

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
分担研究報告書

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

研究分担者

宗田 大 東京医科歯科大学・大学院・運動器外科学 教授

研究要旨

家兔の軟骨欠損モデルに対して滑膜間葉系幹細胞集合体を移植し、軟骨再生に対する効果を検討した。日本白色家兔の滑膜より間葉系幹細胞を採取し、25万細胞の集合体を形成した。大腿骨溝に5x5x1.5mmの軟骨欠損を作成し、集合体を5、10、20、40、80個移植し、移植後4、12週で、肉眼的、組織学的検討を行った。比較的低密度である10個の集合体を移植した群で、最も良好な軟骨の再生が得られた。臨床での軟骨欠損の面積と、用意できる細胞数を考慮すると、ウサギモデルで良好な結果が得られた条件は、実務上可能な条件であった。

A. 研究目的

滑膜間葉系幹細胞浮遊液を軟骨欠損部に10分間静置することで、約60%の滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に接着させることが可能で、軟骨修復を促進させることができる。細胞集合体を使用することにより、細胞を可視化でき、細胞移植の効率を上げることが期待できる。家兔の軟骨欠損モデルに対して滑膜間葉系幹細胞集合体を移植し、軟骨再生に対する効果を検討した。

B. 研究方法

日本白色家兔の滑膜より、間葉系幹細胞を採取した。25万個の滑膜間葉系幹細胞を35 $\mu$ lの培養液に懸濁し、hanging drop法で、3日間培養し、集合体を形成させた。日本白色家兔の大腿骨溝に5x5x1.5mmの

軟骨欠損を作成し、自己滑膜間葉系幹細胞集合体を、それぞれ、5、10、20、40、80個移植した。細胞を移植しない群を対照とした。移植細胞を追跡するため、GFPを発現する兔の滑膜間葉細胞集合体の同種移植も検討した。移植後4、12週で、肉眼的、組織学的検討を行った。

C. 研究結果

集合体は、容易に軟骨欠損部へ接着させることが可能で、移植翌日に移植細胞が軟骨欠損部に残存し、軟骨欠損部以外には細胞は認めなかった。比較的低密度、10個の集合体を移植した群で、移植4週、12週後に最も良好な軟骨の再生が得られた。GFP陽性細胞の集合体を10個移植し、4週後に再生した軟骨には、GFP陽性細胞を認め

た。再生した軟骨は GFP 陽性細胞とともに GFP 陰性の細胞も認めた。

#### D. 考察

日本白色家兎の軟骨欠損モデルを用いた検討では、滑膜間葉系幹細胞集合体を比較的低密度で移植した群で、良好な軟骨の再生が得られたが、最も成績が不良であったのは、最も多くの集合体を移植し軟骨欠損部に集合体を敷きつめた群であった。我々は以前に collagen gel を包埋した滑膜間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植した場合には、より多くの細胞を移植した群で、より良好な成績が得られていたことから、今回の結果は予想に反するものであった。一定数以上の集合体を移植した時に、成績が不良となる理由として、細胞を維持するのに必要な栄養素が枯渇することが考えられる。GFP 陽性の滑膜幹細胞集合体を移植した実験で、得られた再生軟骨には、GFP 陽性細胞と陰性細胞が混在した。骨髄や関節液中には、間葉系幹細胞が存在することから、再生した軟骨は、移植した細胞が直接軟骨に分化しただけではなく、host の細胞が関与することが示唆された。本研究では、比較的低密度で、移植した時に良好な結果が得られたが、臨床応用を考えると望ましい結果であった。我々はすでに、ヒトの軟骨欠損部への自己滑膜間葉系幹細胞移植の臨床治験を行っている。14 日間で平均 5000 万細胞を得ることができ、約 280mm<sup>2</sup> の軟骨欠損部へ移植している。今

回の日本白色家兎の model では、25mm<sup>2</sup> の欠損部に 10 個の集合体(250 万細胞) を移植した際に最も良好な結果が得られた。臨床での軟骨欠損の面積と、用意できる細胞数を考慮すると、ウサギモデルで良好な結果が得られた条件は、実務上可能な条件であった。

#### E. 結論

日本白色家兎の軟骨欠損モデルで滑膜間葉系幹細胞集合体を移植することにより、良好な軟骨修復を認めた。特に集合体を低密度で移植した際に、最もよい軟骨修復が認められた。

#### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1.Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs.

Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E. Cytotherapy. 2012 Mar;14(3):327-38

2. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis.

Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, Tsuji K, Miyaguchi K, Ogishima S, Tanaka H, Muneta T,  
JOrthopRes.2012Jun;30(6):943-9.

3. 滑膜間葉幹細胞の役割と低侵襲な軟骨再生への応用

関矢一郎、宗田大

雑誌整形外 2012 整形トピックス  
Vol.63, No.3, p228

4 変形性膝関節症をめぐる進歩膜由来の幹細胞による再生医療

関矢一郎、宗田大

Bone Joint Nerve 2012 Vol.2, No.1,  
p159-165

5. 再生医学のいま 基礎研究から臨床への展開に向けて滑膜幹細胞を用いた関節軟骨再生

関矢一郎、宗田大

治療

2011 Vol.93, No.8, p1784-1793

6. 滑膜間葉幹細胞を用いた関節軟骨再生

関矢一郎、宗田大

クリニカルカルシウム  
p83-93 Vol.21 No.6 2011

2. 学会発表

a) 国際学会発表

宗田 大

Remnant Preserving Double-bundle ACL Reconstruction.

7th PCL Symposium in Seoul Prof.

Jung Young-Bok, 2011/2/12

宗田 大

Remnant preserving double-bundle ACL reconstruction by transtibial technique. Debate: Remnant Preservation in ACL Reconstruction: Is it Worth Doing?

ISAKOS 2011, Rio de Janeiro, 2011/5/15

宗田 大

17- year experience of 4-strand semitendinosus double-bundle ACL reconstruction ICL: ACL Reconstruction - Single vs. Double Bundle.

ISAKOS 2011, Rio de Janeiro, 2011/5/16

宗田 大

Treatment for knee osteoarthritis before Total Knee - Biologic resurfacing options for osteochondral

defects of the knee -. ICL: Treatment of Knee Osteoarthritis: What are the Options Before Total Knee? ISAKOS 2011, Rio de Janeiro, 2011/5/16

宗田 大

What's going on in the section of Orthopedic Surgery, Orthopedic Biomechanics Laboratory, Gainesville, FL 2011/5/20

宗田 大

17-year experience of 4-strand semitendinosus double-bundle ACL reconstruction.

Grand Rounds in Orthopaedics & Rehabilitation, OHSU, 2011/5/23

宗田 大

Anatomic double-bundle ACL reconstruction using 4-strand semitendinosus tendon. 1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijin. 2011/6/10

宗田 大

Medial patellofemoral reconstruction in various patellar instability. 1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijin. 2011/6/11

宗田 大

Physiological background of ACL injured patients.

1 st Jishuitan Sports Medicine Summit in Beijin. 2011/6/12

鈴木志郎、宗田 大、関矢一郎

Properties and effectiveness of aggregated synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration.

Orthopaedic Research Society,

San Flancisco,2012/2/4

堀江雅史、宗田 大、関矢一郎

Xenografts of Human Mesenchymal Stromal Cells(MSCs) Improve Repair of Rat Meniscus by Being Activated to Express Indian Hedgehog that Enhances Expression of Rat Type II Collagen

Orthopaedic Research Society,

San Flancisco,2012/2/4

奥野真起子、宗田 大、関矢一郎

Syngeneic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat massivemeniscal defect model.

Orthopaedic Research Society,

San Flancisco,2012/2/4

初鹿大祐、宗田 大、関矢一郎

Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in rabbit massive meniscal defect.

Orthopaedic Research Society,  
San Francisco, 2012/2/4

小田邊浩二、宗田 大、関矢一郎  
Property of Mesenchymal Stem Cells  
in Oral Tissues.

Orthopaedic Research Society,  
San Francisco, 2012/2/4

尾島美代子、宗田 大、関矢一郎  
Human mesenchymal stem cells in  
synovial fluid increase in the knee  
with osteoarthritis.

Orthopaedic Research Society,  
San Francisco, 2012/2/4

大関信武、宗田 大、関矢一郎、齋藤知行  
BMP-7 treated Achilles tendon  
transplantation for meniscal defect in  
a rat model.

