

200806011A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成21年3月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成21年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・  
安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究

目 次

I. 班員・研究協力者名簿 .....	1
II. 総括研究報告 .....	3
再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究 森尾 友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	
III. 分担研究報告	
1. DNA損傷及び変異細胞検出システム、標準製品規格検証システムの開発 .....	13
森尾 友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野） 高木 正稔（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野） 水谷 修紀（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	
2. 新規微生物検出システムの開発に関する研究 .....	19
清水 則夫（東京医科歯科大学難治疾患研究所）	
3. 細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発に関する研究 .....	25
加藤 俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学） 安藤 潔（東海大学医学部内科学系血液内科学） 宮地 勇人（東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学） 中村 雅登（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学） 八幡 崇（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学） 中村 嘉彦（東海大学医学部付属病院細胞移植再生医療科） 佐藤 忠之（東海大学伊勢原校舎教育研究支援センター） 田中 進一（東海大学医学部付属病院診療技術部）	
4. ウイルスの網羅的検出方法の開発 .....	30
濱口 功（国立感染症研究所・血液安全性研究部） 水谷 哲也（国立感染症研究所ウイルス第一部） 江下 優樹（大分大学医学部） 佐藤 朝光（福岡大学医学部） 黒田 誠、関塚剛史（国立感染症研究所ゲノム解析センター）	

5. NOD/SCIDマウスを用いたex vivo増幅血液製剤の安全性に関する検討.....	36
伊藤 仁也 (先端医療センター 細胞管理室)	
6. 微量培養細胞を用いた変異原性試験の開発に関する研究 .....	41
中田 光 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)	
7. 細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発に関する研究 .....	47
吉江 弘正 (新潟大学大学院 医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座菌周診断・再建学分野)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	51

I 班員・研究協力者名簿

再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・  
 安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究班  
 班員・研究協力者名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院 歯科学総合研究科 発生発達病態学分野	准教授
研究分担者	清水則夫	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	准教授
	加藤俊一	東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学	教授
	浜口功	国立感染症研究所血液安全性研究部	室長
	伊藤仁也	先端医療センター 細胞管理室	室長
	中田光	新潟大学歯学総合病院 生命科学医療センター	教授
	吉江弘正	新潟大学大学院 歯科学総合研究科 摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野	教授
研究協力者	高木正稔	東京医科歯科大学大学院 歯科学総合研究科 発生発達病態学分野	助教
	水谷修紀	東京医科歯科大学大学院 歯科学総合研究科 発生発達病態学分野	教授
	安藤 深	東海大学医学部 内科学系血液内科学	教授
	宮地 勇人	東海大学医学部 基盤診療学系臨床検査学	教授
	中村雅登	東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学	教授
	八幡 崇	東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学	講師
	中村嘉彦	東海大学医学部付属病院 細胞移植再生医療科	室長補佐
	佐藤忠之	東海大学伊勢原校舎 教育研究支援センター	技師補
	田中進一	東海大学医学部付属病院 診療技術部	科長
	水谷哲也	国立感染症研究所 ウイルス第一部	主任研究官
	江下優樹	大分大学医学部	准教授
	佐藤朝光	福岡大学医学部 薬学部	助教
	黒田 誠	国立感染症研究所 ゲノム解析センター	室長
関塚剛史	国立感染症研究所 ゲノム解析センター	研究員	
事務局	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院 歯科学総合研究科 発生発達病態学分野 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL&FAX: 03-5803-5245 E-Mail: tmorio.ped@tmd.ac.jp	准教授

経理事務 担当者	馬場英寿	東京医科歯科大学総務部 研究協力課 研究協力 第一掛  〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45 Tel: 03-5803-5871 Fax: 03-5803-0179 E-Mail: h.baba.adm@cmn.tmd.ac.jp	
-------------	------	--	--

