

平成13年度厚生科学研究  
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議

日時：2002年2月16日（土）9:15-12:30

場所：三省堂文化会館

TEL:03-3320-2611

新宿区西新宿4-15-3 三省堂新宿ビル内

\*発表原稿はA4用紙で50部ご用意願います。

9:00 受付開始

9:15-9:20

1. はじめに

国立名古屋病院 齋藤英彦

2. ご挨拶

厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室 日下英司

(9:20-10:00)

【司会：東大医科研 高橋 恒夫】

3. 胎盤からの間葉系幹／前駆細胞の分離・同定と骨芽細胞および神経系細胞への分化誘導

東京大学医科学研究所 渡辺信和

4. 活性型TIE2受容体遺伝子導入による造血幹細胞の未分化性の誘導

金沢大学がん研究所 高倉 伸幸

5. 臍帯血造血前駆細胞から巨核球への分化動態 -末梢血前駆細胞との比較-

大阪大学微生物病研究所 仲野 徹

(10:00-10:40)

【司会：兵庫医大 原 宏】

6. 遺伝子導入によるヒト間葉系幹細胞株の樹立とその造血支持能

兵庫医科大学 西岡啓介、原 宏、仇 恵英、甲斐俊朗、藤盛好啓、玉置知子

7. 遺伝子導入によるヒトさい帯血 CD34(+)細胞由来の内皮細胞株の樹立

兵庫医科大学 仇 恵英、藤盛好啓、西岡啓介、甲斐俊朗、玉置知子、原 宏

8. 臍帯血由来 NK 細胞増幅活性化

東京大学医科学研究所 長村登起子

(10:40-11:20)

【司会：東海大学 堀田知光】

9. 臍帯血CD34陽性細胞からのB細胞分化-in vitro, in vivoでの比較-

名古屋大学医学部 廣瀬由佳

10. NODマウスを利用した臍帯血幹細胞評価

東海大学医学部 安藤 潔

11. ex vivo増幅造血幹細胞を用いた移植のための基盤整備

京都大学医学部 伊藤仁也

(11:20-12:00)

【司会：名古屋大学 直江知樹】

12. 臍帯血移植後のリンパ球回復

東海大学医学部 井上裕靖

13. 臍帯血移植後にみられたCD4陽性リンパ球の回復遅延

名古屋大学大学院成長発達医学 渡辺修大

14. 東海臍帯血バンクの現況

東海臍帯血バンク 加藤剛二、矢崎 信

(12:00-12:25)

【司会：東海大学 加藤俊一】

15. 成人のさい帯血移植の経験と成人への移植を考慮した保存さい帯血の条件の再検討

兵庫医科大学 甲斐俊朗、五熊丈義、田中英久、山口雅生、原 宏

16. 非血縁臍帯血移植270例の成績

神奈川県厚木保健所 磯山恵一、西平浩一

### 3. タイトル： 胎盤からの間葉系細胞の分離・同定とその分化誘導能

主任研究者氏名：高橋 恒夫

分担研究者：渡辺 信和、伊倉 宏一、三鶴 亜矢子、長村 登紀子

東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門

臍帯血採取後の胎盤は、現在医療廃棄物として廃棄されている。しかしながら、バンクに登録された臍帯血は、感染性や主要組織適合抗原などの詳細が把握されており、臍帯血採取後の胎盤を再生医療の細胞のソースとして用いることが可能な場合、高い利用価値がある。

発生初期の胎盤には間葉系幹細胞（MSCs）が豊富に存在するが、妊娠後期の胎盤の大部分を占める胎盤絨毛には、筋線維芽細胞、栄養膜合胞体層、毛細血管内皮細胞、および臍帯血や母体血由来の血液細胞などが存在する。

我々は、成熟胎盤の胎盤絨毛を細切し、酵素処理あるいは切片からの outgrowth により、胎盤構成細胞を単離した。酵素処理後得られた単離細胞を 10 日間培養し、その表面マーカーを解析したところ、CD34-CD45+細胞、CD34+CD45dim 細胞、および CD34-CD45-細胞に大別できた。間葉系細胞と思われる CD34-CD45-細胞は種々の間葉系マーカーを発現し、これらのマーカーを用いて sorting すると短時間で接着して単一の線維芽細胞様の形態を示した。一方、outgrowth で得られた細胞は、均一な間葉系細胞であった。

ところで、ヒト間葉系幹細胞に特異的なマーカーは、現在まで知られていない。近年、臓器幹細胞に共通した multidrug resistance gene 分子高発現の性質を利用して、Hoechst33342 染色における side population 検出により臓器幹細胞の同定が試みられている。酵素処理、および遊走法により得られた胎盤由来間葉系細胞について side population の有無を調べた。その結果、我々の方法で得られた間葉系細胞では、side population は 0.1%以下の低頻度であった。

酵素処理で得られた間葉系細胞では、種々の分化誘導因子に対するレセプターの mRNA が構成的に発現していた。また、分化関連マーカーとしては renin のほか、骨芽細胞の分化に関連した mRNA の発現もみられた。さらに胎盤由来間葉系細胞は、適切な培養条件の下で骨芽細胞に分化誘導が可能で、細胞外でのカルシウムの沈着も認められた。

今回我々は、胎盤構成細胞について概説し、とくに間葉系細胞の細胞生物学的性状の解析結果を紹介し、再生医療への応用について考察する。

4. 活性型 TIE2 受容体遺伝子導入による造血幹細胞の未分化性の誘導  
高倉伸幸（金沢大学がん研究所、細胞分化研究分野）

＜目的＞

造血組織においては緻密な血管構造を構築する血管内皮細胞を支持細胞として造血幹細胞の自己複製が営まれると考えられる。そこで本研究では造血幹細胞と血管内皮細胞の両者に発現し、両者の接着と造血幹細胞の未分化性維持に関わる TIE2 受容体を恒常的に活性化させ、試験管内での臍帯血造血幹細胞の長期未分化性を誘導することを研究の目的とする。

＜研究方法とその結果＞

我々の研究は、造血組織内で造血幹細胞の自己複製が誘導される生態学的適所（ニッチェ）を明らかにし、このニッチェを試験管内で再現することによって、造血幹細胞の長期未分化を支持させ、さらに幹細胞の増幅を誘導する試みであり、本年度以下の研究結果を得た。

1) 活性型 TIE2 受容体の構築

TIE2 受容体の細胞膜貫通領域の直下に点突然変異を導入し、恒常的に TIE2 のリン酸化が誘導される変異 cDNA を作成した。本遺伝子を IL-3 依存的に増殖する Ba/F3 細胞に遺伝子導入し、細胞変化を観察したところ、活性型 TIE2 を発現する Ba/F3 細胞はマトリックスへの強固な接着が誘導され、細胞周期の遅延化と IL-3 飢餓状態における細胞死の抑制が観察された。

2) 活性型 TIE2 受容体発現の個体における効果

Cre-Lox-P システムを用い、TIE2 プロモーター制御下に活性型 TIE2 受容体を発現する、コンディショナルトランスジェニックマウスを作成し、造血幹細胞の発生につき観察したところ、造血幹細胞の発生領域である、AGM 領域の動脈内クラスター形成が正常マウスと比べ遷延しており、さらに胎仔肝における造血幹細胞の分化抑制が観察され、ニッチェ領域の増強が観察された。

3) 造血幹細胞への活性型 TIE2 受容体の試験管内遺伝子導入とその効果

活性型 TIE2 と正常 TIE2 受容体を造血幹細胞に発現させるべく、マウス骨髄中から Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>TIE2<sup>+</sup>造血幹細胞を回収し、レトロウイルスによる遺伝子導入を行なった。活性型 TIE2 感染群には CFU-c を形成する細胞が、野生型 TIE2 感染群に比し高頻度に観察されたが、現在、遺伝子導入効率と真の造血幹細胞の増殖効果については検討中である。

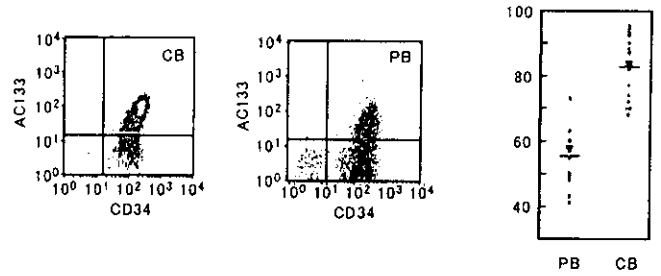
＜考察＞

個体内では TIE2 の活性化により造血幹細胞の未分化性を誘導することが確認された。これらの結果に立脚して、ヒト型活性型 TIE2 受容体を構築し、ニッチェ構成細胞である血管内皮細胞と造血幹細胞に同時に本遺伝子を導入し、造血幹細胞の試験管内における長期未分化性の誘導を試みたい。

