

研究要旨

培養細胞を用いた再生治療には大きな期待が寄せられているが、その反面安全性や製品の品質管理に関する基礎研究は必ずしも十分とはいえない。本研究では、再生医療に必要なとされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術の確立の一環として、無血清培地および自己血清培地を用いた培養システムの開発と、自動培養システムの開発を行うものである。これまでの研究にて、自動培養システムはすでに市場投入の段階となっており、本年度は第1の課題である安全性について、特に血清の影響と無血清培地に関する検討を行なった。H18年度には、間葉系幹細胞（MSC）および皮膚、口腔粘膜由来線維芽細胞を用いた臨床研究を対象として自己血清を用いた培養を継続し、有用性を検討した。また、線維芽細胞を対象として、線維芽細胞用に開発された無血清培地による評価を行なった。本年度は、企業との共同研究により提供を受けた新たな幹細胞培養用無血清培地を用いて、ヒトボランティア由来の骨髄細胞を培養し、通常の培地により培養された細胞との比較検討を行なった。また、臨床研究により明らかとなった培養細胞の個体差の原因を解明するために、血清の種類と濃度が培養細胞の分化誘導に与える影響について検討を行なった。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要なとされる培養細胞の安全性、品質の確保と培養過程の効率性に関する基盤技術を確立することである。

再生医療の対象患者はますます増加しており、対象疾患もいわゆるlife threatening diseasesから日常的な疾患まで拡大されつつある。したがって、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きなインパクトを与えることが予想され、感染防止やがん化の検出など再生医療の安全性の確保は、まさに待つことのできない課題と考えられる。本研究では、安全性確保のひとつの方法として、血清に関する検討を行う。細胞培養には通常牛由来の血清が用いられている。しかしながら、近年BSEなど動物由来の血清の利用に対する懸念があり、BSEの発症のない地域から血清を調達するなどの工夫がなされているが、

完全に危険を除去できるわけではないために改善が望まれている。そのための方法としては、血清を用いない培地である無血清培地、特に動物由来の製剤をまったく用いない培地も開発されている。しかしながら、安定性や安全性の検証が十分ではないために、現在実際の臨床にはあまり使われていない。本研究課題では、これら無血清培地の可能性について検証を行なった。一方、動物由来の材料を避ける方法の一つとして、自己血清を用いた細胞培養が行われている。この方法では、動物由来のウイルスなどの感染の可能性は否定できるが、血清の成分にばらつきが予想されるために、どの程度安定して培養することができるかが問題である。特に、臨床研究の結果からは得られた細胞の増殖や分化誘導に個体差が顕著であった。本研究課題では、新たに幹細胞用に開発された無血清培地により培養された細胞の評価を行なった。また、血清がヒト

骨髄由来間質細胞の分化誘導に与える影響について検討を行い、培養の安定性に与える血清の影響について検討した。

B. 研究方法

1) 無血清培地により培養された骨髄由来間質細胞 (BMSCs) の評価

現在骨再生の臨床研究をはじめ、多くの再生医療に骨髄由来の間質細胞 (BMSCs) が用いられている。しかしながら、BMSCs 用に開発された無血清培地は市販されていない。特に、無血清であるのみでなく、動物由来成分を含まない培地は将来の再生医療の安全性確保には重要である。本研究では、培地メーカーの協力のもと、製品開発中の幹細胞培養用の無血清培地を用いた培養を行ない、従来骨再生に用いられてきた培地との比較検討を行なった。この培地には、一切の動物由来成分が含まれていない。

細胞源としては、東京大学医科学研究所の倫理委員会の承認を得て、健康なボランティアを募り、腸骨穿刺により局麻下で10mlの骨髄液を採取した。骨髄液を2つに分け、一方を無血清培地で、もう一方を通常の10%FBSを含む α -MEMで培養を行なった。細胞の形態、増殖能および表面抗原についてFACSで解析し、それぞれの培地にて培養された細胞の比較を行なった。

2) 血清がBMSCsの分化に与える影響について

臨床研究では、自己血清にて培養された細胞の増殖能および分化誘導後のALP活性に個体差が見られた。しかしながら、この個体差は安定した骨再生のためには障害となる。個体差を生じる原因として、細胞

そのものの違いのほかに、血清の違いが影響している可能性があると考えた。

本研究では、BMSCsへの分化誘導方法として知られているデキサメタゾンを含む分化誘導培地と、BMP-2を用いて、血清の種類や濃度が分化誘導に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織採取を行う場合、東京大学医科学研究所倫理委員会にて承認を得て、該当ボランティアに書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての細胞については、プライバシーの保護のためドナー情報は匿名化して研究を行うこととした。

C. 研究結果

新たに開発された動物由来成分を全く含まない無血清培地を用いてBMSCsの初代培養を行ない、細胞の形態と増殖の比較を行なった。(図1)。

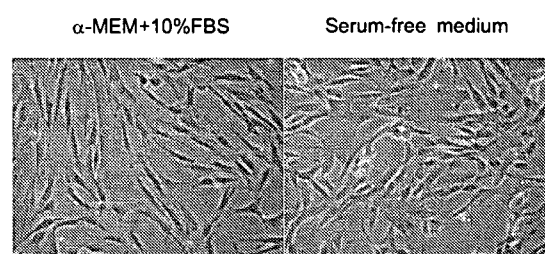


図1. α -MEMとserum-free mediumの比較初代培養 (P0) において、ほぼ同様のコロニー形成と増殖を認めたが、細胞形態には多少の違いを認めた。

図1に示すように、ヒトBMSCsにおいては、無血清培地でも通常の培地である

α -MEM+血清と同様のコロニー形成を認め、細胞の増殖もほぼ同様であった。特に、用いた無血清培地は動物由来成分を含まない培地であり、次世代の培地といえる。この培地にて、通常培地と遜色ないコロニー形成と増殖を示したことは、有望な結果であった。

しかしながら、継代後において、細胞の増殖は無血清培地では遅くなり、形態にも明らかな変化を認めた(図2)。

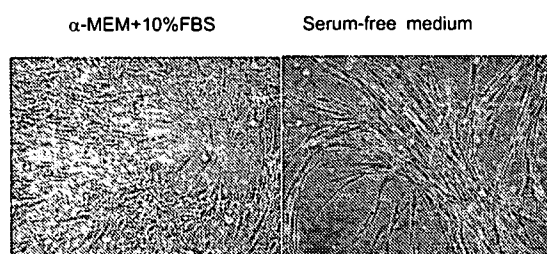


図2. α -MEMとserum-free mediumの比較継代培養(P1)において、無血清培地では増殖が鈍化し、形態にも明らかな違いを認めるようになった。

無血清培地による培養細胞は、紡錘形であり、培養期間が長くなっても多角形は示さず、石灰化noduleの形成も認めなかった。一方、血清入り培地で培養された細胞は、継代後には徐々に多角形を示し、一部は分化したと思われる細胞が存在した。増殖については、初代培養時は無血清培地、血清入り培地ともほぼ同等であったが、継代後は血清入り培地と比較して、無血清培地における増殖は緩やかであった。

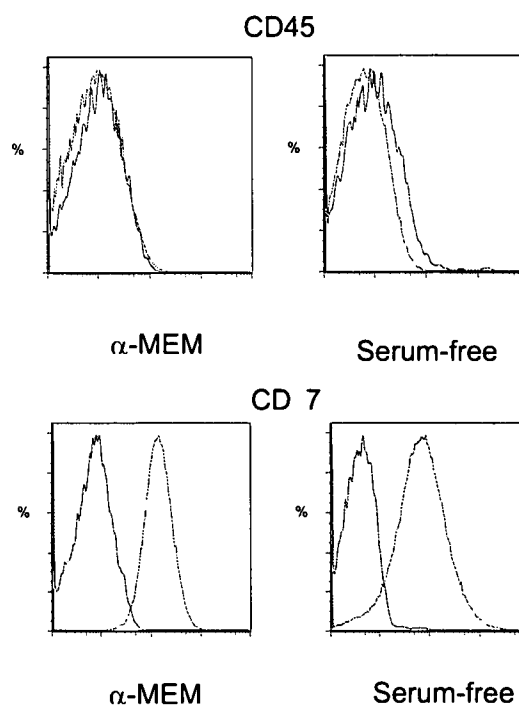


図3. FACS解析。得られた細胞は、 α -MEM、無血清培地とも、CD45(-), CD73(+), CD105(+)であり、MSC様であった。

異なる培地の評価のためには、初代培養よりそれぞれの培地で培養を行なうことが重要と考えられる。今回学内倫理委員会の承認とボランティアからの採取が可能となったため、同時に異なる培地での培養を行ない、得られた細胞の表面抗原の解析を行なうことが可能であった。得られた細胞は、CD45(-), CD73(+), いわゆる間葉系幹細胞の表面抗原のプロファイルと一致していた(図3)。表面抗原の詳細な検討からは、BMSCsはmixed populationであり、CD105, CD90などの陽性率はサンプルにより異なる。しかしながら血球系のマーカーであるCD34は常に(-)である。しかしながら、今回無血清培地にて培養されたBMSCsでは、一部のCD34陽性細胞が見られた(図4)

CD 3

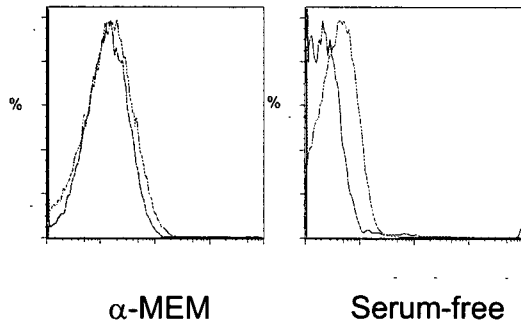


図4. FACS解析。通常BMSCsではCD34陽性分画はないが、無血清培地にて得られた細胞では、一部が陽性であった。

現時点では、培地により異なる細胞分画が選択されたのか、あるいは培地により細胞の表面抗原の発現が変化したのかは明らかではない。いずれにせよ、形態の変化を考えると、無血清培地により培養された細胞と、通常の血清入り培地で培養された細胞とでは、質的な変化があることが推測される。

