

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

「滑膜幹細胞の造腫瘍性の評価」

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

滑膜幹細胞の細胞遺伝学的安定性を調べる目的で、培養後の滑膜幹細胞の染色体検査をモニタリング項目として実施した。その結果、被験者の滑膜幹細胞の5例中3例に7番染色体のトリソミーが検出された。造腫瘍性の有無を軟寒天コロニー形成試験で検討した結果、コロニーは検出されなかったことから、核型異常が検出された滑膜幹細胞が腫瘍形成の原因となる可能性は低いと判断した。今回の例を経験し、体性幹細胞でも造腫瘍性の評価を行うことが重要であると考え、どのような方法で評価するのが適切かを考察した。また、核型異常や増殖性の変化を予め評価する工程評価の重要性を考察した。

A. 研究目的

iPS細胞やES細胞は奇形腫形成という造腫瘍性を有しており、これらの多能性幹細胞に由来する細胞組織加工製品においては、未分化の多能性幹細胞の残留等により異所性組織や腫瘍が形成されるおそれがあるため、最終製品の造腫瘍性の評価と適切な管理が重要な課題である。体性幹細胞加工製品の場合は、原材料の細胞に造腫瘍性がほとんどないと考えられているが、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性について考察するように、ヒト体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針にも定められている。本研究では滑膜幹細胞の細胞遺伝学的安定性を調べる目的で、培養後の細胞の染色体検査を実施した。その結果、5例中3例に7番染色体のトリソミーが検出されたことから、体性

幹細胞でも造腫瘍性の評価を行うことが重要であると考え。本分担報告書は、滑膜幹細胞の造腫瘍性を評価するとともに、培養工程が引き起こす可能性のある、細胞の核型異常や増殖性の変化を予め評価する工程評価の重要性を提言するものである。

B. 研究方法

1. 滑膜幹細胞の染色体検査

本臨床研究ではモニタリング項目の1つとして、培養11日目の滑膜幹細胞の染色体検査を、外部の臨床検査会社に委託して実施した。この検査には分裂期の細胞を使用する必要があるため、委託先では受領した細胞をさらに4日間培養し、培養15日目の細胞が分析に用いられた。細胞をコルセミド処置、固定、染色し、染色体の過不足や染色体の欠失・転座の

有無を確認した。

2. 軟寒天コロニー形成試験

染色体の核型異常が見られた細胞は、造腫瘍性を有する形質転換細胞が発生しているか、軟寒天コロニー形成試験（足場非依存的増殖細胞の検出）で確認した。

（倫理面への配慮）

臨床研究「半月板縫合後の滑膜幹細胞による治癒促進」は東京医科歯科大学医学部ヒト幹細胞倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、ヒト幹細胞を用いる臨床研究として厚生労働大臣の了承を得て実施した。分担する研究に関してもその中の一部として含有されている。

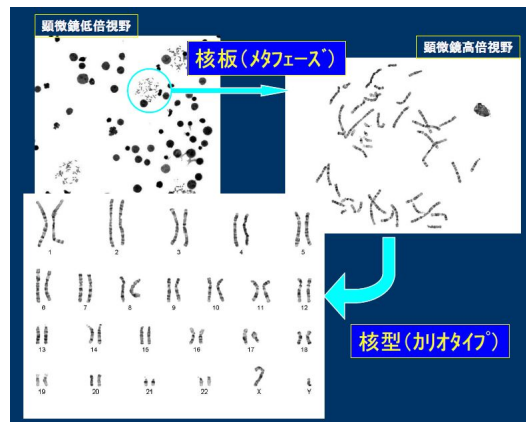
C: 結果

1. 滑膜幹細胞の染色体検査

5例とも培養11日目の増殖期の細胞を検査会社に提出したが、検査でさらに4日間培養し、培養15目の細胞で検査された。この検査は、コルセミド処理により細胞分裂のときの紡錘系の形成を阻害し、cell cycle を止めて分裂中期の細胞を確保する必要がある(図1)。

分裂中期には各染色体は紡錘体の中央部に平面をなして並ぶ。この核板(メタフェーズ)を、臨床細胞遺伝学指導士の資格を有する試験担当者が顕微鏡で観察し、核型(カリオタイプ)を判定した結果、5例中3例に7番染色体のトリソミーが検出された(検出率:4~10%)。

