

201006006A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成23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	13
	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	23
	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	29
	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)	
	佐藤正人 (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	33
	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)	
	野島清子 (国立感染症研究所・血液安全性研究部)	
5.	細胞治療製剤の無菌試験の判定自動化の試みとバリデーション	37
	伊藤仁也 (先端医療センター細胞管理室(現 神鋼病院細胞治療室))	
6.	マイコプラズマ抗原刺激によるヒト骨膜細胞への影響	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)

関根 優 (新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター)

藤本 陽子 (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.....46

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)

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(現 神鋼病院細胞 治療室)	室 長 教 授
	中田 光 吉江 弘正	新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 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 讓治	東海大学医学部外科学系整形外科学	教 授
	佐藤 正人	東海大学医学部外科学系整形外科学	准 教 授
	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
	水谷 哲也	国立感染症研究所ウイルス第一部	主任研究官
	野島 清子	国立感染症研究所血液安全性研究部	研 究 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
	関 根 優	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
	藤本 陽子 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 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 准 教 授

事務局	森尾 友宏 星川あき子	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 事務補佐員
経理事務 担当者	増田 晴彦	〒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: haruhiko.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  
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  
総括研究報告書

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活達病態学分野 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

開発したウイルス測定系は、技術移転した。その結果試薬調製については外部委託可能になり、検査についても外部施設に発注することが可能となった。日本薬局方記載の手法が煩雑なマイコプラズマの検出については、複数のプライマーとプローブを用いる高感度なマルチプレックスPCR系を立ち上げ、長期的には体外診断薬承認に向けて検討を開始した。これらの手法を用いて投与細胞免疫担当細胞、培養口腔粘膜・骨膜細胞・軟骨細胞・髄核細胞において測定を行った。未知のウイルスにはRapid determination system of viral RNA/DNA sequences (RDV法)を、培養T細胞で実施中であり、また次世代シーケンサーを用いた検査系の有用性も明らかにした。さらに簡便な細菌・真菌検出系として、BacT/ALERTシステムのバリデーションをおこなった。

(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損傷修復反応を検出分子を拡大して検討下。実際には、ATM、p53のリン酸化、p21、gammaH2AX、AID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し、辺縁以外の細胞でのリン酸化ATMの発現や、リン酸化p53の検出は強力な増殖刺激、変異刺激の際にのみ検出されることを明らかにした。

(3)標準細胞規格検証システムの開発

Luminex法により、培養骨膜(増殖良好群、不良群、PMA刺激群)の培養上清で、多項目の生理活性物質を測定した。その結果、不適格な細胞培養上清にて検出されるサイトカインを明らかにした。

(4)細胞毒性・有効性検証システム

免疫不全マウスへの移植系は、目的組織構築確認、組織構築に必要な細胞群の同定、及び腫瘍化の否定において重要であり、既に方法は確立された。本年度はさらに培養細胞にマイコプラズマ感染させ、発現するmRNA、誘導されるシグナル伝達物質やサイトカインについて明らかにした。さらに長期培養において、腫瘍化への移行段階(とその指標)を検討している。



## 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  
→神鋼病院・血液腫瘍内科医長

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っている。「再生医療における枠組みに関する検討会」では、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、ヒト幹細胞に関する臨床研究指針が改定されて、様々な分野においての実用化が期待されている。一方、再生医療・細胞治療の実用化に際しては、まず医薬品化に至る前の段階での製剤の品質管理システムの確立が必須である。もちろん医薬品化プロセスでの重要性も論を待たない。

品質管理・安全保証・製品標準規格策定に関する研究は、再生医療の実応用の基盤となるものであり、かつ多大な労力と費用を要する分野でもある。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少ない。

品質保証における具体的な障壁については、1, 2年目の研究報告書にも具体的に記載した。ロットを形成しにくい細胞加工品においては、微生物検査のみならず、製品標準策定、変異細胞同定などの領域において簡便、経済的、高感度、多項目、迅速測定システムが開発されることが、再生医療・細胞医療の発展のために重要である。