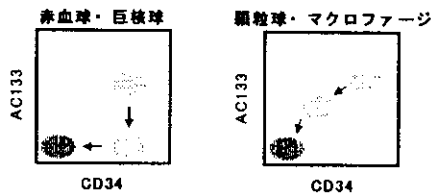
5. 臍帯血造血前駆細胞から巨核球への分化動態  
—末梢血造血前駆細胞との比較—

大阪赤十字血液センター  
松本加代子  
保井一太

大阪大学微生物病研究所  
仲野 徹

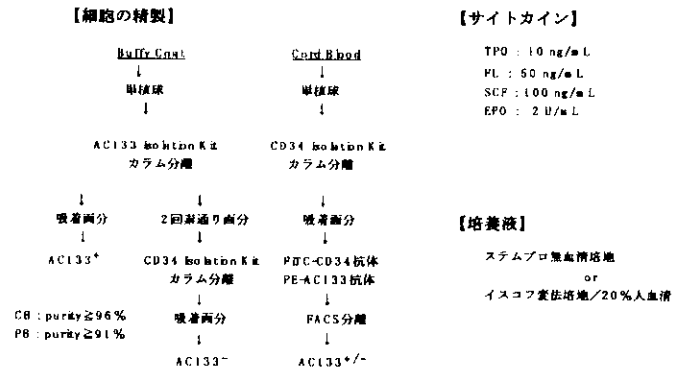


赤血球・巨核球とマクロファージへの分化過程における  
AC133とCD34の発現

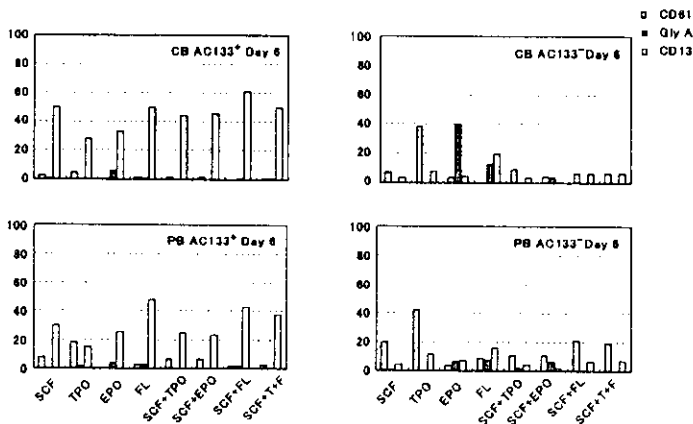


1. 巨核球系の細胞はCD34<sup>+</sup>AC133<sup>-</sup>分面を経て分化するのに対し、顆粒球系の細胞はCD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup>分面を経て分化する。
2. PBに比較して、CBの分化過程において、CD34<sup>+</sup>AC133<sup>-</sup>分面の細胞はほとんど出現しなかった。
3. CBからの分化過程においては、CD34<sup>+</sup>AC133<sup>-</sup>分面の細胞が少ないのみならず、CD34<sup>+</sup>AC133<sup>-</sup>分面の細胞におけるCFU-Megの比率が非常に低かった。

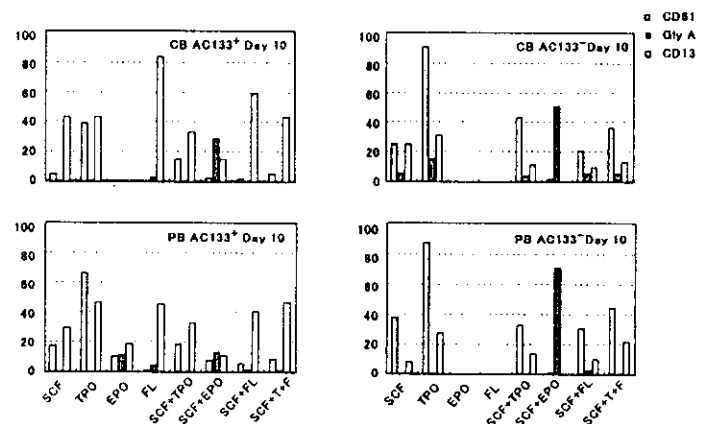
細胞の単離、培養方法



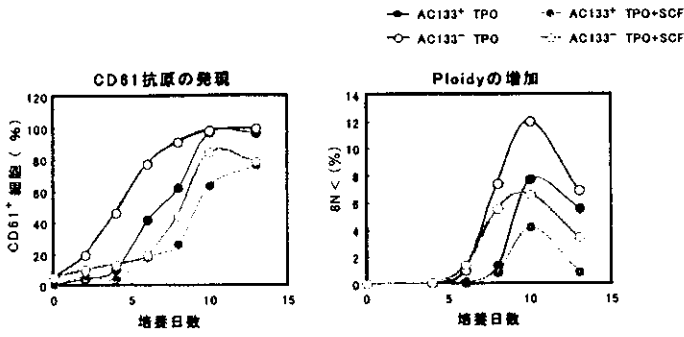
臍帯血、末梢血からの血液細胞分化: 1



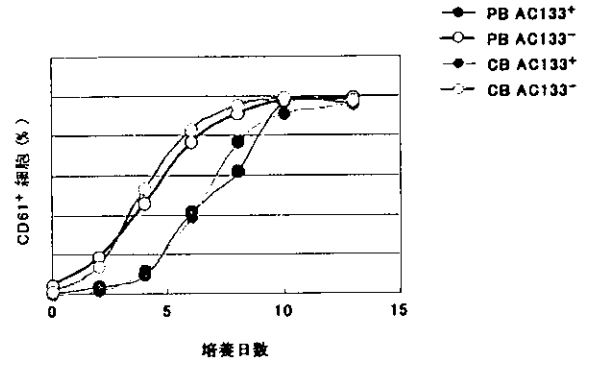
臍帯血、末梢血からの血液細胞分化: 2



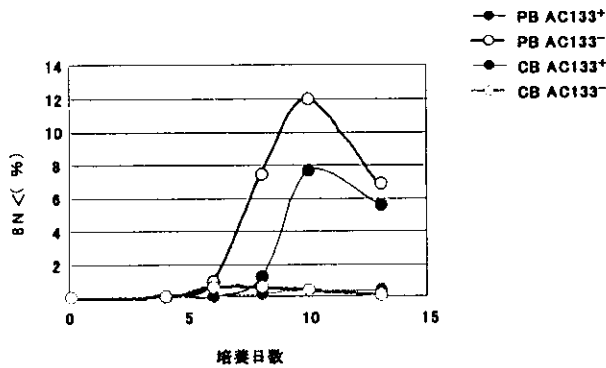
PBからの血液細胞分化におけるサイトカインの役割



CBとPBの分化におけるCD61の発現

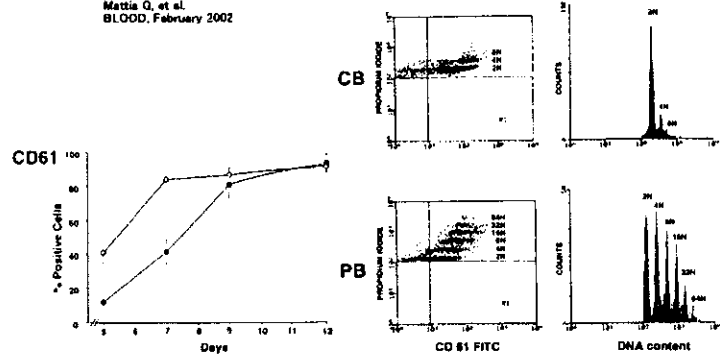


CBとPBの分化におけるPloidyの変化

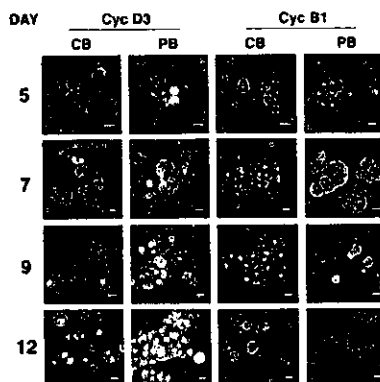


Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34<sup>+</sup> cells are correlated with different levels of platelet release

