

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

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

平成17年度～平成19年度

総合研究報告書

主任研究者 土屋利江

平成20年（2008）年4月

## 目次

### I. 総合研究報告

医療機器・医療材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究  
土屋 利江

総-1

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行物・別刷

# I 総合研究報告

総合研究報告書

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

主任研究者 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所療品部 療品部長

要旨

本研究では、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、培地等による有害作用の防止に関する研究を10項目行い、以下の研究成果を得た。

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

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た。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。

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

本研究では、ヒト細胞を利用した新しい発熱性物質試験法(Human Cell-based Pyrogen Assay, HCPT)の有効性を総合的に評価するため、Toll-Like Receptor (TLR) アゴニストに対するヒト単球様 MM6-CA8 細胞、同 THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞の反応特性について検討した。また、細胞の継代安定性、食食機能、発熱マーカーに関して検討したと共に、エンドトキシン(lipo-polysaccharide, LPS)吸着性材料であるコラーゲン/ハイドロキシアパタイト(HA)人工骨や市販創傷被覆剤に HCPT を適用し、過去に実施した LPS 汚染サーベイ試験結果と比較検討した。

MM6-CA8 細胞及びヒト末梢血細胞を使用した HCPT では、IL-6 産生能を指標として、LPS をはじめとした種々の TLR アゴニストを高感度で検出できることが確認されたと共に、食食作用による免疫応答も検出できることが判明した。MM6-CA8 細胞の細胞形態や老化状況は30代目まで大きな差異はないが、IL-6 産生能については、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。市販製品の HCPT では、エンドトキシン試験及びウサギ発熱試験との相関性が認められたと共に、混入する LPS の種特異性に関する情報も得られた。また、天然医用材料のヒトに対する微生物学的安全性は煩雑な抽出操作を行わなくとも、固形試料を用いる direct HCPT により評価できることも明らかとなった。

以上、direct HCPT は感度的にリムルス試験と大差がなく、種々の発熱性物質を探知できる利点を持つと共に、試料に対するヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、組織工学製品をヒトに適用した際の生体反応を評価する上で大きな利点を持つことが確認された。

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

移植用間葉系幹細胞の品質検査のために、DNA microarray および Real time RT-PCR を用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に選択的に発現している多数のマーカー遺伝子を同定した。これらのマーカー遺伝子には、腸骨、大腿骨、脛骨、歯槽骨由来の間葉系幹細胞で共通して高レベルに発現しているもの(共通マーカー)と、歯槽骨由来の間葉系幹細胞でのみ、あるいは歯槽骨以外の間葉系幹細胞でのみ高レベルに発現しているもの(部位特異的マーカー)が存在した。これらの間葉系幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを測定することにより、移植用間葉系幹細胞の品質検査を簡便にかつ正確に行えるようになった。しかもこの検査法は、歯周病に対する細胞治療の臨床研究でも有効であった。

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

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品質検査を行った。また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、および品質検査法を加えて MSC の安全性検査を統合化(血液検査、血清検査、培養液検査、培養細胞検査のガイドライン案を提案)して、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2年間の実証作業を完了した。

5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

単一細胞の染色体 DNA 損傷、とくに2重鎖切断による DNA 断片化を高精度に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFGE)を開発した。本法は位相を90度ずらした2組の電極を用い、直交電場

を印加することにより長鎖 DNA を分離する。ヒト精子は極めて多様な DNA 断片化パターンを示した。

SCPFGE 電気泳動像を指標として、DNA 断片化精子を分画、除去した。Percoll 沈降速度差遠心分離法。オプチデイツ沈降平衡法により精子を分画し、最終的に swim up 法により運動精子を分離すると、DNA 損傷比率は 1%以下に低下した。初代細胞、幹細胞培養において培養環境の精度向上、感染防御、取り違い防止の観点から複数症例の同時培養回避、培養過程の追跡性保証を図るため、低酸素培養が可能な使い捨て培養システムを開発した。

#### 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

心臓移植患者を対象に、移植待機中と移植後の抗 HLA 抗体 (PRA 値) を測定し、移植後の拒絶反応を含めた臨床的パラメータとの関係を検討した。同種細胞移植による再生医療を安全かつ効果的に試行するには、アロ免疫応答のモニタリングと制御が必要となる事が示唆された。心筋梗塞急性期に対する細胞移植療法におけるアロ骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) 移植およびアロ骨格筋芽細胞 (skMB) 移植の有用性を評価した。アロ MSC は免疫応答を惹起せず治療効果を認めたが、アロ skMB は免疫応答を惹起し、治療効果を認めなかった。

以上から虚血性心疾患に対するアロ細胞移植を臨床に応用するためには慎重検討する必要があると考えられた。

#### 7. 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

再生医療において非自己の細胞ソースを得ることは再生医療が発展していく上で重要である。本研究室では 1995 年から白血病治療のための臍帯血バンクを立ち上げ臍帯血移植においてその成果をあげてきた。臍帯血による治療の対象をこのシステムを利用してさらに広げることがめざし、医療廃棄物として処理される胎盤と臍帯血が再生医療における新しい細胞供給源となりうるか、その可能性を探る研究を進めてきた。臍帯血の間葉系幹細胞の採取が当初は難しかったことから、最初に胎盤組織に注目し、胎盤の胎児側、母体側それぞれから絨毛組織を切り出し、Explant 法で間葉系幹細胞を分離・培養する方法を確立した。胎盤絨毛から得られた間葉系細胞は骨髄や脂肪組織から得られる間葉系細胞と同じ間葉系細胞の表面マーカーを示した。この胎盤絨毛由来細胞は骨細胞、軟骨細胞への分化能を持ち、また脂肪細胞、神経様細胞への分化能も確認された。一方、細胞の寿命を延長させる目的で、lenti virus に組込んだ Bmi-1 および Telomerase 遺伝子を細胞に導入した。この寿命延長させた胎盤絨毛由来間葉系細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を維持していた。次にこれまで難しかった臍帯血由来間葉系細胞の分離法を検討し、臍帯血由来間葉系細胞の分離率は臍帯血の量と採集から分離までの時間に依存する事を明らかにした、この臍帯血由来間葉系細胞は *in vitro* で種々の細胞に分化可能であったが特に軟骨細胞へ高い分化能を示した。動物モデル実験において、分化誘導後胎盤及び臍帯由来間葉系細胞は生体内に骨、軟骨の形成が確認された。これらのことから、ヒト胎盤と臍帯血は再生医療の非自己の細胞ソースとして有用である可能性を明らかにした。胎盤組織と臍帯血から間葉系幹細胞を品質管理された状態でバンキングするシステムの構築は再生医療において有用であると考えられる。

#### 8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSC) はその多分化能を有することと免疫調節性の性質から組織の修復・再生だけでなく免疫制御性の細胞治療において前途有望なツールになると期待されている。しかしながら、未だに免疫調節性の詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。本研究では間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子メカニズムを解明することに焦点を当て、その機能に関わる因子の同定を試みた。一方、MSC を再生医療の細胞ソースとして用いるには培養過程で異種動物由来である血清タンパク質の混入が少ない方がより安全であると考えられる。そこで、無血清培地での培養による MSC の免疫抑制効果への影響について検討した。

#### 9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究 黒澤努

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

#### 10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を細胞組織利用医療機器に応用するためには、*in vitro* で hMSC を増殖させる工程が必要になる。この培養を安全かつ安定的に行うために、分担研究者である加藤幸夫教授らは新しい無血清培地 STK2 を開発した。新規無血清培地 STK2 の hMSC 増殖能について、従来 hMSC の培養に使用されている血清含有培地 2 種 (DMEM, MSCBM) との比較を行った。STK2 は、無血清であるにも関わらず従来の血清含有培地を上回る細胞数が得られることが確認できた。このことから STK2 は、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。hMSC の応用例として骨再生を想定し、ハイドロキシアパタイト (HAp) 粉末が存在する環境下での hMSC の増殖・活性について、培地間で比較する実験を行った。HAp 粉末と hMSC を直接接触させて培養した結果、10 mg/ml を超える添加量ではすべての培地で顕著な細胞活性の低下が見られた。その一方、1 mg/ml までの添加量では、DMEM と MSCBM での細胞活性は HAp 添加量に応じて阻害されたが、STK2 では同条件下で阻害が見られなかった。このことから HAp に播種した hMSC を *in vitro* で培養するような場合でも STK2 の使用は有効であることが示唆された。