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。

最終年度の研究では、今まで開発してきた検証系を用いて、実際に投与を行う細胞(口腔粘膜細胞、骨膜細胞、軟骨細胞、髄核細胞、造血幹細胞、免疫担当細胞)にて、その実用性と問題点、改善点を明らかにすることを主たる目標とした。また、高感度多項目迅速微生物検出や、変異細胞検出などの領域においては、システムのさらなる改良とモジュールの追加を行うことを目的とした。さらに微生物検出系については技術移転、外部委託が可能になることも大きな目的とした。

## 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

本研究の中で開発した検出法(キャピラリーPCRを用いた multiplex PCR 及び ABI7300, ABI7500などを用いた real time PCR)は技術移転し、試薬作成及び研究的測定が外部施

設に委託が可能になった。本方法を用いて、東京医科歯科大学(増殖T細胞、軟骨細胞)、新潟大学(口腔粘膜、骨膜細胞)、東海大学(髄核細胞)、先端医療センター(培養臍帯血)において、実際に測定を行い、その有用性を検証した。

## (2) 標準微生物検出系の確立

BacT/ALERT システム(BIOMERIEUX 社)のバリデーションを行った。標準菌を30CFU/300 $\mu$ lになるよう調整し、Ex vivo 増幅臍帯血培養液(抗生物質無添加、リポソーム添加無血清培地)と生理食塩水を37度で培養し、トリプケースソイブイオン(SCD ブイオン/TSB-T)による局方に定められた直接法による方法と比較し、添加回収を求めた。

## (3) 新規微生物測定系の開発

### \*マイコプラズマ測定系の開発

マイコプラズマに関しては、4種類の陽性コントロールと12種類の陰性コントロールを使用し、感度、特異性、定量性を満足するマルチプレックスPCRの系を構築し、その至適反応条件を検討した。

### \*RDV法の改良及び、次世代シーケンサーによる網羅的ウイルス検出の試み

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。実際には、東京医科歯科大学と国立感染症研究所の間で検体解析が可能になった。

本年度は、次世代型シーケンサーによる解析を行った。実際にはDNAをタカラバイオに送付し、ロシュ社のGenome Sequencer FLX Systemによる受託解析を実施した。

## 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)

増殖活性化T細胞、増殖させた造血幹細胞、分化させたマスト細胞を用いて検討を行った。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、抗p21抗体、抗AID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)

実培養に供された口腔粘膜細胞および、骨膜細胞の中で、正常に増殖したもの、培養途中で増殖が止まったものを用いて組織標本を作成し、下記の各種抗体を用いて染色を行った。また骨膜細胞にはPMAで刺激を行い、培養を継続したものについても標本を作製して解析を行った。

PMAは培養の最終2日間に5ng/mL、50ng/mL、100ng/mLの最終濃度で添加した。また一部の細胞においては10から11日間骨細胞への誘導処理を行った。解析分子はphospho-ATM、phospho-p53、phospho-chk2、ATR、phospho-chk1、AIDである。

### (3) テロメア長の解析

Telomere長については、Telomere PNA kit/FITC for Flow Cytometry (DAKO)を用いて検討した。コントロール4倍体細胞より得られた蛍光強度と検体での蛍光強度を比較することにより、検体の平均(相対的)テロメア長を求め、また培養後にテロメア長が保持されているもの

をスポットとして検出した。

### 3. 標準細胞規格検証システムの開発

Luminex 法及び ELISA を用いた生理活性物質測定:

培養骨膜細胞(正常増殖及び増殖停止、形態変化)の培養上清を集め、以下のサイトカイン(EGF, Basic FGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-15, MCSF, TGF $\beta$ , VEGF, IL-21, sE-selectin, sRANKL, BMP2)を測定した。また培養骨膜細胞に PMA 刺激(変異原性刺激)を加え、その影響について検討した。

### 4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

\*検証システムの有用性の検証

培養髄核細胞では、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が開発され、幹細胞及び支持細胞を共に移植することにより、その効果を検証した。

