

201207012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業 創薬バイオマーカー探索研究事業

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織
及びヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

(H23-バイオ-指定-007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成25(2013)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業 創薬バイオマーカー探索研究事業

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織
及びヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

(H23-バイオ-指定-007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 東歩

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織及びヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究	1
吉田 東歩	

II. 分担研究報告書

1. 新鮮組織・細胞の供給システムの整備・新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討	7
吉田 東歩	
2. 細胞の高品質化の検討	12
佐藤 元信	
3. 無血清培養法等の新規培養技術の関発	16
平 敏夫	
4. 温度調整機能・圧力調整機能を持たせた保存容器・輸送容器等の開発	24
清水 恭子	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	35
-----------------	----

創薬に向けたバイオマーカー探索研究に資するヒト組織及び ヒト組織由来細胞の供給・品質の向上に関する研究

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究代表者 吉田 東歩

研究要旨 バイオマーカー探索研究など創薬研究に役立つ国内自給型のヒト組織バンク事業を効率的に運用するため、組織の採取、輸送、保管、細胞調製、品質管理などについて技術開発を行った。ヒト組織・細胞を高品質で提供するための技術開発として、無血清培養法等新規培養技術および輸送・保存容器を開発した。

A. 研究目的

ヒューマンサイエンス(HS)研究資源バンクは、国内の研究機関や医療機関から収集した細胞株、遺伝子クローン、日本人由来 B 細胞株・DNA、ヒト組織を保管、増幅、品質管理を行い、産学官の研究者に分譲している。1995 年の設立以来、国内外の研究者から 30,002 件の分譲依頼を受け、80,128 試料を分譲した。

創薬シーズとなるバイオマーカーを発見し、知的財産を確保するためには、ヒト試料を収集し、供給する国内自給型のバンク事業を整備することが不可欠である。HS 研究資源バンクは、厚生科学審議会答申を受け、2001 年に国内初のヒト組織バンクを開設し、2007 年からは、国内の他機関では実施されていない新鮮組織の供給事業を開始した。外科手術で摘出された組織の提供を受け、冷蔵状態で研究機関に届けている。現在まで、医療機関から提供された新鮮組織を約 180 件研究機関に譲渡した実績がある。さらに、組織から調製した細胞の供給事業も開始した。

本研究は、(1)創薬バイオマーカー探索研究においてニーズの高い試料の充実、(2)疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織を新鮮組織として供給するシステムの整備、(3)高品質が保証される試料の加工技術の開発、(4)新規培養技術、(5)保存・輸送方法の開発、を通じてヒト組織・細胞の供給体制の確立と拡大を行い、我が国におけるヒト試料利用環境を整備することにより、効率的な創薬研究・医薬品開発の促進に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

1 新鮮組織・細胞の供給システムの整備

医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。国内でヒト組織バンクの統廃合の例はない。ヒト組織バンクの保管試料の移管及びヒト試料の供給事業の移管について HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した。また、移管後の運営を見据え、バイオハザード対策、提供された試料に対して連結不可能匿名化を連結可能匿名化に変更することの可否についても HS 振興財団の倫理審査委員会および資源供給審査委員会において検討した。

2 新鮮組織から細胞の調製

新鮮組織からの細胞調製の検討には滑膜細胞と脂肪前駆細胞を用いた。滑膜細胞は関節リウマチあるいは変形性関節症患者の人工関節置換手術、手関節形成手術で摘出された滑膜組織を用い、脂肪前駆細胞は消化器系癌手術で摘出された内臓脂肪組織を用いて調製した。各組織をコラゲナーゼ処理で分散し、10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37℃で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。滑膜細胞は 1 回継代後、脂肪前駆細胞は 3 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、緩慢凍結(1℃/分)後、液体室

素タンクの気相(-160℃)にて保存した。

3 細胞の高品質化の検討

新鮮組織から調製した細胞についてリアルタイム PCR 法により各種ウイルス(HBV、HCV、HIV)、梅毒菌の否定試験を検討した。滑膜細胞については炎症性サイトカイン TNF- α に対する反応性について、MMP-3、IL-6、関節リウマチ関連遺伝子等の産生を指標として解析した。滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討については、各細胞に分化誘導処理を行い、脂肪細胞や骨芽細胞の分化マーカーを調べた。

4 無血清培養法等の新規培養技術の開発

HS 研究資源バンクで調製したヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞を無血清培地で培養し、分化誘導を検討した。またヒト正常間葉系幹細胞の 11 株(国立成育医療研究センター・梅澤明弘らの研究グループによって寄託)について、間葉系幹細胞の骨芽細胞あるいは脂肪細胞への分化能を検証した。肝伊東細胞株 LI90 の培養性状を検討し、ヒト筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発について血清と様々な濃度の LiCl の継続処理または前処理により検討した。

5 保存容器・輸送容器等の開発

ヒト初代培養細胞等、温度変化による死滅や性状の変化を起こす試料を安定的に輸送するための 5℃、32℃輸送容器を試作し、日本国内の数カ所に季節を換えて発送、温度制御能力を検証した。電池ボックスを接続した定温輸送容器を、真空パネル埋め込み型クールボックスに設置した。その際、5℃設定時には予め-14℃程度に冷却した保冷剤 CV-2 500g(玉井化成)、32℃設定時には、37℃にて加熱した水溶性蓄熱材パッサーモ P-32 5 個(玉井化成)を、定温容器周辺に設置し、各々の定温輸送箱の温度センサーが設定温度以下になった場合、自動的に内部に仕込んだ面状ヒーターに自動的に通電され、加熱されるよう設定した。

海外輸送用として、上記 5℃輸送容器の耐久性、操作性を高めた改良型を試作し、様々な温度環境にて、温度制御能力を検証した。定温環境下で輸送された細胞の品質を評価するため、ラット臍島の遺伝子マーカーについて DNA アレイ、リアルタイム PCR にて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づ

いて実施した。研究代表者吉田及び研究分担者佐藤が所属する HS 研究資源バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては HS 振興財団・倫理審査委員会に諮り、試料ごとに上記の指針を踏まえた上での承認をうけて実施した。また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関でも機関内倫理審査委員会で承認を受けて実施した。HS 研究資源バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料である。これらのヒト試料は、HS 研究資源バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳重に行った上で国内の 14 医療機関から提供された。研究分担者清水及び平が所属する株式会社プライマリーセルにおいては、親会社であるコスモ・バイオ株式会社において、コスモ・バイオグループ生命倫理委員会に諮り、上記指針を踏まえて承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1 新鮮組織の供給システムの整備

平成 24 年度は、組織アレイの HS ヒト組織バンクからの供給について組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と協議した。組織アレイは作製技術の開発とともに的確な医療情報に基づく組織選択が重要である。今後、医療機関の病理部門、組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と連携し、ヒト組織バンクとして組織アレイの譲渡が可能な態勢作りを目指す。平成 24 年度は、利用希望の高い膵臓組織の供給を開始した。膵臓癌は、正常な組織の中にしみ込むように広がっていく特徴があるため、癌と正常組織との境界がはっきりせず、検査で見つけにくい。胃癌や大腸癌のように、癌部位と非癌部位に分けての提供は困難で、癌組織が混在する形での提供となった。滑膜については、関節リウマチ患者および変形性関節症患者由来の滑膜組織の対照として有用な正常滑膜の提供について医療機関と協議した。協議の結果、交通事故による関節内骨折の手術や骨折などにより変形した関節を人工股関節に入れ替える手術の際、正常滑膜の提供が可能であることが分かった。医療機関の倫理審査委員会にて承認後、供給を開始する。

ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。ヒト組織バンクについては、保管している凍結試料、固定試料、組織から調製した細胞等加工試料の 217 試料の移管及びヒト試料の

供給事業の移管について HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した。両倫理審査委員会で審議の結果、移管することが承認された。承認理由として、保管試料は連結不可能匿名化された試料であること、試料及び事業の移管は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿った処置であること、HS ヒト組織バンクと(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクが同等であること、HS 研究資源バンク・ヒト組織バンク担当者が引き続き当該業務を担当することで業務の継続性が確保される、等である。

今回、新鮮組織の取り扱いに焦点をあて、既知あるいは未知の病原性因子を含む可能性のある新鮮ヒト組織を安全に取り扱う上の標準作業手順書を作成した。また、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の改正に伴い、ヒト組織バンクで今後、連結可能な状態で供給することの是非について検討した。研究利用する立場からは、連結可能にすることで臨床情報や追跡情報の追加が可能となり、試料の有用性が増す。しかし、患者にインフォームド・コンセントを実施する際に、連結可能なことの説明を十分に行い、理解を得ることの困難性も議論された。

