

200906008A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成22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	12
	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	18
	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	24
	加藤俊一 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)	
	持田讓治 (東海大学医学部外科学系整形外科学)	
	酒井大輔 (東海大学医学部外科学系整形外科学)	
	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 (東海大学医学部附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)	
	小林広幸 (東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学)	
4.	再生医療に応用できるウイルスの網羅的検出法の確立に関する研究	29
	浜口功 (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)	
	大場邦弘 (公立昭和病院小児科)	
5.	ヒト細胞を受け入れる TM β -1 投与マウスの有用性に関する研究	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	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)
梶 昌 美 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)
元井奈都紀 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)
小神晴美 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)
井上典子 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)
渡辺真理 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)
布施一郎 (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 (新潟大学医歯学系歯周診断・再建学分野)
川瀬知之 (新潟大学医歯学系歯科基礎移植・再生学分野)

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

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医歯学総合研究科発生 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	部 長
	伊藤 仁也	先端医療センター細胞管理室	室 長
	中田 光	新潟大学医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
研究協力者	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	助 教
	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	教 授
	持田 譲治	東海大学医学部外科学系整形外科学	教 授
	酒井 大輔	東海大学医学部外科学系整形外科学	講 師
	安藤 潔	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	東海大学医学部附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
	小林 広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学	教 授
	水谷 哲也	国立感染症研究所ウイルス第一部	主任研究官
	大場 邦弘	公立昭和病院小児科	医 員
	梶 昌美	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	技術補佐員
	元井奈都紀	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	特任助教
	小神 晴美	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	特任助教
	井上 典子	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	技術補佐員
	渡辺 真理	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	研究支援者
布施 一郎	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター	准 教 授	

	川瀬 知之	新潟大学医歯学系歯科基礎移植再生学分野	准 教 授
事 務 局	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 〒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	池内さやか	〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学 学術国際部研究推進課 TEL:03-5803-5872/FAX:03-5803-0179 E-mail:ikeuchi.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、[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

今までの17種類のウイルス測定系に加え、53種類のウイルスを測定可能なシステムを構築した。重要な微生物としては、*in vitro*でのリンパ系細胞への感染性が報告されているXenotropic murine leukemia virus-related retrovirusの定量PCR系を構築した。また、日本薬局方参考情報記載の手法が煩雑かつ不安定と考えられているマイコプラズマの検出についても、新規検査系の構築も行った。投与細胞については、免疫担当細胞、培養口腔粘膜・骨膜細胞・軟骨細胞において測定を行った。未知のウイルスについてはRapid determination system of viral RNA/DNA sequences (RDV法)を改良し、実施体制を構築した。

(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、p53のリン酸化、p21の発現などを指標にして、フローサイトメトリーにて微量かつ高感度迅速で測定するシステムを確立した。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、実際に培養口腔粘膜細胞・骨膜細胞にて解析を行った。また培養元細胞、各種培養細胞(増力良好及び不良細胞)を収集し解析を開始した。

(3) 標準細胞規格検証システムの開発

Luminex法により、増殖活性化T細胞(増殖良好・不良、増殖停止検体)の解析を行うと共に、培養骨膜においても増殖良好群、不良群の検体を50検体以上採取した。また多項目迅速解析手法としてフローサイトメトリー法を取り入れ、髄核細胞移入に適した細胞群及び支持細胞群を同定した。

(4) 細胞毒性・有効性検証システム

髄核細胞由来の細胞が目的どおりに髄核細胞としての性格を保持し、正常に機能するかどうかを評価する方法として、免疫不全マウス皮下移植による椎間板構造再構築の確認を行った。さらに、長期毒性を検証するシステムとして、非照射レジメンでもヒト細胞を受け入れ、長期にわたりヒト造血再構築を維持しうる方法を開発した。

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・部長

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、また「再生医療における枠組みに関する検討会」の中で、共同診療体制の元での再生医療・細胞治療の実施及び促進が検討される中、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、品質管理に関する研究は、再生医療の実応用に当たっての基盤となるものであり、かつ多大な労力を要する分野でもある。それを反映してか、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極めて少ない。

