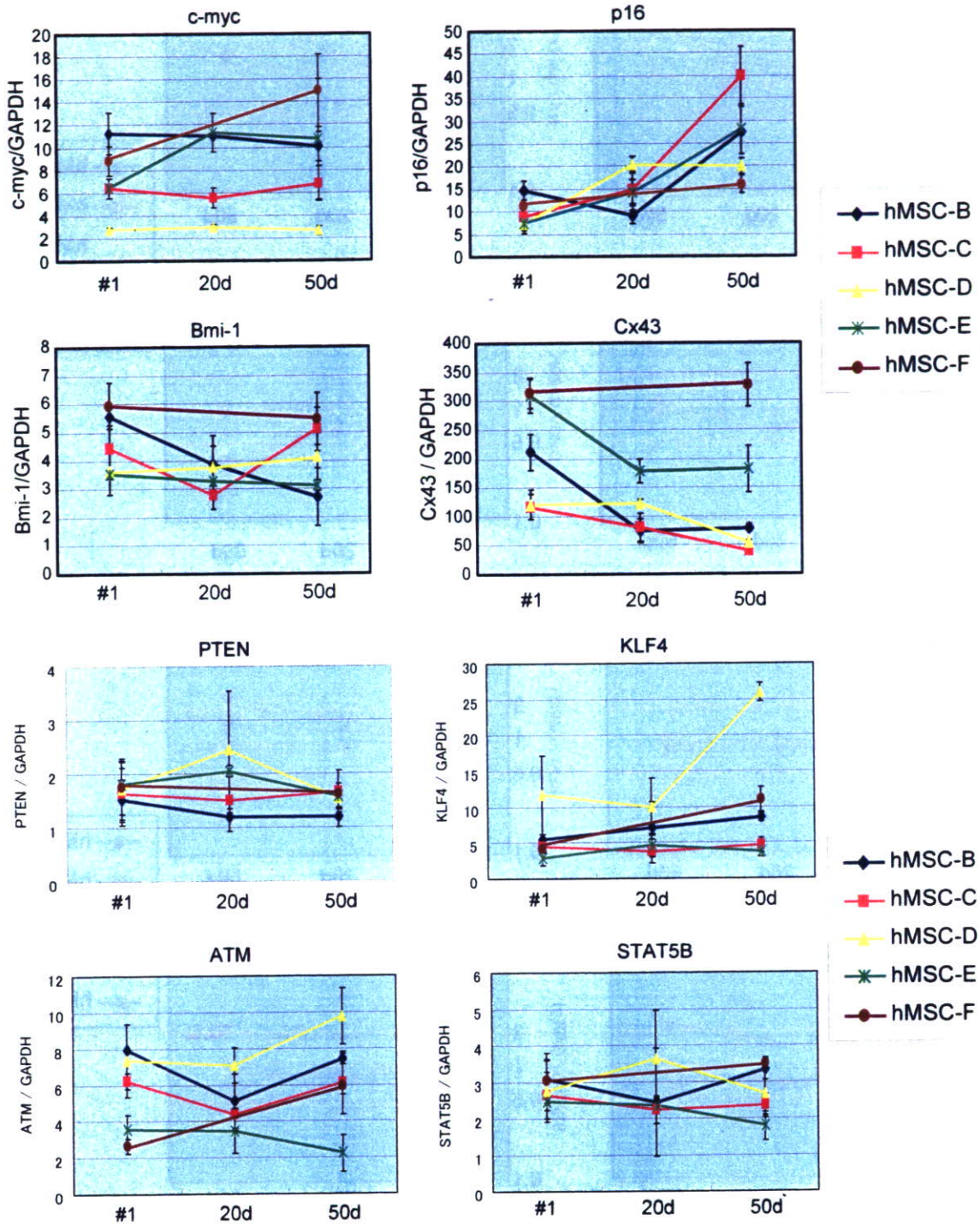


图 4. The mRNA expressions of c-myc, Bmi-1, PTEN, ATM, p16, Cx43, KLF4, and STAT5B in hMSCs

