

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

土屋利江*

Guideline for tissue engineered medical products

細胞組織利用製品のガイドラインについては、平成11年7月30日906号通知“細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について”と、平成12年12月26日1314号通知“ヒト又は動物由来成分を原料として製造されている医薬品等の品質及び安全性確保について”が発出されている。

本稿では、細胞・組織利用製品の審査の迅速化のために検討してきた、次世代医療機器評価指標作成事業(再生医療分野：心筋再生・細胞シート)と再生医療の早期ガイドライン研究班において検討している骨再生、軟骨再生、角膜再生、歯科領域の再生の概略について紹介する。

*Tsuchiya Toshie**

Key words：細胞組織製品，組織工学製品，再生医療，ガイドライン，細胞組織医療機器

再生医療の製品化の過程には、材料開発、細胞ソース、三次元培養物の評価指標・評価技術、動物モデル、臨床評価と各段階でのスムーズな連携が必須である。特に、スタート時の材料の開発と、いくつもある材料からどの材料を選ぶかによって臨床成績が左右されることが、これまでの研究で明らかになっている。材料に細胞を播種し、ハイブリッドとなった三次元培養物の評価方法は、材料の性質によっては、二次元での評価ほどには簡単に評価できないなど困難な技術的側面がある。

一方、開発戦略として、安全性上問題となる因子についてははじめから極力避けて、安全な要素因子を導入、選択、あるいは開発するなど、最近、各分野ごとに努力が実りつつある。たとえば、間葉系幹細胞を無血清培地で培養できた成功例、げっ歯類のフィーダー細胞ではなく、より安全な細胞を用いた幹細胞培養法の開発など、昨年平成18年度は、困難と思われていた培養法が可能となり、より安全な培養方法で、再生医療を実現できる時代になってきている。たとえば、角膜再生をはじめ、臨床現場に携わりながら、安全性上問題とならない設計を考えられ、その結果、臨床結果も成功しておられる状況から、一刻も早くガイドラインを作製することが、少しでも早く、す

*Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所療品部

くれた製品を患者様にお届けできることであると
考え、平成18年度から、次世代医療機器事業に
プラス再生医療の早期ガイドライン化研究班の組織
をつくり、ガイドラインづくりを行っております。

再生医療早期ガイドライン化は、開始から日も
浅く、未完成な状態ではありますが、このような
システムをつくるのが重要であると考えまし
た。さまざまな開発をされておられる先生方が、
このシステムフローにのれば、現在努力している
技術と材料が、やがては、製品化のフローへの道
筋と重なる日は遠くない、と希望を持たれると考
えたからです。

以下、現状のガイドライン化について紹介する。

厚生労働省において、次世代医療機器評価指標
等整備事業が平成17年度からスタートしている。
(<http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/>) 5分野の医療機
器が選ばれた。そのなかの1分野に再生医療がと
りあげられ、ヒューマンサイエンス財団の政策創
業総合研究のプロジェクトで研究課題としてい
る、心筋再生を目的とした細胞シート(心筋シ
ート)が選ばれた。治療法のなかった患者様の命を
救うことが可能な先端医療の実現に貢献できると
期待される。

次世代医療機器評価指標事業の趣旨は、“医療
ニーズが高く、実用可能性のある次世代医療機器
について、審査時に用いる技術評価指標等を予め
作成し、公表することにより、製品開発の効率化
及び承認審査の迅速化を図る”ことであり、心筋
再生細胞シートは、この趣旨に沿った、次世代医
療機器の先頭をいく再生医療品として期待される。

厚生労働省は審査ガイドラインを、経済産業省
は開発ガイドラインを作製している。両省の連携
はこれまでになく、両省合同検討会で、実現可能
性や臨床現場におけるニーズに着目して、次世代
医療機器の分野および対象機器を選んでいる。

これらの審査ガイドライン運営の事務局を、国
立医薬品食品衛生研究所療品部の医療機器担当職
員8名中、7名が担当しており、代表を筆者が務
めている。

また、政策創業総合プロジェクトで成果を上げ
た、骨再生、軟骨再生のガイドラインづくりにも

着手した。

心筋再生細胞シート

心筋再生については、前述した次世代医療機器
評価指標事業で評価指標をまとめており、ホーム
ページ(<http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/>)に、平成
17年度報告書を公開している。詳しくは報告書を
参考にしていきたい。

心筋再生の平成18年度の検討は、材料部分は、
昨年度の細胞シートの内容を確認した。

細胞・動物実験については、再検討し、修正し
た。具体的な数値を記載すると、今後の発展など
を妨げる場合もあるので、可及的に削除した。

今年でまとめる予定であるが、事務局として
は、有効性評価項目に、コネキシン43を追加予定
である。コネキシン43は、心筋の機能において重
要な機能性蛋白であり、コネキシン43の重要性を
論じた多くの論文があることが理由である。

また、造腫瘍性評価法について、企業からの問
い合わせもあり、動物、実験方法などの情報を付
属文書として追加する予定である。共通の試験法
で評価し、データを積み重ねることも重要である
と考える。

骨再生ガイドライン

細胞ソースは、骨髄間葉系幹細胞、滑膜間葉系
幹細胞、脂肪由来組織幹細胞を選んだ。培養骨ガ
イドラインにおける、安全性評価、品質評価項目
を以下に示す。

培養骨の力学評価、動物実験、臨床評価(安全
性評価と有効性評価)の項目からなる。

臨床においては、被験者の選定、対象疾患、選
定基準、除外基準、修復方法などが重要となる。
臨床評価における定量的測定法は、平成19年6月
以降に発行予定のため、別の機会に紹介する。

軟骨再生ガイドライン

細胞ソースとして、軟骨細胞、前駆細胞(骨髄、

滑膜、脂肪、さい帯血、胎盤)を選んだ。

非侵襲的診断法としてMRIがあげられる。力学的・機械的適合性評価としては超音波による測定があるが、測定する角度によって大きく振れるなどの問題点があげられた。京都大学再生医科学研究所・堤 定美教授の開発されたエコーを用いた体積弾性率測定装置で培養物を測定すると、スカフォールドの影響を受けにくく、細胞増殖分化過程に応じての体積弾性率が増加する過程を測定できた。

動物実験では、ブタおよびウサギを選んだ。ブタでの評価は、軟骨がウサギにくらべて大きく、MRIによる非侵襲的診断なども可能であり、MRIの結果と組織病理レベルでの評価結果との比較や、超音波による評価などとの比較が容易であるなど、ヒト臨床に使用可能な非侵襲的診断方法を開発するうえで、有用性の高い動物である。

ウサギは、軟骨の周囲にある骨髄細胞の代謝活性が高く、修復能の早い動物である。自然修復による修復力が高いので、再生医療品を軟骨欠損部に埋植後、細胞によって修復したのか、自然修復力によって修復したのか、そのみきわめを慎重にする必要がある。適切な欠損層を作製し、老齢ウサギを使用するなど、再生医療品の評価が出来る条件を適切に設定する必要がある。

臨床評価は、被験者および修復方法、研究および倫理の体制、安全性の評価、有効性の評価、インフォームド・コンセントの項目となっている。

大阪市立大学・脇谷滋之先生は、軟骨治療を必要とする患者を選択するうえで役立つ、非侵襲的検査法の開発を行っておられる。将来は、早期診断による早期治療が可能となり、完治できる軟骨治療が実現する可能性が高い。

