

宗田 大 :

膝屈筋腱を用いた double-bundle reconstruction I - 4 つ折半腱様筋腱を用い経脛骨骨孔的に大腿骨骨孔を作製する 2 重束 ACL 再建術—
整形外科最少侵襲手術ジャーナル 66 : 57 - 66、2013. 2

宗田 大 :

VIII. 靭帯再建術後再断裂に対する Revision Surgery 「再再建術と私のポイント」
膝靭帯手術のすべて
MEDICAL VIEW 2013. 4. 10 p. 385-389

宗田 大 (総監集) :

ひざ痛を治す
別冊 NHK きょうの健康 2013. 6. 25 発行

宗田 大 :

膝前十字靭帯再建術 : ハムストリング腱使用例
臨床スポーツ医学臨時増刊号 「関節鏡視下手術と術後リハビリテーション」
Vol. 30: p104-107, 2013. 7. 15 発行

宗田 大 :

膝蓋腱炎 (ジャンパー膝) の治療 upda
【特集】腱・付着部症の最近の展開
整形災害外科 55 : p1371 - 1376
2013. 10. 1 発行

2. 学会発表

a) 国際学会発表

Ichiro Sekiya, Takeshi Muneta

Arthroscopic Transplantation of synovial MSCs for cartilage regeneration
International Cartilage Repair Society
2013.9.15. Izmir, Turkey

Nobutake Ozeki, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model

11th International Society for Stem Cell Reseach, Annual Meeting
2013/6/12-15, USA

Nobutake Ozeki, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, Tomoyuki Saito, **Takeshi Muneta**
Weekly intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells delay cartilage degeneration through trophic factors in a rat osteoarthritis model
International conference of cartilage repair
2013/9/15-18, Turkey

Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Kondo S, Saito R, Yanagisawa K, Tabuchi T, Nagata T, Obara M, Okuaki T, Koga H, Tsuji K, **Takeshi Muneta**
Comparison of MRI T1rho mapping and histology for normal and torn menisci in a pig model.
11th International cartilage repair society annual meeting
2013/9/15-18, Turkey

Mio Udo, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**
Evaluation of a rat arthritis model induced by various doses of monoiodoacetic acid
11th International cartilage repair , society annual meeting
2013/9/15-18,

Toshifumi Watanabe, **Takeshi Muneta**, Nicholas Dunbar, Alex Iorgulescu, Scott A Banks
Intraoperative Joint Gap Affects Postoperative Knee Kinematics in Posterior-Stabilized TKA
26th ISTA2013, 2013.10.16-19, USA

Miyoko Ojima, Ichiro Sekiya, Kunikazu Tsuji, **Takeshi Muneta**
Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee after harvest of synovium
11th International cartilage repair , society annual meeting
2013/9/15-18, Izmir, Turkey

b) 国内学会発表

宗田 大：

日本関節鏡膝スポーツ医学会（JOSKAS）
ガイドライン策定委員会
東京医科歯科大学 委員長
日本内視鏡学会理事

宗田 大：

人工膝関節後の痛みとその対応
第43回日本人工関節学会 ランチョン
セミナー
2013. 2. 23 滋賀医科大学

宗田 大：

膝のスポーツ外傷と障害
第29回埼玉・県南東部整形外科勉強会
2013. 3. 8 獨協医科大学越谷医療センター
一大開覧

宗田 大：

症例から学ぶ膝関節外科
2013. 5. 26 第86回日本整形外科学術
総会ランチョンセミナー、広島

宗田 大：

スポーツ復帰への膝外傷・障害の治療
2013. 5. 30 第3回大分膝関節疾患研究
会、大分

宗田 大：

滑膜間葉幹細胞移植による関節構成体の
再生医療の実現化
2013. 6. 4 第36回大学院医歯学総合研
究科 大学院セミナー

宗田 大：

ACTIYAS デザイン～開発背景からコンセ
プト～
2013. 7. 13 ACTIYAS セミナー KYOCERA

辻邦和、片桐洋樹、中村香織、関矢一郎、

宗田 大：

前十字靭帯再建術の手術侵襲に伴う関節
疼痛の重症度は、術後の関節液中のCD105
陽性細胞数に逆相関する
2013. 2. 7-8 第6回日本運動器疼痛学会
神戸

中村香織、辻邦和、片桐洋樹、井上牧子、
Kahaer Abula、関矢一郎、**宗田 大：**
前十字靭帯再建術後の関節疼痛の重症度
は術後関節液中のCD105 陽性細胞と逆相
関する
2014. 2. 28-3-1 第27回日本軟骨代謝学
会 京都

中村智祐、望月智之、二村昭元、**宗田
大、** 秋田恵一：

前十字靭帯脛骨側付着部の解剖学的研究
外側半月板から連続する線維構造。

中村智祐、関矢一郎、柳下和慶、渡邊
敏文、望月智之、古賀英之、堀江雅史、
大川淳、**宗田 大：**

解剖学的二重束前十字靭帯再建術におけ
る移植腱の太さが及ぼす影響。

2013. 03 第86回日本整形外科学術集会
広島

古賀英之、**宗田 大、**柳下和慶、渡邊
敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、
関矢一郎：

解剖学的2重束ACL再建術における大腿
骨孔位置が移植腱張力変化及び膝制動性
に与える影響

古賀英之、**宗田 大、**柳下和慶、渡邊
敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、
大川淳、関矢一郎：