2 新鮮組織から効率よく細胞を調製する方法

新鮮組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで譲渡するシステムを整えた。滑膜細胞、脂肪前駆細胞とも解凍後の生細胞率は 90%以上であり、再培養可能であった。また、微生物汚染(細菌、真菌、マイコプラズマ)について検査した結果、汚染は認められなかった。平成 23 年度に調製した脂肪前駆細胞(5 ロット)について、解凍後の培養可能日数と継代可能な回数を調査した。培養可能日数の平均(±SD)は 70±21 日、継代が可能回数の平均(±SD)は 11.4±3.8 であった。平成 23 年度に調製したロットも含め、脂肪前駆細胞(10 ロット)、滑膜細胞(17 ロット)の機能性状をチェックし、品質上問題がないことを確認した後、HS 研究資源バンクホームページなどで譲渡開始を広報し、譲渡を始めた。

3 細胞の高品質化の検討

ヒト由来細胞のウイルス否定試験として、リアルタイム PCR 法による検出系を設定した。HCV、HIV の検出系として、HCV ゲノム DNA、HIV ゲノム DNA の塩基配列を基にした合成 DNA を陽性対照に用い、HCV 用、HIV 用の TaqMan Gene Expression Assay により、リアルタイム PCR を行った結果、良好な陽性反応が検出された。HS ヒト組織バンクで調製した 2 種類のヒト滑膜細胞について、cDNA 試料を用いて検出実験を行った結果、HCV ゲノム、HIV ゲノムは検出

されなかった。梅毒菌感染否定用としては、市販のキットを用いたリアルタイム PCR による同様の検出系において、陽性反応を確認し、利用可能であることを確認した。

関節リウマチ患者の滑膜組織より調製した滑膜細胞の機能的性状として、TNF- α による炎症反応性を関節リウマチ関連遺伝子(48 遺伝子)に関して調べ、関節リウマチ患者由来と変形性関節症患者由来の滑膜細胞について比較した。関節リウマチ患者由来では TNF- α 添加時に、CD80、IL-1 α 、IL-15、MMP-1、MMP-3、MMP-8、TLR2 等について mRNA 発現量の明確な増加が認められた。特に IL-1 α は顕著な発現増加を示した。変形性関節症由来では TNF- α 添加時に IL-15、MMP-1、TLR-2 について mRNA 発現量の増加が認められ、関節リウマチと同様の傾向を示したが、MMP-3、MMP-8 については発現増加の程度が小さい傾向を示した。また HLA-DQ、HLA-DR、TLR3~TLR9 については、関節リウマチ患者由来と変形性関節症由来、共に大きな発現変動は観察されなかった。また、関節リウマチ患者由来と変形性関節症由来、共に発現量が大きく減少する遺伝子は認められなかった。

滑膜細胞、脂肪前駆細胞について間葉系幹細胞の性状を調べた。両細胞について細胞免疫染色法により間葉系幹細胞マーカー及び多能性マーカーの mRNA レベルでの発現解析を行った。その結果、CD105、CD29、CD90 の発現、CD11b、CD48 の非発現(或いは明確な発現非検出)が認められ、様々な細胞への分化能を持つことが知られている骨髄由来間葉系幹細胞と同様な発現パターンを示した。また、4 種類の多能性マーカーについても発現が認められた。

4 無血清培養法等の新規培養技術の開発

無血清培養法に関しては、ヒト脂肪前駆細胞の無血清培養と分化誘導を試みた。脂肪細胞分化は認められるものの、従来の血清を含む培地による分化誘導能と比較した結果、さらなる条件検討が必要であることが明かとなった。

骨髄由来、遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株 9 株、臍帯血由来、遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株 2 株の合計 11 株について分化能を検証した。 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾンによる骨芽細胞への分化誘導の結果、ほぼ全ての細胞株について、骨芽細胞の分化が確認できた。脂肪細胞の分化は、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インスリンにより誘導し、全ての細胞株について確認できた。

伊東細胞は脂肪肝、繊維肝、肝硬変等の疾患

にかかわる細胞であり、重要な創薬ターゲットのひとつである。ヒト正常伊東細胞 LI90 株の細胞特異的マーカーの発現、脂肪滴の蓄積、TGF- β による活性化等の性状を検証した。LI90 細胞を α -smooth muscle actin (SMA)抗体により免疫蛍光染色すると、一部に SMA 陽性の細胞が確認された。また、デキサメサゾン、IBMX、インドメタシン、インシュリン処理により、微細ではあるが対照よりも増大した脂肪滴が誘導された。

ヒト正常筋芽細胞を分化誘導処理すると、7日目までには筋管様の構造の形成がみられた。馬血清 10%の処理においては、細胞が増殖したが、1%では増殖は抑えられた。また、dexamethasone, EGF は細胞の状態を良好にしたが、分化誘導には影響しないように思われた。いずれの処理においても、10 mM LiCl の添加は、myosin heavy chain 陽性の細胞の割合を高めた。

5 保存容器・輸送容器等の開発

ヒト初代培養細胞等、温度変化による死滅や性状の変化を起こす非凍結試料を安定的に輸送するための 32 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C 輸送容器を試作し、日本国内の数カ所に季節を換えて発送、温度制御能力を検証した。32 $^{\circ}$ C 用輸送容器では四季を通して、いずれの地域でも定温が保たれ、非凍結細胞の定温輸送に問題がないことが確認できた。5 $^{\circ}$ C 用輸送容器では、6 月八王子および京都に発送したものにおいて、発送後約 10 時間後から温度の上昇が認められたが、その原因として移動に伴う外気の急激な上昇により保冷剤が溶けた可能性が考えられたため、検証として保冷剤の使用数を 1 個追加し 5 個として 7 月に再度輸送試験を行った。その際、保冷剤の凍結・融解をモニターするために保冷剤付近に収容している電池ボックス脇にデータログを配置して温度を記録した。その結果、保冷剤を 5 個に増量した条件では約 6 $^{\circ}$ C 温度が保たれ、保冷剤の融解もなかった。盛夏時期である 8 月に保冷剤を 5 個使用して輸送試験を行ったところ、いずれも良好な輸送温度が保たれた。その後寒冷期である 12 月におこなった輸送試験でも良好な結果が得られていることから、国内輸送に関してはこの仕様で問題がないと考えられる。

海外輸送用として、上記 5 $^{\circ}$ C 輸送容器の耐久性、操作性を高めた改良型を試作し、様々な温度環境にて、温度制御能力を検証した。輸送を想定した期間中に温度の上昇が認められた。定温が保たれた時間は 30 分～3 日間で、輸入に最低限必要な 4 日間に至らなかった。梱包した状態を詳細に確認したところ、ヒーターの温度センサー埋め込み位置と保冷剤が直接接触していた可能性が判明した。このため、センサ

ーが輸送箱の実温度よりも低い温度を感知して通電し、ヒーターを過剰に作動させた可能性を疑い、低温輸送容器の壁面厚、蓋の形状および梱包方法に改良を加えた。しかし、根本的な改善はみられず、現在、さらに原因究明調査を継続中である。

定温環境下で輸送された細胞の品質を評価するため、ラット膵島の遺伝子マーカーについて DNA アレイ、リアルタイム PCR にて解析した。膵島輸送を想定したマーカー選定を行った結果、膵島 29 遺伝子、外分泌細胞 11 遺伝子を選定した。

D. 考察

国内自給型のヒト組織バンク事業は国内初の試みであり、HS 財団倫理審査委員会の審議に基づいて慎重に業務を進めた。10 年余りの実績として、14 医療機関から手術摘出組織を 492 試料受け入れ、51 研究機関へ 606 試料を譲渡した(一部は、受け入れた試料を分割し、譲渡を行った)。大きなトラブルはなかったが、譲渡は当初の想定数(年間 100 試料)を下回った。この理由は研究機関が望むバンクに対するニーズと現状が乖離しているためと考えられた。本研究においては、ヒト組織・細胞に対する研究者のニーズ調査を行い、高品質のヒト組織・細胞を効率よく研究者に供給するためのシステムや技術について検討した。

また、バンクの運営形態についても検討し、医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付で(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した結果、移管が承認された。国内のヒト組織バンクの統廃合の例はない。米国では、10 年間利用されなかったヒト組織は、廃棄、保管継続あるいは外部機関へ移管するルールがある。今後、ヒト組織バンクの統廃合で、貴重なヒト組織が失われないよう、インフォームド・コンセントの修正、ルール作りが必要であろう。また、今後は、ヒト組織バンク間で共通の処理法や品質管理法の標準作業手順書を作成し、これに従って調製したヒト組織を収集、保管すべきである。

ヒト試料の品質管理では、病原性ウイルス等の感染否定試験が重要である。今回、リアルタイム PCR 法による HCV 及び HIV 検出系について検討し、HBV 検出系と同程度の高感度な(検出限界;陽性対照 DNA 0.01 pg)試験系を設定した。両系共に、ウイルスゲノムの有無を迅速に判定可能である。今後、検

出用試料の調製に関しては、ウイルス陽性細胞を陽性対照に用いた検討を行う。また、当バンク保有のヒト由来の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞、及び日本人由来 B 細胞株等について、ウイルス感染否定試験を順次実施し、高品質化を図る予定である。

