

20/006006B

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成23年3月

序

再生医療・細胞治療に対する関心と期待が高まる中、その実用化と普及に際しては、制度的枠組みの確立とともに、加工製剤の品質管理システムの確立が必須の重要案件である。汎用性のある検査系の構築には、1分野、1施設が関わるのではなく、様々な細胞調製施設の現場に関わる研究者が、情報と技術を交換すると共に、共同してシステムを開発し、検証することが必要である。そのような使命の元に行われたのが本研究である。

この研究においては、再生医療・細胞治療の場で汎用性のある、①高感度迅速多項目微生物検出系、②微量異常・変異細胞検出系、③標準調製細胞規格策定系、④有効性・毒性検出系、を開発・改良・検証することを目的とした。稀少疾患に対して、ロットを形成しない細胞を提供することの多い再生医療においては、微量で品質保証と品質管理が行える系の確立が重要である。新しい治療として期待される再生医療が現実化するために基盤となる部分であり、高精度低価格なシステム構築の必要性は高い。このシステムはまた将来的に、細胞加工品が製剤化・医薬品化する段階でも極めて重要な領域である。

研究分担者は実際に再生医療・細胞治療の現場に関与し、あるいはその品質保証に精通する研究者である。その中で、役割を分担して、再生医療に供する細胞を解析することにより、安全性と品質が担保された細胞製剤の規格作りを行うことを目指して研究が行われた。

3年に亘る本研究では4つの柱(システム)がほぼ完成し、特に微生物検査については、検査キットのベンチャー企業での作成、検査会社における受託検査、施設に対する技術移転が行われた。将来的に品質保証統一規格となるレベルに到達するよう検証を続けている。

本研究において開発され、様々な再生医療・細胞治療製剤において検証された検査系は、しかしこれからさらに多種類の細胞や組織で検証され、ブラッシュアップされていくべきものである。さらに非侵襲的変異細胞検出系や経時的の高感度細胞観察系もラインアップに加えていく予定であったが、3年間の研究期間が一旦終了することになった。

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針等により、再生医療における製品加工に一定のルールが敷かれるようになったが、実際の細胞治療では、その安全性・品質保証について明確な基準を設置することが困難な状況である。今後、再生医療が様々な領域に展開されることは必至であり、その安全性確保は厚生労働行政でもっとも大切な部分の1つである。本研究成果が、再生医療の開発や普及につながり、国民の健康・医療に大きく寄与すること、また今後さらに本文やにおける研究が継続し、発展していくことを期待している。

平成 23 年 3 月 10 日

研究代表者 森尾 友宏

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. 総合研究報告	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. 総合分担研究報告	
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	29
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	38
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 (東海大学医学部付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	43
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	55
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	62
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	68
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	73
V. 学会発表に関する一覧	93
VI. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	105
VII. 研究事業報告	107

I. 研究班構成

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
	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 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	准教授
	星川あき子	〒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	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. 総合研究報告

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・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
総合研究報告書

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

再生医療・細胞治療に対する関心と期待が高まる中、その実用化と普及に際しては、制度的枠組みの確立とともに、加工製剤の品質管理システムの確立が必須の案件である。この研究は、再生医療・細胞治療の場で汎用性のある、①高感度迅速多項目微生物検出系、②微量異常・変異細胞検出系、③標準調製細胞規格策定系、④有効性・毒性検出系、を開発・改良・検証することを目的として実施した。

研究代表者らは、新規微生物検出系、細胞変異検出系、細胞毒性検出系を立ち上げ、改良を重ねており、本研究に参加する施設も品質管理を重視した取り組みを行っている。この研究ではその技術と材料を相互に提供し、共通の基盤で検証して、汎用性のあるより良いシステムを確立することを試みた。

その結果、微生物検出系は改良され、検出可能な微生物の種類も経時的に増加し、50 種類を越え、さらに細菌、真菌を rRNA 測定により同定する系も確立した。検証の結果、最終的には免疫担当細胞、培養口腔粘膜細胞において測定すべきウイルスが明らかになった。未知のウイルスを同定する系も稼働が開始した。各施設で改良された微生物検査を技術移転し、実稼働させてデータが集積した。局方において示されたマイコプラズマ検出法は時間、経費、技術の面で問題がある。既存の方法との比較により、単独標準検査として、マイコプラズマを網羅的に検出する PCR 系を確立した。口腔粘膜細胞培養においてはマイコプラズマが大きな問題になるが、含嗽や予防的抗菌薬投与にて予防が可能であることを明らかにした。