二重束ACL再建術における大腿骨孔位置
が移植腱張力変化および膝制動性に与え
る影響。

2013. 03 第86回日本整形外科学術集会
広島

古賀英之、**宗田 大、**柳下和慶、渡邊敏
文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、関
矢一郎：

ACL再建術 one bundle から two bundle
同一施設での outcome の比較

1重束及び2重束ACL再建術の前向き無
作為化比較試験の長期成績。

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

古賀英之、宗田大、柳下和慶、渡邊敏文、望月智之、堀江雅史、中村智祐、関矢一郎：

逸脱外側半月板に対する鏡視下半月板制動術の短期成績。

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、宗田大、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks
人工膝関節全置換術において後十字靭帯がキネマティクスに及ぼす影響

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、宗田大、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐、Scott Banks
ロボット支援モジュール式人工膝関節のキネマティクス

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

渡邊敏文、宗田大、関矢一郎、古賀英之、堀江雅史、中村智祐

新しい日本人向け後方安定型人工膝関節の短期成績

2013. 6. 20-22 5th JOSKAS 札幌

Kahaer Abula、宗田大、宮武和、山田淳、松倉遊、井上真紀子、大川淳、関矢一郎、辻邦和：

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2013. 10. 17 日整会基礎学会 千葉幕張

Kahaer Abula、宗田大、宮武和正、山田淳、松倉遊、井上真紀子、大川淳、関矢一郎、辻邦和：

内在性の BMP7 は滑膜の炎症に対して抑制的に機能し、加齢に伴う軟骨の退行変性を予防する

2014. 3. 1 日本軟骨代謝学会 京都

須藤絵里子グレース、馬瀧洋、小柳明日香、大関信武、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏：

マウス間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療の有効性の検討

2014. 3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

馬瀧洋、緒方勇亮、鈴木喜晴、松崎有未、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏：

組織間葉系幹細胞の分化指向性の解析

2014. 3 第 13 回日本再生医療学会総会 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

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

研究協力者

沢辺元司 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科分子病態検査学 教授

渡邊 健 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 特任助教

研究要旨

滑膜由来間葉系幹細胞を用いて、変異細胞検出法にての検討を継続した。ATM, p53 のリン酸化 AID の発現検出は完成し、検体数を増やして解析した結果、DNA 損傷の程度は最小限であることが確認された。腫瘍化前段階を検出する系としてのメチル化 p16 リアルタイム PCR 系は 1/10,000 レベルで検出可能となったが、本法においてもメチル化 p16 陽性細胞は認められなかった。また、大動物移植モデルを用いて病理学的検討を行い、病的細胞がないことを確認した。集合体として培養した間葉系幹細胞 22 検体では大きな DNA 損傷や変異細胞を認めなかった。

A. 研究目的

滑膜由来間葉系幹細胞の品質管理・品質保証系を確立することを目的とした。特に変異細胞の検出、変異を誘導する培養系の識別を目的として研究を行った。体細胞由来の間葉系幹細胞では実際に変異を生じ、それが培養により蓄積し、生存することは極めて稀とされるが、iPS 細胞からの再生医療が進展する中、その解析は参照細胞として重要である。腫瘍

化における代替指標の高感度検出系、DNA 損傷程度の推測系、大動物モデルでの病理学的解析系を立ち上げることにより、低侵襲軟骨再生の品質評価を行うことが具体的な目的である。

B. 研究方法

1) 腫瘍化代替指標の定量的解析：

p16 メチル化定量的 PCR

培養された間葉系幹細胞から常法に従

って核酸を抽出し、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。パッセージ 0 から 2 を含む合計 22 検体にて検討を行った。

2) DNA 損傷修復応答の解析

DNA 損傷応答を検出することで、潜在的に DNA に傷が入りやすい培養系や試薬系を検出することを継続して試みた。具体的には過剰増殖刺激などで誘導される AID (activation induced deaminase) はリアルタイム PCR で定量化し、いわゆる DNA 損傷反応としての ATM, P53 のリン酸化は、それぞれの分子に対するリン酸化特異的抗体を用いて、組織切片を用いて免疫組織染色を行った。

3) 大動物移植モデルを用いた病理組織学的解析

ミニブタにおける移植モデルを用いて、滑膜由来間葉系幹細胞を軟骨欠損部に移植した。さらに組織切片を採取し、HE 染色を行って組織形成や、細胞浸潤、悪性化などを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、再生医療用の組織を用いて検討を行うものであり、解析にあたっては最小限のサンプル量で行えるように留意し、十分な説明と同意のもとで実施した。

また「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 メチル化定量的 PCR

検出法のさらなる改良と変更の結果、現時点では 1/10,000 細胞のレベルでの p16 メチル化を検出できるようになった。合計 22 検体を用いて検討したが、全検体において陰性であることが検証された。

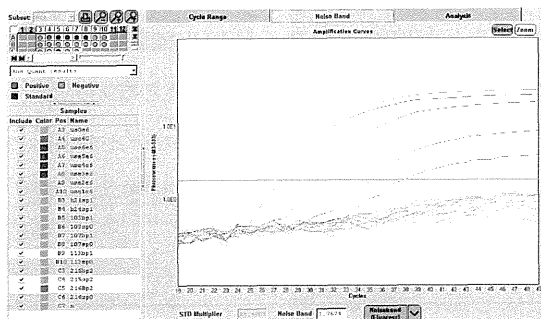


図 1 メチル化 p16 定量系を用いた検証

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)を様々な割合で混在させ、DNA を抽出し、それを用いて検量線を作成した。その結果 1:10,000 のレベルで検出可能であった。緑に示す線は実検体であり、すべて陰性であった。

