

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20592334
 研究課題名 (和文) ヒト骨髄由来間葉系細胞を用いた安全・安心な細胞治療を行うための
 基盤整備研究
 研究課題名 (英文) A base maintenance study to perform security and reliable cell
 treatment that used a human marrow origin mesenchymal cell.
 研究代表者
 岡本 康正 (OKAMOTO KOSEI)
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号：40423371

研究成果の概要 (和文) : ES 細胞用無血清培地 hESF9 にて無血清培養条件の検討を行った。FGF-2、TGF- β 1 およびアスコルビン酸は濃度依存的に間葉系幹細胞 (MSC) の細胞増殖を促進した。hESF9 に TGF- β 1 を加えた hESF10 培地と血清を含む指定維持培地 POWERDBY10 間での各種遺伝子発現を比較検討した結果、hESF10 培地ではヒト ES 細胞の未分化マーカーである Nanog、Oct3/4、Sox2 の発現は POWERDBY10 よりも高く、また、hMSC マーカーである CD90、CD105、integrin β 1 および type I collagen も高発現を認めた。一方、骨分化マーカーである bone sialoprotein、osteopontin、osteocalcin、osteonectin の発現は、POWERDBY10 に比べて低いことがわかった。以上のことから、hESF10 は、未分化性と多分化能を維持した hMSC 細胞の増殖を促進していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : I examined the no serum culture condition in serum-free medium hESF9 for embryonic stem cells. FGF -2, transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid were density-dependent and promoted the cell proliferation of the mesenchyma system stem cell (MSC). As a result of having weighed various gene expression between designated maintenance nutrient medium POWERDBY10 including the serum against the hESF10 nutrient medium which increased transforming growth factor-beta 1 in hESF9, Nanog which was the undifferentiated marker of the human embryonic stem cell, Oct3/4, the expression of Sox2 were higher in the hESF10 nutrient medium than POWERDBY10, and CD90 which was hMSC marker again, CD105, integrin β 1 and typeIcollagen recognized overexpression. On the other hand, bone sialoprotein which was a bone differentiation marker, osteopontin, osteocalcin, the expression of osteonectin understood the thing that was lower than POWERDBY10. Based upon the foregoing, it was suggested that hESF10 promoted the increase of the hMSC cell which maintained an undifferentiation voltinism and many differentiation ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：口歯学・外科系歯学

キーワード：歯学、再生医学

1. 研究開始当初の背景

多分化能と自己増殖能を特徴とする間葉系幹細胞は、近未来における期待に満ち溢れた組織幹細胞である。未だ多くの疑問点はあるけれども、細胞治療における細胞ソースのみならず、その免疫調節作用を利用した組織修復、移植への応用、遺伝子治療など臨床応用など多くの可能性が検討されている。培養細胞を用いた医療を現実実施する際に最も重要視することは、安全性の確保をどのようするかという点である。すなわち、病原性を有する感染因子ならびに造腫瘍性に対する安全性確保、使用する細胞の品質および規制環境の整備などである。何をもちて安全であるかということは不明確な点が多々あり、様々な危険因子が予測できる。リスクを客観的に評価、分類し、いかに安全性を確保するかが必要不可欠である。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞、歯髄幹細胞とともに再生医療の治療戦略の重要な一翼を担う。現在、顎骨切除や骨欠損および歯牙喪失に対する新たな治療法として、骨髄幹細胞を用いた再生医療が期待されている。しかし、現状では細胞治療の実施のためには、未知の病原性微生物感染のリスクのない細胞、安全性の高い培養方法の確立、分化誘導方法の検討、細胞移植方法の設定など問題点が幾つも挙げられるのが実状である。間葉系幹細胞の性質には未だ不明な点が多く、多分化能が制御不能になった場合は造腫瘍性が高まり有害となる可能性もあり、未分化性と多分化能を安定して維持可能である必要がある。現在の間葉系細胞培養に使用されている条件においては、ヒト血清、自己血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は問題点である。

骨髄には多分化能と自己複製能を有する造血幹細胞や造血幹細胞以外の多分化能を持つ幹細胞が存在し、培養条件により骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等へ分化することが知られている。骨髄幹細胞を実験系に用いる場合、多分化能、増殖能を持った未分化細胞を長期的に維持することは困難であり、再現性のある結果が得られにくい。

骨髄幹細胞を培養する際、一般的に広く行われている血清を添加した培地を用いて培養を行う条件では、血清中に含まれるアクチビンや TGF- β などをはじめとする多種の分化

誘導因子、ホルモンおよび未知の因子の影響を受けるため、分化を厳密に制御することは困難である。さらに、再生医療へ応用するためには、未知のウイルスや因子を含む血清を使用することなく、分化させる系を確立する必要がある。さらに、骨髄幹細胞は、内、中、外胚葉由来の組織の全てが誘導可能であり、細胞増殖・分化のメカニズムを究明することが今後の課題となる。無血清培養法を用いることにより、骨髄幹細胞における形態形成、細胞分化の正確な解析を得ることができ、より現実的に且つ安全に医療への応用を進展させることが可能であり、骨髄幹細胞から顎骨や歯牙を誘導できると予想される。