次に、それぞれの血清で培養された細胞のALP活性について検討を行なった。無血清培地では、血清入りの通常培地と比較して、分化誘導前のALP活性が極めて低く、未分化な状態が維持されている可能性が示された。一方、15日間の分化誘導では、ALP活性の上昇が認められなかった(図5)。一方通常のデキサメタゾンによる骨分化誘導培地では、分化誘導前と比較して、約1.5%のALP活性の上昇を認めた。また、分化誘導前の状態でも、一定のALP活性を示したことから、培地に含まれる血清成分により、分化誘導前の状態でも一定の分化細胞の存在が示唆された。

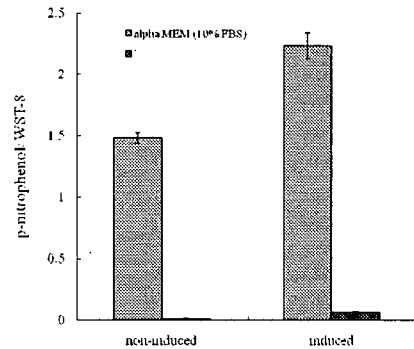


図5. 無血清培地および血清入り通常培地における分化誘導実験。無血清培地(茶)では、血清入り通常培地(α -MEM)(ブルー)と比較して、ALP活性が低く、また分化誘導後の上昇も少ない。

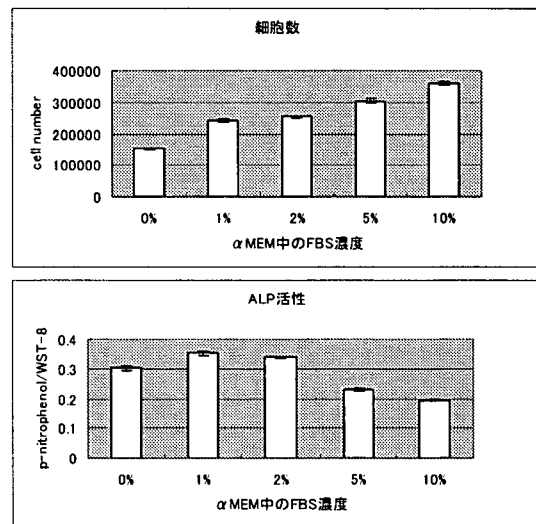


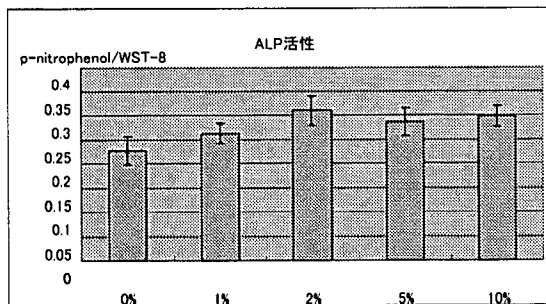
図6. 血清濃度が分化誘導に与える影響。さまざまな血清濃度下で、骨分化誘導培地によるALP活性の上昇を調べた。ALP活性は1-2%の血清存在下で最大となったが、血清濃度が上昇するにしたがって、ALP活性は低下した。

次に、血清が培養細胞の分化誘導に与える影響について検討を行なった。BMSCsに対して、デキサメタゾンを含む骨分化

誘導培地にて7日間分化誘導を行なった。血清濃度が上がるにつれ、細胞増殖は促進されたが、ALP活性は1%~2%の低血清でもっとも上昇した。一方、血清濃度が上がるにつれて、ALP活性は下がる傾向であった(図6)。

次に、BMP-2による分化誘導についても、さまざまな血清濃度にて検討した。

血清濃度が2%で最大のALP活性を示したが、5%以上10%でもALP活性に変化はみ



めなかった(図7)。

図7. 血清濃度が分化誘導に与える影響。さまざまな血清濃度下で、BMP-2(100ng/ml)による分化誘導を行い、ALP活性の上昇を調べた。ALP活性は2%の血清存在下で最大となったが、それ以上の血清濃度では有意な変化を認めなかった。

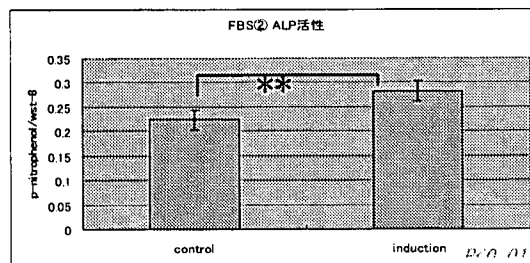
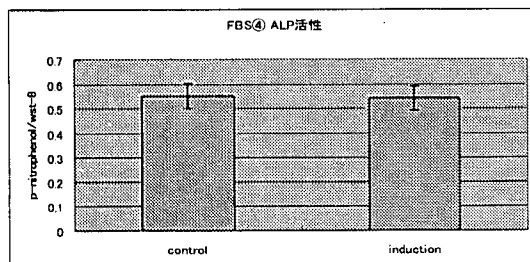


図8. 血清の種類が細胞の分化誘導に与える影響。さまざまな血清により、同一の細胞への同一の分化誘導刺激(BMP-2 100ng/ml)を行なっても、添加する血清により分化誘導の結果が異なる。

以上から、BMP-2による分化誘導は、血清濃度の影響を受けることが示唆されるが、通常使用する血清濃度では大きな低血清ほど有効であると考えられるが、その一方で、BMP-2による分化誘導は、血清の種類による影響を大きく受けることが明らかとなった。

同一患者から培養された細胞をグループ分けし、それぞれに対して異なる血清を用いた培養液で培養し、同一の分化誘導刺激を与えた。その結果、血清により分化誘導の結果には違いがあることが明らかとなった(図8)。特に、BMP-2など増殖因子を用いた分化誘導では、血清に含まれる成分の違いにより、antagonistの誘導を起こす可能性が示唆された。それを明らかにするために、分化誘導の得られなかった細胞と血清の組み合わせを用いて、BMP-2のantagonistであるnogginとfollistatinの発現をリアルタイムPCRにて定量的に測定を行なった(図9)。

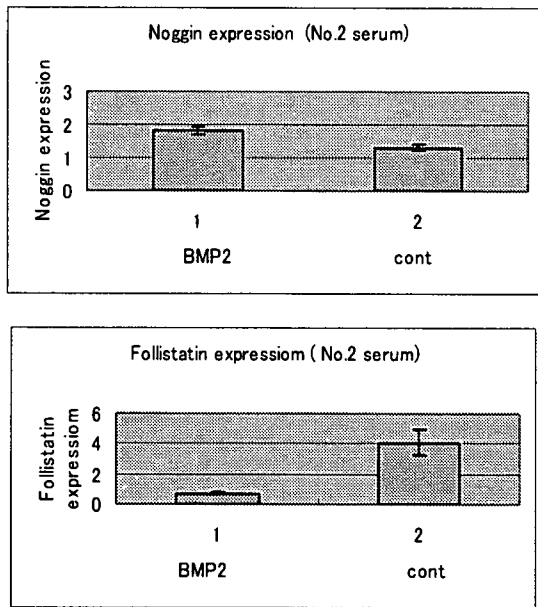


図9. BMP-2の負荷によるnogginとfollistatinのメッセージ発現（定量PCRによる）。

リアルタイムPCRでは、BMP-2の添加によりnogginの発現が誘導されるが、follistatinの発現は誘導されなかった。その一方、分化誘導する前の細胞には、すでにnoggin、follistatinの発現が認められ、これがBMP-2に対する反応性に影響している可能性が示唆された。

D. 考察

無血清培地による検討では、新たに開発された無血清培地にて、ボランティアの骨髓由来の間質細胞（BMSC）は、初代培養から継代培養まで可能であることが示された。細胞の形態には大きな違いが見られるが、細胞の表面抗原はほぼ同じであり、得られた細胞は同一であると考えられた。通常血清培地で培養された細胞と比較して、無血清培地で培養された細胞は未分化な状態に保たれており、ALP活性は有意に低い値であった。このことから、無血清培地で培養された細胞に対しては、長期間の培養でも、

幹細胞としての性質が維持されているものと考えられた。

一方、分化誘導は添加する血清の影響を大きく受けることが示唆された。通常骨分化誘導培地では、血清濃度が上昇するとともに、分化誘導されにくくなり、またBMP-2に対しては、2%から10%までALP活性に変化はなく、1%以下では低いALP活性であった。以上から、分化誘導には低血清培地を用いることが有用と考えられた。

BMP-2による分化誘導では、用いる血清により分化誘導の結果が異なることが示された。現在行なわれている骨再生では、自己血清が用いられている。自己血清では感染の危険が少ない代わりに、血清成分が安定していない問題点がある。本研究の結果からは、自己血清を用いた場合の問題として、分化誘導能に違いをもたらす可能性が示唆された。

現在ウシ血清を用いた培養は臨床では用いられなくなっており、代わりに自己血清を用いた培養が主体となっている。これにより感染の可能性を減らすことや、動物由来の蛋白による免疫応答を防ぐことが可能である。しかしながら、骨再生に関しては血清が分化誘導能に影響を与えることが明らかとなった。特に、同じ細胞を用いても、用いる血清により分化誘導の結果が異なることから、安定した分化誘導を得るためには、血清を含まない新たな培地の使用が望ましいと考えられる。