滑膜細胞について、TNF- α 添加時の遺伝子発現変動について関節リウマチ関連 48 遺伝子について調べ、これまでに確認している MMP-3 及び IL-6 の他に明らかな発現増加を示す遺伝子として、MMP-1、MMP-8、IL-15、IL-1 α 、TLR-2 等が認められた。関節リウマチ患者由来滑膜細胞の方が変形性関節症患者由来滑膜細胞に比べて発現増加を示す遺伝子が多く、その増加程度が大きい傾向が認められた。これらの遺伝子は、関節リウマチにおいて発現が促進されることが知られており、バンクで調製した滑膜細胞は、関節リウマチ患者の滑膜で生じる炎症反応をある程度反映していることが推測される。また変形性関節症患者由来滑膜細胞においても関節リウマチ患者由来滑膜細胞と類似した発現パターンが示されたことから、これらの炎症反応性は、滑膜細胞に共通する性状であることが推測された。

バンクで調製した滑膜細胞及び脂肪前駆細胞が、間葉系幹細胞マーカー及び 4 種類の多能性マーカーについて、骨髄由来間葉系幹細胞と同様な mRNA の発現パターンを示すことが分かり、脂肪細胞、骨芽細胞以外への幅広い分化能をもつことが考えられた。

無血清培地によるヒト組織由来細胞の培養を検討した結果、生理的インスリン濃度環境下および無血清培養環境下、いずれにおいても脂肪分化を確認することができた。特にヒト皮下脂肪細胞の生理的インスリン濃度環境下では分化効率が良かったが、他の 3 条件では分化効率が劣った。今後さらに検討を加えることにより分化効率を改善できる可能性が十分にあると考えられる。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクに登録されている 11 種類の TERT 遺伝子導入不死化ヒト間葉系幹細胞株の分化能を検証し、寄託者の指定する培地をベースとしてほぼ全ての細胞において骨芽細胞への分化能、脂肪細胞への分化能が確認できた。平成 23 年度におけるヒト正常間葉系幹細胞 27 種の分化能確認と合わせ、本研究で得られた成果は細胞研究利用者への重要な情報となる。本年度の研究で用いた分化誘導条件は、いずれもほぼ確立された手法であるが、ひとつの問題として、基本培地が血清を含んでいることが挙げられる。ヒト間葉系幹細胞を用いた創薬、再生医療研究には、無血清、成分既知の培地や、改善された分化誘導法が求められている。本研究では、寄託者により指定された培地を用いた分

化誘導を行ったが、今後は新規な無血清培地等の開発、分化誘導法の改善を計り、ヒト間葉系幹細胞の創薬研究への価値をさらに高めてゆきたい。

肝伊東細胞の培養法および性状の検討に関しては、ヒト肝伊東細胞株 LI90 が α -smooth muscle actin を発現していることが確認された。この結果は、LI90 細胞が活性化した肝伊東細胞としての性質を持つことを示している。活性化した肝伊東細胞は肝硬変をはじめとする肝疾患において重要な役割をはたすことから、本成果は、創薬研究における LI90 細胞の有用性を高める付加価値となった。また、LI90 細胞に対して脂肪滴を誘導する検討においては、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導と同様の手法によって脂肪滴の出現をみた。この結果は、伊東細胞が脂肪前駆細胞と類似した機構によって脂肪滴を形成することを示唆している。脂肪肝では伊東細胞にも中性脂肪が蓄積することが知られており、本成果は脂肪肝等の肝疾患への創薬研究への LI90 細胞の利用に役立つものと思われる。

温度調節機能を待たせた輸送容器の開発に関しては、国内用の 32 $^{\circ}$ C 輸送容器は、昨年度に試作した仕様で定温が保てることを実際の輸送試験で確認できた。5 $^{\circ}$ C 輸送容器では夏季の高温の影響を受けることが判明したが、保冷剤の数を増やすことで、定温が保たれていることが確認できた。また、電池ボックス連結により厳寒期や翌日到着が難しい地域にも容易に対応が可能となった。今後も継続的に実地データを蓄積し、将来的には非凍結細胞のみならず、移植用組織運搬や iPS 細胞などから分化した細胞の輸送など応用範囲を広げていきたいと考えている。海外用では今回の検討では至適条件の確立には至らなかった。保温性改善の目的で肉厚にするために外寸を大きくしたことにより、電池・ヒーター・保冷剤の容積バランスが崩れたと推測され、至適条件を確立するためには詳細な条件検討が必要と考えられた。

定温輸送細胞の品質評価系のモデルとして選定した腓島 29 遺伝子、外分泌細胞 11 遺伝子の有効性を証明するためには、年間を通して様々な気温環境下で、幅広いエリアへの実送試験データの蓄積が必要である。また、遺伝子発現解析データとグルコース刺激によるインスリン分泌試験との関連の検討も必要である。今後も継続的にこれらのデータの蓄積、輸送容器やその使用手順の改良を行いたい。

E. 結論

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、バイオマーカー探索研究を含む創薬研究に必要とされる組織・細胞についてニーズ調査を行い、組織アレイ、正常滑膜組織の供給を検討した。また、膵臓組織に

ついて新鮮組織の供給を開始した。また、バンクの運営形態についても検討し、HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所に移管することとなった。国内のヒト組織バンクの統廃合の例はないため、保管試料や事業を移管することの倫理的な問題について、(財)HS 振興財団および(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会において検証が行われ、移管が妥当と判断された。

新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討に関しては、変形性関節症患者由来の滑膜組織から滑膜細胞、糖尿病患者の大網脂肪組織から脂肪前駆細胞を効率よく分離することができた。調製細胞の一般性状、機能性状を調べ、研究資源化が可能であることを確認し、譲渡を開始した

細胞の高品質化の検討に関しては、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞株についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイム PCR 法を検討し、迅速かつ高感度な HCV、HIV 否定試験系を設定した。バンクで調製した新鮮組織由来細胞の機能的性状を精査するためにリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の発現解析により、滑膜細胞に関しては、TNF- α による反応性を関節リウマチ関連 48 遺伝子について調べ、関節リウマチの病態をある程度反映する有用な知見を得た。間葉系幹細胞としての滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の分化能に関する発現解析により、これらの細胞が多能性を有することが推測された。これらの資源の再生医療研究における利用が可能と考えられた。

無血清培養法に関しては、ヒト脂肪前駆細胞の無血清培養と分化誘導を試みた。脂肪細胞分化は認められるものの、従来の血清を含む培地による分化誘導能と比較した結果、さらなる条件検討が必要であることが明かとなった。培養技術に関しては、ヒト TERT 遺伝子導入不死化間葉系幹細胞株 11 株につき骨芽細胞、脂肪細胞への分化能の検査を行い、幹細胞としての性質が保証されることを確認した。また、ヒト正常伊東細胞 LI90 の細胞特異的マーカーの発現、脂肪滴の蓄積、TGF- β による活性化等の性状を検証し、LI90 細胞の品質を保証することができた。また、正常ヒト筋芽細胞を用い、Wnt 経路を活性化することによる簡便かつ効率の良い横紋筋への分化誘導法を開発した。横紋筋を用いたアッセイ系などへ

の応用が期待される。

温度調節機能を待たせた輸送容器の開発に関しては、生体機能を維持したヒト由来初代細胞を多くの研究者に提供することを目的として、非凍結状態での輸送技術の確立を試みた。本年度の研究では、昨年度に試作した定温輸送容器の性能試験を行うとともに、海外との輸出入仕様の容器を検討した。今回我々が開発した、乾電池で駆動が可能な定温輸送システムは、従来流通が不可能であった生細胞の輸送を可能とするものである。これにより、ごく一部の限られた施設でしか使用が叶わなかった細胞類も、今後は広範囲での使用が可能とできる可能性がある。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべき事項はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

新鮮組織・細胞の供給システムの整備・ 新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究代表者 吉田 東歩

研究要旨 新鮮組織・細胞の供給システムの整備のため、ニーズ調査を行い、膵臓組織の供給を可能とした。ヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所に移管することについて倫理審査委員会にて検証し、移管することが承認された。滑膜組織から滑膜細胞、内臓脂肪組織から脂肪前駆細胞を効率よく調製する方法を確立し、品質を確認後、調製した凍結細胞の譲渡を始めた。

A. 研究目的

ヒューマンサイエンス(HS)研究資源バンクは、国内の研究機関や医療機関から収集した細胞株、遺伝子クローン、日本人由来 B 細胞株・DNA、ヒト組織の保管、増幅、品質管理を行い、産学官の研究者に分譲している。1995 年の設立以来、国内外の研究者から 30,002 件の分譲依頼を受け、80,128 試料を分譲した。

2001 年、国内自給型としては日本で初めてとなる研究用ヒト組織バンクをスタートし、手術摘出組織の研究資源化に取り組んできた。バイオマーカー探索研究を含む創薬研究には、疾患・病態を反映したヒト組織や対照となる正常組織が必須の材料となる。欧米では、移植不適合臓器を研究利用するためのヒト組織バンクや組織から細胞などに加工処理する企業が多数存在する。日本では医療機関から研究用ヒト組織の入手は極めて困難な状況にあり、研究用ヒト組織は主に手術摘出組織に限定されるため、提供される組織量は少ない。この限られた条件下で、ヒト組織を有効利用するための技術開発がバンク事業の利用拡大に必要である。また、国の研究倫理指針に基づき、適正なルールに従ってヒト組織を供給するバンク事業を充実させることは、我が国におけるヒト組織利用環境を向上させ、創薬の研究基盤の整備につながる。

