
厚生科学研究費補助金
高度先端医療研究事業
体外増幅臍帯血幹細胞を利用した
成分輸血製剤生産の検討
平成13年度 総括・分担研究報告書

ANNUAL REPORT OF RESEARCH PROJECT FOR DEVELOPMENT OF CELL
COMPONENT PREPARATION FROM EX VIVO EXPANDED UMBILICAL CORD
BLOOD STEM AND PROGENITOR CELLS

RESEARCH ON ADVANCED MEDICAL TECHNOLOGY
THE MINISTRY OF HEALTH, WELFARE AND LABOR, JAPAN

主任研究者 加藤 俊一

平成14年(2002年)4月

はじめに

この研究報告書は、厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）「体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討」の平成13年度の研究成果をまとめたものである。

年々高度化する先端医療の中でも難治性血液疾患に対する造血幹細胞移植などの治療法の進歩はめざましいものがある。そのような先端医療を支える輸血療法や細胞治療はますます多様化し、治療目的毎に血液細胞を分化誘導しつつ用いる必要性がでてきた。

本研究においては、臍帯血幹細胞から高度機能を有する血液細胞を体外で増幅する技術を開発することを主目的とするものである。さらに体外増幅された血液細胞を目的用途毎に臨床的に応用するための基礎的ならびに前臨床的な検討も開始している。

東海大学においては1994年に国内初の同胞間臍帯血移植を成功させて以来、学内に大型研究プロジェクトを組織して臍帯血幹細胞の基礎的研究と臍帯血移植や臍帯血バンクに関する臨床的あるいは社会的な研究に取り組んできた。1999年には臍帯血幹細胞の大量体外増幅法の開発に成功し、その成果をさらに発展させるべく今回の研究が開始されたものである。

体外増幅方法として用いているマウスストローマ細胞（HESS-5）との隔膜共培養システムは、我々がJT研究所の辻孝博士らと共同開発した方法である。このHESS-5は異種動物由来であるがために、ヒトの造血幹細胞移植を分化させることなく大量に増幅することを可能にしていると考えている。今回の研究では、このシステムにより特定機能をもった血液細胞に分化誘導させつつ大量培養する方法の開発に取り組んでいる。

一方、最近BSEなど異種動物由来の病原微生物による新たな医原病が問題となっている。本研究においては、現在検査しうるすべてのマウス由来病原微生物について検査を行い、いずれも陰性であるとの結果をえている。しかし、現在同定されていないような未知の病原微生物を含めて、異種動物由来の細胞を用いることのリスクは存在するので、そのような異種動物由来の細胞を用いないような培養方法についても併せて研究を進める予定である。

最後に、本研究の発足と活動についてご指導とご支援を賜っている厚生労働省医薬局血液対策課の方々に感謝の意を表したい。

目 次

I. 総括研究報告

体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討

加藤俊一 7

II. 研究組織 11

III. 分担研究報告

1. サイトメガロウイルス特異的細胞障害性リンパ球の臍帯血からの誘導法の研究

加藤俊一 15

2. 体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討

安藤 潔 18

3. 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

堀田知光 20

4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

萩原政夫 22

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

I . 総括研究報告

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業
総括研究報告書

体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討

主任研究者 加藤俊一 東海大学総合医学研究所・教授

研究要旨

臍帯血幹細胞をマウス stroma 細胞である HESS-5 と共培養することにより体外で増幅し、増幅した幹細胞から成熟血球細胞に分化誘導する方法の開発に成功した。分化誘導された血球の機能の詳細な検討が進行中であり、また今後の臨床応用にむけて技術的な検討を進めている。

A. 研究目的

最近造血幹細胞移植の移植細胞源として注目されている臍帯血は、従来は医療廃棄物として破棄されていたものである。この臍帯血から体外で造血細胞や血液細胞を分化増殖させることができるならば、新たな輸血製剤の安定的な供給が可能となるのが期待できる。