Orthopaedic Research Society,  
San Francisco, 2012/2/4

b) 国内学会発表

宗田 大

4つ折りの半腱様筋腱を用いた2重束再  
建術の進歩と課題

第3回 JOSKAS 特別シンポジウム  
北海道 2011/6/16

宗田 大

膝関節の障害に対する保存療法と手術療  
法の位置づけ

第3回 JOSKAS 北海道

2011/6/17

宗田 大

複合靭帯損傷に対する治療のコツとピットフ  
ォール

第3回 JOSKAS セミナー 北海道

2011/6/18

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
分担研究報告書

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

研究分担者

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

滑膜由来間葉系幹細胞の培養にあたって、変異細胞を同定するために、p16 のメチル化に着目して、メチル化特異的 PCR 系を立ち上げ、0.1%の混在する変異細胞を検出することに成功した。また変異を誘導しないという点で最適な培養法の選択のために、変異細胞が生じるきっかけとなる DNA 損傷応答を検出した。ATM, Chk2, p53 などのリン酸化を指標に、培養骨膜細胞にて検証を行った。上記に関しては検出系が確立し、滑膜由来間葉系幹細胞での検証体制が整った。

A. 研究目的

滑膜由来間葉系幹細胞調製での品質保証体系の 1 つとして、変異細胞の有無について検出する系を立ち上げることを目的とした。実際に体細胞の培養系で変異細胞が生じ、生存を続けることは極めて稀な現象と考えられるが、変異細胞が生成する危険性を最小限にする培養系を確立するためのモニタリングシステムを検証することも目的とした。

B. 研究方法

1) p16 メチル化アッセイ

U2OS(p16 メチル化陽性ヒト骨肉腫細胞株)と SaOS2(p16 メチル化陰性ヒト骨肉腫細胞株)から DNA を抽出し、常法に従ってバイサルファイト処理後、メチル化塩基配

列特異的プライマー及び検出用プローブを用いて、リアルタイム PCR 機にてメチル化断片の定量的解析を行った。ヒト骨肉腫細胞 MG-63 についても同様の検討を行った。

2) DNA 損傷修復応答の解析

DNA 損傷修復応答検出系は、実際の培養滑膜間葉系幹細胞につき染色用切片を作成した。また前段階として培養骨膜細胞を用いて染色用切片を作成し、ATM, Chk2, P53 のリン酸化特異的抗体を用いて染色を行った。さらに DNA 損傷を加えた血球系細胞をモデルとして、AID (activation induced deaminase) の発現についてスライド上で検討を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は、再生医療用の組織あるいは健康人の血球細胞を用いて検討を行った。今回の解析においては従って、最小限のサンプル量で行えるように留意し、「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・検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」として倫理審査委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

#### 1) p16 メチル化アッセイ

p16 メチル化陽性細胞、メチル化陰性細胞でそれぞれリアルタイム PCR を行い、陰性細胞では 40 cycle 以上でも陰性であることを確認した。さらに陽性細胞と陰性細胞を 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 の比率で混ぜてリアルタイム PCR を行ったところ、少なくとも 1:1,000 ではメチル化陽性細胞が検出できることを明らかにした。

実際の培養滑膜間葉系幹細胞については、組織から DNA を抽出し、今後の検討に備えた。

#### 2) DNA 損傷修復応答の検出

培養骨膜細胞では、培養組織の辺縁において ATM, Chk2, P53 の微弱なリン酸化が認められた。また DNA 損傷を加えた血球系細胞 (T 細胞) では、AID の発現を検出することができた。ただし血球系の AID はバックグラウンドでも微弱に発現するように見え、その陽性陰性の判定が今後の課題で

ある。同様に培養滑膜間葉系幹細胞からは染色用切片を作成して、今後の染色の準備が整った。

### D. 考察

本年の研究では p16 メチル化アッセイが稼働することが確認された。現時点では 0.1% の検出感度であるが、実際には測定に用いる DNA 量を増やすことによって 0.01% 程度の感度は得られることが予想される。また DNA 損傷応答は染色にて評価可能と判断される。今後評価としては 500-1000 細胞あたりの損傷応答陽性細胞を算定し基礎データとしたい。また来年度からは実際の培養滑膜由来間葉系幹細胞を用いて解析することが可能である。

現時点では培養法に関する大きな変化はないが、今後培養試薬等の変更があった際の指標として活用する。最終的な品質保証としては調製された細胞の Karyotyping を 10 検体以上で実施し、基礎データとしたい。