\*マイコプラズマ感染の培養に与える影響についての検討

培養骨膜細胞の培地に *M.salivarium* のリポタンパク質 LP44 のリポペプチド (FSL-1)を 50 または 100 ng/ml になるよう加え、細胞への刺激を行った。TLR2 下流のシグナルタンパク質 p38、p42/44 および SAPK/JNK のリン酸化は、刺激後 0 から 60 分間で回収された細胞をそれぞれのリン酸化抗体でウェスタンブロットして検出した。IL-6 の産生量変化は、刺激後 18 時間後の細胞培地上清を回収し、IL-6 の ELISA を行うことで調べた。各シグナルタンパク質の阻害剤(リン酸化 p38 の阻害剤;SB203580、リン酸化 p42/44 の阻害剤;U0126、リン酸化

SAPK/JNK の阻害剤;SP600125)を FSL-1 と共に培地に加え刺激した細胞培地上清も同時に回収し、測定を行った。続いて、FSL-1 刺激によって発現量が変化するタンパク質を調べるため、FSL-1 刺激前および刺激後 4 時間、12 時間の細胞から mRNA を精製し、DNA マイクロアレイを行った。

(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

(1) 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付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の実施を継続した。

(2) BacT/ALERT システムを用いた細菌・真菌培養法の応用

BacT/ALERT システムは細菌、真菌が増殖する時に産生される CO<sub>2</sub> を発色モニターで検知するシステムであり、本方法を用いて培養臍帯血(造血幹細胞)での検討、標準菌株を用いての検討を行った。その結果、この系は判定を自動化できる利点の他に感度の上でも局方による SCD 培地接種法を上回るという利点が見いだされた。ただし *Candida Albicans* については、SCD 培地接種法の方が早期に検出

できた。培養臍帯血においては菌の検出は認めなかった。

### (3) 新規検出系の開発

#### \*マイコプラズマ検出系の開発

マイコプラズマに関しては、3種類の Forward Primer (M1,4, 19)、4種類の Reverse Primer (M6,9,13,18)および2種類の蛍光標識プローブ (M5,17)の9種類のオリゴマーを1つの検査系に投入するマルチプレックス PCR 法を開発した。その結果以下の感度を達成し、その有用性が検証された。

M. orale: 定量限界 5 cfu

M. hyorhinis: 定量限界 10 cfu

M. pneumoniae: 定量限界 5 cfu

A. laidlawii: 定量限界 5 cfu

また東海大学においては培養髄核細胞を用いてマイコプラズマの実測定が行われた。

\*RDV 法の改良及び、次世代シーケンサーによる網羅的ウイルス検出の試み:

RDV 法については、東京医科歯科大学及び国立感染症研究所において検体のやりとりが可能になり、実際に東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターにて培養された T 細胞の上清を用いて、解析が進行中である。

次世代型シーケンサーによる解析については、2つの検体において、解析総リード数が 40,430 および 39,756、また、解析総塩基数がそれぞれ 13,392,476 および 13,164,201 であり良好に解析された。それぞれのリードは、NCBI の GenBank において相同性検索をおこない、トップヒットしてくる遺伝子を pick up した。その結果、内在性のレトロウイルスについては両検体ともに検出されていたが、その他のウイルスは陰性であった。

## 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

培養造血幹細胞、培養免疫担当細胞、培養骨膜細胞につき、DNA 損傷検出系を用いて検討を加えた。その結果浮遊細胞系ではリン酸化 ATM は増殖が盛んな細胞で比較的高発現を示した。phospho-chk2, ATR, phospho-chk1 は酸化ストレスや電離放射線照射後の培養臍帯血 T 細胞では陽性として検出されたものの、通常に培養した細胞群では、陽性群はほとんど存在しないことが明らかになった。細胞内 p21 に関しては、通常に増殖した細胞ではほとんど検出されず、増殖が悪くなった細胞においては陽性となった。AID が検出される検体も認めなかった。

培養骨膜細胞ではリン酸化 ATM は辺縁の増殖部位にのみ検出されたが、培養系に変異誘導刺激を加えた場合には、リン酸化 ATM が全面に発現すると共に、リン酸化 p53 が検出されることが明らかになった。それ以外の形態変化した細胞や増殖が盛んな細胞ではリン酸化 p53 は検出されなかった。