Mattia G, et al. BLOOD, February 2002



CBとPBにおけるCyclin発現の違い



Mattia G, et al. BLOOD, February 2002

**Cyclin D3**  
G1期特異的に発現される。トランスジェニックマウスでは、TPO刺激により多核化が増強。

**Cyclin B1**  
G2/M期に発現が著増。巨核球の分化進行にともない、発現は低下する。

まとめ

1. サイトカイン(TPO, EPO, SCF, FL)の組み合わせを変えて巨核球系への分化を検討した結果、TPO単独添加が最適であった。
2. AC133<sup>+</sup>細胞およびAC133<sup>-</sup>細胞それぞれにTPOを添加して培養し、CD61抗原の発現を経時的に調べた。その結果、AC133<sup>+</sup>細胞からの培養におけるCD61抗原の発現は、AC133<sup>-</sup>細胞からの培養に比べて遅延していた。
3. CBとPB間においては、CD61抗原の発現に差は認められなかった。
4. 巨核球のDNA量の変化を経時的に測定して比較したところ、CBでは多倍体化した細胞(≥8N)の割合が非常に低く、PBの1/20程度しか出現しなかった。また、AC133<sup>+</sup>細胞とAC133<sup>-</sup>細胞の間では、多倍体化した細胞の割合に大きな差は認められなかった。

分担報告書

6. 遺伝子導入によるヒト間葉系幹細胞株の樹立とその造血支持能

○西岡啓介\*1、原 宏\*1、仇 恵英\*2、  
甲斐俊朗\*2、藤盛好啓\*3、玉置知子\*4

\*1兵庫医科大学細胞移植部、\*2 兵庫医科大学輸血部、  
\*3 兵庫医科大学先端医学研究所細胞移植部門、  
\*4 兵庫医科大学遺伝学教室

はじめに

間葉系幹細胞は骨髄間質細胞中に存在する線維芽細胞様の細胞であり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞など様々な種類の細胞に分化する能力を持っている細胞であり、再生医療や細胞移植などの面からもその可塑性が注目されている。また血液の領域では間葉系幹細胞は骨髄内で造血を支持することができ、in vitroにおいてもその性質を再現することができる。

レトロウイルスベクターSSR#69を導入することにより哺乳類の細胞を可逆的に不死化することができる。SSR#69は自殺遺伝子であるHSV-TKを有し、アデノウイルスベクターAxCANCreを用いてCre-loxP遺伝子再構築により不死化遺伝子の除去が可能であり安全弁が2つあることから将来における臨床応用を前提としてデザインされたレトロウイルスベクターである。これを間葉系幹細胞に導入する事によりこれを可逆的に不死化することが可能である。正常の間葉系幹細胞は継代していくと約10代目までは継代が可能だがそこで成長が止まってしまう。このSSR#69を用いると不死化が起こり、長期にわたって生存、増殖する。SSR#69を利用して間葉系幹細胞株を作製しそれを大量培養し、間葉系幹細胞より発生させることができる臓器を再生させること、また間葉系幹細胞株の造血支持能についても調べるのがこの研究の目的である。今回はその造血支持能について報告する。

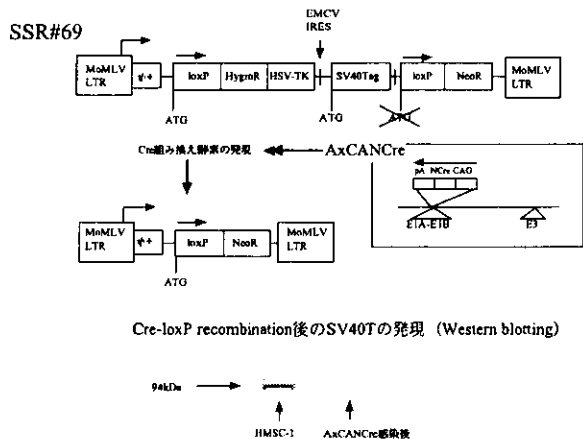
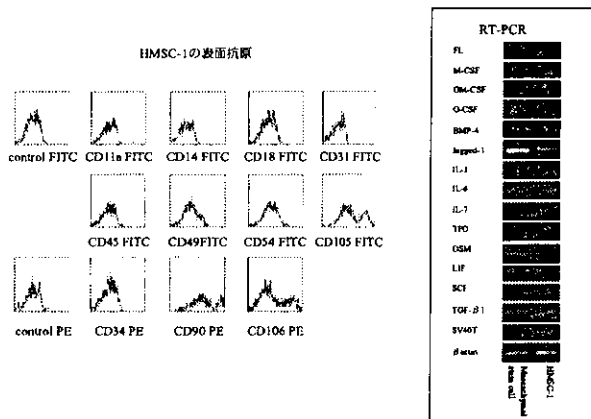
不死化解除

アデノウイルスベクター AxCANCre の産生

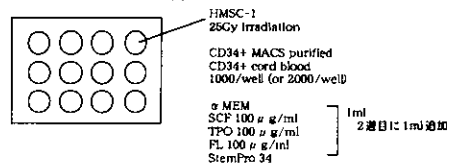
アデノウイルスベクター AxCANCre による Cre-loxP recombination を用いた不死化解除を行った。293 細胞に AxCANCre を感染させて培養し細胞を崩壊させてから、上清をウイルス液とした。-80℃に保存し適宜用いた。

AxCANCre の感染

HMSC-1 に 10% の AxCANCre のウイルス液を 200 μl 加えて 1 時間感染させたあと通常の medium を加えてさらにさらに 48 時間培養し、G418 で selection してからこの細胞を Western blotting にて SV40T の存在の有無につき調べた。



さい帯血 CD34 陽性細胞との共培養



- 各濃度 (0, 1, 2 濃度) に
  - ① flow cytometer で CD34PE, CD38FITC, PI で解析
  - ② methylcellulose 法で CFU を測定。(1mm 以上のコロニーは HPP)
  - ③ SRC
    - CD34+ cord blood 2000 個を 300cGy の放射線照射をした NOD/SCID mice に同濃度もしくは同細胞を培養した細胞を i.v., anti-Asialo GM1 antibody を i.p. し、8 週間飼育庫で飼育した。8 週後に骨髄を取り出し、flow cytometer で抗ヒト CD45 抗体をもちいてヒト細胞を検出し、flow cytometer で検出できなかったものは DNA を抽出しヒト特異的な 17 α satellite gene を PCR により検出した。PCR の検出感度は <0.1% であった。

間葉系幹細胞株の作成

ウイルス液の産生

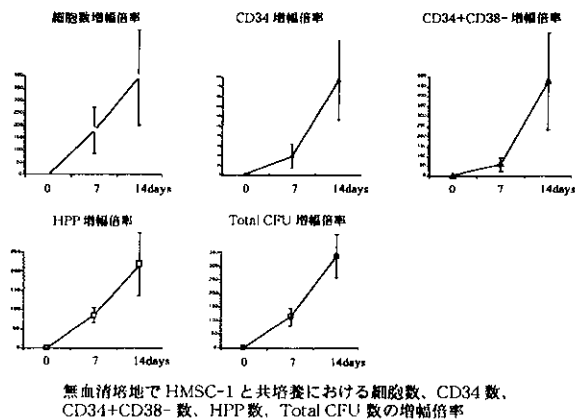
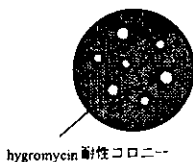
packaging cells を培養し、上清を集めて遠心し、(6000×g, 4℃, 16時間)、-80℃に冷凍保存

間葉系幹細胞の培養

ヒト間葉系幹細胞を培養し 10% のウイルス液で 2 回 (2 4 時間毎) 感染させる。Hygromycin で selection し立ち上がったコロニーの培養、継代を続け、間葉系幹細胞株とした。最も増殖力のあった株(HMSC-1)を用いて以後の実験を行った。

