

200916015A

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業)

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター

運用のための人材育成プロジェクト

(H21- 臨研 (教育) - 一般 - 009)

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 前川 平

平成22(2010)年5月

厚生労働科学研究費補助金

(医療技術実用化総合研究事業)

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター
運用のための人材育成プロジェクト

(H21- 臨研 (教育) - 一般 - 009)

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 前川 平

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

はじめに

セルプロセッシングを伴う再生医療は既に多くの領域で臨床応用が開始され、その有効性も報告されてきている。その安全性を担保するための「ヒト幹細胞を用いる臨床指針」などのルール制定やセルプロセッシングセンター（以下CPC）設立、その運用システムなどの基盤整備は着実に進んでいる。しかしながらCPCを実際に運用する、あるいはCPCを管理運営できる人材の教育システムは現在全く存在せず、個々の施設で独自のルールで教育訓練を行う、あるいはこれすらも行っていない施設すら存在するのが現状である。このことは高品質で安全なセルプロセッシングを要求される再生医療を推進する際の大きな足かせになっている。医薬品と同等の高品質なセルプロセッシングを達成するためには Good Manufacturing Practice(GMP)はもちろんのことであるが、セルプロセッシングそのものも医療行為に直結する Good Clinical Practice(GCP)の知識を併せ持つ必要がある。

本研究課題では医学、細胞生物学教育コースに加えて、GMP, GCP教育プログラムを通して、安全で高品質なセルプロセッシング作業に精通した、再生医療の現場で即戦力となる人材を育成し、再生医療を推進・加速することを目的としたものである。

本研究課題を通じて、わが国における細胞治療・再生治療の開発が発展させてゆくためには、種々の規制やCPCに代表されるソフトやハードのシステムのみでなく、GMP準拠細胞プロセッシングを実施し、CPCを運用してゆく知識と経験をもった人材の育成が喫緊の課題であることを理解していただければと思われる。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成22年5月 主任研究者 前川 平

目次

I. 研究組織	1
II. 平成21年度総括研究報告 前川 平	2
III. 平成21年度分担研究報告書	
1. 青山「間葉系幹細胞の分離・調製手法標準化のための研究」	7
2. 高桑「発癌実験モデルを用いた発癌メカニズムの検討と教育プログラムの作成」	11
3. 伊吹「セルプロセッシングにおける微生物感染経路と品質管理に関する研究」	18
4. 笠井「セルプロセッシングにおける人材育成と運営管理に関する研究」	20
IV. 細胞培養士育成学コース系統講義プログラム関連資料	24
V. 研究成果の刊行物・印刷物	37

I. 研究組織

主任研究者

前川 平 (京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授)

分担研究者

高桑徹也 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・教授)

青山朋樹 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・准教授)

伊吹謙太郎 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・准教授)

笠井泰成 (京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター・主任技師)

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

再生医療実用化を促進するセルプロセッシングセンター運用のための
人材育成プロジェクトに関する研究

主任研究者 前川 平 京都大学医学部附属病院

研究要旨

セルプロセッシングを伴う再生医療は既に多くの領域で臨床応用が開始され、その有効性も報告されてきている。その安全性を担保するための「ヒト幹細胞を用いる臨床指針」などのルール制定やセルプロセッシングセンター（以下 CPC）設立、その運用システムなどの基盤整備は着実に進んでいる。しかしながら、CPC を実際に運用する、あるいは CPC を管理運営できる人材の教育システムは現在全く存在しない。本課題では医学、細胞生物学教育コースに加えて、GMP,GCP 教育プログラムを通して、安全で高品質なセルプロセッシング作業に精通した、再生医療の現場で即戦力となる人材を育成し、再生医療の推進加速に資する事を目的とする。本プロジェクトを推進するにあたり、本年度は GMP,GCP および再生医療の現状に関する講義を実施し、GMP,GCP に関する基礎知識の習熟を行った。

A：研究目的

本研究では医学、細胞生物学教育コースに加えて、GMP,GCP 教育プログラムを通して、安全で高品質なセルプロセッシング作業に精通した、再生医療の現場で即戦力となる人材を育成し、再生医療の推進加速に資する事を目的とする。

B：研究方法

本課題は平成 21 年から 23 年の 3 年間の計画として、京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター、iPS 細胞研究所、人間健康科学科、および神戸先端医療センターで実施する。

（平成 21 年度）

人間健康科学系専攻（学部および大学院

を含む）において細胞育成学コースを設立し、このコース内で基礎細胞生物学、品質検査学、GMP,GCP に関する講習を行う。これらの基本的講習は人間健康科学科および医学部附属病院のほか、京都大学探索医療センターなどの協力を得て行う。

（平成 22 年度）

コース修了者を対象にアドバンストコースとして人間健康科学科で細胞培養実習、品質管理検査実習、CPC 運用講習、GMP 講習、GCP 講習を行い、一定基準をクリアした者を対象に京都大学医学部分子細胞治療センター、iPS 細胞研究所、および神戸先端医療センターにおいて CPC 運用実習、CPC 作業実習を行う。アドバンストコースの GCP 講習は神戸臨床研究情

報センターと連携を取りながら行う。また平成 21 年度と同様に後期日程で講義を行う。

(平成 23 年度)