今回の研究では、ヒト組織バンク事業を効率的に進めるための技術、特にヒト組織・細胞を高品質な状

態で供給するため、採取、保管、輸送、加工、品質管理に関する技術開発を行った。平成 24 年度は、バイオマーカー探索研究を含む創薬研究に必要とされる組織・細胞についてニーズ調査を行い、ニーズの高い試料についてヒト組織バンクで取り扱う対象になりうるか医療機関と協議した。平成 25 年度から HS ヒト組織バンク事業を(独)医薬基盤研究所に移管することが決まった。保管試料や事業の移管に関して倫理面での問題点が存在するか否か、倫理審査委員会にて検証を行った。また、移管後の運営を見据え、バイオハザード対策、提供された試料に対して、連結不可能匿名化を連結可能匿名化に変更することについても検討した。手術摘出組織は提供される量が少ないため、効率よく新鮮組織から細胞に調製するための方法についても検討した。

B. 研究方法

1) ニーズ調査

創薬研究に利用するヒト組織・細胞について、HS 財団の一般事業委員会・研究資源委員会(製薬企業などの 14 社から構成)や各種学会・セミナーでの聞き取り調査、利用者からのバンクへの問い合わせなどに基づきニーズを調査した。調査項目は、研究目的、ニーズの高い組織・細胞の種類、必要量、試料数、摘出後の処理法、提供者の診療情報などである。

2) 新鮮組織の供給体制

HS ヒト組織バンクで取り扱う対象は、手術摘出組織の病変部位(多くは癌)とその周辺の正常部位で、病理診断に不要とされ、本来廃棄(焼却)される組織とした。提供者は、重篤な疾病の原因となる病原体の感染について陽性でないことが条件で、梅毒、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルスが陰性であることを条件に受け入れた。

提供者へのインフォームド・コンセントでは、組織がHSヒト組織バンクに提供され、様々な研究目的をもつ産学官の研究者に譲渡されることを説明し、同意を得た。従来から供給していた凍結組織、固定組織の場合、医療機関やバンクで保存が可能のため、HS財団倫理審査委員会です料ごとに個別審査を行い、承認後にバンクへの受け入れと研究機関へ譲渡を実施していた。新鮮組織の場合は、事前審査で包括承認を得た上で、承認された範囲の事例のみ供給を実施し、事後に倫理審査委員会です料報告した。供給に際して、手術数日前に医療機関から連絡を受け、バンクは複数の研究機関とマッチングを行い、譲渡先を決めた。当日、バンク担当者が医療機関でヒト組織を受け取り、連結不可能匿名化処理を行った上、診療情報を記載したデータシートと一緒に研究機関まで組織を冷蔵輸送した。

3) 新鮮組織から細胞の調製

滑膜細胞は以下の方法にて調製した。変形性関節症患者の人工関節置換手術で摘出された滑膜組織をHanks' balanced salt solutionで数回洗い、脂肪及び腱組織を取り除いた後、1 mg/ml コラゲナーゼ I を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)中にて 37°C、2 時間処理を行った。分散処理後の組織を 250 μ m ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後、沈殿した滑膜細胞を採取した。滑膜細胞は 10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37°C で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。1 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5 x 10⁵ cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1°C/分)し、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

脂肪前駆細胞は以下の方法で調製した。消化器癌で摘出された内臓脂肪組織(大網組織)をHanks' balanced salt solutionで数回洗い、眼科用ハサミで、血管や結合組織を取り除いた後、1mm 角に細切した。4 mg/ml コラゲナーゼ I を含む

Phosphate-buffered saline 液(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B、10%牛血清アルブミン含有)中にて 37°C、振とう(80 サイクル/分)しながら細胞が分散するまで 30~60 分間処理した。分散処理後の組織を 250 μ m ナイロンフィルターでろ過し、細胞塊を取り除き、遠心後、沈殿した脂肪前駆細胞を採取した。脂肪前駆細胞は 10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地(50 μ g/ml カナマイシン、0.25 μ g/ml アンフォテリシン B 含有)に懸濁し、5%CO₂、37°C で培養した。継代には 0.25%トリプシン-0.02%EDTA を用いた。3 回継代後、増殖した細胞をトリプシン処理し、細胞凍結保存液(十慈フィールド製、セルバンカー)に懸濁し(約 5 x 10⁵ cells/ml/チューブ)、プラグラミング・フリーザーにて緩慢凍結(1°C/分)し、液体窒素タンクの気相(-160°C)にて保存した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施した。HS 研究資源バンクにおいては、ヒト試料の取扱いに関しては HS 振興財団・倫理審査委員会に諮り、試料ごとに上記の指針を踏まえた上での承認をうけて実施した。

また、ヒト試料の提供医療機関、供給を受ける研究機関でも機関内倫理審査委員会です料承認を受けて実施した。HS 研究資源バンクで取り扱う対象は、外科手術等で摘出され、診断などに不要と判断された組織またはその組織に由来する試料とした。これらのヒト試料は、HS 研究資源バンクに提供することについて提供者への十分な説明と同意のもとに、連結不可能匿名化などの個人情報保護に係る手続きを厳重に行った上で国内の医療機関から提供された。

C. 研究結果

1) ニーズ調査

平成 23 年度に実施したニーズ調査では、新鮮組織の供給に加え、組織から分離した細胞、組織アレイなど創薬研究にすぐに利用できる試料の利用希望が高かった。今回は、組織アレイについてニーズ調査を行い、供給の可能性について検討した。組織アレイは、数百の組織切片を1枚のスライドガラス上に搭載し、一度に検査することのできる比較的新しい研究技法で、バイオマーカー探索研究に極めて有用である。組織アレイを抗体で免疫染色を行うことによりタンパク質の発現プロファイルが得られ、さらに各症例の臨床情報との相関解析が可能となる。遺伝子発

現についても mRNA 発現量を測定し、疾患ごとの分布を調べることができる。

利用したい組織アレイの種類として、各種正常組織のアレイ、各種癌組織のアレイ、単一癌組織の多数患者症例を集積したアレイ等があげられた。組織としてはホルマリン固定組織から作製したアレイと凍結組織から作製したアレイである。特に利用希望が多かったのは抗体医薬の治験許可申請において、米国食品医薬品局(FDA)が要求する臓器・器官に関する交差反応性のデータ取得に利用可能な組織アレイであった。

組織アレイは国内で調製される例は少なく、海外からの輸入品が利用されている。今回、組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と組織アレイの開発について協議した。組織アレイは作製技術の開発とともに的確な医療情報に基づく組織選択が重要であることが分かった。今後、医療機関の病理部門、組織アレイ作製の受託を請け負うベンチャー企業と連携し、ヒト組織バンクとして組織アレイの譲渡が可能な態勢作りを目指す。

2) 新鮮組織の供給システムの整備

新鮮組織の供給システムの整備に関しては、平成 24 年度、膵臓の新鮮組織の供給を開始した。膵臓組織は、糖尿病や膵臓癌の研究、糖尿病治療薬研究用として利用希望は多い。膵臓癌の場合、放射線や抗癌剤による治療も行われているが、手術で癌を取りきることが、唯一の完治への道であり、手術摘出の膵臓組織をバンクに提供していただくことは可能である。膵臓癌は、正常な組織の中にしみ込むように広がっていく特徴があるため、癌と正常組織との境界がはっきりせず、検査で見つけにくいいため、胃癌や大腸癌のように、癌部位と非癌部位に分けての提供は困難で、癌組織が混在する形での提供となることが分かった。

滑膜については、正常滑膜の提供の可否について医療機関と協議した。従来は、関節リウマチ患者および変形性関節症患者が人工関節置換手術を受ける際に摘出される滑膜組織の提供を受けてきた。欧米では、遺体から摘出された組織を研究用として供給するシステムが存在し、関節の疾患をもたない提供者から正常滑膜を得ている。日本では遺体からの研究用組織を供給するシステムはない。今回、提供医療機関と協議し、交通事故による関節内骨折の手術や骨折などにより変形した関節を人工股関節に入れ替える手術の際、正常滑膜の提供が可能であることが分かった。医療機関の倫理審査委員会にて、バンクへの正常滑膜の提供についての案件が上程さ

れており、承認され次第、供給を開始する。関節リウマチ患者および変形性関節症患者由来の滑膜組織の対照として正常滑膜はきわめて有用な試料となる。

平成 24 年度、HS ヒト組織バンクから研究機関へ譲渡した新鮮組織は 22 試料であり、組織の種類は、関節リウマチ患者由来滑膜組織 11 試料、変形性関節症患者由来滑膜組織 9 試料、大腸(癌/非癌部位ペア) 1 試料、膵臓(癌と非癌部位が混在) 1 試料であった。提供者(22 名)の内訳は、男性 18%、女性 82%で、女性の罹患率が高い関節リウマチ患者あるいは変形性関節症患者からの滑膜の提供例が提供数の 90%を占めたことから女性の比率が高まった。提供者の年齢の範囲は 58~86 歳で平均年齢は 68 歳であった。組織摘出後、組織を冷蔵処理するまでの時間は、1時間以内が 95%を占めた。提供された組織量の平均値は約 7.2 グラムであり、米国で研究利用されている移植不適合臓器と異なり、手術摘出組織の提供量は少なかった。

