

図 3 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 $\alpha$  及び MIP-1 $\beta$  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 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  のほか、IL-1ra、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  及び MIP-1 $\beta$  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 3)。

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 4 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 $\alpha$  及び MIP-1 $\beta$  も IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  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 5 に示したように、IL-1 $\beta$  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 $\alpha$  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。

#### D. 考 察

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<sup>11)</sup>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<sup>19)</sup>。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<sup>20, 21)</sup>。

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- $\kappa$ -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 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  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あ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 (図 1A)。

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ト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、貪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 (表 4)。一方、ヒト末梢血細胞の貪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 を貪食し、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。(表 5)。

MM6-CA8 細胞の発熱マーカーとしては、過去の研究<sup>16)</sup>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 $\alpha$  及び MIP-1 $\beta$  も従来利用されていた発熱マーカーである IL-1 $\beta$  及び TNF $\alpha$  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 $\beta$  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。

## E. 結 論

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) を認識したと共に、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。また、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 $\beta$  が最も優れていることが確認された。

## F. 研究発表

- 1) 藪島由二, 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).
- 2) 藪島由二, 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).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

## 参照論文

- 1) Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zähringer U, Lindner B, Morgan AP, Kulshin VA, Haishima Y, Holst O, Rohrscheide- andrzeweski

- E, Ulmer AJ, Flad HD, Brade H. Chemical structure and biological activity of lipopolysaccharides. In: Baumgartner JD, Calandra T, Carlet J, editors. Endotoxin from pathophysiology to therapeutic approaches. Paris: Flammarion Medicine- Sciences, pp. 5-18 (1990).
- 2) 藪島由二. 発熱性物質試験. 医療材料・医療機器の安全性と生体適合性(監修:土屋利江), pp. 37-42, シーエムシー出版 (2003).
  - 3) 藪島由二. エンドトキシン試験. 医療材料・医療機器の安全性と生体適合性 (監修:土屋利江), pp. 43-50, シーエムシー出版 (2003).
  - 4) Hartung T, Aaberge I, Berthold S, Carlin G, Charton E, Coecke S, Fennrich S, Fischer M, Gommer M, Halder M, Haslov K, Jahnke M, Montag-Lessing T, Poole S, Schechtman L, Wendel A and Werner-Felmayer G. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. *ATLA*, 29:99-123 (2001).
  - 5) Hartung T and Wndel A. Detection of pyrogen using human whole blood. *In Vitro Toxicology*, 9(4):353-359 (1996).
  - 6) Fennrich S, Fischer M, Hartung T, Lexa P, Montag-Lessing T, Sonntag HG, Weigandt M and Wendel A. Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. In: Brown F, Hendriksen C and Sesardic D, eds. Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. *Dev. Biol. Stand. Basel*, Karger, vol 101, pp. 131-139 (1999).
  - 7) Fennrich S, Wendel A and Hartung T. New applications of the human whole blood pyrogen assay (PyroCheck). *ALTEX*, 16:146-149 (1999).
  - 8) Jahnke M, Weigand M and Sonntag HG. Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit in vivo pyrogen test and the LAL test. *Eur. J. Paren. Sci.*, 5(2):39-44 (2000).
  - 9) Petri E, Ploeg A, Habermaier B and Fennrich S. Improved detection of pyrogenic substances on polymer surfaces with an ex vivo human whole-blood assay in comparison to the limulus amoebocyte lysate test. In: Balls M, Zeller AM and Halder ME, eds. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Elsevier Science B.V., pp. 339-345 (2000).
  - 10) Hasiwa M, Kullmann K, von Aulock S, Klein C and Hartung T. An in vitro pyrogen test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials*, 28:1367-1375 (2007).
  - 11) 三宅健介. エンドトキシン (LPS) 認識分子機構. エンドトキシン研究 6, p. 23-30, 医学図書出版株式会社 (2003).
  - 12) Westphal O, Luderitz O and Bister F. Ueber die Extraction von Bakterien mit Phenol/ Wasser. *Z. Naturforsch*, 7b:148-155 (1952).
  - 13) Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol- water and further applications of the procedure. *Methods carbohydra. Chem.*, 5:83-91 (1965).
  - 14) Haishima Y, Murai T, Nakagawa Y, Hirata M, Yagami T and Nakamura A. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55:424- 432 (2001).
  - 15) Tanamoto K, Kato H, Haishima Y and Azumi S. Biological properties of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8:522-527 (2001).
  - 16) Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diang. Lab. Immunol.*, 9:585-597 (2002).
  - 17) Nakagawa Y, Murai T, Hasegawa C, Hirata M, Tsuchiya T, Yagami T and Haishima Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 66B, 347-355 (2003).
  - 18) John AC. Effects of Cytochlasin and Phalloidin on Actin. *J Chem Biol*, 105:1473-1478 (1987).
  - 19) Hemmi H, Kasiho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 3:196-200 (2002).
  - 20) Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C and Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.*, 5:1000-1006 (2004).
  - 21) Girardin SE, Jehanno M, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Alzari PM and Philpott DJ. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem.*, 18:38648-38656 (2005).

