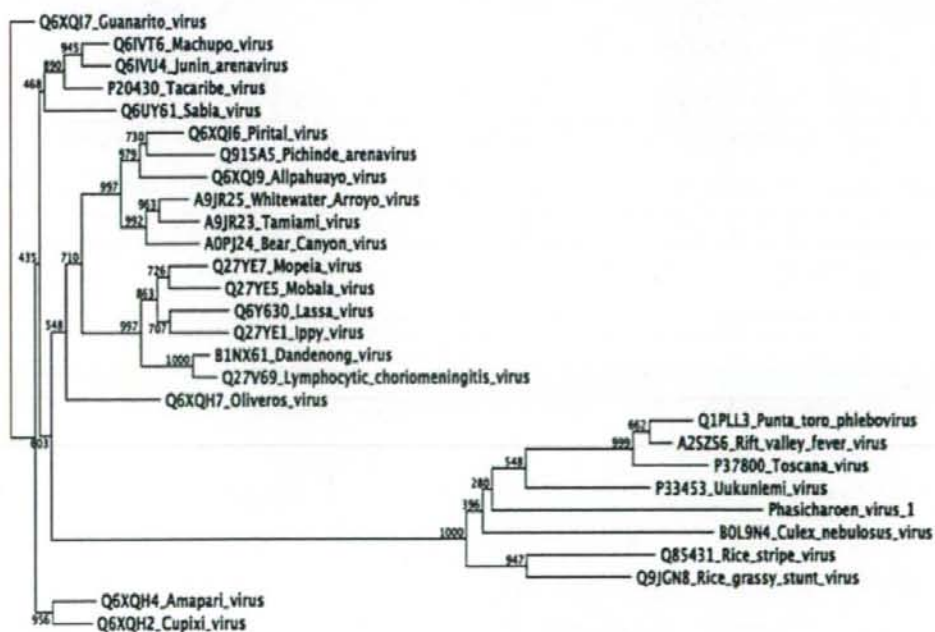


図5. 次世代型シーケンサーを用いたPhaV1遺伝子の伸長



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

伊藤仁也 (先端医療センター・細胞管理室・室長)

研究要旨：

再生医療や細胞治療を目的として体外で増幅や遺伝子導入した細胞が本来の細胞機能を発揮し、腫瘍化、変成などが起こらないなど安全性を証明するには、免疫不全マウスへの移植による長期に渡る観察が必要と考えられる。今回我々は、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を *ex vivo* 増幅した造血幹細胞を NOD/SCID マウスに移植し、ヒト造血を長期にわたり再構築させる方法により、移植細胞がレシピエントの正常な細胞または組織に与える影響を検討すべく、移植後長期のマウス組織における病理組織学的検査を行った。また、移植細胞の *in vivo* における安全性を評価するため、移植後長期のマウス骨髄における生着ヒト血球の染色体解析を行った。

NOD/SCID マウスへのヒト造血細胞移植においては、好中球、単球、血小板、B細胞が再構築されるが、赤血球系は赤芽球までの分化にとどまり、T細胞への分化は起こらない。これにより、GVHD が回避され、ヒト血液細胞がマウス血液細胞と混合キメラ状態を長期間にわたり保つことができる。今回の移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観の異常所見は認めず、病理組織学的にも炎症、変成、癌化を認めなかった。染色体解析においても G-band 分染法、m-FISH 法にて異常所見は確認されず、一定の安全性を評価しうる系と考えられ、異種間移植系を用いての治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として利用できると考えられた。

A. 研究目的

Ex vivo 増幅臍帯血を含むヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品等の品質及び安全性の確保に関しては「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(医薬発第 1314 号)」に製造方法、製造工程、及び最終製品におけるその基本的要件が示されている。

とくに最終製品に関しては“安全性及び効能を、技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物を用いた適切に設計された試験により検討すること”が求められている。

本分担研究では、臍帯血より分離した CD34 陽性細胞をサイトカインで *ex vivo* した細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID

マウス)に移植し、ヒト造血再構築させることにより、安全性の評価が行えるか

B. 研究方法

1. NOD/SCID マウスへの移植

・移植細胞: 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(37°C, 5%CO₂, humidity 95%)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 に抗マウス GM1 抗体を腹腔内投与した。

2. 解析

1) 移植後マウス組織の病理評価

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、骨髄、腹大動脈、腎、膵、心、胸腺、リンパ節、精巣、皮膚(背部)、脳、回盲部を摘出した。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。骨髄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。

2) 生着ヒト血球細胞の染色体検査

移植後 30 週のマウス骨髄血を採取し、サイトカインおよび 10%FCS 添加 α MEM 培地にて 24 時間培養することにより、分

どうかを検証することを目的とした。

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。

(倫理面の配慮)

本研究で用いた臍帯血は 兵庫さい帯血バンクより研究用として供与を受けた。臍帯血の提供と研究内容は同バンクの倫理委員会、先端医療センターの倫理委員会の審査を受けた。供与された臍帯血は匿名化し、実験終了後はオードクレープを行い適切に処理した。

C. 研究結果

1. 病理学的検討

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病理学的に免疫染色および FACS によるヒト CD45 細胞の存在診断を行った。

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ヒト細胞が確認された。

1) 脾臓



Fig. 1 増幅細胞移植後 21 週のマウス脾臓組織標本 (H-E 染色, $\times 100$)

濾胞構造は保たれ、赤脾髄、白脾髄とその中央部にある胚中心が確認された。

ヒト細胞は脾洞とその周囲に多く認められたが、胚中心を伴う濾胞中のリンパ球は主にマウスリンパ球であることが確認された。(Fig.1)。写真で示すように構造は保持され、炎症や変成所見は認めなかった。

2) 肝臓



Fig. 2 増幅細胞移植後 21 週のマウス肝組織標本 (H-E 染色, $\times 100$)

肝小葉は大小不同なく、中心静脈周囲から Glisson 鞘ともにマウス肝細胞から成り、リンパ球の浸潤などの炎症所見、繊維化などの慢性的炎症所見は見られなかった。(Fig.2)。ヒト細胞は B 細胞が中心で血管洞内に分布するのみで小葉間やグリソン鞘への浸潤は認めなかった。

3) 肺



Fig. 3 増幅細胞移植後 21 週のマウス肺組織標本 (H-E 染色, $\times 25$)

肺胞壁構造は保たれ、肺胞内への浸出液、炎症細胞浸潤も認めなかった。(Fig.3)。

ヒト細胞は肺胞間に存在するリンパ節様構造の一部、および血管内に認められた。

4) 骨髄

細胞数は正形成で血管周囲にヒト細胞の集簇が見られた。ヒト細胞は赤芽球、巨核球、顆粒球、リンパ球が認められ、細胞種による偏りは認めなかった。

5) 胸腺

多数の小葉から成り構造異常は認めなかった。皮質のマウスリンパ球が分布し、ヒト細胞は辺縁に局限していた。

6) リンパ節

皮質にはリンパ小節を単位として認め、その中心部である胚中心には特徴的な明瞭部が確認され構造異常は認めなかった。リンパ小葉はヒト、マウスリンパ球が混在するもののマウスリンパ球が主で、ヒトリンパ球は辺縁洞に多く分布した。

2. 生着ヒト血球細胞の染色体検査

1) G-band 分染法

分裂細胞から得られる染色体像はマウス、ヒト細胞で明らかに異なり、容易に鑑別されることがわかった。

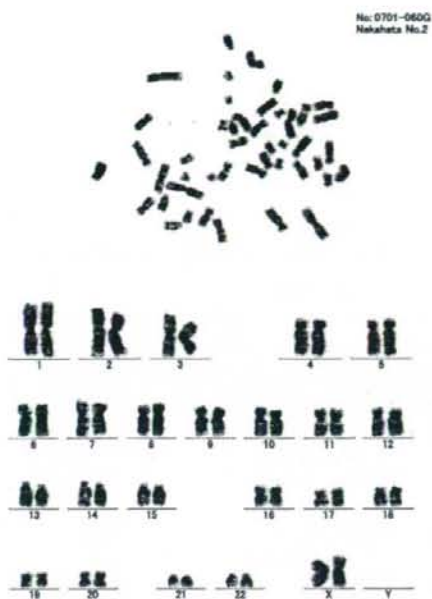


Fig. 6 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における G-band 分染解析 (分析バンドレベル; 300、観察細胞数; 30、核型; 46,XX)