実際に無血清培地で培養した細胞と通常血清入り培地で培養した細胞の比較データは少ないが、今回われわれは健康なボランティアから骨髓液を採取し、同じ骨髓液由来のBMSCを同時に無血清培地と通常培

地とで培養し、比較することができた。その結果からは、MSCを含む骨髄間質細胞は、無血清培地でも初代から培養が可能であることが明らかとなった。また、細胞の表面抗原の解析からは、得られる細胞分画はほぼ同一であることが示された。また、無血清培地では培養中に分化傾向を示さず、血清入り培地と比較して、培養細胞の未分化性が保たれる可能性が示唆された。その一方で、培養細胞の形態には差があり、獲られた細胞の質的な差については、まださまざまな検証が必要と考えられた。さらに、無血清培地により得られたBMSCsでは分化誘導が得られにくい可能性があり、今後もしさまざまな評価を行ない、安全性や有用性についてのデータを蓄積する必要がある。そのような情報の蓄積のより安全性や有用性を示した上で、今後は無血清培地による骨再生治療へと移行することが望ましいと考えられる。

E. 結論

培養細胞の安全で効率的な供給システムの開発は、再生医療の実用化を進める上で臨床的研究とともに車の両輪をなす重要な課題である。本年度の研究からは、無血清培地への移行の必然性が示されたが、得られた細胞の評価について、さらに慎重な検討が必要と考えられる。安全な培地、培養方法、評価方法のそれぞれについて、今後研究を重ねることが重要である。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Agata H, Kagami H, Watanabe N, Ueda M. Effect of ischemic culture conditions on the survival and differentiation of porcine dental pulp-derived cells. *Differentiation* in press

Mizuno D, Kagami H*, Mizuno H, Mase J, Usami K & Ueda M. Bone regeneration of dental implant dehiscence defects using cultured periosteum membrane. *Clin. Oral Imp. Res.* in press

Tonomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H*, Honda MJ, Ueda M. Differential inducibility of human and porcine dental pulp derived cells into odontoblasts. *Connect. Tissue Res.* 48, 229-238, 2007

Iejima D, Sumita Y, Kagami H*, Ando Y, Ueda M. Odontoblast marker gene expression is enhanced by a CC-chemokine family protein MIP-3 α in human mesenchymal stem cells. *Arch. Oral Biol.* 52, 924-931, 2007

Shimizu K, Ito A, Arinobe M, Murase Y, Iwata Y, Narita Y, Kagami H, Ueda M, Honda H. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 472-478, 2007

Agata H, Asahina I*, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda M, Kagami H, Ueda M. Effective bone engineering using periosteum-derived cells. *J. Dent Res.* 86, 79-83, 2007

2. 学会発表

各務秀明、朝比奈泉、縣 秀樹、本田雅規、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」 先端医療研究開発シンポジウ

ム 2008.1.22 東京

各務秀明 体性幹細胞を用いた顎口腔領域の再生医療：歯槽骨再生の臨床研究 東京医科歯科大学シンポジウム東京医科歯科大学 21 世紀 COE プログラム 「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」第 12 回公開シンポジウム「インプラント治療の最近の進歩：再生医療との融合」2008.1.20 東京

Hideaki Kagami Safety and efficacy of alveolar bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and β -TCP, International Symposium for Musculoskeletal Bioorgan Center 2007.11.23 Korea

各務秀明、朝比奈 泉、本田雅規、縣 秀樹、山下直秀、東條有伸、長村登紀子、田端美帆、河野美保子、土屋周平、新村優佳、上田実 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生法」橋渡し研究支援推進プログラム 第一回 橋渡し研究カンファレンス 2007.11.30 東京

各務 秀明 教育講演 II 「再生医療の未来は？」第 18 回日本歯科審美学会・第 26 回日本接着歯学会合同大会 2007.11.18 福岡

各務秀明、朝比奈泉、本田雅規、縣秀樹、上嶋伸知、上田実（ワークショップ 2 臨床応用を先導する歯科の再生医療）口腔領域の再生医療—顎骨再生臨床研究の現状と今後の可能性について— 2007.8.9 第 28 回日本炎症・再生医学会 東京

各務秀明、朝比奈泉、成田祐司、上田実（シンポジウム 1 口腔癌の診断と治療）口腔組織の再生医療—顎骨再生の臨床研究と血管・神経の再生について— 2007.6.14 第 31 回日本頭頸部癌学会横浜

各務秀明、本田雅規、山田陽一、水野裕和、上田 実（シンポジウム 2 口腔領域の Stem Cell Biology）体性幹細胞の分化誘導と口腔組織再生への応用。第 61 回日本口腔科学会総会 2007.4.19 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「細胞品質予測モデル」

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、他：特許出願番号2007-212116

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発

—Glucose transporterを介する上皮細胞の形態変化のメカニズムと立体切片による定量的解析—

分担研究者 紀ノ岡正博 大阪大学大学院基礎工学研究科 化学工学領域 准教授

本研究で開発してきた培養細胞の画像評価手法は、D-グルコースを培養面上に提示することで、培養中に細胞を破壊することなく形態変化を評価可能であり、再生医療に適していると考えている。本年は、ヒト乳腺上皮細胞にて、細胞形態の応答変化機構を明らかとした。また、重層シート等の培養組織製品の品質管理を行う上、培養組織製品の極小部分をサンプリングして質的に観察評価を行う、弱襲撃の評価法が不可欠である。本年度は、乳腺上皮細胞シートを培養組織の製品評価を目指し、基底層安定性についての立体染色評価法を構築した。

A. 研究目的

単層増殖時においては、培養容器底面からの細胞観察は、迅速かつ簡易で最も有効な培養状況の把握手段である。静止画のようにある特定の時間において観察する方法は、簡易かつ安価で一般的な顕微鏡などの装置で行うことができる。その結果、汎用性が高く、多くの研究や生産の現場で、日々熟練オペレータが、細胞形態を顕微鏡下で観察し、培養環境の状況把握に努めている。培養面の修飾により、細胞の一部を強く培養面に固定することで、細胞の移動は、若干制限されるものの、細胞の退縮が阻止されて伸展のみとなり、移動が時間積分され細胞形態が変化する。そこで、細胞を一時的に培養条件とは異なる状態に曝すことで評価する方法により、動的評価の特徴を兼ね備えた静的観察、“準静的評価”を実現した。平成19年度は、準静的評価可能なD-グルコース提示面での動的形態変化のメカニズムの解明を行った。また、立体構造を有する培養組織の場合、組織内の細胞挙動を把握することが困難である。そこで、培養組織の一部を切り出し、染色、弱襲撃の手法にて、立体的に定量的評価することを目指した。

B. 研究方法

1) D-グルコース提示面の特性解明

D-グルコース提示面上の培養の際に細胞側のグルコーストランスポータ(GLUT)を介するヒト上皮細胞に対する形態変化のメカニズムについて解明する。

GLUTを介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 50, 100%D-glucose提示培養面を用いインスリンを含まない培養条件で培養した細胞にインスリンを添加した際の細胞形態変化の観察を行った。ここで細胞の形態は、円形度 R_c にて評価した。

2) 蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築(図1)

乳腺上皮細胞シートを、TOPROおよび抗ki-67抗体にて、全核ならびに増殖細胞核を蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて、シート内細胞密度(X_T)、増殖細胞密度(X_P)を立体的に算出する手法を開発する。算出には、取得立

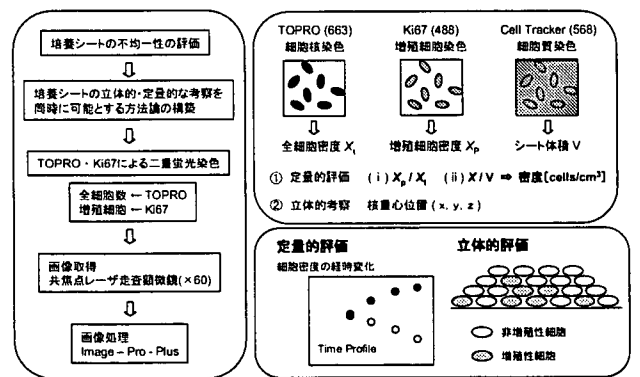


図1 立体組織片の定量解析

体画像を、市販のImage Pro Plusにて画像処理を行った。

C. 研究結果

1) D-グルコース提示面の特性解明

GLUTを介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 50, 100%D-glucose提示培養面を用いインスリンを含まない培養条件で培養した乳腺上皮細胞に、インスリンを添加した際の細胞形態変化の動的観察を行った。図2に示す

