

ヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養期間中の変化について
—*c-myc* をターゲットとした遺伝子発現解析と染色体異常解析—

澤田留美,* 松岡厚子, 松田良枝, 土屋利江

Change in Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells during the *In Vitro* Culture
—*c-myc* Gene Expression and Chromosome Aberrations at the *c-myc* locus—

Rumi SAWADA*, Atsuko MATSUOKA, Yoshie MATSUDA, and Toshie TSUCHIYA
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received July 23, 2008; Accepted September 3, 2008; Published online September 5, 2008)

We investigated mRNA expression of *c-myc* and chromosome aberrations at the *c-myc* locus in the same passage number of human mesenchymal stem cells (hMSCs). To understand the sensitivity of mRNA expression and the induction of chromosome aberrations, we first tested them in hMSC and cancer cell lines (HeLa S3, HOS, and OUMS-27). The *c-myc* mRNA expressions in HeLa S3 and OUMS-27 were significantly higher than those in hMSC, but then those in HOS were not. On the other hand, *c-myc* aberrant cells detected by fluorescence in situ hybridization in HeLa S3, HOS, and OUMS-27 were significantly higher than that in hMSC. Both analyses were performed in hMSCs derived from five donors for the culture period of 50 days. In hMSCs from one donor, the frequency of *c-myc* aberrant cells significantly increased at 20 and 50 days respectively, and each mRNA expressions had a tendency to increase, but there is no significant change among 3, 20 and 50 days. In hMSCs from the others, both endpoints did not change for 50 days. For safe use of somatic stem cells in the regenerative medicine, the investigation of characteristic change of them during the *in vitro* culture is important. In the present study, we showed the mRNA expressions and chromosome aberrations of hMSCs in *in vitro* culture as the first step for establishing of safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal hMSCs.

Key words—human mesenchymal stem cells (hMSCs); *c-myc* gene expression; copy number of the *c-myc* locus; (HeLa S3, HOS, OUMS-27)

緒 言

最近、「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)」と呼ばれる新たな万能細胞がヒトの自己の皮膚細胞から樹立されたことが報告され脚光を浴びている。¹⁾今まさにその実用化に向けて国を挙げての取り組みが始まっており、この iPS 細胞の樹立をきっかけに今後益々事故や病気で失った組織の修復、再建を目指す「再生医療」への期待が高まるであろう。このような背景の中、成体幹細胞の一種である間葉系幹細胞は、骨、軟骨、筋、腱、脂肪、さらには神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も報告されているため幅広い再生医療分野での利用が期待されている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間

葉系幹細胞が、その採取技術及び *in vitro* での培養技術も確立されており、細胞組織医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの1つであると考えられる。しかし、一般に幹細胞は分化能とともに増殖能を有しており、人の体内から取り出してある程度の量まで増殖させて再び体内へ移植できるという利点と同時に、両機能を体内で適切に制御できるかという問題点を含んでいる。特に細胞組織医薬品や細胞組織医療機器に利用するためには幹細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経なければならないため、*in vitro* での培養期間中に幹細胞が目的以外の形質を持った細胞に変化しないこと、特に遺伝的形質に変化がないことを確認し、患者に戻される細胞の安全性を担保する方法を確立することは大変重要であろう。本研究ではその第一歩として、ヒト骨髄由来間葉系幹細

胞 (hMSC) の *in vitro* での培養期間中における細胞の変化について検討する手段として遺伝子発現レベルと染色体レベルでの異常解析とを同じ遺伝子座 *c-myc* で同時に行った。

実験方法

1. 細胞及び培養

ヒト間葉系幹細胞：5ドナー由来の hMSC (Lonza Walkersville, Inc.) を, Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地でそれぞれ培養した。それぞれのドナー情報は Table 1 に示す。

ヒト子宮頸がん由来細胞：HeLa S3 (JCRB Cell Bank) は Ham's F-12 Nutrient Mixture [大日本住友製薬㈱] に 10% fetal bovine serum (FBS) を加えた培地で培養した。

ヒト骨肉腫細胞：HOS [大日本住友製薬㈱] は minimum essential medium (MEM; Eagle) に 0.1 mM non-essential amino acid (NEAA) と 10% FBS (Intergen) を加えた培地で培養した。

ヒト軟骨肉腫細胞：OUMS-27 (JCRB Cell Bank) は Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM; 日水製薬㈱] に 0.1 mM NEAA と 10% FBS を加えた培地で培養した。