品質保証における具体的な障壁としては以下のことがあげられる。それは簡便・安価かつ高感度に微生物を検出できるシステムがないこと、マイコプラズマ否定試験が煩雑・困難かつ安定性や感度に問題があること、個別の細胞加工産物に対応する腫瘍化否定試験が困難であること、出荷基準とも言える標準製品規格を選定することに労力を要し、また複数以上の細胞が必要な場合など明確な規定が困難な場合があること、安全性・有効性検証に際して実験動物モデ

ルが必ずしも最適ではなく、かつ個別の対応が困難であること、などである。

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、免疫担当細胞療法、増殖臍帯血幹細胞調製、軟骨再生医療、皮膚再生医療、培養口腔粘膜細胞移植、培養骨膜移植など様々な分野において再生医療が活発に行われている。

これらの施設では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、これらの実臨床での実績と経験、および各施設で行ってきた品質保証、安全保証、製品標準化の知識と技術を生かし、[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している。それを元に、各施設の知識・技術の相互補完と乗り入れ、共同研究を経て、最終的に①～④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た研究を実施する

それらのシステムは、低価格かつ高感度で一般的な施設が実施可能なものとする必

要があり、研究及び開発特にその点に留意して実施する。

B.研究方法

1. 高感度多項目迅速微生物検出法の開発

(1) 高感度多項目迅速微生物検出法

前年度と同様、2時間で2,000円以下で、20コピーのウイルスを検出できるシステムを用いて、培養T細胞、軟骨細胞、口腔粘膜細胞、骨膜細胞を測定した。検体からの核酸抽出には自動核酸抽出装置を用い、解析はLight Cycler及びABI PRISM 7300を用いた。

(2) 新規微生物測定系の開発

*XMRVゲノム定量系の構築

Primer, probeの設定: Genbankに登録されているxenotropic murine retrovirus (*xrmv*) 4株の遺伝子配列をBLAST解析し、最も特異性の高いと思われる領域にPrimer, Probeを設定し、PCR条件を決定した。

*マイコプラズマ測定系の開発

培養細胞およびヒトからの分離報告があるマイコプラズマ、ウレアプラズマ、アコレプラズマ属をすべて検出できる検査系の構築を目指し、12種類の菌種を検査対象として選定した。

各種マイコプラズマの遺伝子情報をBLAST解析し、プライマー・プローブ配列及びPCR条件を設定した。

*その他のウイルスの検出系の開発

*RDV法の改良

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)の確立を

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。今年度は実際の臨床症例から核酸を抽出し、検討した。

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

(1) DNA損傷反応検出システム

(FACSを用いた方法)

抗CD3抗体固相化フラスコとIL-2で培養した細胞(増殖活性化T細胞)を過酸化水素、電離放射線刺激を加え、その量と時間を変えリン酸化ATM、リン酸化p53、p21発現の検討を行った。

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、抗リン酸化p53抗体、あるいは抗p21抗体にて染色した。染色後の細胞はFACS Caliburにて解析を行った。

一部の検討では、EBVで形質転換したB細胞株(EBV-LCL)、T細胞培養において増殖不良であった細胞なども用いて解析を行った。

(2) DNA損傷反応検出システム

(免疫染色を用いた方法)

実際に培養を行った口腔粘膜細胞および、骨膜細胞を用いて、組織標本を作成、リン酸化ATM、リン酸化p53、リン酸化chk2、ATR、リン酸化chk1に対する抗体を用いて染色する条件を決定した。対照としては、電離放射線刺激を加えた増殖活性化T細胞を使用した。

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、培養骨膜細胞、骨髄細胞、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及び培養上清を収集した。

培養上清については Luminex 法を用いて、下記のサイトカイン (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-15, IL-13, IL-17, IL-21, G-CSF, GM-CSF, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma, MCP-1(MCAF), MIP-1beta, TNF-alpha, sRANKL, VEGF, sE-selectin, EGF, FGF basic, IGFBP-2, BMP-2) を測定した。

