

## In vitro培養ヒト間葉系幹細胞の細胞遺伝学的安全性評価法に関する研究

松岡厚子

### Cytogenetic study on safety evaluation of human mesenchymal stem cells cultured *in vitro*

Atsuko Matsuoka

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are one of the promising sources for regenerative medicine. In general, hMSCs are supposed to grow indefinitely and differentiate to various kinds of cells. The indefinite growth is concerned due to its misleading to carcinogenesis in the practical use of hMSCs in regenerative medicine. In the present study, we investigated unexpected changes, especially in genetic aspect, in hMSCs during culture utilizing fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with chromosome specific DNA probes for chromosomes 1 and 4, or a locus specific identifier for *c-myc*. Three lots of hMSCs and three human cancer cell lines (HeLa S3, HOS and OUMS-27) were analyzed. The results of this study suggest that both observation of cell morphology and FISH analysis of *c-myc* aberrant cells in interphase cells are useful for evaluating safety of hMSCs expanded *in vitro*.

Keywords: human mesenchymal stem cells, *c-myc*, FISH, *in vitro* safety evaluation

#### 1. はじめに

ヒト間葉系幹細胞は、骨、軟骨、筋、腱、脂肪等の組織への分化が可能であるため、再生医療分野で、従来治療法がなかった疾患への応用が期待されている。事故や病気で失った組織の修復、再建が、形態的にだけでなく機能的にも可能であればまさに夢のような治療法である。しかし、一般に幹細胞は分化能と共に無限増殖能を有しており、再生組織としてある程度の量まで増殖させてヒト体内へ移植できるという利点と、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。本研究では、再生医療において*in vitro*で培養中に幹細胞が目的以外の形質をも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検討した。

#### 2. 方法

##### 2-1 細胞

市販のヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells; hMSC) 3ロットをCambrex社 (米国)

より購入した (Table 1)。また、hMSCが増殖に異常をきたした極端な例として癌を想定し、3種の癌細胞株 (Table 1) の検討を行なった。癌細胞株としては、制癌剤スクリーニングに繁用されるHeLa S3細胞、hMSCから分化誘導可能な組織である骨及び軟骨に生じた癌由来の細胞株、それぞれHOS及びOUMS-27の計3種を用いた。hMSCはCambrex社製の専用培地を、また、癌細胞株の培養は添付文書で推奨されている培地を用いた。

##### 2-2 増殖

3ロットのhMSCを同じ条件で継代し、定期的にサン

**Table 1** List of cells used

Normal human mesenchymal stem cells			
Lot	Origin	Donor	
hMSC 10796	bone marrow	26 Y, male, Black	
hMSC 10909	bone marrow	19 Y, female, Black	
hMSC 11809	bone marrow	21 Y, male, Other	
Human cancer cell lines			
Cell line	Supplier	Origin	Donor
HeLa S3	JCRB*	Cervical cancer	31 Y, female
HOS	Dainippon**	Osteosarcoma	13 Y, female, Caucasian
OUMS-27	JCRB	Chondrosarcoma	65 Y, male

hMSC; human mesenchymal stem cells, \*Health Science Research Resources Bank, \*\*Dainippon Pharmaceutical.

To whom correspondence should be addressed:

Atsuko Matsuoka; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9268; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: matsuoka@nihs.go.jp

プリングし、一定数の細胞播種後、経時的にトリプシンで細胞を剥離し、血球計算盤で細胞数を計数した。各測定点につき3枚のプレートを用い、その平均値を増殖曲線にプロットした。癌細胞株HeLa S3についても同様に増殖曲線を作成した。

### 2-3 老化細胞染色

細胞が老化に伴い、pH 6.0で検出できる $\beta$ -galactosidase (Senescence associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -Gal) 活性を示すことを利用した染色法<sup>1)</sup>で、Senescence Detection Kit (Oncogene, Cat# QIA117) を用いて染色した。老化細胞は青く染まる。

### 2-4 染色体解析

染色体異常解析には、従来の分染法より簡便に実施できる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization; FISH) 法を採用した。

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  $\mu$ g/ml) で一晚処理し、トリプシンで細胞を回収した。75 mM塩化カリウム溶液で室温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。癌細胞株の染色体標本は、コルセミド (0.1-0.2  $\mu$ g/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、FISH解析用標本はDNAプローブのハイブリダイゼーションを行うまで、窒素ガスを封入したビニル袋に密閉し、-20℃に保管した。

FISH解析は、1番染色体、4番染色体及び*c-myc*のDNAプローブ (SpectrumOrange標識, VYSIS社, 米国) を用いた。前2者は染色体の構造異常を解析する目的で、ハイブリにより比較的明るいシグナルが観察されるため観察が容易であり、また、比較的大きな染色体であるため効率よく構造異常を検出できると考えて選択した。*c-myc*は正常では8番染色体の長腕の先端 (8q24.12-q24.13) 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り、ヒト癌組織においてしばしば観察される増幅を観察できると考え選択した。増幅は癌遺伝子の過剰発現の一つの機序と考えられている。

