

200706021B

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備に関する研究

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 上田 実

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
再生医療の実用化の安全性・効率性に関する基盤技術の整備に関する研究-----	1
上田 実	
II. 分担研究報告書	
1. 自動培養装置および安全性評価機能を備えた細胞供給システムの開発-----	37
各務 秀明	
2. 画像処理技術を用いた培養細胞の評価法の開発-----	45
紀ノ岡 正博	
3. 情報処理理論を用いた細胞培養の効率化-----	50
本多 裕之	
4. 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-----	59
木全 弘治	
5. 自動培養装置の開発・LOH解析による培養細胞のがん化検出システムの開発 -----	67
鈴木 力	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表・別刷 -----	74

研究要旨

培養細胞を用いた初めての臨床例が報告されて以来約20年が経過し、臓器移植や人工材料による治療に代わる新たな医療として、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。治療対象や症例数はますます広がる傾向にあり、一部はすでに臨床研究から実用化の段階に達しているが、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。本研究は、再生医療に必要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をめざすものである。安全性については、特に血清の影響と無血清培地に関する検討を行なった。さらに、これまでの臨床研究を通じて、安全性に関する情報を収集した。また、品質の確保に関する検討として、細胞の画像から細胞の状態を把握するための画像処理と解析システムの構築と、さらに増殖能を予測するアルゴリズムの作成を行なった。一方、品質の確保には培養細胞の分化誘導法の開発と再生組織の形態制御が大きな課題である。マトリックスマルタン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。効率化については、閉鎖系ですべての工程を自動化可能な自動培養装置の開発と評価を行った。

分担研究者

各務 秀明 東京大学医科学研究所幹細胞組織医工学 准教授

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

本多 裕之 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻生物プロセス工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 名誉教授

鈴木 力 株式会社日立メディコ 主任技師

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。

一方、臨床応用が進められる中で新たに理解されてきた問題もある。実際の臨床で対象となる患者はさまざまな背景を持ち、採取可能な細胞や組織も動物実験ほどには均一にすることができない。われわれが臨床で経験する細胞培養の過程でも、増殖能や、形態に個体差が見られることがあるが、これらの変化をどの程度許容できるのか、あるいはどのように評価すべきなのかといった報告はない。したがって、増殖能や形態に見られる差位と細胞生物学的な特徴、そして治療効果とを結びつける研究の必要性が痛感される。本申請では培養細胞の品質確保のためにこれら基礎的研究を行う。

現在行われている細胞培養操作は人手に頼っており、さらに安全性確保のために高額な施設と管理のための膨大な労力が必要とされている。そのため、再生医療は高額な医療とならざるを得ない現実があり、現在のシステムのままでは高額な医療費を負担できる一部の患者のための医療となることが懸念される。しかしながら、将来は疾患によっては再生医療以外に

A. 研究目的

本研究の目的は、再生医療に必要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、感染防止など

治療方法がないといった場合も想定され、特殊な治療を除いては、より多くの患者が再生医療の恩恵をうけられるようになるべきである。本研究では、安全性を確保しつつも効率的な培養方法の開発を行い、治療コストの削減を目指す。

本研究を通じて安全性や品質管理において現時点で考え得る最良の手段を提供することにより、今後広く臨床応用され、実用化されるであろう再生医療、あるいは細胞治療に対し、科学的な根拠をもって評価がなされるものと期待される。また、この情報を効率的な培養システムの開発と組み合わせることで、はじめて再生医療が多くの国民の健康に奉仕するものになるものになると考えている。

B. 研究方法

・無血清培養および自己血清を用いた培養システムの開発

一部の無血清培地は、わずかながら動物由来の成分を含んでいた。しかしながら、安全性を考慮すれば、現時点では動物由来成分を全く含まない新たな無血清培地が望まれる。しかしながら、実際に再生医療にこのような無血清培養は採用されておらず、増殖能や細胞のキャラクターなどの基礎的検討を行う。一方、安全性確保のためには、動物由来ではなく自己の血清を用いた培養も重要な選択肢であるが、個々の患者においてばらつきのある自己血清を用いて、どの程度安定して細胞培養が可能かについては十分なデータがなく、本研究にて検討を行なった。

われわれは、これまで骨髄由来間質細胞 (BMSCs)、およびヒト線維芽細胞を用いた臨床研究を行ってきた。これらの研究を通じて、自己血清を用いた細胞培養の可能性と問題点について検討を行なった。

一方、本研究では、ボランティアより同意を得て採取した骨髄由来細胞、および細胞バンクや購入可能なさまざまな細胞系列を用いて、それぞれの細胞の表面抗原の違いを FACS を用いて解析した。次に、培養された骨髄由来間質細胞 (BMSCs) の遺伝子発現について、骨関連遺伝子を中心として RT-PCR を用いて検討した。

次に、これらの細胞に対する血清の影響について検討を行なった。特に、血清濃度や血清の種類は分化誘導に与える影響について検索した。また、血清を含まず、動物由来成分を含まない新たな幹細胞用培地の提供をうけ、ヒト由来 BMSCs の細胞増殖と分化誘導について検討を行ない、さらに FACS にて表面抗原の違いについて検討を行なった。

・動的 (あるいは準静的) および静的細胞診断技術の開発

動的評価では、培養中に細胞を破壊することなく評価可能であり、再生医療に適している。すべての培養細胞を調べることが可能であるばかりでなく、評価して安全性を確認した細胞を移植することができる。しかしながら、細胞の動きを定量的に評価する研究は十分ではない。本研究課題では、画像処理技術を用いた細胞モニタリング法を利用して、培養中に細胞の増殖曲線、細胞面積、外部刺激に対する細胞面積変化、回転運動等を評価するこの画像情報を機能的評価の結果と対比させることで、培養細胞の分化度や機能異常を検知することを目標とする。