さらに腫瘍化した細胞を検出する手法として、テロメア長を Flow cytometry にて感度良く定量的に測定する検査法を導入した。実際の培養において腫瘍化した細胞は皆無であるが、幹細胞においても相対的テロメア長が長いという特性がある。しかし腫瘍化細胞では蛍光強度に差がある可能性が示唆された。

## 3. 標準細胞規格検証システムの開発

培養骨膜の EGF, Basic FGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-15, MCSF, TGF $\beta$ , VEGF, IL-21, sE-selectin, sRANKL, BMP2 測定結果では、PMA 刺激を加えたもの、あるいは増殖不良を示すもので TGF-beta が高値となる傾向があり、一方その

他のサイトカインには明らかな差を認めなかった。

培養 T 細胞においては特別な傾向を示さず、末梢血、臍帯血の間でも顕著な差を認めなかった。IL-15 の産生能はほとんどなく、一方 M-CSF や IL-21 は比較的豊富に分泌することが明らかになった。

#### 4. 細胞毒性・有効性検証システムの開発と検証

東海大学では体外で培養したヒト皮膚ならびに椎間板髄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髄核の組織構造を再構築できることを証明しているが、その際に幹細胞に加えて支持細胞が必要となること(単一細胞群での組織再構築は困難で、細胞間相互作用により分化が促進することを明らかにした。

また本年はマイコプラズマ感染が細胞の特性に及ぼす影響を検討した。その結果、FSL-1 刺激によって数百個の遺伝子発現量が変化しており、中でも IL-1 $\beta$  や IL-6 などの炎症性サイトカインや CCL2 や CXCL1 などのケモカインの遺伝子発現量の増加がみられた。また分化・成長因子である PDGFA や FGF5、FGF18、BMP2 の発現量が増加し、PDGFD や FGF7、FGF9、FGF22、BMP4 の発現量が減少していた。生化学的検索では p38 は刺激後 10 分、p42/44 と SAPK/JNK は刺激後 30 分でリン酸化された。また IL-6 の高産生が認められた。さらに長期毒性についての検証も進めているところである。

#### D. 考察

最終年度にあたり、今までに開発してきたシステムを用いてできるだけ多くの再生医療・再

生医療製剤を検討し、その中での課題や改良点を見いだすことができた。

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、新潟大学の検体が解析され、システムに用いる試薬の調整は外部委託が可能になり、検査自体も外部施設で検討することが可能になった。

マイコプラズマ検出法については、マルチプレックス測定が可能な系を立ち上げ、十分に実用に耐えるものであることを明らかにした。リアルタイム PCR で定量的に解析できるシステムが出来上がっており、理論上 106 種類のマイコプラズマに対応できるが、さらに体外診断薬レベルの検査とするために、安定性試験などが実施されるに至っている。

RDV 法を用いて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が、本年度は次世代シーケンサーを用いた系もまた稼働可能であることを確認した。今後低価格化が進めば、多くの情報を集めるための主流となる検査法となる可能性があり、引き続き注目する必要がある。

DNA 損傷検出系は、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。ここでは、リン酸化 ATM は増殖が盛んであることを示す指標であり、リン酸化 p53 はさらに細胞が強力な刺激を受けたときに陽性となることが明らかになった。その他の p21 や  $\gamma$ H2AX、細胞の形態などを複合的に調べることにより、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。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、これらの分子をマルチカラーで染色する

ことにより多角的な情報が得られるはずである。AID は今回の検討では検出されなかったが、様々な慢性刺激で異所性に発現し、変異を誘導する分子であり、継続して検討を行いたい。DNA 損傷細胞のみならず、変異細胞を検出する手法としてテロメア長の測定も実施し、培養細胞の中に 1 万個に数個のレベルで明らかに長さが異なる(長い)群が存在することが判明した。おそらくは幹細胞と考えているが、実際には sorting してさらに細胞の特性を確認すると共に、前述の DNA 損傷応答タンパクとの同時測定を行うことにより、異常細胞か正常幹細胞かを同定できる可能性がある。現時点では固定しなければ行けないという問題点があるが、培養条件の検討の段階では十分に実用的である。一方変異細胞の同定とその除去という点からは、全数検査を行うという前提では、非侵襲的測定系の開発は必須である。