我々は成人に対する造血幹細胞移植のための細胞供給源として臍帯血を利用するために幹細胞の体外増幅の研究を行い、マウス骨髄ストローマ細胞株を feeder layer としたユニークな膜分離型共培養系を開発した。この培養系では未分化前駆細胞である CD34+ CD38-細胞を5日間で約100倍に増幅することが可能である。これらの造血系の再生医学研究の成果を駆使して増幅幹細胞より赤血球、血小板、Bリンパ球などを分化させ輸血製剤（赤血球、血小板、免疫グロブリン製剤）を作成することが可能と考えられる。

本研究ではこの培養システムを輸血製剤の作成のために応用することを目的と

する。平成13年度は増幅した造血前駆・幹細胞を赤血球、血小板、Bリンパ球、樹状細胞へ分化させるシステムについての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

本年度は以下の項目について検討した。
1. サイトメガロウイルス (CMV) 特異的細胞傷害性リンパ球 (CTL) の臍帯血からの誘導法の (分担研究: 加藤俊一)

- 1) CMV 特異的芽球幼若化反応
- 2) 樹状細胞の誘導
- 3) CMV 特異的CTLの誘導

2. 体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討 (分担研究: 安藤潔)

- 1) 造血幹細胞の増幅
 - 2) 造血幹細胞からB細胞への分化誘導
3. 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究 (分担研究: 堀田知光)

- 1) 臍帯血幹細胞の体外増幅効率の検討
 - 2) 赤血球、血小板への分化誘導の検討
4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹

状細胞増幅系の開発 (分担研究: 萩原政夫)

- 1) 臍帯血 CD34 陽性細胞から DC 細胞の誘導法の検討
- 2) CD34 陽性細胞からの NK 細胞の誘導と DC による活性化の検討
- 3) NKT 細胞の増幅と DC による活性化の検討

C. 研究結果

1. CMV 特異的 CTL の誘導法の研究

臍帯血から誘導された樹状細胞 (DC) は成人単球由来 DC と比べて活性が低下していた。また、成人末梢血からの CMV 特異的 CTL の誘導は全例で可能であったが、臍帯血からは一部においてのみ可能であった。

2. 体外増幅臍帯血幹細胞からの B 細胞の誘導の検討

臍帯血幹細胞を体外で増幅した後に成熟 B 細胞に誘導することに成功した。成熟 B 細胞は抗原特異的に抗体を産生することが確認された。

3. 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

臍帯血幹細胞を体外で 100 倍程度に増幅することができ、増幅した幹細胞を種々のサイトカインとの培養により赤血球や血小板への分化誘導を行うことが可能であった。

4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

臍帯血幹細胞から DC 細胞を誘導することが可能であり、誘導された DC 細胞は NK 細胞や NKT 細胞を活性化することが確認された。

D. 考案

本年度の研究成果としては、臍帯血幹細胞を体外で増幅し、増幅した幹細胞から成熟血球細胞を誘導する方法が開発されたことがあげられる。今後の研究の進展により、本研究の目的が達成されるなら、臍帯血は感染に暴露されていないため感染症などの危険を伴わない安全な輸血製剤の安定供給、感染症などの輸血合併症発生による医療コストの軽減、高齢者社会における輸血製剤の需要と供給のアンバランスの解消、臍帯血バンクにより確立した臍帯血供給のインフラを保存目標達成後も有効利用、新たな医療技術の開発による関連産業の生成発展など広範な成果が期待される。