### E. 結論

変異細胞検出手法と、DNA 損傷修復応答解析手法が確立し、実際の培養細胞において検証した。十分な感度も得られることが判明している。来年度以降に、実際の培養滑膜由来間葉系幹細胞を用いての検討が可能である。

### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. Jang SH, Lim JW, **Morio T**, Kim H. Free Radical Biol. Med. 52: 607-615, 2012.
2. Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, **Morio T**, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. Biomaterials 33:1563-72, 2012.
3. Nakamura K. Du L. Tunuguntla R. Fike F. Cavalieri S. **Morio T**. Mizutani S. Brusco A. Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. Hum Mutat. 33:198-208, 2012.

### 2. 学会発表

該当無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
分担研究報告書

細胞製剤の品質・安全保証に関する研究

研究分担者

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 准教授

研究要旨

幹細胞による低侵襲軟骨再生治療に使用する細胞製剤を調製する際の安全性を確保するため、細胞培養工程に混入する可能性がある微生物の迅速検査系の開発を行い、17種類のウイルス(HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2, HCV)の迅速・高感度検査系を作成した。作成した検査系は、すべてのウイルスを50 copies/reactionの感度で測定することが可能だった。本検査系を使用し、滑膜から分離した間葉系幹細胞31検体からDNAおよびRNAを抽出し上記ウイルスの検査を行った。いずれのウイルスも陰性(検出限界以下)だった。

A. 研究目的

再生医療・細胞治療では、生体由来組織・細胞を原材料として使用し、多くは培養した生細胞を治療に用いるため、原材料および最終製品を滅菌処理することにより安全性を確保することは事実上不可能である。したがって、微生物汚染の問題を克服し、安全な治療用細胞製剤を供給する体制を整えることが再生医療・細胞治療を実用化するために極めて重要である。生体材料には細菌・真菌・ウイルスなど多くの微生物が持続感染していることが知られており、微生物汚染の問題を回避するためには、培養工程中の外来微生物の混入の防止を

徹底するだけでは不十分である。したがって、患者に投与する前の最終製品を全数検査することにより治療の安全性を担保することが求められる。

本研究では、1. ヒトに持続感染することが知られているウイルスをリストアップし、2. それらを網羅的に検出可能な検査系を作成し、3. 滑膜および培養滑膜間葉系幹細胞のウイルス検査を通じてデータを蓄積し、4. 滑膜間葉系幹細胞を使用した軟骨再生医療の安全性を確立すること、を目的に研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. DNA ウイルスゲノムの増幅

DNA ウイルスのゲノムを PCR 法により増幅した。

- ・PCR 装置 : Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・PCR 反応 : 95°C10 分処理の後、95°C15 秒, 60°C60 秒の反応を 45 サイクル。
- ・PCR 試薬 : AmpliTaqGold & Gold Buffer (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・プライマー : 通常の合成 DNA を使用
- ・プローブ : Taqman Probe を使用

### 2. RNA ウイルス、レトロウイルスゲノムの増幅

RNA ウイルスおよびレトロウイルスゲノムを RT-PCR 法により増幅した。

- ・PCR 装置 : Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)
- ・逆転写反応 : 50°C30 分処理
- ・PCR 反応 : 95°C15 分処理の後、94°C15 秒, 60°C60 秒の反応を 45 サイクル
- ・RT-PCR 試薬 : QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen)
- ・プライマー : 通常の合成 DNA を使用
- ・プローブ : Taqman Probe を使用