プローブDNAを70℃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℃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、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液をのせ、カバ

ーグラスで覆い、回りをペーパーボンドでシール後、37℃で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ終了後、45℃の50%フォルムアミド液で3回、2 x SSC液で1回、0.1%NP-40を含む2 x SSC液で1回洗浄した。その後自然乾燥させて、DAPI Counterstain (VYSIS社) でマウントし、蛍光顕微鏡 (Nikon E600) で観察した<sup>2)</sup>。間期細胞で観察される*c-myc*の見かけ上1個のシグナルは、G1期の細胞とG2期の細胞で実体は異なり、それぞれ、locus 1個とlocus 2個に相当する。

染色体数分布は、ギムザ染色した分裂中期像を撮影し、プリント上で染色体数を計数して作成した。hMSCは30本以上の、癌細胞株は43本以上の染色体を有する分裂中期像を計数対象とした。

## 3. 結果

今回入手したhMSCはヒトから採取後最低2回の継代増殖を行い、その細胞を凍結した製品である。In vitro継代培養による影響を調べるためには、再生医療においては患者から採取直後の細胞と、患者へ戻される移植直前の細胞との比較を行う必要があると考えられる。本研究では、実施可能な範囲で、すなわち入手したhMSCを培養開始直後の細胞と複数回継代を繰り返した後の細胞との比較をもって、再生医療での上記比較に代えた。

### 3-1 増殖

hMSC 10796では、1代目では順調な増殖が認められたが、4代目、6代目では増殖が低下し、10代目 (データ未掲載) では殆ど増殖しなかった (Fig. 1)。hMSC 10909では5代目までは順調な増殖を示し、10代目では増殖の低下が認められた。hMSC 11809の増殖は1代目

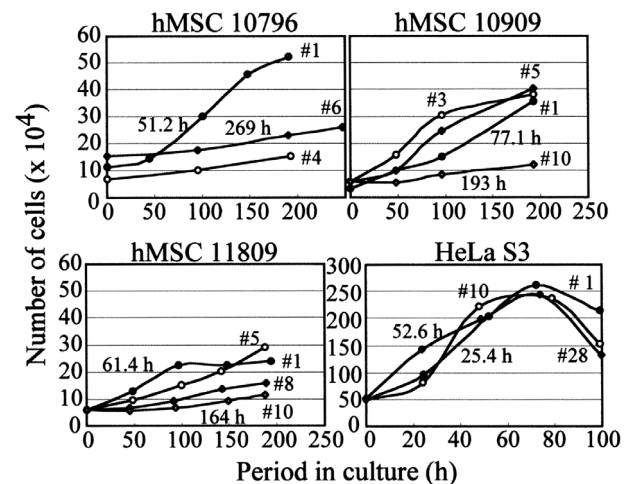


Fig. 1 Growth curve of three hMSCs and HeLa S3

The #number indicates the passage number. The doubling time for the first and the last passage is indicated in the graphs.

から低調で、増殖率測定時の培養100時間目までは、順調に増殖していたが、その後ほとんど増殖しなくなった。HeLa S3細胞では継代数にかかわらず一定の増殖を示し、倍加時間は平均約30時間であった。hMSCの増殖速度は継代とともに低下し、ロット差も認められるが、10代目以降はほとんど増殖しなくなった。

### 3-2 細胞形態及び老化細胞染色

hMSC 10909の老化細胞染色像（位相差顕微鏡像）をFig. 2に示す。培養開始直後（#1）は、細胞全体の配列に一定の流れが認められ、個々の細胞の形も細長い紡錘型で、青く染まる細胞はなかったが、培養後期（#7及び#13）には配列の配向性は低下し、個々の細胞は伸展、肥大し、細胞の中央部が青く染まった。しかし、継代がかなりすすんでも、すべての細胞が青く染色されることはなかった。一方、HeLa S3細胞では継代による形態変化は認められず、一部敷石状で大部分は球形の形態

を維持した。28代目まで継代したが、青く染まる細胞は観察されなかった。

### 3-3 染色体解析

生命現象の基本である遺伝情報を担う染色体は、種によって数、形態が一定で、安定である。変化を起こしにくい染色体を対象とすればわずかな変化も検出し易いと考え、*in vitro*培養によるhMSCの安全性評価指標として検討した。

hMSC 10909の継代による染色体数分布の変化をFig. 3に示す。1, 3, 5代目での観察では、いずれもヒト正常染色体数46本にピークを示す分布を示し、継代による明らかな変化は認められなかった。