3. 研究の方法

幹細胞を用いた再生医療を臨床応用、普及するためには、それ相当の細胞の品質および安全性の確保が極めて重要であり、安全・安心な細胞治療を行うための基盤整備が必須となる。再生医療の応用化に際して、幹細胞の特性を十分に理解し、培養細胞を正常に維持するためのより適切な培養条件の確立、幹細胞の分化能および増殖能の解析、炎症・免疫調整の分子機構の解明、形質転換に関する評価、安全性とリスク管理の検討を行う。本研究を踏まえた上で、より安全性の高い培養方法の確立、種々のウイルスや動物由来の添加物質などの抗原性、病原性を持つ感染因子に対する安全性の確保、癌化や腫瘍形成などの造腫瘍性に対する安全性の確保、環境整備および細胞の品質管理についての検討を行い、再生医療の有力な細胞源である幹細胞による細胞治療への戦略を展開していく。

(1) 細胞治療における安全性とリスク管理の検討

幹細胞を利用した再生医療を実施する上で、感染因子の混入防止、幹細胞の分化・増殖を制御し、実際の臨床応用で細胞治療に使用される細胞の安全性の確保、細胞の品質管理、倫理規定の標準化および細胞の機能を評価するシステムを確立することが必要不可欠である。

① 抗原性、病原性を持つ感染因子の検討

ウイルスやマイコプラズマ等の混入、汚染防止に対する品質管理として血清、細胞培養液、培養細胞における細菌・真菌培養検査、エンドトキシン定量およびマイコプラズマ検査を行う。

② 造腫瘍性の検討

骨髄由来幹細胞における *in vitro*、*in vivo* での分化制御機構、造腫瘍性を検討する。

③施設面を含めた環境整備

外部からの空気の侵入等、感染因子の混入の防止としての空調管理をはじめ、内部の室圧、温度、湿度を管理する。個別化したインキュベーターの管理、定量的 PCR 装置等、種々の機器の管理を徹底する。さらに、定期的に内部監査を行い、管理体制の維持改善を行う。

④細胞の品質管理

培養過程での細胞の均一性、適切な管理体制の構築、長期間による品質変化の管理、再現性の確保、リスク管理、細胞間のクロスコンタミネーションの防止を行い、培養技術のさらなる深化、管理を確立する。

(2) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の未分化性を長期に維持する無血清培養方法の確立
長期継代した骨髄由来幹細胞は、分化能、増殖能が低下する。そのため形質転換を生じさせず、分化能を維持する方法の開発が望まれる。

①ヒト骨髄幹細胞の採取

資料、文書等によりインフォームドコンセントを行い、承諾を得た骨折、顎変形症患者の顎骨骨髄より骨髄細胞を採取し、細胞培養を行う。採取方法は既に確立している。

②間葉系骨髄幹細胞の未分化状態を維持する培養条件の確立

広く無血清培養に用いられている当研究室で開発した培地を基礎培地として、最近マウス ES 細胞の無血清培養用に開発した ESF 培地を基礎培地として細胞増殖に及ぼす影響を検討する。

③骨髄幹細胞マーカー (CD105, CD73, CD106, CD29, CD44, CD90) の発現および血管系細胞の混入の有無をこれらマーカー (CD31, CD45, CD11c, CD123, CD34) 発現を検討する。

④細胞未分化マーカー (ALP, SSEA-1, SSEA-4, Oct3/4) を用いて細胞の未分化性を検討し、上皮、軟骨、骨、神経、血管分化マーカーを用いて細胞分化を検討する。

(3) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分化能および増殖能の検討

幹細胞を利用した再生医療を開発する上で、骨髄由来幹細胞を特定の細胞に分化・誘導するためには、その分化制御機構を解明し、分化をコントロールする必要がある。

①骨髄幹細胞の増殖能の検討

MTT assay にて FGF-2, Nodal, BMP-4, activin 等の存在下、非存在下での細胞増殖能を解析する。

②自己複製の最適化

未分化性の検討をアルカリフォスファターゼ活性で検討する。また、Oct3/4 および SSEA-1 抗体を用いて免疫組織学的ならびに FACS 解析を行う。

③遺伝子発現の解析

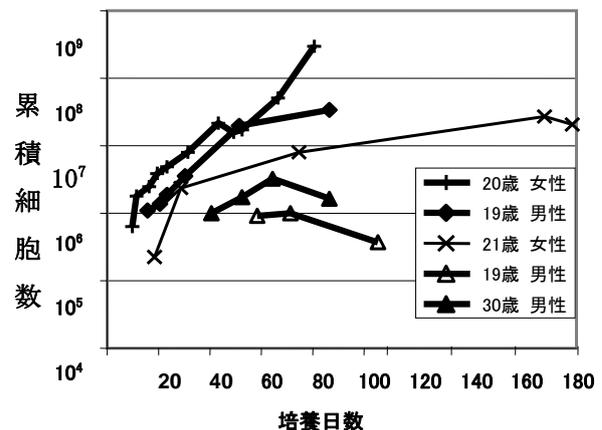
FGF-2, Nodal, BMP-4, activin 等の存在下、非存在下での未分化骨髄幹細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR および real time-PCR を用いて解析する。また、マイクロアレイにより網羅的解析を行う。