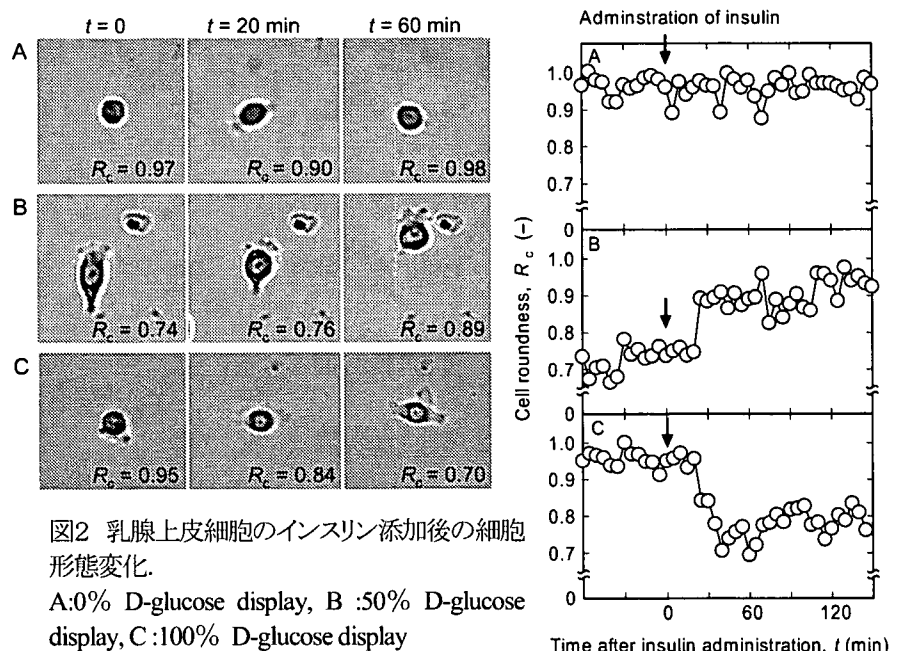


図2 乳腺上皮細胞のインスリン添加後の細胞形態変化。

A:0% D-glucose display, B :50% D-glucose display, C :100% D-glucose display

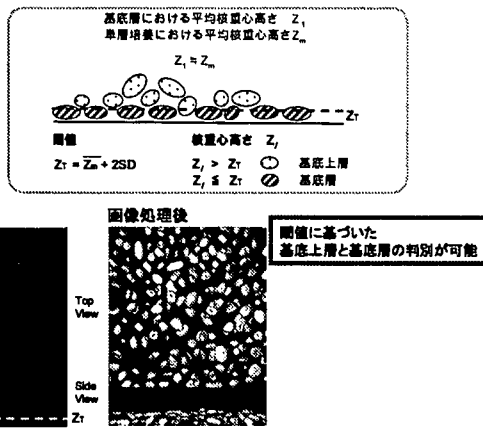


図3 立体組織片の画像定量評価法

ように、0%D-glucose提示培養面では、インシュリン添加前後で細胞の形態変化は無かったが、50%においては、伸展形態から円形形態、100%においては、円形形態から伸展形態へと変化した。これらの応答は、約30分であったことから、インシュリン添加によるGLUT4の提示増加による応答であることが示唆された。

2) 蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築

立体的かつ定量的増殖能の評価を目指し、図3に示すような画像処理技術にて、上皮細胞の重層シートに対する増殖能評価を行った。ここで、基底層核に対する判定高さ Z_1 は単層培養時の値を採用した。図4に示すように、培養の経過に伴い、基底上層の細胞密度が上昇したが、増殖細胞は低下した。さらに、基底層の増殖細胞に比べ基底上層においては、その頻度がより低下していることが分かった。

本手法を、予備的に角化細胞からなる表皮シートへ展開したところ、図5に示すように、増殖細胞が基底層に存在することが分かり、基底層安定性への展開が示された。以上より、蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法は、重層の程度ならびに基底層の安定性評価に有効であることが分かった。

D. 議論

昨年度まで培養面提示グルコース密度の変化による細胞形態変化、本年度の細胞表層の提示GLUT密度変化による細胞形態変化より、形態変化の程度は、細胞側のGLUT量と培養面上のD-グルコース提示量との量的バランスにより変化する Receptor saturation model に従うことがわかった。よって、細胞種に応じ適度なグルコース提示は細胞形態の変化を引き起こし、特に、細胞の移動に伴って伸展させ、細胞移動能力の測定に活用できることが示唆された。また、本研究にて開発された立体組織片の定量評価法は、立体的不均一構造を有する表皮、角膜、口腔粘膜などのシートに対し、増殖能、幹細胞存在率、分化マーカー分布など位置的かつ定量的評価が可能であることが示唆され、将来的には、移植部への生着率(テイク)との相関により、重要な指標となり得ることが示唆される。

E. 結論

グルコース提示型培養面上の細胞は、GLUTの提示量により形態が変化し、インシュリン投与に対する応答は、約30分であった。また、蛍光免疫染色を伴う立体組織片の画像定量評価手法は、上皮シートにおける基底層安定性評価に有効な手法で

あることが示唆された。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していません。

G. 研究発表

1. 論文発表

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Synergistic Effect of D-glucose and EGF Display on Dynamic Behaviors of Human Epithelial Cells", J. Biosci. Bioeng., 104(5), 428-431(2007).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Glucose Transporter Mediation Responsible for Morphological Change of Human Epithelial Cells on Glucose-Displayed Surface", J. Biosci. Bioeng., in press.

2. 学会発表

鍵田祥吾, 金 美海, 紀ノ岡正博, 田谷正仁: ヒト上皮細胞培養における基底層安定性の評価, 第72回化学工学会, 京都(2007,3).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Enhancement of Cell Migration in Culture of Human Epithelial Cells on Surface with EGF and D-glucose Display", TERMIS-EU, London, UK (September 4-7, 2007).

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Stimulated Migration of Human Epithelial Cells on Co-immobilized Surface of D-glucose and EGF", TERMIS-AP, Tokyo, Japan (December 3-5, 2007).

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

層形成の培養時間に対する変化

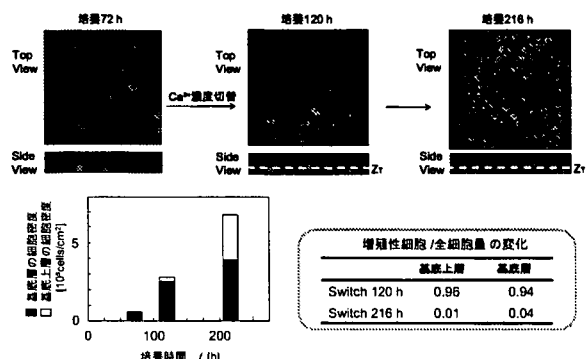
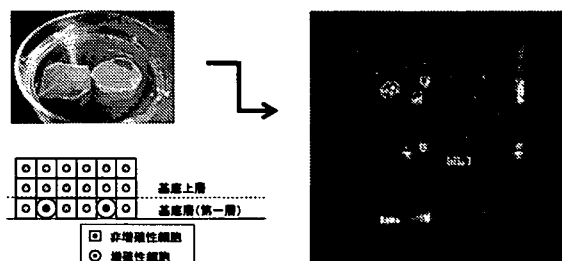


図4 乳腺上皮細胞のシート形成時における重層過程評価

● 角化細胞シート



28 図5 角化細胞シートにおける基底層安定性評価への展開

情報処理理論を用いた細胞培養の効率化

分担研究者 本多裕之 名古屋大学大学院工学系研究科
バイオテクノロジー講座 生物プロセス工学グループ 教授

研究要旨

本研究では、再生医療実用化のため、細胞培養という人間の感や経験に頼った作業工程を効率化するための情報処理技術の確立を行った。現在、再生医療に用いられる細胞は、作業者の感や経験に依存した調製工程で作製されており、通常の工業的大量生産製品に比べて非常に非効率的でありコストが高い。このような問題は、現在の再生医療の産業化における最大の課題であり、より安全かつ安定な細胞調製を行うためには、これらの作業工程における情報処理理論の導入が必要不可欠であると考えられる。本年度の研究では、昨年度行った線維芽細胞の細胞収率予測モデルの構築の手法を応用し、角化細胞の残存ダブリング数を予測するモデル構築を行った。これは、我々のモデル化手法がより他種類の細胞にも用いることができるという実証としての目的と、再生医療において重要な品質である残存ダブリング数を、形態情報だけから予測できるかを検討するために行った。また、我々の独自のアルゴリズムであるFuzzy Neural Networkだけでなく、より多くの多変量解析の手法を適応し、その解析能の比較を行うことで、培養効率化のためのソフトウェア開発に必要な事項を明らかとした。

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療を実用化するために必要である「効率的な培養」を可能にするため、これまで工業的な生産管理に応用されてきている情報処理を用いた支援技術を、医療の臨床現場に密着した形で開発することである。

近年、再生医療の対象患者はますます増加しており、その適応範囲は致死的な疾患から日常的な疾患まで拡大されつつある。しかし、この新しい医療を享受出来る患者の数は僅かではない。これは治療技術の確立以外に、セルプロセッシングの技術が成熟していないことが一因と考えられる。再生医療のための細胞調製という工程はテーラーメイドであり、通常の工業的大量生産のストラテジーを応用することは難しい。これは現在、多くの企業が再生医療に興味を示しているにも関わらず実用化が進まない原因の一つでもある。このため、再生医療の治療用細胞の安定供給と安全性維持のための技術の開発は、より多くの医療施設で、多くの患者に現在の技術を提供するために必須である。

現在、多くの再生医療研究は治療法開発を目的としており、実用化や産業化に必要な、生産プロセスの効率化に関する基礎研究はまだ少ない。非接触で細胞の状態に関連するデータを取得できる画像解析技術の細胞品質管理への応用は、本プロジェクトの研究分担者である紀ノ岡らによっても行われてきていた。本年は、我々のグループでは、紀ノ岡らのアドバイスを受けながら共同で様々なモデル化手法や多変量解析など、これまで生物情報の解析に用いられてきた手法を細胞形態情報に適応す

る有用性と課題を詳細に検討した。昨年度までは、これまで研究分担者の鈴木らの開発した自動培養装置における自動制御のためのソフトウェア開発を目標としていたが、本年度は細胞の品質管理に焦点を絞り、細胞の品質（残存ダブリング数）を予測するためのモデル構築を試みた。また、細胞に応じた細胞形態の画像処理方法の違いも検討し、より具体的に再生医療生産プロセス管理のためのソフトウェアの設計を行った。

