

細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について

澤田留美,* 伊藤友実, 土屋利江

Safety Evaluation of Tissue Engineered Medical Devices Using Normal Human Mesenchymal Stem Cells

Rumi SAWADA,* Tomomi ITO, and Toshie TSUCHIYA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 17, 2007)

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using somatic stem cells in regenerative medicine. Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, *e.g.*, bone, cartilage, adipose, and muscle cells; they, therefore, have many potential clinical applications. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to cancer cells. For safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal hMSCs, in this study, we investigated the expression levels of several genes that affect cell proliferation in hMSCs during *in vitro* culture. We focused on the relationship between the hMSC proliferation and their transforming growth factor β (TGF β) signaling during *in vitro* culture. The proliferation rate of hMSCs gradually decreased and cellular senescence was observed for about 3 months. The mRNA expressions of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β receptor type I (TGF β RI) in hMSCs increased with the length of cell culture. The mRNA expressions of Smad3 increased, but those of c-myc and nucleostemin decreased with the length hMSCs were in *in vitro* culture. In addition, the expression profiles of the genes which regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells. In conclusion, hMSCs derived from bone marrow seldom underwent spontaneous transformation during 1—2 months *in vitro* culture for use in clinical applications. In hMSCs as well as in epithelial cells, growth might be controlled by the TGF β family signaling.

Key words—human mesenchymal stem cells; tissue engineered medical devices; proliferation; transforming growth factor β

1. はじめに

様々な疾病などに起因した組織や器官の機能不全に対して、組織再生又は機能回復を目指した「再生医療」が、現在注目されている。その手段としてこれまでに、幹細胞や人工素材を用いた医療機器の開発や細胞治療などについて多くの研究がなされている。胚性幹細胞 (ES 細胞) は全能性を持つが受精卵を用いることから倫理的問題が大きいのに対し、体性幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題がない点が再生医療や細胞治療のツールとして利用されている大きな理由であろう。中でも骨髄に含まれる間葉

系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞は、様々な臨床分野での応用が期待されている。また、骨髄や臍帯血中には間葉系幹細胞や造血幹細胞よりもさらに上の段階で多くの細胞系への分化能を持った細胞 (multipotent adult progenitor cells; MAPCs) が存在することも報告されている。¹⁾ さらに骨髄中だけでなくそれぞれの組織に特異的な幹細胞 (肝, 心筋, 神経, 上皮など) の存在も知られている。骨髄由来の間葉系幹細胞は骨, 軟骨, 脂肪, 筋肉へ分化可能な細胞として広く知られている¹⁻⁵⁾ が, さらに, 神経細胞³⁾ や肝細胞,^{1,6)} 心筋,^{7,8)} 皮膚など胚を越えた分化も報告されており, 整形外科の分野のみならず動脈硬化症, 心筋梗塞, 肝硬変, 糖尿病などの治療への応用も期待されている。骨髄間葉系幹細胞は採取も比較的容易で *in vitro* での培養技術も確立されているため, 細胞組織利用医療機器の材料と

国立医薬品食品衛生研究所療品部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

*e-mail: rsawada@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S4 で発表したものを中心に記述したものである。

して最も実用に近いものの1つであろう。

しかしその反面、幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞である⁹⁾ため、正常細胞でありながら増殖能力を持つという点で癌細胞と共通の性質を持つともいえる。そのような背景の中、Rubioら¹⁰⁾により脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞を長期間(4—5ヵ月) *in vitro* で培養すると自然に形質転換(癌化)するという報告がなされた。一方最近、間葉系幹細胞の由来によるその性質の違いについて、骨髄、臍帯血、脂肪組織由来の間葉系幹細胞をそれぞれ比較することによって示した報告¹¹⁾もあり、脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞が自然に形質転換するという上記の報告¹⁰⁾が直ちに骨髄由来の間葉系幹細胞やさらには他の体性幹細胞も同様な変化を起こすということにはならないが、やはりその危険性に対して注意を払う必要はあるであろう。特に、体性幹細胞を細胞組織利用医療機器や細胞治療に用いるためには、生体内から取り出したのち *in vitro* で培養しある程度の細胞数を得なければならない。このため、少なくとも *in vitro* での培養中に幹細胞の性質ができるだけ変化しないことが望ましい。幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器や細胞治療の実用化に向けて *in vitro* での培養中における幹細胞の安全性評価法の早期確立が重要課題であろう。