角膜再生ガイドライン

培養上皮細胞シート作製のための温度応答性培養皿については、心筋再生細胞シートを参照し、作製した。培養上皮細胞シート製造過程については、特に、出来た細胞シートの機能評価が重要であることを確認した。たとえば、① シートにお

いて穴が開いていないこと、② 幹細胞がシート中に存在していること、③ 上皮バリア機能の保持などが重要である。

羊膜は、直接、患者様の眼組織に接触し、羊膜上に、角膜上皮、あるいは口腔粘膜由来の組織が存在した状態で使用されている。一方、細胞シートでは、角膜上皮、あるいは粘膜由来の組織が、直接に患者様の眼組織に接触している点で、構造が異なっている。

患者様の眼組織と羊膜を介さずに直接接触することにより、周囲組織との親和性を獲得するのではないかということも考えられる。両方法を経験された研究者・臨床医のご意見をお聞きし、すぐれた再生医療品を、患者様が使用できるように配慮したいと考えている。

歯科領域ガイドライン

歯科においては、再生医療の対象部位について検討した。その結果、歯槽骨の骨再生と歯周組織の再生が選ばれた。

歯槽骨については、整形外科の骨再生ガイドラインが参考となる。前頁の骨再生ガイドラインを基本とすること。臨床評価の分野において歯科特有の評価指標、評価方法を記載することとした。また、歯槽骨の骨再生を盛んに研究しておられる研究者にも加わっていただくこととした。

歯周組織については、複数箇所、それぞれ異なる材料および方法で再生が行われており、まず本年度は、調査を行うこととした。次年度は、個別の調査における共通部分を抽出し、ガイドラインの骨子を作製する。異なる部分については、付属書として添付する方向でまとめることとした。

今後のあり方

(1) コスト削減

かかる費用をなるべく低く抑えるための努力が製品化において必要となる。すなわち、安全性・有効性のバランスのみでなく、かかるコスト(産業化には必要)も考えないと、認可されても、領

域によっては産業化が困難である。骨再生がこの領域に近いと考えられる。すなわち、人工材料単独とくらべて細胞を用いた材料では、効果が少しばかりでは、かかる費用などが桁違いに高いため、費用対効果として考えたときに企業が積極的に製品化していないと考えられる。歯科領域では、整形外科での骨の状況とは異なるようで、すでに、企業が産業化を考えた学会発表が行われている。整形外科系においても、骨の大きな欠損の場合には、骨再生医療による治療が必要となると考えられている。骨系の材料開発を含め今後の進展が期待される。

(2) 不具合の報告の必要性

研究発表では出てこない不具合が、承認後に報告されるケースがある。一番よい成績のみの発表では、無駄な研究が繰り返し行われ、再生医療品の進展が実際は遅れることとなる。

(3) 臨床試験と安全性

治癒成績が他の材料にくらべてわるいことが動物実験で確認されているにもかかわらず、臨床試験をすることがあれば、安全性はもちろん、倫理的にも問題がある。組織工学用材料の有機溶媒抽出物を評価した結果、遺伝毒性陽性を示す材料があった。材料の安全性を評価したのち臨床使用することは当然のことであるが、事前に確認されていなかったのではないかと危惧している。

(4) 材料の安全性

臨床試験する材料については、安全性を熟知している専門家により、安全であると確認された材料から選択すること(内容の吟味なしに、文書に記載された“安全”の文字を信じて安全と考えているケースが意外と多い)。

(5) *In vitro*と*in vivo*

組織工学の場合、*in vitro*試験と*in vivo*試験では、治癒効果が逆に出るケースが意外と多いことに留意すべきである。生体適合性とは、*in vitro*の結果ではなく、*in vivo*での適合性が本来の意味である。生体の空間的・時間的・周囲組織との適合性の意味を深く考える必要がある。

(6) 非侵襲性

可及的に、非侵襲的であること(QOLの向上)。

(7) 周辺技術と材料開発の重要性

評価の高い安全・安心製品であって、世界のトップをいくためには、周辺技術と材料開発が重要となる。たとえば、以下のようなことがあげられる。

- ① 無血清培地の開発(感染因子、アレルギーの低減化)
- ② 安全なフィーダー細胞などの開発(バイオ皮膚作製工程で使用するマウス由来のフィーダー細胞で作製された皮膚で、過去に1例がん化した症例があったと再生医療学会で発表されている)
- ③ 安全性・有効性の高い機能性材料の開発(対象組織によっては、材料のみで治療効果があり、新規材料開発がキーポイントとなる。そのような材料に細胞が加わると治癒効果が高い)
- ④ サイトカイン、薬などとのコンビネーションで治療可能なものは、コンビネーション製品で治療する(扱いやすい、コストにおいて細胞入りより優位性あり)。

再生医療の製品化においては、さまざまな分野の知識が必要であり、また、医療材料や医療機器においても、先端的かつ複合化した製品が今後の主力となると考えられる。少ない人数での産業化は、各企業にとっても大変なプレッシャーになっているものと考えられる。今後は、産・官・学連携を進めていき、わが国のすぐれた技術分野を押し出せるようなシステムづくりを進めていきたいと考えている。

産・官・学連携プロジェクトでは、軟骨再生課題で、材料設計において工夫し、ブタで成功した。今後の設計方法により、材料単独でも、再生能力を期待できる材料である。

世界を目指した再生医療品については、まず、材料がすぐれていることがキーポイントとなる。その点、わが国には、すぐれたバイオマテリアル開発の歴史がある。シート工学につづいて続々と新しい材料が開発されている。2007年は、安全・安心・有効性の高い再生医療製品の幕開けとなるものと期待できる。

細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について

澤田留美,* 伊藤友実, 土屋利江

Safety Evaluation of Tissue Engineered Medical Devices Using Normal Human Mesenchymal Stem Cells

Rumi SAWADA,* Tomomi ITO, and Toshie TSUCHIYA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 17, 2007)

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using somatic stem cells in regenerative medicine. Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, e.g., bone, cartilage, adipose, and muscle cells; they, therefore, have many potential clinical applications. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to cancer cells. For safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal hMSCs, in this study, we investigated the expression levels of several genes that affect cell proliferation in hMSCs during *in vitro* culture. We focused on the relationship between the hMSC proliferation and their transforming growth factor β (TGF β) signaling during *in vitro* culture. The proliferation rate of hMSCs gradually decreased and cellular senescence was observed for about 3 months. The mRNA expressions of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β receptor type I (TGF β RI) in hMSCs increased with the length of cell culture. The mRNA expressions of Smad3 increased, but those of c-myc and nucleostemin decreased with the length hMSCs were in *in vitro* culture. In addition, the expression profiles of the genes which regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells. In conclusion, hMSCs derived from bone marrow seldom underwent spontaneous transformation during 1–2 months *in vitro* culture for use in clinical applications. In hMSCs as well as in epithelial cells, growth might be controlled by the TGF β family signaling.