B. 研究方法

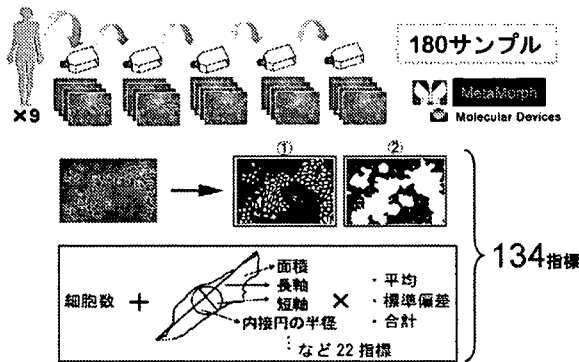
本研究では、細胞培養の品質管理システムとして(i)残存ダブリング数の予測モデル構築のための画像処理手技の開発、(ii)残存ダブリング数の予測モデルの比較と有効性を検証した。用いた画像は、ヒト角化細胞の継代培養における経時的な画像データ(180枚×3視野)である。この画像は、正常ヒト細胞である角化細胞(3個体由来・5 lot)を含むものである。

(i)残存ダブリング数の予測モデル構築のための画像処理手技の開発：

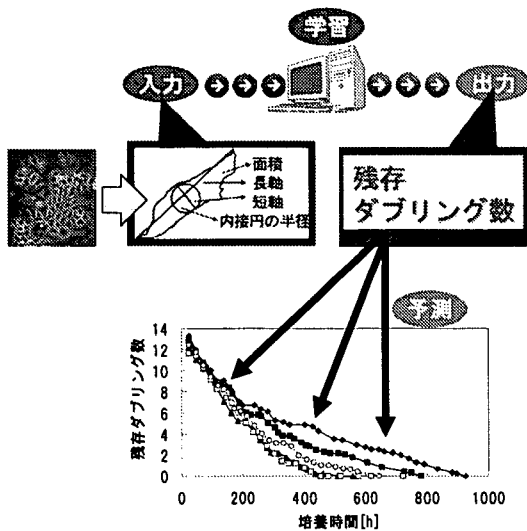
細胞形態の特徴量を画像から取得するには、どうやって細胞を認識させて数値化するかという画像処理手法の確立が重要である。我々は、これまで研究統括者である上田らの臨床研究から得られたヒト線維芽細胞の画像処理手技としては、ノイズ除去のための閾値設定が重要であり、播種後3日目以降のようなサブコンプレントに近い画像では正確な数 我々は、これまで研究統括者である上田らの臨床研究から得られたヒト線維芽細胞の画

像処理手法の確立が重要である。

我々は、これまで研究統括者である上田らの臨床研究から得られたヒト線維芽細胞の画像処理手技としては、ノイズ除去のための閾値設定が重要であり、播種後3日目以降のようなサブコンプレントに近い画像では正確な数値化が難しいことを確認してきた。今年度の研究では、角化細胞に細胞を変え、同様な数値化手法は細胞種が異なっても有効かを検討した。画像解析にはMetaMorphを用い、独自のジャーナルを構築することで誤差を最も減らして画像中の細胞情報を取得する条件を決定した。



(図1) 画像処理のイメージ図



(図2) 残存ダブリング数予測のイメージ図

(ii) 残存ダブリング数の予測モデルの比較と有効性を検証:

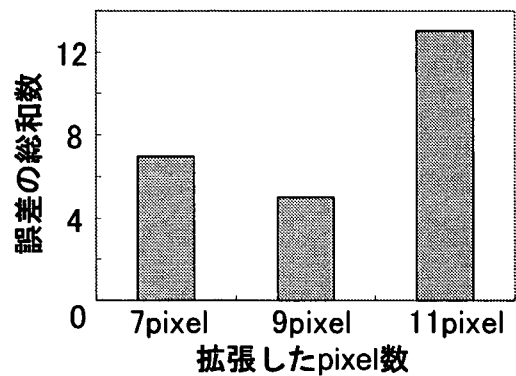
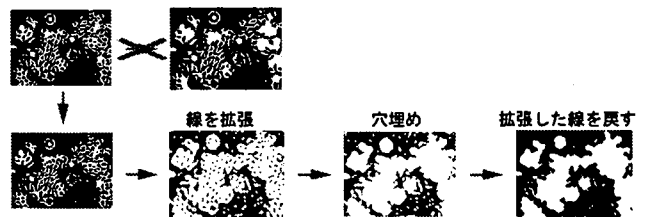
残存ダブリング数の予測のため、従来様々な生物情報処理に用いられてきた(1)主成分分析(PCA)、(2)重回帰分析(MRA)、(3)我々の開発したツールであるFuzzy Neural Network (FNN)の3手法に関して、多変量を用いたモデルとして比較した。

入力項目としては、各画像から得られる細胞形態の特徴量(22指標)と、継代培養期間中の形態情報の変化量を含む134指標を用いてモデル構築を行った。

C. 研究結果

(i) 残存ダブリング数の予測モデル構築のための画像処理手技の開発:

角化細胞の増殖形態は、昨年度に画像処理手技を確立した線維芽細胞とは異なり、敷石状の小さい細胞がコロニーを形成しながら増殖するものである。このため細胞と細胞は、線維芽細胞よりも常に密接した状態にあり、コロニーとしての細胞集塊の特徴も重要であることが考えられた。このため、我々は細胞を1個1個認識させるだけではなく、コロニーとしての細胞集塊の特徴量をも画像から取得する画像処理方法を確立した。

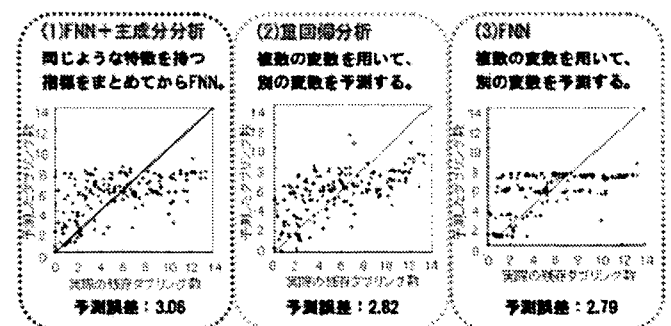


(図3) コロニー (細胞集塊) としての数値化法と誤差

(ii) 残存ダブリング数の予測モデルの比較と有効性を検証:

確立した画像解析手法を元に数値化した全ての画像情報量を用いて、残存ダブリング数を予測するモデルを構築した。

モデルとしては、(1)主成分分析(PCA)、(2)重回帰分析(MRA)、(3)Fuzzy Neural Network (FNN)を比較した。



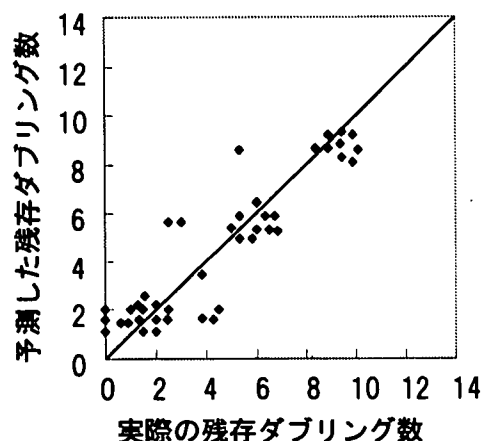
結果、各独立した画像から得た数値情報だけを用いる場合、各多変量解析手法には大きな差が無いことがわかった。しかし、現実的な運用を考えた場合、予測機能だけ

では、予測ミスや異常データを作業者が検出することはほぼ不可能であり、作業者により安心してこのようなシステムを利用してもらうためには、ルール抽出という機能のあるFNNがやはり有用であることが考えられた。

このため、FNNを予測モデルとして選択し、精度をより高めるための検討を行った。

Rule Table		1day→2dayの円形度の平均の変化率②			
		small		big	
		2day→4dayの細胞数の変化率①			
		small	big	small	big
1day→4dayの水平長さの合計の変化率①	small	1.61	9.72	5.16	0.06
	big	10.3	12.8	0.13	0.07

(図4) FNNから得られた残存ダブリング数予測のための形態特徴の組み合わせルール



(図5) 抽出ルールに基づいた予測結果

様々な画像から得られる形態特徴量を検討し、層別化によって年代別のモデル構築なども行った結果、結果としては、継代培養の継代間における細胞形態の変化率を用いることが最も予測精度を向上させることがわかった。また同時に、変化率②としてルール中で表現されている細胞集塊（コロニー）としての形態情報も、角化細胞の品質予測には重要だったことがわかった。

D. 考察

本研究からは、我々のツールであるFuzzy Neural Networkが、細胞の画像情報を元にした細胞品質の予測において、他の手法に比べても優位性が高いことが示唆された。FNNはこれまで多くの生物情報（遺伝子発現、タンパク構造、SNP解析）などに用いられてきていたが、今回の角化細胞の品質予測を通じて、様々な細胞に対しての応用が充分可能であることが強く示唆されるものであった。線維芽細胞・角化細胞の2種類の予測モデル構築が成功し

た結果からは、再生医療に携わる医療機関では、自施設における細胞種と目的に応じてモデルを構築しわたることが可能で、一定以上の安定した予測精度が得られると期待されるものであった。ただ、同時に、細胞種に合わせた細胞数値化には細胞種に合わせた最適化が必要であり、同じモデルが全てを説明することができないことも明らかとなった。

E. 結論

再生医療において、治療用に培養した細胞は、一定の品質を保証することでよりよい治療効果を与えるものでなくてはならないが、現状ではこれを保証できるような非接触な検査方法はまだない。多くの医療施設では、これを熟練者の経験と勘に頼って管理している。しかし、より安定した供給と治療効果の保証を行うためには、本研究で示したような情報処理モデル化手法の導入は非常に有効であり、このための情報源として細胞の位相差画像は十分に機能するものであることが確認されるものであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Akira Ito, Masatake Fujioka, Tatsuro Yoshida, Kazumasa Wakamatsu, Shousuke Ito, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hiroyuki Honda : 4-S-Cysteaminylphenol-loaded magnetite cationic liposomes for combination therapy of hyperthermia with chemotherapy against malignant melanoma, *Cancer Science*, 98(3), 424-430(2007)

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi : Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression, *Cancer Immunol Immunother*, 55(3), 320-38(2007)

Kazunori Shimizu, Akira Ito, Jong-kook Lee, Tatsuro Yoshida, Keiko Miwa, Hisaaki Ishiguro, Yasushi Numaguchi, Toyoaki Murohara, Itsuo Kodama, Hiroyuki Honda : Construction of multilayered red cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4), 803-809(2007)

Kousuke Ino, Akira Ito, Hirohito Kumazawa, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Hiroyuki Honda : Incorporating of capillary-lake structures into dermal cell sheets constructed by magnetic force-based tissue engineering, *Journal of Chemical Engineering Japan*, 40(1), 51-58(2007)

C. Kaga, M. Okochi, M. Nakanishi, H. Hayashi, R. Kato, H. Honda: Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) 362(4), :1063-1068.