## Ⅱ 年 次 総 括 報 告 書



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
総括研究報告書

「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証  
システムの開発と製剤の規格化に関する研究」

研究代表者：森尾友宏  
（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野・准教授）

研究要旨：

本研究班は、今までの実績を生かし、[再生医療の安全性・品質管理に必要な4つのシステム]を開発し、検証することを目標としている。すなわち①高感度多項目迅速微生物検出、②微量細胞を用いたDNA損傷及び変異細胞検出、③標準製品規格検証、④細胞毒性(有効性)検証のためのシステムであり、この研究ではそれらを統合した安全性・品質管理システムを構築することを目的とし、研究を行った。

(1) 高感度多項目迅速微生物検出法の開発

新規微生物検出システムにより実際に細胞治療用に調製されたT細胞を用いて検討し、問題となるウイルスについて明らかにした。また遺伝子配列が不明な未知のウイルスや既知のウイルスを網羅的に検出方法も開発され、実用化に前進した。さらに、細菌を共通配列である16SRNAを標的として検出し、塩基配列解析から迅速に同定する系や、マイコプラズマを感度良く検出し、亜群を同定する系も開発し、検証した。

(2) 微量細胞を用いたDNA損傷及び変異細胞検出システムの開発

DNA損傷修復反応をATMのリン酸化などを指標にして、フローサイトメトリーにて微量かつ高感度迅速に測定するシステムを確立した。また付着細胞においては、免疫組織染色で各種DNA損傷修復関連分子を測定する系を立ち上げた。G-band分染法に加えて、m-FISH法(SKY-FISH法)を用いて感度良く染色体異常を検出する検査系にて、NOD/SCIDマウスに移植したex vivo増幅ヒト造血幹細胞の性状を検討し、異常所見がないことを確認した。またこれらの検査手法で解析可能な培養元細胞、各種培養細胞を収集した。

(3) 標準細胞規格検証システムの開発

培養骨髄を分化誘導、変異誘導して、サイトカイン、増殖因子アレイシステムにて、培養上清のプロファイリングを行い、正常細胞と変異誘導細胞の差異を明らかにした。グルコース消費測定により、標準細胞規格外れの判別を試みた。また今後Luminex法にて解析可能な検体を収集した。

(4) 細胞毒性・有効性検証システム

NOD-SCIDヘビ造血細胞移植を行い、その分化や短期的・長期的有害事象を外観観察、病理組織学的検討、染色体解析などで検討した。また同様にヒト皮膚構造、椎間板構造の再構築系について、マウスへの移植システムを用いて検証を行った。

## 研究分担者氏名

清水則夫：東京医科歯科大学難治疾患研究所・准教授

加藤俊一：東海大学医学部・教授

浜口 功：国立感染症研究所・室長

伊藤仁也：先端医療センター・室長

中田 光：新潟大学医歯学総合病院・教授

吉江弘正：新潟大学大学院・教授

## A.研究目的

再生医療・細胞治療に対する医療者・国民の関心と期待が高まる中、その実用化に際しては、製剤の品質管理システムの確立は必須の重要案件である。一方、本分野における研究者、特に細胞調製施設の現場において研究開発・検証を行っている研究者は少ない。

申請者らの研究チームは細胞プロセッシングセンターが稼動する4施設と生物学的製剤の安全性の検証に取り組む研究者を中心に構築されている。実際に再生医療に供する細胞の操作に関与し(*Stem Cells* 2006, 2008)、高感度多項目迅速ウイルス測定法の開発(標的核酸の検出法:特願2003-164799, *Biol Blood Marrow Transplant* 2007, *Br J Ophthalmol*, 2008 など)、未知微生物同定法の開発(*Emerg Infect Dis*, 2008)、NOG-SCIDを用いたモデル動物システムの作成(*Blood*, 2007)などに携わってきた経緯がある。

この研究では、今までの実績を生かし、[再生医療の安全性・品質管理に必要な4つのシステム]①高感度多項目迅速微生物検出、②微量細胞を用いたDNA損傷及び変異細胞検出、③標準製品規格検証、④細胞毒性(有効性)検証のためのシステム、を開発し、検証することを目標とする。それをも元に、最終的

