

4. Luminex 法による標準細胞規格策定および検証システムの確立

増殖活性化 T 細胞の培養上清を用いて、検討を行った。検体としては、(1)末梢血から増幅し、増殖良好のもの、(2)同様の増幅で増殖不良のもの、(3)臍帯血から増幅し、増殖良好のもの、(4)臍帯血から増幅し増殖不良のものを用いた。

その結果臍帯血では IL-17 産生が不良であるという以前からのデータに加えて、以下の異同が認められた。

A: 同等の発現が認められるもの

IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-alpha, G-CSF, GM-CSF, MIP1-beta

B: 増殖不良群で発現が低下するもの

IL-6, IL-8, MCP-1

C: 増殖不良群で発現が更新するもの

IL-17

さらに、口腔粘膜培養、骨膜培養において増殖良好群、増殖停止群、増殖不良群の培養上清を収集した。これらの検体を用いて、その他のリンフォカインも検討すると共に sRANKL, VEGF, sE-selectin, EGF, FGF basic, IGFBP-2, BMP-2 などを解析する予定である。

D. 考察

1. DNA 損傷応答解析システムの確立

本研究で解析するシステムの特徴は、完成した数少ない腫瘍細胞を、全検体を用いて解析するのではなく、「DNA に傷がつきやすい培養手順を極力避ける手段を検討するシステムである」、という点にある。

今回までの検討で浮遊細胞系では、リン酸化 ATM, リン酸化 p53, gamma-H2AX, p21

及び細胞周期・死細胞の検討が行えることが判明した。これから悪性腫瘍化するためには、さらなる DNA 損傷反応の乗り越えが必要であるが、今後明らかに反応が更新している培養条件があれば、*in vitro* 長期培養系あるいは移植系において、腫瘍が発生しないかを検討することが可能と思われる。

今後はリン酸化 Chk2, リン酸化 Chk1 を解析可能な分子群に加えるとともに、多重染色によって複数以上の分子を検討できるよう開発を進める予定である。

この方法はまた、DNA 損傷異常症のヘテロ異常者解析にも有用である。文献的には、例えば ATM ヘテロ異常症においては、白血病、ホジキン病、乳癌などのリスクが高いとされており、これらの培養前からの検出が、より DNA 損傷の少ない手法の選択などにつながるものと期待される。

付着細胞系においては、今後以下の方向が模索される。まず、増殖不良例や培養不成功例における解析である。口腔粘膜細胞、骨膜細胞、赤芽球系細胞などで検体が蓄積している。もう一つは培養系の改変による、DNA 損傷程度の評価である。骨膜培養において研究分担者である吉江らは、新規短縮培養法を開発しており、その検体を用いた検討が計画されている。

2. 標準細胞規格検証システム

本年度は Luminex 法を用いた実検体の解析を行った。T 細胞では、意外にもいわゆる Th1, Th2, Treg などの産生するサイトカインではなく、IL-6, IL-8, MCP-1 など T 細胞以外が主たる産生細胞であるもの、Th17 が産生する IL-17 などが指標となることが明らかになった。このことは、候補となる分子については最初に体系的にスクリーニ

ングを行うことが重要であることを示唆する。今後培養がより難しい臍帯血を用いて、増殖不良例の早期検出を試みる予定である。

同様に付着細胞系においても検証が進められていく。この中では 30 種類前後のサイトカインがスクリーニングされる予定である。

これらが明らかになればより安価で行える、mRNA 発現レベル検出などに情報を移植し、将来的なモニタリングとして用いる予定である。

E. 結論

汎用可能かつ安価な高感度迅速 DNA 損傷応答解析システムを開発し、その適用分子数が拡大した。

FACS 法は簡便かつ短時間で行うことができ、免疫染色法も 48 時間以内の検査が可能である。これらの手法を用いて培養にあたり注意すべき検体のスクリーニング、より安全な培養条件の選択、異常細胞の危険が高い群の選別などが行えるようになるものと思われる。特に今後複数以上の分子の同時測定を行うことにより、作業の効率化と費用削減、情報量の増加が見込まれる。

標準細胞規格設定システムについては Luminex 法が稼働しはじめ、増殖活性化 T 細胞については指標が確立しつつある。今後付着細胞系における体系的発現解析をおこない、さらに mRNA レベルでの解析を行える体制が整った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, **Morio T**, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood*. 2010 Feb 19. [Epub ahead of print]

2. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, hisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). *Acta Neuroathologica*. 2010. (in press).

3. Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, **Morio T**, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr*. 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]

4. Nanki T, Takada K, Komano Y,

- Morio T**, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009 Oct 5;11(5):R149. [Epub ahead of print]
5. Miyanaga M, Sugita S, Shimizu N, **Morio T**, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 2009 Sep 3. [Epub ahead of print]
6. Hasegawa D, Kaji M, Takeda H, Kawasaki K, Takahashi H, Ochiai H, **Morio T**, Omori Y, Yokozaki H, Kosaka Y. Fatal degeneration of specialized cardiac muscle associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int.* 51:846-8, 2009.
7. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, **Morio T**, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. *Ex vivo* expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.
8. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, **Morio T**, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. . *J. Pediatr.* 155: 829-833, 2009.
9. **Morio T**, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol.* 90:455-462, 2009.
10. Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, **Morio T**, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 17882-5. 2009.
11. Uchisaka N. Takahashi N. Sato M. Kikuchi A. Mochizuki S. Imai K. Nonoyama S. Ohara O. Watanabe F. Mizutani S. Hanada R. **Morio T**: Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with

lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* **155**:435-438, 2009.

12. Futagami Y, Sugita S, Fujimaki T, Yokoyama T, **Morio T**, Mochizuki M. Bilateral anterior granulomatous keratouveitis with sunset glow fundus in a patient with autoimmune polyglandular syndrome. *Ocul Immunol Inflamm.* **17**:88-90, 2009.

13. Takahashi N. Matsukoto K. Saito H. Nanki T. Miyasaka N. Kobata T. Azuma M. Lee S-K. Mizutani S. **Morio T**: Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *Immunol.* **182**:5515-5527, 2009.

14. Yoshida H. Kusuki S. Hashii Y. Ohta H. **Morio T**. Ozono K.: *Ex vivo*-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer* **52**:895-897, 2009

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 森尾友宏、大山 敦、峯岸志津子、高木正稔、水谷修紀：細胞加工過程におけるDNA損傷反応の検出、平成21年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業 「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2回班会議（森尾班）

2. Tomohiro Morio : Infusion of Ex-vivo Expanded Donor T-Lymphocytes for Intractable Infections and Leukemia. 第32回日本造血細胞移植学会シンポジウム「Cell Therapy for Intractable Infections and Malignant Diseases」2010年2月19日～20日、浜松

3. Tomohiro Morio: Common variable immunodeficiency (CVID): Molecular basis of immune dysfunction The 2nd Symposium for PID in Asia February 4 - 5, 2010 Kazusa Academia Hall

4. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症の全国調査と亜群同定。第3回日本免疫不全症研究会 2010年1月31日、東京

5. 森尾友宏、渡辺信和、高橋聡、中内啓光：HLA-Flow法による SCID-臍帯血ミニ移植後のキメリズム解析 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成21年度班会議2010年1月29日 東京

6. 梶原道子、森尾友宏：ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞 輸注療法臨床試験プロトコール 厚生労働科学研究免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班平成21年度第二回班会議、2010年1月30日、東京

7. 清水則夫、森尾友宏：平成 21 年度厚生労働科学研究（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」研究代表者 谷口修一、2010 年 1 月 31 日 東京
8. 清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、森尾友宏、藤本純一郎、藤原成悦：ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化 CD4 細胞の性状解析、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日～4 日、大阪
9. 森尾友宏、水谷修紀：Basic to Clinical: Artemis/Cernunos/Lig4 deficiency、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
10. 満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第 51 回日本小児血液学会 2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
11. 遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RIST にて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡した X 連鎖重症複合型免疫不全症の 1 例、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
12. 森尾友宏：ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成 21 年度「臍帯血 DLI の実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」（研究代表者 藤原成悦）、2009 年 10 月 20 日、東京
13. 満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RIST による非血縁臍帯血移植を施行した SCID3 例、小児 H-SCT 研究会、2009 年 10 月 9 日、東京
14. 森尾友宏、松本耕一郎、落合央、峯岸志津子、清水則夫：891 検体の T 細胞調製におけるウイルス解析、平成 21 年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業「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 1 回班会議（森尾班）
15. 森尾友宏、大山敦、峯岸志津子：培養細胞における DNA 損傷修復反応の検出、平成 21 年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業「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 1 回班会議（森尾班）
16. 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀：当科における同種造血幹細胞移植（1995-2007 年）の検討、第 112 回日本小児

科学会学術総会、2009年4月17日～19日、奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

新規微生物検出システムの開発

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

研究要旨：

再生医療実用化に資する微生物検査系の構築を目指し、最近前立腺がん細胞や慢性疲労症候群患者からの分離および *in vitro* でのリンパ系細胞への感染性を持つことが報告されている Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) の定量 PCR 系を作製し、検査系の検証作業を進めている。また、マイコプラズマに対する新規検査系の構築も行った。各指針でマイコプラズマ検査が求められているが、日本薬局方の参考情報に記載されているマイコプラズマ検査法は、迅速性、簡便性、安定性の面で再生医療製剤の安全性検査として用いるには問題がある。これらの問題を解消しさらに再生医療製品への混入の可能性があるマイコプラズマを網羅的に検出できる新規検査系として、リアルタイム PCR 機による 1 段階 PCR とプローブ検出による検査系を作製した。現在、添加回収試験などによる検査系の検証作業を行っている。