その第一歩として、筆者らは現在、幹細胞の *in vitro* での培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化について検討を行っている。その理由としては、幹細胞におけるいくつかの遺伝子発現について調べることでその安全性を評価できる系を最終的に確立できれば、誰でも簡単に評価できるためであり、幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器等の開発の促進につながることを期待している。本稿では、幹細胞の自己複製制御機構を探るために骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* での培養中に起こる遺伝子発現レベルの変化について検討した結果を紹介する。

2. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能について

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC; Cambrex社より2継代目の凍結細胞を購入)を *in vitro* で培養していくと、通常その増殖能は次第に低下していく(Fig. 1)。細胞を採取した個体による増殖速度の差はみられるものの、そのほとんどが培養期間2ヵ月を超えると増殖速度は低下し始め、4—5ヵ月になるとほとんど増殖しなくなってくる。増殖速度が低

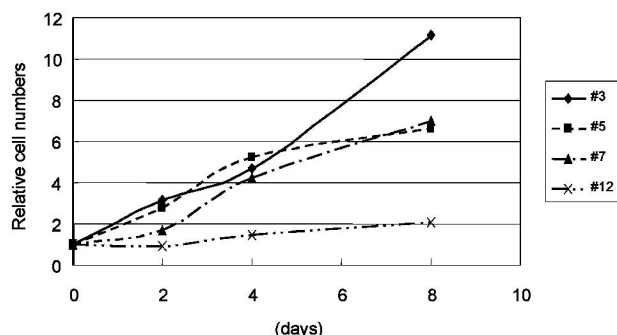


Fig. 1. Proliferation of hMSC in 3rd, 5th, 7th, and 12th Passages¹⁶⁾

hMSC were seeded at 1.7×10^5 cells/ $\phi 60$ mm dish (6000 cells/cm²), and cells were counted after 2, 4, and 8 days. The initial cell number (0 day) is expressed as 1, and the other cell numbers (2, 4, and 8 days) are relative to that of day 0. $n=3$.

下した幹細胞は Senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining によって細胞中に老化している細胞が含まれていることが確認された。増殖因子を添加した培地を用いた培養も行っているが、増殖速度は上昇するものの培養期間による速度の変化は増殖因子を加えていない細胞と同様であり、長期間培養しても無限増殖する幹細胞の存在は現在の所筆者らは確認していない。

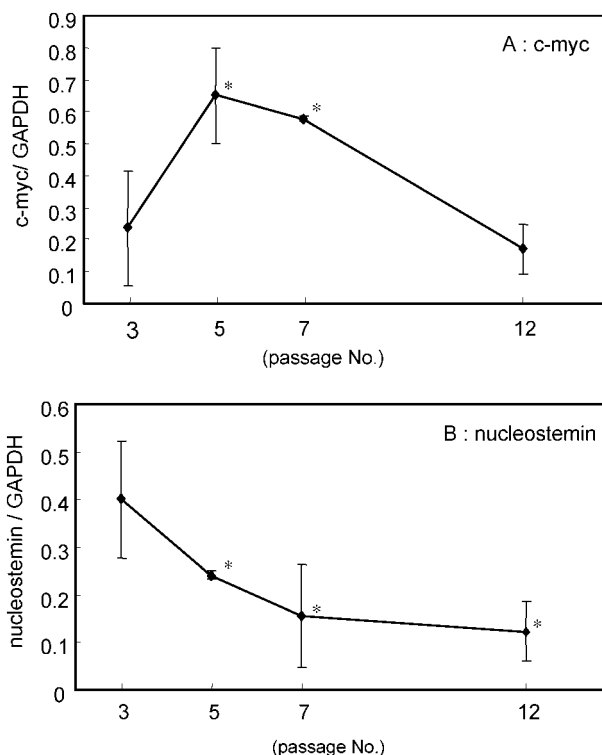
3. *In vitro* 培養における hMSC の遺伝子発現レベルの変化について