2) DNA 損傷修復応答

AID も 22 検体で検討し、1 検体で検出

感度以下の陽性（38 サイクル以降での立ち上がり）検体があったが、それ以外はすべて陰性であった。ATM, p53 リン酸化については、10 検体の解析が終了し、12 検体のブロック作成が終了しているが、今のところ反応したとしても極めて軽微であることが明らかになった。

3) 病理組織学的解析

コントロール 7 匹、間葉系幹細胞移植群 7 匹で検討を行った。滑膜幹細胞移植群では滑膜細胞の著明な増殖、軟骨増生が認められ、異型細胞は皆無であった。

D. 考察

本研究では滑膜由来間葉系幹細胞に焦点を絞って、変異細胞検出と、DNA 損傷の程度の評価に取り組んだ。今までの世界的な報告からも、間葉系幹細胞からの腫瘍発生の報告は皆無（1 例の報告は細胞の contamination とされる）である。本研究は従って、間葉系幹細胞の安全性についての基盤的データを供給するものであり、また今後の培養系開発にあたっての、安全な手技の選択という面で有用になるものと考えている。今後感度を上げれば上げるほど、p16 のメチル化が検出されたり、変異が検出されたりという可能性があるが、あくまで最終製品の標準規格ではなく、基礎的なデータとして蓄積されていくことが重要と考えている。

実調製細胞での臨床検査という点では、karyotyping や免疫不全マウスへの移植実験で、担保されていくと思われる。いずれにせよ新しい技術による検証データが蓄積し共有されることが期待される。

E. 結論

DNA 損傷の評価系（及び DNA 損傷を誘導する分子の評価系）、腫瘍細胞の分子学的刻印の高感度検出法を開発し、実際に培養した滑膜由来間葉系幹細胞 22 検体にて検証した。その結果、調製細胞においては DNA 損傷が最小限であり、また明らかな腫瘍化の徴候が認められないことが明らかになった。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, **Morio T**, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 104:703-10, 2013.

Sugita S, Ogawa M, Shimizu N, **Morio T**, Ohguro N, Nakai K, Maruyama K, Nagata K, Takeda A, Usui Y, Sonoda K, Takeuchi M, Mochizuki M.

Use of a comprehensive polymerase chain reaction system for diagnosis of ocular infectious diseases.

Ophthalmology. 120:1761-8, 2013.

2. 学会発表

森尾友宏：

易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症

平成 25 年度遺伝子病制御研究所研究集会、2013. 10. 25. 北海道、

森尾友宏：

免疫細胞培養ガイドライン（免疫治療関連 6 学会合同策定）について：医療機関・研究施設に求められる基準

第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会

2013. 8. 24. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

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

分担研究者

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

学本学で開発したマイコプラズマ検査系の実用化とウイルス検査系の自動化に関する取り組みを行った。マイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される：TMDU 法)は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なことが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (MycoSEQ: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIASymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることを模擬サンプルを使用した実験により確認した。

A. 研究目的

再生医療に使用する細胞製剤は、生体材料から得た組織・細胞を培養することにより調製し、生きた状態で投与されるため、原材料あるいは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、再生医療を実用化するためには、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極めて重要である。生体には細菌・真菌・ウイ

ルスなど多くの微生物が持続感染しているため、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微生物汚染の問題を回避するには不十分であり、患者に投与する最終製品を全数検査して治療の安全性を担保することが必要と考えている。本分担研究では、1. ヒトに持続感染することが知られているウイルスを主とした検査対象ウイルスのリストアップ 2. それらを網羅的に検出可能な検出系の作成 3. 関節関連組織及び滑

膜由来軟骨幹細胞の微生物検査データの蓄積、4. 検査系の自動化 5. 滑膜由来軟骨幹細胞を使用した軟骨再生医の微生物安全検査法の確立 を目的に研究を行っている。本年度は、これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される: TMDU 法)のバリデーション試験(今回は感度検定試験)と現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット(MycoSEQ: Lifetechnologies)との比較試験、およびキアゲン社の QIASymphony を用いたウイルス・検査系の自動化を目指した研究開発を実施した。

B. 研究方法

1. TMDU 法によるマイコプラズマの検出
核酸の抽出は使用した QIAGEN 社のキットの説明書に従って実施した。マイコプラズマの検出は、本学で開発した 142 種類のマイコプラズマ属が検出可能なマルチプレックス PCR 検査系により、マイコプラズマ属の 16S リボソーム・23S リボソームおよびそれらのスペーサー領域に設定したプライマー・プローブ(合計 15 種類)を使用し、マイコプラズマゲノムの当該領域を増幅した。

・核酸抽出: QIAampMinElute virus spin kit (QIAGEN: 以下 QIAGEN 法と記載)

・PCR 装置: LightCycler480 (ロッシュ)

・PCR 反応: 95°C10 分処理の後、94°C15 秒, 60°C60 秒の反応を 45 サイクル

・PCR 試薬: 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

・バリデーションに使用したマイコプラズマ (17 種類) Mycoplasma arginine, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Mycoplasma hyorhinitis, Mycoplasma lipophilum, Mycoplasma orale, Mycoplasma pneumonia, Mycoplasma primatum, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma synoviae, Ureaplasma urealyticum, Acholeplasma laidlawii, Spiroplasma citri