に□～□を統合した安全性・品質管理システムを構築することを目的とする。

## B.研究方法

1. 高感度多項目迅速微生物検出法の開発  
Multiplex PCR→融解曲線分析によるウイルス検査では、HSV1,2,VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19の11種類のウイルスを対象とし、インナーコントロールとしてβ-globinを使用した。陽性となったウイルスに関してはrealtime PCRで定量を行った。

また新規に細菌16SrRNA遺伝子の増幅システムも立ち上げた。増幅されたものについては遺伝子塩基配列決定から菌種を同定した。

マイコプラズマは共通配列をprimer設定し、PCR法にて検出し、遺伝子塩基配列決定にて亜群を同定した。

遺伝子配列が未知のウイルスを同定のために、Rapid Determination system of RNA/DNA viral sequences (RDV法)の確立も進めた。短いRNAでも効率良く増幅でき、しかも数百分子の遺伝子を検出できる感度の良い方法であるRDV法 ver4.0を中心に解析を行った。

## 2. 微量細胞を用いたDNA損傷及び変異細胞検出システムの開発

浮遊細胞ではDNA損傷刺激を加えた後に、洗浄、固定後、透過処理を加え、FITC標識抗リン酸化ATM(pATM)抗体及び7-AADにて染色を行った。染色後の細胞はFACSにて解析を行った。

付着系細胞では免疫組織染色で各種DNA損傷修復関連分子(ATM, chk2, p53及

びそのリン酸化分子、□H2AX, Ki-67) を検出した。

臍帯血由来 CD34 陽性細胞  $1E+04$  個を SCF, FL, IL-6/sIL-6R 各 100ng/ml, TPO 10ng/ml 添加無血清培地 QBSF-60 (Quality Biological 社)にて 2 週間培養(し得られた細胞 6~8 週齢の NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID)マウスに移植した。移植後 30 週のマウス骨髓血を採取し、サイトカインおよび 10%FCS 添加  $\alpha$ MEM 培地にて 24 時間培養することにより、分裂細胞を得、G-band 分染法、及び multi color-FISH(m-FISH)法にて解析を行った。

### 3. 標準細胞規格検証システムの開発

標準細胞と変異細胞の差を明らかにするために、培養骨髄細胞、骨髓細胞、活性化リンパ球などで、培養成功例、増殖不良例などの細胞を収集した。

培養骨髄については、in vitro で骨芽細胞分化誘導および PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) 添加による変異誘導を行い、抗体アレイを用いて細胞由来サイトカイン/増殖因子を解析した。

また Luminex 法による生物活性因子、転写因子、リン酸化タンパク、mRNA 測定系のセットアップも行った。

### 4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

臍帯血由来 CD34 陽性細胞  $1E+04$  個を 2 に記載の通り、2 週間培養し得られた細胞 6~8 週齢の NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID)マウスに移植した。移植前処置は 2.4Gy の全身放射線照射を行い、day0, 7, 14, 21 に抗  $\gamma$ IFN GM1 抗体を腹腔内投与した。移植後 21 週にマウスの剖検(増幅細胞移植マウス、

対照マウス 各 n=1)を行い、脾、肝、肺、骨髓、腹大動脈、腎、脾、心、胸腺、リンパ節、精巣、皮膚(背部)、脳、回盲部を抽出した。各臓器を 10%ホルマリンでの固定後、パラフィン切片による H-E 染色を行い、各組織において変性、炎症所見の有無の確認を行った。骨髓血におけるヒト血球キメリズムは、フローサイトメトリー法により、ヒト CD45、マウス CD45 抗体を用いて混合キメラ率を算定した。