標準細胞規格検証システムは、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。まず多項目測定を行った後に、実際の検査ではリアルタイム PCR などによる mRNA 発現などが実用的である。今回の測定では規格外のものを高感度に測定できるという側面も明らかになった。

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おり、この段階での検証は既に終了している。このマウスへの移植系は、望ましい組織が構築されたか、腫瘍化しないかを検討するには適しているが、長期毒性の検査としては、まだ不十分である点も多い。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。

## E. 結論

今年度の研究を終了するにあたり目標とした 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をすべて実際の再生医療・細胞医療製剤において検証することができた。その中で実験動物(マウス)を用いた細胞毒性(有効性)検出系は、長期毒性検出においてよりも、実際に望ましい組織が培養できているか、最適な組織構築にはどのような細胞が必要であるかを検索するのに重要であり、研究的位置づけが高いものと判断している。

微生物検出系及び DNA 損傷検出系は実際に実用可能な完成型に近づいており、前者は技術移転にまで至り、さらにレポートを増やし、グレードアップしていくことが可能である。マイコプラズマに関しては、今後局方に対抗できる位置まで近づいている。

変異細胞検出は様々な方策がある中、未だに侵襲的(大規模サンプリングが必要)であり、テロメア長測定は有用であるものの、実用には工夫を要すると考えている。標準製品規格検証系は、主に骨膜細胞にて検討され、既存の製品標準に加えて、不適格品を除外するのに重要な指標を得ることができた。Luminex 法は、その他の様々な細胞製剤に応用可能と判断している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## 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

巻末に記載のとおり

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 平成 22 年度第一回班会議

（研究代表者 森尾友宏）

平成 22 年 9 月 04 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

- 9:00-9:15 研究代表者挨拶  
森尾友宏（東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野）
- 第一部 研究発表（座長：浜口 功）**
- 9:15-9:30 歯科口腔再生医療細胞製品の微生物検査について  
中田 光、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）
- 9:30 -9:50 マイコプラズマ抗原刺激によるヒト骨膜細胞への影響  
元井奈都紀、中田光（新潟大学医歯学総合病院・生命科学医療センター）
- 9:50 -10:10 マイコプラズマ・ウイルス同時検出系の作製  
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）
- 9:10-10:30 再生医療関連検体からの新規ウイルス検出法の確立  
水谷哲也、滝澤和也、浜口 功（国立感染症研究所・血液安全性研究部）
- 10:30-10:45 **休 憩**
- 研究発表（座長：中田 光）**
- 10:45-11:05 BacT/ALERT システムによる無菌試験の判定自動化の検証  
伊藤仁也（先端医療センター・細胞管理室）
- 11:05-11:25 培養骨膜シートの細胞タイプの同定と変異誘導の可能性  
川瀬知之、吉江弘正（新潟大学歯科基礎移植再生学、歯周診断・再建学）
- 11:25-11:45 細胞加工製品における DNA 損傷及び変異細胞の検出  
森尾友宏\*、大山 敦\*\*、落合 央\*\*、峯岸志津子\*\*（東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野\*、細胞治療センター\*\*）
- 11:45-12:05 東海大学における関節再生プロジェクト



佐藤正人\*\*\*、三島大志\*\*\*、持田譲治\*、中村嘉彦\*\*、中村雅登\*\*\*、  
加藤俊一\*\*\*（東海大学医学部整形外科学\*、付属病院セルプロセッシング室\*\*、再生医療科学\*\*\*）

**第二部 総合討論**

12:05-12:30 3年間の総括(技術移転・公開、標準作業手順書)

12:30-13:15

**昼 食**

**第三部 分野別討論**

13:15-14:00 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**

再生医療の品質保証において、変異細胞を高感度で検出する手法の開発は重要であり、また変異細胞が生じにくい培養系を選択することも重要である。培養した細胞については、目的に合致した特性を持っているかを、数値として示すことが重要であり、それに基づき製品標準を策定する必要がある。