進行中のシーズに実習生として加わり、各シーズにおけるセルフプロセッシング業務を遂行する。全てのコースを履修し要項を満たした受講者に対して学会(現時点では、日本輸血・細胞治療学会、日本再生医療学会などを想定している)から認定資格を発行する制度を設立する。

(倫理面への配慮)

実施するシーズは全て倫理委員会の審査を行い、「ヒト幹細胞指針」に遵守して行う。倫理教育は本プロジェクトにおける教育プログラム(GCP)において習熟が特に強調される点である。適宜、京都大学医学研究科社会健康医学医療倫理学講座(小杉眞司教授)、「医の倫理委員会」(研究代表者の前川が委員として参画している)、「グローバル COE プログラム」(研究代表者の前川が事業推進担当者として参画している)の協力を得る予定である

C: 研究結果

平成 21 年度は人間健康科学系専攻(学部および大学院を含む)において細胞育成学コースを設立し、このコース内で基礎細胞生物学、品質検査学、GMP,GCP に関する講習を平成 21 年 10 月より計 13 回行った。これらの基本的講習には人間健康科学科および医学部附属病院のほか、京都大学探索医療センター、iPS 細胞研究所の研究を得て実施した。

講義シリーズ終了後、修士学生 1 名、学

部学生 2 名がアドバンストコースとして実習に進む予定である。

D: 考察

今回の人材育成プロジェクトを行ううえで、もっとも重要な GMP,GCP に関する予備知識の習熟の目的は本年度で十分達成できたと考えられる。今後はさらに知識を深めるとともに、実習をベースとした実際の現場作業へと進めていく予定である。

E: 結論

平成 21 年度に予定していた人材育成プロジェクトの初期段階はほぼ達成できた。このため平成 22 年度以降の計画を予定通り実施していく予定である。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

1. 論文発表

1. Yuasa, T., Sato, K., Ashihara, E., Takeuchi, M., Tsuchiya, N., Habuchi, T., Maekawa, T., Kimura, S.: Intravesical administration of $\gamma \delta$ T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol Immunotherapy*, 58(4):493-502, 2009.
2. Koto, K., Horie, N., Kimura, S., Murata, H., Sakabe, T., Matsui, T., Koto, K., Watanabe, M., Adachi, S., Maekawa, T., Fushiki, S., Kubo, T.: Clinical relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett*, 274(2):271-278, 2009.

3. Ashihara, E., Kawata, E., Nakagawa, Y., Shimazaki, C., Kuroda, J., Tanaka, R., Yokota, A., Murotani, Y., Takeuchi, M., Kamitsuji, Y., Inaba, T., Taniwaki, M., Kimura, S., Maekawa, T.: β -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res*, 15(8):2731-2738, 2009.
4. Matsumoto, S., Tanaka, F., Sato, K., Kimura, S., Maekawa, T., Hasegawa, S., Wada, H.: Monitoring with a non-invasive bioluminescent in vivo imaging system of pleural metastasis of lung carcinoma. *Lung Cancer*, 66(1):75-9, 2009.
5. Tsubakimoto, Y., Yamada, H., Yokoi, H., Takata, H., Kawahito, H., Matsui, A., Urano, N., Nozawa, Y., Hirai, H., Imanishi, J., Ashihara, E., Maekawa, T., Takahashi, T., Okigaki, M., Matsubara, H.: Angiotensin AT1 receptor on bone marrow stem cells that regulates monocyte/macrophage lineage differentiation from hematopoietic stem Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(10):1529-1536, 2009.
6. Kaido, T., Egawa, H., Tsuji, H., Ashihara, E., Maekawa, T., Uemoto, S.: In-hospital mortality in adult recipients of living donor liver transplantation: experience of 576 consecutive cases at a single center. *Liver Transpl* 15(11):1420-1425, 2009.
7. Ito, K., Aoyama, T., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Jin, Y., Nasu, A., Ueda, M., Kasai, Y., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Kobayashi, A., Yoshida, S., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow in the closed system using a new device made by non-woven fabrics. *Tissue Engineering* (in press, 2009)
8. Takeuchi, M., Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T. : Dual BCR-ABL/LYN tyrosine kinase inhibitor, INNO-406. □ *Drug of the Future* (in press, 2009).
9. Taniguchi, K., Shimazaki, C., Ochiai, N., Maruya, E., Akatsuka, Y., Ashihara, E., Maekawa, T., Taniwaki, M., Saji, H.: Modified elispot assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens in healthy individuals. *Int J Lab Hematol* (in press, 2009)
10. Ito, K., Aoyama, T., Fukiage, K., Otsuka, S., Furu, M., Jin, Y., Nasu, A., Ueda, M., Kasai, Y., Ashihara, E., Kimura, S., Maekawa, T., Kobayashi, A., Yoshida, S., Niwa, H., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. □ *Tissue Eng Part C Methods* (in press, 2009).
11. Okabe, S., Tauchi, T., Kimura, S., Maekawa, T., Ohyashiki, K.: The efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, against BCR-ABL positive leukemia cells with ABL kinase domain mutation in single therapy and in combination with dasatinib. *Clin Cancer Res*, (in press, 2009)
12. Ohsaka, A., Kikuta, A., Ohto, H., Ohara, A., Ishida, A., Osada, K., Kimitamari, A., Iwai, A., Kai, T., Maekawa, T., Hoshi, Y.: Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. *Transfusion* (in press, 2009)
13. Tada, N., Hinotsu, S., Urushihara, A., Kita, F., Kai, T., Takahashi, S., Kato, S., Takanashi, M., Ito, K., Sawai, H., Maekawa, T., Kosugi, S., Kawakami, K.: The current status of umbilical