E. 結論

1. CMV 特異的 CTL の誘導法の研究

成人末梢血と比較して臍帯血からは抗原特異的 CTL の誘導効率は低いため、今後 DC による誘導法の改良などが必要と考えられた。

2. 体外増幅臍帯血幹細胞から B 細胞の誘導の検討

臍帯血幹細胞を体外で増幅し、成熟 B 細胞に分化誘導することが可能となった。

3. 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

臍帯血幹細胞から赤血球や血小板へ分化させ、増殖させる技術が開発された。

4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

臍帯血幹細胞から DC 細胞を誘導する方法が開発された。

II. 研究組織

研究組織

本研究は東海大学に所属する4人の研究者によって共同で実施された。

研究者名	所属・専門	分担した研究項目
加藤 俊一	東海大学総合医学 研究所 細胞移植学	研究計画立案とサイトメガロウイルス特異的細胞障害性リンパ球の臍帯血からの誘導法の研究
安藤 潔	東海大学医学部 血液学	体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討
堀田 知光	東海大学医学部 血液学	造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究
萩原 政夫	東海大学医学部 免疫学	マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

III. 分担研究報告

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業
分担研究報告書

サイトメガロウイルス特異的細胞障害性リンパ球の臍帯血からの誘導法の研究

分担研究者 加藤俊一 東海大学総合医学研究所教授

研究要旨

臍帯血中のリンパ球は免疫メモリーが未獲得であるため、ウイルスなどに対する特異的免疫が欠落している。そのため臍帯血移植後には種々の感染症が多発し重症化する。我々は樹状細胞 (dendritic cell、DC) を用いることによってサイトメガロウイルス (cytomegalovirus、CMV) 特異的細胞障害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte、CTL) を誘導する方法の検討を行った。本年度は成人DCと臍帯血DCとの表面マーカーや機能の差異について検討を行ったところ、臍帯血DCは成人末梢血DCに較べてCTL誘導能力が低いことが判明した。今後DC能力を高める方法の開発が必要である。

A. 研究目的

臍帯血移植後の免疫再構築遅延による感染症併発に対して、これまでの薬物療法を補う新たな治療戦略としての細胞性免疫療法が注目されている。

臍帯血Tリンパ球は機能的に未熟であり、しかもその構成成分のほとんどがナイーブな細胞から成る。樹状細胞はこの様なナイーブT細胞を刺激、活性化し、免疫記憶を誘導しうる細胞として知られている。今回の研究においてはまず成人末梢血サンプルを材料とし、樹状細胞を用いることで抗CMV-CTLsが誘導可能であるか否かを試み、さらに臍帯血からにも同様の方法が有効であるか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1)今回用いたCMV抗原がBiowhatker社から購入したもので、その組成はCMV感

染ヒト胎児肺繊維芽細胞株のlysateである。同抗原を用い健常人末梢血リンパ球に対する芽球刺激反応を行ったところ、抗CMV-IgG抗体保有の有無と極めて高い相関 ($p<0.01$) が得られたことより、抗原特異的なTリンパ球を増殖へと導く作用があると判断された。

2)樹状細胞誘導;成人末梢血単核球からCD14陽性細胞(単球)をMACSカラム法によって分離し、GM-CSF+IL-4によってDCへと誘導した。一方で臍帯血については同様方法でDCを誘導し、さらに一部はCD34陽性細胞から2段階法(まずはSCF+FLT-3+TPOで未熟骨髄系細胞を増殖させ、続いてGM-CSF+IL-4にスイッチする)にてDCへと誘導した。以上の細胞のIL-12産生能についてELISA法によって検討した。

3)抗CMV-CTL誘導;2)において誘導したDCにCMV抗原を添加し、さらに

LPS/TNF α を加えることによって成熟DCとした。同DCを刺激細胞、さらに成人又は臍帯血由来CD14(-)細胞を反応細胞とする混合培養を試行した。培養開始後4日目から低濃度IL-2(35U/ml)を添加し、さらに7日毎の刺激培養を継続した。14~28日目において増殖細胞 phenotype を flow cytometry で確認すると共に、抗原パルスDCに対する細胞傷害活性を⁵¹Cr-release assay によって確認した。

(倫理面での配慮)