また別のシステムでは、体外で培養あるいは増幅したヒト組織幹細胞や前駆細胞が実際に目的とするヒトの組織構造を構築できるかどうかを検証できるマウスのアッセイ系を開発し、ヒトの皮膚構造、椎間板構造などを再構築できるかどうかを検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒト血清、貴重な患者検体及び投与用細胞を用いて行うものであり、倫理面には十分に配慮し、適切な説明と同意取得を元に各種研究倫理指針に準拠して研究を行った。動物実験に当たっては、最低限の苦痛と数に配慮し、動物愛護法に基づき適正な実験を行った。

## C. 研究結果

### 1. 高感度多項目迅速微生物検出法の開発

東京医科歯科大学医学部付属病院細胞治療センターで T リンパ球の活性化培養を行った 117 例に対してウイルス検査を行った。その結果、26 例(22%)が陽性反応を示し、その内訳は BKV 3 例、EBV7 例、HHV614 例、CMV2 例であった。

細菌 16SRNA 検出のために作成した検査系は 10 コピー/Reaction の感度を持ち、さら

に6種類の細菌(大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌)に関しても10コピー/Reactionの感度で検出可能なことを確認した。臨床サンプルから抽出したDNAを使用した検討を行った。

また、細菌感染が疑われる臨床サンプル53例を測定したところ、12例が陽性であり、遺伝子配列決定から菌種の同定が可能であった。

マイコプラズマは口腔粘膜培養シートにて検討した。培養前組織のマイコプラズマ試験は11例で行い、5例が陽性(*M.salivarium*:3例、*M.faucium*、*M. orale*:各1例)であった。このうち2例は細胞増殖が良好で培養口腔粘膜が作成でき、培養後マイコプラズマは陰性化した。

## 2. 微量細胞を用いた DNA 損傷及び変異細胞検出システムの開発

開発した簡易フローサイトメトリー法にて、培養T細胞やEBV-transformed B細胞株に放射線照射後、あるいは過酸化水素処理して、DNA損傷反応を検討したところ、濃度・時間依存的なリン酸化ATM(pATM)の発現が認められた。活性化T細胞では、無刺激ではほとんどpATM発現が認められなかった。

付着細胞系でのDNA損傷応答の検討では、ATM, chk2, p53及びそのリン酸化分子、 $\gamma$ H2AX, Ki-67が感度良く染色でき、前癌病変ではその発現が著しく亢進していることを明らかにした。

また、NOD-SCIDマウスにヒト増殖造血幹細胞を移植した系にて染色体異常をSKY-FISH法によって検出する手法が動く

ことを確認した。

## 3. 標準細胞規格検証システムの開発

骨髄培養後に骨芽細胞分化誘導および変異誘導を行い、培養した上清を用いて、約60種のサイトカインおよび増殖因子に対して解析を実施した。骨芽細胞分化誘導培地と変異誘導培地ではサイトカイン発現プロファイルが大きく異なっていることが明らかになった。また、さらにグルコース定量を行ったところ、変異誘導を受けた細胞では顕著にグルコース消費速度が上昇することが明らかになった。

今後Luminex法を用いて、さらに他種類の生理活性物質、遺伝子発現、転写因子などを検討可能になるが、解析のためのサンプルとして、骨髄培養細胞、培養骨髄細胞、培養T細胞などを50検体以上収集した。

## 4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

Ex vivo 増幅臍帯血移植によるNOD/SCIDマウスへのヒト細胞の分布を検討したところ、ヒト細胞は骨髄、脾臓、肝臓、リンパ節に分布していたが、一部肺、腸管のリンパ組織でもヒト細胞が確認された。各臓器の病理学的解析では、顕著な異常を認めなかった。G-banding及びSKY-FISHでは、染色体異常は認めなかった。また、体外で培養したヒト皮膚ならびに椎間板髄核細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、ヒトの皮膚と椎間板髄核の組織構造を再構築できることを証明した。