医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含む HS 研究資源バンクの全事業が平成 25 年 4 月 1 日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。ヒト組織バンクについては、保管している凍結試料、固定試料、組織から調製した細胞等加工試料の 217 試料の移管及びヒト試料の供給事業の移管について HS 振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した。両倫理審査委員会にて審議の結果、保管試料を(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクに移管すること、及び HS ヒト組織バンクが実施しているヒト試料供給事業を(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクに移管することが承認された。HS ヒト組織バンクで保管している試料はインフォームド・コンセントにおいて、「HS ヒト組織バンクへ提供され、研究者へ譲渡される」ことの説明と同意が得られているが、連結不可能匿名化されているため、(独)医薬基盤研究所へ移管されることの再同意を得ることは不可能である。「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」では連結不可能匿名化試料は当該倫理審査委員会の承認と研究を行う機関の長の許可を受けたとき移管が可能であると記載されている。HS ヒト組織バンクと(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクは準拠する国の研究倫理指針、運営方法、インフォームド・コンセント等において同等であり、両者とも非営利・公共的な研究資源バンクである。以上の点に加え、HS ヒト組織バンク担当者が引き続き当該業務を担当することで業務の継続性が確保されることも考慮し、移管が承認された。

3) バイオハザード対策

HS ヒト組織バンクでは、重篤な感染症の患者の組織は取り扱わない。また、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エイズウイルス、梅毒の臨床検査結果が陰性の患者についてバンクへの提供をお願いしている。譲渡先の研究機関でのバイオハザード対策はバンクでは確認しにくく、また多くの研究機関が病原性のない試料を要望することに起因する。HSヒト組織バンクでは、バンク内の作業での安全性の確保のため、「ヒト組織等取り扱いマニュアル」を作成している。今回、新鮮組織の取り扱いに焦点をあて、既知あるいは未知の病原性因子を含む可能性のある新鮮ヒト組織を安全に取り扱う上の以下のチェックポイントを検討し、新たな標準作業手順書を作成した。

1. 収集、運搬時の梱包は確実に封印し、組織を直接扱う運搬人や実験者に、組織が暴露されないようにすること。
2. 医療用輸送会社を用いて新鮮組織を運搬する際、機械的圧力に強い、外装ケースの使用すること。
3. ヒト組織の廃棄するための厳密な手順に従い、処理する。
4. 上記のリスクに係わる人間の数は最小限にすべし、これらのリスクが自分に係わるということを十分に認識し、バイオハザード対策に関する訓練を定期的実施する。

4) 新鮮組織の提供についての倫理面の検証

HS ヒト組織バンク運営の基本としている「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」は全面的な改正が行われ、平成 25 年 4 月 1 日、施行された。改正前は「ヒト細胞・遺伝子・組織バンク」が他の機関に試料等を分譲する際には、連結不可能匿名化することが原則であったが、今回の改正で、連結可能匿名化の状態を提供することが可能であることが明記された。

ヒト組織バンクで今後、連結可能な状態で供給することの是非について、HS 振興財団の倫理審査委員会および資源供給審査委員会にて検討した。研究利用する立場からは、連結可能にすることで臨床情報や追跡情報の追加が可能となり、試料の有用性が増す。しかし、患者にインフォームド・コンセントを実施する際に、連結可能なことの説明を十分に行い、理解を得ることの困難性も議論された。

両委員会では、インフォームド・コンセントの在り方についても以下のとおり議論された。医療機関では、バンク提供のインフォームド・コンセント取得が難しいとの意見がある。ヒト組織バンクの存在が市民に周知されることが大事で、市民向け、医療関係者向け、研究者向けにそれぞれに対するパンフレット、ポ

スターを作成、配布し、講演会やマスコミを通じて広報する。病院の待合室にポスター、パンフレットを置くことが有効である。また、バンクの役割を明らかにするため、提供した組織がどのような使われ方をしたのか（研究機関、研究内容、医療への貢献）について、パンフレット等に記載する。インフォームド・コンセントの在り方について、コーディネーターの養成を目的とした研修会（研究会）の開催、研修用ビデオの作成。臓器移植ネットワーク・移植用組織バンクとの協力関係を築くことも必要である。

5) 細胞の調製

新鮮組織から滑膜細胞、脂肪前駆細胞を調製し、凍結チューブで譲渡するシステムを整えた。本年度は滑膜細胞と内臓脂肪前駆細胞については各 1 ロット調製し、譲渡可能な資源とした。滑膜細胞は、変形性関節症の 60 歳男性、人工関節置換手術で摘出された膝滑膜 9.7 グラムを使用した。培養した結果、 4.5×10^5 cells/tube の凍結チューブを 50 本調製した。内臓脂肪前駆細胞は、糖尿病をもつ 60 歳代男性の胃癌手術で摘出された大網脂肪組織 7.0 グラムを使用した。培養した結果、 2.4×10^5 cells/tube の凍結チューブを 20 本調製した。滑膜細胞、脂肪前駆細胞とも解凍後の生細胞率は 90%以上であり、再培養可能であった。また、微生物汚染（細菌、真菌、マイコプラズマ）について検査した結果、汚染は認められなかった。

平成 23 年度に調製した脂肪前駆細胞（5 ロット）について、解凍後の培養可能日数と継代可能な回数を調査した。各ロットの凍結細胞を 37℃温水中で振とうし、急速融解し、25cm² フラスコに播種した。細胞密度がほぼ飽和状態になった状態で、1:2 の割合で継代し、3~4 日ごとに培地交換した。全ロット（5 ロット）とも解凍後 3 回の継代までの細胞は増殖能力が安定していたが、継代 4 回以降は、ロットごとに増殖能力の違いが認められ、徐々に増殖が遅くなり、最終的には細胞が肥大化し、分裂しなくなった。培養可能日数の平均（±SD）は 70 ± 21 日、継代が可能回数の平均（±SD）は 11.4 ± 3.8 であった。

平成 23 年度に調製したロットも含め、脂肪前駆細胞（10 ロット）、滑膜細胞（17 ロット）の機能性状をチェックし、品質上問題がないことを確認した後、HS 研究資源バンクホームページなどで譲渡開始を広報し、譲渡を始めた。

D. 考察

国内自給型のヒト組織バンク事業は国内初の試みであり、HS 財団倫理審査委員会の審議に基づい

て慎重に業務を進めた。10年余りの実績として、14医療機関から手術摘出組織を492試料受け入れ、51研究機関へ606試料を譲渡した(一部は、受け入れた試料を分割し、譲渡を行った)。大きなトラブルはなかったが、譲渡は当初の想定数(年間100試料)を下回った。この理由は研究機関が望むバンクに対するニーズと現状が乖離しているためと考えられた。本研究においては、ヒト組織・細胞に対する研究者のニーズ調査を行い、高品質のヒト組織・細胞を効率よく研究者に供給するためのシステムや技術について検討した。

また、バンクを運営する組織についても、検討した。医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含むHS研究資源バンクの全事業が平成25年4月1日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。HS振興財団及び(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会にて審議した結果、移管が承認された。承認理由として、保管試料は連結不可能匿名化された試料であること、試料及び事業の移管は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿った処置であること、HSヒト組織バンクと(独)医薬基盤研究所・難病研究資源バンクが同等であること、HS研究資源バンク・ヒト組織バンク担当者が引き続き当該業務を担当することで業務の継続性が確保される、等である。国内のヒト組織バンクの統廃合の例はない。米国では、10年間利用されなかったヒト組織は、廃棄、保管継続あるいは外部機関へ移管するルールがある。今後、ヒト組織バンクの統廃合で、貴重なヒト組織が失われまいよう、インフォームド・コンセントの修正、ルール作りが必要であろう。また、国内で保管されているヒト組織は品質が悪いものも含まれている。今後は、ヒト組織バンク間で共通の処理法や品質管理法の標準作業手順書を作成し、これに従って調製したヒト組織を収集、保管すべきである。

過去10年間でHSヒト組織バンクへ提供された組織量の平均値は約4グラムであった。米国で研究利用されている移植不適合臓器と異なり、手術摘出組織の提供量は少ない。手術担当医が提供部位を決め、手術室近辺で冷蔵処理される例もある。提供には病理部門の協力が必要で、関東地区の医療機関の場合、病理医の協力(手術室に待機)を得ることにより、提供組織量が増加した例もあった。医師、病理医、臨床検査技師、コーディネーターの方々にヒト組織バンク業務に対する理解を深め、協力を得られることにより、高品質の組織提供が可能となる。