Key words—human mesenchymal stem cells; tissue engineered medical devices; proliferation; transforming growth factor β

1. はじめに

様々な疾病などに起因した組織や器官の機能不全に対して、組織再生又は機能回復を目指した「再生医療」が、現在注目されている。その手段としてこれまでに、幹細胞や人工素材を用いた医療機器の開発や細胞治療などについて多くの研究がなされている。胚性幹細胞 (ES 細胞) は全能性を持つが受精卵を用いることから倫理的問題が大きいのに対し、体性幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題がない点が再生医療や細胞治療のツールとして利用されている大きな理由であろう。中でも骨髄に含まれる間葉

系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞は、様々な臨床分野での応用が期待されている。また、骨髄や臍帯血中には間葉系幹細胞や造血幹細胞よりもさらに上の段階で多くの細胞系への分化能を持った細胞 (multipotent adult progenitor cells; MAPCs) が存在することも報告されている。¹⁾ さらに骨髄中だけでなくそれぞれの組織に特異的な幹細胞 (肝, 心筋, 神経, 上皮など) の存在も知られている。骨髄由来の間葉系幹細胞は骨, 軟骨, 脂肪, 筋肉へ分化可能な細胞として広く知られている¹⁻⁵⁾ が, さらに, 神経細胞³⁾ や肝細胞,^{1,6)} 心筋,^{7,8)} 皮膚など胚を越えた分化も報告されており, 整形外科の分野のみならず動脈硬化症, 心筋梗塞, 肝硬変, 糖尿病などの治療への応用も期待されている。骨髄間葉系幹細胞は採取も比較的容易で *in vitro* での培養技術も確立されているため, 細胞組織利用医療機器の材料と

国立医薬品食品衛生研究所療品部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

*e-mail: rsawada@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S4 で発表したものを中心に記述したものである。

して最も実用に近いものの1つであろう。

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⁹⁾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。そのような背景の中、Rubioら¹⁰⁾により脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞を長期間(4—5ヵ月) *in vitro* で培養すると自然に形質転換(癌化)するという報告がなされた。一方最近、間葉系幹細胞の由来によるその性質の違いについて、骨髓、臍帯血、脂肪組織由来の間葉系幹細胞をそれぞれ比較することによって示した報告¹¹⁾もあり、脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞が自然に形質転換するという上記の報告¹⁰⁾が直ちに骨髓由来の間葉系幹細胞やさらには他の体性幹細胞も同様な変化を起こすということにはならないが、やはりその危険性に対して注意を払う必要はあるであろう。特に、体性幹細胞を細胞組織利用医療機器や細胞治療に用いるためには、生体内から取り出したのち *in vitro* で培養しある程度の細胞数を得なければならない。このため、少なくとも *in vitro* での培養中に幹細胞の性質ができるだけ変化しないことが望ましい。幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器や細胞治療の実用化に向けて *in vitro* での培養中における幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であろう。

その第一歩として、筆者らは現在、幹細胞の *in vitro* での培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化について検討を行っている。その理由としては、幹細胞におけるいくつかの遺伝子発現について調べることでその安全性を評価できる系を最終的に確立できれば、誰でも簡単に評価できるためであり、幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器等の開発の促進につながることを期待している。本稿では、幹細胞の自己複製制御機構を探るために骨髓由来ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* での培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化について検討した結果を紹介する。

2. ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の増殖能について

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC; Cambrex社より2継代目の凍結細胞を購入)を *in vitro* で培養していくと、通常その増殖能は次第に低下していく(Fig. 1)。細胞を採取した個体による増殖速度の差はみられるものの、そのほとんどが培養期間2ヵ月を超えると増殖速度は低下し始め、4—5ヵ月になるとほとんど増殖しなくなってくる。増殖速度が低

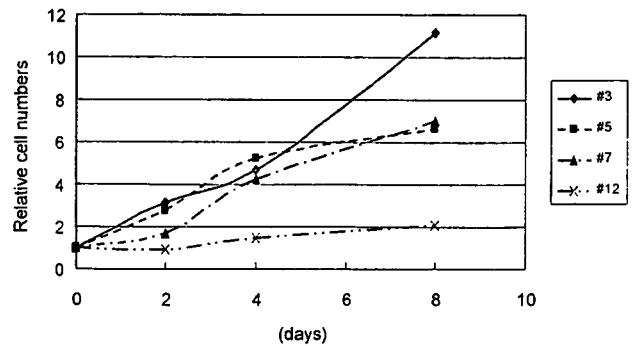


Fig. 1. Proliferation of hMSC in 3rd, 5th, 7th, and 12th Passages¹⁶⁾

hMSC were seeded at 1.7×10^5 cells/ $\phi 60$ mm dish (6000 cells/cm²), and cells were counted after 2, 4, and 8 days. The initial cell number (0 day) is expressed as 1, and the other cell numbers (2, 4, and 8 days) are relative to that of day 0. $n=3$.

下した幹細胞は Senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining によって細胞中に老化している細胞が含まれていることが確認された。増殖因子を添加した培地を用いた培養も行っているが、増殖速度は上昇するものの培養期間による速度の変化は増殖因子を加えていない細胞と同様であり、長期間培養しても無限増殖する幹細胞の存在は現在の所筆者らは確認していない。

3. *In vitro* 培養における hMSC の遺伝子発現レベルの変化について

上述したように、hMSC は *in vitro* での培養を続けることによってその増殖能は低下してくる。また細胞の形態等の変化もみられており、培養期間中に遺伝子の発現に変化が生じる可能性が示唆された。そこで、*in vitro* 培養期間の長さによる hMSC の遺伝子発現レベルの変化について調べるために、まず DNA アレイ解析 (BD Atlas™ Human Cancer 1.2 Array) を行った。培養期間1ヵ月程度の細胞と2ヵ月以上の細胞とで比較検討した。それぞれの遺伝子の機能による分類単位での変化について Table 1 に示した。こちらはあくまで全体的な傾向を示しているため、それぞれの分類に含まれる個々の遺伝子の発現の変化がすべて同じという訳ではないが、hMSC は *in vitro* での培養を続けることによって遺伝子発現レベルの変化が起こることは確認された。hMSC の培養中に癌化といった形質転換が起こっていないことを確かめる指標を探るために「細胞増殖」という点に着目し、また上記の DNA アレイ解析結果も踏まえて、次に個々の遺伝子の発現レベル

Table 1. Comparison of Gene Expressions in hMSC (1 Month Culture) and hMSC (Over 2 Months)

The genes concerned with the following functions were up-regulated with the culture term	
• Cell cycle	
• Cell adhesion receptors/proteins	
• Immune system proteins	
• Oncogenes and tumor suppressors	
• Stress response proteins	
• DNA binding and chromatin proteins	
• Cell receptors (by ligands)	
• Cell receptors (by activities)	
• Intracellular transducers/effectors/modulators	
• DNA synthesis, recombination, and repair	
The genes concerned with the following functions were down-regulated with the culture term	
• Membrane channels and transporters	
• Metabolism	
• Translation	
• Apoptosis associated proteins	
• RNA processing, turnover, and transport	
• Protein turnover	
• Cytoskeleton/motility proteins	