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

## A. 研究目的

本研究では、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、培地等による有害作用の防止に関する研究を行うことを目的とする。具体的には、以下の10課題について取り組む。

### 1. 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

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

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 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 1)、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 2, 3)。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(HCPT)の開発が進められている 4-10)。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 TLR family11)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。従来の分析法では、材料からの菌体成分回収率を向上させる必要があるが、HCPT は固形物自体を試験材料として利用できる可能性が高いと共に、ヒト免疫担当細胞の応答性を指標としているため、ヒトに対するリスクを直接評価でき、組織工学製品をヒトに適用した際の生体反応を予測する方法として非常に有益である。

HCPT は医薬品に混入する発熱性物質の検出を行うことを主目的としており、各種の検証実験も終了している 12)。また、バリデーションは終了していないが、HCPT は医療機器への応用も十分可能であり、近年、金属及びプラスチック表面からの菌体成分の検出に HCPT を適用した研究が報告された 10)。過去、我々の研究グループも天然医用材料から製造された創傷被覆剤に含まれる発熱性物質の検出に HCPT を応用し、エンドトキシン試験、ウサギ発熱試験との相

関性について検討した 13)。同研究では、エンドトキシン試験とウサギ発熱試験が陽性である一方、HCPT が陰性となる製品の存在を明らかにしており、HCPT がヒトに対する現実的な安全性を評価する上で非常に有用であることを見出している。

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、TLR アゴニストに対するヒト単球様 MM6-CA8 細胞、同 THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞の反応特性について検討した。また、細胞の継代安定性、食食機能、発熱マーカーに関して検討したと共に、LPS 吸着性材料であるコラーゲン/HA 骨充填剤や市販創傷被覆剤に HCPT を適用し、過去に実施した LPS 汚染サーベイ試験結果と比較検討することにより、HCPT の有用性を総合的に評価した。また、この試験法は、近い将来、日本にも導入されることが容易に予測されると共に、現在、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。

### 3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

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

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

平成17年度

間葉系幹細胞を用いる再生医療では、間葉系幹細胞製品の安全性を評価する標準的な方法が求められている。そこで、本研究では、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する。

平成18年度

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。間葉系幹細胞の臨床効果を保証するには、自家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確立し、さらにそれらに科学的根拠を与える。

平成19年度

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品質管理支援システム案を作成する。

### 5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

不妊治療は組織、細胞移植による再生医療の嚆矢であり、すでに本邦における出生数の1-2%は不妊治療によるものである。不妊治療により出生した児の健全性保証が、重要な課題となっている。In vitro で授精、初期発生を行った胚の移植は本質的には染色体の移植医療であり、われわれは配偶子（卵、精子）、胚のDNA非特異的構造異常（DNA2重鎖切断、片側の開裂、塩基変異）、遺伝子などを多面的に解析する必要があると考えている。

近年、移植を目的とした組織培養が行われるようになり、これらの領域においてもin vitroで増殖させた細胞の質の評価が不可欠であり、形態学的観察に加えて分子生物学的な機能評価が求められる。従来、DNA評価は数百万個の細胞から抽出したDNA標品の解析が中心であったが、移植細胞評価においては細胞1個のDNAを解析する必要がある。

DNAの酸化的損傷回避の観点から、細胞操作、培養をできる限り低酸素環境下で行うことを目的としたシステムを開発した。昨年度から試作を行ってきたガス循環型クリーンベンチ、使い捨てカプセル型培養装置が実用段階に達し、試験運用を開始した。ガス循環型クリーンベンチはクリーンベンチを気密化して5.0%CO<sub>2</sub>-空気を維持、一部には低酸素環境（5.0%CO<sub>2</sub>、2.0%O<sub>2</sub>、93%N<sub>2</sub>）を設置、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）による機器汚染防止した。使い捨てカプセル型培養装置は容量500mlの使い捨てプラスチック容器（ボトル）を使用し、症例毎に1ボトルを使用してセキュリティの向上を図る。細胞、組織が高酸素に暴露される時間を最小限とするため、ボトルのフタを閉じると同時に無酸素ガス（5.0%CO<sub>2</sub>、95%N<sub>2</sub>）で容器内をパージし、その後混合ガス（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、ガス環境を維持した。

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

細胞移植による「再生治療」の効果と安全性を向上させ、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倫理的にも容認可能と考えられるが、アロ免疫応答による拒絶反応への対処が必要になる。本研究の目的は循環器疾患に対する同種細胞移植療法に如何なるアロ免疫応答モニタリングが必要か、ア

ロ細胞を用いて治療効果を得ることが可能かを明らかにすることである。はじめに現行のアロ免疫応答モニタリングと心臓移植臨床経過の関係を明らかにすることを主眼に研究を行った。次に循環器疾患に対する細胞移植療法の有力な細胞源である MSC および skMB について、ラット心筋梗塞急性期モデルを用いてアロ移植の有用性を評価した。

## 7. 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

間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪などに分化することが知られており、さまざまな細胞・組織に存在することが報告されている。ヒト骨髄間葉系細胞では分離後に増殖、目的とする組織細胞に *in vitro* で分化させて移植、再生医療に供する方法が行われている。しかし、骨髄採取は患者への負担が大きいこと、年齢が高い場合や遺伝性疾患などがある場合など、自己の骨髄由来間葉系細胞を常に得ることは難しい。非自己（アロ）細胞の移植が可能になればその適応は飛躍的に拡大すると考えられる。我々は自らの研究室に構築した臍帯血バンクシステムを利用して、造血幹細胞移植用から除外された臍帯血や、臍帯血が提供された後の胎盤がアロの間葉系細胞のソースとなりうるか、その可能性について研究を進めてきた。

## 8. 間葉系幹細胞の免疫制御（寛容）システムに関する研究

MSC を細胞利用した治療に利用していく上で MSC の機能とそのメカニズムを明らかにすることはその有効性、安全性の面からも必須であり今後の課題である。

そこで本研究では MSC の免疫抑制作用について *in vitro* の系で検証し、その分子メカニズムに関わる因子の探索を試みた。また MSC を臨床応用に用いる場合、より安全で安定した MSC を供給するためには培養過程で異種動物由来のタンパク質の混入は少ない方がよい。そこで MSC を無血清培地で培養した際の MSC の免疫抑制効果に変化があるか検討した。

## 9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

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

## 10. 新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

ヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell, hMSC) は、骨、軟骨、脂肪、神経、肝臓等の細胞へ分化可能で、倫理面での問題点も少ないことから、細胞組織利用医療機器の材料として最も実用に近い

ものの一つと考えられている。しかし、生体内から得られる hMSC の数は限られるため、細胞組織利用医療機器へ応用するためには *in vitro* で hMSC を増殖培養する過程を経なければならないであろう。その際培地に使用される血清が、安全上、あるいは必要な細胞数を安定的に得る上で問題点となることが指摘されている。

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

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

今回、この STK2 を用いて hMSC の培養を行い、hMSC の培養に従来用いられてきた血清含有培地 2 種 (DMEM, MSCBM) と細胞増殖速度について比較検討した。STK2 が hMSC 増殖に非常に優れている事はすでに加藤らが報告しているところではあるが、異なる研究機関で使用する hMSC の増殖能について、無血清および血清含有培地間で再確認のための比較実験を行った。