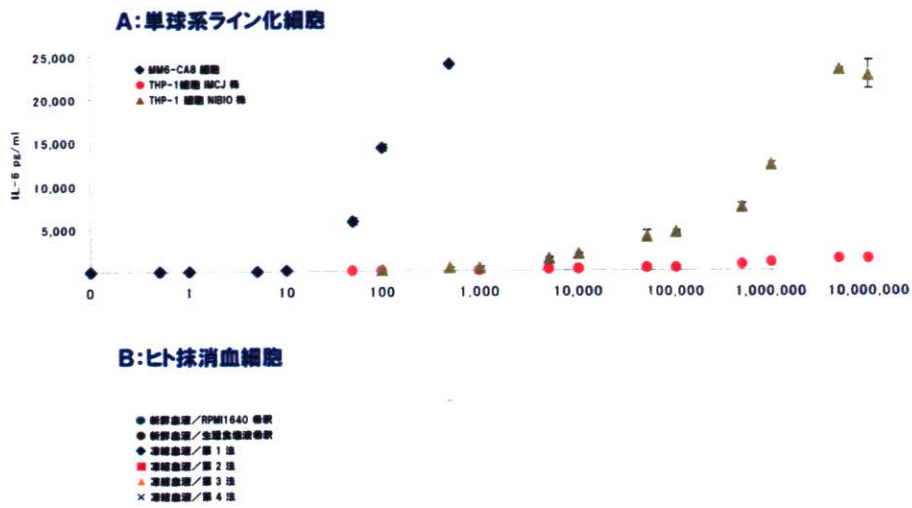
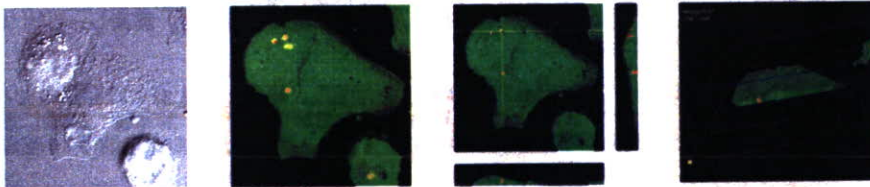


図1. MM6-CA8 細胞、THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞の LPS 応答性  
A: 単球系ライン化細胞. B: ヒト末梢血細胞.

