

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所  
移植・外科研究部  
研究者 梨井 康

### 分担研究者

- (1) 富山医科薬科大学第三内科 高原照美
- (2) 東京都立府中病院産婦人科 桑江千鶴子
- (3) 日本老化制御研究所 越智宏倫

### 要 旨

ヒト臍帯血を利用し、肝不全や肝の先天性代謝異常症に対する新しい細胞移植療法を研究し、開発することを目的とする。本年度は臍帯血幹細胞を MACS により分離システムを確立し、肝再生における肝細胞増殖因子の有用性と遺伝子治療の可能性を明らかにした。

### 1. 研究目的

臍帯血由来の造血幹細胞が血球系以外の臓器になれる可能性を明らかにし、分化・誘導のメカニズムを解明することにより、将来の細胞療法及び再生医療に貢献できればよいと考えている。そこで、本研究では、肝臓に注目し、ヒト臍帯血から抽出した造血幹細胞を Mouse に移植し、その後の肝臓において造血幹細胞が肝細胞に分化しているのを目的とする。そこで本実験を行うにあたって、本年度は臍帯血からの造血幹細胞の分離精製システムの確立とした。また、われわれは臍帯血由来の血液幹細胞に注目しその中に肝細胞に分化しうる肝幹細胞があると考え、その肝幹細胞を分離・同定し、肝内移植により肝組織に再構築し、最終的には肝不全や肝の先天代謝異常症の細胞移植療法の研究と開発を目的とする。そのため本年度は初段階として、肝再生における肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor, HGF)の有用性と遺伝子治療の可能性を検討する。さらに、企業側では、老化やガン・生活習慣病を惹き起こすとされる酸化ストレスを、抗酸化茶という抗酸化性緑茶製品摂取で改善できるかどうかについて酸化ストレスプロファイリング技術を使って偵察することを目的とした。

### 2. 研究方法

1) 臍帯血造血幹細胞の分離精製システムの確立：本研究では、はじめに分娩時に新生児に付随して娩出され、その後必要とされないヒト臍帯血を利用し、その中からの造血幹細胞の分離精製法を確立する。方法として、臍帯血から白血球を分離精製し、その後、抗体標識法を用いて造血幹細胞を特異的に標識し、自動磁気分離システム (Auto MACS) を用いて検討した。細胞の精製度は、FACSscan 解析、細胞染色をして確認した。また、臍帯血の運搬時間、白血球数、造血幹細胞の関係も目安として検討材料とした。

実験材料： ヒト臍帯血、DULBECC'S PBS(大日本製薬株式会社)、ノボ・ヘパリン注 1000(レオ ファーマシューティカル プロダクツ)、Ficoll-Paque Plus and Ficoll-Paque Research Grade(Pharmacia Biotech)、Orthyomune Lysing Reagent(オーソ。クリニカル。ダイアグノスティックス株式会社)、Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kits(Miltenyi Biotec)、autoMACS(Miltenyi Biotec)、FACS Rinse(Becton Dickinson)、Ethanol(Wako)、Albumin, from Bovine Serum, Cohn Fraction V pH5.2(Wako)、Anti-human Lineage Cocktail 1(Becton Dickinson)、Anti-human CD34-PE(Miltenyi Biotec)、FACSscan(Becton Dickinson)、Sodium Azide(Wako)、抗 asialo GM1 抗体(Wako)、Anti-human CD45-PE(Becton Dickinson)、SHANDON Filter Cards、SHANDON Cytoclip、SHANDON Cytospin3

実験動物： 免疫不全である NOD/Scid mouse は実験動物中央研究所より購入し、クリーンルームにて薄い生地を被せたケージの中で飼育した。実験動物の摂食、飲水は自由とした方法

ヒトからの臍帯血抽出法： 東京都立府中病院 産婦人科より、同意の得られた産婦において、分娩当日、新生児から臍帯を切断した直後に娩出前の臍帯静脈を消毒後、血液抗凝固剤（10%クエン酸ナトリウム）の入った 200ml 用臍帯血採取バックに直結されている採血管の先端にある針を穿刺し、自然に血液をバック内部に流入した後、運搬した。