2. MycoSEQ によるマイコプラズマの検出

マイコプラズマ検出キットとして発売されている MycoSEQ (Lifetechnologies) は以下の 2 つのコンポーネントからなる。

・MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit (PCR assay 用)

・PrepSEQ Nucleic Acid Extraction Kit (核酸抽出用)

核酸抽出および検出操作は MycoSEQ の説明書に従って行った。

3. 添加回収試験の実施方法

添加回収試験の実施に当たっては指標となるさにマイコプラズマ試験法開発の標準細胞として採用されている CHO 細胞 DG44 株と添加する指標マイコプラズマとして *Mycoplasma orale* (E3329121020) を使用した。

4. QIASymphony を使用した検査の自動化

使用キット：QIASymphony DSP DNA Minikit192 Version1

qPCR: LightCycler480 (ロッシュ)

・検査対象ウイルス種

HSV1, HSV2, CMV, VZV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, BKV, JCV, HBV, ParvoB19 (PVB19)

の 13 種類

・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・プローブ：固相化 DNA ウイルス検出ストリップ (日本テクノサービス) を使用

(倫理面への配慮)

倫理的な問題が生じるような研究は実施しなかった。

C. 研究結果

1. マイコプラズマ検出の感度検定

方法に記した 17 種類のマイコプラズマ属の菌種について、5 ~ 1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行った。その結果、n=3 の実験で、17 種類すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。したがって、TMDU 法は最低 5 cfu/reaction の検出感度を持つことが示された。

2. キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に *Mycoplasma orale* 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では $20 \mu\text{g}$ 、QIAGEN 法では $12 \mu\text{g}$ であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

2. MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ によりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、Mycoseq Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 31.25 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 31.64 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は

QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が 3 倍以上高く、良好に検出された。

3. TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ により指標となるマイコプラズマ (*Mycoplasma orale*) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 35.63 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 34.98 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は抽出法による差はほとんど観察されなかった。

4. MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

MycoSEQ は SYBR Green のダイシグナル法であるため、Cp 値 36 付近で陰性コントロールからでもシグナルが検出されることがあり、PCR 反応後にメルティング解析 (Tm 値の測定) を行ったうえで陽性か陰性かの判定を行うことになっている。この現象は我々の実験においても図 1 のようなシグナルが観察されている。

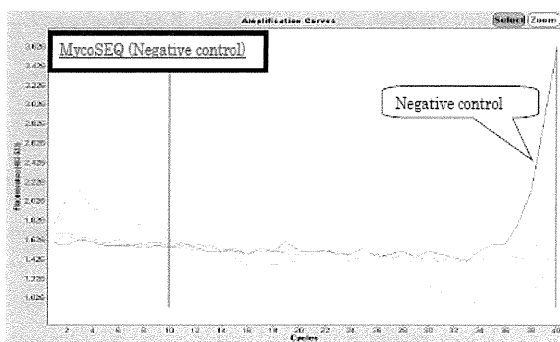


図 1 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性コントロールで出現するシグナル

このような擬陽性反応がでるため、MycoSEQ によりマイコプラズマを検出する際には Tm 値解析により真の陽性シグナルか否かを検証することが推奨されている。図 2 に Tm 値解析の結果を示す。

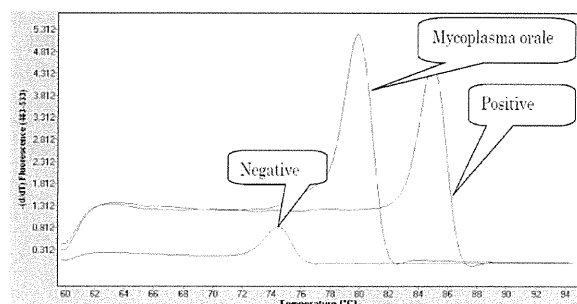


図 2 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に出現したシグナルの Tm 値解析結果

この結果のように陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、図 3 のようにマイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの Tm 値が中間段階になり判定に迷う場合が少なくない。

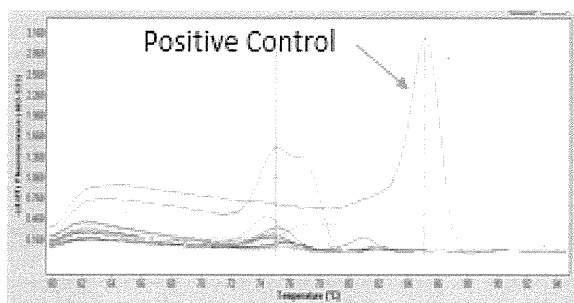


図 3 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性サンプルで見られた中間的 Tm 値を示すシグナル

の例

5. ウイルス検査系の自動化

ウイルス検査系の自動化を目指し、固相化ストリップと QIASymphony を使用し、披検ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA 0.5 μ g に各ウイルスのスタンダードを 10~10000 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実験を行った。

その結果、検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能で、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的データを得ることが可能であることが示された。

D. 考察

1. マイコプラズマ検出の感度検定

方法に記した 17 種類のマイコプラズマ属の菌種について、5 ~ 1000 cfu/reaction の範囲で検出感度の検定を行った。その結果、n=3 の実験で、17 種類すべての菌種をいずれの濃度でもれなく検出することが可能だった。したがって、TMDU 法は最低 5 cfu/reaction の検出感度を持つことが示された。