2. Real time (RT)-PCR による mRNA 発現量の定量的解析 hMSC, HeLa S3, HOS, OUMS-27 から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。抽出した total RNA の cDNA への逆転写は First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics) を用いて行った。それぞれの細胞の *c-myc* の mRNA 発現レベルについて Real time RT-PCR 法にて検討した。用いたプ

ライマーは, Forward: 5'-GCGAACACACAACGTC-3', Reverse: 5'-CAAGTTCATAGGTGATTGCT-3' で, PCR 反応は, 95°C で 10 秒, 50°C で 15 秒, 72°C で 12 秒を 40 サイクル行った。一方, ハウスキーピング遺伝子として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現を検討し, PCR 反応はライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて行った。定量的解析は, Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

3. 染色体数計数と FISH による *c-myc* コピー数異常解析 hMSC の染色体標本は以下のように作製した。コルセミド (0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で一晩処理し, トリプシンで細胞を回収した。75 mM KCl 溶液で室温 20 分間低張処理したのち, カルノア液 (氷酢酸:メタノール=1:3 混液) で 3 回固定した。細胞懸濁液をスライドグラスに滴下し, 自然乾燥させた。3 種の腫瘍細胞株の染色体標本は, コルセミド (0.1-0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 2-4 時間処理した以外は, hMSC と同様に作製した。染色体数計数用の標本はギムザ染色し, 分裂中期像を撮影して染色体数を計数した。*c-myc* コピー数異常解析は, 従来の分染法より簡便に実施できる FISH (fluorescence *in situ* hybridization; 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法を採用したが, FISH 解析用標本は窒素ガスを封入したビニル袋に密閉し, -20°C に保管した。

FISH 解析は, *c-myc* の DNA プローブ (Spectrum Orange 標識, VYSIS 社, 米国) を用いた。*c-myc* は正常では 8 番染色体の長腕の先端にシグナルが観察されるが, プローブ長が短い (約 120 kb) ため間期細胞でもシグナルの正確な観察ができるという利点がある。

プローブ DNA を 70°C で 5 分間熱変性させ, すぐに氷冷した。染色体 DNA を変性させるために, スライドグラスを 70°C の 70% フォルムアミド溶液に 4 分間浸し, すぐに氷冷した 70% エタノールに移し, その後続けて 85%, 100% エタノールに移して自然乾燥させた。スライドグラスに熱変性したプローブ DNA 液を乗せてカバーグラスで覆い, 回りをペーパーバンドでシール後, 37°C で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ終了後, 45°C の 50%

Table 1. Donor Information of hMSCs

	Lot No.	Age	Race	Sex
hMSC-A	3F0664	19 Y	African American	F
hMSC-B	4F1560	23 Y	African American	F
hMSC-C	5F0138	19 Y	African American	M
hMSC-D	5F0972	20 Y	African American	M
hMSC-E	4F0218	21 Y	Other ^{a)}	M

Lonza Walkersville, Inc. ^{a)} Except for Asian/Oriental, Caucasian, African American, Hispanic and American Indian.

フォルムアミド液で3回, 2×sodium saline citrate (SSC) 液で1回, 0.1% NP-40 を含む2×SSC 液で1回洗浄した. その後自然乾燥させて, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Counterstain (VYSIS社) でマウントし, 蛍光顕微鏡 (Nikon E600) で観察した.²⁾ *c-myc* コピー数異常の観察は, 1細胞当たり2点以上のシグナルを持つ間期細胞300個について行い, 2シグナルの細胞を正常, 3シグナル以上のシグナルを持つ細胞を異常とした. 有意差検定には χ^2 検定を用いた.³⁾

結 果

まず, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) と3種類のヒト腫瘍細胞 (ヒト子宮頸がん由来細胞: HeLa S3, ヒト骨肉腫細胞: HOS, ヒト軟骨肉腫細胞: OUMS-27) との比較を行った. Fig. 1 に染色体数分布を示す. hMSC での観察では46本にピークを示す分布を示した. 腫瘍細胞については,