分裂像が得られた観察細胞においての核型異常は認められなかった。

2) m-FISH 法

間核期における細胞の観察は multi-color FISH 法を用いて転座、構造異常を解析した。いずれの分析細胞においても染色体の数、構造異常、転座、逆位なども認めず、正常核型であった。

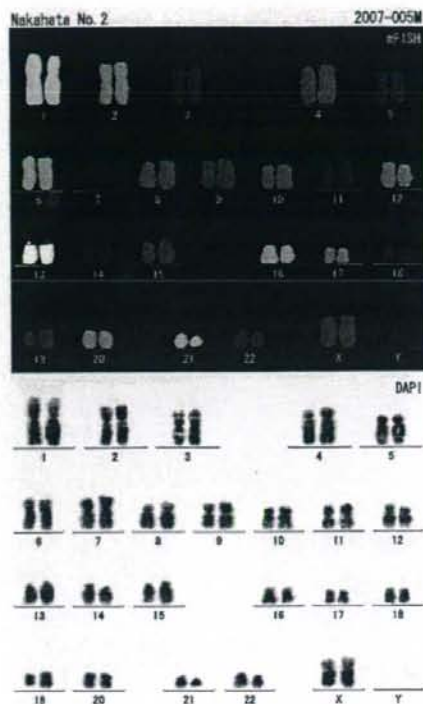


Fig. 7 Nakahata 法による増幅後、マウス骨髄に生着したヒト血球における m-FISH 解析 (観察細胞数; 10、核型; 46,XX)

D. 考察及び今後の展望

移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観検査における異常所見は認めず、移植後 21 週でのマウス剖検時の肉眼的観察では組織肥大等の異常所見は認めなかった。

病理組織学的解析により ex vivo で増幅した細胞は長期にわたりマウス体内で分裂、増殖を行い、マウス血液細胞と混合キメラ状態にて生存しうることが確認された。これにより、ヒト増幅臍帯血での

体内動態や宿主臓器への影響を観察することが可能であった。

染色体解析はマウス染色体、ヒト染色体の鑑別は容易であり、癌化の推測などに汎用可能であると考えられた。

本研究は異種間移植系を用いての、治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として利用できる系であると考えられた。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

論文発表

特になし

国内学会発表

1. 伊藤仁也、Ex vivo 増幅臍帯血移植、第 90 回血液学会地方会近畿血液学会、2008 年 11 月 22 日、神戸市
2. 伊藤仁也、造血幹細胞の ex vivo 増幅技術の開発と応用、第 8 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、2008 年 12 月 12 日、東京都
3. 伊藤仁也、Ex vivo 増幅臍帯血移植を行った急性骨髄性白血病の 1 例、第 31 回日本造血細胞移植学会、2009 年 2 月 6 日、札幌市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

微量培養細胞を用いた変異原性試験の開発

中田 光(新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)

研究要旨：

培養口腔粘膜を用いた角膜再生や口腔癌の術後再建、歯根膜細胞を用いた歯槽骨の再生など、口腔組織を用いた再生医療が注目されている。再生医療の際にマイコプラズマが培養細胞に混入された場合、材料として不相当とされてきた。常在菌としてマイコプラズマが存在する口腔領域の細胞を用いる場合、その増殖に及ぼす影響と除菌の必要性の評価は避けて通れない。当院で口腔組織を用いた再生医療の臨床応用開始前に、培養骨膜シートと培養口腔粘膜の予備培養試験を行い、マイコプラズマ感染が及ぼす影響について検討した。

骨膜の培養が行われた7例中6例で骨膜シート作成が成功した。培養前の口腔内骨膜組織7例中6例にマイコプラズマが陽性であったが、6例中5例は培養可能であり、骨膜シートが作成できた。これら5例は培養後マイコプラズマが陰性となった。