DNA 損傷・変異細胞検出系に関しては、複数以上の分子を指標とした FACS 及び免疫染色による DNA 損傷修復反応(DDR)検出法を開発した。癌化の初期には DDR の亢進が検出され、その後 DDR に関与する分子の変異などで DDR が減弱し、染色体異常を呈した細胞が生存するという現象から、初期の DNA 損傷を検証し、培養法の改善から損傷を回避しようとする考えである。、検体としては、培養免疫担当細胞、口腔粘膜細胞、培養骨膜細胞などで検証を行った。細胞周期との同時解析やテロメア長の測定により、異常クローンの検出も試みた。

標準細胞規格策定については、FACS 及び Luminex 法での検証を行った。培養法を改変して作成した骨膜細胞や、変異誘導刺激を入れた骨膜細胞などにおいて多項目生理活性物質を測定し、問題となる細胞にて検出される生理活性物質を明らかにすると共に、製品標準書に記載可能な最適な状態を規格化することを試みた。数十種類の抗体を用いた FACS 法で行われた研究では、幹細胞自体がある分画に特定されることが明らかになると共に、幹細胞の増殖を支持する細胞群が、実際の組織再生には重要であることも明らかになった。

免疫不全マウスへの細胞移植実験は主に、有効性の検証に有用であった。培養増殖骨髄幹細胞や、髓核細胞の移植実験において、期待された通りの組織が形成されたことが明らかになり、また SKY-FISH や染色体検査において、腫瘍化・染色体異常の発生はないことが検証された。

本研究では 4 つの柱(システム)がほぼ完成し、特に微生物検査については、検査キットのベンチャー企業での作成、検査会社における受託検査、施設に対する技術移転が行われた。将来的に再生医療・細胞治療分野の品質保証統一規格となることを願っている。

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・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・細胞治療製剤の品質管理・確保は、医療者を含む国民の大きな関心事であり、安全かつ信頼される再生医療の発展のために必須の重要案件であるが、それに対して継続的に研究を進めている研究者は少ない。特に、細胞調製施設の現場にて、研究開発し、検証している施設は稀である。

この研究では、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。すなわち

①高感度多項目迅速微生物検出、②微量細胞を用いた変異細胞検出、③細胞毒性検証、④標準製品規格検証のためのシステムであり、それらを用いて安全性・品質管理基準を提案し、さらに長期的な効果と有害事象についてデータを収集する。

B. 研究方法

(1)網羅的迅速微生物検出系の開発

8種類のヘルペス属ウイルス、4種類のレトロウイルス、5種類の肝炎ウイルス、BKV、JCV、パルボウイルス B19、アデノウイルス、マイコプラズマなどを 10 コピー/ μgDNA の感度で、2 時間以内に、3,000 円以内で検出する multiplex キャピラリー-PCR システムを構築し

ており、その多くは定量系も完成している。

本研究ではまずその種類を拡大し、16SrRNA, 18SrRNA を利用した細菌・真菌の検出と同定系を確立した。また定量可能な種類を増やし、培養造血幹細胞、免疫細胞、軟骨培養細胞、歯槽骨培養細胞などを用いて、検出微生物リストを作成した。

さらに汎用性のある PCR 系とするために 96 穴 plate で安定して測定可能な、半定量系を確立し、検証した。実際には ABI7300, 7500 などにて検討した。

マイコプラズマについては、106 種類のマイコプラズマ、特に口腔内から検出されるマイコプラズマを、multiplex PCR にて網羅的に検出できるシステムを作成した。

(primer や probe の実際については分担研究報告を参照)

また未知のウイルスや微生物を検出するシステムを開発した。具体的には RDV 法を用いて、網羅的に DNA, RNA ウイルスを検出する方法と、次世代シーケンサを用いてメタゲノム解析を行う手法の両者を用いた。

(2)微量培養細胞を用いた変異原性試験の開発

悪性腫瘍化の際には、増幅ストレスなどにより DNA 損傷修復反応(DDR)が増強し、さらに遺伝子・染色体転座が生じて、その一部がアポトーシスを逃れて腫瘍化する。腫瘍化への第一段階を拾うため、ATM, Chk2, Chk1, P53, H2AX のリン酸化などを指標に、免疫染色を用いて DDR の亢進を細胞レベルで検証する本システムは浮遊細胞においては FACS で検討し、付着細胞においては免疫染色で検討した。実際には培養口腔粘膜細胞、骨膜細胞、増殖 T 細胞などで検証した。