動的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

画像観察システムの改良ならびに臨床研究に用いられているヒト細胞 (株化されていない細胞) での観察データの取得ならびに解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

既存の細胞観察システムの性能を、ハード (画像取得装置)、ソフト (画像取得プログラミング) の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、動的手法の汎用性を目指し、角化細胞の寿命評価を細胞ペアの回転速度測定により実施した。

準静的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

D-グルコース提示面上での画像観察手法の改良ならびにヒト細胞での観察データの取得・解析についての指針を構築することで、データの信頼性を目指した。

特に、既存の細胞観察システムの性能を、ハ

ード（画像取得装置）、ソフト（画像取得プログラミング）の改良により向上させ、より詳細な画像データの取得を目指す。また、準静的手法の汎用性を目指し、角化細胞の寿命評価を形態変化（円形度）測定により実施した。

蛍光免疫染色を伴う立体組織片の定量評価法の構築

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、取得立体画像を、市販の Image Pro Plus にて画像処理を行った。

培養装置制御のための細胞回収量予測モデル

臨床研究において同意を得た患者 20 名由来の線維芽細胞を経時的に培養し、毎日位相差画像を取得することで経時的な細胞画像データを大量に取得した。各細胞画像データを画像処理し、細胞の形態特徴量を 120 種類抽出して入力データとし、Fuzzy Neural Network(FNN)を用いてモデル構築を行った。教師値としては、各患者の細胞における実際の増殖率を実験により確認したものをを用いた。

画像解析では、線維芽細胞を認識するための最も良い閾値をランダム抽出した画像を目で確認した教師値と比較することで最適化し、大量の画像処理を短時間で行える独自のワークフローとアルゴリズムを確立した。

また、画像の数値化においては、細胞形態情報の経時的な変化量を導入した。

予測精度や重要特徴量の選択能に関しては、これまで多くの生物情報解析に用いられてきていた重回帰分析(MRA)による変数増加法や、主成分分析(PCA)、CART 法などを検討し、その有用性を比較した。

培養施設効率化のための作業管理システム

ASP 形式にてスケジュール管理ソフトウェアを開発し、イントラネットにおいて公開し、

作業内容、作業人員、などすべてを統括した SOP (プロトコル) を DB 化した。データ入力は PC からイントラネットで行い、データ出力として各画面に工程予約状況を表示させた。

培養細胞の品質管理システム

ヒト角化細胞の継代培養(3 個体・5slot)において、細胞の位相差顕微鏡画像を経時的に大量取得した(180 枚×3 視野)。各細胞は、継代限界になるまで継代培養を行い、各培養期間はサブコンプレントになるまでこれを続けて行った(約 3-4 日)。各細胞画像データを画像処理し、細胞形態特徴量を 134 種類抽出し、入力データとして用いて多変量解析を行った。教師値としては、継代限界を迎えた時間から逆算した残存ダブリング数を実験的に計測し、これを用いた。

画像解析では、線維芽細胞の認識とは全くことなるアルゴリズムを確立し、角化細胞に合わせたコロニー形成能を評価できる数値化手法を確立し、これを用いた。

また、これまで生物情報に多く用いられてきた重回帰分析(MRA)や、主成分分析(PCA)、CART 法などを検討し、その有用性を比較した。

・ 効率的分化誘導法および再生組織の形態維持に関する基礎的検討

N1511 細胞は実光らによって p53 ノックアウトマウス肋軟骨より確立された不死化細胞株で、通常は繊維芽細胞様であるが BMP または dexamethasone と PTH の添加により軟骨細胞へと分化する。この分化に伴う細胞外マトリックスの分子変化の検討を以下のように行った。軟骨分化マーカー分子のアグリカン、II 型コラーゲン、IX 型コラーゲンなどの realtimePCR による発現量の測定、またアルシアンブルー染色法および特異抗体を用いた蛍光抗体染色法によるアグリカンの合成及び細胞外マトリックスへの分布蓄積の有無とその量の測定より、軟骨分化への関与を定量化した。分化した軟骨細胞の特性の一つは多量のコンドロイチン硫酸を

合成する能力である。この糖鎖の骨格合成に関与する6種類の酵素（CSS1, CSS2, CSS3, CSGalNAcT-2, CSGalNAcT-1, CSGlcAT）について、間葉系細胞から軟骨細胞の分化に伴う発現の変動を、in situ hybridization法により染色像とリアルタイム RT-PCR法による発現測定から調べ、軟骨再生における分子生物学的、細胞生物学的評価のマーカーとして有用かどうかを、検討した。分化した軟骨の程度は aggrecan の発現を同方法により調べて解析した。ヘパラン硫酸と細胞増殖因子との結合は、主に 2-O-硫酸転移酵素（HS2ST）と 6-O-硫酸転移酵素（HS6ST）によって付加される O-硫酸基がその特異性決定因子になっている。ニワトリの肢芽を実験系として、これらの O-硫酸転移酵素の発現を siRNA 法により抑制しヘパラン硫酸鎖の O-硫酸化パターンを変化させて細胞増殖因子との相互作用を異常にし、肢芽軟骨分化とその形態への影響を観察した。さらに細胞増殖因子の発現と分布の変化、また増殖因子からのシグナルの変化を ERK と Akt のリン酸化で評価した。

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 が発生中の肢芽に部位特異的に発現されていることを見出している。肢芽形成前の揺籃 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。（HSST 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。肢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。

・効率的培養法の開発

現在再生治療に用いる細胞は、ほとんどが手作業で培養されているが、ヒューマンエラーによるコンタミネーションなどの問題がある。また、技術者の勘にたよる部分が多く、産業化の障害となっている。申請者らはこれまで完全閉鎖系の自動培養装置の開発を行っており、動的評価システムや情報処理理論と組み合わせることにより、安全で効率的な細胞培養システムの構築を行う。