今回、滑膜細胞と脂肪前駆細胞を少ない組織から効率よく調製する方法を確立した。欧米では組

織から細胞を調製し、供給する企業が存在するが、国内には無い。国内で細胞を供給する事業を開始するためには、組織量の少ない手術摘出組織から効率よく細胞を調製するための技術開発が必要となる。また欧米で細胞調製用として利用される移植不適合臓器と手術摘出組織は摘出前後の処理法が異なるため、細胞の性状が異なる可能性がある。広く研究資源として供給するためには、高い品質をもつ細胞を調製する技術と品質管理法の開発が必要である。

E. 結論

バイオマーカー探索研究を含む創薬研究に必要とされる組織・細胞についてニーズ調査を行い、組織アレイ、正常滑膜組織の供給を検討した。また、膵臓組織については、新鮮組織の供給を開始した。

医薬品等の研究開発に必要とされる生物資源の効率的な活用を促進するため、ヒト組織バンクを含むHS研究資源バンクの全事業が平成25年4月1日付けで(独)医薬基盤研究所に移管されることとなった。国内のヒト組織バンクの統廃合の例はないため、保管試料や事業を移管することの倫理的な問題について、(財)HS振興財団および(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会において検証が行われ、移管が妥当と判断された。

新鮮組織から細胞を効率よく調製する方法の検討に関しては、変形性関節症患者由来の滑膜組織から滑膜細胞、糖尿病患者の大網脂肪組織から脂肪前駆細胞を効率よく分離することができた。調製細胞の一般性状、機能性状を調べ、研究資源化が可能であることを確認し、譲渡を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

細胞の高品質化の検討

所 属 (財)ヒューマンサイエンス振興財団
研究資源バンク
研究分担者 佐藤 元信

研究要旨 研究資源バンクから供給するヒト細胞の高品質化を図るため、ウイルス否定試験の検討、滑膜細胞の炎症性サイトカイン反応性や脂肪前駆細胞の機能性状の解析、両細胞の間葉系幹細胞としての分化能確認等について検討した。

A. 研究目的

ヒト細胞は、創薬研究・医薬品開発の重要なツールである。本研究では、研究資源バンクが供給しているヒト細胞についてのウイルス等否定試験の検討、滑膜細胞・脂肪前駆細胞の機能的性状解析、分化能の検討などの多角的な研究を行い、バンクが供給するヒト細胞の品質の恒常性を保つと同時に、高品質化、付加情報の充実により、バイオマーカー探索研究をはじめとする我が国の創薬研究の基盤を向上させることを目的とした。

1) ウイルス(HCV, HIV)及び梅毒菌(TP)否定試験

ヒト細胞を用いた研究においては、試料が病原体で汚染されていないことが要求される。バンクのヒト試料に関しては、提供者が重篤な病原体に感染していないことを医療機関で確認した試料を提供している。本研究では、さらなる品質の向上のため、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイムPCR法を検討した。中間報告ではHBV否定試験系について報告し、今回はHIV、HCV、TP否定試験系について報告する。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

中間報告では当バンクで新鮮組織から調製した滑膜細胞において炎症性サイトカイン TNF- α に対する反応性について解析し、機能的性状に関する有用な情報を得た。今回はこの炎症反応に関して詳細な解析を行った結果を報告する。

3) 滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞とし

ての分化能に関する検討

滑膜細胞及び脂肪前駆細胞は、間葉系幹細胞の性状を示すことが知られており、再生医療のソースとして注目されている。そこで、バンク調製の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の性状に関する付加情報を充実させるために、分化能について検討した。幹細胞マーカーの発現に関して検討した結果を報告する。

B. 研究方法

1) ウイルス(HCV, HIV)及び梅毒菌(TP)否定試験

HCV及びHIVウイルスの検出系として、リアルタイムPCRシステム(StepOne Plus System、Presence/Absence Mode)を用いた。陽性対照としては、ゲノムDNAよりデザインした合成DNA(HIV用;IV:260bp/pUC57、208-408 Gene Bank mRNA AF009606.1、HIV用;IV:260bp/pUC57、440-740 Gene Bank mRNA K03455.1)を用いた。HCV及びHIVウイルス検出用のプローブ/プライマーにはTaqMan Gene Expression Assay (ABI)を用いた。PCR反応はABI社のプロトコールに従い、以下の条件で実施した。

反応組成:陽性対照合成DNA 1 μ l (1 pg)或いは関節リウマチ患者由来滑膜細胞 cDNA 1 μ l、TaqMan Gene Expression Assay (HCV 或いは HIV 用) 1 μ l、TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l、大塚蒸留水 8 μ l。反応条件: 50 $^{\circ}$ C、2分 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C、20秒 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C、1秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、20秒) \times 40 サイクル、反応時間:約 2 時間。滑膜細胞由来 cDNA は、TaqMan Fast Cell to CT Kit (ABI)により調製した。TP 検出系には、市販の Treorema Pallidum Real-TM Kit

(SacaceBiotechnologies)を用い、プロトコールに従い実施した。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

滑膜細胞を24時間、通常培養後に無血清培地(DMEM)と交換し、さらに24時間培養した時点で、TNF- α (10 ng/ml、recombinant TNF- α 、R&D Systems)を培養系に添加して、24時間培養した。細胞よりTaqMan Fast Cell to CT Kit (ABI)によりcDNAを調製し、リアルタイムPCR用の解析試料とした。リアルタイムPCRは以下の条件により実施した。リアルタイムPCRシステム: StepOne Plus System、Quantitation-Comparative Mode。解析用プレート: Rheumatoid Array 96-well plate(ABI)。反応組成: cDNA 2 μ l、TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l、大塚蒸留水 8 μ l。反応条件: 95 $^{\circ}$ C、20秒 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C、1秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、20秒) \times 40 サイクル、反応時間: 約40分。相対的mRNA発現量はhuman G3PDHを基準として求めた。

3) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能に関する検討

滑膜細胞或いは脂肪前駆細胞よりTaqMan Fast Cell to CT Kit (ABI)を用いてcDNAを調製した。リアルタイムPCRは以下の条件により実施した。リアルタイムPCRシステム: StepOne Plus System、Quantitation-Comparative Mode。反応組成: cDNA 2 μ l、TaqMan Gene Expression Assay (各種間葉系幹細胞マーカー及び多能性マーカー用) 1 μ l、TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l、大塚蒸留水 8 μ l。反応条件: 95 $^{\circ}$ C、20秒 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C、1秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、20秒) \times 40 サイクル、反応時間: 約40分。相対的mRNA発現量はhuman G3PDHを基準として求めた。

C. 研究結果

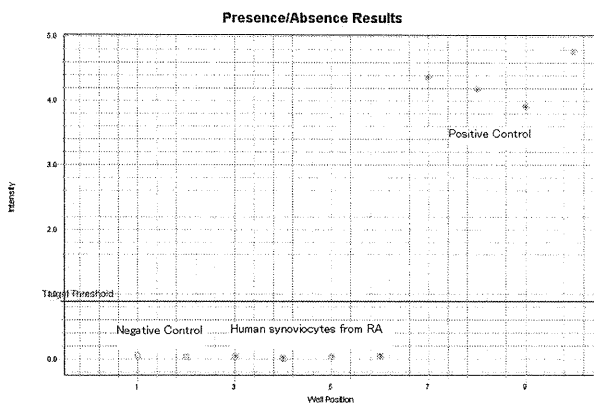
1) ウイルス(HCV、HIV)及び梅毒菌(TP)否定試験

ヒト由来細胞のウイルス否定試験として、リアルタイムPCR法による検出系を設定した。HCVの検出系として、HCVゲノムDNAの塩基配列を基にした合成DNAを陽性対照に用い、HCV用のTaqMan Gene Expression Assayにより、リアルタイムPCR (StepOne Plus System、Presence/Absence Mode)を行った結果、良好な陽性反応が検出された。当バンク保有の2種類のヒト滑膜細胞について、cDNA試料を用いて検出実験を行った結果(n=2)を示す(図1)。

陽性対照の判定が Presence となる測定条件下に

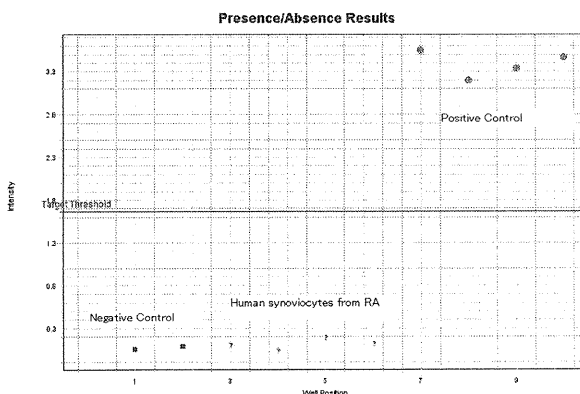
おいて、滑膜細胞由来試料は、いずれも陰性対照と同様に Absence と判定され、HCVゲノムは検出されなかった。以上の結果からヒト滑膜細胞についてHCVによる感染は否定された。