④分化制御チロシンシグナルの解析

骨髄幹細胞の分化・増殖に関して、FGF-2, Nodal, BMP-4, activin 等の存在下、非存在下での受容体シグナル伝達経路の解析を行う。

4. 研究成果

広島大学病院顎・口腔外科において、手術時に顎骨より採取した骨髄細胞の無血清培養を試みた (下図)。



初代培養に成功した骨髄細胞の累積増殖曲

採取した骨髄液中に存在する骨髄細胞を含む骨髄液約 2ml を遠心後、ESF 基礎培地のみ、基礎培地に基本因子を添加した ESF6 培地、ESF6 培地に LIF を添加したマウス ES 用無血清培地 ESF7、あるいは、ESF6 培地に FGF-2 とヘパリンを添加した ESF8 培地と混合し、ゼラチンコートしたプラスチックディッシュに播種し、5%CO₂/95%気相下、37°C インキュベーター内で初代培養を試みた。先行研究で開発したマウス ES 細胞用無血清培地 ESF7 に、FGF-2 およびヘパリンを添加した培地を用いたところ、十分な増殖能を有する骨髄細胞を培養することが可能であった。培養を試みた全 38 症例中、20 症例で初代培養に成功した。また、顎骨骨髄細胞の増殖能における

継代数の影響を検討するため、継代6代目および8代目の骨髄細胞の増殖を比較したところ、6代目では十分な増殖を認めたが、8代目の骨髄細胞では十分な増殖が得られなかった。つまり、長期間継代を続けると細胞増殖が遅くなり、十分な細胞数を得ることができなかった。この結果は、ヒト骨髄由来間葉系細胞はES細胞と異なり無限増殖が出来ないことを示している。

詳細な培養条件の検討は、臨床試料を用いた初代培養細胞では難しいことから、樹立骨髄由来MSCを使用し、ヒトMSCの未分化性を維持できる無血清培養条件の確立を試みることにした。MSC細胞を用いて、ヒトES細胞用無血清培地からFGF-2とヘパリンを除いたhESF7培地を使用し、各種増殖因子の増殖への影響を検討した。その結果、FGF-2、ヘパリンが増殖能に最も関与していることが明らかとなった。血清添加培地と同程度のMSCの細胞増殖が得られ、MSCの細胞増殖が十分得られる既知の因子からなる無血清培養条件の基礎ができたと考えられる。

ヒト間葉系幹細胞(hMSC)は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞といった間葉系に属する細胞以外にも分化することが明らかとなり、癌化の可能性や倫理的な問題が少ないことから安全な細胞ソースとして評価されつつある。しかし、一般的には血清添加培地で培養されており、比較検討および臨床応用が難しい。我々の研究グループは、単純で、且つ既知因子のみからなるヒトES細胞用無血清培地hESF9を開発し、すでに報告した。この研究では、hESF9をもとに、無血清培養条件の検討を行った。その結果、FGF-2、TGF- β 1およびアスコルビン酸は濃度依存的にMSCの細胞増殖を促進した。そこで、hESF9にTGF- β 1を加えたhESF10培地と血清を含む指定維持培地POWERDBY10間での各種遺伝子発現を比較検討した。その結果、hESF10培地ではヒトES細胞の未分化マーカーであるNanog、Oct3/4、Sox2の発現はPOWERDBY10よりも高く、また、hMSCマーカーであるCD90、CD105、integrin β 1およびtype I collagenも高発現を認めた。一方、骨分化マーカーであるbone sialoprotein、osteopontin、osteocalcin、osteonectinの発現は、POWERDBY10に比べて低いことがわかった。以上のことから、hESF10は、未分化性と多分化性を維持したhMSC細胞の増殖を促進していることが示唆された。今後は、将来の再生医療において、より一層の間葉系幹細胞の実用化に向けた評価を行い、臨床応用に関する安全性とリスク管理に関してのガイドライン、組織構築、管理体制の確立、開発を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: Defined Medium for Human ES Cell Culture

発明者: 岡本哲治

種類: 特許

番号: 特願 2009-518958

国際 PCT/GB2007/002584

国内外の別: 国際

○取得状況(計1件)

名称: BASAL MEDIUM FOR ES CELL CULTURING

発明者: 岡本哲治

種類: ヨーロッパ特許

番号: EP1698690

取得年月日: 2010年4月28日

国内外の別: 国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 康正 (OKAMOTO KOSEI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 40423371

(2) 研究分担者

栗原 英見 (KURIHARA HIDEMI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号: 40161765

岡本 哲治 (OKAMOTO TETUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号: 00169153

(3) 連携研究者

()

研究者番号: