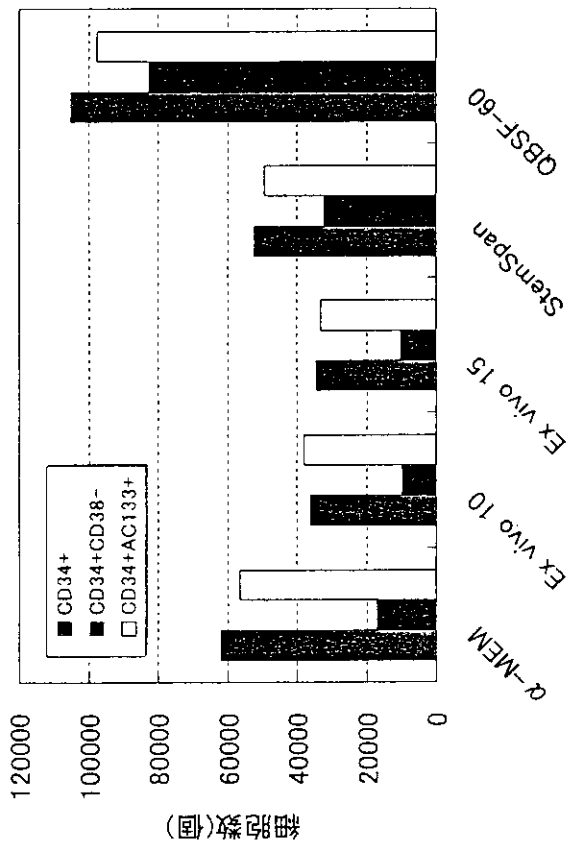
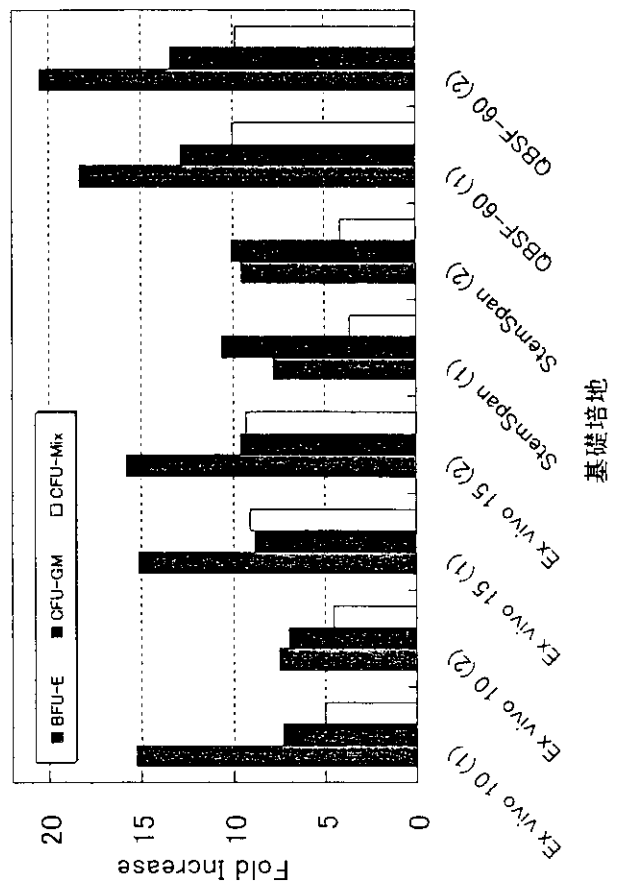


