

Fig. 2. 分離ブタ膵内分泌細胞(pPEC)の糖尿病モデルマウスへの異種移植
A ; 腹腔内移植
B ; 皮下移植 (血管新生誘導処置後)

分担研究報告書

NKT細胞移入による移植免疫制御

分担研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院・教授

患者本人のNKT細胞や樹状細胞をin vitroで増殖・活性化させ、自己の細胞を使った細胞療法によって、これまでの免疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としている。今年度の研究から、つぎの4点の進展があった。(1)ゼノ及びアロのラ氏島の移植実験モデルでは、免疫寛容の誘導は抗CD4抗体の移入、FK506投与、補助受容体(CD80, CD86, LFA-1)に対する抗体の移入などで可能である。その免疫寛容の維持(慢性拒絶の回避)には、NKT細胞の存在が必須であることが、NKT細胞のないノックアウトマウスを用いた研究で分かった。(2)さらに、免疫寛容を効率よく誘導する目的でリンパ球への遺伝子治療を行う場合に、どの遺伝子にターゲットを絞ったらよいかを評価する目的で、T細胞特異的にアデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを樹立した。また、全ての組織の細胞に発現する遺伝子導入マウスを作成した。(3) In vitroでヒトのNKT細胞を増殖させる実験条件、ヒト末梢血から樹状細胞を増殖・活性化させる条件について無血清培地を用いて検討を重ね、さらなる培養条件の改善が図れた。(4) Phase Iに相当する臨床研究を開始した。今後は、NKT細胞由来の抑制性サイトカインや抑制シグナル誘導分子などに焦点を当て、免疫寛容維持になう分子機序の解明を進める。アデノウイルスレセプターの遺伝子導入マウスを用いてin vivoの実験を開始する。ヒトのNKT細胞や樹状細胞の培養で、GMPグレードに沿った大量培養系の樹立を目指す。

A. 研究目的

ラ氏島移植は、最近注目を浴びるようになった新しい糖尿病の治療法である。治療自体の侵襲が小さく、確立されれば貢献度は計り知れない。米国では、これまでに約450例の実績が報告されている。しかし、現在のところ免疫抑制剤だけで移植拒絶を十分コントロールできていないのも、事実である。ラ氏島移植が遅れている一因として、免疫寛容の誘導機序が十分解明されていないことがあげられる。これまでに、細胞療法については、ガン患者でLAK療法などが行われてきたが、移植医療の分野での報告はまだない。

NKT細胞は、NK細胞のマーカーであるNK1.1とT細胞に特異的なT細胞抗原レセプター(TCR)を両方発現している細胞集団で、ヒトでは末梢血リンパ球の約0.1%以下と少なく、これまで解析が遅れていた。このNKT細胞抗原受容体のダイバーシティー

は非常に限られていて、マウスではV α 14、ヒトではV α 24を選択的に使っている。リガンドも通常のTCRでのMHC(主要組織適合遺伝子複合体)分子と蛋白ペプチドではなく、CD1d分子と糖脂質であることが分かっている。NKT細胞は、CD1d分子に提示された糖脂質(α GalCer)を認識すると、活性化されて短時間のうちにIL-4やIFN- γ を産生する。これによって、獲得免疫系のタイプ1(Th1)やタイプ2(Th2)のヘルパーT細胞の分化を調節している。さらに、未知の分子で腫瘍細胞を認識し、強力なパーフォリン依存性の抗腫瘍細胞活性を発揮する。そのほかに、アレルギーの発症制御、自己免疫疾患の発症制御をしていると言われ、NKT細胞が移植免疫系で機能しているかどうか調べる目的で研究が開始された。この研究班では、我々は患者本人のNKT細胞や樹状細胞をin vitroで増殖・活性化させ、自己の細胞を使った細胞療法によって、これまでの免

疫抑制剤だけではコントロールできなかった移植の慢性拒絶をコントロールすることを目的としている。

B. 研究方法

- 1) 移植におけるNKT細胞の存在の必要性に関する実験：まず、ラ氏島移植の実験プロトコールを説明する。まず、7-10週令のC57BL/6マウスやV α 14NKTノックアウトマウスに、streptozotocin (STZ; 200mg/Kg)を静注し、膵臓のラ氏島を破壊する。1-2日後には、血漿中のグルコースレベルが400mg/dlになり、糖尿病がおこる。STZ投与後、5-8日目に、分離したLewisラットのラ氏島500個を経門脈的に注射する。移植が成功すれば、血糖値が正常範囲(100mg/dl以下)に戻る。その後、血糖値が2日以上200mg/dlに上昇した場合に第1日目を拒絶日とする。通常は1週間程度でほとんど拒絶が起こるが、移植後、0, 2, 4日後に50 μ gの抗CD4抗体を注射すると、トランスが誘導され、30日以上の上生マウスの比率は75%以上となる。これは、CD4陽性のT細胞がマウスの生体からいなくなることで、約14日目にNKT細胞が復帰してくることに関係があるようである。また、FK506を移植の次の日から6日間(3mg/kg)投与すると、やはり拒絶の抑制が起こる。第3の系として、磯部らによって確立された、抗LFA-1/ICAM-1やanti-B7-1/B7-2抗体を用いてアロの心臓の移植の系で、免疫寛容を誘導することができる。これらの系を使い、ホストにV α 14NKTノックアウトマウスなどを用いてトランス誘導とNKT細胞の必要性について検討した。
- 2) アデノウイルスを用いた遺伝子治療のための基礎実験：アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスを用いて行った。T細胞をはじめとするリンパ球にはアデノウイルスのレセプターが発現しておらず、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験はリンパ球では非常に難しいのが現状である。しかし、アデノウイルスの遺伝子導入の系は、増殖していない細胞にも感染し遺伝子導入が出来ること、7-9kbといった大きな遺伝子が入ること、数時間で遺伝子発現が起こること、高いタイターのウイルス液が容易に調整できることなどの、大きなメリットがある。そこで、ヒトのアデノウイルスレセプター(CAR)をT細胞に強制発現させたマウスを樹立し、そのマウスのT細胞への感染実験を行った。