### 3. プライマー、プローブ配列

#### ★GAPDH

F- tgtgetcccactcctgatttc

R- cctagtcccagggttttgatt

P-FAM-aaaagagctaggaaggacaggcaacttggc-iowaBlack

#### ★β-actin

F- cttccttcctgggcat

R- tcttcattgtgtgggt

P-FAM- tccgcaaagacctgtacgccaacac -iowaBk

#### ★HSV1 & 2

F-gctcagtgcgaaaaaacgttc

R-tgctggtgataaacgctcagt

P-FAM-gcgcaccagatccacgcccttgatgagc

-TAMRA

#### ★CMV

F- catgaaggtctttgcccagtac

R- ggccaaagtgtaggctacaatag

P- FAM-tggcccgtaggtcatccacactagg-TAMRA

#### ★VZV

F-tgtcctagaggaggttttatctg

R-catcgtctgtaaagacttaaccag

P-FAM-gggaaatcgagaaaccacccctatccgac

-iowaBk

#### ★EBV

F- cggaagccctctggacttc

R- cctgtttatccgatggaatg

P-FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-iowaBlack

#### ★HHV6

F- gacaatcacatgcctggataatg

R- tgtaagcgtgtgtaatggactaa

P-FAM-agcagctggcgaaaagtgtgtgc-iowaBlack

k

#### ★HHV7

F- cggaagtcactggagtaatgacaa

R- ccaatccttccgaaaccgat  
P- FAM-ctcgcagattgcttgtttffccatg-TAMRA  
★HHV8  
F- cggaagcctctggacttc  
R- ccctgtttatccgatggaatg  
P-  
FAM-tgtacacgcacgagaaatgccc-iowaBlack  
★BKV、JCV  
F- ggaaagtcttttagggtctttctacctt  
BKR- gatgaagattttattYtgccatgaRg  
JCR- gaagacctgttttccatgaaga  
P- FAM-atcactggcaaacat-MGB  
★ParvoB19  
F- gggtttcaagcacaagYagttaaaga  
R- cggYaaacttcttggaaatg  
P- FAM-cagctgcccctgtgg-MGB  
★HBV  
F- gtggtggacttctctcaatcttag  
R- ggacaMacgggcaacatacct  
P- FAM-tgtctgcgcgctttt-MGB  
★HTLV-1 & -2  
SHTF- ggcacctgtccagagca  
R1- ctgagccgataacgcgtcca  
R2- ctgagctgacaacgcgtcca  
P1- FAM-Mtcacctgggaccccatcgatgga-TAMRA  
★HIV-1  
F1- ggacatcaagcagcYatgcaaag  
F2- ggacaccaRgcagctatgcaaag  
R1- tgctatRtcaacttccccttggttctct  
R2- tgctatatcaacttcccctaggttcct  
R3- tgctatatcaacttcccctaggttctct  
P- FAM-acHatcaatgaggaagctgcagaa-MGB

★HIV-2  
F- gcaggtagagcctgggtgttc  
R - cttgcttctaaYtggcagctttatt  
P- FAM-tgggcagaYggctccacgc-TAMRA  
★HCV  
F- gtctagccatggcgttagta  
R- ctgcgaagcaccctatcaggcagt  
P- FAM- tgcggaaccggttagt -MGB

#### 4. 検査系の感度、特異性の検討

##### 1) DNA ウイルススタンダードの作成

各種ウイルスのPCR産物をクローニングし遺伝子配列を確認した後、制限酵素 ScaI 消化後に一本鎖にして精製し、OD 値を測定した。電気泳動の結果と OD 値からコピー数をもとめ、ロシユ社製 MS2RNA 10ng/ $\mu$ l 溶液にて段階希釈液を作成した。

##### 2) RNA ウイルススタンダード作成

各種ウイルスの RT-PCR 産物をクローニングし遺伝子配列を確認した後、制限酵素 Sal I (T7 RNA polymerase の場合) または Nco I (SP6 RNA polymerase の場合) 消化した後一本鎖にし、精製後 OD 値を測定した。RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (プロメガ) により RNA を合成し、添付のマニュアルに従い鋳型 DNA の分解後に RNA 精製した。バイオアナライザー2100 にて合成した RNA の定量と純度測定を行った。その結果よりコピー数をもとめ、ロシユ社製 MS2RNA 10ng/ $\mu$ l 溶液にて段階希釈液を作成した。

### 3) 感度測定

各種ウイルスが陰性であることを確認した細胞 DNA (0.5  $\mu$ g/well) に、作成した各種スタンダード 50 copy を加えたものを感度測定に用いた。

### 4) 特異性の確認

各種ウイルスプライマー、ブローブ配列の相同性を GenBank にて検索し特異性を確認した。またプライマー、ブローブ配列を引用した文献で実験的に特異性が調べられている場合は、その結果を採用した。陽性コントロールと特定のウイルスが検出された臨床検体を用いて、お互いの交差反応性の有無の確認をした。

#### (倫理面への配慮)

検体は、匿名化した上で受け取り、患者の個人情報と解析結果との連結が不可能なように配慮した。また、ウイルス検査以外の検査(遺伝子検査など)は一切行わないこととした。