癌細胞株3種の結果をFig. 4に示す。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。

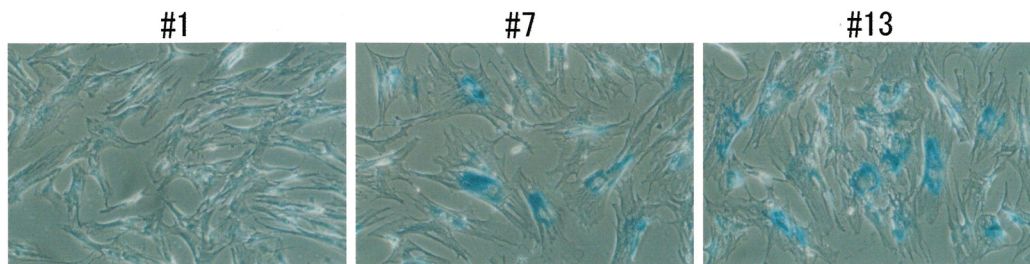


Fig. 2 Senescent cells observed in the hMSC culture (SA- $\beta$ -Gal staining)

Although hMSC (10909) did not show senescent cells stained blue at early passage (#1), some of them changed to flat and big in shape and were stained blue in the center at middle (#7) and late passage (#13).

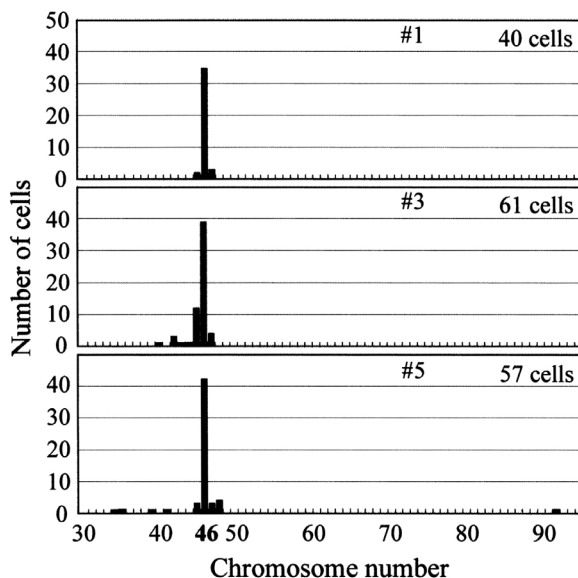


Fig. 3 Distribution of chromosome number of hMSC 10909 at the first, third and fifth passage

The number in the upper right corner indicates the number of cells analyzed.

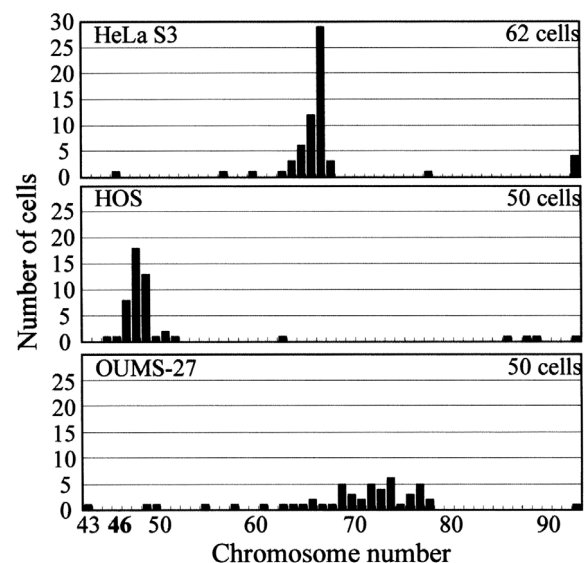


Fig. 4 Distribution of chromosome number of human cancer cell lines, HeLa S3, HOS and OUMS-27

The number in the upper right corner indicates the number of cells analyzed.

HeLa細胞は、継代10, 28代目の解析も行なったが、染色体数分布に継代による変化は認められなかった。

### 3-3-1 ヒト癌細胞株でのFISH法による染色体異常解析

FISH法による染色体異常解析の有効性、癌の種類によって検出される異常頻度、型に特異性があるか、また解析プローブの特性を確認するため、増殖がよく観察細胞数も十分に得られ、高頻度の異常が予想される癌細胞を用いた解析を最初に行なった。

結果をTable 2に示す。いずれのプローブを使った解析でも、正常細胞では、1対の染色体の全部あるいは一部 (*c-myc*) が染色され、2シグナルを示す。HeLa S3細胞では、1番染色体は100%の細胞で異常であったが、4番染色体での異常頻度は7%と低かった。