- 3) ヒトNKT細胞の分離・増殖の培養至適条件の検討：末梢血中のNKT細胞を抗ヒトV α 24と抗V β 11抗体で染色して検出したNKT細胞を、in vitroで1-2週間培養し、NKT細胞の数をFACSで計算する。
- 4) 自己の末梢血から調整した単核球分画をin vitroでGM-CSFとIL-2で培養し、糖脂質(α GalCer)をパルスした後、人に戻す実験を行い、重症の有害事象(National Cancer Institute-Common Toxicity Criteriaに沿った)が起こるかどうかについて検討した(Phase I相当の実験)。

(倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学の動物実験指針に従った。ヒトの末梢血のNKT細胞の計測も、倫理委員会で承認されたプロトコール(平成11年8月、平成13年2月)に従ってインフォームドコンセントを十分に行った。

C. 研究結果

今回の我々の実験で、抗CD4抗体で誘導した免疫寛容と同様に、FK506で誘導したゼノのラ氏島の移植免疫寛容にもNKT細胞の存在が必須であることが分かった。FK506(1mg/kg)では60日目のアロの膵島のsurvival rateが0%から20%になり、FK506(3mg/kg)では、67%であった。レシピエントにV α 14NKTノックアウトマウスを用いると、FK506で誘導される免疫寛容の成立が非常に困難になる。約2週間ではほとんどのマウスでは拒絶が起こり、25日では全て拒絶された。これらの実験から、NKT細胞の存在がアロのラ氏島の移植免疫寛容誘導にも必須であることが分かった。

マウスのアロの心臓の移植では、抗LFA-1抗体、抗ICAM-1抗体もしくは、抗CD80抗体、抗CD86抗体によって誘導された免疫寛容でのNKT細胞の役割においても、NKT細胞のないノックアウトマウスでは免疫寛容の成立が障害され、抗LFA-1抗体、抗ICAM-1抗体での場合、通常120日後の生着率は100%であるものが、40日では100%拒絶された。このとき、NKT細胞のないノックアウトマウスに、正常のマウスからNKT細胞をあらかじめ移入しておくと、免疫寛容の成立は有意に回復し120日後でも70%程度の生着を見た。抗CD80抗体、抗CD86抗体によって誘導される免疫寛容の系でも通常は80日後に100%の生着があるもの

が、30日後には100%の拒絶がNKT細胞のないノックアウトマウスで観察された。これらの実験から、NKT細胞の存在がアロの心臓の移植免疫寛容誘導にも必須であることが分かった。

また、今年度は、マウスモデルで α GalCer投与によってI型の糖尿病の発症や、病気の進行が抑制されることが分かった。つまり、I型の糖尿病患者ではNKT細胞の機能異常があることが報告されていたが、 α GalCer投与によってNKT細胞を活性化させることでの治療の意義が、確認できた。

アデノウイルスレセプターのトランスジェニックマウスの樹立には、CD2のエンハンサー、Ickのプロモーター、ヒト成長ホルモンエンハンサーの入ったトランスジェニック作成用のカセットに、細胞質内部分の欠損したヒトのCAR遺伝子(CARd1)をいれてトランスジェニックマウスを作成した。このマウスの末梢T細胞では60-80%の効率でアデノウイルスが感染し、組み込んだベクターが発現することが、GFPを組み込んだアデノウイルスベクターでの実験で確かめられたが、現在、IL-10, TGF- β などの遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだ。また、全ての組織でアデノウイルスレセプターを発現する β -actinのpromoterを使ったトランスジェニックマウスを樹立した。現在2ライン生まれたが、精子の低形成があり子孫を残せなかったため、さらなる受精卵へのDNA注入を行っている。このマウスができた後は、倅ラ氏島自体へのベクターの導入を考えている。

また、これまでの我々の実験から、in vitroで α GalCerで刺激し、ヒトのNKT細胞を約2週間で100倍程度に増殖させることが出来るようになった。末梢血から分離した単核球のGM-CSFとIL-2の培養に関しても、IL-4がなくても α GalCerの提示によるNKT細胞の増殖、活性化による細胞障害活性の誘導は大丈夫であることが判明した。

今年度、NKT細胞の細胞治療の自主研究(phase I study相当)をがん患者を対象にして行っている。現在までに5例を行い、特に重篤な有害事象は出ていない。

D. 考察

今回、アロの倅島の移植の系でも、アロの心臓の移植の系でも、免疫寛容の誘導にNKT細胞の存在

が必須であることが明らかになった。このことは、移植免疫における免疫寛容の誘導において、NKT細胞の関与が移植組織に依存せず、かなり一般的なメカニズムを使っていることを示唆している。

T細胞にアデノウイルスを感染させる系については、IL-10やTGF- β などの既知の抑制性のサイトカインを導入する実験は進んでいる。これを使って、まずin vivoの系を樹立する。拒絶反応の現場にT細胞は存在するであろうから、そこで効率的に抑制性のサイトカインを産生して移植片の拒絶を抑制するという戦略の効果を、調べたい。B-actinを基本にしたアデノウイルスレセプターの遺伝子操作マウスについては、不妊との関係を注意しながら多くのラインを作成し、樹立を目指す。将来的には移植拒絶、特に慢性拒絶のコントロールに遺伝子治療を施した患者自身のリンパ球を用いる細胞療法は、非常に有望であると思われる。NKT細胞や樹状細胞の培養で、GMPグレードに沿った大量培養系の樹立を目指し、そのための試薬・機器などを調達している。