培養7日目細胞のFACS解析



培養7日目の細胞を用いたコロニーアッセイ



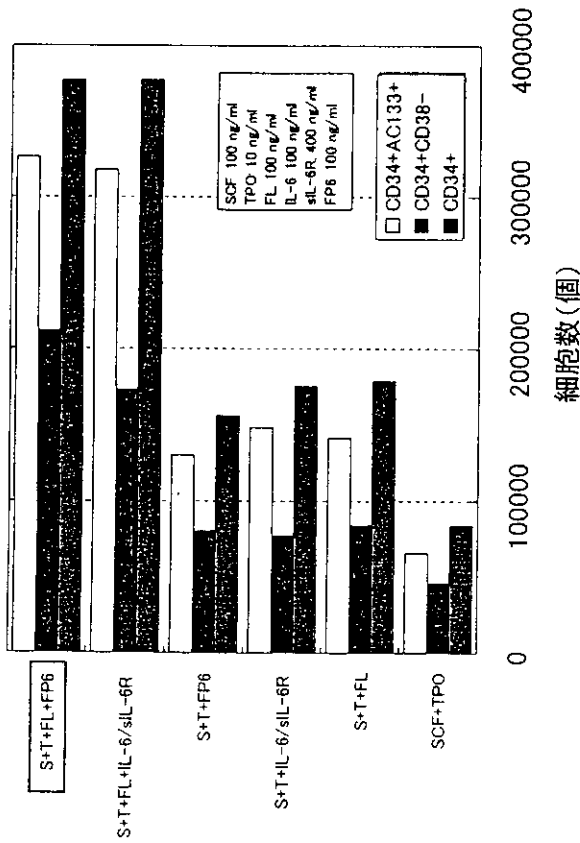
培養液の選択

- 結果
 - トータル細胞数の増幅効率
 - QBSF>StemSpan>ExVivo10>ExVivo15
 - CD34+細胞の増幅
 - QBSF>StemSpan>ExVivo10=ExVivo15
 - コロニー形成能(CFU-Mix)
 - QBSF>ExVivo15>StemSpan=ExVivo10
- 今後の予定
 - QBSFを優先して使用する
 - バック培養による検討

サイトカインの組合せ

- 目的
 - 臍帯血の体外増幅に使用するサイトカインの妥当性について、無血清培地(QBSF)を使用して検証する。
- サイトカイン
 - SCF(S)
 - TPO(T)
 - Flt 3 ligand (FL)
 - IL-6+soluble IL-6 receptor
 - FP6 (fusion protein of IL-6 and soluble IL-6 receptor)

培養7日目の細胞のFACS解析



サイトカインの組合せ

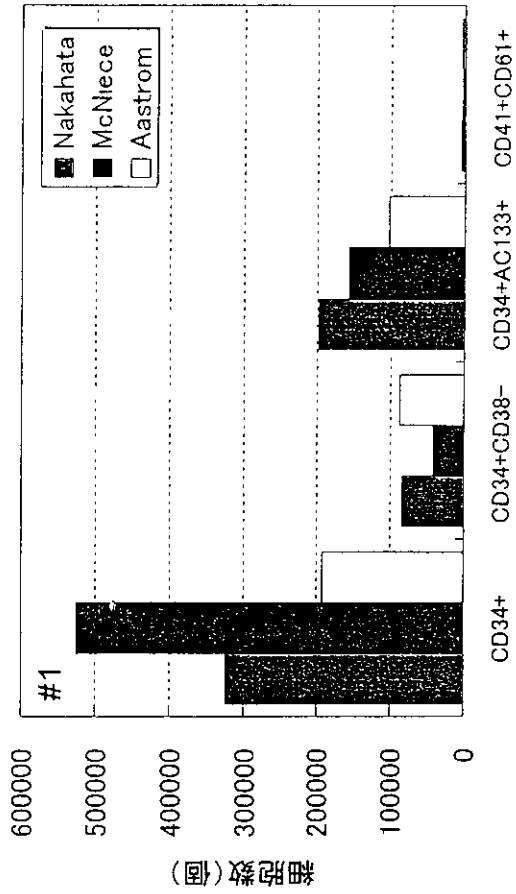
■ 結果

トータル細胞数の増幅、CD34⁺細胞の増幅、CFU-Mixの増幅については、全ての項目でS+T+FL+FPの組合せが最も優れた効果を示した。これまでの報告と一致するデータであり、今回使用した無血清培地により増幅される細胞が、これまでの報告されているようなSRC活性を有する細胞の増幅に適した培地である可能性が高い。