自動培養装置を用いた MSC の培養と分化誘導

小型かつ内部消耗品が完全にディスプレイな無菌的培養チュービングを配した自動培養装置を開発し、これを用いて線維芽細胞・MSC の培養を行った。継代培養、培地交換、画像取得などはすべて遠隔 PC からの操作およびジョブリストの構築によって行い、細胞の装置内への播種以外の工程をすべて自動で行った。

細胞（Cambrex 社正常ヒト線維芽細胞、歯肉由来ヒト臨床サンプル、皮膚由来ヒト臨床サンプル、ヒト由来 MSC）、培地、トリプシン、PBS を無菌的に装置内部にセットした送液チューブを通じて送液し、直径 30cm 特製培養皿にて培養を行った。継代、培地交換、回収の全ての工程は、プログラミングした工程として自動的

に装置が行い、培養中の細胞の状態の映像は30分置きに画像化して保存した。一定期間の培養の後、装置で培養した細胞はPCからのプログラム操作によって培養皿から回収し、回収した細胞液をクリーンベンチにて操作後、細胞計測装置を用いて細胞数・生存率などを測定した。培養中の画像を定期的に保存することで、細胞の育成状況をモニタリングし、回収のタイミング・操作の条件を微調整しながら培養を繰り返した。

開発した自動培養装置を用い、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度とした。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、治療(手術時)に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者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、同意書については名古屋大学倫理委員会および東京大学医科学研究所倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

臨床研究で培養された患者由来BMSCsの個体差についての報告を行なった。自己血清による培養は可能であったが、細胞数およびALP活性には大きな差が認められた(図1)。これらの症例全例で骨再生を認め、インプラントの埋

入が可能であったことから、骨再生への影響は明らかではない。しかしながら、安定して効率的な骨再生法の確立には、得られる細胞が一定の増殖と活性を持つことが必須と考えられる。したがって、本年度の研究として、BMSCsの個体差について詳細な検討を行なった。

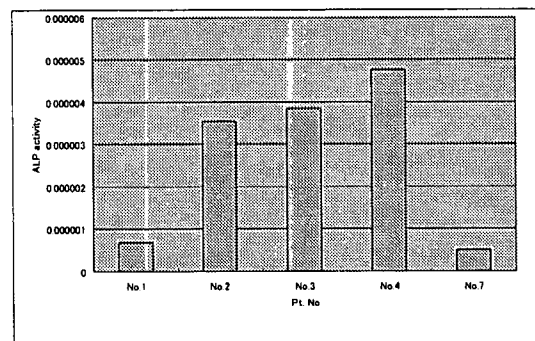


図1. 自己血清による間葉系幹細胞の培養。ALP活性の比較。ALP活性には、細胞数同様最大8倍程度のばらつきが見られた。

はじめに、さまざまな由来のBMSCsを用いて、FACSにより細胞の表面抗原の解析を行なった(図2)。用いた細胞は実験用として購入可能なヒトMSC、Riken細胞バンク由来のMSC、健康なボランティアの骨髄由来BMSCs 2種類である。ボランティア由来のBMSCsについては、臨床研究同様の培養法を用いた。

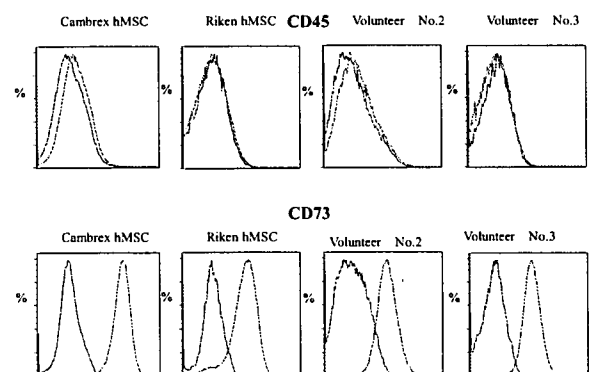


図2. FACSによる細胞表面抗原の解析(CD45, CD73)。

培養細胞の表面抗原は、その由来に係わらず

ほぼ一定であり、継代による変化もわずかであった。このことから、培養される細胞の population は、患者に係わらずほぼ一定していると考えられる。差が見られた部分は CD14, CD34 そして CD106 であった (図 3)。

<p>Cambrex hMSCs passage 5 CD3⁺, CD10⁺, CD14^{low}, CD19⁺, CD29⁺, CD34^{low}, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁻, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻</p>
<p>Riken hMSCs passage 4 (HMS0052: passage 2) CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁻, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻</p>
<p>Volunteer No.2 hBMSCs passage 3 CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁻, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻</p>
<p>Volunteer No.3 hBMSCs passage 3 CD3⁺, CD10⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁻, CD146⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻</p>

図 3. FACS 解析結果のまとめ (赤は差あり)

次に、さまざまな系列の BMSCs を用いて、骨関連マーカーの発現を検討した。臨床で見られる BMSCs には、形態的にはさまざまな分化段階の細胞が認められる。また、個人差があるようにも思われるが、臨床研究で認めた ALP 活性の差が、もともとの細胞の分化度の差や分化度の異なる細胞の混在による可能性が考えられるため、さまざまな細胞系列を用いて、骨関連マーカーの発現を RT-PCR にて調べた (図 4)。

RT-PCRによる骨関連遺伝子の発現

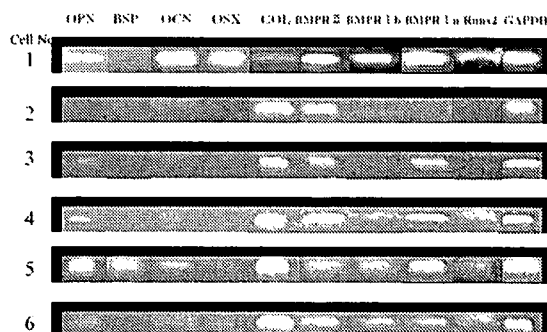


図 4. 各細胞系列における骨関連遺伝子発現の解析

驚くことに、臨床に用いられる BMSCs では、分化誘導前から多くの細胞系列でさまざまな分化マーカーの発現が認められた (図 4)。しかしながら、分化マーカーの発現には個体差があり、すでに分化傾向にある細胞を含む細胞系列と、比較的未分化な細胞が中心である系列との差があることが示された。臨床研究で見られた ALP 活性の差は、分化誘導刺激への反応性のみならず、分化誘導前の細胞に、実際にはさまざまな分化度の細胞が混在している事実を示しているものと考えられる。したがって、安定した骨再生のためには、培養中に細胞の分化度を一定に保つための培地等の工夫が必要と考えられた。