の変化について hMSC の培養期間を 4 点取り検討した。まず、癌遺伝子の 1 つであり細胞の増殖機能に係わる c-myc、幹細胞と癌細胞の両者の増殖に係わる nucleostemin、様々なシグナル伝達経路や発癌に係わるといわれている Wnt-8B について検討したところ、c-myc 及び nucleostemin (Fig. 2) は hMSC の培養期間の長さによってそれぞれの発現レベルは低下した。一方、Wnt-8B についてはどの培養期間においてもその発現は認められなかった。さらに、細胞増殖、分化、アポトーシス、細胞外マトリックス形成、免疫抑制そして発癌などの制御に係わる TGF β について検討した。TGF β には 3 つの分子種が存在 (TGF β 1, 2, 3) し、TGF β は細胞表面にある 3 つのタイプの受容体 (TGF β R1, II, III) を通じてシグナルを細胞内へ伝達する。TGF β R1 と TGF β RII はセリン-チロシンキナーゼで、TGF β RIII はペータグリカンとして知られている。¹²⁾ TGF β はまず TGF β RII に直接か又は TGF β RIII を介して結合し、TGF β RII によって TGF β R1 を刺激することで細胞内 TGF β シグナル伝達系がスタートする。活性化された TGF β R1 が Smad2 若しくは Smad3 をリン酸化したのち、シグナルを核内へと伝え c-

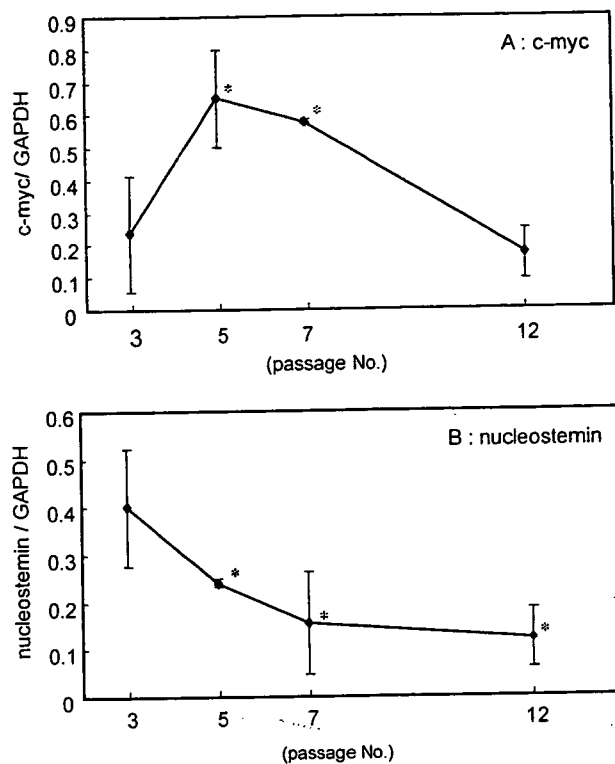


Fig. 2. Effect of *In vitro* Culture Length on the mRNA Expressions of c-myc (A) and Nucleostemin (B) in hMSC¹⁶⁾
Expressions of the two genes relative to GAPDH in confluent cultures of hMSC in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with standard deviations from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (* $p < 0.05$).

myc のような TGF β に依存する遺伝子の転写を制御する。^{13,14)} そのため、TGF β の 3 種類の分子種と 3 タイプの受容体及び Smad3 についても hMSC の培養期間によるその発現レベルの変化について調べた。TGF β 1 及び TGF β 2 は *in vitro* での培養を続けることによってその発現レベルが上昇したが、TGF β 3 は変化しなかった (Fig. 3)。受容体についてはタイプ I は上昇したが、タイプ II 及び III は変化がみられなかった (Fig. 3)。Smad3 は TGF β 1, β 2 及び TGF β R1 と同様に上昇した。以上の結果から hMSC の培養中の遺伝子発現について、TGF β →c-myc へのシグナル伝達系に係わる因子についての変化を Fig. 4 にまとめた。hMSC は *in vitro* での培養を続ける過程で、TGF β →TGF β R1→Smad3→c-myc の経路で細胞周期停止が起こり、細胞の増殖が抑制されるのかもしれない。

以上の結果から、hMSC を *in vitro* で培養することによって通常はその増殖能が徐々に低下していき、その間の遺伝子発現の変化からも上皮系の他の

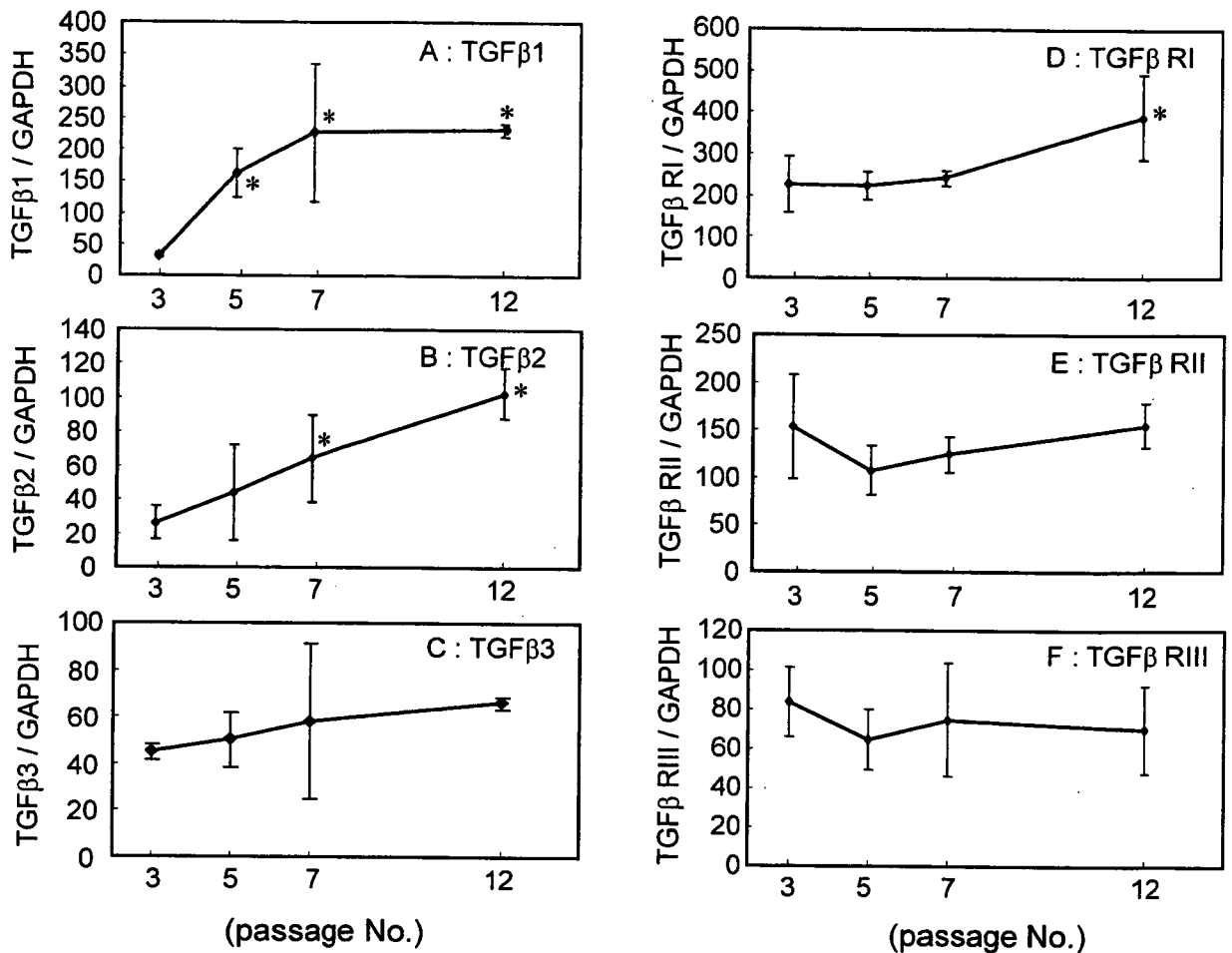


Fig. 3. Effect of *In vitro* Culture Length on mRNA Expressions of TGFβ1 (A), TGFβ2 (B), TGFβ3 (C), TGFβRI (D), TGFβRII (E), and TGFβRIII (F) in hMSC¹⁶

Expressions of the four genes, relative to GAPDH, in confluent cultures of hMSC in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative real time RT-PCR. Mean values with standard deviations from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (* $p < 0.05$).