- cord blood collection in Japanese medical centers: survey from the obstetricians Int J Hematol (in press, 2009)
14. Yokota, A., Kimura, S., Tanaka, R., Takeuchi, M., Yao, H., Sakai, K., Nagao, R., Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kawata, E., Ashihara, E., Maekawa, T.: Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. Leuk Res. (in press, 2009)
 15. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Kato T, Matsui A, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H.: Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 α Arterioscler Thromb Vasc Biol. (in press, 2009)
 16. Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, Kimura S, Maekawa T, Hasegawa S, Wada H: Monitoring with a non-invasive bioluminescent *in vivo* imaging system of successful treatment of disseminated pleural tumors by intra-pleural docetaxel administration. □ Lung Cancer (in press, 2009).
 17. Sekimoto, M., Imanaka, Y., Shirai, T., Sasaki, H., Komeno, T., Lee, J., Yoshihara, K., Ashihara, E., Maekawa, T. : Risk-adjusted assessment of incidence and quantity of blood use in acute-care hospitals in Japan: an analysis using administrative data. Vox Sanguinis (in press, 2009)
 18. Ashihara, E., Kawata, E., Maekawa, T.: Future prospect of RNA interference for cancer therapies. Curr Drug Targets. In press, 2009 Dec 8. [Epub ahead of print]
 19. Takeuchi, M., Kimura, S., Kuroda, J., Ashihara, E., Kawatani, M., Osada, H., Umezawa, K., Yasui, E., Imoto, M., Tsuruo, T., Yokota, A., Tanaka, T., Nagao, R., Nakahata, T., Fujiyama, Y., Maekawa, T.: Glyoxalase-I induction during hypoxia adaptation in Bcr-Abl positive leukaemic cells. Cell Death Diff (in press, 2010)
 20. 万木紀美子、前川 平 : IV. 血液製剤. 2) 輸血療法の実際. 総合臨床第 58 巻増刊号「今すぐに役立つ 輸液ガイドブック」、永井書店、大阪、58:390-398, 2009.
 21. 八尾尚幸、芦原英司、前川 平 : 支持療法ー輸血・成分輸血、Epo, G-CSF などー. 特集「骨髓性白血病ー病因・治療研究の進歩」、日本臨床 67 (10) :1951-1957, 2009.
 22. 笠井泰成、前川 平 : 細胞プロセッシングセンター. 遺伝子 MOOK 別冊「歩みつづける細胞移植療法の実際?再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解ー」、メディカル ドウ、大阪 . (印刷中)
 23. 八尾尚幸、前川 平 : 造血器腫瘍治療における輸血療法の適応は?. 特集「支持療法・輸血」. EBM 血液疾患の治療 2010-2011:493-497, 2009.
- ## 2. 学会発表
1. Maekawa, T.: Molecular target and cellular therapeutics developed in the department of transfusion medicine and cell therapy. MD Anderson Cancer Center & Kyoto Univ. Grad. School of Medicine International Symposium 2009 (Kyoto University Alumni Hall, Kyoto, Japan) (22nd March, 2009)
 2. Ikeguchi R, Kakinoki R, Aoyama T, Goto K, Maekawa T, Nakamura T, Toguchida J: Clinical application of bone marrow stromal cells to avascular necrosis of the femoral

head combined with vascularized iliac bone graft. American Society for Reconstructive Microsurgery, Annual scientific meeting (Maui, Hawaii, USA) (Jan. 12, 2009)

3. 伊藤錦哉、青山朋樹、吹上謙一、大塚聖視、金永輝、那須輝、上田路子、笠井泰成、木村晋也、前川平、小林明、吉田進也、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也. 骨髄間葉系幹細胞分離法デバイスの開発. 第8回日本再生医療学会総会 (東京) 平成21年3月6日 (2009)
4. 前川平: 細胞治療・再生治療とは一研究成果を患者さんに届けるために今何が必要かー (特別講演) 臨床検査展開学細胞育成士養成プロジェクトセミナー「細胞治療の最先端とそれを支える細胞治療センターの役割」(京都) 平成21年10月14日(2009)
5. 松岡玲子、片上幹子、笠井泰成、芦原英司、前川平: 細胞治療・再生治療の開発に必要な細胞プロセッシングセンターに

おける課題. □第53回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (京都) 平成21年11月28日 (2009)

6. 片上幹子、松岡玲子、笠井泰成、芦原英司、前川平: 治療用ヒト細胞の品質管理に必要なエンドトキシン測定時の反応阻害軽減を目的とした前処理方法の検討. □第53回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (京都) 平成21年11月28日 (2009)