骨再生の臨床では、通常 1 継代あるいは 2 継代目の細胞が用いられており、経験的には継代数の増加は骨再生に影響を与えることが知られている。しかしながら、具体的にどの継代 (PDL) の細胞まで用いることができるかについては十分な根拠が示されていない。臨床では再生する組織の量により、必要な細胞数は異なる。したがって、継代数も異なる可能性があるが、どの程度の培養や継代が可能かについては、十分理解されていない。そこで、本研究では、第 1 継代培養から第 5 継代までの細胞の ALP 活性、および骨形成能の比較検討を行なった。

本研究により骨再生能の継時的変化を知るとともに、安定した骨再生を得るための諸条件を明らかにすることを目的とした。

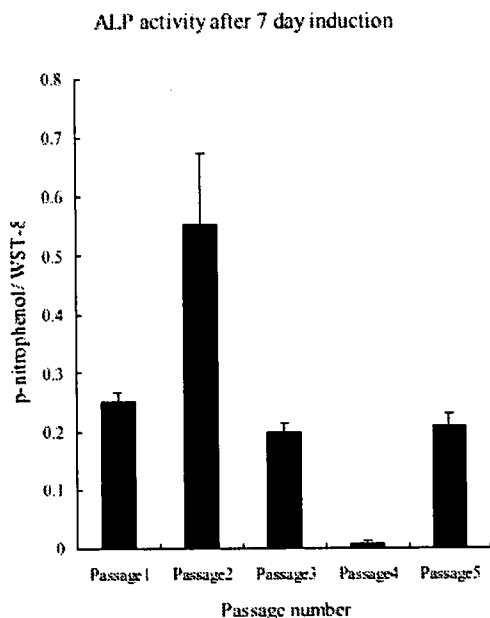


図5. 継代による BMSC s の ALP 活性の変化。(1 週間骨分化培地にて培養)

個体差はあるものの、およそ第2継代の細胞がもっとも高いALP活性を示し、第1および第3以降では下降する傾向であった(図5)。第1継代では細胞は比較的未分化な状態であり、第3継代以降では、非誘導活性が低下するものと推測された。

次に、このALP活性の変化が実際の骨形成能に対する影響を調べるために、各継代の細胞を担体に播種し、ヌードマウスの皮下に移植して、異所性の骨形成能の違いを検討した(図6)。

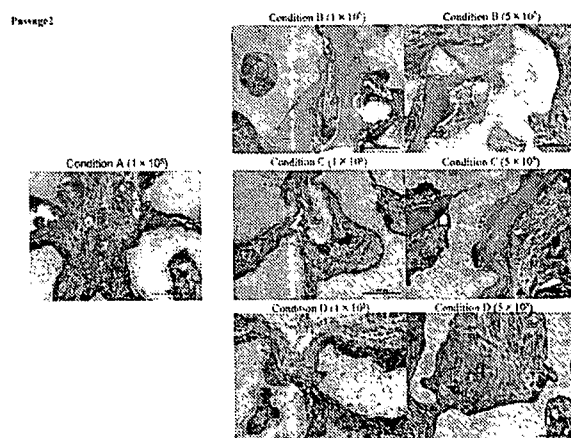


図6. 第2継代の細胞による骨再生。移植条件により差を認めるものの、移植後4週にて骨再生が認められた。

異所性に骨を形成する能力は継代とともに失われ、また in vitro でのALP活性と良く対応していた(図7)。また、同じ継代数であっても、移植条件によっては骨再生能を示さないなど、BMSC s による骨再生には、至適条件を確保する必要があると考えられた。異所性の骨再生は、ほとんど第2継代(細胞や分化誘導条件によっては第1および第2継代)に限局しており、継代により失われることが示された。

Rate of bone regeneration (new bone containing transplants/ total transplants)

		Condition A	Condition B	Condition C	Condition D
Passage 1	1 × 10 ⁵	0/2	0/1	0/1	0/0
	5 × 10 ⁵	0/0	0/1	0/1	0/1
Passage 2	1 × 10 ⁵	0/2	1/2	0/2	0/2
	5 × 10 ⁵	0/0	1/1	1/1	0/2
Passage 3	1 × 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1
	5 × 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1
Passage 4	1 × 10 ⁵	0/3	0/2	0/2	0/2
	5 × 10 ⁵	0/0	0/2	0/1	0/1
Passage 5	1 × 10 ⁵	0/2	0/2	0/2	0/2
	5 × 10 ⁵	0/1	0/1	0/1	0/1

図7. 継代数が BMSC s の骨形成能に及ぼす影響。この細胞では、第2継代の細胞にのみ骨形成能が認められた(1週間の分化誘導後)。

• 無血清培地によるBMSC s 培養の評価

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。

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。

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。

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(+)で、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。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。

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。

線維芽細胞の無血清培地による初代培養

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、初代培養および継代後の細胞について、市販の無血清培地であるDMEMおよび各種濃度の血清との組み合わせで増殖能を検討した。ヒト線維芽細胞を用いた実験では、初代培養時には通常の培地と比較して十分な増殖は得られなかったが、継代後の細胞については、通常の培地と遜色ない程度の増殖が認められた

・血清が細胞の骨分化に及ぼす影響について

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。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。