【図1】HCV感染否定試験



また同様に HIV の検出系として、HIVゲノムDNAの塩基配列を基にした合成DNAを陽性対照に用い、HIV用のTaqMan Gene Expression Assayにより、リアルタイムPCR (StepOne Plus System、Presence/Absence Mode)を行った結果、良好な陽性反応が検出された(図2)。滑膜細胞由来試料は、Absence と判定され、HIVゲノムは検出されず、HIVによる感染は否定された。

【図2】HIV感染否定試験



TP感染否定用としては、市販のキットを用いたリアルタイムPCRによる同様の検出系において、陽性反応を確認し利用可能であることを確認した。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

中間報告では関節リウマチ患者の滑膜組織より調製した滑膜細胞の機能的性状として、TNF- α によるMMP-3とIL-6の産生を指標とした炎症反応性を、タンパク質レベルとmRNAレベルにおいて確認した。

そこで次にこの炎症反応性をより詳細にその他の関節リウマチ関連遺伝子(48 遺伝子)に関して調べ、関節リウマチ患者由来と変形性関節症患者由来の滑膜細胞について比較した。代表的な解析結果を表 1 に示す。

Target Name	Human Synovocytes	
	OA	RA
HPRT1	2.4	1.5
GUSB	1.1	1
CD28	-	1.7
CD4	0.6	0.6
CD40	2.6	4.1
CD40LG	-	-
CD80	-	10.1
FCER1A1	-	-
FCER1G	3.0	2.8
HLA-DQA1	-	1.8
HLA-DQB1	1.5	2.3
HLA-DRA	1.1	1.4
HLA-DRB1	1.3	1.4
HLA-DRB3	1.8	-
HLA-DRB4	-	-
IL1A	-	520.9
IL2	-	-
IL12A	1.1	1.7
IL12B	-	-
IL15	17.7	14.3
IL17A	-	-
IL18	2.7	6.8
LTA	-	-
MMP1	26.0	7.6
MMP2	1.7	2
MMP3	4.2	29.5
MMP7	1.4	-
MMP8	-	19.3
MMP9	3.5	4.7
MMP10	7.8	2.4
MMP12	0.9	-
MMP13	0.9	5.5
TLR1	8.5	2.9
TLR2	47.0	77.1
TLR3	1.2	3.4
TLR4	0.4	0.7
TLR5	5.2	1.2
TLR6	1.6	1.3
TLR7	-	4.8
TLR8	-	-
TLR9	0.3	0.4
TNF	-	10.4
TNFRSF11A	10.6	4.1
TNFSF11	-	0.3

TNF- α 添加時の各遺伝子の発現比をGAPDHの発現量を標準として示す。10倍以上を灰色で表示する。-表示は検出限界以下或いは算出不可である。

関節リウマチ由来では TNF- α 添加時に、CD80、IL-1 α 、IL-15、MMP-1、MMP-3、MMP-8、TLR2 等について mRNA 発現量の明確な増加が認められた。特に IL-1 α は顕著な発現増加を示した。変形性関節症由来では TNF- α 添加時に、IL-15、MMP-1、TLR-2 について mRNA 発現量の増加が認められ、関節リウマチ由来と同様の傾向を示したが、MMP-3、MMP-8 については発現増加の程度が小さい傾向を示した。また HLA-DQ、HLA-DR、TLR3~TLR9 については、関節リウマチ由来と変形性関節症由来、共に大きな発現変動は観察されなかった。また、両由来、共に発現量が大きく減少する遺伝子は認められなかった。

3) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

中間報告において、関節リウマチ患者由来滑膜細胞及び変形性関節症患者由来滑膜細胞は、細胞免疫染色解析により間葉系幹細胞マーカーCD105が陽性を示し、脂肪細胞或いは骨芽細胞への分化能をもつことが認められた。そこで、さらに代表的な間葉系幹細胞マーカー及び多能性マーカーに関して mRNA レベルでの詳細な発現解析を行った(表 1、表 2)。その結果、CD105、CD29、CD90 の発現、CD11b、CD48 の非発現(或いは明確な発現非検出)が認められ、様々な細胞への分化能を持つことが知られている骨髄由来間葉系幹細胞と同様な発現パターンを示した。また、4 種類の多能性マーカーについても発現が認められた(表 2)。

間葉系幹細胞の性状を示し、脂肪細胞或いは骨芽細胞への分化能をもつ脂肪前駆細胞(非糖尿病由来及び糖尿病由来)についても、同様の解析を行った結果、滑膜細胞と同様な間葉系幹細胞マーカー及び多能性マーカーの発現パターンが認められた。

表 1 間葉系幹細胞マーカーの発現解析

(+;発現 -;非発現 \pm ;明確な発現非検出)

DB:糖尿病由来 RA:関節リウマチ由来 OA:変形性関節症由来

	CD105	CD29	CD11b	CD90	CD34	CD45
脂肪前駆細胞(DB)	+	+	-	+	\pm	\pm
脂肪前駆細胞(non DB)	+	+	\pm	+	\pm	\pm
滑膜細胞(RA)	+	+	-	+	\pm	\pm
滑膜細胞(OA)	+	+	\pm	+	\pm	\pm

表 2 幹細胞マーカー(多能性マーカー)の発現解析

	Oct-4	Sox-2	Klf-4	Nanog
脂肪前駆細胞(non DB)	+	+	+	+
脂肪前駆細胞(DB)	+	+	+	+
滑膜細胞(RA)	+	+	+	+
滑膜細胞(OA)	+	+	+	+

D. 考察

1) ウイルス(HCV、HIV)及び梅毒菌(TP)否定試験

中間報告において、リアルタイム PCR 法による高感度な HBV 検出用試験系(ウイルスゲノム DNA の存在/非存在を自動判定するシステム)を設定し、ウイルス否定試験系として効率的で有用なことを確認した。今回 HBV 検出系と同様に、リアルタイム PCR 法による HCV 及び HIV 検出系について検討し、HBV 検出系と同程度の高感度な(検出限界;陽性対照

DNA 0.01 pg) 試験系を設定した。両系共に、ウイルスゲノムの有無を迅速に判定可能と考えられる。検出用試料の調製に関しては、ウイルス陽性細胞等を用いた検討も必要と思われる。TP検出系については、陽性コントロール反応を確認し、利用可能であることを確認した。試料の調製法等については検討が必要である。今後は当バンク保有の資源化されたヒト由来の滑膜細胞及び脂肪前駆細胞、及び B 細胞株等について、ウイルス否定試験を順次実施し、高品質化を図る予定である。

2) 滑膜細胞の炎症反応性の検証

関節リウマチ及び変形性関節症由来の滑膜細胞について、TNF- α 添加時の関節リウマチ関連遺伝子の発現変動について調べた。これまでに確認している MMP-3 及び IL-6 の他に明らかな発現増加を示す遺伝子として、MMP-1、MMP-8、IL-15、IL-1 α 、TLR-2 等が認められた。関節リウマチ由来方が変形性関節症由来に比べて発現増加を示す遺伝子が多く、その増加程度が大きい傾向が認められたが、これについてはより詳細な解析が必要である。

今回 TNF- α に反応して発現増加を示した、これらの遺伝子は、関節リウマチ由来において発現が促進されることが知られており、バンクで調製した滑膜細胞は、関節リウマチ患者の滑膜で生じる炎症反応をある程度反映していることが推測される。よって関節リウマチ由来滑膜細胞は、関節リウマチ研究に有用な資源と考えられる。また変形性関節症由来滑膜細胞においても関節リウマチと類似した発現パターンが示されたことから、これらの炎症反応性は、滑膜細胞に共通する性状であることが推測された。

3) 滑膜細胞および脂肪前駆細胞の間葉系幹細胞としての分化能の検討

バンクで調製した滑膜細胞及び脂肪前駆細胞が、間葉系幹細胞マーカー及び 4 種類の多能性マーカーについて、骨髄由来間葉系幹細胞と同様な mRNA の発現パターンを示すことが分かり、脂肪細胞、骨芽

細胞以外への幅広い分化能をもつことが考えられた。これらの発現結果は細胞の性状に関する付加価値情報として有用と思われる。今後は分化に関する基礎研究だけでなく再生医療研究用の資源としても活用が期待される。

E. 結論

今回の研究では、新鮮組織より調製した細胞或いはヒト由来細胞株についてのウイルス等の否定試験系としてリアルタイム PCR 法を検討し、迅速かつ高感度な HCV、HIV 否定試験系を設定した。今後、ヒト由来細胞の品質管理に活用していく予定である。バンクで調製した新鮮組織由来細胞の機能的性状を精査するためにリアルタイム PCR 法を用いた mRNA の発現解析により、滑膜細胞に関しては、TNF- α による反応性を関節リウマチ関連 48 遺伝子について調べ、関節リウマチの病態をある程度反映する有用な知見を得た。間葉系幹細胞としての滑膜細胞及び脂肪前駆細胞の分化能に関する発現解析により、これらの細胞が多能性を有することが推測された。これらの資源の再生医療研究における利用が可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