臍帯血の運搬方法： 病院からの臍帯血の運搬方法は、バイク便を使用、室温でなるべく静止状態を保ちながら本研究所まで運搬した。

臍帯血からの白血球分離法： ヒト臍帯血を等量の PBS in Heparin solution(1ml PBS/40000 units)にて希釈した後、Ficoll-Paque15ml 入った 50ml チューブの上に希釈した臍帯血 30ml を重層し、1500rpm,25°C,35 分間遠心分離した。遠心後、パストールピペットを用いて分離した溶液中の白血球層をきれいに抽出し、新たな 50ml チューブに移した。再度、1500rpm,4°C,10 分遠心して細胞をペレットにして、上清を除去し、Orthyomune Lysing Reagent 2ml を入れ、激しくピペッティングし、室温で 10 分間放置して溶血を開始した。溶血後、10ml の PBS を入れて反応を停止させ、1500rpm,4°C,10 分間遠心し、白血球を精製した。

Auto MACS による白血球からの造血幹細胞の分離精製： 分離した白血球の細胞数を計算し、細胞数あたりの FcR Blocking Reagent, PBS, CD34 MicroBeads を入れて冷蔵庫（6~8°C）中で 20 分間抗体反応した。反応後、PBS 10ml 入れ 1500rpm,4°C,10 分間遠心した後、上清を除去し、新たに PBS に混濁し洗浄を行った。この操作を 2 回行い、最後のの上清を除去したところで細胞を PBS 2ml に混濁し、ピペッティングにて細胞をよく解した。細胞混濁液を 200 メッシュフィルターに通してシングルセルにした後、Auto MACS(自動磁気分離装置)にて CD34<sup>+</sup> cell(造血幹細胞)を分離精製した。(Figure 1,2)

造血幹細胞の純度の確認による FACS 解析： Auto MACS によって分離精製する前の白血球と分離精製した細胞 (CD34<sup>+</sup> cell, CD34<sup>-</sup> cell)  $2.0 \times 10^4$  cells を FACS チューブに移し、Anti-human Limeage Coccktail 1、Anti-human CD34-PE 抗体の混合溶液を 4°C,20 分間蛍光染色した。染色後、PBS を加え、1500rpm,4°C,10 分間遠心した後、上清を除去し細胞を洗浄した。この操作を 2 回行い、最終的に PBS 1ml に混濁して FACScan にて解析を行った。(Figure 3)

造血幹細胞の Giemsa 染色： 臍帯血から分離精製した  $4.0 \times 10^5$  cells CD34<sup>+</sup>(造血幹細胞)及び CD34<sup>-</sup> cell を、サイトスピン(1200rpm 5 分)にてスライドガラスに細胞を転写した。スライドガラス上の細胞表面に May-Gruenwald's 液をのせ、4 分放置した後、リン酸 Buffer をこぼれないように重層し、5 分放置する。水で洗浄して Giemsa's 液をのせ、10 分反応させる。反応後、水で洗浄し、風乾した。(Figure 4)

臍帯血からの造血幹細胞に至るまでの記録： 臍帯血が採取されてから本研究所に運搬される間での時間及び臍帯血量に対する白血球数と造血幹細胞数の関係について調べた。(Figure 5,6,7)

NOD/Scid mouse への造血幹細胞の移植： 8~12 週齢の♀NOD/Scid mouse に 2.5Gly(0.8Gly/min) を radiation し、抗 asialo GM1 抗体 20 $\mu$ l を全量 400 $\mu$ l になるように PBS で調整した溶液を腹腔内に投与した後、分離精製した細胞 (CD34<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> cell および CD34<sup>-</sup> cell) をそれぞれ別々のマウスに  $5.0 \times 10^4$  cells/500 $\mu$ l を静脈内投与し、数ヶ月間飼育した。