本研究では、自発的な同意をえた成人からの末梢血と研究目的で使用許可をえた臍帯血を用いた。個人情報情報を匿名化した上で研究を行い、プライバシーの保護に配慮した。

C. 研究結果

1)図1,2に示す如く、臍帯血単球由来DCは同じく成人単球由来DCと比べてCD80抗原発現及びIL-12産生能が有意に低下していた。CD34抗原陽性細胞由来DCはさらにいずれも(臍帯CD14陽性由来DCと比べて)低下していた。

2)抗CMV-CTL誘導;成人血からは図3に示す如く自己の抗原パルスDCを特異的に殺傷していた

CD4優位のCTLが誘導し得た(8/9例)。一方臍帯血の場合CTL誘導は試行した9例中2例のみで誘導可能であった(図4)。また成人血からは100倍以上の細胞増殖が得られたのに対して、臍帯血の場合は継続培養が極めて困難である(2~3週後にアポトーシス化する)ことを特徴とした。

D. 考案

今回用いた方法はこれまでRidellらが報告し、実際に臨床応用されているヒト皮膚繊維芽細胞を用いた方法と比べて、ドナーにかかる負担が少なく、又培養手順が簡便であることを長所とした。成人血の場合、CMV未感染者(抗体陰性でprimary responseが得られない)であってもCTLが誘導可能であったのに対して、臍帯血では困難であった理由としては、DCが未成熟であること及び臍帯血における抗ウイルスT細胞頻度が極めて少ない(限りなくゼロに近い)ことが可能性として挙げられた。今後はDCの機能を高める方法の開発等により、CTL誘導効率を高めることを検討する必要がある。

E. 結論

臍帯血からえられたDCは成人末梢血からえられたDCよりもCTL誘導能力が低いことが判明し、今後DC機能を高めるための方法の開発が必要である。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

加藤俊一:先天性免疫不全症に対する骨髓非破壊的造血幹細胞移植。「Annual Review血液2002」高久史磨他編、中外医学社137-142、2002.

2. 論文発表

Ying Y, Kato S, et al.: Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. J Immunology, 166:1590-1600, 2001.

Rocha V, Kato S, et al: Comparison of outcomes of unrelated bone marrow transplantation and umbilical cord blood transplants in children with

acute leukemia. Blood 2001; 97: 2962 - 2971.

Hagihara M, Kato S, et al.: The efficient generation of immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or monocytic leukemia cells in vitro. Leukemia Research 2001; 25:249-258.

Hagihara M, Kato S, et al.: Successful in vitro generation of Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes from severe chronic active EBV patients. Medical Microbiological Immunology 2001;189:137-145.

Matsumoto S, Kato S, et al.: Injection of CD4+ and CD8+ cells with donor or host accessory cells induces acute graft-versus-host disease in human skin in immunodeficient mice. Experimental Hematology 2001;29:720-727.

Hagihara M, Kato S, et al.: Extensive and long-term ex vivo production of dendritic cells from CD34 positive umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma. J Immunol Methods 2001; 253:45-55.

Kato S, et al.: Absence of CD34-hematopoietic precursor population in recipients of CD34+ stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2001;28:587-595.

Oki M, Kato S, et al.: Efficient lentiviral transduction of human cord blood CD34+ cells followed by their expansion and differentiation into dendritic cells. Experiment Hematol 2001;29:1210-1217.

加藤俊一:造血器腫瘍に対する臍帯血移植. medicina、2001;38:251-253.