H: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：間葉系幹細胞の分離・調製手法標準化のための研究

分担研究者 青山朋樹 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 准教授

研究要旨

間葉系幹細胞は臨床応用が進んでいる幹細胞の一つであるが、その分離・調製方法に標準化されたものはない。本研究の目的は間葉系幹細胞を分離および調製する際の標準化を目的としている。株式会社カネカとともに開発した間葉系幹細胞分離デバイスは高い間葉系幹細胞分離能、簡便、短時間処理可能という特性を持つが今回はこのデバイスの安全性に主眼をおいて解析を行った。この結果、デバイスで分離した間葉系幹細胞の染色体、メチル化、造腫瘍性に危惧する問題点はなく、少数例ではあるが安全性が示された。今後、間葉系幹細胞分離・調製手法を確立することで標準化された細胞調製が可能になり、この手法を実習を通して教育訓練することで GMP グレードのセルプロセッシングおよび再生医療を促進するものと考えられる。

A: 研究目的

間葉系幹細胞は体性幹細胞の中で臨床応用が最も進んでいる幹細胞の一つであるが、その分離・調製方法に標準化されたものはない。本研究の目的は間葉系幹細胞を分離する際の標準化を目指して間葉系幹細胞分離デバイスの開発、医療機器としての安全性を確認し、間葉系幹細胞分離・調製手法の標準化を目的としている。

B: 研究方法

2名の被検者から供与された骨髄から間葉系幹細胞分離デバイス(株式会社カネカ製造)と従来最も行われているフィコールを用いた密度勾配遠心法により分離した間葉系幹細胞を比較した。

検討項目は以下の通りである。

- ・ 染色体検査(ギムザ染色およびFISH法)
- ・ p16 転写調節領域のメチル化検出
- ・ 免疫不全マウス(NOD-SCID mouse)皮下接種による造腫瘍試験

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認(E-312)を受け、被検者の同意を得て行われた。

また動物実験は京都大学動物実験委員会の承認(P-18-5)を受けて行われた。

C: 研究結果

2例の骨髄から間葉系幹細胞分離デバイス(デバイス法)とフィコール密度勾配遠心法(フィコール法)を用いて間葉系幹細胞を分離した。分離された総有核細胞数は

デバイス法(骨髄 1 : 1.08×10^8 個、骨髄 2 : 6.15×10^7 個)、フィコール法(骨髄 1 : 6.00×10^6 個、骨髄 2 : 1.81×10^7 個)とデバイス法の方が分離効率が良く、手技によるばらつきも少なかった。分離された間葉系幹細胞を培養し、染色体検査(ギムザ染色、FISH 法)、p16 メチル化検出法、免疫不全マウスにおける造腫瘍試験を実施した結果、デバイス法とフィコール法で調製した間葉系幹細胞はどちらにおいても異常を認めなかった。

D: 考察

間葉系幹細胞分離デバイスは簡便で、短時間(デバイス使用; 10 分以内、フィコール; 50 分)で間葉系幹細胞を分離できる特性を持つ。最も行われているフィコール法は細胞毒性も惹起し、分離後の細胞増殖速度が低下する。これらの観点から間葉系幹細胞分離デバイスは簡便でより安全に細胞分離が可能である。今回の検討により少数例ではあるが間葉系幹細胞を分離するデバイスとして有用であり、安全である事が示された。今後検討数を増やすことで安全性を確認し、今回の分離、調製手法に沿った細胞培養実習を行うことで間葉系幹細胞の分離・調製手法の標準化とともに細胞製造者の育成にも資すると考えられる。

E: 結論

間葉系幹細胞分離デバイスは安全に細胞分離ができ、今後間葉系幹細胞の分離において標準的な手法と成り得る可能性があり、セルプロセシングの標準化、再生医療促進に資すると考えられる。

F: 健康危険情報
なし

G: 研究発表

1. 論文発表

- 1) 青山朋樹、戸口田淳也. 間葉系幹細胞幹細胞の分化誘導と応用. 2009.2.20; pp55-61.
- 2) 青山朋樹、戸口田淳也、中村孝志. 間葉系幹細胞を利用した大腿骨頭無腐性壊死の再生医療技術 幹細胞の分化誘導と応用. 2009.2.20; pp262-267.
- 3) Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T, Toguchida J. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by non-woven fabric. Tissue Eng Part C Methods. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(1):81-91.
- 4) Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 391(3):1471-6.