髓核細胞培養においては、髓核細胞由来の細胞を 20 種類以上の抗体で表面抗原分析し、sorting から得た細胞をコロニー形成法あるいは Nude マウスへの移植によって、適切な性格を保持しているかどうかを検証した。

4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

NOD/SCID Mouse を用いた造血幹細胞移植実験における前処置の検討を行った。実際には照射の有無、抗体投与の有無 (anti-IL-2R β 鎖抗体あるいは抗 Asialo GM-1 抗体) に層別化した。各 Group につき 5 匹の NOD/SCID Mouse に上記の前処置をおこない、臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (を 2×10^4 / Mouse、尾静脈注射で投与した。

移植後 4 週間ごとに末梢血と骨髄を採取し、表面抗原解析を行い、ヒト血球の再構築を経時的に観察した。

培養髓核細胞では、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 Nude マウスのアッ

セイ系を開発して検証した (3 と同様)。

(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

Multiplex キャピラリー PCR と融解温度曲線分析を用いて、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで調製した増幅活性化 T リンパ球と、新潟大学細胞調製施設で調製した口腔粘膜細胞、骨膜細胞のウイルス検査を実施した。それぞれ原材料についても検討した。また口腔粘膜細胞については第一世代マイコプラズマ検出法を用いた検討も行った。

口腔粘膜からは VZV, EBV, CMV, HHV6, Parvovirus B19, HBV に加えて Mycoplasma が高頻度に検出されること (13/53)、培養後には Mycoplasma は消失するが、ヘルペスウイルスが検出される例があること (2/48) が明らかになった。口腔粘膜採取方法の変更を実施し、2009 年秋以降、Mycoplasma 検出事例はゼロとなっている。

Mycoplasma については第二世代の検出系を構築し、4 種類の primer, probe の組み合わせにより、理論的に 106 種類の Mycoplasma が multiplex PCR で検出できる系を確立した。実際には頻繁に検出される 12 種類の菌で検証を行った。

再生医療において問題となる可能性のあるウイルスを網羅するために、健常人の4%でリンパ球に感染が確認される *xrmv* を検出できる系も確立し、また未知のウイルスに対応するために、国立感染症研究所で開発した RDV 法を用いて臨床検体での検討を行った。その結果 *xrmv* は今のところ検出されず、RDV 法では脳炎患者の髄液より Coxsackievirus B4 を同定することができた。

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 損傷刺激後にもっとも初期に応答する分子群の1つであるリン酸化 ATM をフローサイトメトリー法で検出する手法を開発したが、今年度はその下流であるリン酸化 p53 及び細胞周期停止に関わる p21 の細胞内検出に成功した。

培養 T 細胞や EBV-transformed B 細胞株に放射線照射、あるいは過酸化水素処理して解析すると、リン酸化 p53 が確認されたが、一方培養した活性化 T 細胞では、無刺激ではほとんどその発現は認められなかった。

付着細胞系での DNA 損傷応答の検討では、口腔粘膜培養細胞及び培養骨膜細胞を用いて、リン酸化 ATM, chk2, p53 及び ATR, リン酸化 chk1 を検出するシステムを立ち上げた。

その結果、培養組織の辺縁部ではリン酸化 ATM と ATR が検出されるが中心部にはそれらが認められないこと、リン酸化 Chk1, Chk2, p53 はいずれの部位でもほとんど観察されないことが明らかになった。

3. 標準細胞規格検証システムの開発

Luminex システムを用いて、T 細胞調製

における増殖良好群、増殖不良群の培養上清中の 17 種類のサイトカインを測定したところ、増殖良好群では IL-6, Il-8, MIP1alpha が、増殖不良群では IL-17 の高産生が確認された。