2. キットとの核酸抽出結果の比較

prepSEQ と QIAGEN 法の 2 種類のマイコプラズマ検出法に関し、標準プロトコルによる核酸抽出効率を比較した。なお、抽

出に要した時間・最大細胞数は、Mycoseq:3 時間、 1.0×10^6 細胞、QIAGEN 法 1 時間、 5.0×10^6 細胞だった。 1.0×10^6 cells CHO 細胞 DG44 株 1.0×10^6 細胞に Mycoplasma orale 100 cfu を添加し、DNA を抽出したところ、DNA の回収量は prepSEQ では 20 μ g、QIAGEN 法では 12 μ g であり、prepSEQ の方が高い回収率を示した。

2. MycoSEQ による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ によりマイコプラズマ添加 CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、Mycoseq Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 31.25 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 31.64 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は QIAGEN 法で抽出した核酸を使用した方が 3 倍以上高く、良好に検出された。

3. TMDU 法による添加回収試験

QIAGEN 法および prepSEQ により指標となるマイコプラズマ (Mycoplasma orale) を添加した CHO-DG44 細胞から抽出した DNA を使用し、TMDU 法によりマイコプラズマの検出を行った。その結果、QIAGEN 法で抽出した場合には Cp 値 35.63 で、prepSEQ を使用した場合には Cp 値 34.98 でシグナルの上昇が見られた。シグナル強度は抽出法による差はほとんど

観察されなかった。

4. MycoSEQ の擬陽性反応に関する検証

MycoSEQ は SYBR Green のダイシグナル法であるため、Cp 値 36 付近で陰性コントロールからでもシグナルが検出されることがあり、PCR 反応後にメルティング解析 (Tm 値の測定) を行ったうえで陽性か陰性かの判定を行うことになっている。この現象は我々の実験においても図 1 のようなシグナルが観察されている。

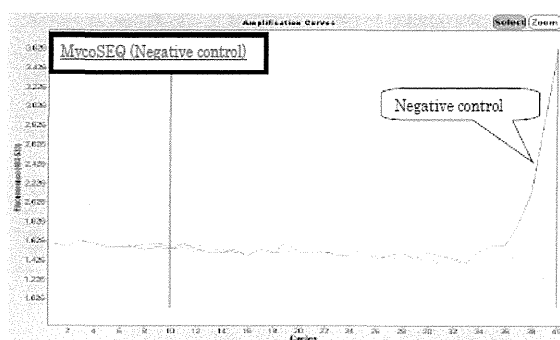


図 1 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性コントロールで出現するシグナル

このような擬陽性反応がでるため、MycoSEQ によりマイコプラズマを検出する際には Tm 値解析により真の陽性シグナルか否かを検証することが推奨されている。図 2 に Tm 値解析の結果を示す。

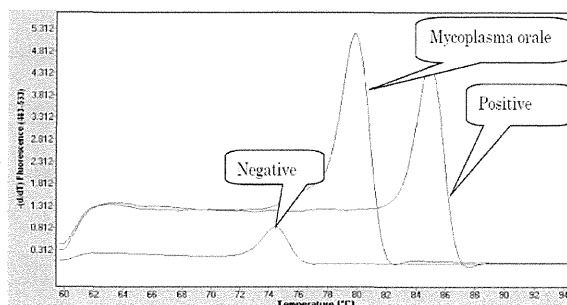


図 2 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に出現したシグナルの Tm 値解析結果

この結果のように陽性・陰性結果および陽性コントロールから得られた結果が明確に区別できる場合は良いが、図 3 のようにマイコプラズマ陰性が確認されているサンプルの Tm 値が中間段階になり判定に迷う場合が少なくない。

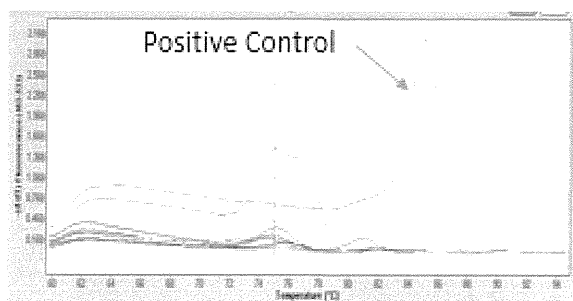


図 3 :

MycoSEQ によるマイコプラズマ検出の際に陰性サンプルで見られた中間的 Tm 値を示すシグナルの例

5. ウイルス検査系の自動化

ウイルス検査系の自動化を目指し、固相化ストリップと QIA symmetry を使用し、披検ウイルス陰性が確認されている細胞の DNA 0.5 μ g に各ウイルスのスタンダードを 10~10000 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実験を行った。

その結果、検討した 13 種類のウイルスをすべて 10 copies/reaction の検出感度で自動測定が可能で、10~10000 コピーまで検量線は直線的で十分に定量的

データを得ることが可能であることが示された。

E. 結論

これまでに開発したマイコプラズマ検査系(遺伝子配列から 142 種類のマイコプラズマ属を検出可能と推測される : TMDU 法) は日本・欧州・米国の 3 極薬局方記載の 9 種類を含む 17 種類のマイコプラズマを 5 cfu/reaction の感度で検出可能なが示された。また、現在汎用されているリアルタイム PCR 法を応用したマイコプラズマ検出キット (Mycoseq: Lifetechnologies) との比較試験を行った結果、我々の開発した TMDU 法は結果の解釈がより簡便であり、感度・直線性・特異性などは同等であるため、実用化すべき十分な性能を持つことが示された。また、QIAGEN 社の QIASymphony を使用したウイルス・マイコプラズマの自動検査の構築を目指し研究開発を進め、DNA ウイルス 13 種類の自動検査が可能であることが模擬サンプルを使用した実験により確認した。