## D. 考 察

研究者が分担し、また共同して行った検討により、高感度多項目迅速微生物検出法を稼働させて、100例以上の細胞治療製剤を解析することができた。またマイコプラズマや細菌も、これまでの標準的検査法より簡便かつ高感度で安価な検査法の開発を試み、ほぼ実用化できる目処が立った。これらの手法は研究班内で技術移転し、各施設で行われている様々な再生医療、細胞治療の中で検証していく予定である。今後はさらに検査可能な微生物を増やすと共に、第二世代、第三世代のウイルス検査法の開発を試みる。RDV法は、これらの検査法を補充し強化するものであり、捕まえにくいウイルスを検出すると共に、今後問題になる可能性のあるウイルスを同定することが期待できる。

DNA 損傷検出系は浮遊系細胞では最も簡便なシステムとして実用化できる目処が立ち、今後 *ex vivo* 増殖ヒト臍帯血造血幹細胞においても、検証を行う予定である。この手法は、異常を未然に感知する方法とも言える。今回検証した SKY-FISH 法や、状況によっては解析可能になっている oligo-CGH (comparative genome hybridization) 法などの併用によって、最終的な悪性腫瘍化や変異に至るのかも検討が可能になった。付着系細胞については免疫染色という比較的時間のかかる検証法が開発されているが、まずは実際のサンプルを測定することによりその実用性を見極めたいと考えている。

標準細胞規格検証システムは、サイトカイン・増殖因子のタンパクアレイ解析及び、グルコース消費量によって検証された。これらは今後他の細胞種にも応用されると共に、解析されたサンプルは BioPlex システムにて検討する予定となっている。

再生医療・細胞治療製剤の最終的な効果や長期有害事象は、マウスへの移植システムで

解析を行っている。実際に解析を行うことは可能であり、これを用いた染色体変異検査は有力な武器であるが、品質管理や安全性保証における最適な使用方法については今後の議論が必要であると考えている。

## E. 結 論

今年度の研究により、想定した4つの柱①高感度多項目迅速微生物検出、②微量細胞を用いた DNA 損傷及び変異細胞検出、③標準製品規格検証、④細胞毒性(有効性)検証のためのシステム、すべてにおいて、成果を上げることができた。また立ち上げたシステムの多くは独自のものである。

今後は再生医療・細胞治療を実施する4つの施設からの検体を中心に解析にあたり、さらに幅広く情報が収集できるものと期待している。

## F. 健康危険情報

とくになし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

巻末に記載の通り

### 2. 学会発表

各分担研究者学会発表 (G2) 参照

**H. 知的財産の出願・登録状況**

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs)

FOR CARTILAGE OR MENISUCUS

REGENERATION (米国国際特許出願中

YCT-1301) 出願人：関矢一郎、発明者：宗

田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

厚生労働科学研究 再生医療実用化研究事業

「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班（研究代表者 森尾 友宏）

平成 20 年度第一回班会議

期日： 平成 20 年 5 月 31 日(土) 9:00～14:00

会場： 東京医科歯科大学附属病院 B 棟 1 6 階第一ゼミナール室

東京都文京区湯島 1-5-45 (JR 御茶ノ水駅、丸の内線御茶ノ水駅、千代田線新御茶ノ水駅から徒歩すぐ)

プログラム

- |             |  |
|-------------|--|
| 9:00～9:30   | 本研究班申請の経緯と目的<br>東京医科歯科大学・発生発達病態学分野・細胞治療センター 森尾友宏   |
| 9:30～9:45   | 改正 1314 号について<br>東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス感染症 清水則夫先生   |
| 9:45～10:25  | 研究分担者施設における品質管理・安全性検証・製剤の規格化における取<br>り組み・研究 第一部（司会：加藤俊一先生）<br>国立感染症研究所血液・安全性研究部 浜口 功先生<br>東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス感染症 清水則夫先生<br>神戸先端医療センター研究所血液再生グループ 伊藤仁也先生                          |
| 10:25～10:40 | コーヒーブレイク   |
| 10:40～11:35 | 研究分担者施設における品質管理・安全性検証・製剤の規格化における取<br>り組み・研究 第二部（司会：清水則夫先生）<br>東京医科歯科大学・発生発達病態学分野 森尾友宏<br>新潟大学歯学部総合病院生命科学医療センター 中田 光先生<br>新潟大学大学院 歯周診断・再建学分野 吉江弘正先生<br>東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 加藤俊一先生 |
| 11:35～12:00 | 総合討論   |
| 12:00～13:00 | 昼食   |
| 13:00～14:00 | 研究分担者会議  |