骨肉腫由来のHOS細胞では、1番、4番染色体とも全細胞で異常であった。1番染色体での異常をFig. 5 Bに、4番染色体での異常をFig. 5 Dに示す。

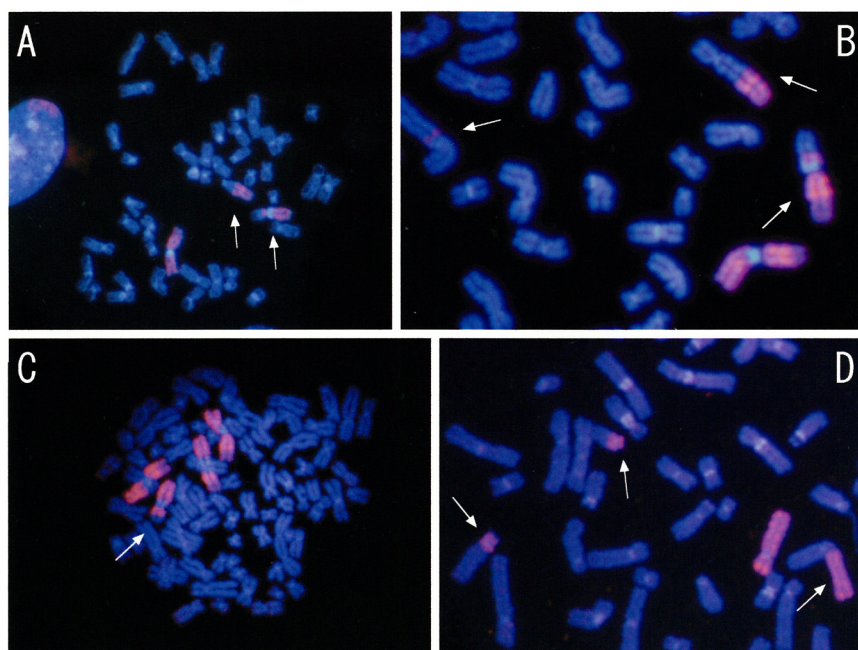
軟骨肉腫由来のOUMS-27細胞では、1番染色体では異常が100%の細胞で観察されたが、4番染色体では

87%の細胞で正常な2シグナルが観察された。1番染色体の異常は、正常1番染色体が3本と転座1本(不完全型)(Fig. 5 C)の4シグナルからなる異常型が異常の半分を占めていた。

HeLa S3では、*c-myc*はほとんどの細胞で異常であった。HOS細胞では正常2シグナルを示す細胞が、分裂期細胞(染色体)の観察では61%、間期細胞の観察では87%観察された(Table 2)。異常な4シグナルが観察された分裂期細胞をFig. 6 A及びその拡大図B, Cに示す。

**Table 2** FISH analysis of three human cancer cell lines

Cell line	Judge	DNA probe			
		Chromosome 1	Chromosome 4	<i>c-myc</i>	
				metaphase	interphase
HeLa S3	normal	0%	93%	0%	3%
	aberrant	100%	7%	100%	97%
	No. of cells observed	82	100	50	100
HOS	normal	0%	0%	61%	87%
	aberrant	100%	100%	39%	13%
	No. of cells observed	139	177	135	200
OUMS-27	normal	0%	87%	7%	1%
	aberrant	100%	13%	93%	99%
	No. of cells observed	83	38	41	200



**Fig. 5** FISH analysis with chromosome specific DNA probes for chromosome 1 or chromosome 4. Images are merged with whole chromosomes stained with DAPI (blue) and portions painted with SpectrumOrange (pink). White arrows indicate chromosomes with aberrations involving chromosomes 1 or 4.  
 A: A translocation (arrows) observed in hMSC (10796). Three chromosomes are painted in whole or in part showing a normal chromosome 1 and a translocation involving another chromosome 1.  
 B: A translocation and an insertion observed in an osteosarcoma derived cell line, HOS. Four chromosomes are painted in whole or in part showing a normal chromosome 1 and a translocation and an insertion involving another chromosome 1.  
 C: An incomplete translocation observed in a chondrosarcoma derived cell line, OUMS-27. Four chromosomes are painted in whole or in part showing three normal chromosomes 1 and an incomplete translocation involving another chromosome 1.  
 D: A translocation and an insertion observed in HOS. Four chromosomes are painted in whole or in part showing a normal chromosome 4 and a translocation and an insertion involving another chromosome 4.

一方、OUMS-27細胞ではほとんどの細胞が異常な*c-myc*シグナルを示した。間期細胞で観察された異常シグナルをFig. 6 Dに示す。これら一定の距離を保ったペアのシグナルは1本の染色体内での増幅の可能性が高い。

HeLa細胞の分裂中期像で観察された1本の8番染色体内に*c-myc*の遺伝子座が2ヶ所ある増幅をFig. 6 Eに、それに相当する間期細胞のシグナルをFig. 6 Fに示す。