2. 学会発表

- 1) Ryosuke Ikeguchi, Ryosuke Kakinoki,

- Tomoki Aoyama, Koji Goto, Taira Maekawa, Takashi Nakamura, Junya Toguchida. Clinical application of bone marrow stromal cells to avascular necrosis of the femoral head combined with vascularized iliac bone graft. American society for reconstructive microsurgery ,Annual scientific meeting 2009.1.7-1.13 Maui, Hawaii, USA.
- 2) 伊藤錦哉、青山朋樹、吹上謙一、大塚聖視、金 永輝、那須 輝、上田路子、笠井泰成、木村晋也、前川 平、小林 明、吉田進也、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也. 骨髓間葉系幹細胞分離法デバイスの開発. 第8回日本再生医療学会総会 2009.3.5-3.6 東京都.
- 3) 戸口田淳也、青山朋樹、中村孝志. 標準的評価法を目指した間葉系幹細胞のエピゲノム変異解析. 第8回日本再生医療学会総会 2009.3.5-3.6 東京都.
- 4) 青山朋樹、大塚聖視、布留守敏、伊藤錦哉、金 永輝、那須 輝、丸山隆幸、金治敏也、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也. プロスタグランジン E2 は EP2 受容体を介して In Vivo においても軟骨修復を促す. 第22回 日本軟骨代謝学会 2009.3.6.-3.7 名古屋市.
- 5) Yonghui Jin, Tomohisa Kato, Moritoshi Kato, Akira Nasu, Yoichiro Kajita, Hiroto Mitsui, Michiko Ueda, Tomoki Aoyama, Junya Toguchida. The effect of hypoxia on proliferation and differentiation properties of human bone marrow stromal cells. 7th Annual Meeting ISSCR 2009.7.8-11. Barcelona, Spain.
- 6) Akira Nasu, Tomohisa Kato, Sakura Tamaki, Kazuo Hayakawa, Hiroto Mitsui, Tomoki Aoyama, Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka, Junya Togichida. Reverse differentiation and redifferentiation of bone marrow stromal cells containing mesenchymal stem cells. 7th Annual Meeting ISSCR 2009.7.8-11. Barcelona, Spain.
- 7) 柿木良介、池口良輔、中山 憲、山川知之、青山朋樹、戸口田淳也、中村孝志. 骨髓幹細胞移植した血管茎含有チューブでのイヌ尺骨神経30の架橋実験—自家神経移植との比較—. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5-6. 横浜市.
- 8) 金 永輝、加藤友久、布留守敏、伊藤錦哉、那須 輝、上田路子、青山朋樹、中村孝志、戸口田淳也. 骨髓間質細胞の増殖、分化に対する低酸素培養の効果. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5-6. 横浜市.
- 9) 那須 輝、加藤友久、玉置さくら、早川和男、青山朋樹、大塚隆信、中村孝志、戸口田淳也. 間葉系幹細胞と人工多能性幹細胞由来間葉細胞の比較検討による間葉系分化機構の解析. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009.11.5-6. 横浜市.
- 10) 青山朋樹、岡本健、吹上謙一、大塚聖視、布留守敏、伊藤錦哉、金永輝、上田路子、長山聡、中山富高、中村

孝志、戸口田淳也. Reversible down-regulation of cartilage-specific gene, chondromodulin-I, in mesenchymal cells and tissues by intrinsic histone modifiers, YY1 and p300. 第32回日本分子生物学会年会 2009.12.9-12. 横浜市.

11) 青山朋樹、前川平、中村孝志、戸口田淳也. 骨髄間葉系幹細胞を用いた骨壊死の治療. 第1回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会. 2010.1.15. 京都市.

12) 青山朋樹、中村孝志、戸口田淳也. 間

葉系幹細胞を用いた臨床応用 (シンポジウム). 第9回日本再生医療学会総会. 2010.3.18-19. 広島市.

13) 青山朋樹. 再生医療を促進する基盤作り—人材育成と機器開発—. 第1回 TRC 定例報告会. 2010.3.27. 京都市.

H: 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案特許

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：発癌実験モデルを用いた発癌メカニズムの検討と教育プログラムの作成

分担研究者 高桑徹也 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 教授

研究要旨

セルプロセッシングを伴う再生医療は多くの領域で臨床応用が開始され、その有効性も報告されてきている。細胞治療に用いた細胞からの発癌、特に細胞維持、管理の際に起こりうるウイルス感染による発癌は再生医療を実施するうえで大きな脅威になる。本研究では、ウイルス発癌実験モデルである SL/Kh マウスを用いて、ウイルス感染に伴う初期の変化を分子生物学的に検討し、リンパ腫発症との関連を検討した。本研究で得られた知見は発癌メカニズムの解明に奇与するばかりでなく、発癌における初期変化を捉えることができることから、迅速検査の開発に貢献すると考えられる。

また本プロジェクトにおける必要な柱である教育プログラムを作成するため、京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻の修士課程において「細胞培養士育成コース」を開設した。

A: 研究目的

<目的 1.> マウス発癌実験モデルを用いた発癌メカニズムの検討

SL/Kh マウスは SL/Am、SL/Ni、SL/Qdj、SL/Kh、の 4 つのファミリーからなる SL ファミリーのひとつで proto-SL、AKR を progenitor とする近交系マウスである。SL ファミリーはスイスのアウトブレッドの 2 匹のアルビノマウスから発生した系統マウスでそれぞれリンパ腫を自然発症する。SL/Kh マウスは生後約半年で、その個体の 90%以上が B 細胞芽球型リンパ腫を自然発症するマウスである。フローサイトメトリーで汎細胞抗原 B220 と前駆細胞抗

原 BP-1 の 2 つの細胞表面抗原を発現していることから B 細胞芽球型リンパ腫であると言える。このマウスは遺伝的に内在性マウス白血病レトロウイルスのひとつである AKV-1 の挿入を獲得している。これまでのサザンブロット(SB)解析で、このマウスは遺伝的に少なくとも 7 カ所への内在性マウス白血病レトロウイルス (MuLV) の挿入を獲得していると推察されている。

一般にレトロウイルスは自身のゲノムを宿主細胞ゲノム内へと挿入することによって安定した感染を成立させる。感染後は、挿入ウイルスゲノムの末端に存在するエンハンサーまたはプロモーターによって挿入部位近傍に存在する宿主側遺伝子