口腔粘膜を培養した15例中8例で培養口腔粘膜作成が成功した。培養前組織のマイコプラズマは5例が陽性であったが、その中で2例は細胞増殖が良好で培養口腔粘膜の作成が可能であり、培養後にマイコプラズマは陰性化した。

以上の結果、マイコプラズマ陽性の骨膜や口腔粘膜を用いても一部の症例で培養は可能であり、増殖良好な場合マイコプラズマは培養後に陰性化することが示された。今後、マイコプラズマの除菌対策（リステリン含嗽の有効性）を含め、多数例での検討を行う予定である。

A. 研究目的

培養口腔粘膜を用いた角膜再生や口腔癌の術後再建、歯根膜細胞を用いた歯槽骨の再生など、口腔組織を用いた再生医療が注目されている。我々は新潟大学医歯学総合病院 細胞プロセッシング室において、「培養骨膜移植による歯周病治療」と「培養口腔粘膜移植による口腔癌の術後再建」の臨床試験を開始している。

再生医療の際にマイコプラズマが培養細胞に混入された場合、材料として不相当とされてきた。しかし、常在菌としてマイコプラズマが存在する口腔領域の細胞を用いる場合、その増殖に及ぼす影響と除菌の必要性の評価は避けて通れない。

臨床応用開始前に培養骨膜シートと培養口腔粘膜の作成実験（予備培養試験）を行い、マイコプラズマ感染が及ぼす影響に

ついて検討した。

B. 研究方法

1. 口腔骨膜を用いた自己培養骨膜シート作成実験：

7症例から骨膜を採取して、6週間の培養を行った。骨膜の増殖を評価するため経時的に培養骨膜シートの長径を測定し、同時にムタロターゼ・GOD法を用いて培養上清中のグルコース消費量を測定した。

2. 口腔粘膜を用いた組織培養実験：

10症例の口腔粘膜より上皮細胞を単離培養後、AlloDerm上に播種してエアリフト培養を行い、細胞を重層化させて培養口腔粘膜を作成した。エアリフト後の細胞増殖を評価するため、培養上清中グルコース消費率を測定（ムタロターゼ・GOD法）し、病理組織像と比較した。

3. マイコプラズマ確認試験：

培養開始前の組織と培養終了後の組織から抽出したDNAを材料として、特異的primerを用いたPCR法により、マイコプラズマ感染の有無を確認した。

（倫理面への配慮）

1. 研究の対象とする個人の人権擁護：対象となる症例が研究に協力するかどうかは全く自由で、撤回もいつでも可能とし、研究への協力の同意は対象者の自由意志で決めていただいた。研究結果を学会や学術誌に発表する際に、提供者の個人情報は公表しない。

2. 研究の対象となる者に理解を求め同意

を得る方法：協力依頼文書を示しながら、主治医から対象者に口頭で説明を行う。対象者だけでは理解が不十分な場合は家族に同席していただき、対象者と一緒に説明する。同意が得られた場合、別紙の同意書に対象者あるいは家族から書面で同意を得る。

3. 以上の研究実施計画は、新潟大学の倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 口腔骨膜を用いた自己培養骨膜シート作成実験：

培養した7例中6例は細胞増殖し、培養骨膜シート作成が可能であったが、1例（CP7）のみ増殖せず培養中止となった（表1）。

培養骨膜シート直径と培養上清中グルコース消費量を経時的に測定した。その結果、細胞増殖とグルコース消費量が相関することが明らかになった（図1、2）。

マイコプラズマ確認試験の結果、培養前の口腔内骨膜組織7例中6例にマイコプラズマ感染が確認された。菌種としては口腔内常在菌として知られる*M.salivarium*と*M.faucium*が同定された。

*M.salivarium*が確認された1例（CP7）は増殖せず培養中止となった。

*M.faucium*が同定された5例は全て増殖し、培養骨膜シート作成が可能であった。培養後の骨膜組織を用いてマイコプラズマ確認試験を行ったところ全例陰性化していた。