## C. 研究結果

### 1. 検査系の感度測定

検査系の感度を測定するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞 DNA 0.5  $\mu$ g に各ウイルスのスタンダード DNA あるいは RNA を 50 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。作成したサンプルを使用した検討の結果、ウイルススタンダードを加えなかった場合は全て陰性だ

ったが、ウイルススタンダードを加えたサンプルからはすべて陽性シグナルが検出され、測定系は全てのウイルスに対して 50 copies/reaction の測定感度を持つことが確認された。

### 2. 特異性(交差反応性)の検討

検査結果が陽性の際に他のウイルスが誤って検出される交差反応の有無を確認するため、披検ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA 0.5  $\mu$ g に各ウイルスのスタンダードを 100~10000 コピー加えた測定用サンプルを各種ウイルス毎に作成した。測定の結果は、例えば CMV のスタンダード DNA ウイルスを加えた場合には CMV の測定用ウェルからのみ陽性シグナルを検出できたが、他のウイルス検出用のウェルからは陽性シグナルが検出できず、全て陰性で交差反応性は陰性と判定された。検査対象すべてに同様の測定を行なったが、すべてスタンダードを加えたウイルスの検出用ウェルのみ陽性で、他のウイルス検出用ウェルは陰性だった。したがって、検査対象ウイルス間には交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることが示された。

### 3. 間葉系幹細胞のウイルス検査

滑膜から分離した間葉系幹細胞 31 検体から DNA および RNA を抽出し上記ウイルスの検査を行ったところ、いずれのウイルスも

検出限界 (50 copies/reaction) 以下だった。

## D. 考察

### 1. 検査系の構築と感度

17種類のウイルスの検査系を作成した。すべての検査項目は 50 copies/reaction の検出感度を持つことが示された。測定項目によっては 5 copies/reaction の感度を持つものもあったが、50 copies/reaction ギリギリの感度の項目もあった。プライマー・プローブ配列の見直しを行い、感度の向上を目指したい。

### 2. HIV-1 の検出に関して

現在の検査系では、検出できる HIV-1 は主に M グループであるが、HIV-1 には他にも多数の遺伝子型が存在する。したがって、さらに多くの遺伝子型を検出できるようにする検査系の改良が必要である。しかし、現在臨床検査に用いられている主要な HIV-1 検査キットは M グループのみを検査対象としていることもあり、現在の検査系でも実用上問題となる事は少ないと考えている。

### 3. 特異性に関して

今回検討した限りにおいては、各プライマー、プローブ間に交差反応性はなく、特異的に被検ウイルスを検出できると考えられる。今後検査系の特異性、正確性をさらに高めていくためには、陽性シグナルが出

た場合増幅産物の遺伝子配列の決定、陽性ウイルスに対する他のプライマー・プローブを使用した検査、などの検証実験を重ねていく必要があるだろう。

### 4. 自動化への取り組み

現在、作成した検査系の自動化を目指し試薬の固相化と自動分注機との組み合わせに関する研究を行っている。通常の液体試薬を用いた場合に比べ、固相化試薬を用いた場合では結果がばらつく傾向がみられ、固相化試薬を溶解する段階に問題がある可能性がある。今後試薬の固相化法と溶解法の検討を継続して行う予定である。

### 5. 軟骨再生のウイルス安全性

滑膜由来間葉系幹細胞に対する 17 種類のウイルス検査結果はすべて陰性だった。健康人の骨髄液由来のサンプルから HHV6, HHV7, CMV, ParvoB19 が検出される例があることが報告されている。例数は少ないものの滑膜由来細胞からはウイルスは検出されなかったことから、軟骨再生に使用する間葉系幹細胞のソースとして滑膜は骨髄よりも安全性が高いことが示唆された。今後例数を増やし、検証を続ける予定である。

## E. 結論

17種類のウイルス (HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19, HTLV-1, -2, HIV1, HIV-2, HCV )

を 50 copies/reaction の感度で測定する検査系を作成した。滑膜から分離した間葉系幹細胞 31 検体から DNA および RNA を抽出し上記ウイルスの検査を行ったところ、いずれのウイルスも陰性（検出限界以下）だった。

## F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR.

Sugita S, **Shimizu N**, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Takase H, Sugamoto Y, Mochizuki M.