口腔粘膜培養及び骨膜培養では、同様に増殖良好群及び増殖不良群にて培養上製を回収し、sRANKL, MIP1-beta, BMPなどを測定予定としている。

髓核細胞培養では、髓核前駆細胞の特性を検証するために 20 種類以上の抗体を用いて系統的に発現解析を行い、様々な分画を採取して、Colony formation assay 及び nude マウスへの皮下移植によってその髓核細胞への分化能を検証した。その結果、前駆細胞の主体を成すと思われる分画が明らかになったが、最良の増殖のためには minor な細胞集団が必要であること、培養においても骨髓間葉系細胞と隔膜共培養することが重要であることなどが明らかになった。

4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

今までのモデルマウスシステムでは放射線照射が必要で長期生存ができない、照射による臓器障害が観察されるなどの問題があったが、先端医療センターの解析により NOD-SCID に抗 IL-2R β 鎖抗体を投与したものが、最も高い生着率と感染に対する抵抗性を認めることが明らかになった。このシステムを用いて Ex vivo 増幅臍帯血移植を実施した。

また東海大学では体外で培養したヒト皮膚ならびに椎間板髓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髓核の組織構造を再構築できることを証明し

ている。その正常分化能の検証には重要な手法の1つであるが、有害事象や腫瘍化の点では、個別の調製細胞の検証が必要な再生医療では、限界があることが示唆されている。

D 考察

実際に再生医療を実施している施設が、検体、知識、技術を相互供与することによって、それぞれの分野において研究が進捗した。

高感度多項目迅速微生物検出法では、東京医科歯科大学にて開発した微生物検証系を先端医療センターに技術移転し、また同システムを用いて新潟大学の検体が解析されている。

新規微生物検出系としての 16SrRNA, 18SrRNA も、細菌や真菌のリアルタイム検出のために今後使用法の検証が行われる。

マイコプラズマ検出法については、今までの時間と労力が必要かつ、安定性に欠ける手法から、リアルタイム PCR で定量的に解析できるシステムを構築したので、今後培養法や簡便な検査として行われる MycoAlert などと厳密な比較を行う予定である。

RDV 法を用いて新規に留意が必要な微生物をスクリーニングする系も初期培養系、生物学的製剤使用の際や、有害事象発生時に威力を発揮するものと思われる。

DNA 損傷検出系は、私たちのグループが変異検出系の確立の前に導入すべき検査として提唱するものである。まずは各人において、DNA 損傷刺激後の正常生体反応を検討し、DNA 修復異常症・そのヘテロ異常をスクリーニングすることは有用と考える。

リン酸化 ATM, p53, γ H2AX, p21 の FACS

による発現解析は、最も DNA 損傷の少ない培養法、培養条件を選定する上で重要な手法となる可能性がある。特に造血幹細胞、T 細胞、樹状細胞などでの適応が想定される。

この方法は付着細胞系においても広く応用が可能であるが、固定・切片作成・免疫染色という過程が必要であるため、同様に条件決定のための手段がベストと考えている。また周辺の活発に増殖している部位では、一部の DNA 損傷修復分子の活性化が認められ、増殖による正常反応と過剰な反応をどう見分けていくかが重要である。その点で、反応の局在と、多分子の解析が有用になるものと考えている。

再生医療製剤における腫瘍化否定試験は、ごく一部の腫瘍化候補細胞を同定するという困難さを伴っているが、これらの解析から得られた異常な“クローン”を oligo-CGH (comparative genome hybridization)法などで解析するという事は可能である。

標準細胞規格検証システムは、High throughput かつ、比較的安価である必要がある。Luminex システムによる分泌生理活性物質測定は多項目性と迅速性に優れているが高価であるという問題がある。一次スクリーニングとして使い、二次スクリーニングでは mRNA 発現などに移行させる必要があるかと考えている。また T 細胞のような単純な培養系においても、意外なサイトカインが増殖指標物質としてピックアップされたことから、初期段階ではある程度網羅的な解析が必要になるかと思われる。

FACS を用いた解析も同様に簡便性には優れているが、多種類の抗体を要することなどから初期導入費用は安価ではない。さ

らに、臓器再生においては、1種類の細胞のみが重要ではなく、いくつかの支持組織が必要な場合、主たる細胞集団が単一ではない場合などが想定され、実際に最終目的細胞に分化する細胞集団を同定することは困難な場合も多いと考えられる。