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。

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活性に変化はみとめなかった。

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。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。

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。

動的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

動画評価を実施するための細胞観察システムのハード（照射装置、ステージ）および取得ソフトを改良し、3つのT-フラスコ中の18点を5分毎に画像取得可能なシステムを構築した。本システムによりより詳細なデータ取得可能とした。また、得られたデータの解析方法について、細胞培養の特徴を考慮し

た方法論を構築した。

フラスコ内で多点観察が可能な細胞観察装置にて、ヒト角化細胞の挙動観察（動的評価）を行い、2個の細胞が接した状態になると回転運動を行うことがわかった。2個の細胞の回転速度を評価した（抽出挙動評価）。回転速度による細胞挙動評価の有効性を確認するため、通常酸素濃度（21%）と極低酸素濃度（0.2%以下）の条件下における角化細胞の継代培養実験を実施した。通常酸素濃度下で培養した場合は、数回の継代培養において累積分裂回数PD=6.8で細胞の増殖が停止し寿命に達するのに対し、極低酸素濃度では増殖速度の著しい低下もなく増殖が続き、PD=14.5まで達した。このとき、各酸素濃度下で培養したときの細胞挙動を把握するために、回転速度を測定したところ、通常酸素濃度下では累積分裂回数の増加とともに、回転速度が低下したが、極低酸素濃度下での培養では、寿命に伴う回転速度の著しい低下は見られなかった。以上の結果より、回転速度を指標とする運動性評価は、細胞活性評価の一つとして有効であることが示された。さらに、回転運動能力と細胞伸展能力の組み合わせ評価により、角化細胞の継代培養中に、細胞寿命を非襲撃的に評価可能であることを確認した。

準静的評価におけるデータ取得・取得方法の指針構築

準静的評価を実施するためのハードの確認を行ったところ、汎用性の高い位相差顕微鏡でかつ、培養初期24h後に画像取得することで適用可能であることが確認された。また、形態変化評価においても既製品の画像解析ソフト（本試験では、WinRoof、三谷商事を使用）にて細胞輪郭をフリーハンドで描き、円形度を算出することで評価可能であることが確かめられた。なお、本評価機能を備え

た、自由配布可能なソフトを作成することで、汎用性を可能とした。

ヒト角化細胞の数回の継代培養において、準静的評価を行い、累積分裂回数に対する細胞形態（円形度）の変化を観察したところ、累積回数の増加に伴い、伸展可能な細胞が減少し、その結果円形度が上昇した。さらに細胞増殖速度の減少と細胞形態変化相関づけるさせることができた。

D-グルコース提示面の特性解明をめざし、抗体を用いたブロッキング法により細胞接着ならびに形態変化のメカニズム解明を目指した。特に、GLUT を介する細胞形態のメカニズムを証明するために、0, 100%*d*-glucose 提示培養面を用いインスリンを含むまたは含まない培養条件で培養した細胞の GLUT の観察を行った。ここで細胞は、不死化処理を施したヒト乳腺上皮細胞を使用することで、実験の安定化を図った。細胞接着はインスリンの有無とは関係なくほとんど差が確認されずに、*d*-グルコースの提示密度に伴う大きな変化は確認されなかった。また、細胞表面に存在する GLUT を anti-GLUT 抗体を用いブロックした細胞の細胞接着にもほとんど差が確認されなかった。これは、乳腺上皮細胞の場合、細胞接着に integrin が関与していると考えられた。様々な濃度 (0, 50, 100%) の *d*-グルコースを結合させた面上で培養した細胞は様々な形態を示すことが確認され、さらに、培地中のインスリンの有無やブロッキングの有無によって、伸展された細胞の形態から丸く維持された細胞形態まで円形度が変化することがわかった。

さらに、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。0%D-glucose 提示培養面では、インスリン添加前後で細胞の形態変化はなかったが、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、インスリン添加による GLUT 4 の提示増加による応答であることが示唆された。

以上より、D-グルコース提示面上の細胞は、接着としては、インテグリンを介した機構、形態変化は、GLUT を介した機構であることが解明された。また、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。

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、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 ZT は単層培養時の値を採用した。さらに、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、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。

培養装置制御のための細胞回収量予測モデル

細胞回収量予測モデルでは、播種後 1 日目

と3日目のまだまばらな細胞画像を用いて、14日後（臨床の治療において患者が来院する時期）において充分量の細胞が回収できるかどうかを連続値で予測した。

結果、多くの細胞の画像解析研究で見られるように、作業員や研究者が恣意的に選んだ指標（増殖具合や播種密度）という情報よりも、情報処理解析によって無作為に選択された形態指標の組み合わせを用いるモデルの方が非常に精度が高く回収量を予測できることがわかった。

このような回収量予測モデルは、自動培養装置における継代のタイミングを自動的に判断するインテリジェント化のためのソフトウェアとして機能することが期待されるだけでなく、培養を行う作業員にとっても作業をより安心して安定に行うことに貢献すると考えられる。

重回帰分析(MRA)による変数増加法や、主成分分析(PCA)、CART法との比較を行った結果、予測精度はFNNを用いたモデルが最もよく、かつルールとして形態特徴量の組み合わせを確認できるため、作業員支援的観点からもFNNモデルの有効性が示唆された。

また、本研究から強く示唆されたことは、人間が感覚的に判断している形態情報は非常に重要であるが、恣意的に選んだ単一の変数では個体差のある細胞を安定して認識することは非常に困難であるということである。このため、情報処理理論のような人間のデータ処理能力を補助し、数値化して汎用化する手法の導入が、再生医療での細胞供給には重要であろう。