の転写活性化を誘導する。挿入部位近傍の遺伝子がプロトオンコジーンであれば感染細胞の増殖を誘導し腫瘍化が引き起こされることが知られている。

SL/Kh マウスにおけるリンパ腫発症機序は、遺伝的に獲得しているプロウイルス由来のレトロウイルスが骨髄内 B 前駆細胞に感染し、そのゲノムが宿主細胞ゲノム内へと再挿入する後天的な体細胞性の挿入に起因した癌遺伝子活性化による発症の可能性が考えられている。

本研究では、(1)この genomic DNA 内の MuLV の挿入部位を特定し、その挿入が近傍遺伝子に影響を与えているか、それがリンパ腫の発症と関連があるかを検討すること、(2) SL/Kh マウスにおけるリンパ腫発症において、宿主ゲノム内への挿入に起因した癌遺伝子活性化の可能性を検討した。

<目的 2.> 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻における教育プログラムの作成

B: 研究方法

<研究方法 1>

(1) genomic DNA 内の AKV-1 の挿入部位の同定

マウス genome を制限酵素で切断し、セルフライゲーション後、インバース PCR 法を用いて挿入部の増幅を行った。得られた PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスを行い、データベースと比較検討した。

(2) プロウイルス挿入部位の同定

pre-B リンパ腫を発症した SL/Kh マウス個体のリンパ腫組織由来の RNA を用い、RT

後 Inverse PCR 法により AKV-1 の挿入部位の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を受けて行われた。

<研究方法 2>

本プロジェクトにおいては GMP, GCP 教育、品質管理法、安全性を脅かす危険因子、再生医療の実際などの系統的な講義プログラムの作成が必要である。このため京都大学医学部付属病院と連携し、教育プログラムの作成を行った。

C: 研究結果

<研究結果 1>

(1) genomic DNA 内の AKV-1 の挿入部位

a: 染色体 2H2 上で、挿入部位からセントロメア側に 10761 base のところに遺伝子、Commd7 が存在した。Commd7 は全長約 14Kbp で 7 個の Exon を持つ遺伝子である。COMM domain は NF- κ B の規制と、銅代謝の調整を行っている MURR1 と相同性がある。

b: 染色体 15F1 上で、挿入部位からテロメア側に 5646 base のところに遺伝子、olfr234 が存在した。olfr234 は全長 522bp の遺伝子であり、臭いの感知に関係する受容体をコードしている。

c: 染色体 7A1 上で、遺伝子 Gltscr1 の第 5 イントロン領域に MuLV の挿入部位が存在した。Gltscr1 は全長 28Kbp で 14 個の Exon を持つ遺伝子で、乏突起膠腫の発症に関係しているが、詳しい機能はよくわかっていない。ヒトでは脳、肝臓など主要臓器に発現していることが報告されている。

d: 染色体 1A5 上で挿入部位からテロメア側に 42718 base のところに遺伝子、Smad1 が存在した。Smad1 は全長 75Kbp で 10 個の Exon を持つ遺伝子である。骨髄の stromal 細胞の表面分子をコードしており、赤血球産生に関係していると考えられている。

これらのうち Gltscr1 は遺伝子内に MuLV の挿入部位が認められたことから、MuLV 挿入が Gltscr1 の発現に影響を及ぼしているかどうかを検討した。RT-PCR 法を用いた定性的検討では BALB/c マウスの脳、腎臓、肝臓、脾臓で遺伝子の発現が認められた。SL/Kh マウスの脳、脾臓でも同様に発現が認められた。このことから、マウスにおいても Gltscr1 は主要臓器でヒトと同様に発現していると考えられた。次に、Gltscr1 の発現を MuLV 挿入部位の 5' 側（上流）、3' 側（下流）に分けて定量的に検討した。上流では、BALB/c マウスの脾臓、SL/Kh マウスの脳、脾臓、リンパ腫で発現が検出できたものの、BALB/c の脳では発現が検出できなかった。下流では SL/Kh マウスのリンパ腫で微弱な検出ができたものの、検討した他の sample では検出できなかった。コントロールとして用いた BALB/c マウスでの発現が検出できなかったので、MuLV 挿入による影響を判断するには至らなかった。

(2) プロウイルス挿入部位の同定

AKV-1 の挿入好発部位としてはこれまで Stat5a、Evi3、c-myc、N-myc、Stat5b などが同定されているが、今回新たにマウス第 7 染色体上の癌遺伝子 Hras1 の exon1 および intron1 領域が挿入好発部位であることが明らかになった。挿入部位は近接する 3

か所に限定されており、同部位への AKV-1 挿入はリンパ腫を発症した SL/Kh マウス 130 個体中 7 個体(5.4%)で認められた。

挿入部位は遺伝子 Hras1 のタンパク翻訳領域の上流に位置しており、翻訳されるタンパクは欠損や変異のない機能的なタンパクであると考えられる。AKV-1 挿入ありの個体において遺伝子 Hras1 および融合遺伝子の発現の有無を検討したところ、検討したすべての個体で遺伝子 Hras1 の発現が認められた。融合遺伝子は検討した 4 個体中 2 個体で遺伝子 Hras1 の intron1 領域の一部がスプライシングされた mRNA の発現が認められた。スプライシング部位は AKV-1 挿入部位によらず共通していた。

