



図 2. Sse8387I 酵素処理後の泳動像とその切り出し。10%TBE ゲルによる PAGE。M1: 20 bp ラダー、M2: 10 bp ラダー。

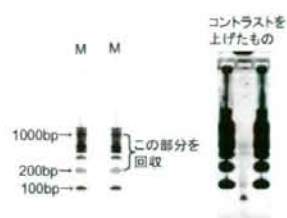


図 3. コンカテマー形成後の電気泳動像。2%アガロース電気泳動。M: 100 bp ラダー。

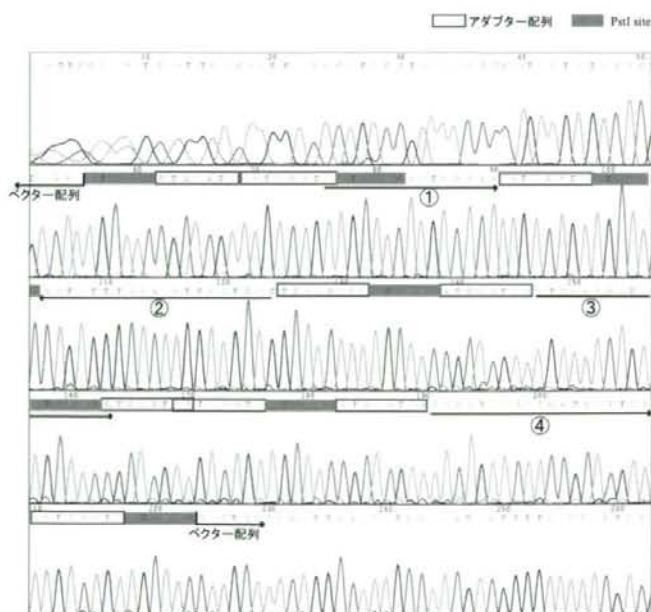


図 4. シーケンスの決定例。ベクターに挿入したコンカテマーの配列からアダプター配列を元に small RNA の配列を決定した。この例では、4つのクローン (①~④) が見出されている。そのうち①と③は

一方のアダプター配列が無いことから Small RNA 配列内に Sse8387I 制限酵素認識配列を含むと考えられたので、その部分を含めた配列を Small RNA 配列とした (PstI は Sse8387I より 2 塩基分認識部位長が短い酵素で切断末端が同一;ベクターは PstI で開環しているので PstI 配列を挿入配列の指標にしている)。

得られたシーケンス	長さ	
CTCAAAGATCCTGCAGG	17	グループ 1
GAATGCTCAAAGATCCTGCAGG	22	
CAGGAATGCTCAAAGATCCTGCAGG	25	
GCAGGAATGCTCAAAGATCCTGCAGG	26	
AGCAGGAATGCTCAAAGATCCTGCAGG	27	
CAGCAGGAATGCTCAAAGATCCTGCAGG	28	
Sse8387I		
AAGATCCGCAGGTGCGTCA	19	グループ 2

図 5. 得られた配列。8 クローンで 7 種類 (26-nt の例が 2 個得られた) の配列が得られた。類似性から大きく 2 群に分けられた。比較しやすいように右揃えで記載した。グループ 1 は 3'-側で同一の配列を共有している。これらは酵素認識部位を含むと考えられるため (図 4 参照)、実際はもっと長いものかも知れない。一方、グループ 2 は 1 例だけ観察された。

グループ 1 の最長の例で検索			グループ 2 の 1 例で検索		
Query: 7-20 evalue: 2.4	<u>hsa-miR-105</u> : 3-16	score: 110.4	Query: 4-19 evalue: 2.8	<u>hsa-miR-124</u> : 7-22	score: 109.4
hsa-miR-105*	24	CCGACAGACCTTGAGCACTCCGCGG	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA	19
	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA	1	CTGAGGACCTGAGCACTCCGCGG	22
Query: 5-23 evalue: 3.9	<u>gcl-miR-249</u> : 4-22	score: 106.7	Query: 5-18 evalue: 3.8	<u>gcl-miR-176</u> : 2-15	score: 107.3
gcl-miR-249	24	CTGACAGACCTTGAGCACTCCGCGG	18	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG	1
	3	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA	23
Query: 5-23 evalue: 3.8	<u>gcl-miR-249</u> : 4-22	score: 106.5	Query: 1-14 evalue: 3.5	<u>gcl-miR-1497b</u> : 4-17	score: 107.2
gcl-miR-249	24	CTGACAGACCTTGAGCACTCCGCGG	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA	18
	3	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG	1	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG	23
			Query: 1-14 evalue: 3.5	<u>gcl-miR-1497a</u> : 4-17	score: 107.2
			gcl-miR-1497a	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA
					19
					23
			Query: 3-19 evalue: 7.9	<u>gcl-miR-548c</u> : 3-19	score: 101.2
			gcl-miR-548c	18	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG
					1
					23
			Query: 1-17 evalue: 7.9	<u>hsa-miR-548b-3p</u> : 2-18	score: 101.2
			hsa-miR-548b-3p	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA
					18
					22
			Query: 3-19 evalue: 7.9	<u>hsa-miR-548b</u> : 3-19	score: 101.2
			hsa-miR-548b	18	CGACGACCTTGAGCACTCCGCGG
					1
					23
			Query: 1-17 evalue: 7.9	<u>gcl-miR-548b</u> : 2-18	score: 101.2
			gcl-miR-548b	1	AAGATCCGCAGGTGCGTCA
					18
					22

図 6. miRBASE によるホモロジー検索。グループ 1 の最長のものとグループ 2 の 1 例について miRBASE にてホモロジー検索を行った。両グループともホモロジーの高い配列が検出された。

細胞研究資源の資源化ならびに品質評価法・特性解析法開発に関する研究

研究分担者 古江 美保

独）基盤研生物資源研究部門 細胞資源研究室 研究員

研究要旨: これまでに間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSC) の *in vitro* での増殖・分化の制御について多くの報告がなされているが、血清添加培地や成分の明らかでない無血清培地など、さまざまな培養条件で検討されているため、比較検討が困難となっている。また、MSC は、血清添加の条件では継代することに品質が変化していくことが知られている。このような問題を克服するためには組成の明らかな無血清培養条件による培養法の標準化が急務である。そこで、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されているヒト骨髄由来樹立 MSC を、血清を用いずに自己複製能と未分化能を長期間継代維持が可能な無血清培養系の確立を行った。さらに、MSC の未分化性と多分化能を検討する有用なマーカーの検討を行った。

A. 研究目的

近年、成体における組織の修復や維持に関与する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSC) が存在すると考えられるようになった。従来、体性幹細胞は、胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) とは異なり、存在する組織の細胞にのみ分化すると考えられてきた。しかしながら、最近の研究により、体性幹細胞は由来組織以外の細胞にも分化しうること、さらには発生学的な起源である胚を越えた分化能力をもつことが明らかとなってきた。このような体性幹細胞は、臍帯血・神経・心臓・脂肪など多くの組織から単離されているが、中でも特に注目されているのは骨髄由来の MSC である。MSC は造血支持細胞、骨芽細胞、