培養施設効率化のための作業員管理システム

本研究では、培養のための培地成分なども含めて培養にまつわる消耗品を用いた培養の効率化を初期には検討したが、臨床現場の

ニーズをより詳細に解析した結果、これらを最適化した場合でも培養効率が飛躍的に向上しないことがわかった。すなわち、再生医療の細胞培養工程における最大の律速は、作業員や使用区域の限界であった。このため、培養効率化のためには、実際の細胞調製施設において細胞調製施設1室、作業員3名、医師1名という細胞治療体制を仮定し、各作業員がイントラネットで自分の作業内容を公開・確認し、これを作業責任者・医師が確認できる管理ソフトウェアの開発を行った。

通常、細胞培養の工程管理は、管理者が経験的に行っており、人による自在な判断が必ず必要ではないかと当初は考えられた。しかしながら、細胞調製のプロトコルを「重要度」を設けてレベル分けし、日程をずらすことができる工程と日程をFixすべき工程とを分別して管理することと、最終調整量に応じてプロトコルを3パターンに分けてこれを選び分ける手法を導入することで、ヒト細胞の培養のような個体差の影響を大きく受ける調製工程を効率的に管理できることを確認した。

結果として、人がスケジュール管理し、医師との疎通を頻繁に行わなくてはならなかった調製工程が大幅に簡易化され、作業効率の向上が確認された。さらに、各試薬の使用データおよび、作業員の履歴をバーコードデータ入出力により管理するソフトウェアを導入したことで、記録を確実に残す安全性の高い作業が達成され、作業の効率化が図られた。

本研究で開発したシステムは、株式会社日立プラントテクノロジーによって、CPC管理システムとして採用され、下記のようなインターフェースを持つソフトウェアとして発売に至った(2007年)。

本研究を通じて明らかになったことは、正

常細胞の倍化時間には一定の時間が必ず必要になるため、極端な作業効率化は培養方法の改良では行うことができず、人的な要因をいかに効率的に動かすかの方が、重要であることであった。再生医療の実用化のためには、このようなインフラの確立が重要であり、再生医療の現場と工学部との密接なやりとりによる最大の成果が、今回のようなコンセプトを生むことに繋がったと考えられる。

培養細胞の品質管理システム

本研究では、さらに情報処理を用いた画像解析と予測モデルの構築が再生医療の実用化に貢献できないかを考え、品質管理への適応を模索した。

治療用の細胞は安全性とともに、安定した治療効果を保証できるものでなくてはならない。このためには、培養終了後、治療に用いる細胞がどのくらい活性が残っているのか、その後どれだけ培養できるのかを予測し、高い精度で賞味期限を表示する必要があると考えられた。そこで、我々はもっとも実用化の近い、角化細胞の培養画像によって、細胞の残存ダブリング数（寿命）を予測するモデルの構築を試みた。

角化細胞は、線維芽細胞とはことなつた増殖形態を持つため、コロニーを形成して増殖する角化細胞に最適な画像処理手法を開発し、細胞一個一個の形態特徴量を抽出すると共に、コロニーとしての形態特徴量を予測モデルの構築に用いた。さらに、継代操作によってリセットされてしまう形態情報をより正確に入力として利用するため、継代間の培養中におきた形態の経時的な変化量も予測モデルの入力値として利用した。

結果、我々は角化細胞の残存ダブリング数を予測するために必要な、重要な形態的特徴の組み合わせを発見し、これを用いて高精度な予測モデルを構築するに至った。選ばれた

形態的特徴は、どれも作業者が経験的に感じているものではあるが、定量化できていないものであったため、このようなルール化とモデル化の成功は、これまで経験的かつ曖昧だった品質管理を、より定量的なものにすることができる可能性がある。

かつ、得られた高精度予測モデルは、さらに継代数を2分したモデルと組み合わせて用いることで、より正確な誤差の少ない予測ができることが確認された。これは、継代数が増えるに従って、その形態特徴量と残存ダブリング数の間に直線的な相関が生まれることに起因するが、このような感覚的に理解できていたことを、改めて数式化・モデル化することによって、品質管理はより定量的なものになると考えられる。

本研究を通じて明らかになったことは、各種細胞にカスタマイズした数値化アルゴリズムをきちんと確立すれば、多変量解析手法を用いれば品質のような複雑な活性も十分に予測することができるという事実である。また、継代培養という細胞の形態的特徴をリセットするような培養工程であっても、変化量を取り入れることで、高精度の予測が可能になるという点である。より大量の細胞が治療に必要な場合、臨床の現場では少量の細胞からより多くの細胞を得るために継代培養は必須のプロセスである。このようなプロセスにおいても、FNNは安定した予測精度を与える手法であり、ルールとして表示したのは、培養に携わる人間に安心感を与え、実感を伴いながら品質を予測できると考えられる。

・軟骨形態制御メカニズムの検討

N1511細胞が軟骨細胞へ分化する時、大型コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるPG-M/versicanの合成とマトリックスへの蓄積が必須であることを明らかにした。結合

コンドロイチン硫酸鎖部分を特異的に消化分解、またプロテオグリカン結合コンドロイチン硫酸鎖量の抑制剤であるβ-キシロシド添加により、軟骨分化への抑制が観察されたことから、コンドロイチン硫酸鎖部分が重要であることが分かった。この糖鎖の骨格の合成に関与する糖転移酵素群、グルクロン酸転移活性とN-アセチルグルコサミン活性の両方を持つCSS-1、CSS-2、CSS-3、グルクロン酸活性のみを持つCSGlcAT、N-アセチルグルコサミン活性のみを持つCSGalNAcT-1とCSGalNAcT-2の計6種類が関与することを報告したが、大量のCS合成能を持つ軟骨組織におけるこれら酵素の個々の役割については全くわかっていない。そこで*in situ*ハイブリダイゼーションを用いてこれら6種類の酵素の発現を検討したところ、胎生14.5日のマウス軟骨組織においてCSS-1、CSS-2、CSGlcAT、CSGalNAcT-1の4種類の酵素の発現がアグリカンコアタンパク質の発現と一致して成長板の前肥大軟骨細胞層中心に認められた。リアルタイムRT-PCRを用いて軟骨分化系細胞株のATDCにおける酵素群の発現を調べたところ、分化に伴ってCSGlcATとCSGalNAcT-1の発現の著しい亢進がみられ、この二つの酵素が軟骨分化に大きく関与していることが明らかになった。肢芽軟骨発生における分化と組織形態はWntやFGFなどの数種類の細胞増殖因子の作用で制御されている。ヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸糖鎖とこれらの因子との相互作用が制御に重要であることが分かっている。相互作用はヘパラン硫酸鎖のO-硫酸基が決定因子になっているので、O-硫酸化に関与する酵素の一つである2-O-硫酸転移酵素(HS2ST)をsiRNA方法により発現抑制して糖鎖構造を変換して増殖因子との相互作用の異常、それによる形態形成の