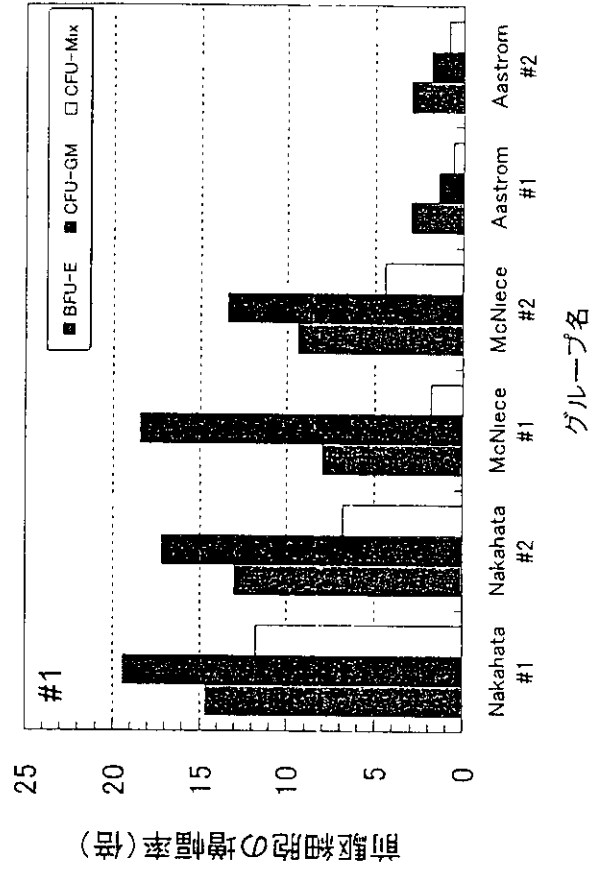
■ 今後の予定

SCIDマウスを用いたSRC活性の測定

他のグループの培養条件との比較(培養7日目)



他のグループの培養条件との比較(培養7日目)

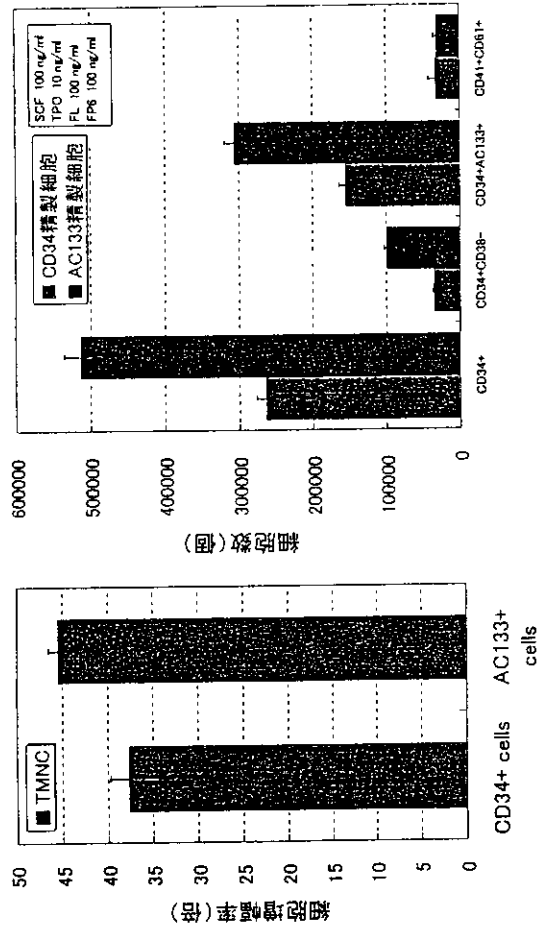


他グループの培養法との比較検討

■ 結果

Nakahataプロトコルが総合的に最良。
McNieceの方法はCD34⁺細胞の増幅効率が良いが、CFU-Mix等の増幅が悪いことから、幹細胞や前駆細胞の増幅効率は悪いことが示唆される。
Aastromの方法は細胞増幅効率も悪く、臨床的に意味があるのか疑問。

CD34陽性細胞とAC133陽性細胞の比較-1



CD34⁺細胞とAC133⁺細胞の比較

■ 結果

- 細胞の性状(FACS)
 - 殆ど全てがAC133⁺CD34⁺である。未分化細胞と考えられているAC133⁺CD34⁻細胞は殆ど存在しない。
- CFU活性
 - CD34⁺細胞とAC133⁺細胞の間で差は認められない。
- Ex vivo expansion
 - CD34⁺細胞とAC133⁺細胞の間で差は認められない。