造血幹細胞を投与した NOD/Scid mouse の解析： 投与して 1 ヶ月後の NOD/Scid mouse の骨髓、脾臓から細胞を抽出して、 $1.0 \times 10^6$  cells を Anti-human CD45-PE で 4°C30 分間抗体染色した。染色後、PBS を加え、1500rpm,4°C,10 分間遠心し上清を除去し細胞を洗浄した。この操作を 2 回行い、最終的に PBS 1ml に混濁して FACScan で解析を行った。(Figure 10)

#### 倫理面への配慮

本研究では、臍帯血は東京都立府中病院の産科医から採集され、匿名化された上で当センターに移送し、研究材料とする。採取に際して、妊婦やその配偶者に十分説明したうえで、承諾を得ること、また、研究実

施に際し、個人情報秘守し個人の権利を守ることは当然であるが、それ以外にも倫理的に配慮すべき点について第三者的な判断を得るために、両施設の倫理委員会に申請し判断を仰ぐ。尚、臍帯血バンクの提供がある場合は、そちらを優先させ、本研究には提供後の余剰を用いるものとする。

動物実験については、当研究センターの実験動物実験指針に則して行うことにより、倫理的には妥当と思われる。

2) 遺伝子治療法の検討: In vivo では筋肉内に HGF naked DNA (pCAGGS vector construct) を注入し electroporator を用いて EP するが、従来行ってきた条件の検討の結果 25volt, 100msec を 6 pulse 刺激して遺伝子を導入する。発現の確認として plasma HGF 値を ELISA で検討し、さらに筋行内で HGF 蛋白発現の有無を免疫染色法で確認する。In vitro では volt と pulse 回数を変更することにより細胞内に遺伝子導入が可能である。

### 3) 動物モデルの確立:

#### 急性肝障害モデル

マウスを用い、HGF 投与群は HGF 50  $\mu$ g EP し、対照群は empty vector を同様に EP する。EP 後 5 日目に、マウスに 5% 四塩化炭素を胃管より 1 回投与し投与後 1,2,3,5, 7 日目に血液と肝臓を採取し以下について検討する。検討項目は、血清 ALT, LDH, HGF, 肝重量、肝組織像 (PCNA 発現、TUNNEL 法による肝細胞の apoptosis 等)、活性酸素量等。

#### 慢性肝不全モデル

マウスに 5% 四塩化炭素を胃管より週 3 回、8 週間投与して肝硬変モデルを作成する。さらに 70% 肝切除を行い慢性肝不全モデルとする。HGF 投与群は肝切除前 4 日目に HGF 50  $\mu$ g EP し、対照群は empty vector を同様に EP し、その後週 1 回の頻度で計 3 回 EP をくり返す。肝切除後 2,4,7,10,14 日目に血液、肝臓を採取し肝再生像と肝不全の程度を経時的に検討する。検討項目は、血清 ALT, albumin, bilirubin, HGF, 肝重量、肝組織像 (Silius red 染色、PCNA 免疫染色)、肝組織中の MAPK (p38, ERK-1,-2, JUNK) の発現を Western blot で、また HGF, c-met, HGF activator, HGF-activator inhibitor, uPA の発現は Northern blot で検討した。

4) 抗酸化性即席緑茶 (抗酸化茶): 抗酸化性の高い 2 番茶を選定したものを熱湯で抽出し、濃縮後、乾燥したものを緑茶粉末と混合し、更に、デキストリンを加え抗酸化茶を製造した。カテキン含有量は 10.5% となった。スーパーオキシド消去能は、抗酸化茶、通常の緑茶、ビタミン C でそれぞれ、158,500, 82,100, 170,000 units/g/dl であった。

5) 抗酸化茶摂取プロトコール: 21 歳から 42 歳 (平均年齢 27.8 歳) の女性 9 名、25 歳から 43 歳 (平均年齢 31.5 歳) の男性 7 名、計 16 名の被験者に対し、1 回 1g を 100ml のお湯または水にとかし、1 日 6 回、30 日間摂取させた。被験者には、この間、生活習慣を意識的に変えないように指示が与えられた。