異常を期待した。四肢形態の異常とその後の四肢軟骨のパターンに大きな異常が観察された。この結果はヘパラン硫酸プロテオグリカンも軟骨分化と形態を制御する重要な機能分子であることを示唆した。

・自動培養装置を用いたMSCの培養と分化誘導

自動培養装置を用いた購入ヒト正常細胞の培養では、19日間の継代培養(自動培地交換3日間隔)を経て、1培養皿から 3.0×10^7 cellsを得ることができた。この細胞数は、例えば皮膚修復に用いる場合を想定すると、約1.5回分の数であるため、正常ヒト線維芽細胞を全自動で十分に培養できることを確認した。さらに、この培養における細胞の形態は画像から正常であり、回収細胞の生存率も90.7%と非常に高いことが明かとなった。

通常の再生医療における細胞培養では、組織片から細胞を、初代培養を経て得る工程があり、これは熟練と経験を要する工程である。自動培養装置を用いた培養も、このような現実的な課題を克服する必要があったため、次にこのような組織片からの初代培養を試みた。この際、得られた組織片を酵素処理する条件の最適化を行い、手作業で初代培養の効率を確認した。

最適化した酵素処理を施した組織片を図1の培養装置にPCを介した操作で投入して培養した結果、偏りを持った増殖ではあったが、 $1.82 \sim 2.3 \times 10^7$ cellsを2例のヒト線維芽細胞を歯肉片より回収できることを確認した。回収された初代培養細胞は、88%という生存率であり形態的にも、通常の手培養と同じような細胞を得られていた。

これまでに開発した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。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。

D. 考察

臨床研究で見られた個人差について、細胞の表面マーカーおよび骨関連遺伝子の発現から原因の検索を行なった。その結果、培養によって得られる BMSC s の population はほぼ一定であるものの、分化についてはさまざまな細胞が混在することが示された。このことが、個体差の一つの原因と考えられ、今後培養する細胞の分化度を一定に保つ、あるいは一定の分化状態の細胞を選択することが、安定した骨再生実現には重要と考えられた。

細胞の分化に影響を与える因子として、培養に用いられる血清の影響が考えられる。したがって、一定の細胞を得るための問題点として、自己血清のように個体によって異なる材料を用いることは問題が多い。新たに開発された幹細胞用の無血清培地を用いて、その可能性について検討を行なった。無血清培地では初代培養から可能であった。その一方で、細胞増殖は継

代とともに遅くなり、 α -MEM と比較して得られる細胞数には限界があった。得られる細胞の表面抗原の発現はほぼ一定であり、通常培地で培養された細胞との差はわずかであった。細胞は比較的未分化な状態を保っていたが、分化誘導刺激への反応性は低くなっていた。以上から、現在の幹細胞用無血清培地では、必要な細胞数を得るためには、培養条件や添加因子についての検討が必要と思われた。また、十分な骨分化を得るためには、分化誘導法および期間についても更なる検討が必要と考えられた。以前行なった線維芽細胞用の無血清培地では、継代後の増殖は得られるものの初代培養では十分な増殖を示さなかった。これらの課題は残るが、無血清培地による細胞培養には血清を含む通常の培地に見られたさまざまな問題を解決する可能性があり、今後も引き続き重要なテーマになると考えられた。

同じく、血清が分化誘導に与える影響について、詳細な検討を行なった。細胞の ALP 活性には、添加する血清濃度が影響を与えることが明らかとなった。また、BMP-2 による分化誘導では、血清により分化誘導が影響を受けたが、その原因として血清による BMP-2 antagonist の誘導考えられた。以上の結果からも、安定した骨再生のためには、できるだけ血清を含まない培地による細胞培養の重要性が示されたと考えている。

細胞の品質評価の方法として、本研究では一貫して細胞形態から細胞の状態を診断するための動的評価システムの構築を目指している。細胞の形態から、細胞の寿命や増殖能を推測することが可能であった。本システムを用いることで、将来は細胞の増殖の異常＝腫瘍化などさまざまな培養中に細胞に起こりえる異常を検知するシステムの開発が可能と考えられた。細胞表層の提示 GLUT 密度変化による細胞形態変化は、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た。

もう一方の形態からの細胞評価方法として、Fuzzy Neural Network を用いた情報解析による、細胞の品質予測モデルの確立を行なっている。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。線維芽細胞のみでなく、角質化細胞の増殖予測に FNN 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、今後はさまざまな細胞の増殖予測モデルとして利用できることが期待される。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。

安定した再生治療のためには、培養された細胞が目的の細胞へと分化することが重要であり、そのためには効率的な分化誘導法の開発が必要である。本研究では、骨分化に関しては BMP-2 の有用性について検討を行なった。従来のデキサメタゾンを用いた分化誘導法と比較して有用性が示されたが、血清による影響を受ける点が問題であり、今後の検討課題である。一方、軟骨を対象として、分化へのマトリックス成分の影響についても検討を行ってきた。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。本研究から、HS の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強いと考えられた。