上述したように、hMSC は *in vitro* での培養を続けることによってその増殖能は低下してくる。また細胞の形態等の変化もみられており、培養期間中に遺伝子の発現に変化が生じる可能性が示唆された。そこで、*in vitro* 培養期間の長さによる hMSC の遺伝子発現レベルの変化について調べるために、まず DNA アレイ解析 (BD AtlasTM Human Cancer 1.2 Array) を行った。培養期間1ヵ月程度の細胞と2ヵ月以上の細胞とで比較検討した。それぞれの遺伝子の機能による分類単位での変化について Table 1 に示した。こちらはあくまで全体的な傾向を示しているため、それぞれの分類に含まれる個々の遺伝子の発現の変化がすべて同じという訳ではないが、hMSC は *in vitro* での培養を続けることによって遺伝子発現レベルの変化が起こることは確認された。hMSC の培養中に癌化といった形質転換が起こっていないことを確かめる指標を探るために「細胞増殖」という点に着目し、また上記の DNA アレイ解析結果も踏まえて、次に個々の遺伝子の発現レベル

Table 1. Comparison of Gene Expressions in hMSC (1 Month Culture) and hMSC (Over 2 Months)

The genes concerned with the following functions were up-regulated with the culture term	
•	Cell cycle
•	Cell adhesion receptors/proteins
•	Immune system proteins
•	Oncogenes and tumor suppressors
•	Stress response proteins
•	DNA binding and chromatin proteins
•	Cell receptors (by ligands)
•	Cell receptors (by activities)
•	Intracellular transducers/effectors/modulators
•	DNA synthesis, recombination, and repair
The genes concerned with the following functions were down-regulated with the culture term	
•	Membrane channels and transporters
•	Metabolism
•	Translation
•	Apoptosis associated proteins
•	RNA processing, turnover, and transport
•	Protein turnover
•	Cytoskeleton/motility proteins

の変化について hMSC の培養期間を 4 点取り検討した。まず、癌遺伝子の 1 つであり細胞の増殖機能に係わる c-myc、幹細胞と癌細胞の両者の増殖に係わる nucleostemin、様々なシグナル伝達経路や発癌に係わるといわれている Wnt-8B について検討したところ、c-myc 及び nucleostemin (Fig. 2) は hMSC の培養期間の長さに依存してそれぞれの発現レベルは低下した。一方、Wnt-8B についてはどの培養期間においてもその発現は認められなかった。さらに、細胞増殖、分化、アポトーシス、細胞外マトリックス形成、免疫抑制そして発癌などの制御に係わる TGF β について検討した。TGF β には 3 つの分子種が存在 (TGF β 1, 2, 3) し、TGF β は細胞表面にある 3 つのタイプの受容体 (TGF β RI, II, III) を通じてシグナルを細胞内へ伝達する。TGF β RI と TGF β RII はセリン-チロシンキナーゼで、TGF β RIII はペググリカンとして知られている。¹²⁾ TGF β はまず TGF β RII に直接か又は TGF β RIII を介して結合し、TGF β RII によって TGF β RI を刺激することで細胞内 TGF β シグナル伝達系がスタートする。活性化された TGF β RI が Smad2 若しくは Smad3 をリン酸化したのち、シグナルを核内へと伝え c-

Fig. 2. Effect of *In vitro* Culture Length on the mRNA Expressions of c-myc (A) and Nucleostemin (B) in hMSC¹⁶⁾

Expressions of the two genes relative to GAPDH in confluent cultures of hMSC in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with standard deviations from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (* $p < 0.05$).

myc のような TGF β に依存する遺伝子の転写を制御する。^{13,14)} そのため、TGF β の 3 種類の分子種と 3 タイプの受容体及び Smad3 についても hMSC の培養期間によるその発現レベルの変化について調べた。TGF β 1 及び TGF β 2 は *in vitro* での培養を続けることによってその発現レベルが上昇したが、TGF β 3 は変化しなかった (Fig. 3)。受容体についてはタイプ I は上昇したが、タイプ II 及び III は変化がみられなかった (Fig. 3)。Smad3 は TGF β 1, β 2 及び TGF β RI と同様に上昇した。以上の結果から hMSC の培養中の遺伝子発現について、TGF β →c-myc へのシグナル伝達系に係わる因子についての変化を Fig. 4 にまとめた。hMSC は *in vitro* での培養を続ける過程で、TGF β →TGF β RI→Smad3→c-myc の経路で細胞周期停止が起こり、細胞の増殖が抑制されるのかもしれない。