Br J Ophthalmol. 2011; 95:345-349.

2. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling.

Ng S, Selvarajan V, Hung G, Zhou J, L Feldman A, Low M, Kwong Y, **Shimizu N**, Kagami Y, Aozasa K.

J Pathol. 2011; 223:496-510.

3. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes.

Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai S, Yasuda A, **Shimizu N**, Tojo N.

LAB CHIP. 2011; 11:1166-1167.

4. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). Yagasaki H, Kato M, **Shimizu N**, Shichino H, Chin M, Mugishima H. Ann Hematol. 2011; 90(7):851-852.

5. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, **Shimizu N**, Sagawa K. Leukemia. 2011; 25(8):1324-1334.

6. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, **Shimizu N**, Mochizuki M. Jpn J Ophthalmol. 2011; Jul 13. 55(5):495-501.

7. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. Sugita S, Komori K, Ogawa M, Watanabe K, **Shimizu N**, Mochizuki M. Graefes Arch Clin Exp. 2012.250 : 391-398

8. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma.

Ng S, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong Y, Shimizu N, Aozasa K, Chng W. Blood. 4919-4929:4919-4929.2011 Nov 3.

9. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells.

Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. PLoS Pathogens, 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.

10. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice.

Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, Fujiwara S.

PloS ONE 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.

11. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas.

Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, Shimizu N, Rice A, D.Ling P. PLoS ONE, 2011;6(11):e27271. 2011 Nov

11

## 国内学会発表

1. 清水則夫

網羅的ウイルス・真菌 PCR 法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断

第33回日本造血細胞移植学会松山市

2011/3/10

2. 清水則夫

非血縁骨髄ドナー 由来の Chromosomal integrateHHV-6 (CIHHV-6) の1女児例

第33回日本造血細胞移植学会松山市

2011/3/10

3. 清水則夫

High levels of human cytokines were detected in a novel mouse xenograft model of CAEBV and EBV-HLH

日本血液学会 名古屋

2011/10/14-16

## 国際学会発表

1. 清水則夫

Imadome K, et al. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells.

XV International Congress of Virology, 2011, Sapporo, JAPAN.

- H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
分担研究報告書

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

研究分担者

赤澤 智宏 東京医科歯科大学・大学院・分子生命情報解析学 教授

研究要旨

膝関節の軟骨欠損に対して滑膜間葉系細胞を移植する軟骨再生治療法は、従来のマイクロフラクチャー法と比べて有効な治療法として期待されている。本研究では滑膜間葉系幹細胞の分化機構をiPS細胞と分子レベルで比較検証するために、軟骨分化に伴って蛍光タンパク質が緑色から赤色にスイッチする新規iPS細胞を樹立する。

A. 研究目的

日本で関節軟骨の細胞治療を受けている患者は年間 6000 人と推定されているが、その大半が、マイクロフラクチャー法を受けており有効性に疑問を持たれている。軟骨再生を目指したドナー細胞に関する基礎的解析は乏しい。本研究は滑膜間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生治療の効果を検証する基礎的な研究として、滑膜間葉系細胞と iPS 細胞から軟骨細胞細胞への分化機構を比較検討することを目的とする。

B. 研究方法

Nanog プロモータ制御下に EGFP、Sox9 または ColIII プロモータ制御下に mCherry を発現する組み換え iPS 細胞を樹立する。未分化な幼弱細胞で緑色蛍光、成熟した軟骨細胞に分化したときに赤色

蛍光を発する iPS 細胞を作成し、現在知られている軟骨分化のプロトコールの最適化を行う。

C. 研究結果

Sox9 プロモータ領域を含む BAC クローンに、大腸菌内相同組み換えを用いて mCherry を挿入することで、Sox9-mCherry を作成した。ATDC5 細胞にトランスフェクションして、軟骨分化条件で mCherry の発現誘導を調べたが、赤色蛍光は観察されず、mCherry mRNA も発現していなかった。そこで、Type II Collagen プロモータに mCherry を挿入し、ColII-mCherry を作成した。同様に ATDC5 細胞にトランスフェクションし、軟骨分化条件で観察したところ、分化に応じて赤色蛍光が観察された。この発現ベク