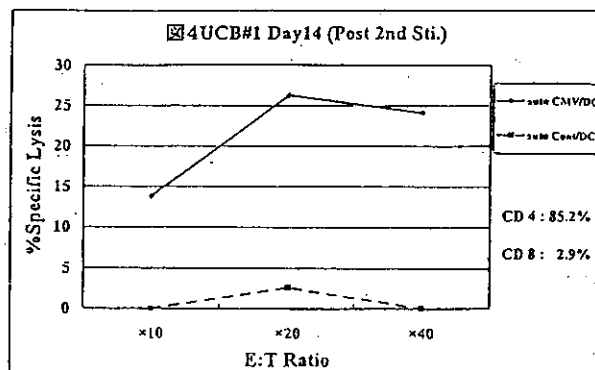
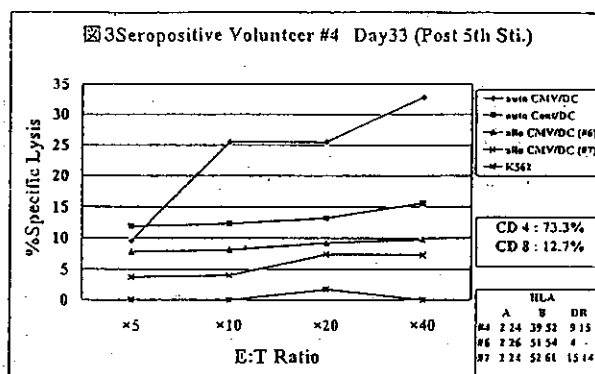
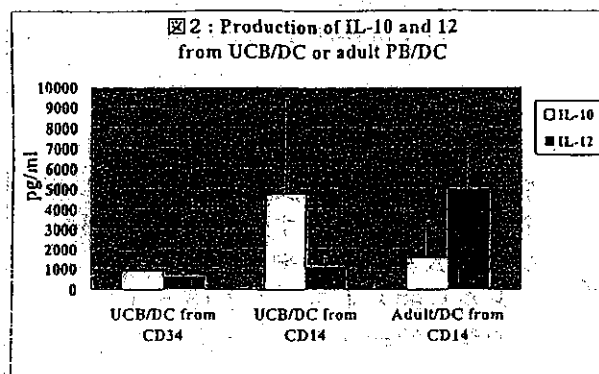
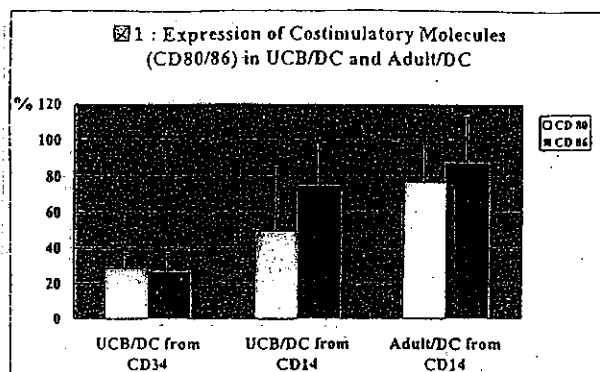
加藤俊一:骨髄バンクと臍帯血バンク. 内科 2001;88:418-422.

3. 学会発表

加藤俊一:小児白血病における非血縁者間骨髄移植と非血縁者間臍帯血移植の比較. 日本臨床血液学会シンポジウム、2001年10月.

G. 知的所有権の取得状況

なし



研究課題 体外増幅臍帯血幹細胞を利用した成分輸血製剤生産の検討

分担研究者 安藤 潔 東海大学医学部・助教授

研究要旨

ヒト臍帯血幹細胞をマウス骨髄ストローマ細胞株存在下に増幅培養すると造血幹細胞(SRC)を13倍に増幅できることが確認された。増幅幹細胞は抗原特異的な抗体産生可能なBリンパ球に分化することが確認された。

A. 研究目的

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。本研究ではこの培養システムを輸血製剤の作成のために応用することを目的とする。平成13年度は増幅した造血前駆・幹細胞を抗体産生可能なBリンパ球へ分化させるシステムについての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

従来の報告では試験管内でCD34陽性造血幹細胞よりプレBリンパ球までの分化は可能であるが、成熟リンパ球の産生は不可能である。成熟リンパ球産生のため移植宿主の体内でのBリンパ球への分化能を検討した。