トランスが誘導されているマウスのNKT細胞に特異的に発現する遺伝子群をDNAアレイなどで同定しようとしているが、マウスNKT細胞から独自にライブラリーを作成する必要性が浮上し、この点は当初の計画に比べて遅れている。

E. 結論

今年度の研究での達成された点。

- * アロのラ氏島及び心臓移植においてNKT細胞の必要性を明らかにした。
- * I型糖尿病患者でNKT細胞の機能不全があるが、マウスでの実験ではNKT細胞レセプターのリガンド α GalCerによって発症抑制ができることが分かった。
- * α GalCerを用いた自己DC移入臨床研究を、GMP基準に準拠した形で開始した。現在までに5例を行い、特に重篤な有害事象は出ていない。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Seino, K., Muramoto, K., Yanagisawa, K., Oyama, K., Takada, Y., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Bashuda, H., Yagita, H., Okumura, K., and Fukao, K.: Requirement for NKT cells in the induction of allograft

- tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2577-2581, 2001.
2. Kamada, N., Iijima, H., Kimura, M., Harada, M., Shimizu, E., Motohashi, S., Kawano, T., Shinkai, H., Nakayama, T., Sakai, T., Brossay, L., Kronenberg, M., and Taniguchi, M.: Crucial amino acid residues of mouse CD1d for glycolipid ligand presentation to V α 14 NKT cells. *Int. Immunol.* 13: 853-861, 2001.
 3. Kimura, M., Koseki, Y., Yamashita, M., Watanabe, N., Shimizu, C., Katsumoto, T., Kitamura, T., Taniguchi, M., Koseki, H., and Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by *mel-18*, a mammalian polycomb group gene. *Immunity* 15:275-287, 2001.
 4. Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q-S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, J.-M., Leite-de-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J.-F., and Herbelin, A.: Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nature Medicine* 7: 1057-1062, 2001.
 5. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A.: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J. Immunol.* 167:6525-6532, 2001.
 6. Nakayama, T., Kasprovicz, D. J., Yamashita, M., Schubert, L. A., Gillard, G., Kimura, M., Didierlaurent, A., Koseki, H., and Ziegler, S. F.: The generation of mature, single-positive thymocytes *in vitro* is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J. Immunol.* 168:87-94, 2002.
 2. 学会発表
 1. Nakayama, T., Yamashita, M.: TCR-induced calcineurin activation regulates Th2 cell development by modifying the IL-4 receptor signaling complex. FASEB meeting, Orlando, March 31-April 4, 2001.
 2. Kimura, M., Taniguchi, M., Nakayama, T.: Regulation of Th2 cell differentiation by a mechanism involving *mel-18*, a mammalian polycomb group gene. FASEB meeting, Orlando, March 31-April 4, 2001.
 3. Harada, M., Kamada, N., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M.: Regulation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by a glycolipid ligand/CD1d complex on target cells. FASEB meeting, Orlando, March 31-April 4, 2001.
 4. 本橋新一郎、中山俊憲、真柄久美子、谷口克、藤澤武彦 原発性肺癌患者末梢血中及び肺組織中 NKT細胞数と機能 基盤的がん免疫研究会 三重 7.18-19、2001.
 5. 本橋新一郎、中山俊憲、真柄久美子、谷口克、藤澤武彦 原発性肺癌患者末梢血中及び肺組織中 NKT細胞数と機能 日本がん学会 横浜 9.26-28、2001.
 6. 中山俊憲、山下政克 T細胞活性化シグナルによるTh2細胞分化制御 第51回日本アレルギー学会総会シンポジウム 福岡 10.29-31、2001.
 7. 清水千織、山下政克、鎌田徹、谷口克、中山俊憲 Th1/Th2細胞分化における加齢の影響 第31回日本免疫学会総会 大阪 12.11-13、2001.
 8. 鎌田徹、山下政克、清水千織、柴田陽一、村田薫、谷口克、中山俊憲 SHP-1のTh2依存性I型アレルギー反応における関与 第31回日本免疫学会総会 大阪 12.11-13、2001.
 9. 木村元子、勝本拓夫、渡辺直熙、谷口克、古関明彦、中山俊憲 哺乳類ポリコーム群遺伝子 *mel-18*によるTh2細胞への分化の調節 第31回日本免疫学会総会 大阪 12.11-13、2001.

10. 山下政克、鶴飼磨貴、菅谷薫子、中山俊憲
Erk/MAPKカスケードによるTh2細胞分化と
IL-4、IL-13遺伝子座ヒストンアセチル化の制御
第31回日本免疫学会総会 大阪 12.11-13、
2001.
11. 原田通成、伊藤俊広、小池順造、三國修、中山
俊憲、谷口克 CD1d分子を介したV α 14NKT細胞
の傷害抑制に関わる120kDタンパク質の解析
第31回日本免疫学会総会 大阪 12.11-13、
2001.
12. 小林誠一郎、金子佳賢、中山俊憲、谷口克 非
寛解サルコイドーシス患者におけるV α 24NKT細胞
の減少およびIFN- γ の産生抑制 第31回日本免
疫学会総会 大阪 12.11-13、2001.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