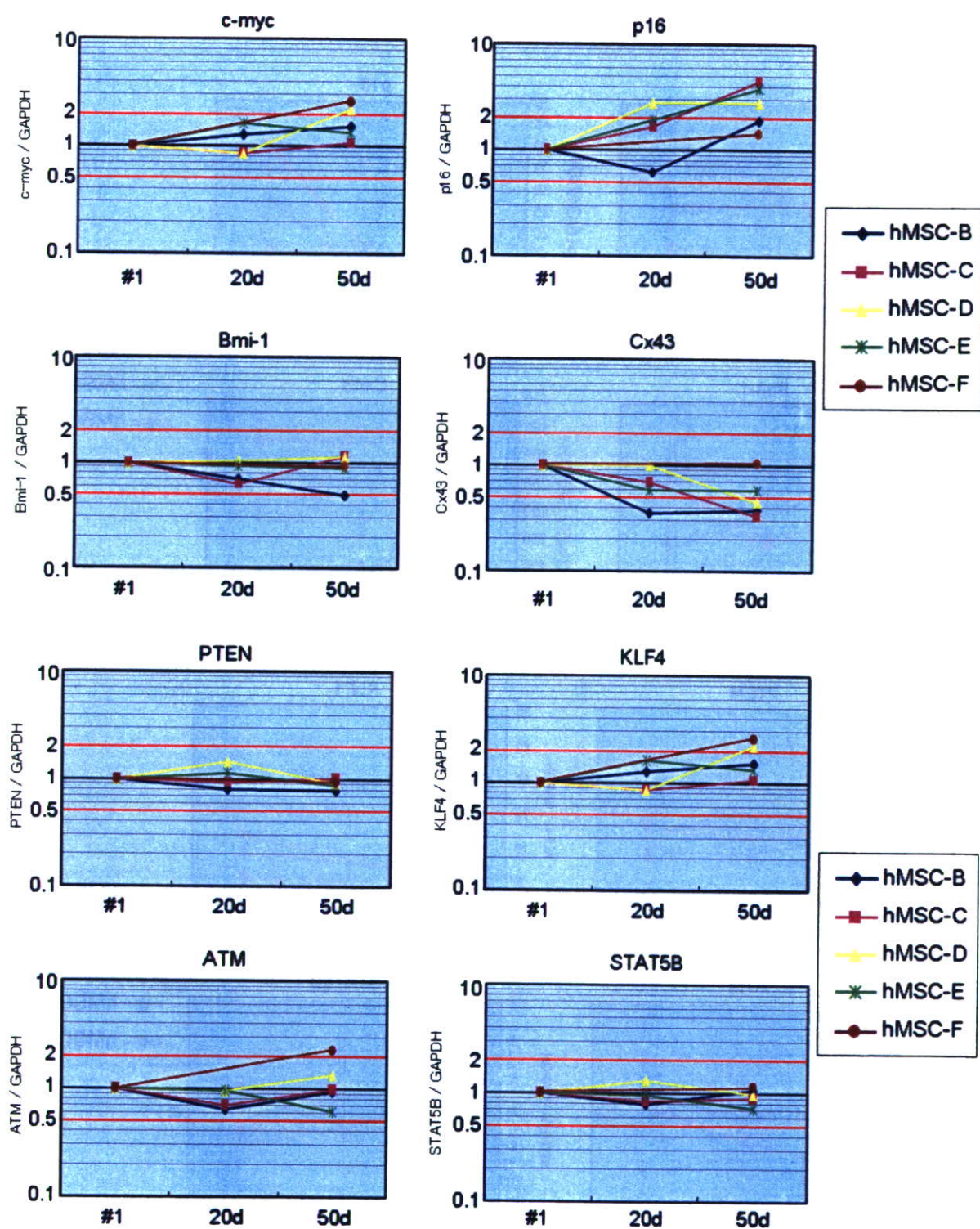


图 5. The changes of the mRNA expressions in hMSCs

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

薮島 由二



## 分担研究報告書

平成 19 年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等）研究事業（H17-再生一般-022）

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

### 分担研究課題名

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

主任研究者	土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所療品部
分担研究者	藪島 由二	国立医薬品食品衛生研究所療品部
協力研究者	長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所療品部
	佐々木和夫	日本ハム株式会社中央研究所
	村井 敏美	日本公定書協会
	中川ゆかり	日本公定書協会

研究要旨：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 細胞の貪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。

MM6-CA8 及び THP-1 細胞は Micro sphere を貪食した。また、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、TLR アゴニストと比較すると低値であるが、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 が最も優れていることが確認されたと共に、単球遊走化能を持つ CC ケモカインである MIP-1 $\alpha$  及び MIP-1 $\beta$  も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 $\beta$  が優れており、MIP-1 $\alpha$  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。

### A. 研究目的

組織工学を基礎とする細胞を用いた再生医療技術の発展には、培養細胞の効果的な利用技術と高度な分化機能を示す細胞を大量に獲得するための足場となる培養担体（スキャホールド）の開発が必須である。高度先端医療として期待が高まる再生医療工学で必要となるスキャホールドとしては、コラーゲンなどの天然由来材料のほか、生分解性

材料を含めた合成高分子やセラミックスなど様々な担体が考案されている。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基礎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<sup>1)</sup>、

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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4-10)</sup>。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<sup>11)</sup>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。また、前述のとおり、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細胞の貪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。

## B. 研究方法

本実験で使用したガラス製、金属製、テフロン製器具は使用前に250℃で2時間加熱処理を行った。また、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℃で16時間振とう培養後、培養液のpHを中性に調整し、100℃、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<sup>12,13)</sup>、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)<sup>14)</sup>。

## (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<sup>15)</sup> と MM6-CA8 細胞<sup>16,17)</sup> 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 µg/ml)、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (10 µg/ml) 及びアンホテリシン B (0.25 µg/ml) を含む RPMI1640 培地を用いた。同細胞を calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>; 10 ng/ml) により 72 時間刺激した後、 $1 \times 10^6$  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 µM)、HEPES (5 mM)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) を含む RPMI1640 培地を使用した。 $2 \times 10^5$  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 µg/ml) 及び calcitriol (0.1 µM) 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<sup>10)</sup>、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 µm, Ex=580 nm, Em=605 nm, Molecular Probes) を 0.1 µl 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 µl の Rhodamine phalloidin<sup>18)</sup> (Ex=540 nm, Em=565 nm, Invitrogen) を含む PBS 200 µl 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 2) 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。

## C. 研究結果

### (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 1A 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 1B 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 1 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 1B）。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 1 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 1）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 3）。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

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 3 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 2 に示したように、粒径 1  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ) 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 $\beta$ 、IL-6 や TNF  $\alpha$  が利用されていたが、ヒト末梢血細胞の場合、