脂肪細胞だけでなく、中、内、外胚葉の細胞といった、胚を超えた分化能力を有する。

再生医療や創薬・毒性評価における応用が期待されている ES 細胞は、その多分化能から細胞分化のメカニズムの解明に大きな役割を果たしている。しかしながら、その培養法は十分に確立されているわけではない。また、培養系の様々な不定要素の存在によって、増殖因子・分化誘導因子の機能を正確に解析することができず、特定の細胞への分化を誘導するのが困難であり、さらに医療応用における安全性にも問題がある。このような問題点を解決するためには、血清・フィーダー細胞を使用しない、既知の因子による未分化能・多分化能を維持した長期培養系の確立が求められる。先行研究にて、その第一段階として、マウス ES 細胞の未分化能と多分化能を血清とフィーダ

一細胞を用いないで維持可能な無血清培地・ESF7を開発した。さらに、この培地に改良を加え英国 Sheffield 大学との共同研究により、ヒト ES 細胞株 Shef-1、Shef-5、HUES-1 を用いて、フィーダー細胞を用いない無血清培地 hESF9 を開発した。しかし、ヒト ES 細胞は、染色体の不安定性、腫瘍化などの問題、また倫理的な課題もある。また、2007 年に山中らにより、ヒトの皮膚細胞にレトロウイルスをベクターとして 4 遺伝子を導入することによりヒト ES 細胞に匹敵する人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell: iPS 細胞) が開発された。ヒト iPS 細胞は倫理的問題を克服しているものの、腫瘍化の問題など依然として再生医療における課題が残っている。そのため注目を集め始めているのが MSC である。MSC は、分化できる能力に制限はあるものの倫理的な問題も少なく、採取が容易であることから、再生医療や創薬・毒性評価も含めた幹細胞研究において ES 細胞にとって代わる可能性が指摘されつつある。

これまでに MSC の *in vitro* での増殖・分化の制御についても多くの報告がなされているが、血清添加培地や成分の明らかでない無血清培地など、色々な培養条件で検討されているため、比較検討が非常に困難となっている。また、正常細胞は、血清添加の条件では継代するごとに、品質が変化していくことが知られている。このような問題を克服するためには組成の明らかな無血清培養条件による培養法の標準化が急務であると考えられる。

そこで、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell バンク) に登録されているヒト骨髄由来樹立 MSC を、血清を用い

ずに自己複製能と未分化能を長期間継代維持が可能な無血清培養系の確立を目指した。さらに、MSC の未分化性と多分化能を検討する有用なマーカーの確立を目指した。

B. 研究方法

培養細胞ならびに培養方法

細胞は、国立成育医療センターより寄託された厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell バンク) に登録されたヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) より、E6、E7、hTERT あるいは bmi-1 遺伝子をレトロウイルスにより導入して不死化を行った UE7T-13 細胞 (JCRB1154)、UBE6T-15 細胞 (JCRB1159)、および UE6E7-16 細胞 (JCRB1160) を使用した (表 1)。培地は、指定維持培地である POWEREDBY10 (牛胎児血清含有、メド城取、東京) を使用し、5%CO₂/95%気相下、37°C インキュベーター内で培養を行った。サブコンフルエントの MSC を 0.05%トリプシン/0.02%EDTA (シグマ) にて細胞分散後、約 5×10^5 個/10ml の細胞密度で 10cm プラスチックディッシュに細胞を播種し、継代を行った。

ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 は、hESF 基礎培地 (ニプロ) にインシュリン、トランスフェリン、2-エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、亜セレン酸ナトリウム、オレイン酸/FAF-BSA の基本 6 因子ならびに FGF-2、ヘパリンを含む。MSC の無血清培養には、hESF9 から FGF-2 ならびにヘパリンを除いた hESF7 培地、あるいは hESF9 (10ng/ml FGF-2、0~1000ng/ml ヘパリン) を使用した。

無血清培地における MSC の細胞増殖に及ぼす各種増殖因子ならびにへパリンの影響についての検討

POWEREDBY10 維持培地にて継代維持した UE7T-13、UBE6T-15、UE6E7-16 細胞の 4 種の MSC がサブコンフルエントの状態になったところで hESF7 培地に培地交換して一晚培養後、0.05%トリプシン/0.02%EDTA (シグマ)にて細胞分散後、トリプシンインヒビター (0.1%) を加えてトリプシン作用を中和、遠心後、細胞を hESF7 培地に再浮遊させ、ゼラチンでコートした 24 穴プラスチックマルチプレートに 1.0×10^4 個/ml/ウェルの細胞密度で細胞を播種し、以下の条件で検討を行った。FGF-1、FGF-2 (以上シグマ)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 1, シグマ) について増殖に及ぼす影響について検討した。FGF-1 および FGF-2 は 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100ng/ml、TGF- β 1 は 0, 0.1, 1, 3, 5, 10ng/ml の濃度でそれぞれ添加し、培養 3 日目に培地交換を行い、培養 6 日目に細胞数をコールターカウンターにて計測した。各因子毎の各濃度における細胞数を比較し、増殖を最も促進する濃度を得た。

血清添加培地と無血清培地での細胞増殖能の比較検討

指定維持培地である POWEREDBY10 およびヒト ES 細胞用無血清培地の基礎培地・hESF 培地に ES 細胞用ウシ胎児血清 (インビトロジェン、USA) を 10% 添加した hESF+10%FBS 培地を血清添加培地として使用した。ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 (10ng/ml FGF-2、1000ng/ml へパリン)、ならびに、hESF9 培地に 5ng/ml TGF- β 1 を添加した hESF10 培地を使用した。これらの培地で 3 代以上継代維持した

UE7T-13、UBE6T-15、UE6E7-16 細胞の 4 種の MSC を用い、上記に準じた方法にてそれぞれ細胞を播種した。培養 1 日目から 6 日目まで 24 時間ごとに細胞数をコールターカウンターにて計測し、細胞の増殖曲線を得た。培地交換は、培養 3 日目に行った。さらに、同増殖曲線から細胞倍加時間を算出した。

Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析による細胞表面抗原発現の検討

細胞は UE7T-13 細胞を使用し、指定維持培地 POWEREDBY10、無血清培地 hESF9 および hESF10 培地にて 3 代継代維持したものを使用した。細胞を FACS 用固定液にて室温で 10 分固定後、5%ウシ血清/PBS にて室温 15 分ブロッキングを行った後、MSC マーカー CD90 (Thy-1)、CD105 (Endogrin) および CD44、CD45、CD73、CD34 に対する抗体を用いて、また、未分化ヒト ES 細胞に発現する SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 および分化したヒト ES 細胞に発現が認められる SSEA-1 に対する抗体を用いて、室温にて 30 分反応させた後、5%ウシ血清/PBS にて洗浄後、二次抗体と 30 分反応させ、5%ウシ血清/PBS にて洗浄し、BD FACSCanto™ (ベクトンディッキンソン、USA) にて解析を行い、各条件で培養した MSC での発現について検討した。

C. 研究結果

無血清培地を用いた培養系での樹立間葉系幹細胞 (MSC) の細胞増殖に及ぼす各増殖因子の影響

MSC・UE7T-13、UBE6T-15、UE6E7-16 の 3 細胞株を用い、ヒト ES 細胞用無血清培地

hESF9 培地から FGF-2、ヘパリンを除いた hESF7 培地を用いて、FGF-1、FGF-2、TGF- β 1、の細胞増殖への影響を検討した結果、FGF-1 は 100ng/ml、FGF-2 は 10ng/ml で最も細胞増殖を促進した (図 1、2)。また、TGF- β 1 は検討した濃度間で細胞増殖に大きな差は認められなかったが、TGF- β 1 は 5ng/ml (図 3) でやや増殖促進を示した。