以上の結果から、hMSC を *in vitro* で培養することによって通常はその増殖能が徐々に低下していき、その間の遺伝子発現の変化からも上皮系の他の

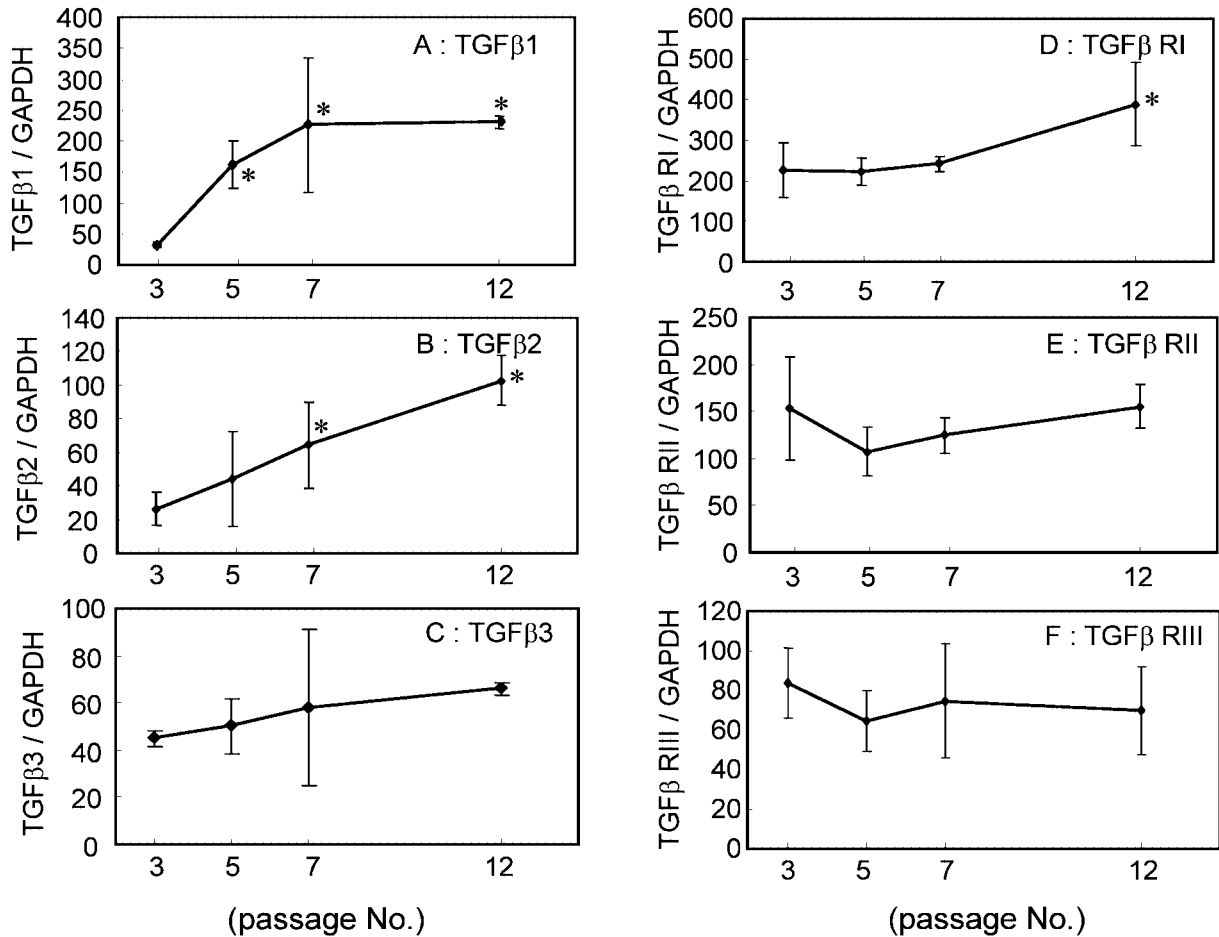


Fig. 3. Effect of *In vitro* Culture Length on mRNA Expressions of TGFβ1 (A), TGFβ2 (B), TGFβ3 (C), TGFβRI (D), TGFβRII (E), and TGFβRIII (F) in hMSC¹⁶⁾