遺伝子 Hras1 への AKV-1 の挿入によるマウス宿主への影響を評価するため、AKV-1 挿入ありの個体と挿入なしの個体を用いて遺伝子 Hras1 およびタンパク Hras1 の発現量を検討した。遺伝子およびタンパク Hras1 の発現量は AKV-1 挿入ありの個体で高く、タンパク発現の上昇は有意であった(P=0.0038)。

<研究結果 2>

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻の修士課程において「細胞培養士育成コース」を開設し、計 13 回の系統講義プログラムを作成した。

構成は再生治療、細胞治療の総論、GMP に準拠した CPC 運営方法、新規治療に対する GCP 教育、安全性を脅かす感染症とそのルートに関する教育に加えて、現在実施されている再生医療の実際例から今後の再生医療の展望までとした。平均 35 名

の参加者を得ることができた。

D: 考察

<考察 1>

(1) **genomic DNA 内の AKV-1 の挿入部位**
ヒトの GLTSCR1 は脳、心臓、胎盤、骨格筋、膵臓で発現が高く、肺、肝臓、腎臓では発現が低いことが報告されている。マウスでは臓器別の発現に関する報告は発表されていない。今回の研究で、RT-PCR 法を用いた定性的研究では、BALB/c マウスでは、脳、肝臓、腎臓、脾臓で発現が RT-PCR 法を用いて確認できた。AKR/J マウスでは脳と脾臓で発現が確認できた (3 個体)。SL/Kh マウスでは脳 (1 個体)、脾臓 (5 個体) で発現が確認できた。これらのことから遺伝子 *Gltscr1* はマウスでもヒトと同様に主要臓器で発現していると考えられる。BALB/c マウスの脳については RT-PCR 法では発現は確認できたが、Probe A を用いた定量的検討では *Gltscr1* の発現は検出できなかった。内在性コントロールである β -actin の発現はこの条件で確認ができていたので、sample 調整時や定量時の技術的な問題ではないと考えられる。*Gltscr1* の Exon1-2 での遺伝子の発現は従来微量で、リアルタイム PCR 法の感度以下であった可能性が考えらる。

Probe P を用いた *Gltscr1* の発現量の定量は、SL/Kh マウスのリンパ腫で微弱な発現を検出した以外は、今回検討した sample 全て検出できなかった。その理由として、Probe P に問題がある可能性や、*Gltscr1* の MuLV 挿入部位より下流の Exon が従来ほとんど発現していない可能性が考えられる。今後は *Gltscr1* の MuLV 挿入部の下流

の Exon について新たな Probe を設定して発現を検討するとともに、より多くの症例を対象として *Gltscr1* の発現量を検討すること、また、タンパクの発現を検討することは必須であると考えられた。

Gltscr1 内への MuLV 挿入がリンパ腫の発症と関係するかどうかは引き続き検討する必要があると考えられた。

(2) プロウイルス挿入部位の同定

SL/Kh マウスにおけるリンパ腫発症機序は、遺伝的に獲得しているプロウイルスの後天的な体細胞性の挿入に起因した癌遺伝子活性化による発症の可能性が考えられている。このような観点から同マウスにおける AKV-1 挿入部位の同定が試みられ、これまでに *Stat5a*、*Evi3*、*c-myc*、*N-myc*、*Stat5b* などが同定されている 5)。AKV-1 挿入の割合はそれぞれ、5.8%、75%、5%、5%、2%未満、である。今回 genomicDNA を精製した SL/Kh マウス全 130 個体において、*Hras1* 遺伝子の exon1 および intron1 領域への AKV-1 挿入が認められたのは 7 個体(5.4%)であった。挿入の割合としては *Stat5a*、*c-myc*、*N-myc* と同程度であり *Stat5b* よりも高いことから、同部位は SL/Kh マウスにおいてリンパ腫発症時にみられる AKV-1 挿入好発部位のひとつであると考えられる。

Hras1 遺伝子は RAS ファミリーのひとつであり、マウス第 7 染色体上の遺伝子である。その構造は全長 3Kbp 程度で 5 つの exon からなっている。また、開始コドンは exon2 上に位置している。機能としては、細胞膜の内側に存在する GTP 結合型タンパクをコードする。このタンパクは下流の細胞内シグナル伝達因子である Raf-1 を活

性化し、その結果 MEK1/2、ERK1/2 からなる MAP キナーゼ経路を活性化する 6)働きをもつ。このことから RAS 遺伝子は、細胞の分化増殖に関わるシグナル伝達を調整する働きをもつ癌遺伝子として知られている。

今回 AKV-1 の挿入した個体では、挿入好発部位は Hras1 遺伝子のタンパク翻訳領域の上流であった。HeLa 細胞株コントロールや挿入なしの個体と比べて、発現しているタンパクの泳動距離に差がことから、発現しているタンパクに欠損や変異がなく、挿入部位から検討すると翻訳される Hras1 タンパクは機能的であると考えられる。Hras1 遺伝子への挿入が見られた個体で、Hras1 タンパク発現の上昇が。一般にレトロウイルスは自身のエンハンサーまたはプロモーターによって宿主側遺伝子の転写活性化を誘導する 3)ことが知られており、Hras1 遺伝子が AKV-1 のプロモーターによって発現していることから、タンパク発現の上昇は AKV-1 挿入によるものであると考えられる。このタンパク発現の上昇が、リンパ腫を発症した SL/Kh マウスにおいてその発癌の機序に何らかの関連性があるのではないかと考えられる。AKV-1 は宿主ゲノムへ挿入すると LTR 上 U3 領域末端配列(AATGAAA)の AA 配列および U5 領域末端配列(TTTCATT)の TT 配列が取り除かれることが知られている。今回 AKV-1 の挿入した個体でマウスとの結合部位の塩基配列を解析したところ U5 領域末端配列の TT 配列が取り除かれていた。これは AKV-1 の挿入時にみられる現象に合致している。しかし、U3 領域末端配列の AA 配列が取り除かれていることを確