本研究においては、最終年度の研究として、変異細胞を誘導する最も重要な原因であるDNA損傷をモニタリングする新しい手法で、培養造血幹細胞、培養免疫担当細胞、培養骨膜細胞につき検討を加えた。その結果、変異誘導刺激を加えた場合にリン酸化 ATMに加えて、リン酸化 p53 が検出されることが明らかになった。さらに腫瘍化した細胞を検出する手法として、テロメア長を Flow cytometry にて感度良く定量的に測定する検査法を導入した。実際の培養において腫瘍化した細胞は皆無であるが、幹細胞においても相対的テロメア長が長いという特性がある。しかし腫瘍化細胞では蛍光強度に差がある可能性が示唆された。

製品標準の規格設定については、浮遊細胞においては検査種目を増やして、また付着細胞においては今まで知られている一般的な指標以外に 11 項目の生理活性物質を加えて、正常増殖細胞、増殖不良細胞、過剰刺激を加えた細胞で検討を行った。その結果、培養骨膜細胞では、増殖不良群あるいは過剰刺激群で特定のサイトカインが上昇することが明らかになった。

**A. 研究目的(研究の背景)**

2 年目までの研究にて、微量細胞を用いた DNA 損傷を認めた細胞を高感度で検出するシステムを開発した。

細胞の腫瘍化過程において、class I mutation (増殖・生存), class II mutation (分化停止・自己複製能) を獲得するが、細胞は腫瘍化に至らない方策として、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は DNA 損傷が入

るものの、腫瘍化に関与するような変異を獲得し維持する細胞はわずかであり、正常体性幹細胞の移植においても、移植動物において、腫瘍を発生させることは難しい。

再生医療・細胞治療製剤において腫瘍化を捕まえる手法は下記の 3 種類に大別される。

(1) 染色体検査あるいは SKY FISH レベルでの大まかな確認(従来の「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(平成 12 年 12 月 26

日付け医薬発 1314 号厚生省医薬安全局長通知)などに準じる形式

(2) 投与細胞の半数を用いて、わずかな変異細胞を高感度に検出する手法(例えば、p21 のメチル化、糖鎖修飾異常、p53 変異の検出など)

(3) 非侵襲的観察系(形態の高解像度解析や電気特性変化検出)による異常検出系(開発途上)

本研究が開発する手法は第 4 の道であり、「腫瘍化の際には、異常な遺伝子発現(抑制)、DNA 損傷応答反応を伴うため、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、DNA 損傷が少ない培養条件を使用する」というむしろ、腫瘍化を抑える検査系の開発である。

さらに本年は、異常な DNA 損傷修復応答(DNA damage response: DDR)に加えて、テロメア長が通常よりも長い細胞群を検出する検査法を検討することを目的とした研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. DNA 損傷反応検出システム (FACS を用いた方法)

増殖活性化 T 細胞に加えて、増殖させた造血幹細胞、分化させたマスト細胞を用いて、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、抗 p21 抗体、抗 AID 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、骨膜細胞の中で、正常に増殖したもの、培養途中で増殖が止まったものを用いて組織標本を作成し、下記の各種抗体を用いて染色を行った。また骨膜細胞には PMA で刺激を行い、培養を継続したものについても標本作製して解析を行った。

PMA は培養の最終 2 日間に 5ng/mL、50ng/mL、100ng/mL の最終濃度で添加した。また一部の細胞においては 10 から 11 日間骨細胞への誘導処理を行った。

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

### 3. テロメア長の解析

Telomere 長については、Telomere PNA kit/FITC for Flow Cytometry (DAKO)を用いて検討した。この系ではコントロール 4 倍体細胞より得られた蛍光強度と検体での蛍光強度を比較することにより、検体の平均テロメア長を求めることができ、また培養後にテロメア長が保持されているものをスポットとして検出することができる。

### 4. Luminex 法及び ELISA を用いた生理活性物質測定

培養骨膜細胞(正常増殖及び増殖停止、形態変化)の培養上清を集め下記のサイトカインを測定した。

EGF, Basic FGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-15, MCSF, TGF $\beta$ , VEGF, IL-21, sE-selectin,