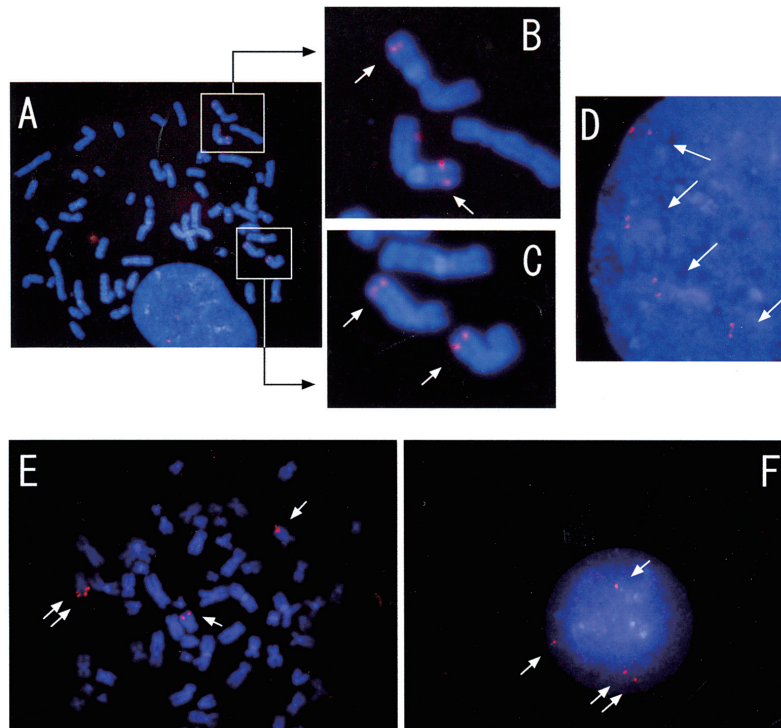
*c-myc*異常頻度が異なったHOSとOUMS-27を用いて、染色体（分裂期細胞）と間期細胞での*c-myc*シグナル数の詳細な比較を行った (Fig. 7)。HOS細胞では分裂期細胞でも間期細胞でも正常2シグナルを示す細胞が圧倒的に多く、シグナル数も1から6シグナルと同じであった。OUMS-27細胞では、異常4シグナルを示す細胞が多く、シグナル数も2から8以上と似ていた。この結果から、間期細胞の観察で染色体観察の代用が可能である

と考えられた。増殖が低下した時期の細胞も間期細胞で観察することにより、十分な数の細胞を解析対象とすることができより客観性の高い結果を導き出すことにつながると考えられる。

癌細胞株の染色体異常解析 (Table 2) では、予想されたとおり高頻度の染色体異常が検出されたが、同じ細胞でもその異常頻度は用いるプローブによって大きく異なることが判明した。このことは、異常解析には少なくとも2種のプローブの使用が望ましいことを示唆していると考えられる。

### 3-3-2 hMSCでのFISH法による染色体異常解析

最も長期に継代を行えたhMSC10909を用いて、分裂が非常に低下した継代後期の細胞まで解析を行なうために、*c-myc*をプローブとして間期細胞で解析した。安全



**Fig. 6** FISH analysis with a locus specific identifier for *c-myc*

A: Four pairs of signals observed in a metaphase spread of an osteosarcoma derived cell line, HOS.

B: The magnified image of a part of panel A. Two pairs of signals for *c-myc* are seen near the distal end of two chromosomes. Both chromosomes seem to be translocated between chromosome 8 and chromosome 1 that has a white portion (heterochromatin) near the centromere.

C: The magnified image of another part of panel A. Two pairs of signal for *c-myc* are seen on two normal chromosomes 8.

D: Four pairs of signals for *c-myc* observed in an interphase cell of a chondrosarcoma derived cell line, OUMS-27. Panel D is a part of the interphase cell and the pair of signals seems to be amplification of *c-myc* within a chromosome, that is to say that a single signal corresponds to a pair of signals in panels B or C. Refer to panels E and F.

E: Four pairs of signals observed in a metaphase spread of HeLa cells. Two pairs of signals are seen in a chromosome located on the left. They seem to be amplification of *c-myc* within a chromosome, because only a pair of signals for *c-myc* exists in a normal chromosome 8.

F: Four signals observed in an interphase cell on the same preparation as panel E of HeLa cells. Four signals are separated in three regions. In a region, two signals are adjacent indicating that they correspond to two pairs of signals (amplification of *c-myc*) seen within a chromosome in panel E.