**THP-1 細胞**



**MM6-CA8 細胞**

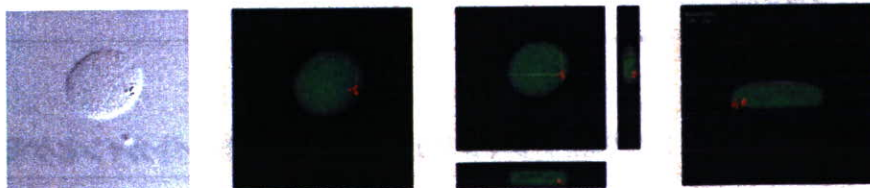


図2. THP-1 細胞及びMM6-CA8 細胞の Micro Sphere 貪食機能評価

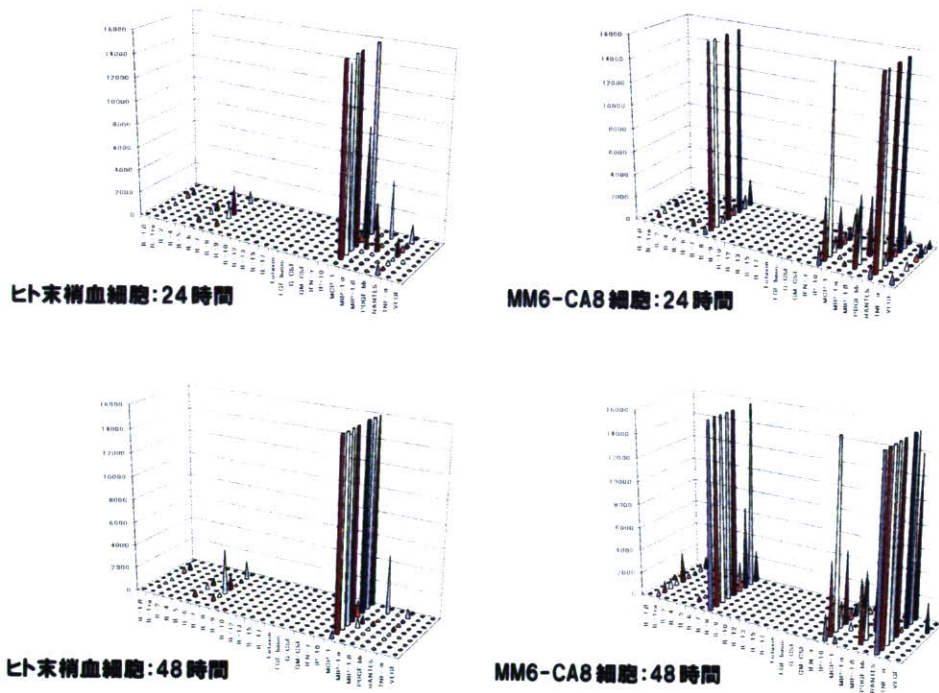


図3. Bio-Plex による発熱マーカーの一斉解析 (サイトカイン・ケモカインの発現パターン)

表1. 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、解凍し、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、解凍し、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。解凍後、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。解凍後、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2. 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 $\beta$ , 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- $\gamma$ , IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-bb, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF
------	--

表3. 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 (ED <sub>50</sub> )	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	159 × 10 <sup>3</sup>	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	13575 ± 537	560 ± 4.5	nt
0.1	15675 ± 671	962 ± 228	16605.0 ± 728.3			
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	40.6 ± 2.8	9.60 ± 0.7	nt
			0.01	70.5 ± 0.6	11.1 ± 1.6	nd
			0.05	78.6 ± 2.1	11.8 ± 2.4	45.9 ± 2.3
			0.1	213 ± 7.1	12.8 ± 1.1	85.8 ± 5.9
			0.5	609 ± 24	22.4 ± 1.1	1863.5 ± 217.1
1	1355 ± 106	36.5 ± 12	8465.0 ± 813.2			
10	12300 ± 424	663 ± 184	18775 ± 5098.2			
合成リポ蛋白質 (Pam)	TLR2/1	1.90	0	1.5 ± 0.5	7.20 ± 0.2	nt
			0.1	488 ± 3.5	1395 ± 52	358.4 ± 34.9
			1	8189 ± 88.6	nt	1140.0 ± 124.5
			10	23735 ± 516	2600 ± 149	2615.0 ± 487.9
Poly (I:C)	TLR3	0.04	0	20.0 ± 0.03	16.4 ± 3.7	nt
			1	25.9 ± 0.13	nt	nt
			10	28.5 ± 0.08	23.3 ± 4.8	nt
			100	28.0 ± 0.15	>500	153.9 ± 13.9
R837	TLR7	nd**	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	18.7 ± 0.02	nt	nt
			10	17.7 ± 0.09	11.9 ± 2.5	83.9 ± 36.8

\*EndoTrap 精製標品. \*\*nd, not detect. \*\*\*nt, not tested.