A. 研究目的

再生医療を実用化するためには、治療に使用する細胞製剤の品質管理システムの構築が極めて重要である。再生医療を行い際には、生きた細胞を治療に使用するため、細胞製剤に滅菌操作を加えることができない。このような再生医療の特質から微生物検査の重要性は非常に高く、高い感度・信頼性と迅速性を兼ね備え、さらに安価に検査できる新しい検査系の確立が必須である。本研究では、これまでの研究開発により構築したウイルス検査系を基に、再生医療の実用化に資する新しい微生物検査系の構築をめざした研究を行っている。本年度は、Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) およびマイコプラズマの迅速検査法の開発を目的に研究を行った。XMRV は最近前立腺がんや慢性疲労症候群発症への関与の可能性が指摘され、実験的

に B 細胞・T 細胞などへの感染性が示されている。XMRV は米国内の健常人に 4% 程度の持続感染者がいるとの報告があり、我国でも多くの XMRV 保有者が存在することが懸念されているため、再生医療に使用する生体材料に混入する危険性があり、データの蓄積が求められる。

一方、再生医療関連指針には、「マイコプラズマ汚染を否定すること」と規定されているが、日本薬局法の参考情報に記載されているマイコプラズマ検査法(培養法、DNA 染色法、Nested PCR 法)は迅速性や安定性に欠ける懸念があり、決して満足すべき方法ではない。我々は迅速性・安定性・感度を満し、混入が懸念されるマイコプラズマを網羅的に検出することができる新しい検査系の構築を目指し、リアルタイム PCR 装置を使用した 1 段階 PCR 法を応用した検査系の開発を行った。

B. 研究方法

1. 検体からの DNA 抽出

DNA の抽出には核酸抽出機 EZ-1 (キアゲン) を使用した。

抽出試薬は、EZ-1 Virus kit あるいは EZ-1 Tissue kit 試薬を使用した。

2. 核酸増幅

遺伝子の増幅・検出には LightCycler (ロッシュ)、および ABI-Prism 7300 (アプライドバイオシステム) を使用した。

C. 研究結果

1. XMRV ゲノム定量系の構築

- a. Primer, Prbe の設定: Genbank に登録されている VP62 (DQ399707), VP35 (DQ241301), VP42 (DQ241302), VP62 (EF185282, DQ399707) 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下記 Primer, Probe を設定した。

Forward Primer

ATGTGACTGAGACCTGCACCG (4862-4883)

Reverse Primer

ACTTCCGTGAAATCAACTTCCC
(4982-4960)

Probe

6FAM-TGCGAGTACGCGGACATCGGC-iowaBK
(4926-4947)

VP62 (DQ399707)

- b. 感度検定: 作成した合成スタンダードを使用した感度検定により、10 コピーの標的 RNA および DNA の検出が可能だった。
- c. 交差反応性の検証: XMRV はレトロウイルスに属するため、他のレトロウイルス (HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2) との交差反応性の有無を検証した。その結果、これらのレトロウイルスとの交差反応性は認められなかった。

2. 新規マイコプラズマ検査系の開発

マイコプラズマの検査法は日本薬局法の参考情報に3つの検査法 (培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法、核酸検査法) が記載にされており、再生医療関連指針

ではその方法の使用が推奨されている。

しかし、これらの方法には以下の問題点がある。① 培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法は、煩雑であり、結果がでるまでに長時間を要するため、ロットを形成しない細胞製剤の最終検査法としては不適當、② PCR による検出法は、2 段階増幅後に電気泳動をする方法であり、時間がかかり、それ以上に電気泳動を行うためキャリーオーバーの懸念がある。特にマイコプラズマ汚染が問題となる口腔内由来の生体材料を使用する再生医療のマイコプラズマ検出法としては不適當、③ PCR による検査法は定性的方法であり、定量性がない、④ 例示されているプライマーでは、混入する可能性があるマイコプラズマすべてを検出できない可能性がある。これらの問題点を克服するため、以下のような新しいマイコプラズマ核酸検査法の開発を行った。

1. 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、下記 12 種類の菌種を検査対象として選んだ。

ヒト由来 *M. buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. pirumatum*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *U. urealyticum*,