分担研究報告書

「安全な移植技術の確立」に関する研究

分担研究者 山岡 義生 京都大学消化器外科・教授

研究要旨

マウスの胎仔肝をコラゲナーゼ二段階還流法にて細胞を単離し、10ng/ml HGF 存在下で浮遊培養させるとホモフィリックな細胞接着因子の作用により細胞集塊を形成する。この細胞塊は、核が大きく細胞内顆粒に富み、cuboidal な形態をした細胞で構成され、 α -fetoprotein、Cytokeratin 19、Albumin 陽性、VE-cadherin, CD34, desmin, CD45 陰性であったことから肝前駆細胞と考えられた。さらに、この細胞は 10% FCS、10ng/ml dHGF、600ng/ml insulin を添加した培地で旺盛な増殖能を示し、外来遺伝子の導入及び細胞塊の形での肝への移植・生着が可能であった。将来的には、この手法をヒト成体肝に応用することで細胞移植治療に利用出来る可能性が示唆された。

A. 研究目的

終末期肝疾患に対して現在確立された治療法は肝移植のみであるが、移植先進国である欧米や脳死肝移植が開始されたばかりの本邦でも肝移植ドナー不足は大きな問題であり、これらの問題を克服する方法として正常機能を持つヒト肝細胞供給源の開発とその臨床応用が期待されている。しかし、成熟肝細胞そのものは試験管内で増殖・長期培養することは困難であるため、それに代わる細胞源の一つとして増殖・分化能を有する肝幹細胞の同定・分離法に関する研究が盛んに行われているが、肝幹細胞及び肝前駆細胞の同定・分離法は未だ確立されていない。そこで我々は、まず肝前駆細胞が豊富に存在するマウス胎仔肝を用いて肝前駆細胞の同定・分離法を確立することを目的とした。さらに肝前駆細胞への遺伝子導入や肝前駆細胞集塊の移植実験により、細胞移植への応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) マウス胎仔肝からの肝前駆細胞分離実験

・妊娠 13.5 日、Balb/c マウスの胎仔から胎仔肝を採取した後、0.05%コラゲナーゼの二段階還流法を用いて細胞を単離する。成熟肝細胞を除去した後、10ng/ml HGF 存在下で浮遊培養させることで形成される細胞集塊のみを採取し、高率に肝前駆細胞を分離する。

・内胚葉系の characterization には、 α -fetoprotein (AFP)、Cytokeratin 19 (CK19)、Albumin の蛋白発現を細胞免疫染色にて、他 lineage 細胞の除外の検討には VE-cadherin, CD34, desmin, CD45 の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討する。

・肝前駆細胞の増殖能を ^3H -Thymidine 取り込み能で検討する。

(2) 肝前駆細胞への遺伝子導入及び in vivo 移植実験

・マーカーとして DsRed を発現するプラスミド (pCAGmitoDsRed) を Lipofection

法にて遺伝子導入し、その導入効率を検討する。

・70%部分肝切除した成体マウスの残存肝に、pCAGmitoDsRed を遺伝子導入した肝前駆細胞からなる細胞塊を移植する。肝再生が終わる10日目にサンプルを採取し、その生着及びアルブミンの発現を蛍光組織免疫染色法にて検討する。

C. 研究結果

(1) マウス胎仔肝からの肝前駆細胞分離実験

妊娠13.5日、Balb/cマウスの胎仔肝から0.05%コラゲナーゼの二段階還流法にて単離された細胞は、10ng/ml HGF存在下で浮遊培養させるとホモフィリックな細胞接着因子の作用により細胞集塊を形成し、重力沈降により容易に細胞塊を分離できた。この細胞塊を接着培養すると核の大きな、細胞内顆粒に富んだcuboidalな形態の細胞からなるコロニーが形成され、これらの特徴は胎仔肝前駆細胞の特徴に一致していた(図1)。細胞免疫染色で蛋白発現を検討すると、この細胞のほとんどが未分化内胚葉マーカーAFP陽性であり、培養を続けるとコロニーの中心部にalbumin陽性細胞、周辺部にCK19陽性細胞が出現した(図2)。さらにコロニー細胞のmRNA発現をRT-PCRで検討したところ、AFP、albumin及びCK19の発現は認められたが、間質細胞マーカーのfetal liver kinase-1 (flk-1)、血管細胞マーカーのVE-cadherinとCD34、星細胞マーカーのdesmin及び血球系マーカーのCD45等の発現は認めず、以上から胎仔肝前駆細胞が効率的に採取できることが検証された。

また、この細胞を10% FCS、10ng/ml dHGF、600ng/ml insulinを添加した培地

で培養すると、無添加時と比べて約50倍の³H-Thymidine取り込み能の増加を認めた。

(2) 肝前駆細胞への遺伝子導入及びin vivo移植実験

(1)で確立された手法で得られた胎仔肝前駆細胞に外来遺伝子(pCAGmitoDsRed)をLipofection法にて遺伝子導入すると、³H-Thymidine取り込み能の結果から類推された様に、10% FCS、10ng/ml dHGF、600ng/ml insulinを添加した培地では有意に遺伝子導入効率が増した。また、遺伝子導入時期に関する検討では、胎仔肝より分離した細胞を浮遊培養にて細胞集塊形成させる段階での遺伝子導入が最も効率的であることも明らかになった。

さらに、pCAGmitoDsRedマーキングされた胎仔肝前駆細胞を70%部分肝切除した成体マウスの残存肝に細胞塊の形で移植すると、術後10日目にも再生肝内に生着・残存していることが確認され、マーカー遺伝子DsRedの発現も認められた。

D. 考察

肝に存在する幹細胞および前駆細胞を同定・分離する試みが近年盛んに行われており、Flow cytometry解析などから肝幹細胞に特異的な細胞表面抗原等の情報が得られつつある。一方でFlow cytometryによる細胞分離では細胞のviabilityが低下するなどの問題点があり、これらを克服する分離方法の確立が求められている。今回我々が行った実験では、胎仔肝前駆細胞同士をホモフィリックな細胞接着因子の作用により細胞集塊形成させることで、胎仔肝前駆細胞に混入する非実質細胞を容易に除外することができ、胎