### 3. 研究成果

1) 臍帯血からの造血幹細胞に至るまでの記録: 分離精製された造血幹細胞の細胞数が、臍帯血量及び白血球数に対して比例関係であった。また、その中において、臍帯血が採取されてから実験に至るまでの運搬時間によって反比例の結果をもたらすことが確認できた。

造血幹細胞の FACS 解析: 臍帯血からの造血幹細胞の分離精製システムは、Ficoll-Paque、Lysing Reagent で白血球を分離し、抗体標識法によってラベルし Auto MACS によって分離精製した造血幹細胞を CD34-PE 抗体、Lin (Lineage)-FITC 抗体で標識し FACSscan 解析した。CD34 は造血幹細胞特有のマーカーであり、Lineage は、T リンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、NK 細胞、B リンパ球、NK リンパ球などの血球系細胞である。分離前細胞においては、CD34+ Lin- 1.73%、CD34+ Lin+ 0.16%、CD34- Lin- 2.09%、CD34- Lin+ 96.02% 存在し、殆どが CD34- Lin+ 細胞で占められていることがわかる。分離精製システムによって得た細胞では、CD34+ 細胞では CD34+ Lin- が 99.25% に飛躍的に上昇し、他の細胞群に

においては、0.19%、0.09%、0.47%に減少し、その減少した細胞群がCD34-細胞において検出されていることからきれいに分離精製されていることがわかることから、このシステムは、有効であったことが言える。

造血幹細胞の Giemsa 染色：造血幹細胞を Giemsa 染色したところ、Giemsa 効果によって比較的メチル基の少ないアズール青・エオジネートは細胞質のみならず、核内に浸透し核酸のリン酸基と結合し赤紫色調の核に染色され、比較的分子の大きく極性の強いメチレン青などは細胞質のタンパクと結合し、青色調を生じているのがわかる。核と細胞質に関して観察すると、CD34-細胞においては多様な細胞が存在し、核と細胞質が存在しているのがわかる。一方、CD34+、Lineage-細胞はすべての細胞において核がむき出し状態で細胞質が存在していない未分化の細胞であることがわかる。

造血幹細胞の Fas 発現の確認：Jurkat 細胞、CD34-および CD34+、Lineage-細胞を Fas 抗体を用いて蛍光染色し FACS 解析したところ、ヒトの株化した T リンパ球細胞である Jurkat 細胞では、殆どの細胞が発現しており、CD34-細胞においては、数パーセント存在している。しかし、造血幹細胞においてはピークが観察されなかった。これは造血幹細胞表面には Fas が発現していないためと考えられる。

造血幹細胞の分化能の確認：この精製した造血幹細胞の分化能を確認する方法として mouse に投与し、数ヶ月後に臓器等において血球系を確認する方法がある。そこでアシアロ抗体・放射線照射によって完全免疫不全した NOD/Scid mouse (もとは、T/B 細胞存在せず) に造血幹細胞  $5.0 \times 10^4$  cells を静脈投与し、術後 2,3 ヶ月後に骨髄と脾臓を摘出し、細胞を抗ヒト CD45-PE で染色し、FACS にて解析を行った。抗ヒト CD45 抗体は、循環赤血球、血小板、非造血組織を除くすべての白血球に結合する。結果より、術後 2,3 ヶ月後の骨髄と脾臓において 24.56%、24.68%、31.41%、15.68%と長期にわたるにつれ造血系が増加し、一方、CD34-細胞を投与した mouse では検出されなかったことがわかる。

2) HGF 50 $\mu$ g を正常マウスに 1 回 EP すると HGF 血中濃度は 5 日目から上昇し 7 日をピーク(2.5 ng/dl) に 14 日目まで高値を示し 21 日には低下した。HGF の免疫染色では筋肉内に HGF の発現を認め、HGF が EP により遺伝子導入が可能であることが確認された。また週 1 回 EP をくり返すことにより血中濃度は 2.5 ng/dl を維持することが可能であった。