動物由来 *A. laidlawii*

キャリーオーバーの危険性を低減するため電気泳動なしで結果を得るため、また、擬陽性を排除するためにはプローブ検出を組み合わせる必要があると判断し、リアルタイム PCR 装置を使用し他 1 段 PCR と蛍光プローブを使用した検出を行う方法を採用した。

検査対象菌種を網羅的に検出することができるプライマー・プローブ配列を決定するため、各種マイコプラズマの遺伝子情報を BLAST 解析し、下記のようなプライマー・プローブ配列を設定した。

プライマー
配列

M1	5' taccacagatctccctacga 3'	19 mer
M3	5' tctTcTcAaaacTgAaa 3'	17 mer
M4	5' tctcccacaaacatattaa 3'	21 mer
M6	5' ccaggcctccgcacata 3'	18 mer
M9	5' ctcaatgcatccgaccata 3'	20 mer
M10	5' ctcaatagantccgaccatatagttctctcaaacctggata 3'	41 mer

プローブ

MZ	5' GFAM-accTccttTctcTcAgta-IAMHA 3'	19 mer
M5	5' GFAM-tgaaaaCgaCaaTcttTcTagTtcca-TAMRA 3'	26 mer

大文字はLNA

現在、作製した検査系の感度検定、交差反応性試験などを行っている。

D. 考察

1. XMRV 検査系： XMRV は我が国での感染率を示す疫学的研究報告はいまだなく、我が国で分離されたウイルス株の遺伝子配列は Genbank に未登録である。また、本ウイルスは前立腺がんや慢性疲労症候群への関与が示唆されている段階であり、再生医療実用化に対する検査の重要性は確立されたものではない。しかし、実験的に B および T 細胞への感染性が証明され、他の細胞種に感染性を有する可能性もあるため、XMRV の検査系を確立し、データを蓄積することは重要と考える。現在、陽性コントロール（XMRV 陽性との報告がある前立腺がん細胞株）の分譲を細胞バンクに申請中であり、入手できたら検査系の検定と改良を行っていく予定である。

2. 新規マイコプラズマ検査系： 今回作成した新規マイコプラズマ検査系を実用化するためには、感度検定、交差反応性試験などにより目標とする性能を持つことを確認したうえで、日本薬局法の参考情報に記載されているマイコプラズマ試験と同等以上の性能を持つことを検証していく必要がある。そのためには、代表的菌種を用いた添加回収試験などにより、感度・特異性などを検証する必要があり、今後の課題である。

E. 結論

迅速・高感度・安定的に再生医療材料に混入の可能性があるマイコプラズマを網羅的に測定することを目的に、リアルタイム PCR 機による PCR とプローブを用いた検出を行う新しい核酸検査系を構築

した。また、最近問題となっている XMRV の検査系の作製も行った。今後両検査系の検証作業を行う予定である。

F: 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Nagasawa M, Ogawa K, Nagata K, **Shimizu N**. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol*. 2009 Nov 13. [Epub ahead of print]

2. Yajima M, Imadome KI, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, **Shimizu N**, Yamamoto N, Fujiwara S. T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice. *J Infect Dis*. 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]

3. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, **Shimizu N**, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol*. 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]

4. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo Y-M, Iwamoto K, Yamashita J, Saitoh H, Kameoka Y, **Shimizu N**, Ichinohasama R, Sawada K. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114: 3265 – 3275, 2009.

5. Moriai S, Takahara M, Ogino T, Nagato T, Kishibe K, Ishii H, Katayama A, **Shimizu N** and Harabuchi Y. Production of Interferon- γ -Inducible Protein-10 and Its Role as an Autocrine Invasion Factor in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells. *Clin Cancer Res*. 15(22):6771-6779, 2009 .

6. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N,

Imadome K, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri Y, Okita H, Morio T, **Shimizu N**, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.

7. Imadome 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. *Microbes Infect.* 11(3):429-433, 2009.

8. Ono Y, Terashima K, Liu A, Yokoyama M, Yokoshima K, Mizukami M, Watanabe K, Mochimaru Y, Furusaka T, **Shimizu N**, Yamamoto N, Ishiwata T, Sugisaki Y, Yagi T, Naito Z. Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production *in vitro*. *Pathol.Int.* 59: 332-344, 2009.