各種培養条件における細胞増殖能

hESF9 培地では、6 日後の細胞数や細胞増殖速度も、血清添加培地ほどの増殖が得られなかった。一方、同培地に TGF- β 1 を加えた hESF10 培地ではいずれの細胞株でも、6 日後の細胞数、細胞増殖速度ともに、血清添加培地と同程度の増殖が認められた (図 4~6)。各培地における細胞倍加時間は、POWEREDBY10 培地：23.5~34.0 時間、hESF10%FBS 培地：19.7~31.9 時間、hESF9 培地：24.9~56.9 時間、hESF10 培地：20.4~46.8 時間であった。

FACS 解析による細胞表面抗原発現の検討

MSC・UE7T-13 細胞株を、POWEREDBY10、hESF9 および hESF10 培地でそれぞれ 3 代継代培養を行った後、各種細胞表面マーカーの発現をそれぞれの抗体を用いて FACS にて解析した。MSC の表面マーカーである CD90、CD105 および CD44、CD73 陽性細胞は、血清添加培地である POWEREDBY10、無血清培地 hESF9 および hESF10 の各培養条件で発現が認められた。一方、CD34、CD45 陽性細胞はいずれの培養条件でも認められなかった。各培養条件下では、これらの CD 抗原の発現には大きな差を認めなかった (図 7)。一方、ヒト ES 細胞の未分化マーカーの発現を検討した結果、POWEREDBY10 培地では SSEA-3、SSEA-4 陽性細胞の発現が認められ、

hESF9 培地では SSEA-4 陽性細胞は同程度認められたが、SSEA-3 陽性細胞の発現は減少していた。また、hESF10 培地では SSEA-3 および SSEA-4 陽性細胞はともに発現の減少が認められた。いずれの条件でも SSEA-1、TRA-1-60 および TRA1-81 陽性細胞の発現は認められなかった (図 8)。

D. 考察

MSC は ES 細胞や iPS 細胞ほどの多分化能はないが、骨芽細胞や脂肪細胞だけでなく、肝細胞や神経細胞など胚を超えて分化する能力を持っていることが報告され、再生医療への応用の可能性が高まってきている。MSC は臍帯血・神経・心臓・脂肪など多くの組織から単離されているが、口腔領域において顎骨髄は採取が容易である。従って、もっとも応用の現実性の高い幹細胞だと考えられる。これまでに MSC の *in vitro* での増殖・分化の制御についても多くの報告がなされているが、ほとんどの報告は、血清添加培地や成分の明らかでない無血清培地など、色々な培養条件で検討されているため、比較検討が非常に困難である。このような問題を克服するためには組成の明らかな条件による培養法の標準化が急務であると考えられる。そこで、本研究では MSC の既知の因子による無血清培養条件の確立を試みた。

骨髄由来 MSC 細胞に E6、E7、hTERT あるいは bmi-1 遺伝子をレトロウイルスにより導入して不死化を行った MSC 細胞株を用いて、ヒト ES 細胞用無血清培地から FGF-2 とヘパリンを除いた hESF7 培地を使用し、各種増殖因子の増殖への影響を検討した。その結果、FGF-2、TGF- β 1 およびヘパリンが

増殖能に最も関与していることが明らかとなった。ヒト ES 用無血清培地 hESF9 培地に TGF- β 1 を加えた hESF10 培地で培養したところ、血清添加培地と同程度の MSC の細胞増殖が得られ、MSC の細胞増殖が十分得られる既知の因子からなる無血清培養条件が確立できたと考えられる。

MSC は細胞増殖だけでなく、その未分化性を維持する必要がある。これまでの報告によると、神経、結合組織、骨髄、臍帯血、胎児肝などのストローマ細胞に発現する CD90 (*Thy-1*)、TGF β 1 及び TGF β 3 のコ・レセプタで中胚葉系組織に分化能のある MSC に発現する CD105 (*Endoglin*) は、MSC の未分化マーカーとされている。hESF9、あるいは hESF10 培地で 5 代以上継代維持した MSC におけるこれらの遺伝子ならびにタンパクの発現を RT-PCR ならびに FACS を用いて解析したところ、無血清培養条件下においても、血清含有培地を用いた培養条件と同様に、CD90 ならびに CD105 の発現を維持していた。また、間葉系マーカーである CD73 を発現し、一方、MSC には発現しない白血球共通抗原である CD45、造血幹細胞マーカーの CD34 は、血清含有培地を用いた条件と同様に、発現は認められなかった。この結果は、本研究で確立した無血清培養条件を用いて、血清添加の条件と同様に MSC の未分化性を維持できていることを示している。しかし、これらのマーカーは、MSC の未分化性を同定するために十分でないと考えられる。そこで、さらに有用なマーカーを検討するため、未分化なヒト ES 細胞に発現が認められている *Oct3/4*、*Nanog*、*SOX2* および発生初期の中胚葉細胞に発現する *Brachyury* の発現について検討したところ、

MSC において *Oct3/4*、*Nanog* の発現が認められた。*Oct3/4*、*Nanog* 陽性 MSC が未分化性を維持している状態であるとすれば、未分化ヒト ES 細胞との共通性が存在していることとなり、未分化 MSC の有用なマーカーとなると考えられる。また、未分化ヒト ES 細胞の胚発生段階特異的抗原といわれている SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4 や、未分化ヒト ES 細胞で発現が認められている TRA-1-60 および TRA-1-81 の発現も検討したところ、hESF9 培地では SSEA-3 陽性細胞は減少し、また hESF10 培地ではどちらも発現が低下していた。また、TRA-1-60 および TRA-1-81 はどちらの条件下でも発現が認められなかった。ヒト ES 細胞におけるこれらの表面抗原の発現の意味は解明されておらず、更なる検討が必要と考えられた。

E. 結論

本研究の結果、ヒト骨髄由来 MSC の細胞増殖能と未分化性を維持することが可能な無血清培地を開発することができた。また、MSC 細胞は MSC マーカーとともにヒト ES 細胞の未分化マーカーも発現しており、MSC の未分化性の指標となる可能性が示唆された。本無血清培養条件は、未知成分を含んでおらず、MSC の増殖および分化機構を制御する各種因子の検討が標準化できるとともに、より安全で確実な再生医療ならびに創薬・毒性評価系への応用の実現を可能にするものと考えられた。

G. 研究発表

学会発表

第 62 回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会平成 20 年 4 月 17 日(木)・18 日(金)

福岡

マウス、サルおよびヒトES細胞とヒト骨髄
由来間葉系幹細胞の無血清培養

木村直大、古江一楠田美保、福井康人、明石
靖史、末盛博文、中辻憲夫、Peter W. Andrews、
岡本哲治

The International Workshop on biodental
Education & Reserch 2009

平成21年2月7日(土)・8日(日)