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究班  
第二回班会議（研究代表者 森尾友宏）

平成 21 年 2 月 28 日（土曜日 9:00 - 14:00 東京医科歯科大学医学部附属病院 16 階小会議室）

- 第一部 研究発表（座長：加藤俊一）
- 9:00-9:05 研究班の課題  
森尾友宏（東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野）
- 9:05-9:20 DNA 損傷反応の検出法について  
森尾友宏（東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野）
- 9:20-9:35 再生医療・細胞治療に使用する微生物検査の改良に関する取り組み  
清水則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学）
- 9:35-9:50 再生医療分野に応用可能な既知・未知のウイルスの網羅的検出法の確立  
水谷哲也、浜口功（国立感染症研究所・血液安全性研究部）
- 9:50-10:05 TBA  
中田光（新潟大学医歯学総合病院・生命科学医療センター）
- 研究発表（座長：浜口功）
- 10:05-10:20 ヒト培養骨膜におけるサイトカイン/増殖因子の半網羅的定量  
吉江弘正（新潟大学大学院・歯周診断・再建学分野）
- 10:20-10:35 細胞を用いた高感度毒性試験法の開発とマウス移植系での長期安全性試験  
伊藤仁也（先端医療センター・細胞管理室）
- 10:35-10:50 再生医療・細胞医療に用いる細胞の腫瘍形成否定試験法の開発  
中村雅登、八幡 崇、中村嘉彦、三島大志、加藤俊一  
（東海大学医学部・基盤診療学系再生医療科学）
- 10:50-11:00 休 憩



第二部 総合討論 (司会：森尾友宏)

11:00-12:00 再生医療・細胞治療の現状、問題点と本研究班の課題

12:00-13:00 昼 食

第三部 分野別討論

13:00-14:00 グループ別討論

### Ⅲ 分 担 研 究 報 告

## DNA損傷及び変異細胞検出システム、標準製品規格検証システムの開発

森尾友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野・准教授）

研究協力者：高木正稔（東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野・助教）

水谷修紀（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野・教授）

### 研究要旨：

再生医療においては、培養した細胞が遺伝子変異→腫瘍化していないかを明らかにすることが極めて重要である。最終細胞製品において、これを解析するには、染色体検査（G-banding）のような簡便かつ低感度の検出法か、あるいは免疫不全マウスに移植して悪性腫瘍化を検出するような手間がかかり、個別の細胞には対応が難しい方法などが用いられる。悪性腫瘍がDNA損傷修復応答の亢進→遺伝子変異/染色体転座という経路で成り立つという一般的な考え方から、研究者は培養過程においてDNA損傷応答亢進を検出するシステムを確立した。この方法を用いることにより、細胞に損傷あるいは負荷の少ない培養法が選択可能である。また、調製した製品の標準化を明確に規定し、様々な加工細胞の製品標準を策定するべく、高感度多項目生理活性物質測定システムを立ち上げた。

### A. 研究目的

今回の研究ではまず、微量細胞を用いた変異細胞の検出システムの開発を目指した。今までは、最終細胞製品において染色体検査（G-banding）を行うことが標準的方法であったが、この方法では数十の細胞での染色体異常を低感度で測定しているにすぎず、必要な検査ではあるが、再生医療製品の最終品質を保証するものではない。一方、NOG-SCIDなどの免疫不全症マウスに移植して腫瘍化を検出する方法も、手間と時間がかかり、個別対応が必要な再生医療においては実用的ではない。研究者らは、腫瘍発生が、DNA損傷修復応答の亢進→遺伝子変異/染色体