加藤竜司、山本若菜、各務秀明、上田実、本多裕之：「再生医療における細胞品質管理を目指した細胞画像データへの多変量解析の有効性」，ソフトウェアバイオロジー，生物工学会出版音（2007） in press

各務秀明，加藤竜司：「III. 細胞移植による美容医療を行うにあたって」，再生医療と美容，上田実編集，株式会社南山堂，（2007），p30-39

各務秀明，加藤竜司：「第2章：歯槽骨再生の基礎～再生医療をとりまく法的枠組み～」再生医療とインプラント-究極のQOL向上医療を目指して-，上田実編，クインテッセンス出版会社，（2007），p80-87

加藤竜司，蛭沢克己，各務秀明：「第4章：再生医療の審美へのアプローチ～繊維芽細胞の細胞特性と培養法～」再生医療とインプラント-究極のQOL向上医療を目指して-，上田実編，クインテッセンス出版会社，（2007），p170-180

加藤竜司、本多裕之：「第4章 細胞の3D組織化～8節 動物実験代替のためのバイオリアクターを用いた3次元組織培養～」，動物実験代替のためのバイオマテリアルデバイス，酒井康行，民谷栄一監修，シーエムシー出版，（2007），p219-234

2. 学会発表

加藤竜司、加賀千晶、大河内美奈、国松己歳、本多裕之「情報処理を用いたペプチドスクリーニングの効率化」化学工学会、京都、2007年3月

R. Kato, W. Yamamoto, Y. Tomita, M. Nakatochi, Y. Tomita, M. Okochi, H. Honda, H. Kagami, K. Ebisawa, M. Ueda: Development of morphological process-control analysis for the automation of processes in regenerative medicine, *Biochemical Engineering XV (Engineering Biology from Biomolecules to Complex Systems)*, Quebec City, Canada, July, 2007.

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、蛭沢 克己、上田実、各務秀明「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」化学工学会秋季大会、札幌、2007年9月

加藤竜司、加賀千晶、富田康之、大河内美奈、国松己歳、本多裕之「降圧作用短鎖ペプチドのペプチドインフォマティクスによる活性向上」農芸化学会中部支部大会、春日井、2007年9月

山本若菜、加藤竜司、蛭沢克己、各務秀明、上田実、本多裕之「再生医療実用化のための画像情報処理による品質管理技術の開発」生物工学会、広島、2007年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

加藤竜司、山本若菜、本多裕之、他：「細胞品質予測モデル」特許出願番号2007-212116（発明登録済→特許出願中）

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

間葉系幹細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価
—軟骨再生における至適材料評価に関する研究—

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子 名誉教授

研究要旨

再生医療の実用化のためには、軟骨組織の再生において細胞分化の制御とともに組織としての軟骨形態の制御が大きな課題である。つまり軟骨細胞の分化・増殖の決定因子である細胞増殖因子活性の制御が重要な問題となる。ヘパラン硫酸プロテオグリカンはその硫酸化糖鎖部分で細胞増殖因子と結合し、さらにそれらの特異レセプターとも相互作用して、三者複合体を形成することにより増殖因子のシグナル活性のon-offを調節していることを示し、本研究ではニワトリ未分化枝芽における四肢の軟骨パターン形態の形成について、マトリックス分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンの時空間的な発現がFGFの発現と活性の調節因子として作用して一定の軟骨形態パターンが形成されることを明らかにした。これらの結果は、研究課題である「間葉系幹細胞細胞の分化に関する分子生物学的、細胞生物学的評価—軟骨再生における至適材料評価に関する研究」に極めて有益な示唆を与える。

A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で、軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。しかしながら、軟骨組織の再生においては、細胞分化の制御とともに組織としての軟骨形態の制御が大きな問題となる。従来の研究から、軟骨再生における前駆細胞の増殖・分化のキーとなる細胞増殖因子の局在や濃度の時間的、空間的な変化がこれらの細胞の増殖や分化の方向、また細胞の動きの方向の決定因子となり、重要な役割を果たしていることが示され、従って細胞増殖因子の作用の制御が極めて重要な課題となる。マトリックス分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンはその硫酸化糖鎖部分で細胞増殖因子と結合し、さらにそれらの特異レセプターとも相互作用して、三者複合体を形成することにより増殖因子のシグナル活性のon-offを調節していると思われる。本研究では、ニワトリ未分化枝芽における四肢の軟骨パターン形態の形成を研究例として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの分布やヘパラン硫酸糖鎖構造の変化が枝芽に見出される数種類のFGFの発現と活性の調節因子として作用して一定の形態パターンの軟骨、ついで骨が形成される可能性を検討した。また軟骨細胞は脱分化をきたしやすく、実用化のためには細胞の分化を制御し、安定した細胞を供給することが重要な課題であるが、ヘパラン硫酸プロテオグリカンと細胞増殖因子との相互作用の研究は、この点においても重要となる。軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨細胞への分化に関わるマトリックスの検討にとっても重要である。

B. 研究方法

ヘパラン硫酸のO-硫酸化は、2-O-硫酸転移酵素（HS2ST）、6-O-硫酸転移酵素（HS6ST）、3-O-硫酸転移酵素（HS3ST）

の特異的な硫酸転移酵素群によって行われるから、これらのO-硫酸転移酵素活性によるヘパラン硫酸鎖の硫酸化パターンが細胞増殖因子の局在を制御しているものと考えられる。ニワトリ胚では、HS2STとHS6ST-1、-2が発生中の枝芽に部位特異的に発現されていることを見出している。そこで、枝芽形成前の揺籃2日卵のニワトリ胚（Stage 13-14）に空気孔部分の卵殻を破って接近し、予定翼芽領域へHS2STやHS6STのsiRNAを導入した。（HS2ST cDNAを基に合成したRNA 2重鎖をRNaseIII消化したものをエレクトロポレーションによりターゲットに遺伝子導入の効率と導入部位確認のコントロールであるGFP発現ベクターと共に注入後に15Vで3回パルスで細胞内導入し、それらの発現抑制（ノックダウン）を行った。パラフィンで被い、時間を追って観察した。枝芽形成に大きく関与する因子として、FGF-10、FGF-8、ソニックヘッジホッグ（Shh）発現についてwhole mount in situ hybridizationや組織切片上のin situ hybridizationを常法に従って行った。ヘパラン硫酸糖鎖の組成変化をin situ FGF-2 binding assayや免疫組織化学で確認した。増殖因子からのシグナルの変化をERKとAktのリン酸化を特異抗体組織染色と組織抽出物のWestern blot解析で評価した。

（倫理面への配慮）ニワトリを実験材料に用いた研究であり、ヒト材料は今回の研究では使用していない。

C. 研究結果

ニワトリ胚ではHS2STとHS6ST-1、-2が発生中の枝芽に部位特異的に発現されており、枝芽形成に関わる増殖因子の作用を制御していると推測し、枝芽形成前のニワトリ胚の予定翼芽領域へまずHS2STのsiRNAを導入し、そのノックダウンを行った。RNAi法による発現抑制により枝芽の発生に以下の異常がみられた。一つは枝芽の外胚葉性頂堤（AER）の一部の欠損で、重度のものでは枝芽が二股

に裂ける例もみられる、もう一つは異常な（指様の）突起構造の形成である。前者は枝芽の先端側で起こり、後者は基部側の間充織で起こったと思われる。RNAiによる発現阻害の結果siRNA導入細胞では2-O-硫酸をもたない、又は少ないヘパラン硫酸プロテオグリカンが一過的に生成されることになる。このため、ヘパラン硫酸結合性をもつFGFなどの形態形成、細胞増殖因子のシグナリングが正常におこなわれなかった可能性が高く、結果として異常な細胞死又は細胞増殖を示したものと思われた。まず、ヘパラン硫酸糖鎖の組成のsiRNA処理有無での変化をin situ FGF-2 binding assayや免疫組織化学で確かに2-O-硫酸化低下があることを確認した。次いで、in situ hybridization法および免疫染色法により枝芽組織における増殖因子発現への影響を調べた。siRNA処理により枝芽のパターンの異常や伸長の阻害が観察された枝芽ではAER部分のFGF-8の発現が著しく低下しており、また、間充織中ではFGF-10の発現も著しい低下が認められた。枝芽の形成及び成長には、FGF-8とFGF-10のシグナルフィードバックループが作用することが明らかにされており、ヘパラン硫酸糖鎖の2-O-硫酸化の異常低下によりAER-間充織間におけるこれらの増殖因子のシグナルループの破綻が枝芽の発生の異常をもたらしたと思われる。シグナルの異常はERKとAktのリン酸化（前者はMAPキナーゼの、後者はホスファチジルイノシトール3-O-キナーゼの活性上昇による）の上昇となって細胞死などを誘導したと判断された。確かにsiRNA処理した枝芽ではその後の肢骨前駆体軟骨の発生異常により正常形態の四肢骨の形成が見られなくなった。さらに、cHS6STについても同様の実験をおこないヘパラン硫酸6-O-硫酸化も枝芽形態形成に大きく関与することを明らかにした。