図1 骨膜シート直径

グルコース消費量

図2

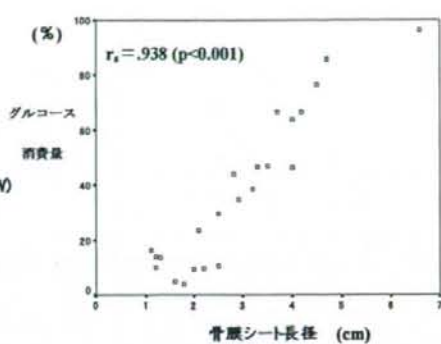
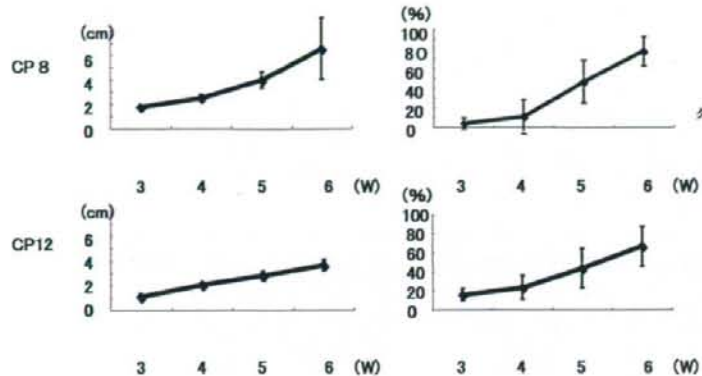


表1 マイコプラズマ試験結果 (+:陽性,-:陰性,ND:未施行)

培養組織	識別番号	マイコプラズマ試験			培養経過
		採取組織	培養後	同定結果	
骨膜	CP7	+	ND	<i>M.salivarium</i>	増殖せず中止
	CP8	+	-	<i>M.faucium</i>	増殖早い
	CP9	+	-	<i>M.faucium</i>	増殖良好
	CP10	-	-		増殖良好
	CP11	+	-	<i>M.faucium</i>	増殖良好
	CP12	+	-	<i>M.faucium</i>	増殖遅い
	CP13	+	-	<i>M.faucium</i>	増殖良好
口腔 粘膜	OM7	+	ND	<i>M.faucium</i>	増殖せず中止
	OM8	-	-		増殖良好
	OM9	-	ND		増殖せず中止
	OM10	+	ND	<i>M.salivarium</i>	増殖せず中止
	OM11	-	-		増殖良好
	OM12	+	-	<i>M. orale</i>	増殖良好
	OM13	+	ND	<i>M.salivarium</i>	増殖せず中止
	OM14	+	-	<i>M.salivarium</i>	増殖良好
	OM15	-	ND		増殖せず中止
	OM16	-	ND		増殖せず中止

2. 口腔粘膜を用いた組織培養実験:

15例(表1の10例に加え、さらに5例で施行)中8例で培養口腔粘膜が作成可能であった。

培養前組織のマイコプラズマ試験は11例で行われ5例が陽性(*M. salivarium*: 3例、*M. faucium*、*Morale*: 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。

グルコース消費率は最も低下するエアリフト2日目で20%以上であり、8日目にかけて増加する傾向が見られた。組織学的にも上皮細胞の重層化が確認された。

D. 考 察

1. 骨膜シート長径と培養上清中グルコース消費量との間に正の相関が見られたことから、骨膜のように細胞数計測が困難な培養系に対して、細胞増殖の評価のために、グルコース消費量が代用できる可能性が示唆された。さらに、口腔粘膜の場合にもグルコース消費量の増加が上皮細胞の良好な重層化を反映することも確認された。

2. 口腔骨膜と口腔粘膜の両者において、マイコプラズマが高頻度で認められた。しかし、陽性例であっても組織培養が可能であり、培養骨膜シートや培養口腔粘膜の作成が可能であった例は全て、培養後にマイコプラズマが陰性化していた。