表4. 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	2.60	106.37	>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	33.69
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5. 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	66.67
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	>563.56	103.05	16.03	>124.97	260.40	20.26	231.21
Pam	1000	243.00	3.93	>801.13	200.13	13.12	>124.97	1506.13	216.16	21.12
Poly I:c	100000	90.67	12.92	>75.61	1.90	6.26	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	86.16	3.20	>124.97	208.86	216.12	22.67
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

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

加藤 幸夫

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究者 加藤 幸夫 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨：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、臨床的あるいは実際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ことなどである。このようにして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。

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

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 にて比較した。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 法でも確認した。

#### C. 研究結果

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。

#### D. 考察

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、マーカーの使用方法が拡大し、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。

#### E. 結論

本研究で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。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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
5. 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.
6. 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.
7. Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Transforming Growth Factor- $\beta$  Promotes Survival of Mammary Carcinoma Cells through Induction of Antiapoptotic Transcription Factor DEC1. *Cancer Res*. 2007 Oct 15;67(20):9694-703.
8. 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.
9. 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.
10. 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
11. 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.
12. 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.
13. 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.
2. 学会発表
1. 邵金昌、久保裕嗣、桂由紀、五十嵐晃、金輪真佐美、瀬越和美、辻紘一郎、加藤幸夫 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の無血清長期継代培養におけるリン脂質・脂肪酸の効用について 第 20 回日本軟骨代謝学会 平成 19 年 3 月 2-3 日 岡山市
  2. 久保裕嗣、清水正和、五十嵐晃、河本健、辻紘一郎、加藤幸夫 間葉系幹細胞の自己複製に関わる転写因子についての検討(ポスター発表) 第 6 回日本再生医療学会総会 平成 19 年 3 月 13-14 日 横浜市
  3. M. Nishimura, K. Sekiya, Y. Sakai, Y. Kato. High HAS1 and low CD44 levels may contribute to viscosity of bone marrow aspirates. (ポスター発表) Hyaluronan 2007 平成 19 年 4 月 22-27 日 Charleston, USA.
  4. 坂井将典、邵金昌、桂由紀、パワール・ウジャール・クマール、西村正宏、加藤幸夫、辻紘一郎 間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生療法による骨粗鬆症治療の可能性 (ポスター発表) 第 54 回日本実験動物学会総会 平成 19 年 5 月 23-25 日 東京都
  5. 末廣史雄、西村正宏、関谷健祐、西村春樹、久保裕嗣、五十嵐晃、河本健、加藤幸夫、濱田泰三 間葉系幹細胞の骨分化に関わる転写因子の機能解析 第 40 回広島大学歯学会総会 平成 19 年 6 月 16 日 広島市
  6. 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 岡山市
  7. 上嶋太一、河本健、本田清昌、能城光秀、藤本勝巳、後藤修、加藤幸夫 軟骨細胞分化の概日リズムを制御する新規配列の探索とそこに関与する転写因子の同定 中四国骨代謝研究会 平成 19 年 7 月 7 日 岡山市
  8. 清水正和、久保裕嗣、田谷雄二、河本健、島津徳人、青葉孝昭、加藤幸夫 間葉系幹細胞の生体内分布および未分化維持機構の解明 第 25 回日本骨代謝学会学術集会 平成 19 年 7 月 19-21 日 大阪市
  9. 上嶋太一、河本健、能城光秀、藤本勝巳、本田清昌、中島歩、加藤幸夫 軟骨細胞の分化の概日リズムを制御する数種類の新規制御配列の同定とそこに関与する転写因子の探索 (ポスター発表) 第 25 回日本骨代謝学会学術集会 平成 19 年 7 月 19-21 日 大阪市
  10. 河本健、本田清昌、藤本勝巳、能城光秀、加藤幸夫 DEC1 による概日リズム調節の機構 第 49 回歯科基礎医学会 平成 19 年 8 月 29-31 日 札幌市
  11. Nakashima A., Kawamoto T., Honda K., Ueshima T., Noshiro M., Fujimoto K., Kubo H., Kato Y. DEC1 modulates circadian phase of clock gene expression 2<sup>nd</sup> World Congress of Chronobiology 平成 19 年 11 月 4-6 日 東京都 (ポスター発表)
  12. Noshiro M., Usui E., Kawamoto T., Sato F., Nakashima A., Furukawa M., Ueshima T., Honda K., Fujimoto K., Honma S., Honma K., Kato Y. The liver X receptors (LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ ) are potent regulators for hepatic Dec1 expression 2<sup>nd</sup> World Congress of Chronobiology 平成 19 年 11 月 4-6 日 東京都 (ポスター発表)
3. 招待講演
1. 加藤幸夫 関節症における滑膜線維芽細胞(間葉系幹細胞)の活性化および高分子ヒアルロン酸療法 第 39 回日本結合組織学会・第 54 回マトリックス研究会合同学術集会 平成 19 年 5 月 9-11 日 東京都
  2. 加藤幸夫 ヒト間葉系幹細胞の無血清培地の開発 第 5 回医療機器フォーラム 平成 19 年 10 月 27 日 東京都
  3. 加藤幸夫 時計治療学をめざして: 時計遺伝子 DEC の発見および日内時刻による遺伝子発現の制御 第 35 回薬物活性シンポジウム 平成 19 年 11 月 29-30 日 広島市