無血清培養法等の新規培養技術の開発

所 属 株式会社プライマリーセル
研究者 平 敏夫

研究要旨 厚生労働省の重点課題である創薬や再生医療など分野において、ヒト細胞をはじめとする培養細胞は研究開発のツールとして多用されている。本研究では、無血清培養法や脂肪前駆細胞の機能検証、間葉系幹細胞の分化能確認、肝伊東細胞、筋芽細胞の性状の検討等の多角的な研究を行い、新たな培養技術、分化誘導技術等の開発を検討した。

A. 研究目的

創薬研究においては、多種多様な細胞が培養され、研究開発のツールとして用いられている。しかしながら、それらの培養で用いられている一般的な培地には血清が含有されている。このような血清含有培地を用いた場合、血清中に含まれる生理活性物質の干渉により、バイオマーカー探索に障害となる。さらに血清を用いた細胞培養には、ロット間差や感染リスクなど様々な問題が存在し、基礎研究のみならず、将来的な医療応用への大きな障壁となる。従って、血清を使用しない、無血清培地による培養法を確立する事で、幅広い分野に貢献することが出来る。本研究では、無血清培養法など新規培養技術の開発を検討した。また、脂肪前駆細胞、間葉系幹細胞、肝伊東細胞、筋芽細胞の機能的性状解析、分化能の検討など、幹細胞、機能細胞の培養技術に関する多角的な研究を行う。

1) 無血清培地によるヒト幹細胞培養の検討

これまでの検討で脂肪組織からの幹細胞の採取と脂肪細胞への分化に成功している。脂肪組織より得られた細胞群には、脂肪前駆細胞が含まれており、まず得られた細胞群を継代する事により、幹細胞特異的マーカーを発現している細胞が得られる条件を確立した。さらにこれらの幹細胞を無血清培地の条件で脂肪細胞へ分化させる事に成功している。次に確立したラット幹細胞を無血清培地にて、培養する系を確立する。本年度の検討では、これまでの検討で得られた培養方法をヒト細胞に応用することを目的とした。

2) 間葉系幹細胞の分化誘導法および分化能の検討

ヒト間葉系幹細胞は、線維芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞等の間葉系に属する細胞の幹細胞

として仮定されている細胞である。近年、骨髄や、脂肪組織、胎盤など、様々な組織から、間葉系幹細胞と同定される多分化能をもつ細胞が発見され、骨や血管、心筋の再構築などの再生医療への応用が期待されている。

ヒューマンサイエンス研究資源バンクには、国立成育医療センター・梅澤明弘らの研究グループによって寄託されたヒト正常間葉系幹細胞が27種類と、テロメラーゼ(TERT)遺伝子を導入することによって不死化されたヒト間葉系幹細胞株11種が登録されている。これらの多種類のヒト間葉系幹細胞を用いて、寄託者により指定された培地の評価を行い、分化能の検討結果と、分化誘導法について検証する。これらの情報は、ヒト正常間葉系幹細胞の品質と付加情報の向上につながる事が期待される。

平成23年度は、ヒト正常間葉系幹細胞27株の分化能の検証を行った。本年は、引き続き、TERT 遺伝子導入不死化ヒト間葉系幹細胞株11種の分化能の検証を行った。

3) 肝伊東細胞の培養法および性状の検討

肝伊東細胞(肝星細胞、Ito cells, hepatic stellate cells)は、肝において実質細胞を支持する間葉系の細胞で、細胞内の脂肪滴中にビタミンAを貯留することが知られている。肝硬変においては、活性化した伊東細胞からコラーゲンが産生され、繊維肝の形成の主要な要因となる。また、脂肪肝では、肝実質細胞とともに、脂肪滴が増大することが知られている。このように、伊東細胞は肝臓関連の重要疾患にかかわる細胞であり、重要な創薬ターゲットのひとつである。しかしながら、研究資源としての伊東細胞は例が少なく、公的バンクから供給されているヒト正常伊東細胞 LI90 株のみであり、各国の研究機関、創薬企業などで活発に利用されている。本研究では、

L190 細胞株についてその機能・性状について検証し、細胞の品質の保証ならびに付加価値の向上を行った。

4) 筋芽細胞の効率よい横紋筋への分化系の開発

横紋筋は、糖を代謝して熱やエネルギーに変換する主要な組織であり、横紋筋における糖代謝は糖尿病治療薬などの創薬における重要なターゲットである。分化した横紋筋は増殖しないため、実験動物、未分化な筋芽細胞、筋衛星細胞から培養下で誘導した横紋筋が研究に利用されている。後者の例としては、マウスの C₂C₁₂ 筋芽細胞株や、初代の筋芽細胞で横紋筋への分化系がある。一方、ES 細胞や iPS 細胞、間葉系幹細胞等の未分化な幹細胞から効率よく横紋筋を分化させる実験系は、MyoD や myogenin 遺伝子の導入によるダイレクトプログラミング以外にはほとんど確立されていない。Wnt は細胞間相互作用に様々な働きを持つ細胞外因子である。筋の発生においては、胚発生期に沿軸中胚葉に筋節を誘導することが知られており、筋の初期分化を制御しているとされている。

平成23年度は、バンク登録の筋分化能を持つ細胞株であるラット骨格筋由来筋芽細胞株 L6、ヒト横紋筋肉腫由来 RD について、横紋筋モデルとしての有効性を高めるため、Wnt 経路を活性化することによる効率よい横紋筋分化系の開発を行った。本年度は、さらにヒト正常筋芽細胞を用いて Wnt 経路活性化による横紋筋誘導を検討し、前年度の L6 細胞株、RD 細胞株モデルの妥当性を確認した。

B. 研究方法

1) 無血清培地によるヒト幹細胞培養の検討

脂肪前駆細胞は、ヒューマンサイエンス資源研究バンクで確立したヒト腸間膜由来脂肪前駆細胞 (HT99560192、HT85523822)、および比較対照として市販品であるサイエンセル・リサーチ社(米国)ヒト皮下脂肪細胞 (Cat.No.7220) を使用した。これらの細胞を、生理的インスリン濃度である 1ng/ml 環境下培養時は脂肪細胞用培地: 内臓脂肪細胞分化メディウム ver2 (VACM2、プライマリーセル) を使用し、無血清培養条件下培養時は 3T3-L1 細胞用の無血清培地: コスメディウム 3T3-L1 (COS-PM3、コスモ・バイオ) を使用して培養した。内臓脂肪前駆細胞は融解後、 2.8×10^4 cells/well、皮下脂肪細胞は 1.4×10^4 cells/well にて コラーゲンコートした 24 穴プレートに播種後、1ml/well の培地を用い 5%CO₂、37℃にて培養した。培地は1~2日おきに交換した。

播種 2~4 日後に細胞がコンフルエントになった時

点で、培地を 1 μ M デキサメサゾン、0.05 mM イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、10 μ M トログリタゾン を加えた分化誘導培地に交換した。内臓脂肪前駆細胞は 4 日間、皮下細胞は 4~6 日間分化誘導処理、その後再び分化誘導剤を含まない培地で培養することにより成熟化させた。

播種翌日 (Day1) および図 3、4 に記載した時点で細胞のトータル RNA を回収した。細胞は培地を除去後 Saline で洗浄し、200 μ L の TRIZOL Reagent (コスモ・バイオ株式会社) を加えて細胞を溶解させ、スクレープして 1.5 mL チューブに回収した。さらにピペッティングにより細胞を完全に溶解した後、室温で 10 分間インキュベートした。40 μ L のクロロホルムを加えてよく攪拌した後、20,000 \times g、10 分間、の遠心により相分離を行った。上清を別の 1.5 mL チューブに採取し、上清と同量のイソプロパノールを加えて攪拌した後 10 分間インキュベートし、20,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C の遠心により RNA を析出させた。上清を除去し、1 mL の 75%エタノールにて洗浄後、20,000 \times g、5 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離して上清を除き、風乾後、ヌクレアーゼフリー水に溶解させた。得られた RNA 溶液の濃度は吸光光度計ナドドロップ ND-1000、(サーモフィッシュサイエンス社) を用いて 260 nm の吸光度を測定することにより算出した。

cDNA 合成は以下の方法でおこなった。総 RNA 1 μ g 量を材料として RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (コスモ・バイオ、東京) にて cDNA を調製した。逆転写反応はキットに含まれる OligodT primer と Random Primer を等比混合プライマーにて行い、cDNA 合成反応液は 70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることにより失活後 10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA 溶液 pH8.0 にて 10 倍希釈し、リアルタイム PCR 用テンプレートとして 4 $^{\circ}$ C 保管した。

リアルタイム PCR は LightCycler 480 PCR Real-Time PCR Instrument (ロッシュアプライドサイエンス、スイス) にて EverGreen qPCR KIT (BM 機器、東京) を使用し、脂肪分化マーカーである、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)、fatty acid binding protein 4 (FABP4)、CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA) の遺伝子発現解析をサイバークリーン法により行い、Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) の遺伝子発現値により補正した。

2) 間葉系幹細胞の分化誘導法および分化能の検討

細胞の増殖に際しては、寄託者により指定された増殖培地(骨髄由来不死化間葉系幹細胞の場合、POWERDBY10、臍帯血由来不死化間葉系幹細胞の場合、Plusoid-M。いずれも製造・肥田商店、販売