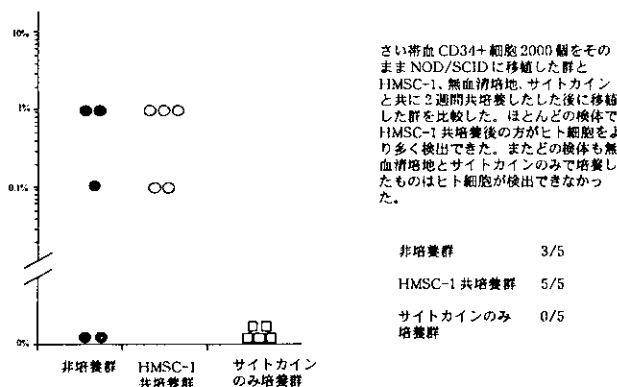
脂肪細胞への分化

- ① Adipogenic Induction Medium
    - h-Insulin, L-glutamine, MCGS (mesenchymal cell growth supplement), Dexamethazone, Indomethacin, IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine), Pen/Strep
  - ② Adipogenic Maintenance Medium
    - h-Insulin, L-glutamine, MCGS, Pen/Strep
- ①と②を交互に 3 日おきに交換し 3 週間培養する



無血清培地で HMSC-1 と共培養における細胞数、CD34 数、CD34+CD38- 数、HPP 数、Total CFU 数の増幅倍率

## SCID repopulating cells (SRC) assay



### 考察

- ①小林らはレトロウイルスベクターSSR#69を用いて肝細胞を可逆的に不死化させ、ヒト肝細胞株を作製し、急性肝不全モデルラットに対する治療として同細胞の肝細胞移植を施行する事によって、延命し得たことを報告した。(Science, 2000 : Vol 287, 1258) この実験から、このシステムの臨床応用の可能性が示された。
- ②SSR#69を用いることによって、ヒト間葉系幹細胞株 HMSC-1 を作製することができた。この細胞はアデノウイルスベクターAxCANCreを感染させ、SV40TをCre-loxP recombinationにより除去することが可能であった。この細胞はSV40Tを除去しなくても脂肪細胞に分化することが可能であった。近年、この間葉系幹細胞の可塑性が注目されており、このシステムを用いることによってさらに間葉系幹細胞の大量培養が可能であり、骨や軟骨、心筋等、臓器再生においても有効な手段であると思われる。
- ③今回は間葉系幹細胞の造血支持能について調べた。間葉系幹細胞が造血を支持することは多くの報告があり、明らかである。この実験でも、細胞数、CD34+細胞数、CFU数を増幅させることができた。さらにこの実験で HMSC-1 が SRC の増幅を補助することができそうである事がわかった。BhatiaらによってBMP-4, Jagged-1等はSRCを増幅させることが報告されており、この細胞がBMP-4やJagged-1を発現していることはSRCの増幅に関与しているかもしれない。
- ④間葉系幹細胞は造血幹細胞と同時に移植することにより生着率が上昇するという報告もある。この細胞をこのように利用するためには大量培養してから不死化を解除し、造血幹細胞とともに投与するという方法が考えられる。

### Acknowledgement

SSR#69はMITのDr. Karen A. Westerman, Dr. Philippe Leboulchとの共同研究です。

岡山大学第一外科の小林直哉先生にSSR#69を実際に提供していただき、技術指導をしていただきました。

SCF, TPO, EPO, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6はキリンビール株式会社より提供していただきました。

Western blottingに用いたウリナスタチンは持田製薬株式会社より提供していただきました。

## 7. 遺伝子導入によるヒトさい帯血CD34(+)細胞由来内皮細胞株の樹立

仇 恵英<sup>1)</sup>、藤盛好啓<sup>2)</sup>、西岡啓介<sup>3)</sup>、甲斐俊朗<sup>1)</sup>、玉置知子<sup>4)</sup>、原 宏<sup>1)2)3)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫医科大学輸血部、<sup>2)</sup>先端医学研究所細胞移植部門、<sup>3)</sup>細胞移植部、<sup>4)</sup>遺伝学

目的 さい帯血血管内皮前駆細胞に由来する血管内皮細胞の不老化を試みた。

方法 さい帯血CD34(+)細胞をVEGF、bFGF存在下で培養後、レトロウイルスベクターSSR#69を用いて、SV-40T遺伝子を導入した。



Fig. 1



Fig. 3

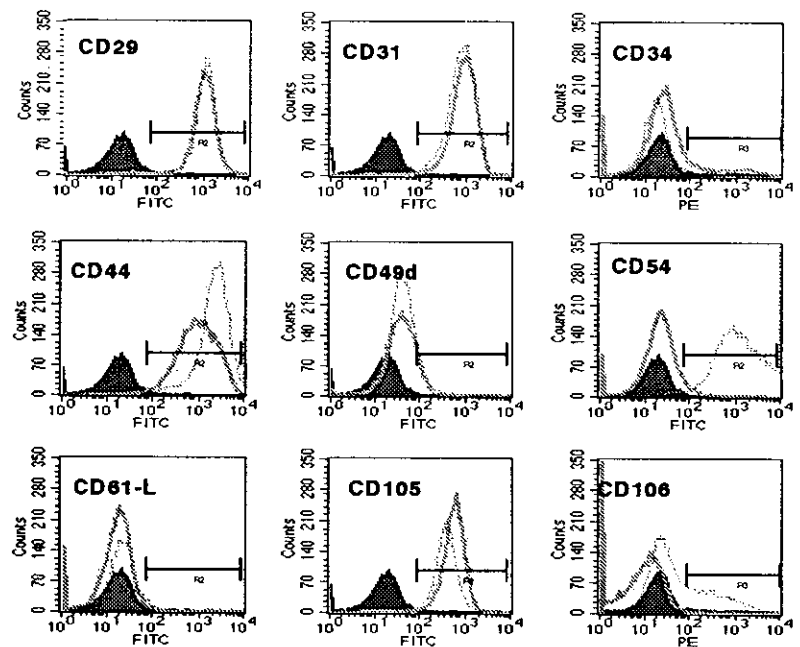


Fig. 2

結果 さい帯血CD34(+)細胞より血管内皮細胞が誘導できるものの、その頻度は低く、初代培養は1-3代で継代不能となった。SV-40T遺伝子導入することにより細胞株HYCEC-1 (Fig. 1)を得た。HYCEC-1は、VEGF、bFGF存在下に増殖し、ganciclovirにより増殖が抑制された。HYCEC-1は、acetylated LDLを取り込み、vWF陽性であった。CD29、CD31、CD44、CD105陽性であり、CD34、CD49は弱陽性であった(Fig. 2)。また、マトリゲル上に血管様構造を形成した(Fig. 3)。Cre-loxP recombinationによりSV-40Tを除去することができた。

考察 さい帯血CD34(+)細胞由来血管内皮細胞株HYCEC-1はin vitroで血管様構造形成可能であり、血管内皮前駆細胞と考えられた。血管内皮障害の治療に応用できる可能性がある。



平成 13 年度 厚生労働省 厚生科学研究  
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業) 研究  
斎藤班「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」

## 8. タイトル：臍帯血由来 NK 細胞の増幅活性化

主任研究者：氏 名 高橋 恒夫  
分担研究者：氏 名 長村(井上) 登紀子、森 有加、渡辺 信和、Zhen Yizhou  
東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング研究部門

造血幹細胞移植同様に移植後の再発は大きな問題であり 移植後の Graft versus leukemia/tumor (GVL/T) 効果の増強が期待される。T 細胞の未熟な臍帯血を用いた臍帯血移植では HLA 非拘束性、腫瘍非特異的細胞傷害活性を有す NK 細胞はその効果細胞として注目される。本研究では臨床応用を念頭において IL15 と Flt3L を用いて臍帯血単核球由来 NK 細胞の増幅活性化を検討したので報告する。

方法：臍帯血由来単核球(MNCs)または AUTOMACS(NK cell Isolation kit, Miltenyi Biotec, ISA)にて nonNK 細胞を除いた純化 NK 細胞を IL15+Flt3L 種々の濃度で 2 または 3 週間培養した。培養後生細胞数を測定し FACS にて NK 細胞分画 (CD3-CD56+) の絶対数を算出するとともに表面マーカーの解析、機能について調べた。RT-PCR は培養後の AUTOMACS にて純化した細胞を用いた。

結果：臍帯血由来 NK 細胞の増幅は純化した NK 細胞よりも MNC からの培養の方が増幅率もよく、効率的で Dish に付着しながら増幅する傾向が認められた。