異常細胞の検出については、telomere

Flow 法を用いて、相対的テロメア長を測定し、他のパラメータとあわせて、テロメアが維持されかつ、変異した(あるいは DNA 損傷をうけた)細胞を同定した。

全体の細胞をスクリーニングする目的では、NOG-SCID, NOD-SCID(NK 除去)などを用いてマウスへの移植実験を行った。

(3) 細胞の標準化を目指した細胞プロファイリングシステムの開発

調製した細胞の適格性を判断するためには、調製細胞の特性を知り、それを元に基準を作成する必要がある。ここでは Bio-Plex200 システムを用い、広範な細胞内タンパク・生理活性物質測定を行った。具体的には、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, IL-15, MCSF, TGFβ, VEGF, sE-selectin, sRANKL, BMP2などを測定した。

(4) 細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発

細胞を SCID マウスや Nude マウスに移植し、有害事象や、毒性、自己免疫疾患などについて検討する。免疫系に及ぼす影響については、患者末梢血から幹細胞を取り出して、マウスに移植、さらに別種類の細胞(再生医療に用いる細胞)を移植して、反応を検出することを試みた。

またマイコプラズマについては、モデル細胞にパルスすることにより、惹起される反応につき、シグナル伝達及び mRNA 発現の点で解析し、悪性化などへの変化を検証した。

(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。本研究は、各種指針を遵守した形で行われた。また、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認をえて行った。

C. 研究結果

(1) 網羅的迅速微生物検出系の開発

1) ウイルス検査系の検定

ウイルス検査項目は、HSV1,2, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ParvoB19, XMRV の 12 種類とし、インナーコントロールとして β-globin を使用した。

ウイルス検査系の感度検定をおこなったところ、全てのウイルス種において 10 copies/reaction の感度を持つことが示された。またシステムはキャピラリー PCR 及びプレート型 PCR の両方で用いることのできるシステムを作成した。

2) 細菌 16SrRNA 遺伝子、真菌 18SrRNA 遺伝子解析(網羅的細菌・真菌特定法)の開発

細菌 16SrRNA 遺伝子による細菌検出系を検定し、塩基配列決定から細菌を特定した。実際に6種類の細菌(大腸菌、放線菌、肺炎桿菌、肺炎球菌、緑膿菌、コアグラージェ陰性ブドウ球菌)での検証もを行い、10 copy 程度の菌を捕まえることができること、また、細菌同定手法として使用に耐えることを確認した。また真菌 18SrRNA 遺伝子解析を試みた。

3) 新規マイコプラズマ検出系の確立

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。その結果理論上

106種類のマycopラズマが検出できる系が作成できた。実際に *Mycoplasma orale*, *pneumoniae* など4種類の菌にて10copy以下の感度で検出できることを確認した。

4) BacT/ALERT システムの検証

検出株のうち *Candida Albicans* を除く5種の細菌・真菌で BacT/ALEART システムの方が、通常培養法に比して短時間に検出できることを確認した。

5) RDV 法及び次世代シーケンサを用いた網羅的微生物検出

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) を確立した。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。

また微生物同定法の発展型として、次世代型シーケンサーによる解析を行った。実際には DNA をロシュ社の Genome Sequencer FLX System によって解析した。

6) 実臨床での検証

1) の PCR システムは、再生医療・細胞治療用に調製した、増殖 T 細胞、口腔粘膜細胞、骨膜細胞、軟骨細胞、髄核細胞において実際に検証を行った。また 3) のマイコプラズマ検出システムは 67 検体の口腔粘膜細胞において検証を進め、実際に陽性を確認した。

さらにこのデータを受けて、洗口薬や抗菌薬投与によりマイコプラズマの検出率が下がることを明らかにした。

7) 技術移転

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。

(2) 微量培養細胞を用いた変異原性試験の開

発

1) DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) の検出による過剰刺激、DNA 損傷の危険がある培養系の回避