国内学会発表

1. 清水一史、渡辺 哲、佐々木 裕、芝田敏克、井口晃史、下平義隆、田中寅彦、黒田和道、清水則夫、山本直樹、山本樹生：重度免疫不全 NOG マウスにおけるインフルエンザウイルス感染：強毒変異ウイルスの出現、第 57 回 日本ウイルス学会 学術集会、2009 年 10 月、東京

2. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、清水則夫、中村浩幸、渡辺哲、寺嶋一夫、山本直樹、藤原成悦：EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析、第 57 回 日本ウイルス学会 学術集会、2009 年 10 月、東京

3. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、山本直樹、藤原成悦：EBV 感染ヒト化 NOG マウスモデルにおける T 細胞応答、第 57 回 日本ウイルス学会 学術集会、2009 年 10 月、東京

4. 塩田節子、林田みどり、平山知子、湯華民、森康子、渡辺健、清水則夫、平田誠、亀岡洋祐、古江（楠田）美保、水澤博、増井徹、小原有広：ヒトヘルペスウイルス-6 (HHV-6) ゲノムが検出されたヒト臍帯静脈内皮細胞由来の細胞株 HUV-EC-C での HHV-6 の存在様式、第 57 回 日本ウイルス学会 学術集会、2009 年 10 月、東京

5. 杉田 直、堀江真太郎、山田由季子、望月 學、渡邊 健、片山未来、清水則夫：感染性眼内炎の眼内液を用いた細菌 Broad-range 定量 PCR システムの有用性の検討、第 113 回日本眼科学会総会、2009 年 4 月、東京

6. 清水則夫、森尾友宏：造血幹細胞移植後微生物モニタリングシステムの改良と普及に向けて、同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有及びドナーとレピシエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究班会議、2009 年 1 月、東京

国際学会発表

1. Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of broad-range quantitative polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. 10th International Ocular Inflammation Society Congress, Prague, 5/30-6/2, 2009.

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

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

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

研究分担者	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
研究協力者	持田讓治	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
	小林広幸	東海大学医学部基盤診療学系臨床薬理学	教授

研究要旨：

東海大学においては医学部と付属病院を橋渡しする形で再生医療の実施体制を構築している。基礎的研究は再生学センター、臨床応用のための細胞処理と品質評価は細胞移植再生医療科セルプロセッシング室、細胞の安全性は細胞移植再生医療科安全性評価室、臨床研究の進捗管理は総合臨床研究センターが担当する形で有機的な連携を図っている。

品質評価システムとしてマウス皮下にヒトの組織を再構築するアッセイ系、安全性管理システムとして各種ウイルスならびにマイコプラズマのリアルタイム PCR アッセイを実施し、発癌性否定試験としてヒト化マウスを用いた少数の細胞による短期間アッセイシステムを開発中である。

すでに進行中の臨床研究の1つである椎間板再生プロジェクトについての臨床研究体制について報告するが、GMP に準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

A. 研究目的

細胞製剤を用いた再生医療においては体外における細胞の調製や培養のプロセスの安全性と品質管理が大きな課題となっている。

東海大学において細胞製剤の安全性の確保と新しい品質評価システムについての検討を行うために、再生医療の基盤整備を行うことを本分担研究の目的とした。

本年度は具体的な臨床研究として椎間板再生プロジェクトを例に取り、臨床研究実施体制とセルプロセッシング部門や安全管理部門の役割を報告する。

B. 研究方法

1. 椎間板再生医療の基盤的研究

2002年に設置された再生医学センターにおいて整形外科学の持田讓治教授・酒井大輔講師を中心とするグループが椎間板の再生に関する基礎的研究を行い、骨髄間葉系細胞(MSC)と髄核細胞を隔膜共培養する形の細胞培養系を開発した。

2. 培養髄核細胞の品質評価

体外で培養した髄核細胞由来の細胞が所期の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、酒井大輔講師が考案した方法(①細胞表面マーカーによる

細胞分化の評価、②コロニー形成法による増殖能力の評価、③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など)にて、付属病院細胞移植再生医療科セルプロセッシング室の加藤俊一室長・中村嘉彦室長補佐らが、などにより品質評価を行っている。

3. 培養髄核細胞の安全性評価

1) 培養細胞の腫瘍形成否定試験

中村雅登教授らは培養細胞の腫瘍形成性否定試験としてヒト化マウスを用いて少数の細胞により短期間でアッセイできる系の開発を試みている。

2) 感染性因子否定試験

安藤潔教授、宮地勇人教授らを中心として、培養細胞中に諸種のウイルス (HBV、HCV、HIV、HSV-1、-2、VZV、CMV、EBV、HHV-6、ParvoB19)、細菌、マイコプラズマなどの感染性因子が混入あるいは増殖していないことを証明するために、リアルタイムPCR法、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン定量測定などを日本薬局方に準じて実施している。

4. 臨床研究

持田讓治教授を中心とする整形外科グループは厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究審査委員会において承認を受け、椎間板再生臨床研究を開始した。