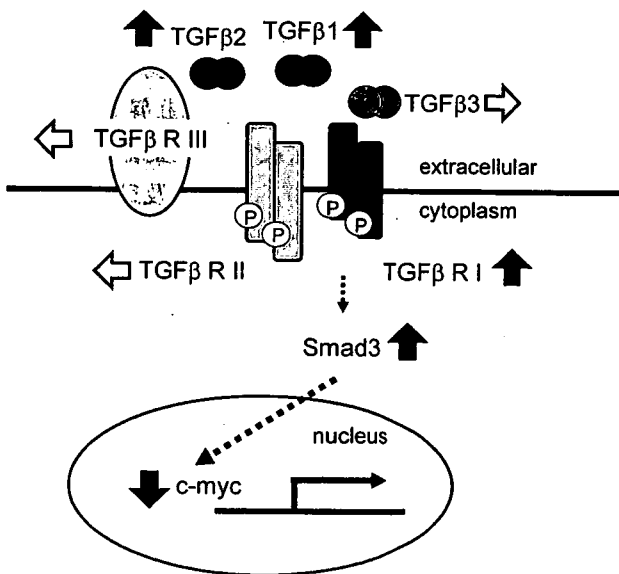


Fig. 4. Changes in the Expressions of TGFβ Signaling Genes during hMSC *In vitro* Culture for Three Months

細胞と同様なメカニズムで細胞増殖抑制が起こっていると考えられる。もしもこのような細胞の変化が「正常」な変化であると考えた場合、hMSCが培養中に形質転換等の望ましくない変化を起こした場合には違った発現パターンがみられる可能性があり、本研究で検討した遺伝子が幹細胞における培養中の変化に対する安全性評価の1つの指標となり得るかもしれない。現在、遺伝子発現の変化におけるhMSCの個体差を考慮し個体差を超えた共通性を見出すために、複数の個体由来のhMSCを研究対象とし、また細胞の癌化や老化という観点からも更なる検討を行っている。

4. 幹細胞と癌細胞における遺伝子発現の比較について

幹細胞の癌化について、その危険性を評価するためには「自然に癌化した」幹細胞との比較検討が必

要であると思われる。しかし、現段階でそのような幹細胞は得られていない。そのため、筆者らはこれまでにライン化された数種類の癌細胞と幹細胞(hMSC)を、特に「細胞増殖」や「発癌」に係わると考えられている遺伝子についてその発現を比較した。「細胞増殖」に係わる遺伝子についてはその発現が上皮系の癌細胞では幹細胞よりも高いものもいくつか認められたが、肉腫細胞との比較ではその限りではないものもあり、未だ検討の余地が大きく残されている。つまり、幹細胞と癌細胞の違いを明らかにし幹細胞の癌化の指標となる遺伝子を決定するためにはさらなる検討を必要としている。特に現在、癌幹細胞の存在も広く認められてきており、⁹⁾組織幹細胞と癌幹細胞との共通性や特異性を明らかにしていくことが望まれる。それが最終的に幹細胞の癌化のメカニズムを探る1つのきっかけとなるであろう。

5. おわりに

再生医療を目的とする幹細胞の研究は、わが国でも非常に盛んに行われている。特に間葉系幹細胞を用いることによる有効性については、骨・軟骨再生から心筋梗塞治療に至るまで幅広い臨床分野で報告されている。また、先頃厚生労働省より「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が公布され、幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器についてさらなる臨床研究の発展が期待される。しかし一方で、実際に幹細胞を用いる際の安全性について評価する明確な基準は今のところ制定されていない。幹細胞の調製の際に無菌的に取り扱うための基準等は定められているものの、幹細胞自身の安全性さらに生体内へ移植したのちの癌化等を含む安全性を担保するための評価法については確立しておらず、その早期確立が求められている。また幹細胞が将来的に「細胞組織利用医療機器」としての材料となるためには auto だけでなく allo も視野に入れていかなければならず、より一層早急な対応が望まれる。現在、幹細胞の調製段階において MSC 及び繊維芽細胞のマーカー遺伝子の発現をみることによって骨髄間葉系幹細胞の均一性を検査する方法を Kato ら¹⁵⁾が提案しており、われわれは同様な方法で細胞の癌化に対する安全性評価法を確立できたら幹細胞の調製時にその均一性と安全性を同時に簡便に評価できるのではないかと考え、そのマーカー遺伝子の探索を行っ

ている。細胞組織利用医療機器として移植された幹細胞が生体内で癌化等の望ましくない変化を起こさないかどうか確認するためには、本来ならば10年単位の非常に長期的な観察が必要であろう。しかし現時点である程度癌化の予測ができるような評価系を確立しなければ、最新の技術によって支えられた「細胞組織利用医療機器」という次世代の医療機器の開発を妨げることになってしまう。そのため、筆者らは幹細胞の安全性評価法の早期確立を目指して、第一段階として移植前の *in vitro* 培養中の細胞の変化について検討し、幹細胞の増殖能に関する性質を探ることで、そこから逸脱しないという形での基準作りを試みている。本稿で述べた研究内容はその第一歩である。「細胞組織利用医療機器」の実現のために少しでも貢献できるように現在も検討を続けている。

REFERENCES

- 1) Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., Verfaillie C. M., *Nature*, **418**, 41-49 (2002).
- 2) Rosenthal N., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 267-274 (2003).
- 3) Korbling M., Estrov Z., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 570-582 (2003).
- 4) Hishikawa K., Miura S., Marumo T., Yoshiohka H., Mori Y., Takato T., Fujita T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 1103-1107 (2004).
- 5) Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K. K., Marx J. C., Neel M. D., McNall R. Y., Muul L., Hofmann T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 8932-8937 (2002).
- 6) Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. N., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S., *Science*, **284**, 1168-1170 (1999).
- 7) Mangi A. A., Noiseux N., Kong D., He H., Rezvani M., Ingwall J. S., Dzau V. J., *Nat. Med.*, **9**, 1195-1201 (2003).
- 8) Strauer B. E., Brehm M., Zeus T., Kostering M., Hernandez A., Sorg R. V., Kogler G., Wernet P., *Circulation*, **106**, 1913-1918

- (2002).
- 9) Pardal R., Clarke M. F., Morrison S. J., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 895–902 (2003).
 - 10) Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A., *Cancer Res.*, **65**, 3035–3039 (2005).
 - 11) Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K., *Stem Cells*, **24**, 1294–1301 (2006).
 - 12) Lopez-Casillas F., Cheifetz S., Doody J., Andres J. L., Lane W. S., Massague J., *Cell*, **67**, 785–795 (1991).
 - 13) Massague J., Wotton D., *EMBO J.*, **19**, 1745–1754 (2000).
 - 14) Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.-H., *J. Cell Sci.*, **114**, 4359–4369 (2001).
 - 15) Ishii M., Koike C., Igarashi A., Yamanaka K., Pan H., Higashi Y., Kawaguchi H., Sugiyama M., Kamata N., Iwata T., Matsubara T., Nakamura K., Kurihara H., Tsuji K., Kato Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 297–303 (2005).
 - 16) Sawada R., Ito T., Tsuchiya T., *J. Artif. Organs*, **9**, 179–184 (2006).