仔肝前駆細胞を効率的に viability 良く分離可能であった。また、これと同様の原理を成体マウス肝に応用することにより、成体肝からも肝前駆細胞が可能であることも確認している。今後、この手法をヒトに応用することにより、ヒトにおいても肝前駆細胞が入手できる可能が示唆された。

さらに、この肝前駆細胞には高効率に外来遺伝子を導入することが可能であることや肝切除後の再生肝には容易にこれを移植・生着させ得ることから、肝臓をターゲットとした遺伝子ベクターや細胞治療の細胞源としてこの肝前駆細胞を利用できる可能性が示唆された。

将来的には肝前駆細胞から成熟肝細胞へと分化誘導することが可能となれば、成体ヒト由来の肝前駆細胞や成熟肝細胞を用いての細胞移植治療が臨床的にも可能となると考えられる。

E. 結論

・浮遊培養を用いて細胞集塊を形成させることで、マウス胎仔肝から肝前駆細胞を効率的に分離することが可能となった。

・分離された胎仔肝前駆細胞に高効率に外来遺伝子を導入し、これを成体肝臓に移植・生着させることが可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Alpha fetoprotein positive immature endodermal cells from adult mouse liver. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. (2002 in press)
2. Yasuchika K, Hirose T, Yamaoka Y, Fujii H, Oe S, Azuma H, Fujikawa T. Establishment of efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells. (2002 in press).
3. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. (2002 in press).
4. Oe S, Hirose T, Fujii H, Yasuchika K, Nishio T, Iimuro Y, Morimoto T, Nagao M, Yamaoka Y. Continuous intravenous infusion of deleted form of hepatocyte growth factor attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 34:832-9, 2001.
5. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療の実際とこれからの展望. 実験医学 (2002 印刷中)
6. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療. *Surgery Frontier* (2002 印刷中)
8. 廣瀬哲朗, 山岡義生. 再生医療はどこまで来たか. 外科治療・特集「再生医療時代の幕開けを知る」86(1):1-8 2002.
9. 安近健太郎, 東久弥, 藤川貴久, 廣瀬哲朗. 肝幹細胞の分化. *最新医学* 57(1):94-101, 2001.
10. 安近健太郎, 廣瀬哲朗, 末盛博文,

中辻憲夫. ES 細胞と再生医療. 今日の移植 14(5):542-548,2001.

11. 廣瀬哲朗 安近健太郎. 肝幹細胞. 肝胆膵 42(2):179-187,2001.

(2) 学会発表

1. 安近健太郎、廣瀬哲朗、藤井英明、大江正士郎、藤川貴久、東久弥、内藤雅人、馬場慎司、北方敏敬、山岡義生. 「マウス胎仔肝前駆細胞の分離精製と応用に関する基礎的検討」第102回日本外科学会総会（京都）. 日外会誌 103 巻、臨時増刊号. (2002)
 2. 東久弥、廣瀬哲朗、藤井英明、大江正士郎、安近健太郎、藤川貴久、山岡義生. 「成体マウス正常肝からの AFP 陽性未分化内胚葉細胞の分離」第102回日本外科学会総会（京都）. 日外会誌 103 巻、臨時増刊号. (2002)
 3. 藤川貴久、廣瀬哲朗、東久弥、安近健太郎、藤井英明、大江正士郎、山岡義生. 「Fluorescence-activated cell sorting(FACS)を用いた GFP トランスジェニックマウスからの成体肝幹細胞の分離と精製」第102回日本外科学会総会（京都）. 日外会誌 103 巻、臨時増刊号. (2002)
 4. 藤井英明、廣瀬哲朗、大江正士郎、安近健太郎、東久弥、藤川貴久、山岡義生. 「マウス部分肝切除後再生肝への骨髄由来細胞 commitment の検討」第56回日本消化器外科学会総会（秋田）(2001)
 5. Oe Shoshiro, Tetsuro Hirose, Hisaya Azuma, Takahisa Fujikawa, Kentaro Yasuchika, Hideaki Fuji, Yoshio Yamaoka. "Expansion of putative hepatic stem cells during dHGF treatment of thioacetamide-induced liver fibrosis in rats." 米国消化器病週間、肝臓病学会 2001 年 5 月 20 ~ 23 日 米国アトランタ市
 6. Hirose T, Kentaro Yasuchika, Takahisa Fujikawa, Hideaki Fuji, Oe Shoshiro, Hisaya Azuma, Iwao Ikai, Yoshio Yamaoka. "Blastosphere A new culture method for human fetal hepatic progenitor cells." 米国消化器病週間、肝臓病学会 2001 年 5 月 20 ~ 23 日 米国アトランタ市
 7. 安近健太郎 「マウス胎児肝前駆細胞の分離精製と細胞遺伝子治療への応用に関する基礎的検討」第56回日本消化器外科学会総会（秋田）
 8. 大江正士郎 「dHGFによるthioacetamide肝硬変治療に伴うstem-like cellの進展」第56回日本消化器外科学会総会（秋田）
 9. 廣瀬哲朗、安近健太郎、藤井英明、大江正士郎、藤川貴久、東久弥、猪飼伊和夫、山岡義生. 「ヒト胎児肝前駆細胞の新規分離精製及び長期培養法の確立」第4回日本組織工学会 2001 年 7 月 6、7 日(川崎)
 10. 安近健太郎 「胎児肝前駆細胞の分離精製と細胞遺伝子治療への応用に関する基礎的検討」第37回日本移植学会 2001 年 12 月 15、16 日（東京）
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

図 1

肝前駆細胞集塊 (浮遊培養)