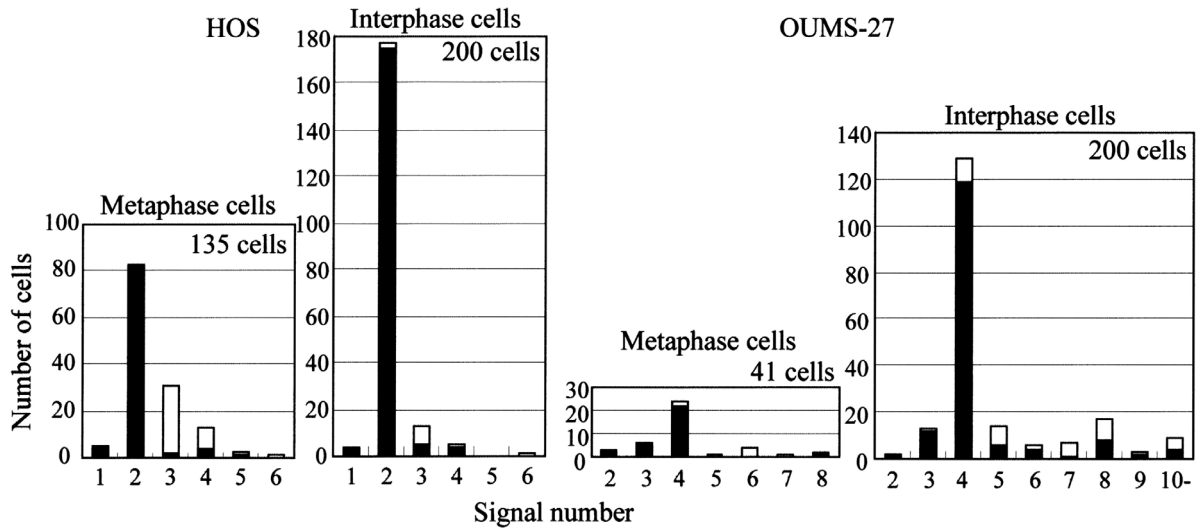


Fig. 7 Comparison of the signal number for *c-myc* observed in between metaphase cells and interphase cells in HOS and OUMS-27

The number in the upper right corner indicates the number of cells observed. The white portion of the bar indicates cells with amplification of *c-myc* within a chromosome. The black portion indicates cells without amplification within a chromosome. The distribution of the signal number observed are consistent between in the metaphase cells and in the interphase cells in both cell lines.

性評価法を標準化するために必要な、観察細胞数、統計処理法を検討するために、観察は、1枚のスライド標本上で、100細胞単位で、連続する10カ所について、計1000細胞の計数を行なった。*c-myc*は正常細胞では2シグナル観察されるため、3シグナル以上のシグナルを有する細胞を異常細胞とした。結果をFig. 8に示す。14代目では殆ど増殖しておらず標本上の細胞も少なかったために6カ所、計600細胞しか観察できなかった。その結果、1代目では10カ所の観察で異常頻度に2%から12%までのばらつきがみられた。継代3代目、5代目では、継代1代目に比べて異常頻度のばらつきは少なく、異常頻度も低かった。このことは、解凍直後の細胞はまだ培養環境に順化していないため各細胞によって増殖開始時期が一定ではなく、本来の各種細胞の構成比を反映していなかったのではないかと推察している。細胞継代10代目ではすべて6%以上の頻度を示し、観察場所によるばらつきも少なかった。継代14代目では異常頻度は明らかに増加した。

Fig. 8のデータを用いて解析に必要な観察細胞数を検討した。解析法を標準化する場合には一定の観察細胞数で1回観察した結果を用いて培養時期の異なる細胞の比較を行なうことから、検定には $\chi^2$ 検定を用いることにした。1代目と14代目の結果には必ず有意差が認められるという条件を満足する観察細胞数を探した。観察細胞数100の場合には、例えば、1代目で12%、14代目で11%の異常が観察された場合には、有意差が認められない。次に、Fig. 8のデータを最初から200個ずつ計数した

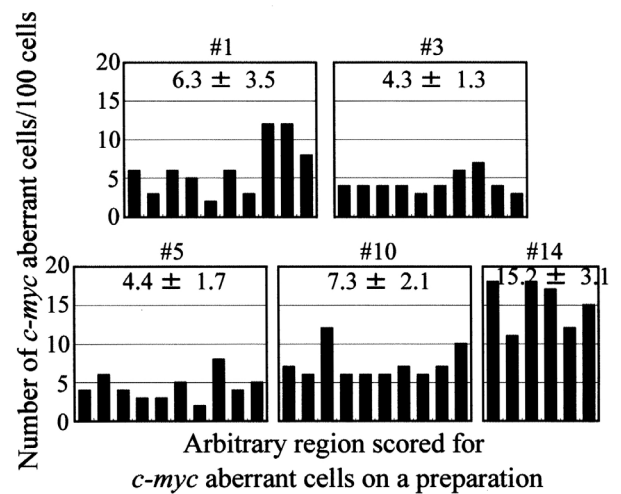


Fig. 8 Distribution of the number of *c-myc* aberrant cells observed on 100 cells during five months passage in hMSC (10909)

The number of *c-myc* aberrant cells per 100 cells was scored at 10 regions on a chromosome preparation, except for #14 where the number was scored at six regions due to less number of cells. The number in the top of graphs indicates the average number of *c-myc* aberrant cells  $\pm$  SD in ten or six regions analyzed.