再生医療技術の最前線

Recent progress in Regenerative Medicine Technologies

監修：岡野光夫，大和雅之

Supervisor : Teruo Okano, Masayuki Yamato

シーエムシー出版

2 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

2.1 はじめに

土屋利江*

正常組織や器官、臓器の恒常性維持や細胞の分化に重要な役割を担う機能として、ギャップ結合を介した細胞間連絡機能 (gap-junctional intercellular communication; GJIC) がある。GJIC は、直径が約 1~2 nm 程度の管の穴が、隣り合う細胞と細胞との間に存在する。これを構成するタンパクがコネクソンと呼ばれている。分子量 1,000 程度の分子が、コネクソンからなる管を通過する。

コネクソンは、6つのコネクシン分子から構成され、細胞の膜に存在している。隣接した細胞のコネクソンと連結して、細胞間の連絡が可能となる。コネクシン分子は、N端側およびC端側が細胞内に存在している。Protein kinase Cの活性化により、C末側に存在するチロシン残基のリン酸化により、ギャップ結合が閉じることが知られている。その結果、細胞間の連絡機能が阻害される。

ギャップ結合細胞間連絡機能の阻害は、一般的に可逆的であると考えられている。たとえば、protein kinase C 賦活剤である 12-*o*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) の場合には、TPA を添加すると、時間単位でのコネクシンのリン酸化 (hyperphosphorylation) が見られ、GJIC 阻害作用が観察されるが、TPA 作用によるシグナルは短時間で消失し、それに伴って、GJIC 機能は回復する。そこで、コネクシンのC末側のリン酸化をうけるチロシンを別のアミノ酸で置換したコネクシン遺伝子を導入した細胞では、protein kinase C 賦活剤による GJIC 阻害作用は、見られなくなる¹⁾。しかし、がん化した細胞では、この GJIC 機能は、低下あるいは消失している。材料でがん化した細胞のコネクシン遺伝子について、DNA 塩基配列を調べた結果、遺伝子の変異はなかった。しかし、コネクシン遺伝子からの mRNA への転写活性が抑制されていた。したがって、mRNA から翻訳されたタンパク質の発現量も低下あるいは消失していることを、ウエスタンブロット解析により確認している²⁾。

以上述べたコネクシン研究は、コネクシン 43 について明らかにした実験結果である。ヒトでは、コネクシン 43 を含めて、約 20 種のコネクシン遺伝子が知られており、各コネクシン分子種は、組織特異的に発現していることも知られている。

次に、再生医療分野のキーマテリアルであり、心筋再生、角膜再生ですでに治療効果が明らかになっている細胞シート工学材料の GJIC 機能に及ぼす作用について紹介する。

* Toshie Tsuchiya 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長

2.2 細胞シート工学材料が細胞に優れた効果を示す科学的根拠に関する研究

培養ディッシュにコーティングした温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが、正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に与える影響および、そのギャップ結合細胞間連絡機能を担うタンパク質の一種であるコネキシン 43 の発現に与える影響、さらに繊維芽細胞の増殖に与える影響に関する研究を行った³⁾。温度に应答して相変化を起こす温度応答性ポリマーは、薬剤運搬機構、細胞培養、生体分子の分離などの様々な分野において、機能性の素材として研究されてきた。温度応答性ポリマーであるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは、32℃ 以上で相変化を起こして脱水状態になり、コンパクトな鎖状形態になる。この特性を利用して、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは様々な培養細胞を分離するための培養装置として研究されてきた。近年、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュを用いた回収方法により培養細胞を、単層のシート状組織として回収することが可能となった。シート状の細胞組織は、生体内において臓器形成の基本単位となるものであり、単一の細胞と比較して高い自己組織化能を有し、自ら臓器を形成する性質がある。

上記の回収方法では、トリプシン処理を行わないため細胞膜に存在する機能性タンパク質が損傷を受けることがなく、ギャップ結合細胞間連絡機能も維持されている。ギャップ結合は、隣り合う哺乳動物細胞間に存在する 1.5~2.0 nm の細胞膜チャンネルであり、増殖制御物質の選択的通路として機能する。ギャップ結合細胞間連絡機能は、細胞増殖、細胞分化および組織恒常性において重要な役割を担い、組織再生においても重要な機能であると考えられている。

ギャップ結合細胞間連絡機能が、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドから受ける影響については未だ解析されていない。本研究は、電子線の照射により重合化したポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたポリスチレンディッシュが、培養した正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能に与える効果を解明した。さらに、細胞の増殖に与える影響や細胞間連絡機能の構成タンパク質の 1 つであるコネキシン 43 の発現に与える影響を解析した。

正常ヒト皮膚繊維芽細胞は、25, 100, 250, 500 KGy の電子線を照射して重合化したポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュと、コーティングしていないディッシュで培養した。細胞がコンフルエントに達した後に、ギャップ結合細胞間連絡機能 Scrape Loading Dye Transfer Assay (SLDT 法) により解析した。SLDT 法は、蛍光染色液の移行する距離によってギャップ結合細胞間連絡機能を検討する解析法である。コネキシン 43 の発現はウエスタンブロッティング法により検出した。細胞の増殖は、タンパク質の量を測定することで決定した。平均分子量 22,000 のポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを購入して使用した。正常ヒト皮膚繊維芽細胞は 10% ウシ胎児血清, 1% ペニシリン-ストレプトマイシン含有 DMEM 培地で 37℃, 5% CO₂ で培養した。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたデ

第6章 安全性

イッシュの作製は、*N*-イソプロピルアクリルアミドをイソプロピルアルコールに溶かして濃度40%の溶液にした後に、その溶液100 μ lを35mmディッシュに加え、広域電子線システムを用いてそれぞれ25, 100, 250, 500 K Gy の電子線を照射して単量体の*N*-イソプロピルアクリルアミドを重合化して4種類のディッシュを作製した。コーティングしたディッシュは2mlの冷水で5分間洗い、洗いを3度繰り返した後に風乾した。