#### 急性肝障害モデル

急性四塩化炭素障害モデルでは、障害早期より ALT 上昇が著明となり肝組織像では中心静脈周囲の帯状壊死や巣状壊死を認めた。HGF 投与群では対照群に比較して優位に ALT 値の低下が見られたが、HGF 値は共に高値を示し相違を認めなかった。肝組織像では帯状壊死や巣状壊死、PCNA 陽性細胞数には相違は認めなかった。一方肝細胞の apoptosis 像は HGF 群で低下し画像解析により優位に低下を認めた。(Gut, in press)

#### 慢性肝不全モデル

四塩化炭素を 8 週間投与を続けると肝硬変が形成された。硬変肝を Higgins-Anderson に従って 70%切除すると徐々に肝再生を認めるが HGF 群と対照群では大きく優位差を認めたものとして、2 日より血清 ALT 値、Bilirubin 値の優位な低下である。特に Bilirubin は対照群で術後より上昇し 7 日より 15.0mg/dl で横ばいであったが HGF 群では正常に復した。一方 Albumin はあまり相違は見られず 14 日目で HGF 群で優位に上昇した。肝重量の増加は術後 2 日目より HGF 群で優位に増加し、それは肝組織の PCNA 陽性細胞数と相関した。線維化の指標である Silius red 染色では HGF 群では術後早期より肝線維化の改善が見られ 14 日目にはほとんど正常肝に類似したが対照群では術後 14 日目でもまだ肝線維化は持続していた。Western blot による MAPK の発現を検討すると、HGF 群では術直後より ERK-1,-2 のリン酸化が認められるのに対し、対照群では 4 日目で軽度、7 日目より強く認めた。他の MAPK のリン酸化は変化を認めなかった。また Northern blot で各種遺伝子発現を検討したところ、HGF 群において HGF-activator の発現の増加が見られたが uPA, c-met, HGF には対照群と比較して相違を認めなかった (Hepatology, submitted)。

3) 抗酸化茶摂取による酸化損傷バイオマーカーの変化 O S P の 4 つの酸化損傷バイオマーカー全てが有意に低下した。即ち、

① 8-OHdG 生成速度 (DNA 酸化損傷バイオマーカー) 32% 低下 ( $p < 0.001$ )

- ② イソプラスタン (細胞膜等酸化損傷バイオマーカー) 41% 低下 (p<0.004)
- ③ 過酸化脂質 (血清脂質酸化損傷バイオマーカー) 46% 低下 (p<0.001)
- ④ C o Q10 酸化率 (血清中の酸化進行一次マーカー) 12% 低下 (p<0.056)

#### 抗酸化能力の改善

血清総合抗酸化活性 (STAS : Serum Total Anti-oxidant Status) が抗酸化茶の摂取後、58 μM (4.5%) 改善された (p<0.003)。血清中の α-トコフェロール/コレステロール、葉酸はそれぞれ 28% (p<0.001)、52% (p<0.012) づつ増加した。

#### その他の成分の変化

血清中の鉄、ビタミン C、ビタミン B12 と中性脂質は抗酸化茶摂取により低下する傾向があった。

#### 4. 考察

1) 臓器移植におけるドナー不足が深刻となっている現在、肝硬変症、代謝性肝疾患、劇症肝炎では細胞療法、再生療法で治療できる可能性が高い。中でも細胞療法においては、胚性幹細胞 (ES,EG 細胞)、肝幹細胞、造血幹細胞などが利用できるものと考えられる。近年、臍帯血由来の造血幹細胞が血球系以外の臓器に分化する能力があると言われている。そこで、我々はヒト臍帯血から造血幹細胞の分離システムを確立し、造血幹細胞が肝細胞に分化するための生体内環境を検討した。