1)-1 DNA 損傷反応検出システム

(FACS を用いた方法) の開発と検証

培養を行った浮遊系細胞のうち、主に活性化培養臍帯血 T 細胞 (増殖が良いものと、増殖が悪いもの) について、phospho-ATM, phospho-p53, phospho-chk2, ATR, phospho-chk1, AID 染色の条件決定を行い、また蛍光強度の解析を行った。phospho-ATM については、回転が速く増殖が良い細胞群では、シフトが認められた。5種類の異なった検体で解析し、初期の増殖期、対数増殖期、対数増殖期を過ぎた時期が含まれていたが、わずかではあるが対数増殖期の細胞で最も ATM のリン酸化が強い傾向にあった。一方増殖不良となったものでは phospho-ATM はほとんど検出されなかった。

一方 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。

一方細胞内 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。

慢性感染や慢性刺激において B 細胞以外に発現する AID は mutator として知られている。この発現は今回の検討では観察されなかった。

1)-2 DNA 損傷反応検出システム

(免疫組織染色を用いた方法) の開発と検証

培養口腔粘膜、培養骨膜細胞標本、PMA で刺激した培養骨膜細胞標本 (新潟大学にて

培養)を用いて、DNA 損傷応答分子の染色を行った。

培養の先端部において、phospho-ATM, ATR の発現が確認され、一方 Chk2, Chk1, p53 のリン酸化は検出されないという結果が得られた。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)と結論した。

PMA にて2日間刺激をしたものでは、一部の細胞では通常培養あるいはPMA刺激において、凝集したような変形細胞を認めた。これらの細胞においては、phospho-ATM, phospho-p53 の発現が検出され、一方 Chk2, Chk1 のリン酸化は認められなかった。通常の培養においては辺縁においてのみ phospho-ATM が確認されるという点からは、過剰刺激状態においては、多くの細胞にて ATM がリン酸化され、また p53 のリン酸化にまで繋がっていることが明らかになった。

さらに培養法を改良した(短期培養が可能になった)骨膜シートにおいて、DDR の検証を開始した。

2) テロメア長測定による癌化細胞の同定

テロメア長はテロメア配列にハイブリダイズする PNA を FITC ラベルし、細胞内で反応させ、FACS にて検出するシステムを用いて検証した。幹細胞あるいは腫瘍化細胞の1つの目安となるテロメア長の長い細胞については、培養 T 細胞では検出されなかった。

一方、培養造血幹細胞においてはテロメア長の長い細胞群が一群として検出された。その蛍光強度(相対的テロメア長)は、HPB-ALL 程度であった。一方その他の T 細胞株である Jurkat や Molt-4 では相対的テロメア長はより大きな傾向にあった。

(3) 細胞の標準化を目指した細胞プロファイリングシステムの開発

1) サイトカインのモニタリング

通常の条件で培養した骨膜シートおよび骨芽細胞への分化誘導処理を施した骨膜シートが産生するサイトカインについて、ドナー別に10枚程度調査し共通となるプロファイルの特徴を把握し、標準細胞規格を作成した。

また直径20mm程度に成長した培養骨膜シートに対して、①発癌プロモーターである Phorbol ester (PMA)処理、②紫外線のなかでも組織・細胞に有害とされる UVC 照射、③ γ 線照射などの方法で細胞の突然変異を誘発させた。癌化の可能性は、形態、細胞核の大きさ、増殖活性、リン酸化 p53 の蓄積などから判定する。これと並行して、培養骨膜シートの培養上清に放出されるサイトカインを抗体アレイや Bio-Plex などの方法で半網羅的に定量解析した。また、癌化することによって増加するであろう glucose 消費は培地中の glucose 量を定量することにより検証した。

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、上記の標準細胞基準に加えて、不適格基準の1つが策定された。

2) FACSを用いた組織形成に適した細胞群の同定

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、(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超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)を用いて品質評価を行った。

その結果、椎間板構造再構築には、細胞

表面抗原発現で特定可能な幹細胞群に加えて、支持細胞が重要であることが明らかになった。

(4) 細胞治療の有効性・毒性検証システムの開発

1) 前処置を工夫した NOD/SCID マウスへの増殖臍帯血細胞移入による治療の有効性、毒性、細胞変異の検証

NOD/SCID マウスへのヒト造血細胞移植においては、T 細胞を除く造血系が再構築する。これにより、GVHD が回避され、ヒト血液細胞がマウス血液細胞と混合キメラ状態を長期間にわたり保つことができる。さらに前処置として、anti-IL-2R β 鎖抗体(マウス TM β -1 抗体)を投与することにより、高いヒト細胞キメリズムを維持でき、感染に抵抗性で、生存率も高くなることが明らかになり、汎用される NOG-SCID マウスに対する優位性を明らかにした。移植後長期観察の結果、体重減少、脱毛といった外観の異常所見は認めず、病理組織学的にも炎症、変成、癌化を認めなかった。染色体解析においても G-band 分染法、m-FISH 法にて異常所見は確認されず、一定の安全性を評価しうる系と考えられ、異種間移植系を用いての治療用細胞製剤の安全性に関する前臨床試験として利用できると考えられた。