1. 臍帯血CD34⁺細胞をマウス骨髄ストローマ細胞HESS-5上で、TPO, FL, SCF存在下に培養する。培養後の細胞をNOD/SCIDマウスに移植し、SRCの増幅倍率を算出する。

2. 上記方法により増幅された臍帯血CD34⁺細胞のB細胞への分化能を検討するために、増幅後細胞を移植したNOD/SCIDマウスを用いて以下の検討を行った¹⁴⁾。ヒト造血細胞の生着を確認後、移植後6週目より2週間毎に抗原を腹腔内投与した。用いた抗原はDNP-Ficoll、DNP-OVA、DNP-KLHの3種類である。

C. 研究結果

14週後の骨髄、脾臓、末梢血の解析ではCD19⁺細胞の中でCD10⁺の未熟B細胞は骨髄で87.1±1.1%、脾臓で14.3±2.2%、末梢

血で38.6±3.8%、一方sIgM⁺の成熟B細胞は骨髄で28.4±9.1%、脾臓で88.8±3.4%、末梢血で76.4±1.2%という分布を示した。これは臓器特異的なB細胞分化を反映するものと解釈される。また、抗DNP抗体をELISAにより測定した。対照群では抗DNP抗体を検出しなかったが、DNP-Ficoll投与群で3/5、DNP-OVA投与群で3/4、DNP-KLH投与群で4/4で抗DNP抗体を検出した。さらにDNP-KLH投与群の2匹のマウスで抗DNP抗体のクラスを測定したところIgMが主要な抗体クラスであったが、微量のIgGも検出された。

D. 考案

以上の結果より増幅された臍帯血CD34⁺細胞より分化したB細胞はマウス体内で胸腺非依存性抗原(DNP-Ficoll)に反応して特異的抗体を産生するだけでなく、胸腺依存性抗原(DNP-OVA、DNP-KLH)にも反応して特異的抗体(IgM、IgG)を産生しうることを示している。

E. 結論

ヒト造血幹細胞を増幅を増幅し、それらが抗体産生Bリンパ球に分化可能であることが示された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Stem cells, 18, 183-189, 2000
- 2) J Immunology, 166, 1590-1600, 2001
- 3) J Immunol Methods, 253, 45-55, 2001
- 4) Bone Marrow Transplant 28, 587-595, 2001
- 5) Exp Hematol 29, 1210-1217, 2001
- 6) Cell Transplantation, 10, 0409-412, 2001
- 7) J Immunology in press, 2002
- 8) Int J Hematol. In press, 2002

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

研究課題 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

分担研究者 堀田知光 東海大学医学部・教授

研究要旨：ヒト臍帯血幹細胞をマウス骨髄ストローマ細胞株存在下に増幅培養すると造血幹細胞(SRC)を13倍に増幅できることが確認された。増幅幹細胞は機能を有するTリンパ球、Bリンパ球に分化することを新たに作成されたNOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスに移植することにより確認された。

5日間の増幅培養後、赤血球分化培養

A. 研究目的

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。本研究ではこの培養システムを輸血製剤の作成のために応用することを目的とする。平成13年度は増幅した造血前駆・幹細胞を赤血球、血小板へ分化させるシステムについての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34+細胞をマウス骨髄ストローマ細胞 HES-5 上で、TPO, FL, SCF 存在下に培養する。培養後の細胞を NOD/SCID マウスに移植し、SRC の増幅倍率を算出する。
2. 培養後臍帯血 CD34+細胞を赤血球分化培養(20%FCS, 10%HS, IL-3 100u/ml, SCF 100ng/ml, EPO 4U/mL)で8日間培養、あるいは、巨核球分化培養(IL-1 10ng/ml, IL-6 25ng/ml, IL-11 25ng/ml, SCF 25ng/ml, TPO 50ng/mL, FL 50ng/mL)で14日間培養する。