転座という経路で成り立つという知見と事実から、DNA損傷応答反応の亢進を感度良く検出するシステムの開発を目的として、研究を行った。

2つめの目的は調製した細胞の標準化指標を、適格にかつ体系的に決定するシステムの開発である。再生医療・細胞治療に用いられる細胞は、一定基準を満たしていることを担保される必要がある。

吉江らにより、抗体アレイを用いた培養細胞の品質基準策定が模索されているが、研究者らはLuminex法を用いた検討を模索した。このシステムでは核酸、タンパク質、転写因子などを高感度に測定

することができることがメリットである。

初年度はまず、高感度多項目測定システムを立ちあげることが目的として検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. DNA 損傷反応検出システム

(FACS を用いた方法)

EBV により形質転換した B 細胞株、固相化した CD3 抗体と IL-2 の存在下で培養した活性化 T 細胞を用い、様々な量の電離放射線照射、あるいは様々な濃度の過酸化水素で処理して DNA 損傷を与えた。

細胞は洗浄、固定後、透過処理を加え、FITC 標識抗リン酸化 ATM(pATM)抗体及び 7-AAD にて染色を行った。染色後の細胞は FACSCalibur にて解析を行った。

同様に健常者の末梢血及び、DNA 損傷修復異常症の末梢血を用いて、単核球を分離し、DNA 損傷刺激を加え、DNA 損傷応答反応を解析した。

またマウスではリン酸化 ATM 抗体を用いることができないために代替の方策を検討した。腹腔内に Etoposide を投与し、脾臓の細胞を回収して単核球を分離し、 $\gamma$ H2AX 抗体と Propidium Iodide で二重染色することによって、DNA 損傷反応亢進を検討した。

### 2. DNA 損傷反応検出システム

(免疫染色を用いた方法)

付着細胞においても同様の手法が行える必要があるため、固定、染色条件を様々に変更しつつ、以下の抗原 (ATM, phospho-ATM, p53, phospho-p53, chk2, phospho-chk2,  $\gamma$ H2AX, Ki-67) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

### 3. BioPlex による生理活性物質測定

高感度多項目生理活性物質測定システムとして、Luminex 法を用いた培養細胞上清のサイトカイン産生の検討を行った。

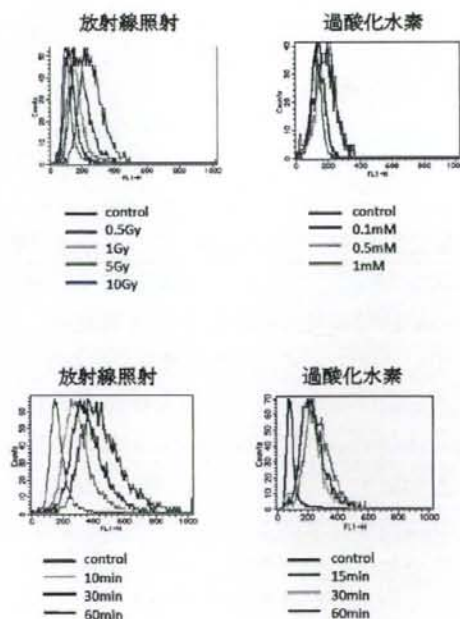
(倫理面への配慮)

本研究では貴重なヒト培養細胞を用いることになり、細胞提供者には十分な説明を行い、同意を取得した上で検討を行う。またマウスの実験も実施されるが、各種指針に従い、最小限の苦痛と数で検討できるように配慮する。

## C. 研究結果

### 1. pATM-7-AAD 解析

図に示すごとく、放射線照射後、あるいは過酸化水素処理後に、濃度依存的、かつ、時間依存的な pATM 発現が認められた。



活性化 T 細胞では、無刺激ではほとんど