肝前駆細胞コロニー



図 2

細胞免疫染色 赤 : AFP

赤 : CK19 緑 : アルブミン

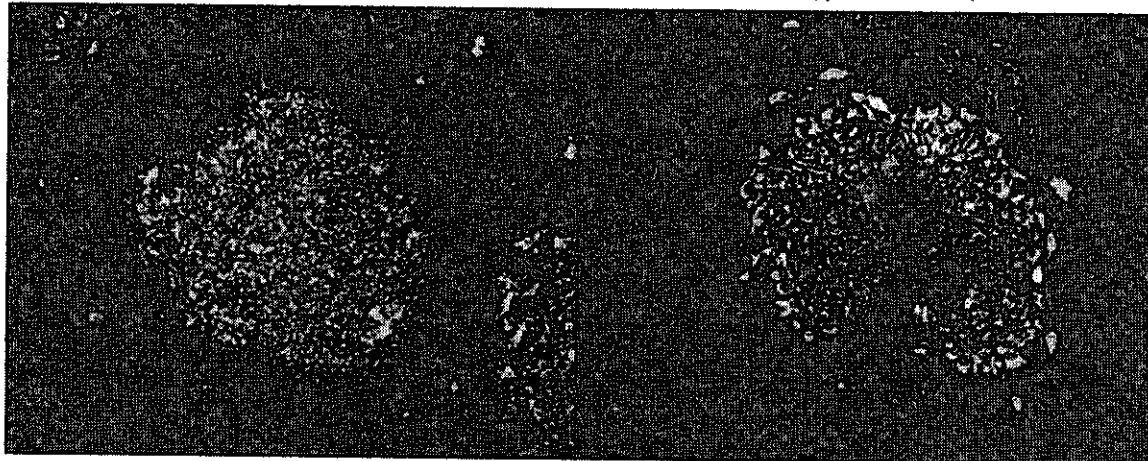
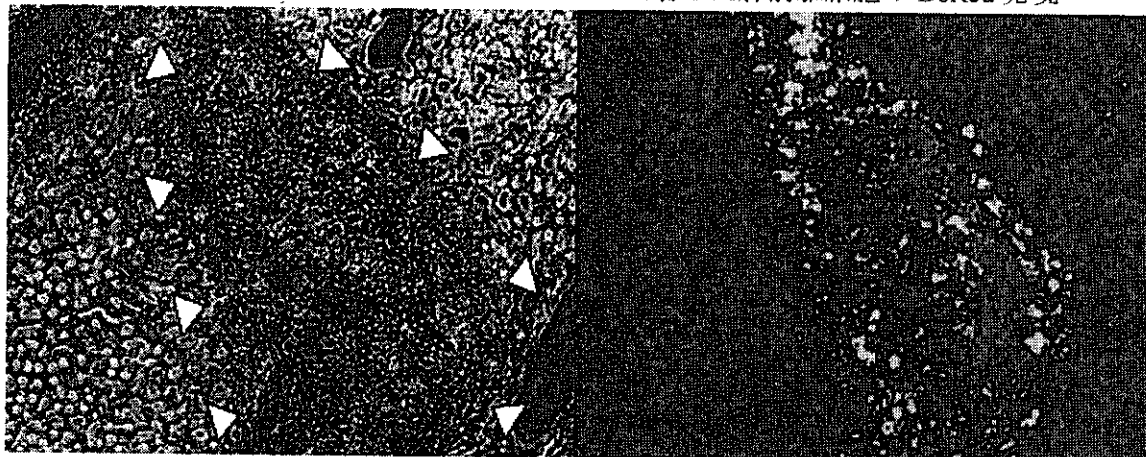


図 3

移植した肝前駆細胞

生着した肝前駆細胞の DsRed 発現



分担研究報告書

再生膵β細胞の安全な移植技術の確立に関する研究

分担研究者 清野 裕 京都大学医学研究科教授

研究要旨

インスリン依存状態の糖尿病の根治療法として、膵β細胞移植が注目されている。本研究において、膵ランゲルハンス島の移植により内在性の膵β細胞機能もある程度回復することを示した。

A. 研究目的

糖尿病は過去40年間に70倍に激増し、690万に達した。糖尿病の治療として、インスリン注射などを用いた厳格な血糖コントロールが行われているが、このような対症療法では血糖の制御を行うことは不可能で、かつ重篤な低血糖の増加やQOLの低下を招くため、根本的な治療法の確立が望まれている。膵β細胞が再生療法は、糖尿病の根治療法として期待されている。膵β細胞の機能は、高血糖に長期に曝されたことによる糖毒性によって低下している。したがって、再生膵β細胞の移植により、内在性の膵β細胞の機能も回復することが期待できる。そこで、膵島移植によって血糖を正常化することにより、内在性の膵β細胞の機能が回復するか否か糖尿病モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

(1) 1型糖尿病モデル動物

雄性 Wistar ラット (体重 250g) に、

ストレプトゾトシン (体重 1kg あたり 35mg) を尾静脈から注射することによって、糖尿病モデル動物 (STZ ラット) を作製した。

(2) 膵ランゲルハンス島の単離と移植
Wistar ラットよりコラギナーゼ法で膵ランゲルハンス島を単離し、約 250 個の膵ランゲルハンス島を STZ ラットの腎被膜下に移植した。

(3) 内在性膵ランゲルハンス島の評価
膵ランゲルハンス島移植 29 日後に、膵組織の免疫染色を用いた評価、インスリン含量、膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌能の評価等を施行した。

(倫理面への配慮)

