

## 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、実際に変異細胞を生じ、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い

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 - 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) をリアルタイム PCR で定量化した。また、いわゆる DNA 損傷応答としての 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、組織切片の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

ミニプ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。

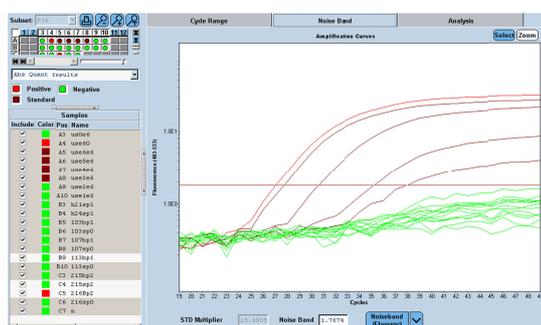


図1 メチル化 p16 定量系を用いた検証

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 検体のブロック作製が終了しているが、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