また Flt3L+IL15 の方が Flt3L+IL2 よりも NK 細胞の増幅が良かったが MNC からの NK 細胞と T 細胞の比は IL15 の濃度に依存し IL15 と Flt3L の至適濃度の確立が重要と思われた。臍帯血由来 NK 細胞は MNCs の 10-20%に認められ IL15(10ng/ml)+Flt3L(10ng/ml)にて 5-10 倍の増幅を認めた。これにより初期培養開始 2 週間後に MNC 細胞数とほぼ同量の NK 細胞が得られると期待される。培養後の表面マーカーは Flt3L+IL2 との培養と差は無く、CD56 の強陽性、LFA1a、VLA4 陽性、細胞内染色にて perforin の発現を認めた。また Perforin を含めた機能的分子である FasL, GranzymeB の発現誘導も RT-PCR により確認された。さらに K562, Jurkat 細胞に対する細胞傷害活性は 培養後に著明に認められ、これらは Perforin の阻害剤である Concanamicin A(CMA)にて抑制された。

結語：臍帯血 MNC 由来 NK 細胞の IL15 と Flt3L にて増幅可能でありかつ機能的で GVL/T として臨床的に貢献できる可能性があると思われた。今後は *in vivo* マウスの系での検討ならびに NK 細胞の遊走能、組織浸潤能も検討予定である。

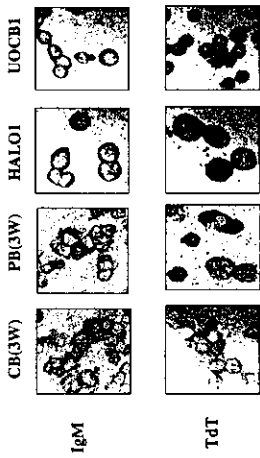
臍帯血移植後の免疫系再構築機構の解析

*in vitro*

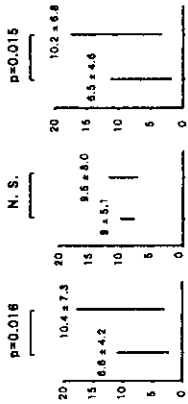
MS-5 培養系による B 細胞分化  
 臍帯血・末梢血由来 CD34+ 細胞の比較  
 IgH CDR3 レパートリー  
 B 細胞分化関連遺伝子発現

*in vivo*

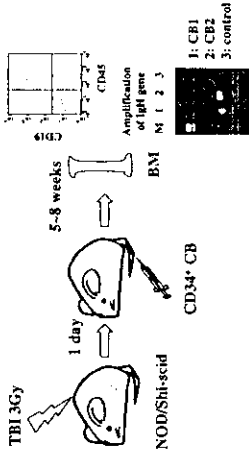
マウスにおける移植モデル



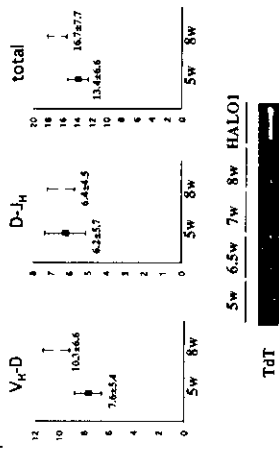
Comparison of the N nucleotides at the V<sub>H</sub>-D junction between cultured CB and PB cells



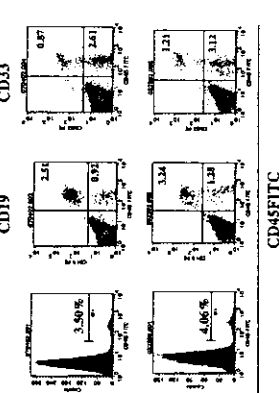
Analysis of the human IgH gene repertoire in the BM cells of NOD/Shi-seid mice transplanted with human CB cells



Comparison of the N nucleotides



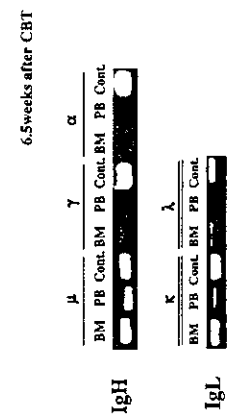
FACS analysis of BM cells in mice



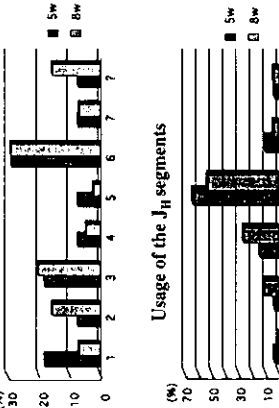
Comparison of the in/out of frame ratio of the IgH gene rearrangement

Cell Type	3W	4W	6W
CB	12 / 35 (25.5%)	11 / 16 (40.7%)	21 / 19 (52.5%)
PB	15 / 5 (75.0%)	10 / 7 (58.8%)	14 / 10 (58.3%)
mouse 5W	26 / 28 (92.9%)		
mouse 8W	45 / 45 (100%)		

Expression of human Ig genes in mouse



Usage of the D segments

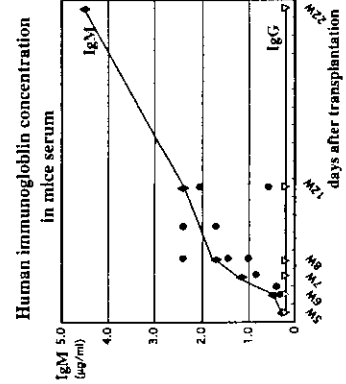


Usage of the J<sub>H</sub> segments



考察

1. マウスにおけるヒト臍帯血移植後の B 細胞再構築過程はヒト出生後の初期 B 細胞構築過程を反映する。
2. 抗原刺激に基づく特異抗体産生能など B 細胞の成熟過程の検出が必要。
3. T 細胞、NK 細胞を含めたヒト免疫系の再構築モデルが必要。
4. ヒト特有の感染症の発症機構や、それに対する免疫応答機構の解明への応用。



平成13年度厚生科学研究

「臍帯血を用いた移植・再生医療の確立に関する研究」班会議

平成14年2月16日 於 三省堂文化会館

## 10 NOG マウスを利用した臍帯血幹細胞評価

班員：東海大学医学部内科 堀田知光

協力者：

東海大学医学部細胞移植研究センター、細胞移植研究センター

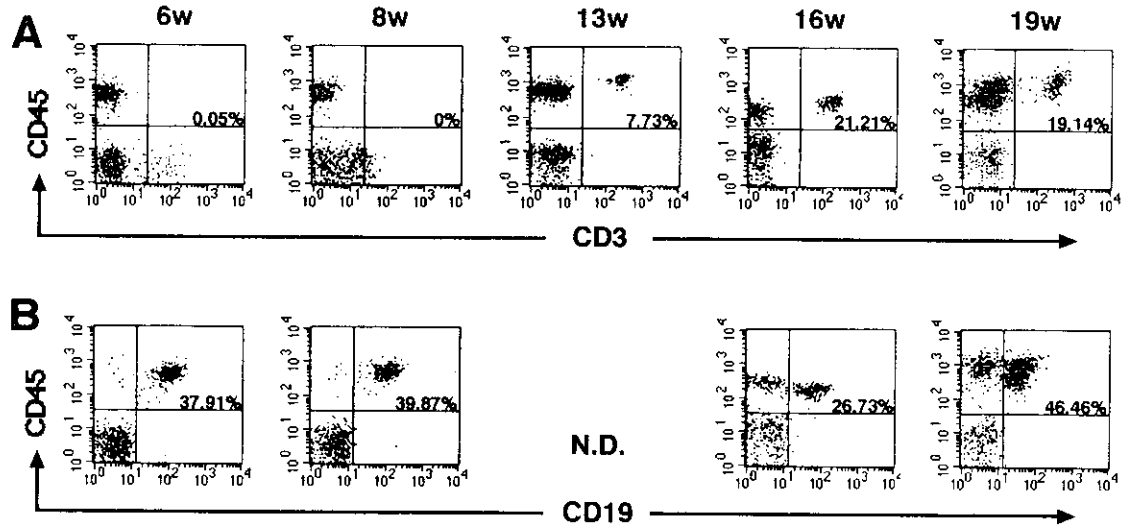
安藤 潔、八幡 崇、中村嘉彦、加藤俊一

【背景と目的】ヒト造血幹細胞の測定系の開発は造血幹細胞を用いた再生医療技術の評価するためにも必須の課題である。現在異種移植を利用した長期造血再構築能をもってヒト造血幹細胞の代替測定系とすることが一般に認められている。すなわち動物にヒト細胞を移植して一定期間後に骨髄、末梢血などでヒト CD45 陽性細胞の表面マーカーを解析し、骨髄系およびリンパ系マーカーが認められれば多分化能があると判断される。2次移植も可能であれば自己複製能も併せ持つと判断され、造血幹細胞としての能力が証明されたと考えられている。NOD/SCID マウスはヒト造血幹細胞のアッセイに最もよく利用されている免疫不全マウスである。この系では T リンパ球への分化効率が低いため造血幹細胞あるいはプロ T 細胞から成熟 T リンパ球への分化能を見るためには利用が困難で、胎仔胸腺器官培養などが用いられている。今回（財）実験動物中央研究所で開発された NOG マウス (NOD/Shi-*scid* /IL-2R $\gamma$  null mouse) を用いて再現性良くヒト臍帯血 CD34 陽性細胞より成熟 T リンパ球を分化させることが可能であったので報告する。