SLDT法を用いてGJIC機能を評価した。SLDT法は、ギャップ結合を通して染色液が移行した距離によってギャップ結合細胞間連絡機能を評価する方法である。コンフルエントの状態の細胞に切れ目を入れ、蛍光色素であるルシフェルイエローを加えてから10分後に、蛍光染色液の移行した距離を室温で蛍光顕微鏡を用いて計測した。ウエスタンブロット法は、コネキシン43を認識する一次抗体を1/1,000に希釈し、2次抗体を1/5,000に希釈して使用した。一次抗体、二次抗体を処理した後に、ECLキットを用いて検出した。タンパク質量は、BCA (Bicinchoninic acid) 法を用いて測定した。細胞から抽出したタンパク質サンプルと市販の試薬を混合して30分間インキュベーションし、562 nmで吸光度を計測して、タンパク質量を測定した。 2.0×10^5 個の正常ヒト皮膚繊維芽細胞をコーティングしていないディッシュと、ポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミドをコーティングした4種類のディッシュ(電子線25, 100, 250, 500 K Gy を照射)に播種した。ポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュに対する正常ヒト皮膚繊維芽細胞の接着する能力は、コーティングしていないディッシュで2~4日培養した繊維芽細胞とほぼ同程度であった。しかしながら、500 K Gy の電子線を照射したディッシュを用いた培養の初期段階では、細胞の接着率がわずかに劣ることが判明した(図1)。この結果から、ポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミドの細胞への接着性と、*N*-イソプロピルアクリルアミドに照射した電子線量の間に関係があることが明らかとなった。ディッシュ表面にコーティングされた4種類のポリマーは、細胞の接着、増殖および分化を制御する主要な因子の1つであるが、そのポリマーの浸潤性にわずかの違いがあることが考えられる。コーティングしていないディッシュと、コーティングしたディッシュの両方において細胞は完全に接着し、4日後にコンフルエントに達した。

コーティングしていないディッシュとコーティングしたディッシュの両方において、ギャップ結合細胞間連絡機能の測定を行った。その測定は、正常ヒト皮膚繊維芽細胞が完全なコンフルエントに達した後に、SLDT法により行った。染色液の移行した距離は200~330 μ mである。ポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミドをコーティングした全てのディッシュ上の細胞は、コーティングしていないディッシュの細胞より約1.4倍以上の高いルシフェルイエロー染色液の移行を示していた。25, 100, 500 K Gy の電子線を照射したディッシュではあまり変わらないが、250 K Gy の電子線を照射したディッシュでは最高値を示した(図2, 3)。細胞増殖度を比較するために、

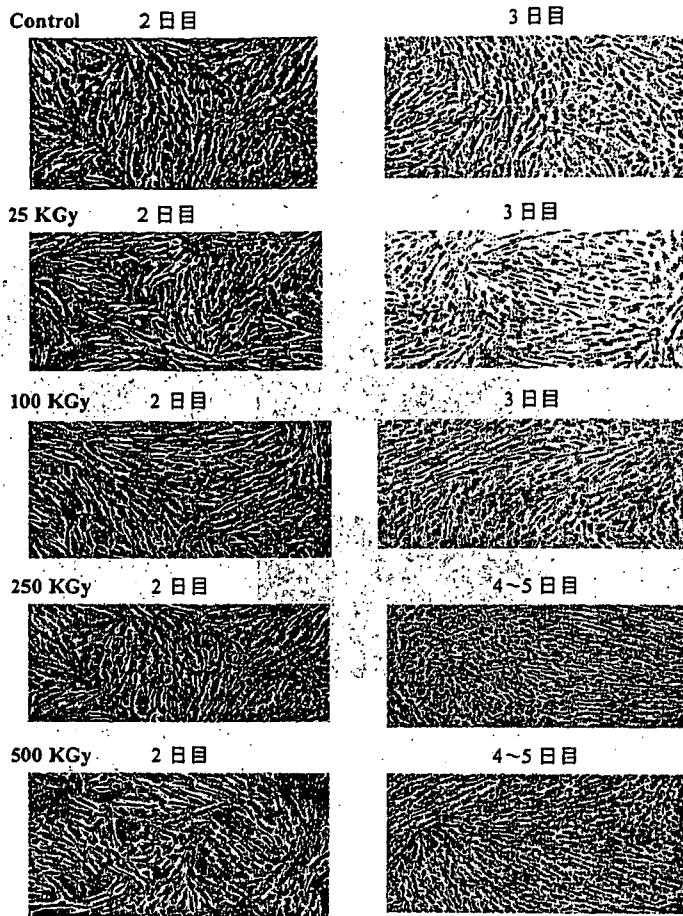


図1 コーティングされていないディッシュと、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュ(25 KGy, 100 KGy, 250 KGy および 500 KGy) の正常ヒト皮膚繊維芽細胞の接着 (文献3より引用)

細胞増殖をタンパク質量で比較した。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュから回収した細胞数は、コーティングしていないディッシュから回収した細胞数と比較して、その細胞数の減少は認められない。100 KGy および 250 KGy を照射したディッシュで培養した細胞は、コーティングしていないディッシュから回収した細胞数と比較して増加が確認された (図4)。

正常皮膚繊維芽細胞の細胞膜に存在するコネキシン43の発現量を、ウエスタンブロッティング法により解析した。リン酸化されていないコネキシン43であるNPバンド、リン酸化されたP1バンド、コネキシンが細胞間連絡機能を果たすうえで重要な機能性のP2バンドの3つを確認できる (図5, 6)。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュから

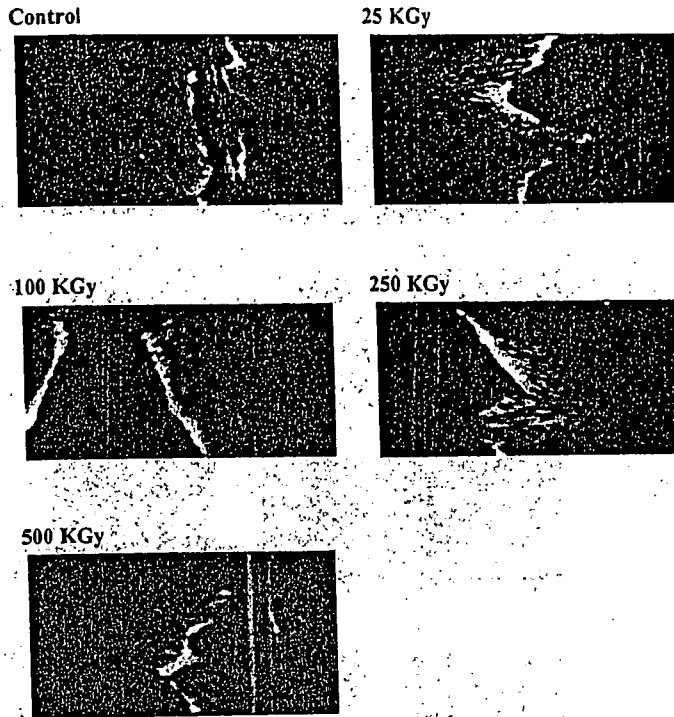


図2 コーティングされていないディッシュと、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュ (25 KGy, 100 KGy, 250 KGy および 500 KGy) 上の正常ヒト皮膚繊維芽細胞のSLDT法によるギャップ結合細胞間連絡機能の測定 (巻頭カラー参照)
(文献3より引用)

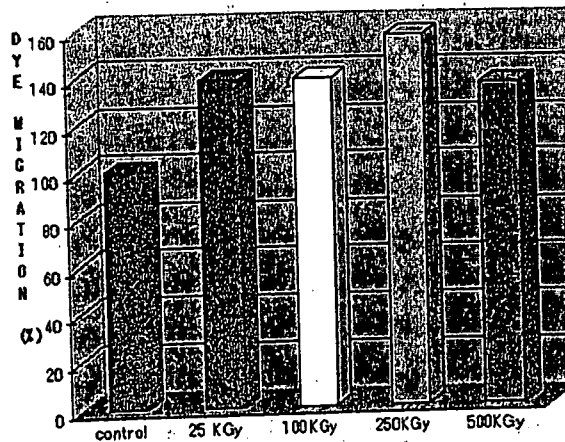


図3 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュおよびコーティングしていないディッシュ上の正常ヒト皮膚繊維芽細胞の蛍光色素移行比率の比較