細胞組織利用医療機器への応用を考慮すると、組織再生の足場となるような物質に hMSC を播種した状態で培養するような場合が想定される。今回そのようなケースとして骨再生を想定し、それぞれの培地にハイドロキシアパタイト (Hydroxylapatite, HAp) 粉末を混合した状態での hMSC 増殖・活性についても調べた。HAp は、血清成分や培地成分を吸着する性質があり、細胞の増殖や細胞機能に影響を及ぼすことがこれまでの研究で明らかになっている。また、HAp 由来のイオンが培地中に溶出することも知られている。HAp の存在によって培地の組成が変化し、hMSC の細胞活性が低下する可能性が考えられる。そこで、開発された無血清培地 STK2 の優れた効果が、HAp 存在下でも維持できるかどうかを調べた。

## B. 研究方法

### 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

幹細胞の癌化の危険性について、まず *in vivo* の系として、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。また、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、幹細胞と腫瘍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。さらに、hMSC の *in vitro* 培養期間 (~50 日間) 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 DNA マイクロアレイ解析等を行い比較することによりその共通性について検討した。

## 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

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°C で 2 時間加熱処理を行った。また、プラスチック製器具はピ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、大腸菌 0111 株及び黄色ブドウ球菌 209P 株を普通ブイヨン培地中、37°C で 16 時間振とう培養後、培養液の pH を中性に調整し、100°C、10 分間加熱して殺菌した。同加熱死菌体を連続遠心分離により集菌し、蒸留水で 3 回洗浄した後、エタノール、アセトン及びジエチルエーテルにより順次脱脂し、乾燥菌体とした。

大腸菌 03 株 LPS は、乾燥菌体からフェノール/水法により抽出し<sup>14,15)</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>16)</sup>。

### (2) LPS および菌体スパイク標品の調製

医用材料としては、ブタ皮膚由来アテロコラーゲン (Type I & Type III: 日本ハム製) と多孔性ハイドロキシアパタイト (HA, 東芝セラミックス製ネオボーン: 粒径 0.5-1.0 mm, 孔径 150 µm) を使用した。同コラーゲンに種々の量の大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体及び黄色ブドウ球菌 209P 株乾燥菌体を添加し、凍結乾燥後、直径 1.6 cm、厚さ 1.5 mm の弱架橋化コラーゲンシートを調製した。また、同様の方法により、各種の菌体成分を含むコラーゲン/HA シート (重量比 3:5) を作製した。

### (3) 市販製品

本研究に使用した市販スキャホールドの性状を表 1 に示した。ペンタックス製コラーゲン/HA 人工骨は同社から分与を受け、その他の製品は購入した。市販創傷被覆剤としては、コラーゲン製品 12 種及びアルギン酸製品 3 種を使用した。

### (4) 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。

### (5) 菌体成分含量の測定

コラゲナーゼ (Sigma 社製 Type 1A-S) 溶液 1 ml (1 mg/ml in 5mM HEPES Buffer) を平衡化した Profos 社製 EndoTrap Blue ゲル 100 · 1 入りの試験管に加え、4°C で 8 時間、ロータリーシェーカーを使用して緩やかに攪拌した後、同混合液の全量をもう 1 本の EndoTrap Blue ゲル 100 · 1 入りの試験管に移した。引き続き、4°C で 16 時間、同様にインキュベーションした後、遠心して上清を採取し、精製コラゲナーゼ溶液とした。

LPS は第 15 改正日本薬局方「エンドトキシン試験法」に準拠し、カイネティック比色法により定量した<sup>17,18)</sup>。定量試薬としてエンドスペシー ES-50M (エンドトキシン特異的リムルス試薬: 生化学工業) を用い、標準品として日本薬局方標準エンドトキシン (JPSE, 大腸菌 055:B5 株 LPS) を使用した。測定装置としては SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用した。反応干渉因子試験も日本薬局方の記載に準じて行った。

LPS 含量測定用試験原液は下記のように調製した。コラーゲン材料は正確に重量を測定した後、1 ml の HEPES 緩衝液 (5 mM, pH 7.3) 中、37°C で 16 時間、精製コラゲナーゼにより消化した。処理液を塩酸酸性 (pH 3, 最終容量 2 ml) とし、氷冷下、10 分間超音波処理後、その遠心上清を原液として注射用蒸留水を用いて希釈系列を作製した。無機系材料は無菌的に粉碎した後、PEG 溶液 (0.4% polyethyleneglycol, 50mM EDTA, 1% Tween 20: 使用時 100 倍希釈: 生化学工業) により、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。合成ポリマー材料は PEG 溶液中、ホモジナイザーにより破碎した後、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出して、試験液を調製した。

β-グルカン類はファンギテック G テスト<sup>SM</sup> (生化学工業) を用いて定量した。ペプチドグリカン SLP 試薬 (和光純薬工業) を用いて定量した。β-グルカン及びペプチドグリカン含量測定用試験原液は、正確に秤量した各試料に 1mM KOH (1 ml) を加え、10 分間超音波処理後、100°C · 15 分間加熱し、再度 10 分間超音波処理して調製した。

いずれの測定も SK603 マイクロプレートリーダー (生化学工業) を使用して行った。

### (6) β-ガラクトシダーゼ染色

種々の期間培養した MM6-CA8 細胞を PBS で 2 回洗浄し、10%ホルマリン含有 PBS で固定した後、更に PBS で 2 回洗浄し、Senescence Detection Kit (Oncogene Research Products) を用いて pH 6.0 における β-ガラクトシダーゼ活性を染色法により測定した。

### (7) 細胞培養

細胞としては、ヒト末梢血細胞のほか、ヒト単球

様 THP-1 細胞と MM6-CA8 細胞を用いた。

MM6-CA8 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸 (1 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、ウシインシュリン (9 · g/ml)、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (10 · g/ml) 及びアンホテリシン B (0.25 · g/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 × 10<sup>6</sup> 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 · M)、HEPES (5 mM)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 · g/ml) を含む RPMI1640 培地を使用した。2 × 10<sup>5</sup> 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 · g/ml) 及び calcitriol (0.1 · M) を添加した。37°C で 72 時間培養した後、培地で 2 回洗浄し、培地 (0.9 ml) 及び試料 (0.1 ml 又は 1 mg) を添加して 24 時間培養した。

ヒト末梢血細胞を使用した実験では<sup>10, 12)</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 2 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。

#### (8) 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 · m, Ex=580 nm, Em=605 nm, Molecular Probes) を 0.1 · l 添加して 24 時間培養し、PBS で 3 回洗浄後、ホルマリン固定し、再度、PBS で 3 回洗浄した。同細胞に 5 · l の Rhodamine phalloidin<sup>21)</sup> (Ex=540 nm, Em=565 nm, Invitrogen) を含む PBS 200 · l を添加し、室温下、20 分間インキュベートしてアクチンを蛍光染色した後、再度、PBS で 3 回洗浄した。FluoSphere の食食状況は共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス) を用いて観察した。

#### (9) 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。

#### (10) 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を BioPlex サスペンションアレイシステム (Human 27-Plex Panel, BIO-RAD) 及び Bio-Plex システム (BIO-RAD) を使用して一斉解析した。

### 3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

#### 17 年度

腸骨および歯槽骨からヒト間葉系幹細胞を分離して、FGF-2 存在下で数代にわたって培養して RNA を抽出した。均質性を検討するためには、ヒト間葉系幹細胞の母集団から 10-20 個のクローンを分離して RNA を抽出した。さらに繊維芽細胞からも RNA を抽出した。これらの RNA を DNA マイクロアレイにて解析して、マーカー遺伝子を同定した。またマーカー遺伝子の発現レベルを定量的 PCR で確認した。