【方法】ヒト臍帯血より免疫磁気ビーズ法により CD34<sup>+</sup>細胞を 98%以上の純度で得た。CD3<sup>+</sup>細胞の含有率は 0.1%以下であった。4ドナー由来の臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞 10<sup>5</sup> 個をそれぞれ 1 匹ずつ計 4 匹の NOG マウスに移植した。

【結果】移植後 13 週目にいずれのマウスにおいても末梢血に CD3<sup>+</sup>細胞が出現した (Figure 1)。19 週後に骨髄、胸腺、脾臓を解析した。骨髄では 69.43±14.3% (n=4) のヒト細胞が認められた。胸腺では CD4/CD8 double- および single-positive の細胞が認められた。脾臓細胞を用いて TCR V $\beta$  のクロナリティーおよび MLR アッセイを行ったところ、ポリクローナルな機能を有する成熟 T リンパ球が分化していることが確認された。

Figure 1



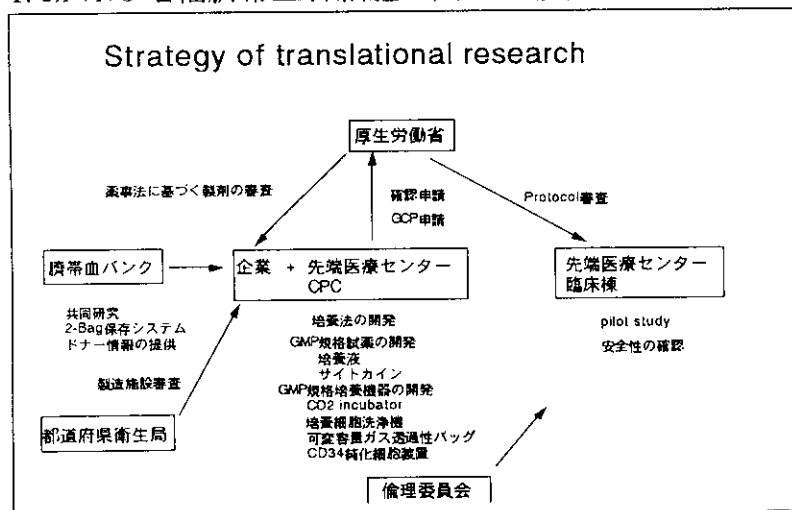
## 11. ex vivo 増幅造血幹細胞を用いた移植のための基盤整備

京都大学小児科 伊藤 仁也、中畑 龍俊

### 要旨

再生医療・細胞治療の基礎研究の成果が蓄積されることに並行し、2000年にFDAよりGTP(Good Tissue Practice)が法制化され、わが国でも2001年に厚生労働省令として生物製剤の取り扱いに対する基準が示された。今後、基礎研究の成果を臨床応用していくTranslational researchにおいて、GTPに準拠した細胞加工を行い、またすぐれたGCP(Good clinical protocol)に従った臨床研究を行わなければならない。我々はサイトカインを用いたex vivo 増幅臍帯血による移植へ向けた実際の取り組みを紹介する。

### 1. ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いた移植の臨床応用の進め方



### 2. GTP に準拠した細胞加工

#### 細胞組織医薬品に関する厚生労働省令概要 2001.3

##### 第1章. 細胞組織製剤の定義

細胞の加工とは、細胞の人為的増殖、活性化を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、遺伝子工学的改変、ハイブリット化、カプセル化をいう。

##### 第2章. 細胞採取、ドナーに関する規定

倫理委員会の設置、ドナースクリーニング、ドナー記録の作成、保管

##### 第3章. 製造段階における安全性確保

品質管理システムの構築、標準操作手順書の作成、試薬の規格、製品の試験法、製造施設の認可、バリデーションの実施

##### 第4章. 職員及び管理体制

管理者の任命、技術者の規定、CPCへの入室制限、教育訓練、健康管理

##### 第5章. 使用段階における安全性確保対策

製品情報の提供、説明と同意、試料の保存、患者情報の把握と保護

##### 第6章. 個人情報の保護

具体的に我々は GTP に準拠した臍帯血幹細胞を増幅させるために

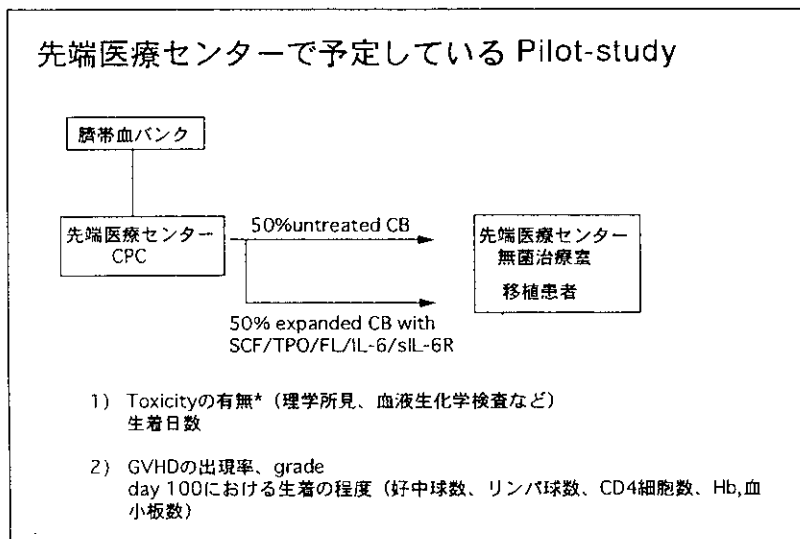
- 1) Cell processing center の整備
- 2) GMP 規格の培養液、試薬の使用
- 3) 細菌の混入機会を減らすための工夫として閉鎖系培養法の確立
- 4) 動物由来蛋白、血液製剤を使わない無血清培養法の確立
- 5) 最適な品質管理基準の作成

### 3. GCP に準拠した臨床試験への取り組み

#### (1) FDA,NIH の認可を受けた ex vivo 増幅臍帯血を用いた移植プロトコルの 1 例

Colorado groupの臨床試験protocol		
Title Ex vivo expansion of umbilical cord blood progenitors fortransplanstation into patients with high-risk hematological disease or blest cancer		
Primary endpoint toxicity, the number of days to engraftment of neutrophil and platlet		
Secondary endpoint disease free and over all survival, the rate of GVHD		
Treatment plan		
1.Strata A high-dose therapy	40%untreated CB	60% expanded CB with SCF/TPO/G-CSF
▼		
Day -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 +11 +12		
▼		
2.Strata B high-dose therapy	40%untreated CB	+ 60% expanded CB with SCF/TPO/G-CSF
▼		
Day -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 +11 +12		

#### (2)



### 4. 臍帯血バンクとの連携

Ex vivo 増幅による臍帯血移植の臨床応用に向けて、臍帯血バンクとの連携が重要である。品質管理のためにはドナー情報の共有化 (感染症のスクリーニング情報など) や 2-Bag system による保存方法、などが必要になると思われる。