広島

Development of Defined Serum-Free Medium for
Human ES Cell Culture

Kimura, Naohiro, Furue, Kusuda Miho, Na, Jie,
Jackson, Jamie P., Baker, Duncan, Hata,
Ryu-Ichiro, Moore, Harry D., Sato, J. Denry,
Andrews, Peter W. Okamoto, Tetsuji

図表説明

図1 FGF-1の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

無血清培地 hESF7 に FGF-1 を各濃度で添加した条件で、6 日間培養した各種 MSC の細胞数。各細胞間で差はあるものの、100ng/ml で増殖を最も促進した。

図2 FGF-2の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

無血清培地 hESF7 に FGF-2 を各濃度で添加した条件で、6 日間培養した各種 MSC の細胞数。各細胞間で差はあるものの、10ng/ml で増殖を最も促進した。

図3 TGF-β1の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

無血清培地 hESF7 に TGF-β1 を各濃度で添加した条件で、6 日間培養した各種 MSC の細胞数。各細胞とも検討した濃度で細胞数に大きな差は認められないが、5ng/ml でやや細胞増殖を促進した。

図4 各培養条件での UE7T-13 細胞の増殖曲線

無血清培地および血清添加培地における UE7T-13 細胞の増殖曲線を示す。無血清培地として、ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 (10ng/ml FGF-2、1000ng/ml ヘパリン)、ならびに、hESF9 培地に 5ng/ml TGF-β1 を添加した hESF10 培地、また血清添加培地として POWEREDBY10 および hESF+10%血清培地を使用した。血清添加培地に比べ、hESF9 培地では十分な増殖が認められないが、hESF10 培地では血清添加培地に匹敵する増殖を認めた。

図5 各培養条件での UBE6T-15 細胞の増殖曲線

UBE6T-15 細胞では、hESF10 培地で血清添加培地以上の増殖を認めた。また、hESF9 培地でも血清添加培地に及ばないが十分な増殖を認めた。

図6 各培養条件での UE6E7-16 細胞の増殖曲線

UE6E7-16 細胞では hESF10 培地で血清添加培地と同程度の増殖を示した。hESF9 培地では、培養 5 日目までは血清添加培地と同程度の増殖を認めたが、培養 6 日目で若干増殖能が低下した。

図7 各培養条件での MSC における MSC マーカーの FACS による発現解析

無血清培地 hESF9 および hESF10 培地と血清添加維持培地 POWEREDBY10 での MSC マーカーの発現を FACS にて比較したもの。間葉系マーカーといわれる CD90 および CD105 陽性細胞はいずれの条件でも同程度発現が認められる。また、CD44、CD45、CD73 および CD34 についても各培地で同様の結果が認められる。

図18 各培養条件での MSC におけるヒト ES 細胞マーカーの FACS による発現解析

hESF9 および hESF10 培地と血清添加維持培地 POWEREDBY10 でのヒト ES 細胞の未分化マーカーの発現を FACS にて比較したもの。血清添加維持培地では SSEA-3 および SSEA-4 陽性細胞の発現が認められるのに対し、無血清培地 hESF9 では SSEA-3 陽性細胞の発現が減少している。また、hESF10 培地では SSEA-3 および SSEA-4 陽性細胞はともに殆ど認められない。一方、SSEA-1、TRA-1-60 および TRA-1-81 陽性細胞は、いずれの培養条件でも殆ど認められない。