#### 18 年度

昨年度に、多くの骨髄由来間葉系幹細胞のマーカー候補遺伝子を同定した。本年度は、これらのマーカーの候補遺伝子の、再生医療での有用性を、多数の骨髄由来間葉系幹細胞株を用いて検定/証明する。一方、数種類のマーカー遺伝子の発現レベルをクローン化した骨髄由来間葉系幹細胞で測定して、クローン間での遺伝子発現パターンを比較することにより、細胞集団の均質性を証明する方法を開発する。均質であれば、全てのクローンが同一の遺伝子発現パターンを示すはずである。

#### 19 年度

1 および 2 年目に、繊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。これらは繊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、繊維芽細胞以外に、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。

倫理面への配慮) 骨髄由来間葉系幹細胞の採取については、広島大学倫理委員会の規則に従い行う。すでに承認済みである。

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

#### 平成 17 年度

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〉において、安全性を評価するための手順を決定し、この手順に従って、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、エンドトキシンの検査

を実施した。

(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。

平成18年度

歯周病を対象として、昨年度から本年度にかけて、間葉系幹細胞を用いた臨床研究(10症例)の安全性を評価した。

また、安全性検査を含む患者情報、臨床スケジュール、培養スケジュール、安全性検査結果を安全に管理する電子システムソフトを段階的に開発した。

平成19年度

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)

本臨床研究は広島大学歯学部病院倫理委員会の承認を受けている。

## 5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

われわれはヒト精子を対象とし、個々の細胞における2重鎖切断(DSB)に伴うDNA損傷を定量的に観察するため、single cell pulse gel field electrophoresis (SCPFG)を開発した。装置は位相を90度ずらした2組の電極を有し、3秒インターバルで直交電場(2.0V/cm、10分間)を印加する。表面親水化処理したスライドガラス上に100・g/mlのアフィニティクロマトグラフィ精製トリプシンを含むアガロースに懸濁した細胞(30万/ml)を滴下し、薄膜ゲルを作成した。これを界面活性剤、トリプシン溶液に浸漬して、細胞融解、核蛋白の除去を行った。

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。

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。

(倫理面への配慮)

検査に供した精液はインフォームドコンセントを得た後、研究に使用した。

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

### 1. アロ免疫応答モニタリングと心臓移植臨床経過

31例の心臓移植適応患者から登録時とその後の経過中に血清を採取し、Panel Reactive Activity (PRA)の測定を行った。PRA値の推移と他の臨床的パラメーター(登録前治療、輸血歴、人工心臓装着の有無、心臓移植後の拒絶反応、血行動態など)の関係を検討した。

(倫理面への配慮) 血清は治療上必要な採血の余剰部分を使用し、総ての対象患者に、血清を含めた採取標本が研究目的に使用され得る事を含めた心臓移植に関するインフォームドコンセントが行われた。また、これら一連の心臓移植治療は大阪大学医学部倫理委員会の承認と第三者評価委員会の監視下に行われている。

### 2. ラット心筋梗塞急性期モデルに対する細胞移植

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

オスのLEWラットおよびACIラットから既に報告されている方法でMSCを単離、培養した。MSCにおけるMHC class I、II、B7.1、B7.2の発現をフローサイトメトリーで解析した。

メスのLEWラットで冠状動脈前下降枝結紮による心筋梗塞モデルを作成し、急性期に細胞移植を施行した。移植細胞5×10<sup>6</sup>個をハンクス緩衝液に懸濁し、梗塞部周縁の5か所に30G針で注入した。LEW由来細胞をドナーとする細胞移植(S群)はMHC完全一致の同系細胞移植であり、自家移植を模擬している。ACI由来細胞をドナーとする細胞移植(A群)はMHC完全不一致の異系細胞移植であり、他家細胞移植を模擬している。細胞なしの緩衝液のみ注入した対照群(C群)は無治療を模擬している。

移植後15分から28日の移植細胞数を心臓組織内の雄性遺伝子コピー数を定量PCR法で測定し評価した。

左室拡張末期径(LVDd)、左室収縮末期径(LVDs)を心臓超音波で測定し、以下の式から左室駆出率(LVEF)を算出した。

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

## 7. 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

母親からインフォームドコンセントを得て正期産後に娩出された胎盤を用いた。胎児側絨毛からExplant法でout-growthさせた細胞を単離増殖させた。臍帯血は採取施設において移植に用いない臍帯血のインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血をフィコールに重層し、比重遠心後に単核球層を回収した。採取細胞をシャーレ上に接着させ、

3-4 週間培養後、形成されたコロニーを回収し増幅させた。また、異なる酸素濃度の培養条件で培養し、臍帯血由来間葉系細胞の回収率と細胞の増殖を検討した。増殖した胎盤及び臍帯血由来間葉系細胞細胞を FACS で細胞表面抗原解析し、得られた細胞に母体側の細胞が混入しているかを検討するために、男児の胎盤とその臍帯血細胞を用いて FISH 法で性別染色体を確認した。次に in vitro で分化誘導培地を用いて培養し、骨、軟骨、脂肪細胞方向への分化能を調べた。骨髄、脂肪組織から同様に接着間葉系細胞を単離して培養し、臍帯血由来間葉系細胞の遺伝子発現、分化能は骨髄、脂肪由来間葉系細胞と比較した。In vivo での軟骨、骨形成について、胎盤と臍帯由来間葉系細胞は足場であるコラーゲンスポンジ、また β-TCP に細胞に挿入し、1 週間誘導培地で培養後、5 週齢のヌードマウス皮下に移植し、軟骨形成は 4 週、骨形成は 8 週後に移植片を取り出してパラフィン包埋切片を作り、組織と免疫解析を行った。またヌードラット膝関節における軟骨骨欠損部に胎盤由来間葉系細胞を移植、6 週後にラットの膝関節を取り出し、欠損部の修復状況を観察した。臍帯血由来間葉系細胞の免疫抑制能を調べるためにマイトジェン (PHA) 処理したヒト末梢血 T 細胞と臍帯血由来また骨髄、脂肪由来間葉系幹細胞をそれぞれ共培養し、活性化 T 細胞の増殖を <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによって観察した。さらに増殖した臍帯血由来間葉系細胞が臨床に使用できるかその安全性について、40 PDL まで増殖した細胞を用いて染色体異常を核分析で調べた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は実地に際して「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、その内容を本研究所倫理審査委員会に申請し、審査承認を受けている。研究に用いる臍帯血は本研究施設と資料譲渡契約と結んでいる採取医療機関 1 施設 (東京臍帯血バンク採取医療機関) において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で分娩後に採取している。分娩後の採取のため、採取に際してドナーの安全性は完全に確保されている。また、研究に用いる臍帯血は東京臍帯血バンクより細胞数等の面から移植用としては適さない臍帯血について、ドナーの同意を得た上で提供を受けている。なお、提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認を受けている。また、採取に際しては、東京臍帯血バンクにおいてドナーに対して問診および家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴のあるドナーからの臍帯血の採取は行わない。臍帯血は東京臍帯血バンクにおいて感染症検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診および家族歴等の個人情報 は東京臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処置を講じている。以上より、提供を受けた試料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に研究従

事者の安全性も確保されている。

#### 8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究 加藤玲子)

1. 活性化 T 細胞への間葉系幹細胞の免疫抑制効果についての検証のため、マウス脾臓細胞を活性化させた状態 (1. アロ免疫応答 2. mitoge 刺激 3. anti-CD3/anti-CD28 刺激) のもの、及びそれらにヒト (マウス) 間葉系幹細胞 (hMSC, mMSC) を共培養したものの両方で細胞増殖およびサイトカインの量 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) の比較を行った。

2. 抑制効果に関わる因子の探索のため、1) 細胞上清を分画し抑制効果をもたらす分子を単離する。2) 定常状態の hMSC (コントロール) とマウス脾臓細胞を活性化させた状態と共培養した hMSC (=抑制効果を発揮している hMSC) の間で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化のある遺伝子 (=免疫抑制効果に関与すると思われる遺伝子) を同定するという二つのアプローチをとった。

3. 無血清培地の MSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討のため、従来の培地 (MSCGM) と無血清培地 (STK2) での培養による hMSC の免疫抑制効果 (細胞増殖、サイトカインの量) への違いを検討した。