D. 考察

脊椎動物の四肢の原基である肢芽において、ヘパラン硫酸 (HS) 鎖はFGF, Wnt, BMPなどの増殖因子や形態形成因子、さらにそのレセプターと相互作用をし、一定の形態を持った軟骨組織が分化発生する。これまでに、ニワトリでは、1種類の2-O-硫酸転移酵素 (HS2ST) と2種類の6-O-硫酸転移酵素 (HS6ST-1, -2) が明らかとなっている。これらの酵素は肢芽では特異的なパターンで発現しており、HS2STは、肢芽全体で一様に、HS6ST-1, -2は肢芽先端側では弱く、それぞれ基部側の前方側と後方側で強く発現している。この発現パターンに合致するように肢芽の先端側では基部側に比べHS中の6-O-硫酸残基の量が少ない。つまり、HSの硫酸化は、硫酸残基の結合位置に対応した硫酸転移酵素によりおこなわれていると思われた。こうした硫酸残基パターンの違いは細胞増殖因子の時空間的なパターンやシグナリングを調整し、肢芽の伸長やパターン形成に関与している可能性が高い。今回、エレクトロポレーション法でsiRNAを導入しHS2STの発現抑制をおこなったところ、肢芽のパターンの異常や伸長の阻害が観察され、またこうした肢芽ではFGF-8やFGF-10

発現が著しく低下した結果から、肢芽でのヘパラン硫酸鎖中の2-O-硫酸残基の減少が、FGFシグナリングなどに影響を与え、肢芽の発生異常が起きたものと推測された。このことはHSの硫酸残基が肢芽での形態形成因子の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

本研究により、軟骨前駆体細胞において細胞表面や細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のヘパラン硫酸 (HS) 鎖は、FGFと、またそれらのレセプターと相互作用をもち、軟骨細胞への分化と増殖の他に、軟骨組織としての組織形態の形成にも大きく関与していることが明らかになった。HS鎖とこれらのリガンドとの結合反応は、HS中の硫酸化のパターンとウロン酸残基のアイソマー分布パターンで決定される特異的構造ドメインで起こり、特にHS中の硫酸化のパターンは数種類の異なる硫酸転移酵素の活性によって決定されており、その特異的な硫酸残基の結合位置によって細胞増殖因子の時空間的な発現パターンやそのシグナリングを調整していると推測された。このことは細胞表面マトリックスを構成するヘパラン硫酸の硫酸残基が肢芽での軟骨組織の分化と形態形成に重要な働きをしていることを示唆すると共に、HS糖鎖の研究は軟骨再生における至適材料評価に関する研究において重要な位置を占めることを示す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sugaya N, Habuchi H, Nagai N, Ashikari-Hada S, Kimata K. 6-O-sulfation of heparan sulfate differentially regulates various FGFs-dependent signaling in culture. *J Biol Chem*. 2008; **283**: in press

Morita H, Yoshimura A, Kimata K. The role of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney International* 2008; **73**: 247-248

Kobayashi T, Habuchi H, Tamura K, Ide H, Kimata K. Essential role of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase in chick limb bud patterning and development. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 19589-19597

Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Atsumi F, Stevens RL, Kimata K. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation and late embryonic lethality. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 15578-15588

Kurup S, Wijnhoven TJM, Jenniskens GJ, Kimata K, Habuchi H, Li J-P, Lindahl U, van Kuppervelt TH, Spillmann D. Characterization of anti-heparan sulfate phage-display antibodies AO4B08 and HS4E4. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 21032-21042

Yamaguchi T, Ohtake S, Kimata K, Habuchi O. Molecular cloning of squid N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase and synthesis of a unique chondroitin sulfate containing E-D hybrid tetrasaccharide structure by the recombinant enzyme. *Glycobiology* 2007; 17: 1365-1376

Nagai N, Habuchi H, Kitazume S, Toyoda H, Hashimoto Y, Kimata K. Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta -secretase activity. *J Biol Chem.* 2007; 282: 14942-14951

Kusafuka K, Watanabe H, Kimata K, Hiraki Y, Shukunami C, Kameya T. Minute pleomorphic adenoma of the submandibular gland in patients with oral malignancy: a report of two cases with histological and immunohistochemical examination. *Histopathology* 2007; 51: 1258-1261.

Minamisawa T, Suzuki K, Maeda H, Shimokata S, Sugiura N, Kimata K, Hirabayashi. Characterization of isomeric unsulfated glycosaminoglycan oligosaccharides by mass spectrometry/ mass spectrometry. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* 2007 Jan; 55(1): 1-6.

Koyama H, Hibi T, Isogai Z, Yoneda M, Fujimori M, Amano J, Kawakubo M, Kannagi R, Kimata K, Taniguchi S, Itano N. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *Am J Pathol.* 2007 Mar; 170: 1086-99.

Sakai K, Kimata K, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shinomiya K, Watanabe H. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 play a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. *J Biol Chem.* 2007; 282: 4152-4161

神村圭介、中藤博志、木全弘治. ヘパラン硫酸の微細構造に秘められた機能— 1: 線虫 ショウジョウバエを用いた解析 実験医学 羊土社 2007; 27 No. 7: 1049-1053

小林孝、羽瀧弘子、木全弘治. ヘパラン硫酸の微細構造に秘められた機能— 2: 脊椎動物におけるヘパラン硫酸 O-硫酸転移酵素による形態形成制御 実験医学 羊土社 2007; 27 No. 7: 1054-1059

羽瀧弘子、羽瀧脩躬、木全弘治. ヘパラン硫酸プロテオグリカンと形態形成 メディカルレビュー社 2007; 5 No. 1: 75-79

幡野その子、渡辺秀人、木全弘治. プロテオグリカンの生物学 ティッシュエンジニアリング2007 日本医学館

単行本

Kimata K, Habuchi O, Habuchi H, Watanabe H. Knockout mice and proteoglycans in *COMPREHENSIVE GLYCOSCIENCE*. Elsevier, (2007) Vol. 3, Chapter 4.10, 159-191

J. Esko, U. Lindahl, K. Kimata: Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. Edited by A. Varki, C. Bertozzi, R. Cummings, Etzler M, Esko J, Freeze H, Hart G, Stanley P, Cold Spring Harbor Laboratory (2007)

2. 学会発表

木全弘治. 生物の形作りを操るヘパラン硫酸. 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 Functional Glycomics」研究成果公開発表シンポジウム、東京(有楽町朝日ホール)、2008: 1-25, 26

Yusa A, Fujii M, Goto Y, Miyaura M, Kim S, Iwata H, Kimata K, Kyogasima M, Kannagi R. Increase of Heparan Sulfate, FGF and VEGF on Cancer Cell Surface in Serum-depleted Culture. 第66回日本癌学会学術総会 横浜 パシフィコ横浜 ワークショップ11 2007 10-3[~]5 : p. 719

羽瀧脩躬、大竹しおり、近藤幸子、山口照由、日下部敦子、伊藤達郎、羽瀧弘子、木全弘治. N-アセチルガラクトサミン 4-硫酸 6-O-硫酸転移酵素の機能解析. 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会. 横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11-15

芦刈-羽田智子、羽瀧弘子、菅谷典子、木全弘治. 2-O-硫酸化ヘパラン硫酸 8糖による FGF-2活性の特異的阻害. 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会. 横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11-15

Zhu L, Zhuo L, Watanabe H, Kimata K. Equivalent involvement of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain isoforms in forming covalent complexes with hyaluronan. 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会. 横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11-15

佐藤祐哉、上村俊人、盛満圭介、杉浦信夫、木全弘治、長田亜樹、眞鍋理一郎、高木淳一、山田雅司、関口清俊. ネフロネクチンのドメイン機能の解析. 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会. 横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11-15

永井尚子、菅谷典子、木全弘治、ヘパリン硫酸 6-O-硫酸基転移酵素 3 (HS6ST-3) に結合する細胞内因子の探索. 第80回日本生化学会大会・第30回日本分子生物学会年会・合同大会. 横浜 パシフィコ横浜 2007、12-11-15

杉浦信夫、角田佳充、大澤拓男、下方郷嗣、木全弘治、渡辺秀人. 大腸菌由来コンドロイチンポリメラーゼ変異酵素による高分子コンドロイチン多糖の合成. 第27回日本糖質学会年会. 福岡 九州大学医学部百年講堂 2007、8-1-3

山口照由、大竹さおり、木全弘治、羽渕脩躬. イカのリコンビナント硫酸転移酵素によるE-D4糖を含むコンドロイチン硫酸の合成. 第27回日本糖質学会年会. 福岡 九州大学医学部百年講堂 2007、8-1-3

木全弘治. グリコサミノグリカン硫酸転移酵素：種々の動物系におけるヘパリン結合性活性分子の生理機能の調節因子としての役割. 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節 Functional Glycomics」第5回公開シンポジウム 東京 東京ガーデンパレス 2007 2-9

Lohmander L, Zhu L, Zhuo L, X-Y RS, Ma K, Blake S, Kimata K. Hyaluronan-linked inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (SHAP), interleukin 8, MMP-3 and hyaluronan in human synovial fluid and serum in osteoarthritis, joint injury and inflammation. 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS); 2007 2.11-14; San Diego, California; 2007.