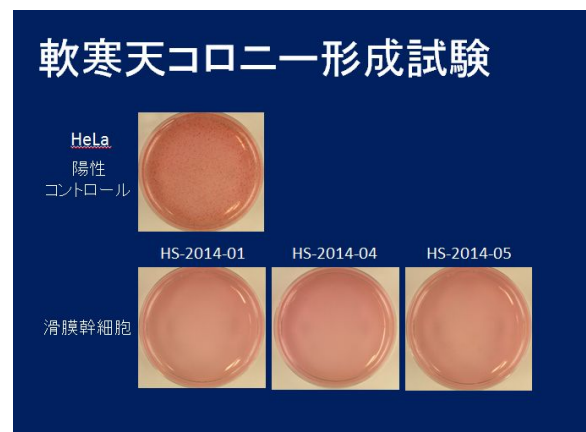
図1. 実施した染色体検査の方法



2. 軟寒天コロニー形成試験

7番染色体のトリソミーが検出された3例で、軟寒天コロニー形成試験を実施した。滑膜幹細胞を 1×10^5 個/60 mm dish の密度で軟寒天培地に播種し、2週間後にコロニー形成を判定した。陽性コントロールとしてはHeLa細胞を用いた。その結果、3例ともコロニーは検出されなかった。

図2. 軟寒天コロニー形成試験の結果



D: 考察

臨床研究に参加した被験者の5例中3例に7番染色体のトリソミーが検出されたが、過去の文献を調査すると、膝の関節軟骨疾患の患者由来の滑膜、軟骨、骨棘由来の細胞では、これまでも7番染色体のトリソミーが多数報告されていた(文献1~4)。文献2では、滑膜組織をコラゲナーゼ処理しただけの培養前の細胞にも7番染色体のトリソミーが検出されたと報告されている。また、すでに薬事承認された自家培養軟骨「ジャック」の審査報告書(平成24年6月5日PMDA)で報告されているが、変形性膝関節症患者3例中3例の膝関節軟骨から分離した培養前の軟骨細胞に7番染色体のトリソミーが検出されている。これらの過去の例からも、膝関節の疾患では、滑膜や軟骨の細胞に7番染色体のトリソミーがモザイクで存在することは珍しくない事例と思われる。

- 1) Ermis A, Henn W, Remberger K, Hopf C, Hopf T, Zang KD. Proliferation enhancement by spontaneous multiplication of chromosome 7 in rheumatic synovial cells in vitro. *Hum Genet.* 1995, **96**:651-4.
- 2) Mertens F, Pålsson E, Lindstrand A, Toksvig-Larsen S, Knuutila S, Larramendy ML, el-Rifai W, Limon J, Mitelman F, Mandahl N. Evidence of somatic mutations in osteoarthritis. *Hum Genet.* 1996, **98**:651-6.
- 3) Eklund E¹, Broberg K, Westergren-Thorsson G, Bjärdahlen A, Hedlund M, Malmström A.

Proteoglycan production in disomic and trisomy 7-carrying human synovial cells. *Matrix Biology.* 2002, **21**:325-35.

- 4) Castellanos MV, Hernández JM, Ramos L, Belén González M, Gutiérrez NC, Leone PE, Lumbreras E, Robledo C, García Hernández JL. Chromosomal abnormalities are related to location and grade of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:982-5.

再生医療製品の安全性確保の上で最も重要なのは、最終製品の造腫瘍性を正しく評価することと考える。*in vitro* 試験としては、軟寒天コロニー試験による評価が挙げられる。iPS細胞やES細胞には分散誘導性細胞死の問題から、軟寒天コロニー形成試験の適用は難しいが、滑膜幹細胞にはこのような問題もないので、軟寒天コロニー形成試験で造腫瘍性を評価したのは妥当であったと考える。

再生医療製品が生着する微小環境において腫瘍を形成するかを検討するためには、*in vivo* の試験が必要であるが、最終製品にごく僅かしか混入していないであろう造腫瘍性細胞を検出するには、より高感度な系が必要であろう。近年開発された重度免疫不全のNOGマウスは、ヒトの細胞や組織の生着性が著しく高く、ヒト癌細胞を高率に生着させることが可能である。7番染色体のトリソミーが検出された3例のうち最も検出率が高かった例では、トリソミー率は10%であった。10%の混入率の造腫瘍性のある細胞であれば、NOGマウスの系で腫瘍化を確認することは可能である