2) Nude マウスを用いた培養髄核細胞の有効性と腫瘍形成検証システム

培養髄核細胞の品質評価として、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 Nude マウス皮下移植による椎間板構造再構築の確認によって評価した。また、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時間でアッセイできる系を開発した。Nude マウ

スも同様に実用的なシステムであることが明らかになった。

D. 考察

高感度迅速網羅的微生物検出系は、培養増殖 T 細胞、増殖臍帯血細胞、培養軟骨細胞、培養骨膜細胞、培養口腔粘膜細胞、培養髄核細胞で検証され、その高感度性と迅速性、経済性が明らかになった。システムはキャピラリー式、プレート式共に対応可能であり、定量系も備えている。従って PCR 機を有するどのような施設でも検査可能となっている。今後は体外診断薬認可に向けて、調製試薬の安定性、再現性などを検証する段階に来ており、さらに臨床応用研究を充実させる必要がある。

マイコプラズマの新規検出系は最も力を注いだ分野の一つであり、現在最も感度が高く確実とされる培養法と比べてより感度が高く、迅速で、安価な方法が確立している。数多いマイコプラズマの中で 106 種類は理論的に検証可能で、その中の代表的な 4 種類では高感度性を明らかにしているが、すべてを網羅できることを検証するためには労力が必要である。今後は局方に組み入れられるレベルを目指した研究が続く。

未知の微生物に対する次世代シーケンサー検査や RDV 法は、現時点では研究的検査系であるが、思わぬ有害事象が生じた場合には必須の検査と考えている。また将来的に価格破壊が実現した場合には、主流となる検査に格上げされる可能性を秘めている。

再生医療・細胞治療製剤において腫瘍性・細胞変異を捕まえる手法には様々なものがあるが、大まかには下記の 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)

(1)の弱点は、大きな変異のみしか検出できない点である。この応用として実験動物に移入して腫瘍化を検討するという方策があるが、時間と労力を要し、また完全な保証とはならない。(2)の弱点は、侵襲的検査であり、抜き取ったものでしか検査が行えない(従って投与したものでは保証が行えない)点である。

この中で(3)が最も望ましく、私たちが研究開発を続けているが、この領域の innovation を実現するにはまだ時間が必要である。そこで私たちは以下のアプローチをとった。

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。

そこで、「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を開発した。実際に腫瘍化や細胞変異を捕まえる技術ではないが、培養系を顕彰する段階では様々な応用可能であり、最終年度に加えたテロメア長の測定を含む多次元解析が行えれば、浮遊細胞系では有用な検査となる可能性を秘めている。

標準化を目指した細胞プロファイリングシステムでは、細胞自体の多項目解析と培養液における指標の抽出が必要である。細胞の多項目解析については、Flow cytometer と Luminex 法が優れており、特に Flow cytometer で行えれば、迅速性や簡便性、感度の点で最良と思われた。今後 CyTOF といった次世代の>30 parameter 解析装置が一般化すれば、そちらへの移行も考えられる。

上清での生理活性物質測定は、良好な培養状況の指標となると共に、増殖不良群や強力な刺激が入った群のピックアップにも有用であることが示唆された。

今回は shotgun proteomics アプローチをとらなかったが、将来的にはこのような手法によってタンパクレベルで一気に指標を取得するという方法も考えられる。

細胞治療の有効性・毒性検証システムは、今のところ動物への移入という形をとることが多い。本研究でも NOD-SCID/IL-2R α 鎖抗体処理と、Nude マウスシステムが、有用であることが示された。その中で腫瘍化がおきないこと、思わぬ生理活性物質が放出されてマウスに大きな有害事象がおきないこと、期待した細胞に分化し生着したことを確認できた。