C. 研究結果

臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を骨髄ストローマ細胞存在下に TPO, FL, SCF 存在下に5日間培養した。CD34 陽性造血幹細胞は約13倍に増幅した。これらを SRC アッセイすると培養前後で SRC 頻度がほとんど変わらない(前で CD34 陽性細胞中 1/46000、後で 1/48000) ことから SRC レベルでも12倍程度の増幅が得られていることが確認された。このような培養系で

(20%FCS, 10%HS, IL-3 100u/ml, SCF 100ng/ml, EPO 4U/mL, Blood 92, 443, 1998)で8日間培養すると総細胞数で100倍に増加し、赤血球系マーカーである Glycophorin A 陽性細胞は70%以上であった。これらは形態的にも赤芽球であった。また同様に5日間の増幅培養後、巨核球分化培養(IL-1 10ng/ml, IL-6 25ng/ml, IL-11 25ng/ml, SCF 25ng/ml, TPO 50ng/mL, FL 50ng/mL Blood 91, 4118, 1998)へ細胞を移すと14日目までに総細胞数で100倍に増加し、巨核球系マーカーである CD41 陽性細胞は60%以上であった。ただし、形態学的には8N程度の幼弱な巨核球であった。

E. 結論

以上より申請者らの方法により得られた増幅 CD34 陽性造血幹細胞を赤血球および血小板へ分化させる培養条件を見いだすことが可能であった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Stem cells, 18, 183-189, 2000
- 2) J Immunology, 166, 1590-1600, 2001
- 3) J Immunol Methods, 253, 45-55, 2001
- 4) Bone Marrow Transplant 28, 587-595, 2001

- 5) Exp Hematol 29, 1210-1217, 2001
- 6) Cell Transplantation, 10, 0409-412, 2001
- 7) J Immunology in press, 2002
- 8) Int J Hematol. In press, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業
担研究報告書

研究課題 マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

分担研究者 萩原政夫 東海大学医学部・講師

研究趣旨

マウス stroma を用いた培養系によって、臍帯血 CD 3 4 陽性細胞から臨床投与可能なレベルの大量の樹状細胞の増幅に成功した。同細胞は臍帯血NK細胞やNK T細胞の活性化を促すなど抗腫瘍・ウイルス免疫系の賦活化に重要な役割を担う可能性が示唆された。

A. 研究目的

臍帯血移植における問題点(弱点)のひとつに、移植後の免疫再構築遅延による感染症あるいは悪性疾患の再発が挙げられる。細胞免疫療法はこの弱点を補う治療法として注目されている。臍帯血においては同免疫療法における major effector 細胞である Tリンパ球が機能的に未熟であるが故に、NK細胞やNK T細胞など minor effector 細胞が重要な役割を担うと考えられる。樹状細胞(dendritic cells=DC)はこの様な細胞性免疫系全体を organize し得る細胞として重要であるが、臍帯血中において低頻度かつ低機能である為今回その前駆細胞である造血幹細胞(CD34 陽性細胞)から培養により増幅することを試みた。続いて DC を用いた細胞免疫療法の可能性に関し探る目的で、得られたDCの NK/NKT 細胞に対する影響に関して in vitro 検討を行った。

B. 研究方法

1) HESS-5 を用いた臍帯血 CD 3 4 陽性細胞由来 DC 誘導； 臍帯血単核球から

MACS beads 法によって CD 3 4 陽性細胞を分離し、micropore membrane を介しマウス stroma 細胞 (HESS-5) 上において無血清培地 (Stem Cell 培地) 及びサイトカイン(Flt-3/SCF/TPO)存在下に長期間(最長2ヶ月)培養した。培養後細胞を GM-CSF/IL-4 添加によって DC へと誘導した。

2) CD 3 4 陽性細胞由来NK細胞誘導及び DC による活性化； CD 3 4 陽性細胞を SCF/IL-15 添加によって1~2ヶ月培養することによって、CD3-56+NK 細胞を誘導し得た。同一臍帯血から1)の方法で誘導されたDCと 48 時間混合培養後の腫瘍細胞に対する傷害活性及び IFN γ 産生能を解析した。