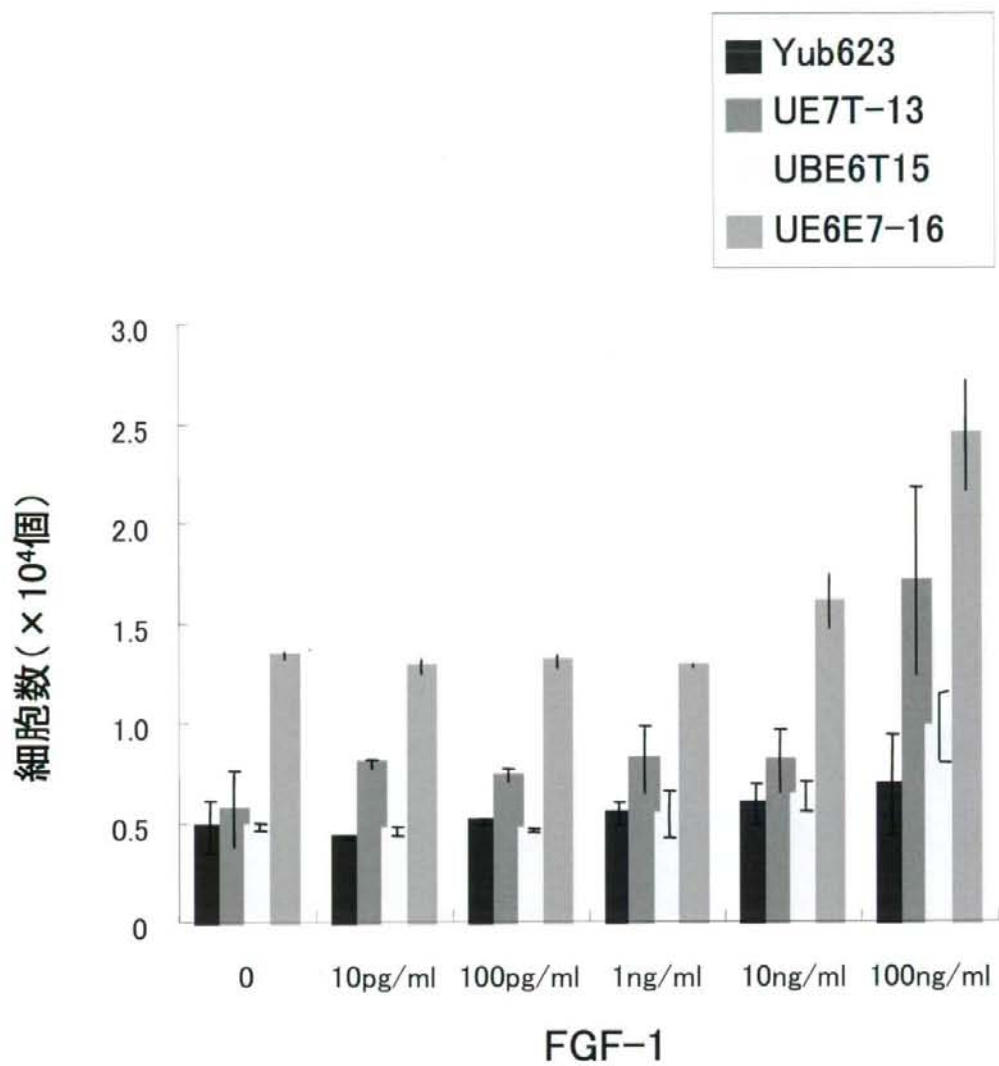


図1 FGF-1の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

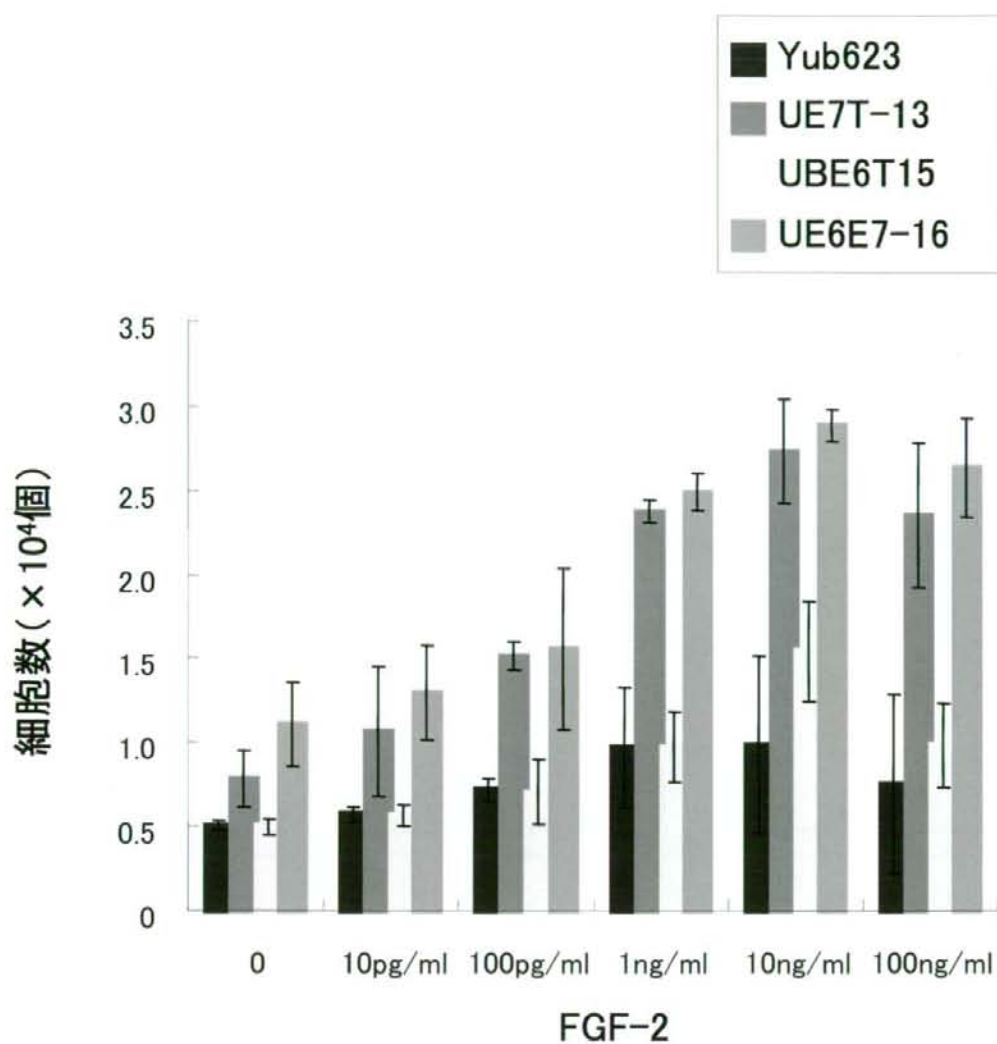


図2 FGF-2の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

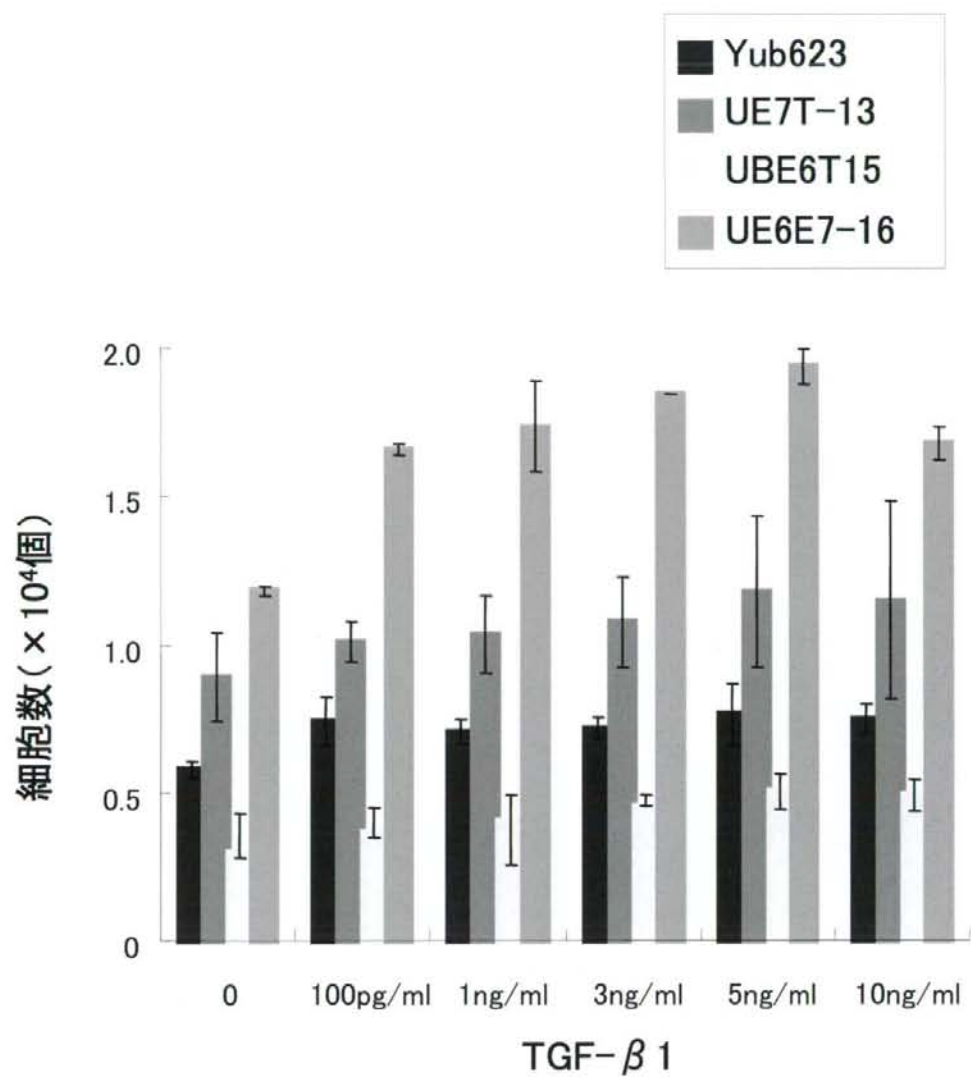


図3 TGF- β 1の各種MSCの細胞増殖に及ぼす影響

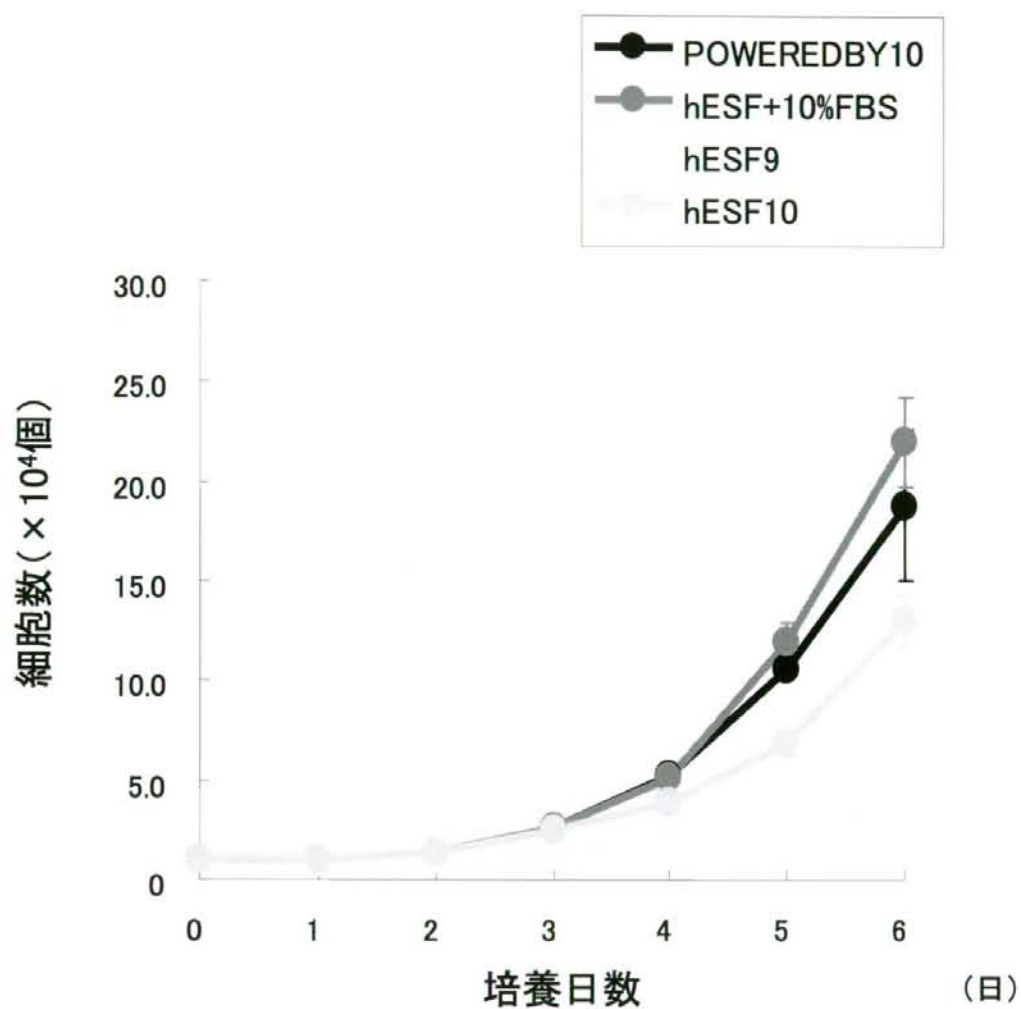


図4 各培養条件でのUE7T-13細胞の増殖曲線

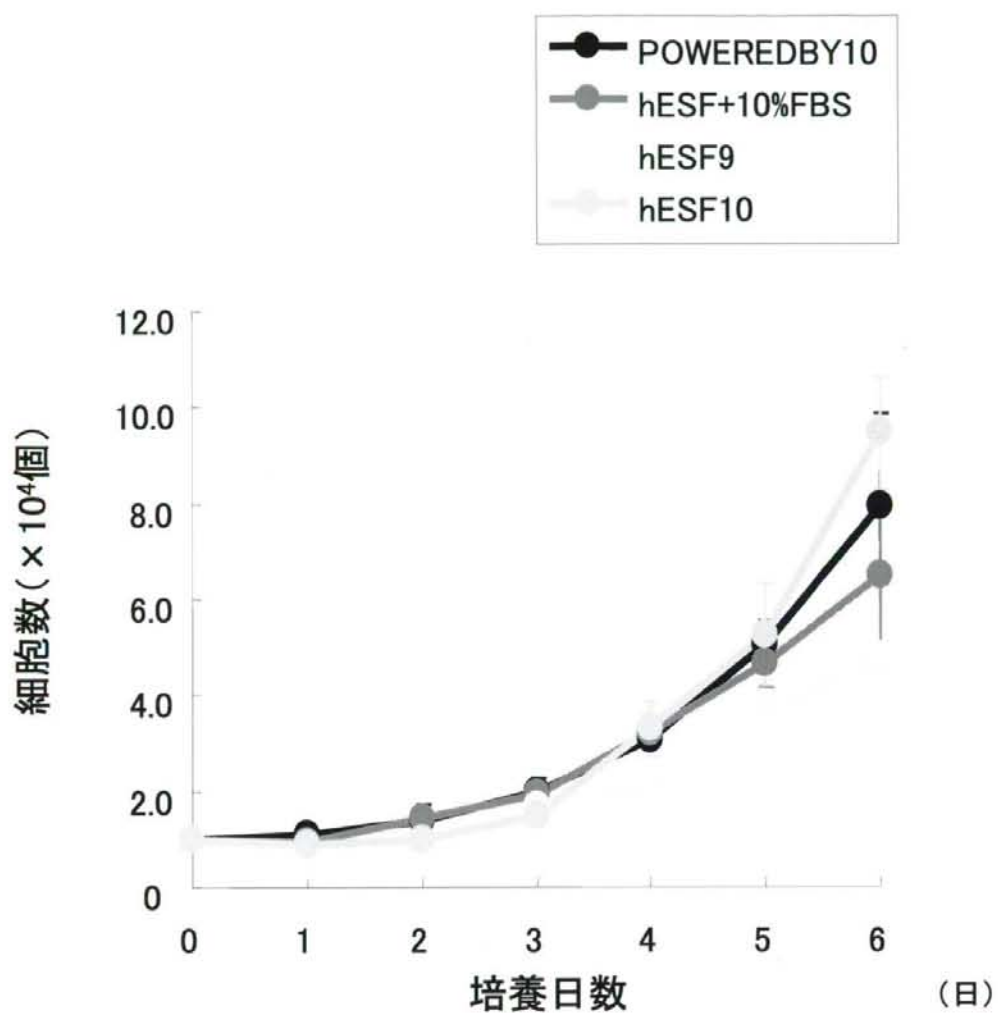