臍帯血からの造血幹細胞の分離システムは、Auto MACS (自動磁気分離装置) を用い、分離後 FACS 解析によって精度を確認し、さらに造血幹細胞の細胞染色、Mouse への投与後の白血球への分化能について検討した。分離精製した造血幹細胞は、99% の高精度のものが得られ、その細胞の性質として核が向き出しであり、血球系の分化能を有し、細胞表面に Fas 抗原を持たないという特徴が確認できた。以上により造血幹細胞の分離システムが確立された。今後としては、実際に移植条件 (肝臓障害・自己肝細胞による増殖抑制) 下での細胞導入後の解析を行う方針である。

2) EP による HGF の遺伝子導入により有効な血中 HGF 濃度を確認し得た。この方法はくり返し投与により血中濃度を持続することができしかも non-virus で安全な方法である。急性肝障害では HGF により肝再生像の促進は確認されなかったが血清 ALT の優位な低下と肝細胞の apoptosis 抑制が確認された。急性障害でみとめられる HGF の肝保護作用はまだ十分に機序が説明されていないが apoptosis 抑制はその一因であろう。一方慢性肝不全における HGF の有用性は特筆すべきもので肝再生を著明に誘導している。その機序として 1) HGF-activator の発現が増加していたことから HGF の活性化が生じた可能性、2) HGF により肝線維化が改善されて肝再生が起こりやすいこと、3) MAPK のリン酸化が誘導されており増殖シグナルが優位に働くこと、などが考えられる。つまり HGF 遺伝子導入は肝再生を促進し肝不全治療に有用であることが証明された。人への応用を考える時、肝癌の誘発が完全に否定できない現在は、肝再生不全に短期間適応されるべきと考えられる。EP 法を細胞療法に適応する場合、肝幹細胞に各種遺伝子導入が可能であるだけでなく HGF 遺伝子を筋肉内 EP することにより肝内に注入した肝幹細胞の分裂、増殖を誘導することが可能と考えられる。

3) 近年、老化やガン・生活習慣病を惹き起こす大きな要因として、生体内で発生している酸化ストレスにより生体成分が酸化損傷を受けることが上げられている。酸化ストレスは、生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルの多寡とこれらの酸化力を抑制する生体内の抗酸化システムとのバランスであると定義されている。老化・疾病を予防し、快適加齢・生涯現役を実現するには、この酸化ストレスの大きさを検出し、コントロールすることが必要である。酸化ストレスが高く生体成分の酸化損傷が高い場合、抗酸化食品を摂取して体内の抗酸化能力を高め、活性酸素類の酸化力を弱めることで酸化損傷を抑制できることが期待できる。我々独自に開発したカテキンを 10% 含有する特に抗酸化性の高い即席茶 (抗酸化茶) を 21 歳から 42 歳までの平均年齢 28 歳になる女性 9 名と 25 歳から 43 歳までで平均年齢 31.5 歳になる男性 7 名、計 16 名で 1 回 1 グラムを 1 日 6 回、30 日間摂取した場合の酸化ストレスの低減効果について検討し、有意な効果を認めて。

#### 5. まとめ

1) 臍帯血からの造血幹細胞を AutoMACS(自動磁気分離装置)用い、分離、精製システムを確立した。2) 筋肉内 electroporation 法による遺伝子治療法を確立した。また肝再生における HGF の有用性と遺伝子治療の可能性が確認された。3) 抗酸化緑茶は、酸化力の高い活性酸素類を除害する生体内抗酸化システムを強化し、生体構成成分の酸化損傷を低下させ、従って、ガン・生活習慣病・老化のリスクを低減する可能性のあることが判った。

#### 6. 研究発表

Xue F, Takahara T, Yata Y, Minemura M, Dono H, Takahara S, Yamato E, Watanabe A. Attenuated acute liver injury in mice by naked HGF gene transfer into skeletal muscle with electroporation. Gut, in press

7. 知的所有権の取得状況 特になし。

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社