自動培養装置の開発・初代培養細胞の網羅的遺伝子解析

分担研究者 鈴木 力 日立メディコ 主任技師

研究要旨

再生医療の実用化のためには、熟練した人の技術に依存している現在の作業工程を自動化することは、培養コストの削減と安全性向上の両観点から非常に重要であると考えられる。このため、昨年に引き続き本研究では、接着依存性細胞であるヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の自動培養装置による培養の遂行と、培養した細胞の機能性評価を行った。結果として、本研究で開発された自動培養装置を用いて培養したMSCは、骨分化能を十分に有しており骨再生などの研究に充分用いることができるものであることが示唆された。培養装置の評価としても、10日間の長期無人操作がコンタミネーション無しで行うことができたことから、本研究を通じて開発された培養装置の機能性が有効であることがわかった。また、本研究では由来組織の異なるヒト細胞(線維芽細胞、MSC)の自動培養をこれまで実践してきたが、由来組織の違いがもたらす細胞における遺伝子プロファイルを解析することで、培養装置に適すると共に、治療効果にも期待が持てる細胞を特定できないかと考え、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。

A. 研究目的

再生医療に用いる細胞の多くは、手作業による細胞培養を必要としている。この作業は熟練を要し、扱う器材も多岐に渡るため、ヒューマンエラー、コンタミネーションのリスクが高い。また培養条件の均一化と品質の再現性向上も重要なファクターであり、医療品と同等以上の安全性を確保する仕組みが必要である。さらに、現在の再生医療の多くは研究フェーズにあるが、産業化を進めるに当たっては、コストの問題も配慮する必要がある。すなわち、培養作業に伴う工数と、その人的・物的管理費用、高潔浄な施設の建設ならびに管理には莫大な費用がかかることが予想されており、新しい医療技術の普及を阻害する要因になり得ると考えられる。このように、安全性の確保とコスト低減の両立を図る必要があり、現状では大きな課題がある。

我々は、昨年度まで歯肉由来・真皮由来の線維芽細胞など、細胞治療に用いる細胞として一つのモデルケースに対して自動培養装置の有効性を確認して来ていた。また、プライマリーカルチャーに代表される組織からの培養においても、酵素処理条件を最適化することによって自動培養装置での培養が充分に行えることを確認していた。そこで本年度は、もう一つのモデルケースとして、未分化なヒト骨髄由来の間葉系幹細胞(MSC)を自動培養装置で培養し、骨に分化誘導することが可能かどうかを検討した。分化しきっている線維芽細胞の培養とは異なり、未分化な幹細胞を分化できることは、今後より多くの細胞治療の現場において、自動培養装置が活躍できることを示唆するものである。

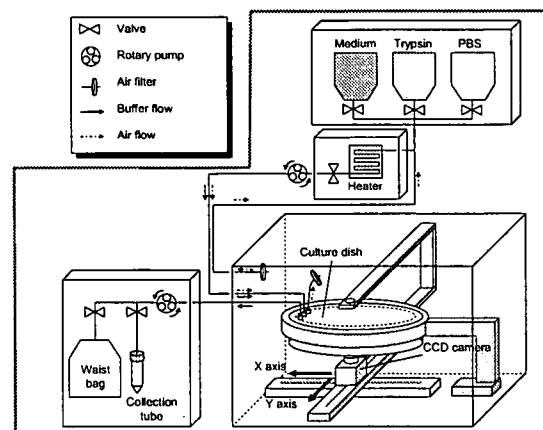
同時に、本研究では自動培養装置内における初代培養が由来組織を問わずに可能であることを確認していた

が、どんな由来(遺伝子的背景)を持つ細胞の方が治療効果を期待できるかを詳細に知るため、マイクロアレイを用いた歯肉組織・真皮組織の二つの組織由来の線維芽細胞の網羅的な遺伝子解析を行い、より臨床的な目標と実現に近いものがあるかを検討した。

B. 研究手法

(1) 自動培養装置を用いたMSCの培養と分化誘導

開発した自動培養装置(図1)を用い、PCからの遠隔操作を行いながら、ヒト骨髄由来のMSCを用いた培養を行った。培養行程は、初期培養を10日間に設定し、10日目にトリプシンで細胞を剥離し均一に再播種した後、4日間培養後に分化培地を投入して骨分化を誘導した。培地交換頻度は1週間に1度でした。



(図1) 開発自動培養装置

(2) マイクロアレイを用いた歯肉・真皮由来の線維芽細胞の遺伝子プロファイル比較

名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得たプロトコル・インフォームドコンセントによって得られた臨床ヒト線維芽細胞（皮膚由来8例、歯肉由来8例）をDMEM培地（FBS 10%, 抗生物質1%）を用いて継代培養し、P4-5の細胞からmRNAを抽出した。得られたmRNAをサンプルとしてHUMAN FOCUS ARRAY (Affymetrix) による約8,500遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を行った。網羅解析にはArray Assistを用いた。

C. 研究結果

(1) 自動培養装置を用いたMSCの培養と分化誘導

図1の自動培養装置を用いてヒトMSCの培養を行い、手作業による培養との比較検討を行った。

結果、装置を用いた場合にも、手作業で培養した場合にも、分化誘導への応答性、増殖能の変化はなかった。培養後の細胞は、アルカリフォスファターゼ活性（ALP活性）において、手作業と変化が無かったため、自動培養装置での培養行程が幹細胞にダメージを与えることは無いことが示唆された。

即ち、本研究を通じて開発された自動培養装置は、幹細胞を未分化のまま培養が可能で、手作業によるルーチン作業を十分に代替できることがわかった。

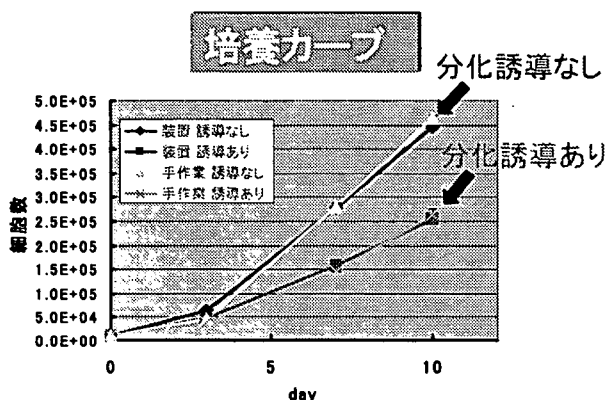


図2: MSC培養における自動培養装置の影響

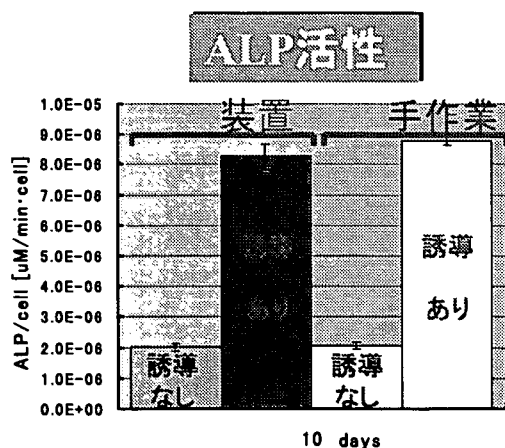


図3: 自動培養装置を用いて培養したMSCの骨形成能評価

また、自動培養装置で培養・骨分化を行ったMSCを、ヌードマウス皮下への細胞移植によりin vivoで評価し

た。移植した組織片は4週後に取り出し、HE染色を行い顕微鏡で観察した結果、TCP顆粒中に混ぜられた細胞の中に、骨に分化した部分が存在しており、得られた細胞には骨分化能が存在することが判明し、自動培養装置で培養したMSCが骨分化誘導後、生体内で十分に骨となっていることが確認された。

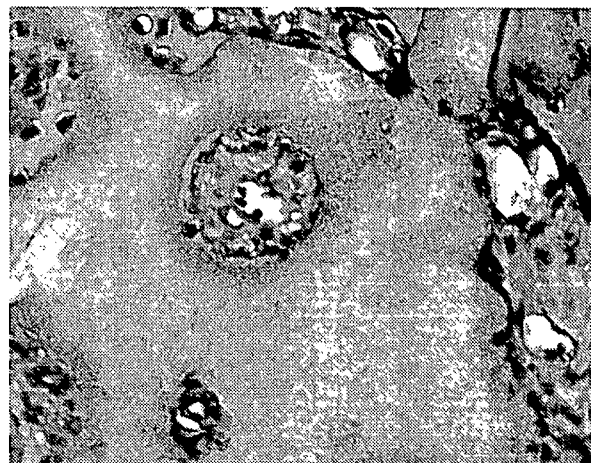


図4: 図1の装置を用いて培養した細胞による骨形成

(2) マイクロアレイを用いた歯肉・真皮由来の線維芽細胞の遺伝子プロファイル比較

臨床ヒト線維芽細胞（皮膚由来8例、歯肉由来8例）における遺伝子発現データを解析したところ、8,500遺伝子において114遺伝子が皮膚由来の線維芽細胞で優位に高く発現し、154遺伝子が歯肉由来の線維芽細胞で優位に高く発現していることがわかった。総じて、年齢にかかわらず歯肉由来の線維芽細胞の方がより多くの活性化因子を多く発現していることが示唆された。

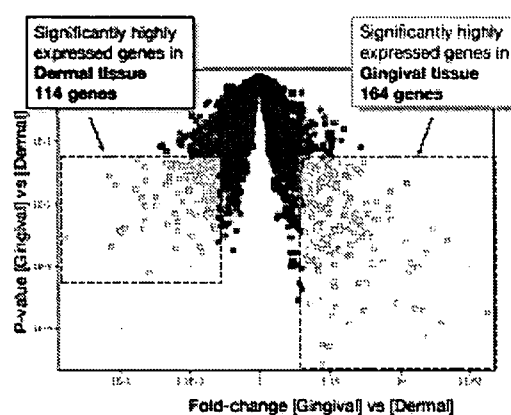


図5: 皮膚由来・歯肉由来の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル比較

また、各組織に特異的に高発現していた遺伝子をピックアップし、Gene Ontology解析を行ったところ、抗加齢に関連する遺伝子の多くが、歯肉由来の細胞で高く発現していることがわかった。例えば、抗加齢に関与してい