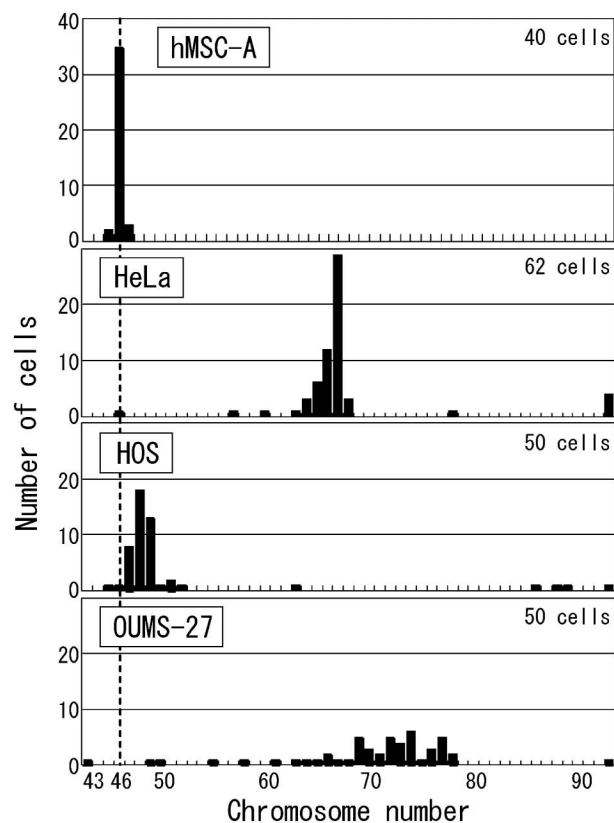


Fig. 1 Distribution of Chromosome Numbers in hMSC-A and Cancer Cells (HeLa S3, HOS, and OUMS-27)

The numbers in the upper-right corner indicate those of metaphases, for which the chromosome number was counted. The normal chromosome number for human is 46 indicated by a dotted line.

HeLa S3 細胞及び HOS 細胞はそれぞれ 67 本及び 48 本にピークを示す分布を示したが, OUMS-27 細胞では目立ったピークはなく, 69-78 本を中心として幅広い分布を示した. 46 本にピークを持つ正常な染色体数分布を示した hMSC に対し, 3 種類の腫瘍細胞はそれぞれの染色体数分布に大きな違いがみられ, すべて正常とは異なるものであった. Figure 2 に *c-myc* の mRNA 発現レベルと染色体異常率を示す. mRNA 発現レベルを GAPDH の相対値として示し, 染色体異常については 300 細胞中に観察された異常細胞数から求めた異常細胞率を示した. *c-myc* の mRNA 発現レベル [Fig. 2(A)] は, hMSC に比べて HeLa S3 及び OUMS-27 では有意にその発現が高かったものの, HOS では有意な差は認められなかった (*t*-検定). 一方, 染色体レベルでの異常細胞率 [Fig. 2(B)] は, HeLa S3 及び OUMS-27 においてはどちらも 100% 近い異常率を示し, HOS では 15% 程度の異常細胞率であったが, 異常細胞率が 5% 以下の hMSC と比較すると 3 種類すべての腫瘍細胞株で有意に高い異常率を示した (χ^2 検定).

次に, hMSC の *in vitro* での培養期間中における遺伝子発現レベルの変化と *c-myc* コピー数異常解析を行った. まず 5 ドナー由来の hMSC (hMSC-A, B, C, D, E) について, 培養期間 160 日程度までの増殖曲線を Fig. 3 に示した. どの細胞も培養 50 日間くらいまでは比較的よく増殖しているが, この時点で総細胞数がドナー間で既に最大 100 倍以上も違っていた. そしてその後はどの細胞も増殖速度が徐々に低下してきた. 増殖速度についてはそれぞれのドナー間で差がみられたが, 今回用いた hMSC はどれも Lonza Walkersville 社より購入したもので, その細胞調製方法は一定であると思われるため, 骨髄を採取されたそれぞれの個人差が大きく影響するものと考えられる.