図5 各培養条件でのUBE6T-15細胞の増殖曲線

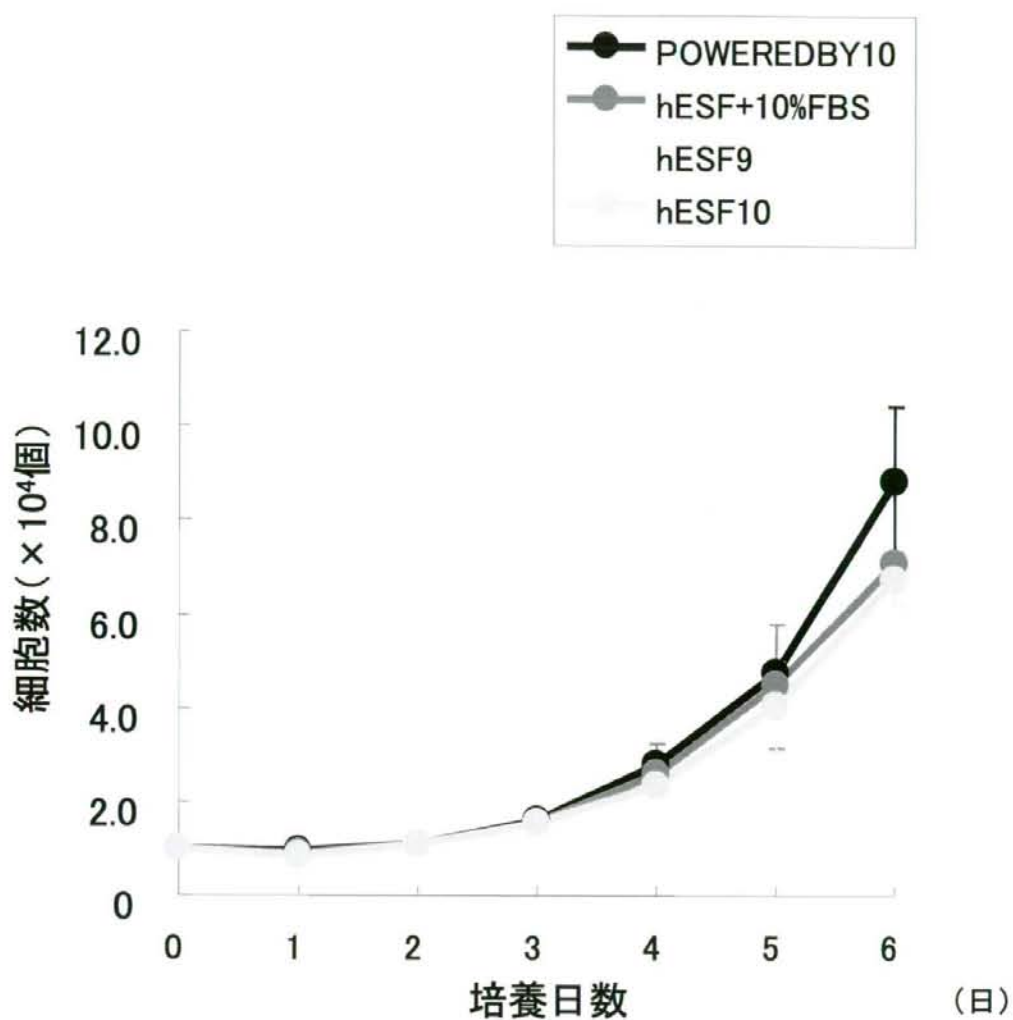
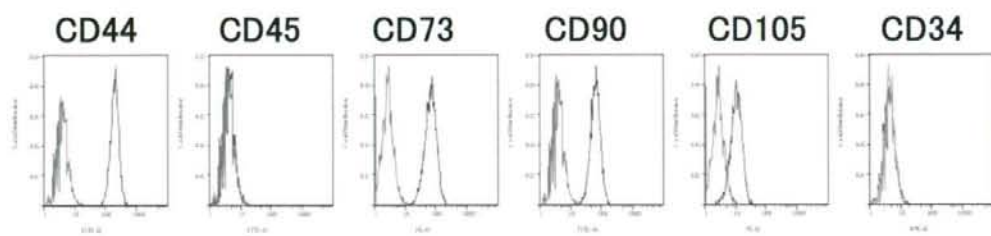
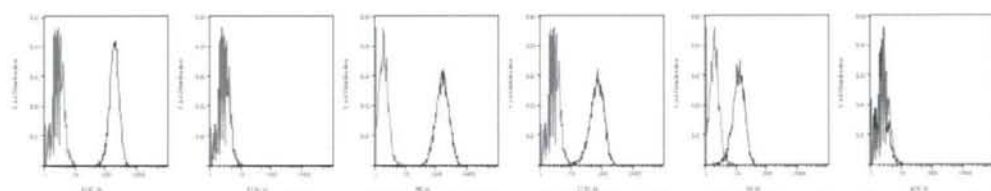


図6 各培養条件でのUE6E7-16細胞の増殖曲線

POWEREDBY10



hESF9



hESF10

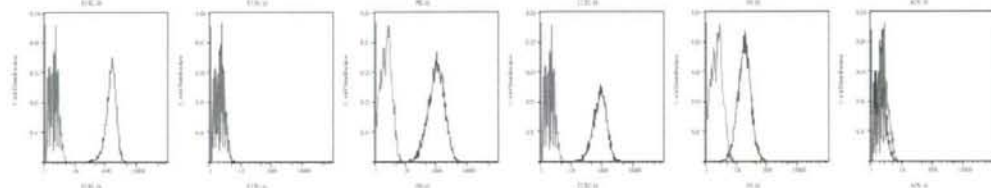


図7 各培養条件でのMSCにおけるMSC
マーカーのFACSによる発現解析

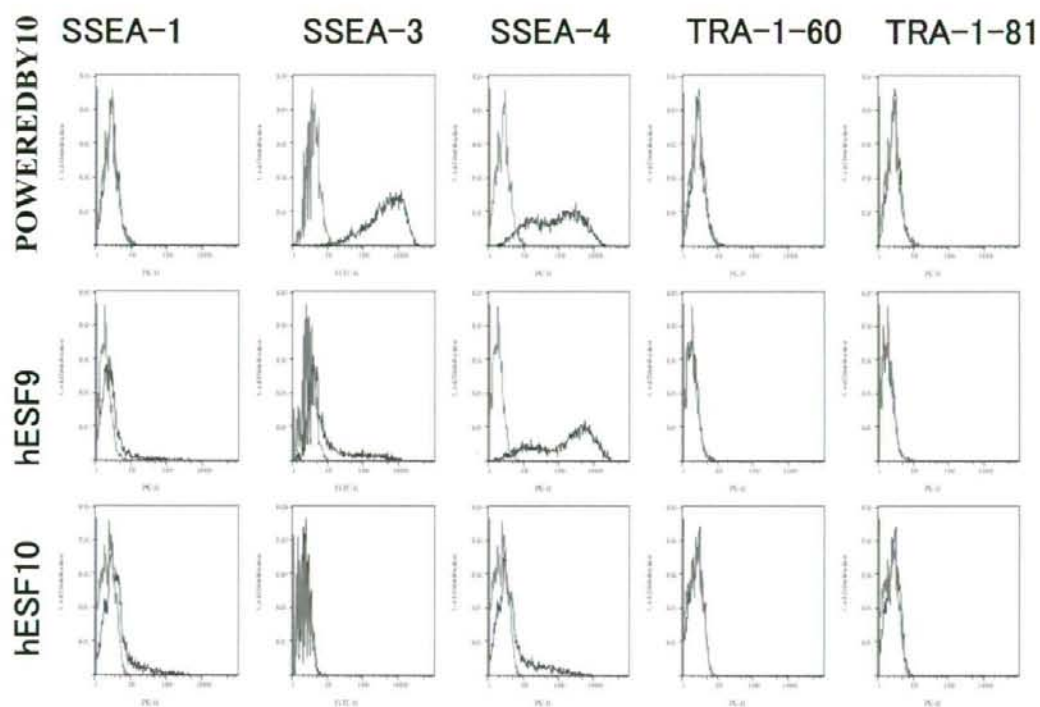


図8 各培養条件でのMSCにおけるヒトES細胞
マーカーのFACSによる発現解析

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

細胞資源の品質評価法ならびに特性解析法開発に関する研究

研究分担者	小原 有弘	(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部	研究員
協力研究員	塩田 節子	(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	小澤 裕	(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	大谷 梓	(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	林田 みどり	(独)医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員