採取組織にてマイコプラズマ混入が確認された骨膜の1例と口腔粘膜の3例は、細胞増殖が不良であり培養が中止となっ

た。これらの症例において増殖不良の原因がマイコプラズマ感染である可能性は否定できない。また、マイコプラズマの菌種の違いによる影響は確認できなかった。

E. 結 論

予備培養試験の結果、マイコプラズマ陽性の骨膜や口腔粘膜を用いても培養は可能であり、増殖良好な場合、マイコプラズマは培養後に陰性化することが示された。

現在、再生医療の臨床応用を開始しており、マイコプラズマの除菌対策(リステリン含嗽の有効性)を含め、多数例での検討を予定している。

G. 研究発表

論文発表

なし。

学会発表

1. 第7回 日本再生医療学会総会 ポスター発表、P-112 口腔内骨膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出、新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター 輸血・再生医療部門 (発表誌名:再生医療 第7巻/増刊号・266頁・2008年2月22日発行)

2. 第8回 日本再生医療学会総会 ポスター発表予定、口腔粘膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出、新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センタ

- 一 輸血・再生医療部門 梶 昌美、他
(発表誌名：再生医療 第8巻/
増刊号・2009年発行予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発

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歯周診断・
再建学分野 教授)

研究要旨：

歯周組織再生を目的として現在臨床研究中である培養骨膜について、*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/増殖因子を解析している。対象とした約 60 種のサイトカインおよび増殖因子のうち、骨芽細胞分化誘導により IL-13、IGFBP-2 の産生が増加し、反対に IL-6、MCP-1 が低下する傾向にあった。PMA による変異誘導では、IL-6、IL-7、MCP-3 などが増加傾向、IL-2、IL-3、IL-15、GCSF が減少傾向にあった。また、変異誘導された細胞では培地中のグルコース消費が亢進していた。ただし、アレイ分析結果の再現性については課題が残っており、さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

細胞医療製剤の製造では品質管理試験で用いる細胞試料は微量で済む、高感度の試験技術が求められている。我々は培地中に産生されるサイトカイン・プロファイルを分析することによってヒト骨膜の培養状態をモニターするシステムを開発することができれば、形態情報とともに移植前の培養骨膜の変異度を判断する材料を提供するだけでなく、移植後の骨組織再生への有効性を予想する骨膜分化度をモニターできると考えた。本研究では骨膜を培養し、骨芽細胞分化誘導および変異誘導に供した際のサイトカインや増殖因子の産生レベルを半網羅的に解析するとともに、培養中のグルコース消費量を追跡することとした。

B. 研究方法

1. 骨膜片の採取と培養

6月10日から10月9日まで提供を受けた骨膜検体は男性14名(28.0±6.1歳)、女性10名(33.0±11.7歳)の合計24検体であった。採取骨膜はPBS(-)で洗浄した後、2-3mm角の細片に切り分け、φ100mmの培養用ディッシュに静置した。CO₂インキュベーター内で15-20分間静置し、骨膜片を定着させてから、10%FBS、25μg/mLアスコルビン酸および抗生剤カクテル(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含むMedium 199培地を注いで37℃、5%CO₂、95%湿度により培養を開始した。約30日間の培養の後、骨膜はそれぞれ5%KE-200(DSファーマメディカル、大阪)を含む骨芽細胞分化誘導培地、25ng/mL PMAを含む変異誘導培地に変更して、それぞれ10日間誘導培養を行った。その後、各誘導培地のFBS濃度を2%に低下させ、

さらに2日間培養を継続して得られる培養上清をサイトカインおよび増殖因子抗体アレイとグルコース定量用の測定試料とした。コントロールでは培地を変更せずに培養を継続し、最後の2日間だけFBSの濃度を低下させて培養を行った。培養培養骨膜はPBS (-) で洗浄した後、SDSを含む抽出液中 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT, 20% glycerol) で超音波処理し、95℃、10分間加温した後の遠心上清をタンパク定量用試料とした。

(倫理面への配慮)

本研究計画および同意書に関して新潟大学医歯学総合病院倫理委員会の承認を得ている。

2. サイトカインおよび増殖因子抗体アレイ

サイトカインおよび増殖因子の産生レベルはヒトサイトカイン抗体アレイ I およびヒト増殖因子抗体アレイ I (Ray Biotech, Inc., Norcross, GA) により測定した。方法は製造元による手順に従った。メンブレン上に得られるスポット状の蛍光シグナルは Light Capture (アトー、東京) によって画像化し、解析ソフトである Total Lab (TL100; Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) を用いてシグナル強度を数値化した。