臨床研究の進捗管理については持田讓治教授と総合臨床研究センターの小林広幸教授により行われている。

5. 書類管理

このような品質評価や安全性評価の業務については綿密な研究計画とSOP(作業手順書)に基づいて実施し、その記録は詳細に記述して厳格に保管している。

また、作業工程毎に定められた試料の保存も厳重に行われている。

6. 倫理的事項

本研究は国の定めるヒト幹細胞の臨床研究に該当することから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月制定)に則り、また動物実験に関しては平成17年改正の動物愛護法に基づき適正な実験を行った。

C. 研究結果

1. 椎間板再生臨床研究

椎間板変性疾患患者において体外培養髄核細胞による治療を実施している。主要評価項目は安全性の確認であるが、現在まで問題となる有害事象の発生はない。

2. 品質評価

体外で骨髄間葉系細胞と隔膜共培養された髄核細胞は髄核細胞に特徴的な表面マーカーを維持しつつ旺盛な増殖能力を維持していることがすべての症例において確認された。

3. 安全性の確保

培養前後の検体において検査したウイルス、細菌、マイコプラズマのいずれも検出されず、エンドトキシンも限界以下であり、感染性因子の混入はなかった。

4. 資料と試料の保管

一連の作業工程の資料についてはそれぞれの担当者により作業記録が作成され、作業工程毎に定められた試料の保存も実施された。

このようなGMP準拠の作業と管理には膨大な時間と労力が必要であった。

D. 結論

東海大学でGMP基準に準じて実施されている椎間板再生医療プロジェクトにおける細胞治療の有効性・毒性検証システムについて報告した。GMPに準拠した細胞処理を実施するためには膨大な書類作成と保管を必要とし、管理業務を担当する人員の確保が大きな課題となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

著書

1. 加藤俊一. 日本移植学会の倫理指針. 「腎移植のすべて」(高橋公太編集) 506-509、2009年、メジカルビュー社。

論文発表

1. Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, In

oue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, **Kato S**, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Oct 13.

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

2.Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, **Kato S**, Ishii E. Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Sep 21.

該当なし

3.Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, **Kato S**. Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May 11.

4.Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, **Kato S**, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera Y. Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/ methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15(12):1603-8. 2009.

5.Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, **Kato S**. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 89(3):374-82.2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

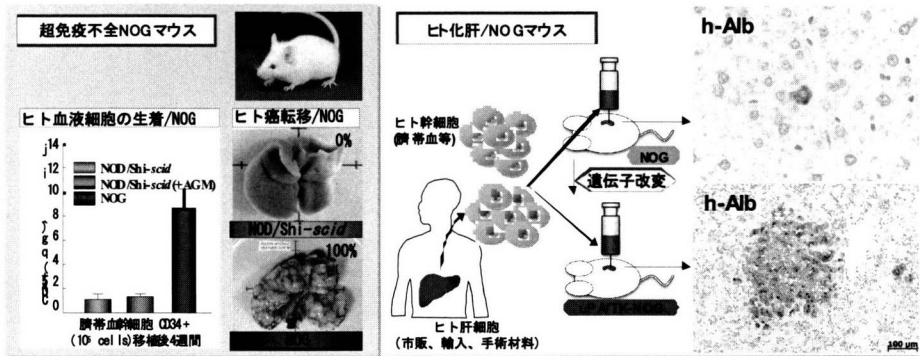
再生医療・細胞医療に用いる細胞の 腫瘍形成否定試験法の開発

(超免疫不全NOGマウスを用いた移植再生医療用細胞の
分化能、癌化否定確認システムの開発)

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)