動物の実験に関しては、「京都大学動物実験に関する指針(昭和63年総長裁定)」に従い、動物実験に係る京都大学医学研究科内諸規則を厳守して実施した。

C. 研究成果

STZ ラットの随時血糖は、407mg/dl で

あったが、膵ランゲルハンス島移植によって143mg/dlまで改善した。抗インスリン抗体を用いた膵β細胞量、膵ランゲルハンス島のインスリン含量は、著明に改善を示した。また、STZラットの膵ランゲルハンス島においては、グルコースに対するインスリン分泌は著明に低下しているが(グルコース16.7mMと3.3mMに対するインスリン分泌量の比、2.8)、移植を受けたSTZラットでは、分泌量の比が7.6と対照ラットと同程度まで改善した。

D. 考察

再生膵β細胞の移植は、インスリン依存状態の糖尿病患者に対する現在考えられる唯一の根治療法である。本研究において、膵ランゲルハンス島を移植することによって耐糖能を改善すれば、残存する内在性の膵β細胞を質的・量的に改善することを明らかにできた。このことは、移植時にいかに血糖をコントロールするかが、移植の良否や移植細胞数を減らす上で重要であると考えられた。

E. 結論

膵ランゲルハンス島を糖尿病モデル動物に移植することによって耐糖能を改善すれば、残存する内在性の膵β細胞を質的・量的に改善することを明らかにできた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, Takeda T, Mukai E, Fujita J, Yamada Y, Seino Y. Recovery of function and mass of endogenous beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. **Biochem Biophys Res Commun** 287(1):104-9, 2001.

2. 学会発表

- (1)井原 裕、山田祐一郎、清野 裕、ブドウ糖毒性と膵β細胞酸化ストレス障害、第16回日本糖尿病合併症学会 平成13年10月19日～20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

安全な移植技術の確立に関する研究

分担研究者 宮島 篤 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

研究要旨 我々が見出したオンコスタチンMによるマウス胎仔肝細胞 *in vitro* 分化系を利用して、分化マーカー遺伝子の発現および肝細胞の構造的な成熟化について詳細に調べた。その結果、アミノ酸代謝酵素の一つである TAT のプロモーター領域が明らかとなった。また、成熟した肝細胞構造を形成するためには E-カドヘリンの細胞間接着面への局在が重要であること、およびその局在化には K-Ras のシグナルが必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は細胞治療、遺伝子治療、さらに人工肝臓の開発の鍵となる肝臓の幹細胞の同定と分離、機能評価、および培養システムを構築することにより、肝臓における再生治療の向上を目指すものである。安全な細胞移植を行なうためには、組織適合性の問題をクリアする必要がある、いずれは核移植したヒト ES 細胞から肝細胞へと分化誘導することが有効な手段と考えられる。そのためには、ES 細胞から効率的に肝細胞を作り出す最適条件を検討する必要がある。我々はマウス ES 細胞を材料として効率的な肝細胞分化系の構築を目指している。これまで、ES 細胞から肝細胞への分化誘導を試みた実験の多くは、胎生期に発現する α フェトプロテインやアルブミンの

プロモーターをレポーターとして利用しているものがほとんどであり、それよりも分化段階の進んだマーカー遺伝子のプロモーター解析はほとんどなされていない。そのため、アルブミンは発現するが、さらに機能細胞へと分化するのかが不明であったり、更なる分化マーカーの発現の判定が必要であったりした。そこで、アルブミンより分化段階の進んだ肝分化マーカーである TAT のプロモーター解析を行ない、より成熟肝細胞に近いレポーター系の構築を目指している。

また、肝臓では、肝細胞は極性をもって配置されており、類洞、Disse、毛細胆管などの構造を形成している。そのため、人工肝臓に充填する細胞は、解毒や栄養代謝のための酵素群の発現、グリコ

ーゲンの蓄積といった機能面はもちろんのこと、各細胞の形態や細胞群が形成する構造においても成熟肝臓に近いものであることが望まれる。そこで、我々が確立したオンコスタチンM(OSM)によるマウス胎仔肝細胞分化系において、細胞の形態および構造の成熟化について検証した。また、どのようなシグナルが肝細胞の形態的な成熟化に関与しているのかを検討した。

B. 研究方法

TAT のプロモーター解析を行なうために、まず、マウスゲノムライブラリーより TAT 遺伝子のプロモーター領域(約 3.0kb)を単離し、Luciferase 遺伝子の5'上流に連結したレポーターを作成した。それを、胎生肝細胞に導入した後、OSM による分化誘導を行ない、転写活性を解析した。さらに、様々な長さの deletion mutant を作成し、OSM による TAT の転写活性化領域の特定を行った。

また、OSM により *in vitro* で分化誘導した肝細胞の構造を電子顕微鏡および免疫染色法により調べた。また、これらの構造形成にはどのような情報伝達系が重要であるのかを調べるために、ミュータントマウスを用いて検証した。

(倫理面への配慮)

これらの実験は、すべてマウスを用いたものであり、麻酔および頸椎脱臼により苦痛を伴わない形で遂行された。

C. 研究結果

TAT 遺伝子の転写開始点より 0.8kb 上流を含む領域に OSM 応答性の領域が存在することが分かった。さらに、-200 から-300 にある約 100 塩基対に OSM 刺激に応答する配列が存在することが分かり、-230 から-270 の間に STAT3 と C/EBP α response element に類似した領域が並んで存在することが明らかになった。この2つの element のうち、いずれかに変異を入れた場合には OSM 刺激後の転写活性が著しく損なわれたことから、この領域を ORE(OSM Responsive Element)と決定した。

また、OSM で分化誘導した肝細胞を電子顕微鏡で観察した結果、細胞-細胞間で非常に明瞭な結合領域が観察され、細胞間接着に携わる接着斑(desmosome)様の構造体も認められた。また、上部の細胞膜には無数の微絨毛が観察され、極性を有する上皮細胞の形態をとっていた。さらに、細胞質にはグリコーゲンや脂質の顆粒が認められた。これらの特徴は成熟した肝細胞と非常によく合致するものであり、OSM が機能面だけでなく、