#### 9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究 ISO/TC194の策定会議に参加し、情報を収集する。

(倫理面への配慮)

確認すべき安全性試験法確認では動物愛護法等関連法を遵守して行う。

#### 10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

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

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

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を添加した培地 (MSCBM, MCGS 共に Cambrex 社、以下 MSCBM と略記)
- 無血清培地 STK2

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

各培地での培養に際しては 96 ウェルプレートを使用した。各ウェルに 100  $\mu$ l の培地が入った状態で 2000 cells/well (約 6000 cells/cm<sup>2</sup>) となるように hMSC を入れた。hMSC は事前に DMEM (10% FBS) で培養していたものを用い、血清の入っていない DMEM で細胞を洗浄した後、それぞれの培地へ再濁液した。そして、4 日間培養した時点での細胞数を比較した。

細胞数の定量は、Crystal Violet 染色法にて行った。

## 2. ハイドロキシアパタイト (HAp) 存在下での細胞増殖・活性の比較

ハイドロキシアパタイト (HAp) 粉末を各培地 (DMEM, MSCBM, STK2) に混合し、HAp 粉末と hMSC が直接接触する状態で培養して、細胞増殖・活性を比較した。また、HAp 混合培地の上澄みでも hMSC を培養し、HAp 粉末と細胞とを直接接触させた場合と比較した。上澄みでも培養を行ったのは、固形粉末が培養環境に加わることの影響を排除するためである。

まず、実験 1 と同様に 96 ウェルプレートに hMSC の培養状態を用意した。1 日培養した後、アパタイト粉末を混合した各培地の懸濁液およびその上澄みに培地を交換した。培地に対する HAp の混合割合は、0, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml とし、各ウェルに対し 200  $\mu$ l ずつ注入した。さらに 4 日間培養した後、TetraColor ONE (生化学バイオビジネス (株), 800560) を用いて細胞増殖・活性を比較した。

## C. 研究結果

### 1. 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

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。また、幹細胞 (hMSC) と腫瘍細胞 (HOS, OUMS-27, HeLaS3, HepG2) とで遺伝子発現の比較を行ったところ、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 種とで比較した。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。さらに、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 hMSC を用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、*in vitro* 培養期間 (50 日間) 内に発現レベルに変化が無い遺伝子として 3 遺伝子 (c-myc、Bmi-1、PTEN) 抽出された。この 3 遺伝子に加えて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 mRNA 発現レベルを Real-time PCR にて検討した。その結果、c-myc、Bmi-1、KLF4、ATM、PTEN、STAT5B は、培養期間 (50 日) 内における発現レベルにほとんど変化が見られなかった。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、逆に Cx43 は減少する傾向が見られた。

### 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

#### (1) 市販スキャホールドの微生物汚染試験

本研究で使用した 5 種類の製品に含まれる LPS、 $\beta$ -グルカン及びペプチドグリカン量を従来法により測定した結果を表 4 に示した。BD 製コラーゲン製品からは僅かに LPS が検出されたが、リン酸カルシウム及びポリ乳酸により構成される BD 製品からは、微生物汚染の指標であるこれら 3 種の菌体成分が検出されなかった。

ペンタックス製コラーゲン/HA 人工骨からは極微量の  $\beta$ -グルカンが検出されたが、LPS 汚染は認められなかった。しかし、同製品を大腸菌 O3 株 LPS 含有 PBS (1  $\cdot$  g/ml) に浸漬し、凍結乾燥後、精製コラゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験により LPS 含量を測定した結果、LPS 活性が全く検出されなかったことから、同製品は非常に高い LPS 吸着能を示すことが明らかになった。

#### (2) LPS 応答性

IL-6 産生誘導能を指標として MM6-CA8 細胞、THP-1 細胞及びヒト末梢血細胞の LPS 応答性を比較検討した。図 1A に示したように、MM6-CA8 細胞は 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 2 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 2 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 2) 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。

#### (3) TLR アゴニストに対する応答性

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

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た。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が確認された。

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

#### (4) 継代に伴う MM6-CA8 細胞の性状変化

HCPT においてライン化細胞を使用する場合、試験に供する細胞数を得るために時間を要することが欠点の 1 つに挙げられる。この問題は細胞を常時継代することにより回避できるが、継代に伴って菌体成分に対する細胞応答性が変化する可能性がある。そこで、MM6-CA8 細胞の継代安定性を評価した結果、図 2 に示したように、細胞形態は 30 代目まで大きな差異がないが、老化の指標となる  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色性は継代に伴って増加する傾向が認められた。また、図 3 に示したように、LPS 刺激に対する IL-6 産生能も、8 代目以降、継代数の増加に伴って低下する傾向があることが確認された。

#### (5) 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 4 に示したように、粒径  $1 \cdot m$  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。

#### (6) 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  $1 \cdot m$ ) 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、図 5 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 5)。

検出感度は S/N 比に依存するため、産生量が多くてもバックグラウンドが高い場合、結果として検出感度が低下する。そこで、種々の TLR アゴニスト及び Micro sphere 刺激により誘導されるサイトカイン、ケモカインの S/N 比を考慮して発熱マーカーを検索した。その結果、表 6 に示したように、24 時間刺激後の MM6-CA8 細胞では、IL-6 が最も高い S/N 比を示すことが明らかとなり、また、MIP-1 $\alpha$  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 7 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。

#### (7) Direct HCPT の有用性評価

##### 7-1. 標準試料

種々の量の菌体成分を含むコラーゲンシート 1 mg を試料とし、抽出操作を行うことなく、直接、MM6-CA8 細胞と共培養した時の IL-6 産生量を評価した。表 8 に示したように、菌体成分を含まないコラーゲンシートによって誘導される IL-6 量はバックグラウンド値 (7.5 pg/ml) を多少上回る程度であったが、コラーゲンに大腸菌 03 株 LPS、大腸菌 0111 株乾燥菌体及び黄色ブドウ球菌乾燥菌体をスパイクしたシートでは、添加量に比例して IL-6 産生量が顕著に増加した。同様にコラーゲン/HA シートを試料とした場合も菌体成分の添加量に比例して IL-6 産生量が増加したが、コラーゲン/HA シート自体によっても 51.0 pg/ml の IL-6 が産生された。一方、コラーゲン/HA シートの HA 原材料であるネオボーン自体には、顕著な IL-6 産生誘導能が認められなかった。

##### 7-2. LPS 吸着材料

非常に高い LPS 吸着能を示すペンタックス製コラーゲン/HA 人工骨に direct HCPT を適用し、従来法によるエンドトキシン試験結果と比較検討した。エンドトキシン試験を実施するにあたり、本製品には精製コラゲナーゼ/塩酸前処理法が適用できなかったため、適切な前処理法に関して検討した結果、表 9 に示したように、LPS を添加した同材料からの LPS 回収率は氷冷下で短時間超音波処理する塩酸抽出法を適用することにより改善されることが判明した。また、LPS 回収率は塩酸濃度の上昇に伴って増加すると共に、希釈溶媒として Tris 緩衝液を使用した際に高い値が得られることも確認された。

一方、抽出操作を行うことなく、固形 (粉体) 試料 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養する



direct HCPT を適用した時の LPS 回収率は 23.8%であり、1M 塩酸抽出/Tris 緩衝液希釈法を用いたエンドトキシン試験と同等であることが確認された(表 9)。