2009年2月28日

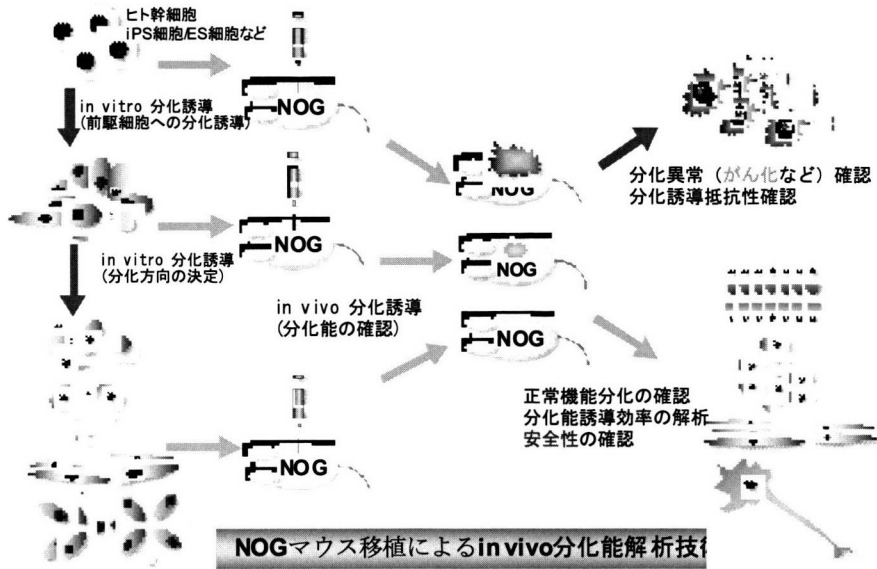
Hu-iPS/NOGマウス



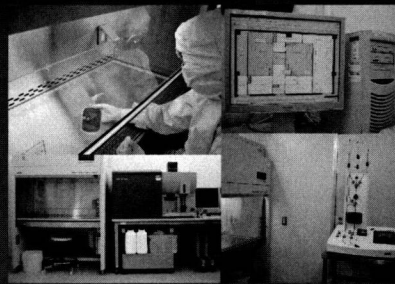
超免疫不全NOGマウスによるヒトiPS細胞などの幹細胞のin vivo分化誘導技術の開発

- ◎ **in vitro** iPS細胞分化誘導技術の確立(どの段階の前駆細胞までの分化誘導が必要か?)
- ◎ **in vivo** iPS細胞分化誘導技術の開発 (ヒト型の機能を再現できるか? In vivo分化誘導は前駆細胞からの終末分化に適している)
- ◎ **PS**細胞由来前駆細胞の非腫瘍性安全性の確認 (少なくとも移植時点で腫瘍性ではないことを確認する)
 - ? 移植細胞数 (少数の細胞で解析できる)
 - ? 短期間での解析 (従来の免疫不全動物移植に比して1/10ぐらいの期間約2週間で判定可能)
 - ? 正常細胞生着性 (適切なin vivo微小環境によって正常細胞が生着する—腫瘍性細胞の検出)

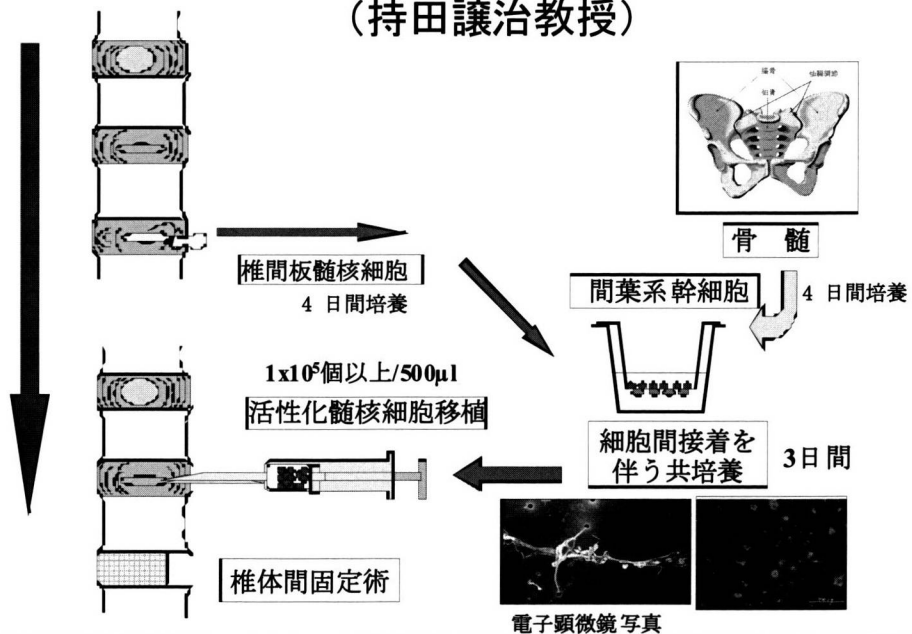
超免疫不全NOGマウスを用いた幹細胞等のin vivo分化能確認解析システムの開発



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
東海大学 椎間板再生医療プロジェクト
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、
八幡 崇、安藤 潔、酒井大輔、持田譲治



椎間板再生プロジェクト
(持田譲治教授)



椎間板再生療法における投与細胞の安全性検査

(東海大学病院 2009. 02. 03より)