として、5ヶ所の計数結果と14代目についても同様に3ヶ所の計数結果の間のすべての組み合わせで $\chi^2$ 検定を行なった。この時も有意差が認められない場合があった。同様に300細胞と細胞数を増やして検討した結果、300細胞以上で1代目と14代目の間には必ず有意差がつくことが判明した。

そこで、他の2ロットのhMSCについても300細胞を観察し、 $\chi^2$  検定を行なった。その結果をTable 3に示す。Lot. 10796では5代目までしか解析できなかったが、*c-myc*異常細胞の有意な増加は認められなかった。Lot. 11809では1ヵ月で有意差のある異常細胞の増加が認められた。Lot. 10909はFig. 8のデータを表にしたものであるが、14代目で有意差のある異常細胞の増加が認められた。本研究で用いたhMSCは1社から購入しており細胞の調製は同じ製造管理工程のもとで同様に実施されていると考えられることから、この表でのロット差はドナー差、つまり臨床での個人差に相当すると考えられるが、3ロットの間でも差が認められる。例えば、ロット11809の1代目での異常細胞数を基準にすると、ロット10796は1代目からすでに有意差のある異常細胞数を示していることになる。*In vitro*継代培養による異常頻度の変化の有無を判定するには、患者本人の採取直後の細胞の異常を慎重に観察する必要があると考えられる。

遺伝子座プローブだけでなく染色体特異的DNAプローブを用いる構造異常の解析も安全性評価指標の候補としていたが、Table 3に示すように、分裂指数から判断してロットによっては培養初期の標本でさえ十分な数の分裂期細胞を集めることが困難であることが判明した。しかしながら、基礎データとして染色体構造異常の頻度に関するデータも確認しておく必要があると考え、hMSC 10796の1代目の標本で1番と4番染色体プローブ、比較的増殖が良かったhMSC 10909で1番染色体での5代目までの解析を試みた (Table 4)。また、別ロットhMSCの5代目での解析を参考に記載する。1番染色体プローブを用いた解析ではhMSC 10796は1.6%の細胞が転座 (Fig. 5 A) を示し、別ロットのhMSCは継代5代目で2%の細胞が転座を有していた。4番染色体では1代目でも別ロットの5代目でも異常は検出されなかった。hMSC 10909では1, 3, 5代目の細胞を200個以上観察したが、継代による異常頻度の増加は認められなかった。

#### 4. 考察

hMSCの無限増殖能を制御できなくなった場合として癌化を危惧したが、本研究での3ロットのhMSCについては、継代による増殖低下、細胞形態の変化、老化細胞染色から、「生体から分離し、*in vitro*の培養系に移したhMSCは無限増殖能を示さない」ことが判明した。むしろ、hMSCは*in vitro*で長期継代培養することによって老化徴候を示すようになると考えられた。また、老化染色写真Fig. 2に示すように、継代13代目で殆ど増殖をしなくなっているにも拘わらず、すべての細胞が老化 (関連) 細胞ではなかった。以上のことはhMSCの他のロットについても確認している<sup>3)</sup>。幹細胞の増殖分化を考え

**Table 3** Number of *c-myc* aberrant cells in interphase cells of hMSC

hMSC Lot.	Passage	Days in culture	Mitotic index(%)	No. of aberrant cells / 300 cells	$\chi^2$ -test
10796	#1	0	2.8	24	—
	#3	13	NT	35	N.S.
	#5	31 (1 month)	0.2	23	N.S.
10909	#1	0	10.2	15	—
	#3	13 (2 weeks)	5.6	12	N.S.
	#5	27 (4 weeks)	7.2	14	N.S.
	#10	78 (2.5 month)	0.1	25	N.S.
	#14	152 (5 month)	0.6	47	$P<0.001$
11809	#1	0	1.5	10	—
	#5	28 (1 month)	0.8	23	$P<0.05$
	#8	66 (2 month)	NT	41	$P<0.001$
	#10	98 (3 month)	NT	44	$P<0.001$

NT; Not tested, N.S.; Not significant.

**Table 4** FISH analysis with chromosome specific DNA probes for chromosomes 1 and 4 in hMSC

Passage	Judge	hMSC 10796		hMSC 10909
		Chromosome 1	Chromosome 4	Chromosome 1
#1	normal	98.4%	100%	95.8%
	aberrant	1.6%	0%	4.2%
	No. of cells observed	60	207	261
#3	normal			97.9%
	aberrant			2.1%
	No. of cells observed	NT*	NT	242
#5	normal	98.0%	100%	96.2%
	aberrant	2.0%	0%	3.8%
	No. of cells observed	201**	55**	236

\*NT; Not tested, \*\*The data are derived from another lot of hMSC.

る時、従来は一つの幹細胞が単純に増殖を繰り返して細胞数を増やす時期があり、その後その細胞集団が何らかの分化刺激を受けて全体が分化していくという流れが考えられていた。近年、幹細胞が分裂する時娘細胞の一つは自己複製のための幹細胞であるが、他の一つはすでに分化 (の準備ができた) 細胞になっており、後者はその後分裂せず前者が同じ形式の分裂を繰り返すことにより分化 (の準備ができた) 細胞が増え、それらと一定数の無限増殖能をもった幹細胞とからなる細胞集団が考えられてきている。従来の考え方ではある時期の細胞集団は同じ性質をもった細胞の集まりであるが、後者の考え方ではヘテロな細胞集団となる。本研究の老化関連染色において継代を重ねた細胞でもすべての細胞が青く染まらなかったことは、後者の考え方を導入すると理解しやすいと考えられる。