### (8) HCPT による市販創傷被覆剤の微生物学的安全性評価

#### 8-1. コラーゲン製品

表 10 に示したように、温水抽出 (50°C・24 時間・注射用水) を用いた過去のサーベイ試験において、テルダーミス及びテルプラグはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、抽出液を用いた HCPT とともに陽性結果が得られている。その他、アロアスク及びノバコールからも僅かに LPS が検出されたが、アロアスクのみが HCPT 陽性となる結果が得られていた。ガイドライン法 (室温・72 時間・生理食塩液) を適用したエンドトキシン試験では、アロアスクを除き、大部分が LPS 陰性と判定されるが、抽出条件を最適化した精製コラゲナーゼ/塩酸法を用いて試験を行うことにより、テルダーミス及びテルプラグからの LPS 回収率は飛躍的に改善される。また、同法を適用した場合、ガイドライン法及び温水抽出法において陰性又は擬陽性を示したアビテン、インテグラン、ヘリテンからも相当量の LPS が検出される。

これらの性状を示す試料各 1 mg 相当を直接的に MM6-CA8 細胞と共培養した結果、表 10 に示したように、ウサギ発熱陽性を示したテルダーミスとテルプラグのほか、相当量の LPS が検出されたインテグランは direct HCPT においても高い LPS 活性 (IL-6 産生能) が検出された。パイオブレン、ウレザック C、ノバコール、インスタットはエンドトキシン試験及び direct HCPT のいずれの試験法においても、低い LPS 汚染度を示すことが確認された。一方、アビテンとヘリテンはエンドトキシン試験において相当量の LPS が検出されたが、direct HCPT においては顕著な LPS 活性が検出されなかった。また、アロアスクについては逆の傾向が認められ、エンドトキシン試験の結果と比較して、direct HCPT では有意に高い LPS 活性が検出された。

#### 8-2. アルギン酸製品

表 10 に示したように、温水抽出を用いた過去のサーベイ試験では、いずれの製品からも相当量の LPS が検出された。アルギン酸製品の LPS 含量はガイドライン法を用いたエンドトキシン試験によっても測定可能であるが、事前にホモジナイズ処理を施すことにより回収率が改善される。ソープサンはエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験及び抽出液を用いた HCPT とともに陽性反応を示す。一方、カルトスタットには相当量の LPS が混入しており、ウサギ発熱試験も陽性となるが、抽出液を用いた HCPT は陰性を示すことが判明している。また、アルゴダームの場合、エンドトキシン試験及び HCPT とともに陽性となり、特に HCPT では高い活性が観察されるが、ウサギ発熱試験における  $\Delta T_{max}$  は 0.56°C であり、擬陽性と判定さ

れる。

このような性状を示す試料各 1 mg 相当を direct HCPT により評価した結果、表 10 に示したように、ソープサン及びアルゴダームは非常に高い IL-6 産生誘導能を示すことが確認された。一方、カルトスタットの IL-6 産生誘導能は比較的 low、過去の成績と相関性が認められた。

### 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

#### 17 年度

幹細胞の均質性 (同一性) を確保する培養方法をすでに開発した。また歯周病への自家間葉系幹細胞移植の有効性を実験的に明らかにして報告し、広島大学病院での臨床研究を開始した。さらに、幹細胞のマーカー遺伝子および蛋白を同定して報告した (Ishii et al., BBRC 2005) (2 種類の特許)。マーカー遺伝子については、骨の種類に関わらず、骨髄由来間葉系幹細胞に共通なマーカー遺伝子を多数同定した。

#### 18 年度

多数の骨髄由来間葉系幹細胞株を用いてマーカーの有用性を証明した。腸骨、大腿骨、脛骨、歯槽骨由来のヒト骨髄由来間葉系幹細胞に共通して、ヒト繊維芽細胞よりも高レベルに発現しているマーカー遺伝子を多数同定した。またこれが、骨髄由来間葉系幹細胞移植による臨床研究で役立つことを明らかにした。また母集団より分離した多数の MSC コロニーでの各マーカーの発現レベルが殆ど同一であることを示して、母集団は単一の細胞 (MSC) から成立している、つまり細胞集団の均質性を証明できた。

#### 19 年度

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

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

#### 平成 17 年度

骨髄採取を行った 9 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。

平成18年度

骨髄採取を行った10症例の間葉系幹細胞の安全性を評価して、細菌、真菌、ウイルス、エンドトキシン、マイコプラズマに異常値は認められなかった。これまでの自家移植例で異常は認められなかった。再生医療に用いる電子システムソフトを開発し、このソフトに臨床情報を入力したところ、臨床、培養スケジュールを円滑に遂行できたとともに、患者情報、試験データ記録の管理を安全にかつ簡便に行えた。

平成19年度

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、コンピュータによる支援システムは実用化が可能である。

## 5. 再生医療に用いる安全な細胞・培養技術の確立とその評価法

SCPFGEにより泳動を行うと、1.連続するDNAファイバーが原点から伸展する、2.DNAファイバーの先に断片化DNA、3.鎖長が異なるDNA断片が展開する、4.原点が消失し、高度断片のみを認める、など多様な像が得られた。これまで報告されたアルカリコメット法によるDNA断片化研究は、粒子状の断片化DNA像の有無でDNA損傷を判定していた。一般的にDNAはアルカリ条件に安定であるとされてきたが、本研究で取り扱う1000万baseレベルのDNAは酸、アルカリに脆弱であり、その取り扱いに関しては、pH、活性酸素等に十分な注意が必要であることが明らかになった。この結果は、汎用されるアルカリコメット法がDNA断片化研究には不適であることを示唆しており、さらに定量性の高い検出法の開発を続ける必要がある。

上述したSCPFGEにより射精精液を観察すると、DNA断片化像を呈する精子の比率は20-70%程度であった。本研究で開発した方法を指標としてDNA損傷精子の排除を試みた。Percollを密度勾配担体とする沈降速度差遠心分離法で精子を分離した後、オプチデンツを担体とする沈降平衡法を行うと、精子は2峰性に分布した。上層のDNA損傷比率は1%以下に低下したが、下層ではほとんどがDNA高度断片化像を示した。この結果はDNA損傷に伴い、細胞性状、特に密度が変化することが明らかとなった。上層の精子分画は

運動率が高く、先体反応誘起能が高かった。さらに電顕による形態観察の結果、超微形態も良好であった。

ヒト精子核DNAにおけるsingle strand break (SSB)観察の基礎的検討として、単一細胞のDNA fiberをできるだけ伸展する、biber中のnickを検出する方法を検討した。新たにヨーイングモーション電気泳動法を開発し、位相を120度づつずらして3回泳動することにより各DNA fiberを0.5-1.0mm程度伸展させることができた。DNAポリメラーゼ-FITC-dATPを用いるnick translation変法によりDNA fiber中のnick部位を検出できた。大腸菌（DNA base数：約430万base）をマーカーとして、伸展ヒト精子DNA鎖長を推定したところ、最長のもので1000万base程度の連続したDNA fiberが得られた。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。チャンパー内雰囲気は繰り返し濾過（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°Cに保持した。作業面は使い捨てプラスチックフィルムで覆い、感染性因子（体液等）による機器汚染を防止した。画像記録、作動記録等を可能とした。使い捨てカプセル培養装置：ガス、温度環境の攪乱防止、感染防御、取り違え防止に配慮した使い捨て培養装置を開発した。恒温ドライブロックに着脱可能なプラスチック容器（容量500ml、以下ボトル）を16個設置し、培養槽とした。症例毎に1ボトルを使用してセキュリティの向上を図り、使い捨てとした。ボトル内には混合ガス（5.0%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。

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

### 1. アロ免疫応答モニタリングと心臓移植臨床経過

心臓移植登録時、3例のPRA陽性患者を認めた。全例に血小板輸血症があり、2例は左心補助人工心臓装着後の患者であった。PRA陽性2例に心臓移植を行った。ともに移植直前の対ドナー直接クロスマッチ試験は陰性であった。1例のPRA値は待機中に低下したが、他例は低下不十分で、シクロフォスファミドとIVIgによるPRA抑制治療を行った。両例ともに