3. グルコース消費量の定量

グルコース濃度はグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業、大阪) により定量した。方法は製造元による手順に従った。タンパク定量は RC/DC タンパク定量キット (パイオラッドラボラトリーズ、

東京) により測定した。

C. 研究結果

1. サイトカインおよび増殖因子の産生レベル

約30日間の骨膜培養後に12日間の骨芽細胞分化誘導および変異誘導を行った。最後の2日間にFBSを2%へ低下させて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。表1にコントロールと比較した産生レベルの変動を示した。コントロールとの比較で産生レベルが上昇する傾向にあったものは、骨芽細胞分化誘導培地ではIL-13、IGFBP-2で、変異誘導培地ではIL-6、IL-7、MCP-3であった。これに対して顕著に低下した骨芽細胞分化誘導培地のサイトカインおよび増殖因子はIL-6、MCP-1で、変異誘導培地ではIL-2、IL-3、IL-15、GCSFであった。

表1 サイトカインおよび増殖因子の産生レベル

誘導処理	変化	サイトカイン/増殖因子
骨芽細胞分化誘導	増加傾向	IL-13, IGFBP-2
	減少傾向	IL-6, MCP-1
変異誘導 (PMA)	増加傾向	IL-6, IL-7, MCP-3
	減少傾向	IL-2, IL-3, IL-15, GCSF

2. グルコース消費量

サイトカインおよび増殖因子の産生レベルを測定した培養上清に対して、さらにグルコース定量を行った。表2に培養骨膜の抽出タンパク量あたりに換算したグルコース消費量を示した。骨芽細胞への分化誘導を受けた培養細胞はコントロールと比較してほとんど差がないのに対し

て、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していた。

表2 培養骨膜におけるグルコース消費速度

	グルコース消費量 (mg/mg protein · 2days)						平均
	試料A	試料B	試料C	試料D	試料E	試料F	
コントロール	2.4	2.0	2.9	3.6	2.4	2.7	2.7±0.5
骨芽細胞分化誘導	1.9	2.3	2.8	-	-	4.1	2.8±0.9
変異誘導 (PMA)	4.1	-	-	5.6	3.0	5.0	4.4±1.0

D. 考察

今回のサイトカインおよび増殖因子解析に使用した抗体アレイ (Ray Biotech 社) による結果で再現性に問題が見られるサイトカインがあった。①同一の誘導処理で増加および減少の結果が反転するものや、②同一メンブレン内、2重測定のスロット間で得られるシグナル値の異なるものが存在した。これらの問題について培養ロット間による差異も考慮する必要がある。しかし少なくとも後者の問題から、Ray Biotech 社によるアレイ用メンブレンの再現性については検証する必要がある。

増減の傾向が一定しないものを除いた結果において、骨芽細胞誘導を行った培養骨膜で骨代謝に関係が深いものが上昇し、他方、変異誘導処理では炎症関連、腫瘍細胞関連の因子が上昇する産生パターンへと変化した。IL-13 は骨芽細胞や破骨細胞の分化に関わるほか、IGFBP-2 は骨芽細胞で発現して骨ミネラルの密度調節に関係していることが知られている。また、変異誘導により上昇がみられた MCP-3 は多くのガン細胞株で発現が見られるものである。

糖分解系について腫瘍細胞では、本来

嫌氣的な解糖-乳酸合成系が好氣的条件下でも亢進していることが良く知られている。本研究では我々の期待通り、変異を誘導した培養骨膜でグルコースの消費が亢進していた。

E. 結論

当初の予想通り、サイトカインや増殖因子に関するプロファイリングは、細胞の分化度や変異度を判断する際に有用な情報を提供し、かつ汎用性の高い手法であることが示唆された。しかし、現状では結果の再現性にやや難点を抱える。今後は、必要に応じて他社の抗体アレイで再現性を検証し、例数を増やして産生レベルの変動範囲を確認する。これにより、安定したシグナルを示す抗体スポットと明瞭なレベル変動を示すサイトカインを選択する。また製造ロット間のデータ比較を容易にする目的で、内部標準となりうるサイトカイン類を見出すことも視野に入れる。グルコース代謝に関しても、並行して検討を継続する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