Expressions of the four genes, relative to GAPDH, in confluent cultures of hMSC in the 3rd, 5th, 7th, and 12th passages were investigated by quantitative real time RT-PCR. Mean values with standard deviations from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with the 3rd passage (**p*<0.05).

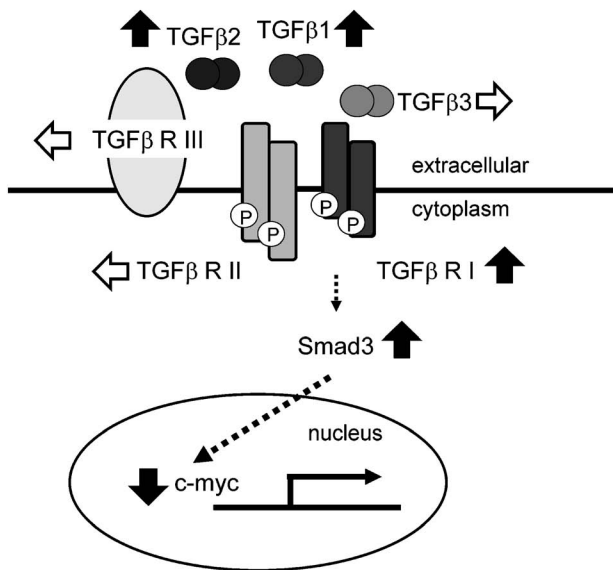


Fig. 4. Changes in the Expressions of TGFβ Signaling Genes during hMSC *In vitro* Culture for Three Months

細胞と同様なメカニズムで細胞増殖抑制が起こっていると考えられる。もしもこのような細胞の変化が「正常」な変化であると考えた場合、hMSCが培養中に形質転換等の望ましくない変化を起こした場合には違った発現パターンがみられる可能性があり、本研究で検討した遺伝子が幹細胞における培養中の変化に対する安全性評価の1つの指標となり得るかもしれない。現在、遺伝子発現の変化におけるhMSCの個体差を考慮し個体差を超えた共通性を見出すために、複数の個体由来のhMSCを研究対象とし、また細胞の癌化や老化という観点からも更なる検討を行っている。

4. 幹細胞と癌細胞における遺伝子発現の比較について

幹細胞の癌化について、その危険性を評価するためには「自然に癌化した」幹細胞との比較検討が必

要であると思われる。しかし、現段階でそのような幹細胞は得られていない。そのため、筆者らはこれまでにライン化された数種類の癌細胞と幹細胞(hMSC)を、特に「細胞増殖」や「発癌」に係わると考えられている遺伝子についてその発現を比較した。「細胞増殖」に係わる遺伝子についてはその発現が上皮系の癌細胞では幹細胞よりも高いものもいくつか認められたが、肉腫細胞との比較ではその限りではないものもあり、未だ検討の余地が大きく残されている。つまり、幹細胞と癌細胞の違いを明らかにし幹細胞の癌化の指標となる遺伝子を決定するためにはさらなる検討を必要としている。特に現在、癌幹細胞の存在も広く認められてきており、⁹⁾組織幹細胞と癌幹細胞との共通性や特異性を明らかにしていくことが望まれる。それが最終的に幹細胞の癌化のメカニズムを探る1つのきっかけとなるであろう。