う。

今回、7番染色体のトリソミーが検出された滑膜幹細胞の造腫瘍性を軟寒天コロニー試験で検討した結果、コロニー形成が認められなかったことから、核型異常のある滑膜幹細胞が、腫瘍形成の原因となる可能性は低いと考える。しかし、再生医療製品の品質管理という点では、核型異常が培養によって発生したものではないということを明らかにする必要がある。また、原料の組織あるいは組織を酵素処理した段階で、核型異常を有する細胞が存在しているか否かを短時間で判定できる検出法の確立が重要な課題である。

E: 結論

被験者の滑膜幹細胞の5例中3例に7番染色体のトリソミーが検出されたが、軟寒天コロニー形成試験でコロニーは検出されず、腫瘍形成の原因となる可能性は低いと判断した。体性幹細胞でも核型異常や増殖性の変化を予め評価する工程評価が重要である。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

- 1) Suzuki N, Mizuniwa C, Ishii K, Nakagawa Y, Tsuji K, Muneta T, Sekiya I, Akazawa C. Teneurin-4, a transmembrane protein, is a novel regulator that suppresses chondrogenic

differentiation. *J. Orthop. Res* **46**: 1029–31, 2014

- 2) Suto EG, Mabuchi Y, Suzuki N, Koyanagi A, Kawabata Y, Ogata Y, Ozeki N, Nakagawa Y, Muneta T, Sekiya I, Akazawa C. High capacity of purified mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. *Inflammation and Regeneration* 2015 35(2):78-85.

著書

なし

国際学会発表

- 1) Eriko Grace Suto, Yo Mabuchi, Nobuharu Suzuki, Asuka Koyanagi, Yoshiko Kawabata, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, and Chihiro Akazawa. Purified Mesenchymal Stem Cells maintain purity and have high ability of chondrogenic regeneration after prolonged culture. The 9th New York Stem Cell Foundation Annual Meeting(2014.10.22)New York・USA

国内学会発表

- 1) 須藤絵里子グレース、馬淵洋、鈴木喜晴、川畑佳子、赤澤智宏。ラット間葉系幹細胞の分離および性質評価。第14回日本再生医療学会総会(2015.3.21)・横浜
- 2) 緒方勇亮、馬淵洋、吉田茉由、須藤絵里子グレース、鈴木喜晴、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏。ヒト膝滑膜における間葉系幹細胞マーカーの解析。第14回日本再生医療学会総会(2015.3.21)・横浜

- 3) Eriko Grace Suto, Yo Mabuchi, Nobuharu Suzuki, Asuka Koyanagi, Yoshiko Kawabata, Nobutake Ozeki, Yusuke Nakagawa, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya, Chihiro Akazawa
Purified Mesenchymal Stem Cells Have High Ability for differentiation in vivo.
第 37 回日本分子生物学会年会
(2014.11.27)・横浜
- 4) 緒方勇亮、馬淵洋、吉田茉由、須藤絵里子グレース、鈴木喜晴、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏． ヒト滑膜由来間葉系幹細胞の増殖能力及び軟骨分化能力の解析．
第 37 回日本分子生物学会年会
(2014.11.27)・横浜
- 5) 緒方勇亮、馬淵洋、吉田茉由、須藤絵里子グレース、小柳明日香、鈴木喜晴、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏． ヒト滑膜間葉系幹細胞の純化及び機能解析． 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2014.10.10)・鹿児島
- 6) 須藤絵里子グレース、小柳明日香、川畑佳子、馬淵洋、鈴木喜晴、関矢一郎、赤澤智宏． フローサイトメーターを用いた 純化間葉系幹細胞移植の有用性の解析． 第 9 回日本臨床検査教育学会学術大会(2014.8.22)・東京都
- 7) 吉田茉由、緒方勇亮、馬淵洋、須藤絵里子グレース、鈴木喜晴、宗田大、関矢一郎、赤澤智宏． ヒト滑膜間葉系幹細胞の純化及び性質比較． 第 9 回日本臨床検査教育学会学術大会(2014.8.22)・東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記する事項はなし