## 1 2. 臍帯血移植後のリンパ球回復-GVHDの有無、ATG使用の有無の影響について

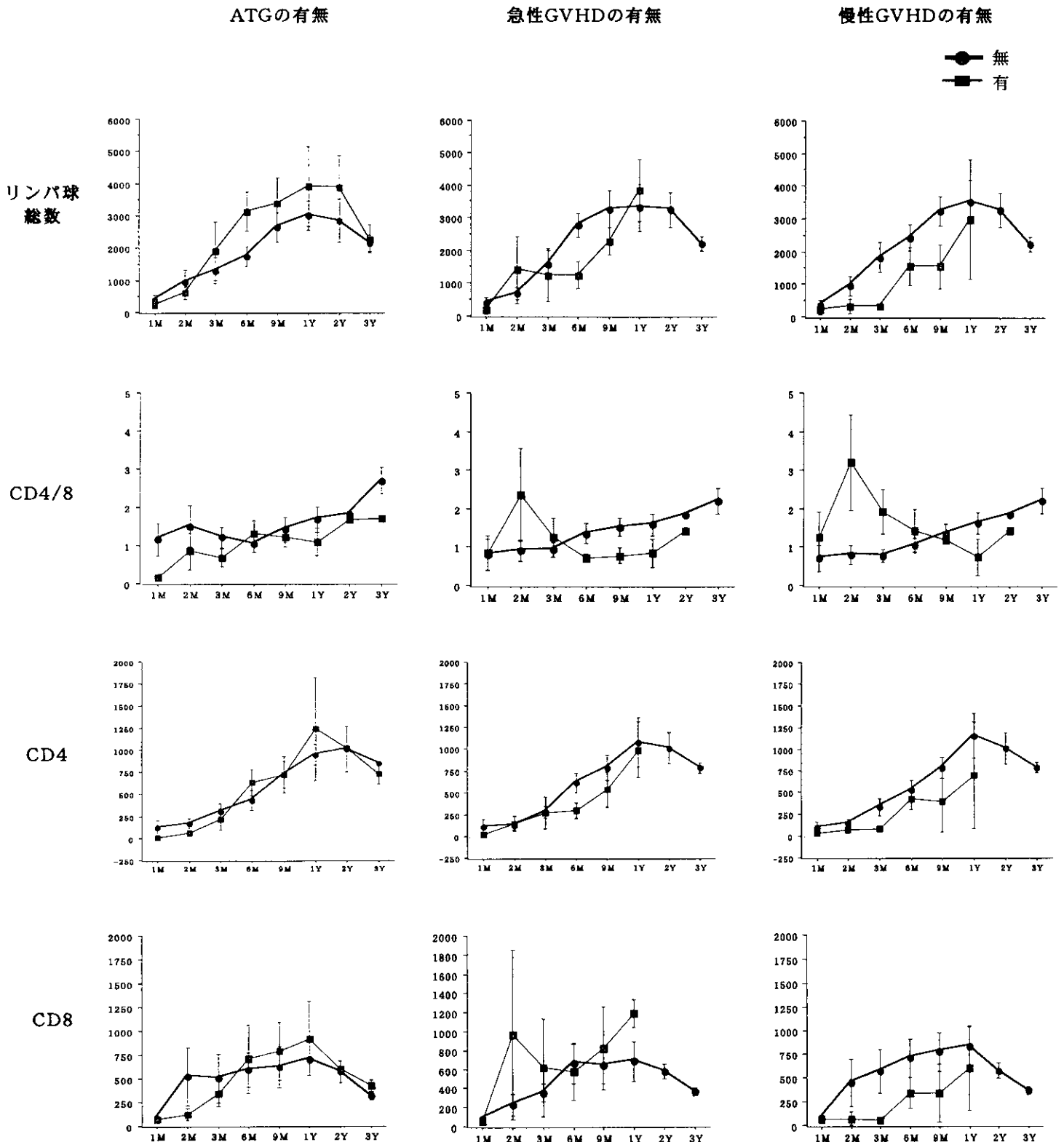
班 員 : 東海大学小児科 加藤俊一

研究協力者: 東海大学小児科 井上裕靖

大阪市立総合医療センター小児科 迫 正広

まとめ

1. 臍帯血移植後のリンパ球表面マーカーをATG、急性GVHD、慢性GVHDの有無で比較検討した。
2. ATG有りの群では無しの群よりもリンパ球総数、CD19<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>5<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>が多い傾向があった。
3. 急性GVHD有り(≧II度)の群では無しの群よりもCD19<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>5<sup>+</sup>が少なかった。
4. 慢性GVHD有りの群では無しの群よりもCD8<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>11b<sup>+</sup>が少ない傾向にあった。また、CD4<sup>+</sup>45RA<sup>+</sup>も少ない傾向にあった。

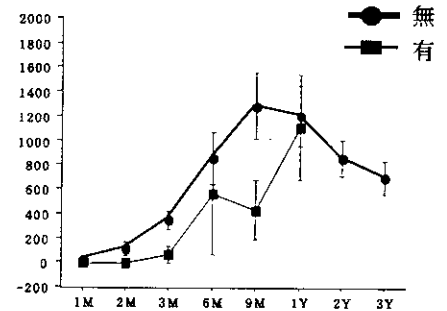
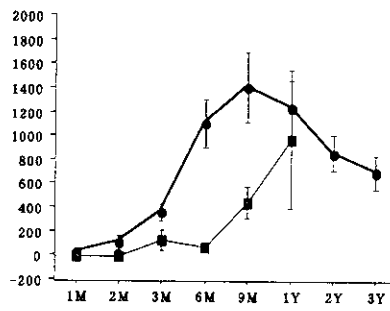
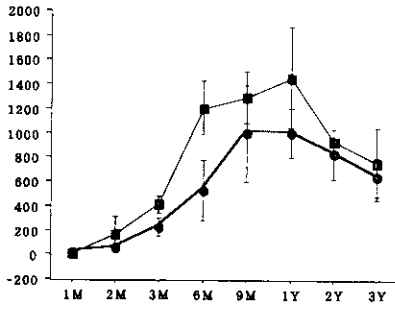


ATGの有無

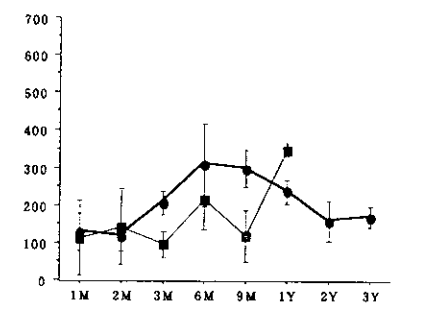
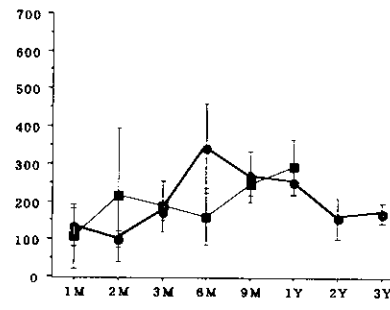
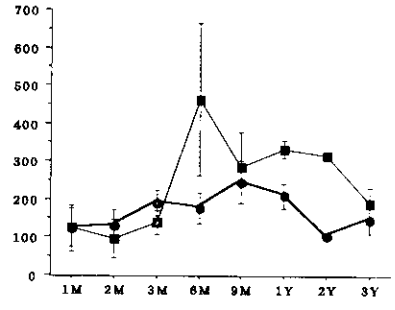
急性GVHDの有無

慢性GVHDの有無

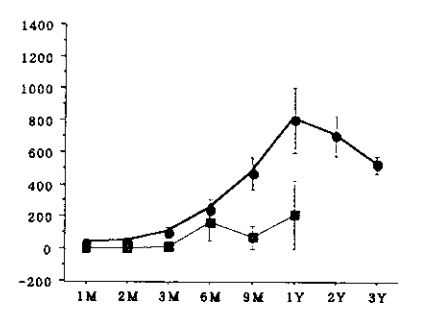
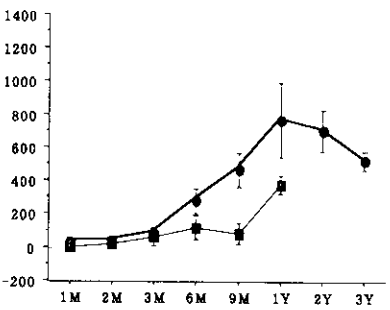
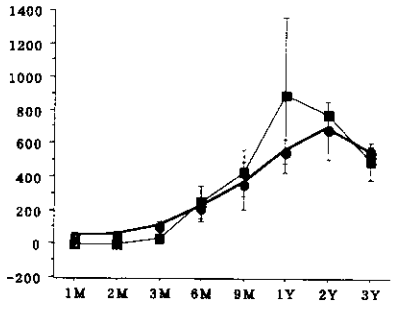
CD19