5. おわりに

再生医療を目的とする幹細胞の研究は、わが国でも非常に盛んに行われている。特に間葉系幹細胞を用いることによる有効性については、骨・軟骨再生から心筋梗塞治療に至るまで幅広い臨床分野で報告されている。また、先頃厚生労働省より「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が公布され、幹細胞を用いた細胞組織利用医療機器についてさらなる臨床研究の発展が期待される。しかし一方で、実際に幹細胞を用いる際の安全性について評価する明確な基準は今のところ制定されていない。幹細胞の調製の際に無菌的に取り扱うための基準等は定められているものの、幹細胞自身の安全性さらに生体内へ移植したのちの癌化等を含む安全性を担保するための評価法については確立しておらず、その早期確立が求められている。また幹細胞が将来的に「細胞組織利用医療機器」としての材料となるためには auto だけでなく allo も視野に入れていかなければならず、より一層早急な対応が望まれる。現在、幹細胞の調製段階において MSC 及び繊維芽細胞のマーカー遺伝子の発現をみることによって骨髄間葉系幹細胞の均一性を検査する方法を Kato ら¹⁵⁾が提案しており、われわれは同様な方法で細胞の癌化に対する安全性評価法を確立できたら幹細胞の調製時にその均一性と安全性を同時に簡便に評価できるのではないかと考え、そのマーカー遺伝子の探索を行っ

ている。細胞組織利用医療機器として移植された幹細胞が生体内で癌化等の望ましくない変化を起こさないかどうか確認するためには、本来ならば10年単位の非常に長期的な観察が必要であろう。しかし現時点である程度癌化の予測ができるような評価系を確立しなければ、最新の技術によって支えられた「細胞組織利用医療機器」という次世代の医療機器の開発を妨げることになってしまう。そのため、筆者らは幹細胞の安全性評価法の早期確立を目指して、第一段階として移植前の *in vitro* 培養中の細胞の変化について検討し、幹細胞の増殖能に関する性質を探ることで、そこから逸脱しないという形での基準作りを試みている。本稿で述べた研究内容はその第一歩である。「細胞組織利用医療機器」の実現のために少しでも貢献できるように現在も検討を続けている。

REFERENCES

- 1) Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., Verfaillie C. M., *Nature*, **418**, 41-49 (2002).
- 2) Rosenthal N., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 267-274 (2003).
- 3) Korbling M., Estrov Z., *N. Engl. J. Med.*, **349**, 570-582 (2003).
- 4) Hishikawa K., Miura S., Marumo T., Yoshio-ka H., Mori Y., Takato T., Fujita T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 1103-1107 (2004).
- 5) Horwitz E. M., Gordon P. L., Koo W. K. K., Marx J. C., Neel M. D., McNall R. Y., Muul L., Hofmann T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 8932-8937 (2002).
- 6) Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. N., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S., *Science*, **284**, 1168-1170 (1999).
- 7) Mangi A. A., Noiseux N., Kong D., He H., Rezvani M., Ingwall J. S., Dzau V. J., *Nat. Med.*, **9**, 1195-1201 (2003).
- 8) Strauer B. E., Brehm M., Zeus T., Kostering M., Hernandez A., Sorg R. V., Kogler G., Wernet P., *Circulation*, **106**, 1913-1918

- (2002).
- 9) Pardal R., Clarke M. F., Morrison S. J., *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 895–902 (2003).
 - 10) Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M. C., Fuente R., Cigudosa J. C., Lloyd A. C., Bernad A., *Cancer Res.*, **65**, 3035–3039 (2005).
 - 11) Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K., *Stem Cells*, **24**, 1294–1301 (2006).
 - 12) Lopez-Casillas F., Cheifetz S., Doody J., Andres J. L., Lane W. S., Massague J., *Cell*, **67**, 785–795 (1991).
 - 13) Massague J., Wotton D., *EMBO J.*, **19**, 1745–1754 (2000).
 - 14) Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.-H., *J. Cell Sci.*, **114**, 4359–4369 (2001).
 - 15) Ishii M., Koike C., Igarashi A., Yamanaka K., Pan H., Higashi Y., Kawaguchi H., Sugiyama M., Kamata N., Iwata T., Matsubara T., Nakamura K., Kurihara H., Tsuji K., Kato Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 297–303 (2005).
 - 16) Sawada R., Ito T., Tsuchiya T., *J. Artif. Organs*, **9**, 179–184 (2006).