心移植後に液性拒絶反応が強く疑われ、血行動態の悪化を見た。液性拒絶反応の臨床的治療において、ドナー抗体の検出と生検材料の免疫組織検査が有用であった。

## 2. 心筋梗塞急性期に対するアロ MSC 移植の治療効果

A 群および S 群は、C 群と比して左室径短縮率が高く、左室繊維化率が低く、血管密度が高かった。A 群と S 群の間に有意な差は認めなかった。S 群において、細胞移植後 28 日までに移植細胞の大部分が脱落した。In vitro で MSC は培養液中に VEGF の分泌を認めた。低酸素条件下の培養で MSC の VEGF 分泌量が増加した。A 群および S 群は、C 群と比して心筋における VEGF 転写量および血中 VEGF 濃度が高かった。移植後 1 日で、いずれの群の心臓組織においても IL1b および MCP-1 の転写量の上昇を認め、A 群は、S 群および C 群と比して有意に高かった。移植後 1 日ですべての群においても T 細胞浸潤像を認めず、A 群の細胞移植部位においてマクロファージが多く集積していた。移植後 28 日ですべての群においても IL1b および MCP-1 の転写量は正常値であった。MSC は in vitro で MHC class I (+)、MHC class II (+dull)、B7.1(-)、B7.2(-) であり、interferon  $\gamma$  を添加しても B7 分子の発現を認めなかった。ACI 由来 MSC 刺激による LEW リンパ球増殖を認めず、interferon  $\gamma$  存在下で培養した ACI 由来 MSC 刺激においても同様の結果であった。

## 3. 心筋梗塞急性期に対するアロ skMB 移植の治療効果

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 RT1A の発現増強および RT1B の発現を認めた。CD80、86 の発現は変わらなかった。細胞移植部位へ免疫担当細胞の浸潤程度を評価するために、直接的な指標であるインターロイキン受容体 (IL2R) および間接的な指標である IFN $\gamma$  について経時的に定量 RT-PCR を行った。移植後 7 日の A 群において IL2R、IFN $\gamma$  ともに顕著な発現の上昇を認めた。心筋梗塞の左室組織における移植細胞数は、移植後 15 分 (day 0) では A 群および S 群と同程度であるが、その後 1、4、7、28 日ですべても A 群は S 群と比して有意に低い値であった。移植後 28 日で A 群のドナー細胞は検出限界以下であった。S 群において C 群と比して LVDs、LVDs が小さい傾向をみとめたが、A 群においては C 群と比して有意に大きかった。EF は S 群において移植後 4 週から高い傾向を認め、移植後 8 週で有意に高かったが、A 群では C 群と同程度であった。

## 7. 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

胎盤絨毛及び臍帯血由来間葉系細胞は骨髄や脂肪組織から得られた間葉系細胞と同じように線維化細胞の形態を示し、CD44、CD29、CD73、CD105、CD90、

HLA-class I が発現しているが、CD45、CD31、CD34、HLA-class II が発現していなかった。男児の胎盤絨毛 (N=7) 及び臍帯血 (N=11) から得られた細胞は全て XY 性染色体をもっていたことから、単離した細胞には母体側の細胞が混入していないことが確認された。胎盤絨毛及び臍帯血から得られた細胞は in vitro で骨、軟骨細胞への分化能を確認されたが、特に、臍帯血由来間葉系細胞は軟骨細胞への分化能が高く、骨髄や脂肪由来間葉系細胞より多量の軟骨基質を合成することが観察された。一方、脂肪細胞への分化能に関しては両方ともに低かった。Bmi-1 および Telomerase 遺伝子を導入によって胎盤絨毛由来間葉系細胞は増殖を続け、寿命延長した細胞はサブクローンをつくり、それぞれサブクローン細胞の分化能を確認し、クローンにより異なる分化能をもつことが確認された。In vivo 実験で軟骨形成に関しては、4 週間移植後、細胞とコラーゲンスポンジの複合体は白色で平滑な軟骨様な組織を形成、パラファン切片で円形の軟骨細胞と軟骨特異基質が確認された。骨形成に関しては、8 週間移植後に、 $\beta$ -TCP の空間に骨芽細胞、骨細胞と骨基質が観察された。また移植した膝軟骨骨欠損部は修復され、膝表面に円滑な軟骨様な組織が形成された。これまで臍帯血からの間葉系細胞の分離効率、臍帯血ユニットの 20-40% との低い報告が多かったが、我々は臍帯血の容量 (60 g 以上) と採集から分離までの時間 (5 時間以内) を調整した臍帯血からは、コロニー形成間葉系細胞の採取率は 70% ぐらい所にあげることができた。遺伝子発現に関しては臍帯血由来間葉系細胞は骨髄および脂肪由来間葉系細胞と同様に Oct3/4、Runx-2、PPAR- $\gamma$ 1、BMP receptor、Smad を発現しているが、軟骨細胞へ分化する関連遺伝子 SOX9 の発現が高いことが見出された。培養時の酸素濃度については 5% 低酸素での培養は通常の 20% と比べ臍帯血由来間葉系細胞の回収率がやや高い傾向が見られ、また単離した細胞はよく増殖できることが観察された。臍帯血由来間葉系細胞は免疫抑制能については、骨髄や脂肪細胞由来間葉系細胞と同様に PHA 刺激ヒト末梢血由来リンパ球増幅を細胞濃度依存的に抑制し、ConA 刺激、混合リンパ球培養試験でも同様な抑制効果が示された。増殖させた細胞の安全性に関しては 40PDL の臍帯血由来間葉系細胞の核分析では染色体異常はまったく見られなかった。

## 8. 間葉系幹細胞の免疫制御 (寛容) システムに関する研究

### 1. 活性化 T 細胞への間葉系幹細胞の免疫抑制効果についての検証

mMSC による免疫抑制効果が確認されただけでなく、hMSC を用いた結果から、間葉系幹細胞の免疫抑制効果は同種だけでなく異種の免疫細胞にも発揮されることが示された。

### 2. 抑制に関わる因子の探索

1) 細胞上清を粗分画し抑制効果があるか確認した

ところ、分子量 5 万 kDa 以下の分画にその効果があることが判明した。分子量から抑制効果にプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 関わっていると推測されたので、その効果を確認するため PGE<sub>2</sub> の合成酵素の抑制剤 (Cox インヒビター) を用いて、MSC の活性化 T 細胞に対する抑制効果への影響をみたが、今回の系では MSC による活性化 T 細胞の抑制 (細胞増殖、サイトカインの産生) に影響はなかった。

2) DNA マイクロアレイの結果を GeneSpring を用いて解析した結果、コントロールに対して条件 1, 2, 3 と共培養した三者の MSC で共通に発現が二倍以上になった遺伝子が数十個抽出されてきた。

### 3. 無血清培地の hMSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討

無血清培地で MSC を培養しても活性化 T 細胞の細胞増殖は抑制する機能を維持していることが確認できた。

## 9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

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

## 10. 新しい無血清培地のヒト間葉系幹細胞における増殖能評価に関する研究

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

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

### 2. ハイドロキシアパタイト (HAp) 存在下での細胞増殖・活性の比較

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

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

回る結果が得られた。

## D. 考察

### 1. 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

ヌードマウスの皮下に hMSC を移植した結果から、未分化の幹細胞を生体内に移植してもただちに癌化する可能性は低い事が示唆された。また、幹細胞と腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子発現について比較検討及び hMSC の in vitro 培養期間 (~50 日間) による遺伝子発現の変化について検討した結果から、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るため、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事も踏まえた上で、細胞増殖能との兼ね合い等も検討する必要が示唆された。さらに、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 培養中における幹細胞の性質の変化について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

LPS はグラム陰性細菌細胞壁表層に局在するリポ多糖体である<sup>1)</sup>。グラム陰性細菌は、水中 (河川水及び海水)、大気中、土壤中に広く分布している。それ故、天然由来医用材料は、原料自体がグラム陰性細菌により汚染されている可能性があると共に、その製造工程中での混入により、最終製品が同細菌により汚染されることも考えられる。細菌自体は各種の滅菌処理により殺滅或いは除去することができるが、菌体成分である LPS は通例の滅菌条件では分解を受けず、その除去も困難である。我々は、過去に実施した市販創傷被覆剤の微生物汚染サーベイ試験において、アルギン酸製品及びコラーゲン製品の幾つかに相当量の菌体成分汚染があることを見出している<sup>13,22)</sup>。そこで、現在市販されている組織工学用スキャホールドの微生物汚染状況を従来法により評価した結果、無機製品及び合成ポリマー製品からは LPS、β-グルカン類、ペプチドグリカンが検出されず、微生物学的な品質に問題ないことが明らかになった。また、BD 製コラーゲン製品からは極微量の LPS が検出されたが、単位重量当たりの検出量は大きな問題となり得ないことが判明した。

ペンタックス製コラーゲン/HA 人工骨からは微量の β-グルカンが検出された。通常、β-グルカン汚染が認められる製品には LPS 汚染も観察されるが、同製品から LPS が検出されなかったため、大腸菌 LPS

を使用した添加回収実験を実施した。精製コラゲナーゼ消化/塩酸法を併用したエンドトキシン試験ではコラゲナーゼに残存する LPS 活性がバックグラウンドとして検出されるが、同製品のエンドトキシン試験ではバックグラウンドも検出されなかった。前処理として実施した精製コラゲナーゼ消化中の反応液の pH は中性であり、LPS が処理中に分解する可能性が否定されたことから、ペンタックス製品に添加した高濃度の LPS が検出不能となった要因として、同製品が非常に高い LPS 吸着能を持つことが示唆された。同製品は未焼成の HA を構成成分として含むため、蛋白質をはじめとした様々な物質を吸着すると共に、マグネシウムイオンやリン酸イオンなどの交換能を持つことが推測される。一方、LPS は血清学的抗原性を決定する多糖部分及び生物活性を担うリポ D 部分にリン酸基を有するため、HA に吸着される可能性がある。このように、市販製品の中には LPS 吸着能を持つ製品が存在するため、細胞培養時に使用する培地の LPS 含量を正確に把握しておく必要がある。また、ペンタックス製人工骨は常法により LPS 含量を測定することが不可能であり、同製品やその他の類似製品の品質を評価するためには新しい前処理法又は分析法の開発が必須となる。この点についても、HCPT の応用可能性に期待が持たれる。

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>23)</sup>。また、細菌類の細胞壁成分であるペプチドグリカンが 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>24, 25)</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生じる欠点を持っている。また、本研究において確認されたように、同種の細胞であっても、由来の相違により、発熱性物質に対して異なる応答性を示す場合もある (図 1A)。

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た。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た。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二本鎖 RNA を認識する TLR3 を欠損している場合、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 細胞の継代安定性を評価した結果、細胞形態は 30 代目まで大きな差異がないが、老化の指標となる  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色性は継代に伴って増加する傾向が認められた。また、IL-6 産生誘導能についても、8 代目以降、継代数の増加に伴い応答性が低下する傾向が認められた。本実験で使用した MM6-CA8 細胞は 4 代目を保存株としている。通常、試験には 8-10 代目を使用するが、LPS 応答性を見る限り、30 代目の細胞は感度が半減すると共に、7 代目までは本試験に使用できないことも判明した。

MM6-CA8 細胞は Micro sphere を細胞内に取り込むが、食食作用によって誘導されるサイトカイン、ケモカインの産生量は、TLR アゴニスト刺激時と比較して低値を示した (表 6)。一方、ヒト末梢血細胞の食食機能は評価していないが、発熱マーカー検索の結果から、同細胞も Micro sphere を食食し、MM6-CA8 細胞より高いサイトカイン、ケモカイン誘導能を示すことが確認された。これらの結果から、HCPT では

異物による免疫応答も検出できることが明らかになった。(表7)。

MM6-CA8 細胞の発熱マーカーとしては、過去の研究<sup>20)</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 $\cdot$  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。

菌体成分をスパイクしたシートを直接的に MM6-CA8 細胞と共培養する direct HCPT において、菌体成分添加量に比例した IL-6 産生誘導能が観察されたのは興味深い結果である。コラーゲン/HA シートの IL-6 産生バックグラウンドが若干高い結果が得られたが、HA の原材料であるネオボーン顆粒自体は顕著な IL-6 産生誘導能を示さなかったことから、この現象は円柱状の凍結乾燥品からシートを切り出す際に発生した HA 顆粒の微粉末を MM6-CA8 細胞が貧食したことに由来するものと思われる。

エンドトキシン試験及び HCPT による大腸菌 03 株 LPS 含有コラーゲンシートからの LPS 回収率を表 11 に示した。エンドトキシン試験用の試料は、同シートを精製コラゲナーゼにより 37 $^{\circ}$ C、16 時間消化し、塩酸により pH 3 に調製後、4 $^{\circ}$ C で 10 分間超音波処理した溶液を原液として希釈系列を作製した。一方、HCPT では前述したように前処理を行うことなく、同シート 1 mg を 24 ウェルプレートに直接採取し、同ウェル中で MM6-CA8 細胞を培養した。精製コラゲナーゼ消化/塩酸法は、コラーゲン製品からの LPS 回収法として過去に我々が開発した方法であり、従来のガイドライン法<sup>26)</sup>と比較して LPS 回収率が飛躍的に改善されている。しかし、IL-6/LPS 検量線 (5 - 100 pg/ml,  $r=0.989$ ) に基づいて HCPT によって得られた LPS 回収率は、いずれの添加量の場合でもエンドトキシン試験の回収率を上回っていた。また、非常に高い LPS 吸着能を示すペンタックス製コラーゲン/HA 人工骨に direct HCPT を適用した結果においても、前処理法を最適化したエンドトキシン試験とほぼ同等の LPS 回収率が得られた。

HCPT において、ライン化細胞を使用する場合、試験に要する細胞数を得るまでに分化刺激の時間を含めて通常 2 週間程度の準備期間が必要になるが、試験液を調製する必要がない、換言すれば抽出効率を考慮する必要がないことは大きな利点である。また、ヒト末梢血細胞を利用することにより、上記の準備期間は不要となる。

エンドトキシン試験に用いるリムルス反応における LPS の構造要求性は比較的 low、同反応においては広範な種類の LPS が活性を示すことが知られている。また、LPS には種特異性があり、動物の種類によって発現される活性強度が異なる。市販創傷被覆剤の微生物学的安全性を direct HCPT により評価し、

過去に実施したサーベイ試験と比較検討した結果、多くの試料はエンドトキシン試験、ウサギ発熱試験、direct HCPT の間に相関性が認められたことから、天然由来医用材料の微生物学的安全性は固形試料を用いた direct HCPT により評価できることが明らかとなった。また、アビテンやヘリテンのように、エンドトキシン試験では陽性を示すが、direct HCPT では陰性となる製品のほか、アロアスクやアルゴダームのように、エンドトキシン試験の結果と対比した場合、direct HCPT において比較的高い活性が認められる製品が存在したことから、HCPT はヒトに対する現実的な安全性を評価する上で非常に有用であることも判明した。

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

### 3. 間葉系幹細胞の均質性/同一性、および品質検査法の開発

#### 17 年度

移植用の細胞の均質性と同一性が簡単なテストで検定できるようになったので、科学的な根拠に準拠して細胞治療の治療効果を評価できるようになった。また腸骨および歯槽骨から分離したヒト間葉系幹細胞のマーカー遺伝子について多くが共通していたものの 20%-30% は共通していなかったことは、神経冠由来および中胚葉由来のヒト間葉系幹細胞の性質が異なることを示唆している。

#### 18 年度

移植用細胞に目的以外の細胞が混入してもある程度有効かもしれないが、他細胞が混入していない細胞集団を移植することにより、治療方法自体および治療の有効性の評価をより明確に出来る。

#### 19 年度

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。

### 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)

#### 平成 17 年度

検査手順において、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