実際に幹細胞を細胞組織医療機器や細胞治療の材料として用いる臨床研究の場合, 生体内から取り出して *in vitro* で継代培養する期間はだいたい 1 ヶ月以内が多い. そこで, 実際に細胞組織医薬品・医療機器等の材料として間葉系幹細胞を用いる場合を想定し, 妥当な培養期間内 (多少長めに設定し 50 日以内) で *c-myc* の変化について検討した. 5 ドナー由来の hMSC (hMSC-A, B, C, D, E) を用いて, *c-*

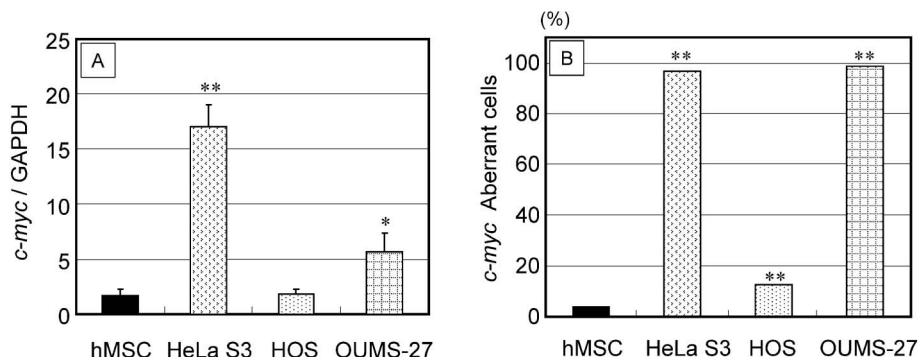


Fig. 2 *c-myc* Gene Expression (A) and Chromosome Aberrations at the *c-myc* Locus (B) in hMSC and Cancer Cells (HeLa S3, HOS, and OUMS-27)

(A) The relative expressions of *c-myc* to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in hMSC, HeLa S3, HOS, and OUMS-27 were investigated by quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). Mean values with SDs from three independent experiments are presented. Asterisks denote statistically significant differences compared with hMSC (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). (B) Frequency (%) of *c-myc* aberrant cells in hMSC, HeLa S3, HOS, and OUMS-27. 300 interphase cells were analyzed after hybridization with the *c-myc* probe. ** $p < 0.01$ by a chi-square test.

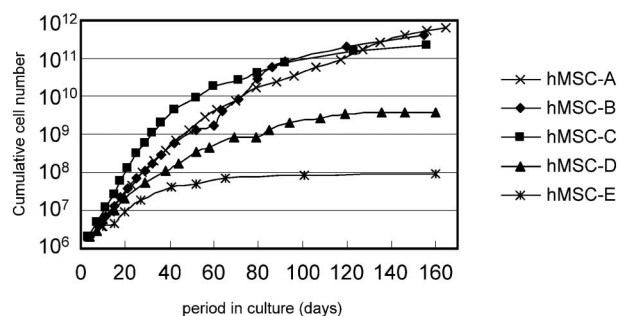


Fig. 3 Proliferation of hMSCs

hMSCs were seeded at a density of 6000 cells/cm² and when they were just subconfluent they were subcultured and then counted the cell numbers.

myc の mRNA 発現レベルと染色体レベルでの変化について検討した結果を Fig. 4 に示す。hMSC-A, B, C, D では、培養期間 50 日以内における *c-myc* の mRNA 発現レベルとコピー数には、有意な変化は認められなかった。しかし、hMSC-E においては、*c-myc* コピー数異常細胞率が培養 20 日間で 7.7%、50 日間で 13.7% と培養日数の経過に伴い増加し、3 日間 (3.3%) に比べていずれも有意な増加がみられた。一方、mRNA レベルについては培養 20 日間及び 50 日間で 3 日間に比べて平均値では 2 倍程度の増加傾向がみられたものの、いずれも統計学的に有意な差は認められなかった。また、hMSC-A は 50 日以降も培養を続け、ほとんど増殖しなくなり細胞老化が認められる状態⁴⁾まで観察した。培養期間 152 日間の細胞における *c-myc* FISH 解析によるコピー数異常細胞率を測定した結果、異常細胞率が 15.7% であり 3 日間 (5.0%) に比べて

有意な増加が認められた。

京都大学で樹立された国産初のヒト ES 細胞株で同様に解析した *c-myc* コピー数異常細胞率を Fig. 5 に示す。京都大学再生医科学研究所末盛博文先生に培養期間の異なる 3 種のヒト ES 細胞株染色体標本を提供して頂いた。KhES-2 の 3 ヶ月培養標本では、その培養開始時よりも有意な *c-myc* コピー数異常細胞の増加が観察されたが、さらに培養を続けた 12 ヶ月目の標本では有意差は認められなかった。