我々の開発した自動培養装置は、再生医療の産業化の際に現実性の高い「既に分化した細胞」であるヒト線維芽細胞を用いた場合でも、分化能を維持した幹細胞を培養する場合であっても、安定に長期間自動培養が行えることが確認された。また、自動化が難しいと考えられた初代培養を、酵素処理を通じて簡易化できたため、現実的な細胞取得現場における有効性が期待されるものであった。

各研究課題で得られた成果を相互に結びつけ、より総合的な細胞供給システムを構築することが今後の課題である。

E. 結論

これまでの研究から、BMSCs を用いた骨再生治療については、その有効性や安全性を示してきたが、同時に安定した骨再生を実現するための課題も明らかとなってきた。今後はこれらの問題点を解決するための基礎研究の継続が望まれる。無血清培地では、目的にあった培地の更なる改良と、得られた細胞の安全性評価が必須である。さらに、新たな分化誘導法の確立や、再生組織の形態を一定に保つための遺伝子制御などが新たな課題である。一方、細胞の形態から機能や品質を評価するための方法については、従来にない先進的な試みを行ってきた。細胞の品質の確保には全数評価の可能な非侵襲評価が必須と思われ、今後の安全性評価法に一定の方向性をもたらすことが出来たと考え

ている。しかしながら、まだまだ未開拓の分野であり、今後基礎的研究を積み重ねることで、再生医療の安全性の向上に努力したい。

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

<主任研究者>

(上田 実)

Masaki J. Honda, Shuhei Tsuchiya, Yoshinori Sumita, Hiroshi Sagara, Minoru Ueda.

The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials*, 28, 680-689, 2007

Hideyuki Nakashima, Kazunori Hamamura, Toshiaki Houjou, Ryo Taguchi, Noriyuki Yamamoto, Kenji Mitsudo, Iwai Tohnai, Minoru Ueda, Keiko Furukawa and Koichi Furukawa. Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. *Cancer Sci*, vol.98, no.4, 512-520, 2007.

Kazuhiko Kinoshita, Hideharu Hibi, Yoichi Yamada, Minoru Ueda. Promoted New Bone Formation in Maxillary Distraction Osteogenesis Using a Tissue-engineered Osteogenic Material. *Journal of Cranifacial Surgery* in press

Treatment of Human Infrabony Periodontal Defects by Grafting Human Cultured Porous

Hydroxyapatite Granules: Three Case Reports. *Journal of the International Academy of Periodontology* in press.

profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials* 27, 3766-3781, 2006.

Y.Yamada, M.Ueda, H.Hibi, S.Baba. A Novel Approach to Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchyma Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Using Tissue Engineering Technology: A Clinical Case Report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol.26(4), 363-370, 2006.

H.Mizuno, K.Hata, K.Kojima, L.J.Bonassar, C.A.Vacanti, M.Ueda. A Novel Approach to Regenerating Periodontal Tissue by Grafting Autologous Cultured Periosteum. *Tissue Engineering*, vol.12(5), 1227-1235, 2006.

K.Ito, Y.Yamada, T. Naiki, M.Ueda. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin.Oral.Implant Res.* 17, 579-586, 2006.

M.Ohya, Y.Yamada, R.Ozawa, K.Ito, M.Takahashi, M.Ueda. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in

rabbits. *Clin. Oral. Implant Res.* 17, 579-586, 2006.

M.Ueda, Y.Yamada, R.Ozawa, Y.Okazaki : Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement, *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 25(2), 129-137, 2005

H.Maeda, T.Kasuga, M.Noagami, M.Ueda : Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold, *Science and technology of Advanced Materials* 3, 48-53, 2005

K.Ito, Y.Yamada, T.Nagasaka, S.Baba, M.Ueda Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogeneous bone, bone substitute(Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings, 15, 64-72, 2005

M.Murata, M.Momose, K.Okuda, Y.Ninagawa, M.Ueda, H.Yoshie : Immunohistochemical Localization of Cytokeratin 19, Involucrin and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cultured Human Gingival Epithelial Sheets, *International of the International Academy of Periodontology*, 7/4, 129-134, 2005

<分担研究者>

(各務 秀明)

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

Tomomura 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. Bioscienc 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

Tatebe, R.Nakamura, H.Kagami, K.Okada, M.Ueda. Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular

epidemiological study for Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytherapy* vol.7 (6) ,520-530, 2006.

Y Murase, Y. Narita, H.Kagami, K.Miyamoto, Y.Ueda, M.Ueda, T murohara.Evaluation of Compliance and Stiffness of Decellularized Tissues as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound.ASAIO, 450-455, 2006.

Matsunuma H, Kagami H, Narita Y, Hata K-I, Ono Y, Ohshima S, and Ueda M. The potential of bone marrow-derived mononuclear cells for enhancing angiogenesis in ureteral acellular matrix. *Tissue Eng.* 12,509-518,2006.

(紀ノ岡正博)

Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi, and Masahito Taya: "Synergistic Effect of D-glucose and EGF Display on Dynamic Behaviors of Human Epithelial Cells", *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.104, No.5,pp.428-431(2007)

Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi, and Masahito Taya: "Glucose Transporter Mediation Responsible for Morphological Change of Human Epithelial Cells on Glucose-Displayed Surface", *J. Biosci. Bioeng.*, in press.

M.-H. Kim, M. Kino-oka, M. Kawase, K. Yagi, M. Taya: "Response of Human Epithelial Cells on Culture Surfaces with Varied Roughnesses Prepared by Immobilizing Dendrimers with/without D-Glucose Display", *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.103, No.2, pp.192 -199,2007.

Norihiko Hata, Yuka Agatahama, Masahiro Kino-oka, and Masahito Taya: "Relations between Individual Cellular Motions and Proliferative Potentials in Successive Cultures of Human Keratinocytes", *Cytotechnology*, Vol.47,No.1-3, pp.127 - 131 (2005)

(本多裕之)

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 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-bases tissue engineering, *Journal*