IV 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Morio T , Ozono K.	Ex vivo-expanded donor CD4(+) lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient graft-versus-tumor effect. <i>Pediatr.</i>	Blood Cancer	[Epub ahead of print]		2009
Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T , Mizuatni S.	Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation.	<i>Leukemia.</i>	23(2)	409-14	2009
Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, Shimizu N, Morio T , Mochizuki M.	Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis.	[Journal Article] <i>Japanese Journal of Ophthalmology.</i>	52(6),	463-467	2008
Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T , Mochizuki M.	Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herp etc.	<i>Br J Ophthalmol.</i>	92(4)	505-508	2008
Suzuki K, Tsugawa K., Oki E, Morio T , Ito E, Tanaka H.	Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia.	<i>Ped. Nephrol</i>	23	1005-1008	2008
Morio T , Kim H.	Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage.	<i>Int J Biochem Cell Biol.</i>	40	598-603	2008
Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, Morio T , Gehars, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H.	Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals.	<i>Cell.</i>	132	794-806	2008
Takahashi N. Morio T .	Common variable immunodeficiency.	<i>Japanese Journal of Clinical Immunology.</i>	31(1)	9-16	2008.

Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M.	Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis.	<i>Br J Ophthalmol.</i>	92	928-932	2008
Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, Morio T, Kosaka Y.	Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation.	<i>Int J Hematol.</i>	87	88-90	2008
木戸さやか、杉田直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月學、清水則夫、森尾友宏	ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜炎内皮炎の4例	臨床眼科	62	1061-1065	2008
Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M.	A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis.	<i>Japanese Journal of Ophthalmology</i>	52(2)	136-138	2008
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M.	Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis.	<i>British Journal of Ophthalmology</i>	92(7)	928-932	2008
Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M.	Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette.	<i>British Journal of Ophthalmology</i>	92(4)	505-8.	2008
Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S.	The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB.	<i>Virus research</i>	131(2)	170-179	2008
Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S.	A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses.	<i>Journal of Infectious Diseases.</i>	198(5)	673-82	2008

Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T.	Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines.	<i>Clinical Experimental Immunology</i>	151	519-527	2008
madome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S.	CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells.	<i>Microbes and Infection</i>			(in press)
加藤俊一	臍帯血移植の今後.	総合臨床	Vol57, No.4	632-638	2008
Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S.	Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia.	<i>Blood.</i>	Dec 22.	[Epub ahead of print]	2008
Yabe M, Ishiguro H, Yasuda Y, Takakura I, Matsuda S, Shimamura K, Kato S, Yabe H.	Fatal giant cell myocarditis after allogeneic bone marrow transplantation.	<i>Bone Marrow Transplant</i>	Vol.41 No.1	93-4	2008
Yasuda Y, Yabe H, Inoue H, Shimizu T, Yabe M, Yogo Y, Kato S.	Progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome.	<i>Pediatr Int</i>	Vol.50, No.2	238-40	2008
Narimatsu H, Miyakoshi S, Yamaguchi T, Kami M, Matsumura T, Yuji K, Murashige N, Kusumi E, Kodama Y, Komatsu T, Sakamaki H, Kouzai Y, Okada M, Osugi Y, Kobayashi R, Inoue M, Takahashi S, Kai S, Kato K, Inoue-Nagamura T, Taniguchi S, Kato S.	Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan.	<i>Blood</i>	Vol.112 No.6	2579-82	2008
Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato K, Takahashi S, Taniguchi S, Miyamura K, Aoki K, Hidaka M, Nagamura F, Tojo A, Fang X, Kato S.	Unrelated cord blood transplantation in CML: Japan Cord Blood Bank Network analysis.	<i>Bone Marrow Transplant</i>	Vol.42 No.4	241-51	2008