Table 4に示すように、十分な数 (例: 200細胞) の分裂中期像があっても4番染色体は誘発される異常頻度が低く、解析細胞数を多くする必要が考えられることから、本目的の解析には適切ではないと考えられる。2例

の健常人の末梢血リンパ球で同じ手法で4番染色体プローブでの解析を行なった経験があるが、異常頻度は0.13%あるいは0.11%であり、現実的には約800細胞を観察してやっと1個の異常細胞を検出できる程度であった<sup>4)</sup>。また、癌細胞でさえも4番染色体の異常頻度は極端に低いものがあった (Table 2)。

一方、1番染色体ではTable 4に示すように、60細胞の観察ですでに1個の異常を検出できており、4番染色体より異常頻度が高いことが予想され、100細胞程度の観察でも異常頻度を算出でき、*in vitro*培養前後の比較が可能だと考えられる。1番染色体の方が解析プローブとして適切であると考えられるが、基本的にhMSCの標本では安定した数の分裂中期像を集めることが困難という事実から、染色体を観察対象とする評価は困難だと考えられた。

対照的に、*c-myc*では間期細胞での効率のよい異常解析が可能で、安全性評価法として有用であることが示唆された。実際に、5ヵ月まで継代培養できたhMSC 10909を用い間期細胞で*c-myc*解析を行なった結果、継代による異常頻度の変化、及び最終継代標本で有意な増加を検出できた (Table 3)。

本研究では実施していないが、分化により増殖が停止した細胞でも本研究と同様に細胞標本作製し、間期細胞でFISHによる観察が可能であると考えられる。ただし、骨芽細胞のように分化によって骨化する細胞ではカルシウム沈着がおこり細胞標本作製できない可能性がある。このような細胞では遺伝的影響の検出は困難であると考えられる。

試験手技上の利点であるが、解析対象を間期細胞にすることによって、標本作製も容易になり観察時間も短縮できる。広く一般に応用するにあたっては非常に重要な長所である。具体的には、この手法を用いれば最短3日 (標本作製1日、翌日FISH、3日目に300細胞を観察) で結果を得ることができ、臨床手順の流れをさえぎることなくこの結果を臨床に反映させることができると考えられる。

hMSCは市販品であるが、Cambrex社によるとドナーから細胞を採取後製品とするまでに約3週間 (2-3代の継代) を要しているという。従って、1ヶ月で統計学的に有意な異常頻度を示したhMSC11809 (Table 3) はその時点でヒトから採取後すでに2ヵ月近く培養していることになる。現在臨床研究で行なわれている培養は採取後長くて1ヵ月といわれており、Table 3の結果から、実際的にはその期間では異常細胞頻度が有意に増加することはないであろうと考えている。5ヵ月まで継代した時点で*c-myc*の明らかな異常の増加が認められたhMSC 10909でも、1ヵ月までは染色体数の分布も46本にピー

クが認められ (Fig. 3)、*c-myc*の異常頻度も培養開始直後の頻度より高くはなかった。

*c-myc*等の遺伝子座での異常とは別に染色体の構造異常も指標とするのが望ましいと考えられるが、効率よく異常を検出できることが判明したFISH法でも、分裂期細胞での観察は実際的には困難であることが判明した。染色体構造異常を間期細胞で観察する方法として小核試験があり検討の余地ありと考えられるが、今後の課題としたい。

最後に、「*In vitro*培養ヒト間葉系幹細胞の安全性評価法」の1つとして、以下の方法を提案したい。

- 1) 提案の前提：採取された幹細胞の本来使用目的以外の使用量を最小限にする。臨床手順を妨げない。
- 2) 観察対象：患者から採取直後の細胞 (陰性対照) と、*in vitro*で培養増殖させ患者に移植直前の細胞とで、異常頻度の比較を行う。
- 3) 評価手法：3-1. 位相差顕微鏡による細胞形態観察  
3-2. FISH法で300間期細胞の染色体異常解析を行い、 $\chi^2$ 検定を行う。  
プローブは*c-myc*等の遺伝子座特異的DNAプローブ2種を用いる。

## 謝辞

本研究は財団法人ヒューマンサイエンス振興財団よりの研究助成金によって実施された。ここに謝意を表する。

## 参考文献

- 1) Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medranos, E. E., Linskens, M., Rubelj, L., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. and Campisi, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363-9367 (1995)
- 2) Matsuoka, A., Tucker, J. D., Hayashi, M., Yamazaki, N. and Sofuni, T.: *Mutagenesis*, **9**, 151-155 (1994)
- 3) Ito, T., Sawada, R., Fujiwara, Y., Seyama, Y. and Tsuchiya, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, 108-114 (2007)
- 4) Matsuoka, A., Yamada, K., Hayashi, M. and Sofuni, T.: *J. Radiat. Res.*, **37**, 257-265 (1996)