認することはできなかった。

また、今回の検討は Hras1 遺伝子の exon1 および intron1 領域に絞った AKV-1 挿入の検討であり、Hras1 遺伝子の exon2 より下流への AKV-1 挿入を評価していない。同遺伝子における他領域への挿入を検討することは今後の課題である。

<考察 2>

今回の系統講義による教育プログラムで再生医療の基礎教育は達成されたと考えられる。今後はこれらの系統講義の内容をさらに深め、実習を行うことでより実務作業に即した教育プログラムを作成する必要がある。

E: 結論

<結論 1>

1. SL/Kh マウス genome 内の MuLV 挿入部位を検索し、染色体上の合計 4 か所(1A5、2H2、7A1、15F1) の挿入部位を特定した。このうち 7A1 では、Gltscr1 の第 5 インtron領域に MuLV 挿入部位が特定できた。
2. Gltscr1 の発現を MuLV 挿入部位の 5'側 (上流)、3'側 (下流) に分けて定量的に検討した。上流では、BALB/c マウスの脾臓、SL/Kh マウスの脳、脾臓、リンパ腫で発現が検出できたものの、BALB/c の脳では発現が検出できなかった。下流では SL/Kh マウスのリンパ腫で微弱な検出ができたものの、他の sample では全て検出できなかった。コントロールとして用いた BALB/c マウスでの発現が検出できなかったので、MuLV 挿入による影響を判断するには至らなかった。
3. 癌遺伝子 Hras1 の exon1 および intron1

領域は SL/Kh マウスにおいてリンパ腫発症時にみられる AKV-1 挿入好発部位のひとつと考えられる。AKV-1 挿入が見られた SL/Kh マウスにおいて Hras1 タンパクの発現上昇がみられた。Hras1 タンパクの発現上昇は AKV-1 の挿入による影響であると考えられ、リンパ腫を発症した SL/Kh マウスにおいてその発癌機序に何らかの関連性があるのではないかと考えられる。

本研究で得られた知見は発癌メカニズムを明らかにし、迅速検査による早期発癌過程を同定する事に貢献できると考えられる。

<結論 2>

系統講義による教育プログラムは再生医療の基礎教育の習熟には有効であった。今後は実習を伴う、より現場に即した教育プログラムの作成が必要である。

F: 健康危険情報
なし

G: 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuruyama T, Imai Y, Takeuchi H, Hiratsuka T, Maruyama Y, Kanaya K, Kaszynski R, Jin G, Okuno T, Ozeki M, Nakamura T, Takakuwa T, Manabe T, Tamaki K, Hiai H.. Dual retrovirus integration tagging: identification of new signaling molecules Fiz1 and Hipk2 that are involved in the IL-7 signaling pathway in B lymphomas, *J Leukoc Biol.* in press
- 2) Kaszynski RH, Akatsuka S, Hiratsuka T, Jin G, Ozeki M, Okuno T, Nakamura T,

Manabe T, Takakuwa T, Hiai H, Toyokuni S, Tamaki K, Tsuruyama T. A quantitative trait locus responsible for inducing B - cell lymphoblastic lymphoma is a hotspot for microsatellite instability. *Cancer Sci*, 2010; 101(3): 800-5

3) Oji Y, Kitamura Y, Kamino E, Kitano A, Sawabata N, Inoue M, Mori M, Nakatsuka S, Sakaguchi N, Miyazaki K, Nakamura M, Fukuda I, Nakamura J, Tatsumi N, Takakuwa T, Nishida S, Shirakata T, Hosen N, Tsuboi A, Nezu R, Maeda H, Oka Y, Kawase I, Aozasa K, Okumura M, Miyoshi S, Sugiyama H. WT1 IgG antibody for early detection of nonsmall cell lung cancer and as its prognostic factor. *Int J Cancer*. 2009;125(2):381-7.

4) Takakuwa T, Miyauchi A, Aozasa K. Aberrant somatic hypermutations in thyroid lymphomas, *Leukemia Research* 2009 ;33(5):649-54.

2. 学会発表

- 1)丸山泰弘、高桑徹也、他：B-lymphoblastic lymphoma (B-LBL) を自然発症する SL/Kh マウスにおける内因性レトロウイルスの特定、第6回日本病理学会カンファレンス 2009.7.31,つくば市
- 2) 金谷和哉、高桑徹也、他：SL/Kh マウスにおけるプロウイルス挿入に伴う癌遺伝子 Hras1 の発現異常の解析、第6回日本病理学会カンファレンス 2009.7.31,つくば市
- 3) 高桑徹也、他：甲状腺リンパ腫における ASHM の検討、第68回日本癌学会、2009.10.1.横浜市