考 察

c-myc は、細胞分裂を促進するアクセル役となる「がん遺伝子」の中で最もよく知られた遺伝子の 1 つで、多くのがんに関係していることが分かっている。また細胞の老化や不死化に係わるテロメラーゼを活性化する転写因子であり、細胞周期にも深く係わる。さらに、昨今話題の iPS 細胞作製の際に導入される 4 つの遺伝子のうちの 1 つでもあり、その後「がん遺伝子」である *c-myc* を除いた 3 遺伝子の導入によっても iPS 細胞が作製可能であることが報告されている。⁵⁾ 本研究の最終的な目標が幹細胞の *in vitro* での継代培養中の安全性を担保できる方法の確立であり、幹細胞自身が増殖能を持つことからその最も異常な変化として「がん化」が懸念されているため、本研究では細胞増殖やがんに係わる遺伝子 *c-myc* に着目し検討した。

「再生医療」の早期実現が待望されている今、その材料の 1 つとして間葉系幹細胞の有用性が期待されている。幹細胞の大きな特徴としては、様々な組

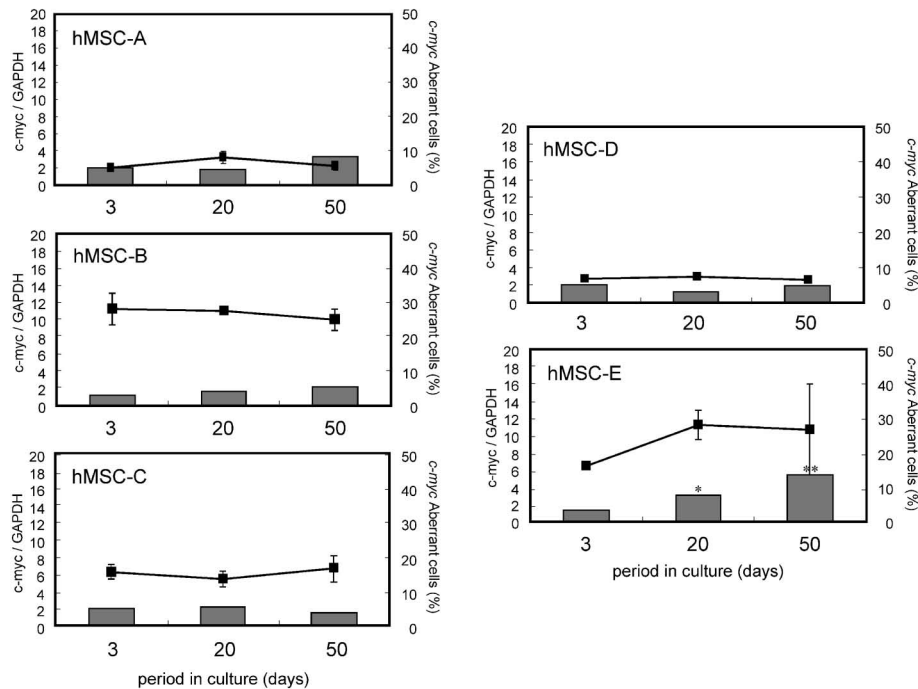


Fig. 4 Change in *c-myc* Gene Expression and Chromosome Aberrations at the *c-myc* Locus of hMSC-A, B, C, D, E during the *in vitro* Culture

Expressions of *c-myc* relative to GAPDH were investigated by quantitative RT-PCR. Mean values with SDs from three independent experiments are presented in the line graph. Frequency (%) of *c-myc* aberrant cells is presented in the bar graph. 300 interphase cells were analyzed after hybridization with the *c-myc* probe. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ by a chi-square test.

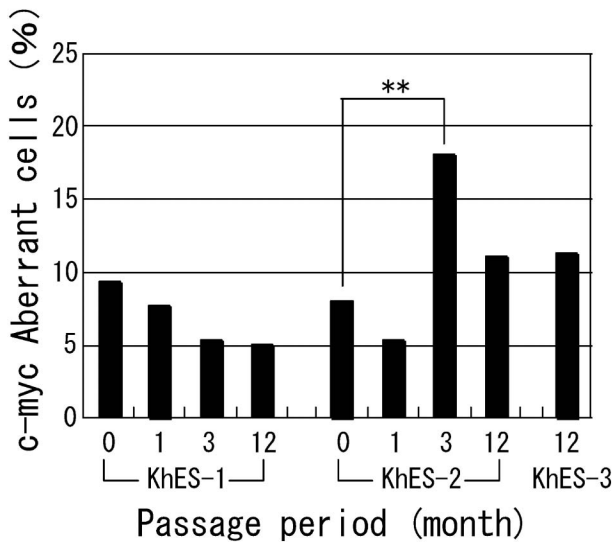


Fig. 5 Frequency of *c-myc* Aberrant Cells in the Three Human ES Cell Lines Supplied by Dr. Suemori (Kyoto University) as Chromosome Preparations

300 interphase cells were analyzed after hybridization with the *c-myc* probe. ** $p < 0.01$.