1. 受け入れ時検査 (Day0) 採取髄核組織、骨髄液、末梢血
 - 1) カルチャーボトルによる好気性、嫌気性菌の検出
 - 2) Real time PCR法によるマイコプラズマの検出
 - 3) 培養法によるマイコプラズマの検出
2. 中間管理試験 (Day4) 培養髄核細胞上清、培養骨髄液上清
 - 1) カルチャーボトルによる好気性、嫌気性菌の検出
 - 2) Real time PCR法によるマイコプラズマの検出
 - 3) 培養法によるマイコプラズマの検出
3. 投与前日検査 (Day6) 髄核細胞および骨髄MSC混合培養上清
 - 1) 目視による全培養皿の確認
 - 2) 比濁法によるエンドトキシン測定
4. 最終製品検査 (Day7) 上記混合培養上清および細胞洗浄生理食塩水
 - 1) カルチャーボトルによる好気性、嫌気性菌の検出
 - 2) Real time PCR法によるマイコプラズマの検出
 - 3) 培養法によるマイコプラズマの検出
 - 4) 比濁法によるエンドトキシン測定
 - 5) Real time PCR法によるHBV, HIV1, HTLV1, ParvB19NS1, ParvB19VP2, HSV, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, HCV, HTLV1の各ウイルス確認

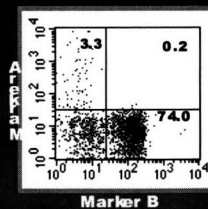
マイコプラズマ、各ウイルスPCR法は神戸先端研内三菱メディエンスより技術指導、またこれらの検査は全て院内にて測定

新しく開発された椎間板再生療法における品質評価法

1. コロニー形成法

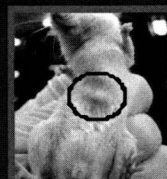


2. フローサイトメトリー法



3. 免疫不全マウスへの移植法

(必要かつ可能な時)



安全性検査結果入手日と投与日の関係(可能な限り投与日までに結果を出すための配慮)

検査項目	検査項目	結果入手時期
受け入れ時検査		
髄核組織	細菌培養 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与1日前 中間報告、最終報告は投与翌日 投与前 投与後3週間
骨髓液	細菌培養 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与1日前 中間報告、最終報告は投与翌日 投与前 投与後3週間
末梢血	細菌培養 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与1日前 中間報告、最終報告は投与翌日 投与前 投与後3週間
中間管理試験		
髄核細胞培養上清	細菌培養 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与1日前 中間報告、最終報告は投与後4日目 投与前 投与後約3週間
培養骨髓上製	細菌培養 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与1日前 中間報告、最終報告は投与後4日目 投与前 投与後約3週間
投与前日検査		
髄核、骨髓混合培養上清	目視検査 比濁法によるエンドキシン検査	投与前 投与前
投与日最終検査		
髄核、骨髓混合培養上清	細菌培養 比濁法によるエンドキシン検査	投与後7日目 投与後半日
投与髄核細胞洗浄液	PCR法ウイルス検査 PCR法マイコプラズマ検査 培養法マイコプラズマ検査	投与後1～2日目 投与後半日 投与後約4週間

椎間板再生療法における使用試薬の 安全性検査

(東海大学病院 2009. 02. 03より)

- 1.DME/F12培地
- 2.Trypsin
- 3.Collagenase
- 4.Dextran
- 5.静注用生理食塩水(陰性コントロールとして)

- 1) カルチャーボトルによる好気性、嫌気性菌の検出
- 2) Real time PCR法によるマイコプラズマの検出
- 3) 培養法によるマイコプラズマの検出
- 4) 比濁法によるエンドキシン測定
- 5) Real time PCR法によるHBV、HIV1、HTLV1、ParvoB19NS1、ParvoB19VP2、HSV、VZV、CMV、EBV、HHV6、HHV7、HHV8、HCV、HTLV1の各ウイルス確認

全ての検査項目が陰性ないしは基準値以内のロットを1症例1ボトルの使い捨てにて使用。

今回の椎間板再生療法におけるCPC室の役割

1. 各種書類の作成
標準作業手順書、品質検査標準書、製品標準書 etc
2. 各種試薬等の安全性情報収集および試薬の発注、管理、安全性検査用サンプルの提出、結果集計
3. 品質検査法および投与細胞の処理、培養法の開発
4. 投与用細胞の処理、培養、各種書類への記録、集計
5. 安全性検査用サンプルの提出、結果回収、記録、集計
6. 各種サンプル(試薬、培養上清、細胞etc)の保存、管理
7. CPC室の維持、管理

椎間板再生療法実施における問題点 (再生医療全般に関係)

1. 安全性検査
投与当日に全ての結果は出ておらず、方法論的な革新、革命が不可欠
……腫瘍化否定試験などはその典型例
2. 経費
全ての費用は研究費から充当
……高度医療への申請等、収入を得る方法の模索が必要
3. 人員
現在、CPCの定員は1名であり、精神的、肉体的負担が大きい
……人件費などを賄う収入が不可欠
4. 資格
細胞培養を行う者の資格制度がなく、責任の所在が不明瞭
……後継者(研究者としての素質も重要)の育成ができない