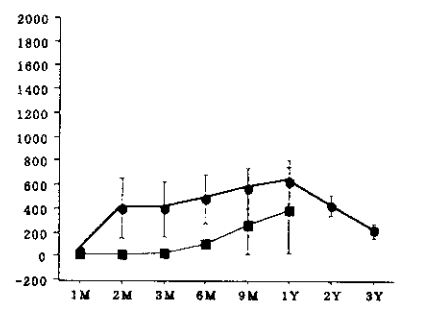
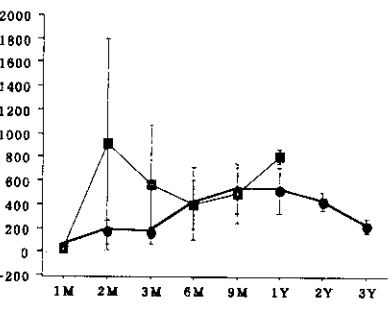
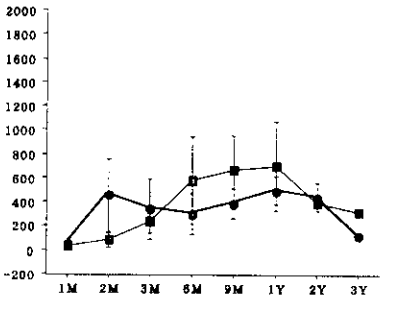
CD56



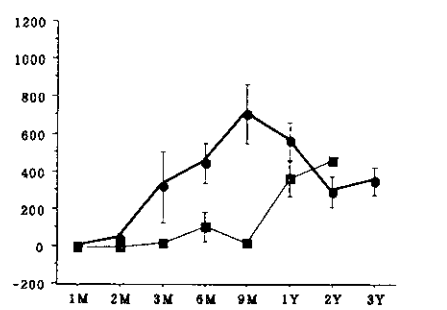
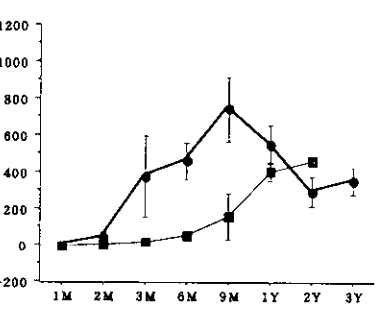
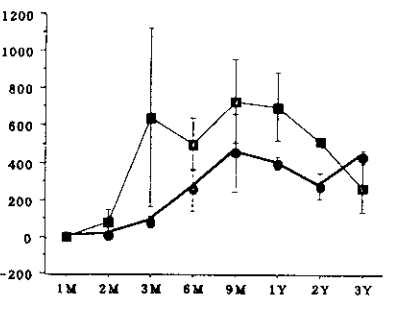
CD4<sup>+</sup>  
45RA<sup>+</sup>



CD8<sup>+</sup>11b<sup>+</sup>



CD19<sup>+</sup>5<sup>+</sup>





### 13. 臍帯血移植後にみられたCD4陽性 リンパ球の回復遅延

名古屋大学小児科/成長発達医学  
渡辺修大 吉見礼美 中村陽一 小山慎朗  
工藤寿子 小島勢二

#### はじめに

近年、科学技術の進歩、もしくは社会システムの改良などにより、多数の臍帯血の保存が可能になり、また医療技術の発展に伴い、非血縁者間臍帯血移植の症例数も増えてきた。

臍帯血移植後(CBT)の免疫の再構築に関してはこれまでいくつか骨髄移植(BMT)後の免疫再構築と比較した形で報告されているが、CBT,BMT共にCD4の回復はCD8,CD19,CD56に比べて遅延する傾向があるようである。今回我々はCBT後のCD4陽性リンパ球の著明な回復遅延、またそれによる遷延するサイトメガロウイルス感染症を経験したので報告する。

## 症例

<患者> H.S 女児

2歳 身長77.6cm 体重9.3kg 体表面積0.43m<sup>2</sup>

<診断> Langerhanscell histiocytosis(LCH)

<現病歴>平成12年7月より、発熱、頸部リンパ節の腫脹、肝脾腫を認め近医受診。汎血球減少、全身の紫斑を認め当院に紹介入院となる。入院後頸部リンパ節生検を行ったところ、CD1a陽性の組織球の浸潤を認めたためLCHと診断。その後化学療法(VP16,VBL,CPM,VCR,ADR,PSL)、脾摘を行うも病状は改善せず、頻回の輸血を要し、全身状態も悪化傾向であるため平成13年4月非血縁者間臍帯血移植を行った。

## 臍帯血移植

<HLA>

Recipient ♀B(+) A11,24 B 35(3501),62 DR2(1501),4(0406)  
Donor ♀B(+) A11.1,24 B 35,52 DR15(1502),4(0405)

<臍帯血細胞数>

保存時 : 10.08×10<sup>7</sup>/kg  
輸注時 : 9.4×10<sup>7</sup>/kg

<前処置>

ATG : 2.5mg/kg/day ×4days (day-5,-4,-3,-2)  
CY : 60mg/kg/day ×2days (day-4,-3)  
TBI : 2.5Gy ×4 (day-2,-1)

<GVHD予防>

FK506 : 0.02mg/kg/day (day-1~)  
MTX : day+1 4mg静注(10.5mg/m<sup>2</sup>)  
day+3,+6,+11 2.5mg静注(6.6mg/m<sup>2</sup>)

### 移植後の経過

<生着>

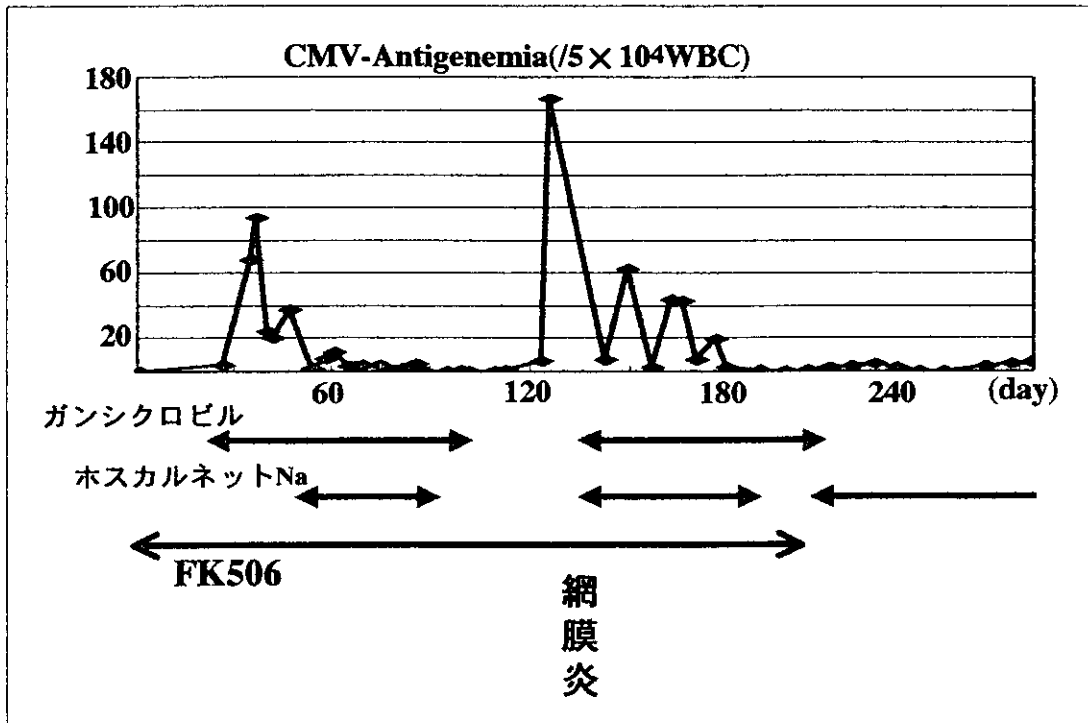
網状赤血球 >10% : day30  
 好中球 >500/ $\mu$ l : day26  
 WBC >1000 / $\mu$ l : day23  
 血小板 >20000/ $\mu$ l : day58  
 赤血球最終輸血日 : day16  
 血小板最終輸血日 : day50

<急性GVHD> 発症せず

<慢性GVHD> 発症せず

<CMV感染症>

移植前にCMV-DNAが陽性になり、day-5~day-2までガンシクロビルを投与した。その後CMV-DNAは消失したが、day27にCMV-Agが陽性になり再びガンシクロビルを開始した。肺炎、胃腸炎、肝炎など特に症状は呈しなかった。



### 眼底所見



### 移植後のリンパ球サブセットの推移