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

Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, **Shimizu N**, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.:
Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. Journal of the Neurological Sciences 324, 190-194(2013)

Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, **Shimizu N**, Huang G, Yu Q, Chng WJ.:
EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. Blood 121: 4512-4520(2013)

Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, **Shimizu N**.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. Respiration, [Epub ahead of print] (2013)

Ito K, **Shimizu N**, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. Internal Medicine. 52(2):201-11 (2013)

北條浩彦、**清水則夫** :
基本編ー原理と基本知識ー
リアルタイム PCR を使った解析の基本
10 プライマー/プローブの設計手順②マルチプレックスの場合
原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ : p72-74 2013 発行

清水則夫、渡邊 健、外丸靖浩：

実践編ープロトコールを中心にー

IV章 遺伝子量解析

15 ウイルス感染症を診断する ウイル

スゲノムの定性的検査と定量的検査

原理からよくわかるリアルタイム PCR 完

全実験ガイド 最強のステップ UP シリー

ズ:p192-202

2. 学会発表

今留謙一、松田剛、川野布由子、千葉佑

規乃、新井文子、中澤温子、伊藤守、

清水則夫、藤原成悦：

難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖

性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬

3 剤の評価研究

2013. 11 日本ウイルス学会 神戸

清水則夫：

再生医療におけるウイルス・マイコプラ

ズマ安全性検査系の開発

2013. 9 第 14 回日本医薬品等ウイルス

安全性研究会 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

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・大学院保健衛生学研究科 教授

研究要旨

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治療が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCs を得る際の組織採取の侵襲や、MSCs の *in vitro* における継代培養には限界があるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。本研究では、iPS 細胞（iPSCs）を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。また、MSCs の移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を解析した。

様々な組織由来の iPSCs に対し、ペレット培養法による *in vitro* での軟骨分化誘導を行うことで、軟骨分化しやすい株の同定を行った。スクリーニングによって選別された iPSCs を Hanging drop 培養法で 3 日間培養して細胞集塊を作成し、軟骨欠損モデルラットに 1.7×10^6 cells を移植した。移植後 4 週でラット大腿骨を摘出し、Toluidine Blue および Safranin O で染色して軟骨分化を確認したところ、移植した MSCs とほぼ同様に iPSCs が軟骨細胞に分化したことが確認された。また、移植細胞より RNA を採取して遺伝子の定量的解析により、Col2, Sox9 などの軟骨分化マーカーの発現が優位に上昇していることが確認された。

あらかじめ分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。

A. 研究目的

臨床における軟骨再生治療として自己滑膜由来間葉系幹細胞（MSCs）の移植治

療が行われており、軟骨再生への臨床的評価も得られている段階である。しかしながら、MSCs を得る際の組織採取の侵襲や、MSCs の *in vitro* における継代培養

には限界があるため、移植細胞ソースとしての課題が未だ残っている。

iPS 細胞 (iPSCs) は皮膚線維芽細胞などの体細胞に初期化因子 Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の遺伝子を導入することで樹立され、ES 細胞とほぼ同等の分化能を持った幹細胞である。iPSCs を用いて軟骨を再生することが可能となれば、侵襲性が低く、ほぼ無限に移植細胞を供給できる理想的な細胞になると考えられる。しかし、iPSCs の問題として、株間での性質の違いが指摘されている。特に分化誘導に対して抵抗性を示す iPSCs 株が残存し、移植先での腫瘍形成の原因となりうる事が報告されている。iPSCs を移植する際は Nanog 遺伝子の発現を減衰させる、予め分化抵抗性の iPSCs を除去することが求められるが、iPSCs は株間の多様性が高いことから、適切な細胞株のスクリーニングが必要であると考えられる。

本研究では、iPSCs を用いた次世代の軟骨再生治療を目的として、軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング法を開発し、その効果を検討した。予め分化抵抗性細胞の残存が少ない iPSCs 株を簡便に選定し、軟骨欠損部位に移植することにより、腫瘍化の可能性が低い軟骨再生治療を開発することが可能となった。また、MSCs の移植効果と平行して評価することにより、軟骨再生への寄与を詳細に解析した。

本学では膝関節の軟骨欠損に対して、滑

膜由来間葉系幹細胞を細胞治療センターに於いて自己血清を用いて培養し、浮遊液の状態ですべて軟骨欠損部に 10 分間静置することにより、細胞を接着させる再生医療をすでに実施している。より操作性が高く、細胞接着の効率を改善するため、hanging drop 法を用いて滑膜間葉系幹細胞から多数の集合体を作成し、表面張力を用いて軟骨欠損部に接着させる方法を検討する。また、本治療のみならず、細胞治療の安全性を評価する方法を確立することも目的とする。さらに、iPS 細胞による軟骨再生医療の開発も行なう。

B. 研究方法

マウス MSCs の分離・培養方法

8~12 週齢オスマウスの大腿骨・脛骨から 0.2% コラゲナーゼ処理によって骨髄細胞を抽出し、フローサイトメーター (FACS) で PDGFR α (+)、Sca-1(+), CD45(-)、Ter119(-) の MSCs を採取した。採取した細胞を 10cm ディッシュに播種し 37°C 5%CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。