## 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節する組成物  
(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 2

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)

辻 紘一郎

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 辻 紘一郎 株式会社ツーセル/広島大学

研究要旨：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)

平成17年度、18年度に研究した感染病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、19年度は、加藤教授との共同研究により間葉系幹細胞の均質性/同一性なお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。

A. 研究目的

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て、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出する。

B. 研究方法

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を保護するために、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。

C. 研究結果

支援システムによるデータ管理上で、骨髄採取を行った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。ウイルス検査に関して、登録前(血液)検査と培養細胞検査でウイルスは検出されなかった。また、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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita T, Iwata T, Shiba H, Igarashi A, Hirata R, Takeda K, Mizuno N, Tsuji K, Kawaguchi H, Kato Y, Ku

- rihara H. Identification of marker genes distinguishing human periodontal ligament cells from human mesenchymal stem cells and human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 42(3) 283-286, 2007.
2. Akira Igarashi, Kasumi Segoshi, Yuhiro Sakai, Haiou Pan, Masami Kanawahikihito Higashi, Masaru Sugiyama, Kozo Nakamura, Hidemi Kurihara, Satoru Yamaguchi, Koichiro Tsuji, Takeshi Kawamoto, and Yukio Kato. Selection of Common Markers for Bone Marrow Stromal Cells from Various Bones Using Real-Time RT-PCR: Effects of Passage Number and Donor Age 13(10) 2405-2417. 2007.
  3. 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 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.
  4. 加藤幸夫、坂井裕大、本田清昌、五十嵐晃、辻紘一郎、西村正宏。間葉系幹細胞の特質遊走能。癌化リスク、病的変化 *BIO Clinica* 22(12) 1063-1068. 2007.
  5. 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.
2. 学会発表
1. 田井雅子、辻紘一郎、加来真人、菅麻倫衣子、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
  2. 坂井将典、邵金昌、桂由紀、パワーウルジャー、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
  3. 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
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許出願
    1. 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
    2. 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月27日: 出願人: 広島大学、ツーセル、クリオカプス
    3. 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
4. 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
  5. 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
  6. 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　： P C T / J P 2007/054869　：出願日：平成19年3月12日：出願人：広島大学、ツーセル
  7. 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

## 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)

篠崎 尚史



厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

「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）

分担研究者 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  
研究協力者 兼子 智 東京歯科大学市川総合病院婦人科講師

研究要旨

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、取り違え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。

A. 研究目的

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した。

B. 研究方法

CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>-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した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>-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

気は繰り返し濾過（ヘパフィルター）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℃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%CO<sub>2</sub>、2.0%O<sub>2</sub>、93%N<sub>2</sub>）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CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>、95%N<sub>2</sub>でパージすることにより、3分以内にO<sub>2</sub>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。

#### D. 考察

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%CO<sub>2</sub>-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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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

##### 2. 学会発表

#### G. 知的財産権の出願・登録取得状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案特許

なし

##### 3. その他

なし

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

澤 芳樹

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  
分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 教授

### 研究要旨

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 $\gamma$ ) 刺激により RT1B の発現を認めた。冠状動脈左前下降枝結紮によるメスの心筋梗塞モデルラットに対して急性期にオス由来 skMB 移植を行った。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 $\gamma$  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。雄性特異的遺伝子の定量 PCR により左室内における移植細胞数を算出した。A 群、S 群ともに移植後 4 日で増加し、その後減少した。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。

#### A. 研究背景と目的

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

たである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 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