今後の再生医療・細胞治療を考える上で、研究レベルでのマウスの検証系を有しておくことは重要であるが、多数の匹数を用いて多数検体の培養細胞を移入するという手法は、

実際可能な細胞種と困難な細胞種があり、細胞毎で議論を進めていくべき内容であろうかと考えている。今後モデル動物に替わる、生体系ができることが期待される。

E. 結論

3年間の研究によって、4つのシステムが開発され、検証された。

高感度迅速網羅的微生物検出系は改良され、検出可能な微生物の種類は経時的に増加し、50種類を越え、さらに細菌、真菌をrRNA測定により同定する系も確立した。検証の結果、最終的には免疫担当細胞、培養口腔粘膜細胞において測定すべきウイルスが明らかになった。未知のウイルスを同定する系も稼働が開始した。各施設で改良された微生物検査を技術移転し、実稼働させてデータが集積した。従来マイコプラズマ検出法は時間、経費、技術の面で問題があるが、マルチプレックスPCR、定量測定により理論的には、100種以上のマイコプラズマを網羅できる、単独標準検査としての確立に近づいた。さらに口腔粘膜細胞培養においてはマイコプラズマが大きな問題になることが判明したために、含嗽や予防的抗菌薬投与にて予防が可能であるかについて検証を行った。

DNA損傷・変異細胞検出系に関しては、複数以上の分子を指標としたDNA損傷修復反応(DDR)検出法を開発し、口腔粘膜細胞、培養骨膜細胞などで検証した。さらには簡易DDR検出法を確立して、適切な培養条件や、培養不成功例での問題点が確認された。細胞周期との同時解析やテロメア長の測定により、理論的に異常クローンの検出も可能となった。

標準細胞規格策定については、FACS及び

Luminex法での検証を行った。培養法を改変して作成した骨膜細胞や、変異誘導刺激を入れた骨膜細胞などにおいて多項目生理活性物質を測定し、問題となる細胞にて検出される生理活性物質を明らかにすると共に、製品標準書に記載可能な最適な状態を規格化した。数十種類の抗体を用いたFACS法を用いて行われた研究では、幹細胞自体がある分画に特定されることが明らかになると共に、幹細胞の増殖を支持する細胞群が、実際の組織再生には重要であることも明らかになった。

免疫不全マウスへの細胞移植実験は、有効性及び細胞変異の検証に有用であった。培養増殖骨髄幹細胞や、髄核細胞の移植実験において、期待された通りの組織が形成されたことが明らかになり、またSKY-FISHや染色体検査において、腫瘍化・染色体異常の発生はないことが検証された。

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

巻末学会発表(G2)参照

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許

「APPLICATION OF
SYNOVIUM-DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs)
FOR CARTILAGE OR MENISUCUS
REGENERATION」

特願番号:PCT/JP2007/066708

特許:第 4437335 号

出願人:関矢一郎

2010年1月15日

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

2008年8月22日

3.その他

国内特許

該当なし

「ヒト未分化造血幹細胞およびその分離方
法ならびに分離装置」

発明者:加藤俊一、中村嘉彦

Ⅲ. 総合分担研究報告

平成 20～22 年度厚生労働科学研究・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
総合分担研究報告書

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活達病態学分野 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活達病態学分野 助授
水谷修紀 東京医科歯科大学大学院発生活達病態学分野 教授

研究要旨

再生医療の品質保証において、変異細胞を高感度に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、変異細胞を誘導する最も重要な原因である DNA 損傷を、浮遊細胞及び付着細胞でモニタリングする新しい手法を開発した。この DNA 損傷修復反応(DNA damage response:DDR)検出システムを用いて、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。この検出系はまた、DDR に関与する分子のヘテロ異常も同定することが可能である。

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(増殖 T 細胞)及び付着細胞(培養骨膜細胞)において Luminex 法を用いて検証した。具体的には正常増殖細胞、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。

以上より、DNA 損傷をできるだけ避ける培養法の選択、変異細胞の高感度検出、標準規格の体系的な選定に用いることのできる実用的なシステムが構築された。検討した細胞の種類はまだ限られており、今後さらにその種類を増やして検討していくことが求められる。

A. 研究目的(研究の背景)

(1) 腫瘍細胞・DNA 損傷細胞の検出

再生医療の品質保証においては、微量細胞にての感度良い腫瘍細胞の検出が重要で

ある。私たちは腫瘍細胞を検出するという手法に加えて、腫瘍化しにくい最適の培養系、刺激系を確立するという違った視点から、微量細

胞を用いて 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。

さらにこの研究では、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)

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)、あるいは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した。

増殖活性化 T 細胞では過酸化水素、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。

また negative control として、ATM が欠損する患者において、電離放射線刺激後にリン酸化 ATM が検出されないことも確認した。

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