マウス iPS 細胞の培養方法

iPSCs 培養時の Feeder として用いる SNL 細胞 (SNLCs) は、予めゼラチンコートした 10cm ディッシュに播種し、37°C 5%CO₂ で培養した。3 日毎に培地交換を行った。Feeder として用いる前日に

Mitomycin C (日本薬局方)で処理し、細胞増殖を阻害したものを Feeder として用いた。iPSCs は 37°C 5%CO₂ で培養し、毎日培地交換をした。本研究では A 株 (MEF 由来 Nanog GFP/SOX10 DsRed-iPSCs)、B 株 (MEF 由来 Nanog GFP-iPSCs)、C 株 (MEF 由来 Oct GFP-iPSCs) の 3 株を用いた。

軟骨分化誘導と分化能力評価

MSCs の分化誘導の際は 3x10⁵ 個、iPSCs は 6x10⁵ 個を 15mL 遠沈管に回収し、軟骨分化誘導培地 1mL を加えて 200g で 4 分間遠心した。遠沈管を立てた状態で 37°C 5%CO₂ で 3 週間培養しペレットを作成した。培地交換は遠沈管内の培地の半量を吸い新しい培地を半量加え、3 日毎に行った。

軟骨組織欠損ラットへの細胞移植

Lewis ラットの膝関節部位を切開した後、膝蓋腱をずらして脱臼した。大腿骨内側顆の軟骨部位に電動ドリルで直径 1.8mm の穴をあけ、軟骨組織欠損を作成した。移植細胞がレシピエント組織に生着したことを可視化するため、移植細胞を予め赤色蛍光色素である DiI (Life Technologies) で染色した。移植の際、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作成した。Hanging drop 培養法では、MSCs 培地に 2.5x10⁵cells/35μL の濃度の細胞懸濁液を作り、ディッシュの蓋に 35μL を滴下したものを 3 日間培養

して細胞集塊を作成した。得られた細胞集塊をラットの一膝につき 4 つ移植した (1.0x10⁶cells/knee)。iPSCs では iPS 細胞滴 (1.7x10⁶cells/knee) を用いて細胞集塊を作成した。MSCs および iPSCs の細胞集塊を移植後、10 分間ラット膝の欠損部を上部にしたまま静置し細胞集塊を欠損部に安定させた後、膝蓋腱の位置を戻してから縫合した。

ラット大腿骨の摘出および組織染色

移植後 2 週あるいは 4 週のラット大腿骨を摘出し、凍結ブロックを作成した。12μm の厚さで薄切し、トルイジンブルーおよびサフラニン 0 で染色した。また、移植した DiI(+) の局在は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS MVX10) で観察した。

C. 研究結果

軟骨分化に適した iPSCs のスクリーニング

iPSCs は株によって分化能が異なるという問題点があり、再生組織に応じた細胞株の選定が必要である。そこで本研究では、3 株の iPSCs (A 株, B 株, C 株) における *in vitro* での軟骨分化能を評価した。始めに、各 iPSCs をそれぞれ軟骨誘導培地にてペレット培養し、作成したペレットのパラフィン切片をトルイジンブルーとサフラニン 0 で組織学的に評価した。その結果、軟骨ペレットの染色によって、A 株由来のペレットでは染色性

が見られなかったが、B 株由来のペレットが MSCs ペレットと同様に軟骨様の染色が確認された。なお、C 株由来の細胞はペレットを形成せず染色像が得られなかった(図 1A)。

次に、各ペレットの RNA を回収し未分化マーカー Nanog と軟骨分化マーカー Col2a1・Aggrecan・Sox9 の発現量を解析した。軟骨分化誘導法が既に確立されている MSCs を陽性対象として比較した。B 株の iPSCs は軟骨分化誘導によって Nanog が減衰し、Col2a1 の発現が増加することが確認された(図 1B)。以上の結果から、3 株の中で B 株が軟骨分化能が高く、移植後の腫瘍化の可能性が低い iPSCs であることが示唆された。

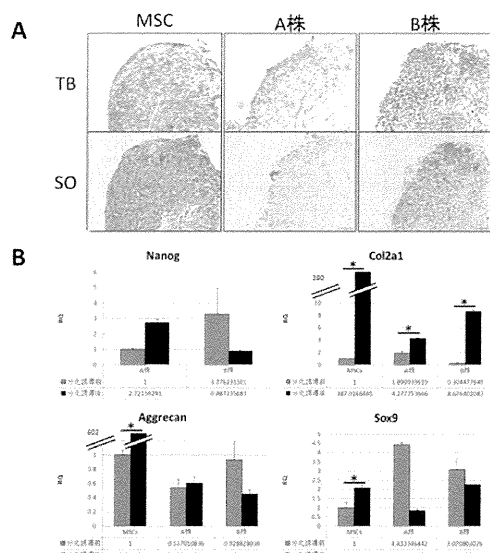


図1 MSCs ペレットと各 iPSCs ペレットの染色像および定量的 RT-PCR A) マウス MSCs 及びペレット形成をした A 株 B 株のマウス iPSCs ペレットを、トルイジンブルー(TB)とサフラニン 0(SO)で染色した。B) A 株・B 株の Nanog 発現量と、各軟骨分化マーカー発現量を比較した。(*P<0.05)

Hanging drop 培養による Nanog 発現量の

解析

ラット組織への細胞移植の際には、軟骨欠損部位から移植細胞が流出するのを防ぐため、Hanging drop 培養法によって細胞集塊を作成・移植を行った(図 2A)。iPSCs を予め軟骨誘導培地にて Hanging drop 培養を行い、その際の Nanog の発現解析を経時的に行った。使用した iPS 細胞は前述のスクリーニングで選出した B 株の iPSCs を用いた。Hanging drop 前後における Nanog の発現を定量的 PCR によって解析した結果、Hanging drop 培養前の Nanog の発現量に対して Hanging drop 培養 1 日以降で Nanog 発現量が減少する傾向がみられた。これらの結果から、Hanging drop 培養を用いることで腫瘍化の原因になりうる Nanog 遺伝子の発現を低下させる事が確認された(図 2B)。

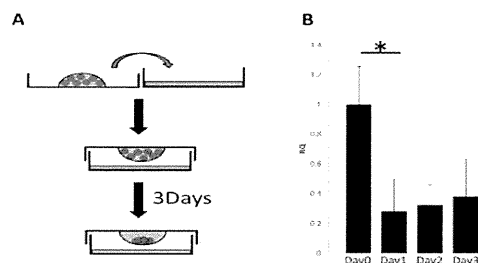


図2 Hanging Drop 培養法による Nanog 発現の低下 A) Hanging drop 培養法, B) B 株 iPSCs 細胞の未分化維持培養時・Hanging Drop 培養 1 日・2 日・3 日それぞれの Nanog 発現量を比較した。(*P<0.05)

MSCs を用いた軟骨組織再生

マウス骨髄より純化した MSCs を用いて、ラット軟骨組織の再生が可能かどうかを確認した。ラット軟骨欠損部に移植した DiI(+)MSCs は、移植後 2 週および 4 週で生体内での生着が確認された。さら

に、細胞移植を行わなかったモデルと比較して軟骨再生能力が高く、移植後 4 週では軟骨細胞様の染色像が確認された(図 3)。これらの実験により、マウス細胞をラット軟骨欠損部に移植する系を確立し、MSCs の軟骨再生への関与を直接的に解析することが可能となった。

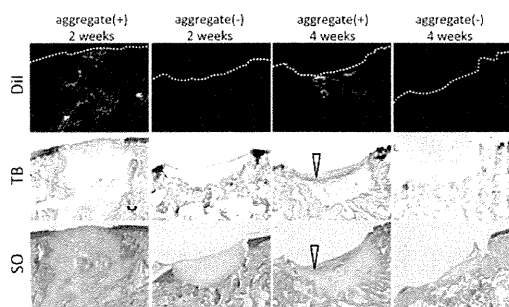


図 3 マウス MSCs を軟骨欠損モデルラットに移植

移植後 2 週および 4 週のラット軟骨欠損部をトルイジンブルー・サフラニン O で染色した。軟骨様細胞 (矢尻)

iPSCs を用いた軟骨組織再生

マウス iPSCs を用いた軟骨組織の再生能力を調べるため、ラット軟骨欠損モデルに対し、マウス iPSCs の移植を試みた。マウス MSCs の移植結果から、移植後 4 週で軟骨細胞様の分化が確認されたため、iPSCs の移植に関しても移植後 4 週の観察を行った。移植後 4 週の関節を取り出し、組織切片を作成して解析した結果、移植細胞全体が軟骨細胞様の染色像を示した(図 4A)。また、移植組織から細胞を回収し、遺伝子発現解析を行った結果、未分化状態の B 株よりも Nanog の発現は減少し、軟骨分化マーカーの発現が上昇していることが確認された(図 4B)。以上の結果から、iPSCs を移植することで *in*

vivo において軟骨分化が進み、軟骨再生を促していることが示唆された。

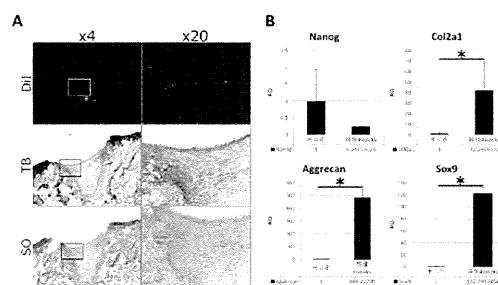


図 4 移植マウス iPSCs (B 株) の染色像および定量的 RT-PCR

移植後 4 週のラット軟骨欠損部をトルイジンブルー・サフラニン O で染色した。移植細胞を採取し、定量的 RT-PCR で各マーカーの解析をした。(*P<0.05)

D. 考察

研究では、MSCs で既に確立されている軟骨移植技術を iPSCs に応用し、軟骨再生を試みた。iPSCs による組織再生は、未分化状態の iPSCs の残存が腫瘍化の原因とされており、さらに iPSCs の株ごとに分化能が異なることが実用化に向けた障壁となっていた。これらの問題をクリアするために、本研究では軟骨再生に適した iPSCs 株のスクリーニング方法を開発し、予め細胞集塊を形成する過程で Nanog 遺伝子を低下させ、安全で効果的な iPSCs 移植治療の可能性を示した。スクリーニングで用いたペレット培養法は、*in vivo* における軟骨分化を *in vitro* で疑似化したものであり、iPSCs 株のスクリーニングとして有用であると期待される。また、移植前に細胞集塊を形成する際、未分化 iPSCs を軟骨分化誘導培地で