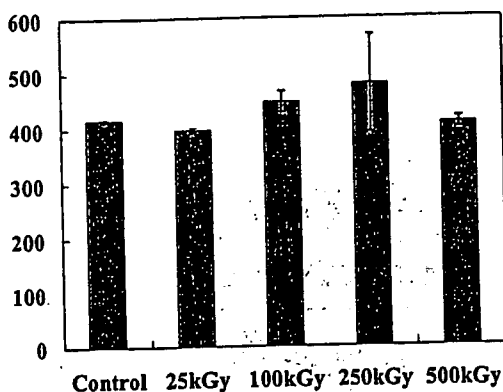


図4 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュおよびコーティングしていないディッシュ上の正常ヒト皮膚繊維芽細胞の細胞増殖度比較

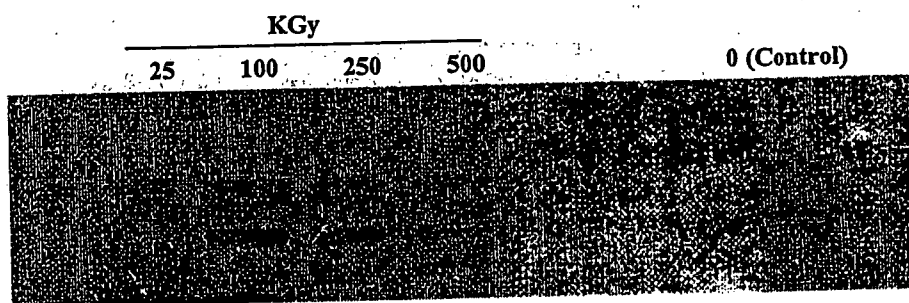


図5 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュ (25, 100, 250 および 500 KGy) で培養した細胞で発現したコネクシン 43 のウエスタンブロットニングによる比較 (上から P2, P1, NP バンド)

回収した細胞では、コーティングしていないディッシュから回収した細胞と比較して NP, P1, P2 のいずれのバンドにおいても発現量は増加した。100 KGy および 250 KGy の電子線を照射したディッシュで培養した細胞においては、バンドの発現量は特に高く、ほぼ同レベルの増加が確認された。250 KGy の電子線を照射したディッシュで培養した細胞では、最もギャップ細胞間連絡機能が亢進されていたが、機能性のコネクシンである P2 バンドも 250 KGy のディッシュにおいて最も高い値を示している。本研究から、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュは、正常ヒト皮膚繊維芽細胞のギャップ結合細胞間連絡機能を亢進し、さらにその機能を担うタンパク質の一種である、コネクシン 43 の発現を増加させることが判明した。

上記の結果から、温度応答性ゲルを用いた細胞の分離・回収の際に細胞膜タンパク質が損傷を受けず、ギャップ結合細胞間連絡機能が維持されることは明白である。観察された機能性のコネ

第6章 安全性

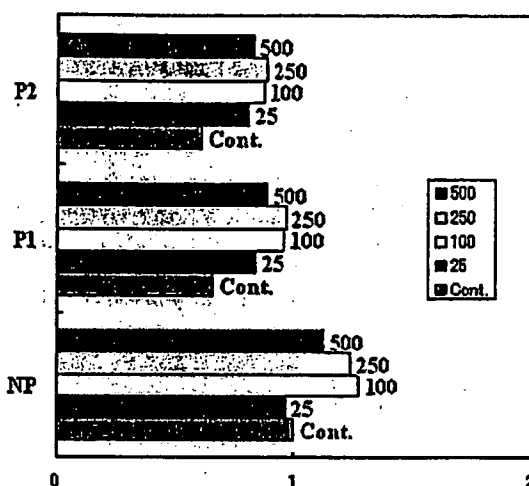


図6 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドをコーティングしたディッシュ (25 KGy, 100 KGy, 250 KGy および 500 KGy) で培養した細胞のコネキシン 43 の NP, P1, P2 バンドの発現量の定量化による比較

キシシン 43 である P2 バンドの増加が、細胞間連絡機能の亢進の一因である可能性が考えられる。また、コネキシンは約 20 種類が存在するが、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが今回解析したコネキシン 43 以外のコネキシンの発現を亢進させている可能性も考えられる。

以上の実験から見出される特性は、種々の細胞を培養して再生臓器を構築する目的に適しているため、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは、人工器官の開発に安全な生体素材として使用できる可能性があると考えられる。細胞シートは、組み合わせることで3次元的な立体臓器の構築が可能となる、次世代の組織工学の技術である。今後、当研究室で開発中の機能性素材と共に応用することで、さらなる画期的な技術の開発が可能であると考えられる。その他、コネキシンが細胞分化に関与していることも明らかになっている。これらについては、関連する文献リストを記載しておく⁴⁻⁹⁾。

現在、GJIC 機能は、バイオマテリアルの安全性と生体適合性指標として有用であり、さらに再生医療品の有効性指標として使用できるのではないかと考えている¹⁰⁻¹³⁾。ASTM において、GJIC 機能を測定できる SLDT 法の標準化をめざし、文書化を行っている¹⁴⁾。

文 献

- 1) Akira Ichikawa and Toshie Tsuchiya, *J. Biomedical Materials Research*, 62, 157 (2002)

再生医療技術の最前線

- 2) Akira Ichikawa, Toshie Tsuchiya, *Animal Cell Technology*, 12, 269 (2002)
- 3) Tsutomu Nagira *et al.*, *Tissue Engineering*, 11 (9-10), 1392 (2005)
- 4) Yuping Li *et al.*, *Biomaterial*, 27, 1437 (2006)
- 5) Ryusuke Nakaoka *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 74 (2), 181 (2005)
- 6) Nagahata M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315 (3), 603 (2004)
- 7) J. Yang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 80 (2003)
- 8) Jeong Ung Park and Toshie Tsuchiya, *Tissue Engineering*, 8, 419-427 (2002)
- 9) Ryusuke Nakaoka *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 35, 391 (1997)
- 10) Toshie Tsuchiya, *Tissue Engineered Medical Products*, STP 1452, 254 (2004)
- 11) Ryusuke Nakaoka *et al.*, *J. Biomed. Mater. Research*, 57, 567 (2001)
- 12) Toshie Tsuchiya, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 11, 947-959 (2000)
- 13) Toshie Tsuchiya and Akitada Nakamura, *Surgical Implants and Other Foreign Bodies*, 74, 290 (1999)
- 14) Toshie Tsuchiya, ASTM X XXXX-XX WKI 2008

再生医療技術の最前線

2007年5月23日 第1刷発行

監修 岡野光夫, 大和雅之 (T0552)
発行者 島 健太郎
発行所 株式会社シーエムシー出版
東京都千代田区内神田1-13-1 (豊島屋ビル)
電話 03(3293)2061
大阪市中央区南新町1-2-4 (椿本ビル)
電話 06(4794)8234
<http://www.cmcbooks.co.jp/>

〔印刷 美研プリンティング株式会社〕 © T. Okano, M. Yamato, 2007

定価はカバーに表示してあります。
落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複製(コピー)することは、
法律で認められた場合を除き、著作者および出版社の権利の侵害
になります。

ISBN978-4-88231-676-3 C3047 ¥65000E