ターを Nanog-EGFP iPS 細胞にトランスフェクションして目的の iPS 細胞を樹立している。

#### D. 考察

Sox9 プロモータは調節領域が長く通常のプラスミドでは全調節領域を包含出来ない。そこで、組み換え BAC を用いて mCherry 発現をドライブしようと試みたが、BAC ベクターはトランスフェクションによって細胞内に取り込まれるコピー数が少ないため、蛍光蛋白を発現させるトータルの活性が低かったと考えられる。現在、iPS 細胞で蛍光の発現を解析中であるが、TypeII Collagen プロモータは機能していることが確認された。

#### E. 結論

Nanog プロモータ制御下に EGFP、ColII プロモータ制御下に mCherry を発現するベクターを作成した。ATDC5 細胞にトランスフェクションし、軟骨分化に応じて緑から赤に変化することが観察された。

#### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. Hara-Miyauchi C, Tsuji O, Hanyu A,

Okada S, Yasuda A, Fukano T, **Akazawa C**, Nakamura M, Imamura T, Matsuzaki Y, Okano HJ, Miyawaki A, Okano H. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Mar 9;419(2):188-93.

##### 2. Visualization of enteric neural crest cell migration in SOX10 transgenic mouse gut using time-lapse fluorescence imaging.

Miyahara K, Kato Y, Koga H, Dizon R, Lane GJ, Suzuki R, **Akazawa C**, Yamataka A.

J Pediatr Surg .

2011Dec;46(12):2305-8.

##### 3. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest.

Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, **Akazawa C**, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.

Mol Brain. 2011 Sep 23;4:34.

##### 2. 学会発表

該当無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

2009-001082、

赤澤智宏、井上高良、井上健、高坂新一。

トランスジェニック非ヒト動物(神経堤特異的蛍  
光標識マウス).

(財)ヒューマンサイエンス振興財団. 平成 21 年  
1月 6 日(再出願)

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
分担研究報告書

幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発と臨床応用

研究分担者

浅原 弘嗣 国立成育医療研究センター研究所

システム発生・再生医学研究部 部長 (平成23年4月～5月末)

東京医科歯科大学・大学院・システム発生・再生医学 教授 (平成23年6月～)

研究要旨

これまでの研究で我々は、滑膜由来間葉幹細胞が軟骨再生に有用であることを報告してきた(Arthritis Rheum. 2005,2006,2008; Cell Tissue Res. 2007, 2008; Stem Cells. 2007; Arthritis Res Ther. 2008; Osteoarthritis Cartilage. 2010)。現在、滑膜由来間葉幹細胞の浮遊液を軟骨欠損部に静置し、細胞を接着させる軟骨再生医療を行っている。本法は従来法よりも低侵襲である点が有用であるが、現時点で基礎研究に立ち戻り、より効率の良い、滑膜間葉幹細胞、あるいは更なる発展を目指しiPS細胞を用いた次世代の低侵襲軟骨再生治療の開発を行なうことが本研究の目的である。しかしながら、軟骨再生の品質評価を行なうにあたり基盤となる正常な軟骨分化メカニズムの詳細は未だ不明な点も多い。そこで本研究分担では、軟骨分化に重要なmiRNAであるmiR-140 (Gen Dev. 2010)の軟骨分化における詳細な機能について調査するために、miR-140の標的遺伝子の探索を行なった。さらに我々が構築した約1500個の転写関連因子のWhole-mount in situ hybridization (WISH) database "EMBRYNS" (Dev Cell. 2009)を用いて解析を行い、軟骨分化に関わる新たな因子の探索を行なった結果、Fox遺伝子群のいくつかが軟骨特異的に発現していることを見出した。

A. 研究目的

本研究では、軟骨再生治療の開発を行なうにあたり、その品質評価の基盤となる軟骨分化メカニズムについての解析を行った。我々は miR-140 が Adamts5 の抑制を介して関節軟骨の恒常性維持に関与すること、さらに軟骨細胞の分化にも関わることを報告しているが(Gen Dev. 2010)、より詳細な

軟骨分化での機能を解析するために、新たな標的遺伝子の探索を行なった。さらに軟骨分化に関わる新規遺伝子を同定するために、組織発生・分化に重要な役割を担う約1500個の転写因子・転写コファクターの胎生9.5-11.5のマウス胚を用いたWISHデータベース"EMBRYNS"により軟骨特異的な遺伝子について調査した。