研究要旨

我々厚生労働省の細胞バンクである JCRB 細胞バンクでは 1000 株にもおよぶ細胞資源を保有しており、年間 3500 を越える凍結アンプルを研究者に提供している。近年、細胞を扱う研究者の安全を確保する目的と将来ヒトへの応用も視野に入れた研究の目的のため、細胞分譲に際して細胞のウイルス汚染状況に関する問い合わせが多くなっていた。現在、世界的に見ても細胞資源を提供する細胞バンクにおいてウイルス検査体制を確立しているバンクは無く、わずか一部の細胞においてのみ情報が提供されているのが現状である。本研究では昨年度より継続して、細胞資源のウイルススクリーニング検査を実施し、細胞資源の登録情報として研究者へ提供することにより研究者の安全を確保するとともに、細胞資源のウイルス汚染状況の確認を行った。その結果、ヒト由来細胞を中心に 511 検体を検査し、43 検体でウイルス検査陽性の結果を得ることが出来、細胞資源のウイルス汚染の現状を把握することができた。また、本年度は HCV の検査を実施するため RNA 試料を用いたウイルススクリーニング検査体制の確立を行い、感度検定や再現性確認を実施した。さらに、細胞のマイコプラズマ汚染検査に関する全国調査を継続実施し、2000 検体におよぶ検査を実施した結果、24%程度の細胞においてマイコプラズマ汚染が認められる結果が得られた。今後、研究者への情報提供を行うとともに、更なる検査項目の追加を行い、世界最高水準の細胞資源を保有する細胞バンクを目指す。

A. 研究目的

<細胞のウイルス検査の実施>

細胞バンクでは、動物種、健康状態の異なる個体由来の、種々の臓器から採取された正常組織や腫瘍組織から樹立され、寄託された細胞株を国内外の企業、大学等の研究機関に提供している。細胞自体には微生物汚染に対する防御能力は無く、その品質管理は重要である。とりわけ、細菌、真菌による汚染と異なり、培地の濁り等で判定できないマイコプラズマやウイルスによる汚染検査は重要である。

我々はすでにマイコプラズマ汚染検査は確立し受託業務を行っているが、細胞株のウイルス検査は我々のバンクを含め公的バンクではまだ行われておらず、すでに多方面で使われている細胞株でも、ウイルス汚染の有無に関しては何の情報も無いのが現状である。

しかし、近年の再生医療の技術的な発展に伴い、細胞を使った薬品の開発、治療法の開発研究の進展に伴い、ウイルス検査の必要性は高まっている。汚染された細胞を通しての持続感染は、ウイルスに本来の宿主以外の、自然環境では起こりえない環境を与え、ウイルスの変異を促進し、人類に多大な不利益をもたらしかねない。このような事態をさけるためにも、ウイルス検査の確立と分譲用培養細胞の全細胞株の検査実施は重要な課題であり、多数の細胞株を安全かつ効率よく、安価に検査できる方法の確立が急務であった。

東京医科歯科大 清水らは実際に細胞治療の現場で、治療用細胞の品質検査として、マルチプレックス PCR を用いたウイルス検査法を

確立した。我々は、同研究室に検査用プレートの作成を委託した。検査対象をヒト由来細胞に絞り、ヒト細胞で持続感染を起こす、または、ゲノムに潜むウイルス 14 種類 (CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, BKV, JCV, ADV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, HTLV-2, HIV1, HIV2, HPV18) を同一プレート上でリアルタイム PCR によって検査できる方法を確立し、今年度は昨年度に引き続き検査を実施し Total 511 検体の検査結果を得た。

ヒトサイトメガロウイルス (CMV)

エプスタイン・バーウイルス (EBV)

ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6)

ヒトヘルペスウイルス 7 型 (HHV-7)

BK ウイルス (BKV)

JC ウイルス (JCV)

アデノウイルス (ADV)

B 型肝炎ウイルス (HBV)

ヒトパルボウイルス 19 型 (parvoB19)

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1)

ヒト T 細胞白血病ウイルス 2 型 (HTLV-2)

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)

ヒト免疫不全ウイルス 2 型 (HIV-2)

ヒトパピローマウイルス 18 型 (HPV18)

また、上記の検査において RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) の検査が未実施であることより、RNA 試料を用いたウイルススクリーニング検査の導入実施が必要であり、今年度実施した。検査対象としては、9 種類 (HAV, HCV, HDV, HEV, HGV, HTLV-1, HTLV-2, HIV-1, HIV-2) を選択し、検査法の確立を目指した。

A 型肝炎ウイルス (HAV)

C型肝炎ウイルス (HCV)

D型肝炎ウイルス (HDV)

E型肝炎ウイルス (HEV)

G型肝炎ウイルス (HGV)

ヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1)

ヒトT細胞白血病ウイルス2型 (HTLV-2)

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1)

ヒト免疫不全ウイルス2型 (HIV-2)

<培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査>

マイコプラズマは自己増殖能を持つ、細菌の1/10ぐらいの大きさの微生物であり、培養細胞と共存して増殖するが、汚染しても培地が濁ったりしないので混入に気づきに微生物である。マイコプラズマの汚染が細胞に与える影響は様々であり、細胞の遺伝子発現やシグナル伝達に与える影響は少ない。また、汚染された細胞から抽出されたDNAやRNAの20%程度はマイコプラズマ由来になってしまうとの報告もあり、マイコプラズマ汚染が研究に及ぼす影響は非常に大きいものである。しかし、これまで細胞バンクに寄託された細胞のマイコプラズマ汚染検査を実施していると、その約20%は汚染していることが明らかになっており、マイコプラズマ汚染の現状を把握し、その実状を広く研究者に知らせることにより、質の高い研究の遂行を普及し、信頼性・再現性の高い研究による国際競争力強化を目指すため、培養細胞のマイコプラズマ汚染全国調査を実施した。本調査に使用したのは、Lonza社製 マイコアラート という迅速検査キットであり、マイコプラズマの汚染/感染を化学発光により検出する新しい測定キットである。その特徴として操作が簡単

で高感度に短時間でマイコプラズマの検出ができることがあげられ、全国調査に際して迅速簡易検査が非常に効果を発揮したと考えられる。

B. 研究方法

<細胞のウイルス検査法の開発>

細胞株からのゲノムDNAの抽出

培養細胞から Amersham 社製 GenomicPrep もしくは、QIAGEN 社製 AllPrep を用いてゲノムDNAを抽出した。

検査プレートの作成

東京医科歯科大学 清水らの方法で14種類のウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた検査用プレートを宅配便にて受け取り、検査に使用した。

ウイルスゲノムの増幅

10xbuffer、dNTP、ROX、25mMg、taq、H₂O からなる Master Mix に細胞のゲノムDNAを0.5 ng/well となるように加え、Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン) で95°C10分処理後、95°C15秒、60°C 60秒の反応を50サイクル行った。Negative control としてH₂OをPositive control として、スタンダードを50 copy/well 加えた。

細胞株からのtotalRNAの抽出

QIAGEN 社製 AllPrep を用いてゲノムDNAを抽出した。

検査プレートの作成

東京医科歯科大学 清水らの方法で9種類のウイルス検出用プライマーを付着乾燥させた