3) 臍帯血NK T細胞増幅及びDCによる活性化；臍帯血単核球を α GalCer + IL-2 (100U/ml)によって2週間刺激培養し、増殖した TCRV α 24/V β 11 陽性NKT細胞を FACS sorting によって単離した。同細胞をさらに1)の方法で誘導したDCによって刺激培養後の細胞内サイトカイン(IFN- γ ・IL-4)発現及び各種腫瘍細胞に対する細

胞傷害活性を解析した。

C. 研究結果

1)臍帯血CD34陽性細胞はHess-5存在下において、最終観察期間の8週目に到るまで10倍/週のペースにて増殖を続けた。増殖した細胞はCD33抗原陽性、一部(5-20%)がCD14陽性であり、GM-CSF/IL-4によってDCへと分化した。同DCは貪食能(dextran uptake)を有しさらにTNF- α によって成熟DC(CD80/83発現)に分化し、アロTリンパ球増殖刺激能を発揮した。

2)NK細胞活性増強作用；臍帯血CD34陽性細胞から由来するNK細胞はCD16陰性、CD56陽性の未熟NK細胞である。同細胞はDCとの短期間培養後に抗腫瘍活性の増強及びIFN- γ 産生能の上昇を認めた。

3)NKT細胞のサイトカイン産生及び腫瘍細胞傷害活性；臍帯血NKT細胞は α GalCer添加により成人血NKT細胞と比し有意に高い増殖倍率を示した(臍帯血0.08 \rightarrow 8.5%, 平均102倍；成人血0.02 \rightarrow 22%, 平均1006倍)。同細胞はCD1d分子依存性にDCによる活性化を受け、Th1(IFN γ)優位なサイトカイン産生パターンを示し、種々血液系悪性細胞に対してはtarget細胞との長時間(20時間)暴露によって強い傷害活性を示した。

D. 考案及び結論

今回研究により臍帯血の僅かな割合のCD34陽性細胞から大量のDCが増殖可能であることが明らかとされた。これは理論上、1CD34陽性細胞たり3200個のDCに相当し、臨床に用いられる平均

的数即ち 10^7 オーダーのDCが一検体当たり臍帯血のごく一部から得られる計算となる。臍帯血は獲得免疫系が未発達であるが、NK細胞やNKT細胞など自然免疫系を担うeffector細胞群の役割は重要である。今回誘導されたDCはこれらeffector細胞の機能亢進をもたらす効果を有する点で有用と考えられる。

F. 健康危害情報

なし

G. 成果

1) 論文

Gansuud B, Hagihara M, et al: Human umbilical cord blood NKT cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanism. Human Immunol, 2002, 63, 164-175.

Hagihara M, Gansuud B, et al. Killing activity of human umbilical cord blood derived TCRV α 24+ NKT cells against normal and malignant cells In vitro. Cancer Immunol Immunotherapy 2002, 51, 1-8.

Tsuchiya T, Hagihara M et al. The generation of immunocompetent dendritic cell from CD34 positive acute myeloid or lymphoid leukemia cells. Int J of Hematol 2002, 75, 55-62.

Hagihara M, Li C, et al. Extensive and long-term vivo production of dendritic cells from CD34 positive umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma. J Immunol Methods 2001,

253, 45-55

Oki M, Ando K, Hagihara M, et al.
Efficient lentiviral transduction of
human cord blood CD34⁺ cells followed
by their expansion and
differentiation into dendritic cells.
Exp Hematol 2001, 29, 1210-1217

Ying Y, Hagihara M, et al. Enhancemaent
of Human Cord Blood CD34⁺Cell-Derived
NK Cell Cytotoxicity By Dendritic
Cells. J Immunol 2001, 166, 1590-1600

IV. 研究成果の刊行 に関する一覧表