

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592923

研究課題名(和文) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた安全・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(歯)・病院助教

研究者番号：40423371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：樹立骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を使用して、ES細胞用無血清培地にて検討を行った。MSCのマーカー遺伝子であるCD90(Thy-1)、CD105(Endogrin)および未分化ヒトES細胞で発現が認められる遺伝子Oct3/4、Nanogは、POWEREDBY10あるいはhESF7培地にFGF-1、FGF-2、LIF、アクチビンAあるいはヘパリンをそれぞれ添加したいずれの条件のMSCにおいても発現が認められた。また、hESF9およびhESF10培地で培養したMSCでも同様に発現が認められた。MSCの未分化性の指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：With a mesenchyma system stem cell (MSC) derived from establishment marrow, I examined it in a serum-free medium for embryonic stem cells. In CD90 (Thy-1), CD105 (Endogrin) which was a marker gene of the MSC, and gene Oct3/4, Nanog where expression was accepted with an undifferentiated human embryonic stem cell, expression was recognized in the MSC of which condition that added FGF-1, FGF-2, LIF, activin A and heparin in POWEREDBY10 or hESF7 nutrient medium. In addition, expression was accepted in the MSC which I cultured in hESF9 and hESF10 nutrient medium equally. Possibility to become the index of the undifferentiation voltinism of the MSC was suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：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的に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に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。何をもちい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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

骨髄幹細胞、細胞未分化マーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行い、発現動態を解析する。

(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。

骨髄幹細胞の増殖能の検討

MTT Assay、³H-thymidine incorporation assay によって FGF-1、FGF-2、FGF-4、FGF-10、Nodal、BMP-2、BMP-4、BMP-6、TGF- β 1 等存在下、非存在下での細胞増殖能を検討する。

遺伝子発現の解析

幹細胞のマーカーと考えられている CD90、ヒト ES 細胞の未分化マーカーで間葉系幹細胞でも発現が認められている Oct3/4、その他、Nanog、Sox2、DPPA5/ESG1 等の発現を、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。

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。

分化制御シグナルの解析

骨髄幹細胞の分化・増殖に関して、FGF-1、FGF-2、FGF-4、FGF-10、Nodal、BMP-2、BMP-4、BMP-6、TGF- β 1 等存在下、非存在下での受容体シグナル伝達経路の解析を行う。

免疫染色

無血清培養条件下で骨分化誘導培地、軟骨分化培地、脂肪分化培地を使用し、骨・軟骨・脂肪への分化誘導を行って、分化能を解析する。誘導された骨芽細胞の確認には Alizarin Res S、軟骨細胞の確認には Alcian Blue、脂肪細胞の確認には Oil Red O による染色にて行う。

造腫瘍性(癌化、腫瘍形成)の検討

骨髄由来幹細胞の *in vitro*、*in vivo* での分化制御機構、形質転換を検討する。また、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の発現を解析し、ヌードマウスを用いて造腫瘍性の有無を検討する。

(4) 細胞治療における安全性とリスク管理の検討

将来の再生医療において、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、開発を行う。

抗原性、病原性を持つ感染因子に対する安全性の確保

ウイルスやマイコプラズマ等の混入防止に対する品質管理として血清、細胞養液、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。

造腫瘍性に対する安全性の確保

発癌性試験およびエピジェネティック解析を行う。また、核型分析、継代数を重ねた細胞に対する評価試験を行う。

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、リスク管理を確立する。

幹細胞の標準化

幹細胞の性質(由来、培養条件、生物学的特性等)を一定の基準や様式に関して検討する。

4. 研究成果

顎骨より採取した骨髄液中に存在する骨髄細胞を含む骨髄液を無血清培地にて初代培養を試みた。先行研究で開発した Lekemia inhibitory factor (LIF) を除去したマウス ES 細胞用に開発された無血清培地 ESF7 に Fibroblast growth factor - 2 (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。詳細な培養条件の検討は、臨床試料を用いた初代培養では難しいことから、樹立骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を使用して検討を行った。

MSC 細胞株についてヒト ES 細胞用無血清培地から FGF-2 およびヘパリンを除いた hESF7 培地を用いて FGF-1, FGF-2, LIF, TGF- β 1、ア

クチピン A、ヘパリンの細胞増殖能への影響を検討した結果、FGF-2、TGF- β 1 およびヘパリンが MSC の細胞増殖に關与することが明らかとなった。前年度に hESF7 培地に FGF-2 およびヘパリンを添加した hESF9 培地、hESF9 培地に TGF- β 1 を加えた hESF10 培地および血清添加培地である POWERDBY10 間でのヒト ES 細胞の未分化マーカーである Nanog、Oct3/4、Sox2、hMSC マーカーである CD90、CD105、integrin α 1、type I collagen の発現を比較検討したが、増殖能を比較したところ、hESF9 培地では血清添加培地ほどの増殖が得られず、一方、hESF10 培地では血清添加培地と同程度の増殖が認められた。MSC のマーカー遺伝子である CD90 (Thy-1)、CD105 (Endoglin) および未分化ヒト ES 細胞で発現が認められる遺伝子 Oct3/4、Nanog は、POWEREDBY10、あるいは hESF7 培地に、FGF-1、FGF-2、LIF、TGF- β 1、アクチピン A あるいはヘパリンをそれぞれ添加した、いずれの条件で培養を行った MSC でも発現が認められた。また、hESF9 および hESF10 培地で培養した MSC でも同様に発現が認められた。これらは、感染因子の混入防止とし徹底した管理体制のもとで研究を行った。管理体制、培養技術は年々向上しており、十分な細胞の品質管理が可能であった。今後は、将来の再生医療において、臨床応用に関する安全性とリスク管理に關してのガイドライン、組織構築、管理体制の確立を行いたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

取得状況 (計 2 件)

名称 : 細胞増殖培地 : Defined Medium for Human ES Cell Culture
発明者 : 岡本哲治、楠田美保、デンリー・サトウ、ピーター・アンドリュース
権利者 : 岡本哲治
種類 : 特許
番号 : 特願 2009-518958 (P2009-518958), 国際出願番号 PCT/GB2007/002584
取得年月日 : 2013 年 3 月 22 日
国内外の別 : 国際

名称 : Basal Medium for ES culturing
発明者 : 岡本哲治、古江美保、浅島誠
権利者 : 岡本哲治
種類 : 特許、米国特許
番号 : 米国出願番号 : 10/584,371, 国際出願番号 : PCT/JP04/19818, 米国特許番号 : No. 7,923,245
取得年月日 : 2011 年 4 月 12 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 (歯)・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・医歯薬保健学研究院 (歯)
教授
研究者番号 : 40161765

(3) 研究分担者

岡本 哲治 (OKAMOTO TETSUJI)
広島大学・医歯薬保健学研究院 (歯)
教授
研究者番号 : 00169153