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あげることができた。測定可能微生物種の拡大や、新規マイコプラズマ検出法、検出可能DNA損傷修復関連分子の拡大、多項目生理活性物質測定系など、新しく開発した検証系も多い。微生物検出系や、DNA損傷・変異細胞検出系、標準製品規格検証系はすでに共同研究の形で進行している。

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 (G.2) 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 第一回班会議(研究代表者 森尾友宏)

平成 21 年 9 月 05 日(土)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

- 9:00-9:10 研究班の課題と進捗状況
森尾友宏(東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野)
- 第一部 研究発表 (座長:中田 光)
- 9:10-9:25 ウイルスの網羅的解析(RDV 法)の血清サンプルへの検討
水谷哲也、浜口功(国立感染症研究所・血液安全性研究部)
- 9:25-9:40 培養口腔粘膜、培養骨膜シートのマイコプラズマ除菌について
中田光(新潟大学医歯学総合病院・生命科学医療センター)
- 9:40-10:00 培養口腔粘膜に対するマイコプラズマ菌抗原スパイク試験
梶昌美(新潟大学医歯学総合病院・生命科学医療センター)
- 10:00 -10:15 新規マイコプラズマ検査系の開発
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)
- 10:15-10:30 ヒト培養骨膜の培養期間の短縮化
吉江弘正(新潟大学大学院・歯周診断・再建学分野)
- 10:30-10:40 休 憩
- 研究発表 (座長:伊藤仁也)
- 10:40-10:55 TMβ-1 抗体投与によるヒト細胞を受け入れる免疫不全マウスの作成
伊藤仁也(先端医療センター・細胞管理室)
- 10:55-11:15 バイオセーフティを重視した再生医療実現化プロジェクト
加藤俊一、中村嘉彦、三島大志、中村雅登、宮澤秀和、佐藤忠之、蓮沼裕也、宮地勇人(東海大学 椎間板再生医療プロジェクト)
- 11:15-11:25 891 検体の T 細胞調製におけるウイルス解析
森尾友宏*、松本耕一郎**、落合央**、峯岸志津子**、清水則夫**(東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野*、細胞治療センター**)
- 11:25-11:45 培養細胞における DNA 損傷修復反応の検出
森尾友宏、大山敦**、峯岸志津子**(東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野、細胞治療センター**)
- 第二部 総合討論 (司会:森尾友宏) / 昼食
- 11:45-13:00 再生医療・細胞治療製剤の製品標準作成・品質保証・安全性検証における課題
- 第三部 分野別討論
- 13:00-14:00 グループ別討論

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 22 年 3 月 6 日(土)11:00 - 16:00

東京医科歯科大学医学部附属病院 1 階第 1 会議室

- 11:00-11:10 研究代表者挨拶、Overview
森尾友宏(東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野)
- 第一部 研究発表 (座長:加藤俊一)
- 11:10-11:30 再生医療に応用できる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)
- 11:30-11:45 新規マイコプラズマ検査系の開発
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)
- 11:45-12:00 東海大学における再生医療の安全性検査
佐藤忠之、中村嘉彦、中村雅登、安藤 潔、加藤俊一(東海大学・医学部)
- 12:00-12:20 細胞加工過程における DNA 損傷反応の検出
森尾友宏、大山 敦、峯岸志津子、高木正稔、水谷修紀(東京医科歯科大学・院・発生発達病学分野)
- 12:20-13:00 休 憩
- 第二部 研究発表 (座長:吉江弘正)
- 13:00-13:20 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)
- 13:20-13:40 培養骨膜シートの品質管理と製造期間短縮化
川瀬知之、吉江弘正(新潟大学大学院・歯周診断・再建学分野)
- 第三部 分野別討論
- 13:40-16:00 グループ別討論

III 分担研究報告

厚生労働科学研究補助金 再生医療実用化研究事業
分担研究報告書

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

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

研究協力者 高木正稔 東京医科歯科大学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、加工細胞が腫瘍化（悪性腫瘍化）していないことを示すことが重要である。最終細胞製品において、解析するには、染色体検査（G-banding）のような簡便かつ低感度で数十個程度を検討する検出法や、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煩雑かつ、個々の検体での確認には適さない方法などがとられており、実際に用いられるべきより汎用性の高い方法は模索されていない状況にある。

悪性腫瘍は DNA における変異→DNA 損傷修復応答→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いくつかの分子を指標として DNA 損傷応答亢進を検出するシステムを確立した。浮遊細胞において簡便に用いることが可能である。また付着細胞においても免疫染色によって確認することが可能となった。

この検査法を用いることにより、(1)DNA 損傷修復異常のあるドナーを簡便にスクリーニングできると共に、細胞に損傷あるいは負荷の少ない培養法を選択することが可能になる。本年度は、指標となる分子を増やし、また組織染色にて実調製細胞の検討を行った。

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、T 細胞培養系にて確認した。

A. 研究目的

昨年までの研究では、微量細胞を用いた変異細胞を検出するシステムを開発した。

細胞の腫瘍化過程で class I mutation (増殖・生存), class II mutation (分化停止・自己複製能) を獲得する際に、細胞は通常 DNA 損傷応答により、細胞回転を止め、細胞死に至る。

通常の細胞培養において mutation を獲得する細胞は通常わずかであり、正常幹

細胞のマウス移植系においてもむしろ腫瘍を発生させることの方が難しい。

再生医療・細胞治療製剤においては karyotyping あるいは SKY FISH レベルでの大まかな確認が現実的であり、わずかな腫瘍化細胞を捕まえることは困難である。腫瘍化の歳には、異常な遺伝子発現(抑制)、DNA 損傷応答反応を伴うため、少なくとも培養過程においては、個人が DNA 損傷修復異常を有しないことを確認

し、また DNA 損傷が少ない培養条件を使用することが望ましい。

この前提を元に、本年は検出する DNA 損傷応答関連分子の数を増やし、また実際に調製された細胞を用いて、組織切片での DNA 損傷応答反応を検討した。

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。

研究者らは迅速にかつ体系的に標準化指標を確立するためには、Luminex 法などによる多項目生理活性物質あるいは遺伝子発現検査か、Flow cytometer 用いた多種類の抗原測定が実際であると考え、本年はそれを検証することとした。

B. 研究方法

1. DNA 損傷反応検出システム

(FACS を用いた方法)

抗 CD3 抗体固相化フラスコと IL-2 で培養した細胞（増殖活性化 T 細胞）を用いて検討した。増殖活性化 T 細胞には過酸化水素、電離放射線刺激を加え、その量と時間を変えリン酸化 ATM、リン酸化 p53、p21 発現の検討を行った。

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、抗リン酸化 p53 抗体、あるいは抗 p21 抗体にて染色した。染色後の細胞は FACS Calibur にて解析を行った。

一部の検討では、EBV で形質転換した B 細胞株(EBV-LCL)、T 細胞培養において増殖不良であった細胞なども用いて解析を行った。

2. DNA 損傷反応検出システム

(免疫染色を用いた方法)

実際に培養を行った口腔粘膜細胞および、骨膜細胞を用いて、組織標本を作成し、各種抗体にて下記の分子群を染色する条件を決定した。対照としては、電離放射線刺激を加えた増殖活性化 T 細胞を用いた。

解析分子：phospho-ATM, phospho-p53, phospho-chk2, ATR, phospho-chk1

3. Luminex 法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(下記)産生の検討を行った。

IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-15, IL-13, IL-17, IL-21, G-CSF, GM-CSF, IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma, MCP-1(MCAF), MIP-1beta, TNF-alpha, sRANKL, VEGF, sE-selectin, EGF, FGF basic, IGFBP-2, BMP-2

(倫理面への配慮)

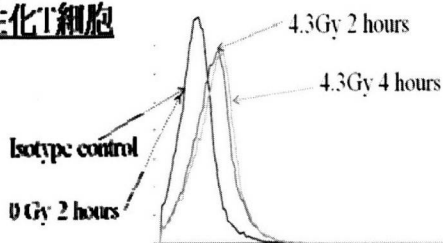
本研究では貴重なヒト培養細胞を用いることになり、細胞提供者には十分な説明を行い、同意を取得した上で検討を行った。また ATM ヘテロ異常などを検出する系を用いており、遺伝子解析に関与する各種倫理指針を遵守して研究を実施した。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会及び、同遺伝子解析に関わる研究に

C. 研究結果

1. 細胞内 phospho-p53 染色

図に示すごとく、放射線照射後に p-p53 発現が認められた。

活性化T細胞

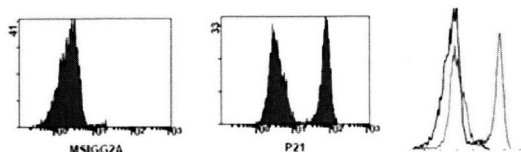


予備的な実験ではまた、培養状態が悪い（増殖停止に至る前の）細胞において、phospho-p53 の発現が更新していることが確認された。

1. 細胞内 p21 染色

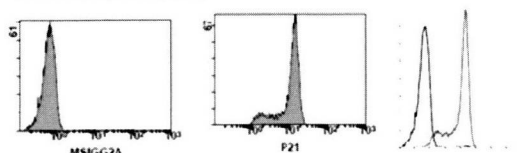
また同様に、EBV-LCL を用いた検討では、細胞周期回転が停止する際に検出されると想定される p21 も検出が可能であった。

EBV-LCL



しかし、増殖活性化 T 細胞においては、以下のごとく未刺激状態から細胞質内 p21 の発現が認められ、今後は脱核して検討する必要がある。

活性化T細胞



2. 付着細胞系での DNA 損傷応答の検討
新潟大学にて作成した培養口腔粘膜、培養骨膜細胞標本を用いて、DNA 損傷応答

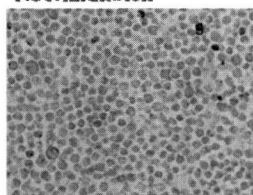
分子の染色を行った。

以下に示すように活性化 T 細胞においてはほとんど p-ATM の発現を認めず、DNA 損傷後に検出された。用量としては、0.5Gy 以下でも十分な検出が得られた。

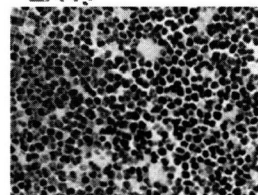
活性化T細胞

Phospho-ATM

No stimulation



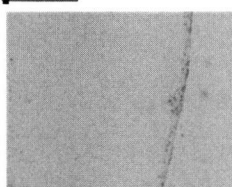
IR 5 Gy



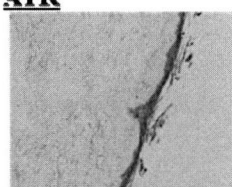
以下に骨膜細胞における代表的な染色パターンを示す。

骨膜細胞培養(正常増殖)

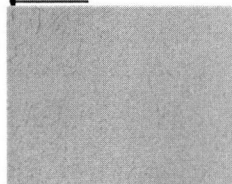
p-ATM



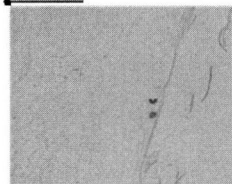
ATR



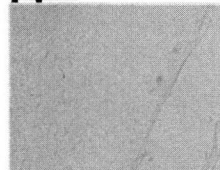
pChk2



pChk1



p-p53



図に示すように培養の先端部において、p-ATM, ATR の発現が確認されたが、一方 Chk2, Chk1, p53 のリン酸化は検出されなかった。口腔粘膜培養細胞においても同様の結果が得られており、この所見はむしろ正常増殖を示唆するもの（増殖良好を示唆する所見）と考えられる。