形態的にも肝細胞を成熟化していることが明らかとなった。また、細胞接着分子の一つである E-カドヘリンを免疫染色法にて調べた結果、OSM が不在状態では拡散しているのに対し、OSM 存在下では細胞膜に局在化していることが明らかとなった。このような細胞接着分子の細胞間での局在化が成熟型肝細胞の細胞骨格形成に寄与しているものと考えられた。OSM の細胞内情報伝達系としては、主に Ras と STAT3 が知られている。そこで、E-カドヘリンの局在化にはどのシグナル伝達系が重要なのかを調べるために、ドミナント・ネガティブ型の Ras もしくは STAT3 を細胞内で強制発現させた。その結果、STAT3 のシグナルを抑えたものでは局在化に変化は見られなかったが、Ras を抑えたものでは顕著に局在化が阻害されていた。Ras には H, K, N の 3 種類の Ras が存在するが、それぞれのノックアウトマウス由来の初代胎仔肝細胞培養を OSM 存在下で行なった結果、K-Ras が E-カドヘリンの局在化に必須であることが明らかとなった。これまで、胎仔肝細胞の機能的な成熟には STAT3 が重要であると考えられてきたが、成体肝臓内での肝細胞の形態や構造形成には Ras シグナルが重要であることが示唆された。

D. 考察

TAT のプロモーター解析については、OSM に応答して転写を活性化する領域の特定ができた。今後はこの領域に GFP や beta-galactosidase などのレポーター遺伝子を導入して、実際に発生過程の肝臓で機能しているかどうかを調べる必要がある。その上で、ES 細胞に導入し効率の良い肝細胞への分化条件の評価、および細胞分離に利用していく。また、胎仔肝を用いた OSM の肝細胞分化系においては、肝細胞は機能面のみならず、形態的、構造的にも成熟化していることが明らかとなった。今後は三次元培養においてもそれらの構造が保たれ、成体肝臓に近い形態をとるのかどうかを検証していく必要がある。

E. 結論

我々はマウス胎仔肝細胞を材料として、*in vitro* での OSM による肝細胞分化誘導系を確立してきた。そして、OSM による作用は酵素などの機能分子の遺伝子発現誘導のみならず、成熟肝でみられるような肝細胞の形態や構造形成にも関与していることを明らかにした。さらに、E-カドヘリンの局在化については、K-Ras のシグナル系が必須であることを明らかにした。また、ES 細胞から肝細胞への *in vitro* 分化系を確立する上で、

肝細胞分化を段階的にモニターできるシステムを構築することは有用である。我々は後期分化マーカーの一つである TAT のプロモーターの解析を行ない、分化誘導に应答する領域を特定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K-Ras mediates cytokine-induced formation of adherens junctions during liver development.

T.Matsui, T.Kinoshita, Y.Morikawa, K.Tohya, M.Katsuki, Y.Ito, A.Kamiya, and A.Miyajima
EMBO J., **21**, 1021-1030, 2002

2) Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways.

A.Kamiya, T.Kinoshita and A.Miyajima
FEBS Letters, **492**, 90-94, 2001

2. 学会発表

1) 小島伸彦, 木下大成, 宮島 篤
(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M および細胞高密度培養による C/EBP α の翻訳調節

第 37 回日本肝臓学会総会 (01.5.17~5.18 パシフィコ横浜)

2) 松井貴輝 1, 木下大成 1, 沢井昭司 2, 勝木元也 2, 宮島 篤 1

1 東京大学分子細胞生物学研究所, 2 東京大学医科学研究所

K-Ras による E-カドヘリン n を介した接着装置の形成制御

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30 笹川記念会館)

3) 莊敦堯, 松井貴輝, 木下大成, 宮島 篤 (東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M による tyrosine amino transferase 遺伝子の発現制御

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30 笹川記念会館)

4) 野中秀紀, 松井貴輝, 木下大成, 宮島 篤

(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M 類洞内皮細胞への作用

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30 笹川記念会館)

5) 小島伸彦 1, 木下大成 1, 塩尻信義 2, 宮島 篤 1

1 東京大学分子細胞生物学研究所, 2 静岡大学理学部生物地球環境科学科

オンコスタチン M による C/EBP α の転写活性調節

第 8 回肝細胞研究会 (01.6.29~6.30 笹川記念会館)

6) Duen-yau Chuang, Takaaki Matui, Taisei Kinoshita and Atsushi Miyajima
IMCB, The University of Tokyo

Regulation of Tyrosine Amino Transferase Expression by Oncostatin M in Fetal Liver

4th International Conference of the Asia-Pacific International Molecular Biology Network (01.11.03~11.04 国立台湾大学 台北、台湾)

7) 松井貴輝 1, 木下大成 1, 森川吉博 2, 勝木元也 3, 宮島 篤 1

1 東大・分生研, 2 和歌山県医大, 3 基生研

肝発生過程における細胞間接着の制御機構

第 24 回日本分子生物学会年会 (01.12.09-12.12 パシフィコ横浜)

8) 莊敦堯, 松井貴輝, 木下大成, 宮島 篤

(東京大学分子細胞生物学研究所)

オンコスタチン M による tyrosine amino transferase 遺伝子の発現制御

第 24 回日本分子生物学会年会 (01.12.09-12.12 パシフィコ横浜)

第 24 回日本分子生物学会年会 (01.12.09-12.12 パシフィコ横浜)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

平成13年度(2002年3月)
厚生科学研究費補助金
「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」

発行

事務局 国立佐倉病院
〒285-8765
千葉県佐倉市江原台2-36-2
Tel 043-486-1151(代)

印刷所 株式会社文友堂印刷
〒260-0001
千葉県千葉市中央区都町998
Tel 043-231-7301