織への多分化能を保ちながら増殖する点であり、実際に臨床において幹細胞を利用する場合には、幹細胞を体内から取り出したのち *in vitro* で培養して増

殖させなければならない。その培養過程において万が一細胞に不都合な変化が起きてしまった場合、その後患者の体内に戻した際の安全性は担保できない。そのため、幹細胞の *in vitro* 培養中の変化の観察は重要であると考え、本研究では観察の手段として2通りの方法（遺伝子レベルでの発現とコピー数異常）を用いて行い、同じ遺伝子座 *c-myc* について同時に検討した。

まず、幹細胞と腫瘍細胞を用いて *c-myc* の mRNA 発現レベルとコピー数異常について検討したところ、その結果には違いがみられた (Fig. 2)。HeLa S3 及び OUMS-27 のように染色体レベルでの異常細胞率が 100% 近い腫瘍細胞については、mRNA 発現レベルも幹細胞に比べて有意に高い値を示したが、異常細胞率が 15% 程度であった HOS では、mRNA 発現レベルに幹細胞 (hMSC) との有意な差は認められなかった。さらに、実際に幹細胞の臨床現場での利用を想定した培養期間における経時的変化についても *c-myc* の mRNA レベルとコピー数での検討結果には違いがみられた (Fig. 4)。用いた 5 ドナー由来の hMSC (hMSC-A, B, C, D,

E) すべてにおいて、*c-myc* の mRNA 発現レベルには有意な変化は認められなかったが、コピー数異常細胞率については 5 ドナー中の 1 ドナー (hMSC-E) において有意な増加 (~13.7%) が認められた。以上の結果から、染色体レベルでの異常頻度が非常に高い細胞ではその mRNA 発現レベルにも有意な差が現れてくるが、異常細胞率が 15% 程度 (つまり正常細胞が 85% 程度と数としては異常細胞よりもかなり多く含まれている状態) の細胞では、mRNA 発現レベルにおいて有意な変化を検出できない可能性を示している。このことから、hMSC をはじめ培養細胞の増殖異常の指標となる *c-myc* 遺伝子座に関しては、遺伝子発現の検討だけでなくコピー数の検討を行う必要があると考えられた。また、*c-myc* 以外の領域についても同様の検討を行っていく必要もあるであろう。

本研究では、幹細胞の *in vitro* 培養期間中の変化について観察するためのよりよい評価法を探るための第一歩として *c-myc* を用いて mRNA 発現レベルとコピー数での 2 つの方法で検討した結果を示した。「再生医療」を目指した臨床応用に向けて、細胞の培養条件や目的による利用細胞の選び方なども考慮していくことが重要であろう。⁶⁾

謝辞 国産初のヒト ES 細胞標本を提供して頂いた京都大学再生医科学研究所中辻憲夫教授、末盛博文准教授に感謝申し上げます。本研究は、創薬等

ヒューマンサイエンス総合研究事業「幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化」及び再生医療事業「感染リスクの排除、同一性の確保、がん化等の抑制及び培地等による有害作用の防止に関する研究」にて実施された研究の一部である。

REFERENCES

- 1) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, **131**, 1–12 (2007).
- 2) Matsuoka A., Tucker J. D., Hayashi M., Yamazaki N., Sofuni T., *Mutagenesis*, **9**, 151–155 (1994).
- 3) Matsuoka A., “Kansaibou-tou wo mochiita Saibu-soshiki-iryokiki no Kaihatsu to Hyokagijutsu no Hyojun-ka,” Heisei 17 nendo Hokoku-sho, Japan Health Sciences Foundation Research Grants (2006).
- 4) Ito T., Sawada R., Fujiwara Y., Seyama Y., Tsuchiya T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**(1), 108–114 (2007).
- 5) Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 101–106 (2008).
- 6) Tsuchiya T., Idenshi-igaku MOOK betsu-satsu “Susumi Tudukeru Saibou-ishoku Chiryō no jissai,” ge-kan, 236–243 (2008).