■ 予定

AC133⁺細胞の性状解析には、AC133⁺CD34⁻細胞を使用することが必要。
当面はpending。

まとめ

- 培養液の選択
 - 現行の培養条件ではQBSF-60がベストと考える。
Ex vivo15とQBSF-60について、バツク培養での比較が必要
- サイトカインの組合せ
 - Nakahataカクテルの優位性を特に否定するデータも出ていないが、細胞増幅効率やコロニーアッセイのデータだけでは結論を導くのが難しい。
- サイトカインの濃度
 - FGF 最低でも50~25ng/mlの添加が必要と考える。
FL3:100ng/mlの添加が必要と考える。
- 他グループとの比較
 - McNieceの培養条件はCD34陽性細胞の増幅に適しているが、CFU-Mixの出現率では、Nakahataプロトコルがベスト。
- 大量培養に向けた検討
 - 細胞純度の影響
 - CD34陽性細胞の純度は、必ずしも高い必要はない。回収率を上げることを優先するべきか?
 - 凍結保存液(特にHES40)の影響は、ASHでの報告ほど大きくないと考える。
 - 凍結方法の検討
 - 凍結操作における回収率が悪いが、CD34⁺細胞精製操作における回収率と細胞純度は目標を達成している。
- CD34とAC133の比較
 - コロニーアッセイの結果待ちであるが、in vitroレベルでは大きな差は出ないと予想される。
 - 最終判断にはSRC活性のデータが必要と考える。

8. ドナー由来と考えられる骨新生が観察された非血縁者間臍帯血移植症例

名古屋大学大学院医学系研究科 成長発達医学/小児科

小島勢二、渡辺修大、中村陽一、工藤寿子

名古屋大学医学部附属病院病理部

伊藤雅文

要約

Hemophagocytic lymphohistiocytosis の2歳男児に対して DRB1 座不一致の非血縁者間臍帯血移植が施行された。移植後 IL-6 をはじめ各種サイトカインの異常高値、さらに高ガンマグロブリン血症 (IgG:4600mg/dl) がみられた。頭蓋骨に多発性の骨吸収像がみられたので day255 に頭蓋骨の生検をおこなったところ、あらたな骨形成が観察された。骨組織から DNA を抽出し、キメリズム解析をおこなったところと混合キメラ (ドナー由来:70%、レシピエント由来30%) が観察された。これより骨組織はドナー臍帯血由来の間葉系幹細胞がレシピエントの生体内で骨細胞へ分化した可能性も考えられる。

症例

<患者>N.K 男児

2歳 身長78cm 体重10.5kg 体表面積0.47m²

<診断> hemophagocytic lymphohistiocytosis(HLH)

<現病歴>

平成11年1月末より発熱、肝脾腫を認め、近医受診したところ汎血球減少を認め当院に紹介され入院した。肝生検を施行し組織球の浸潤を認めHLHと診断した。化学療法を施行したが改善を得られず、H.11.12.2摘脾を行った。一時的に汎血球減少は改善したが、再び上記症状が出現しH.12.7.5非血縁者間臍帯血幹細胞移植を行った。

非血縁者間臍帯血移植

HLAタイピング:

患者	A 24, 33	B 44, 52	DRB1 1502, 0405
ドナー	A 24, 33	B 44, 52	DRB1 1502, 0403

輸注細胞数: 4.5×10⁷/kg

前治療: CY(60mg/kg ×2)

ATG(サイモグロブリン、2.5mg/kg×4)

TBI(2.5Gy ×4)

GVHD予防: プログラフ(0.02mg/kg)

移植後の経過

〈細菌感染症〉

移植前より発熱、CRP上昇、がみられた。day5の血液培養にてグラム陰性桿菌が陽性となった。抗生剤の投与にてコントロールできた。

〈生着〉

網状赤血球 >10% :day80 好中球 >500/ μ l :day21
 WBC >1000/ μ l :day24 血小板 >20000/ μ l :day212

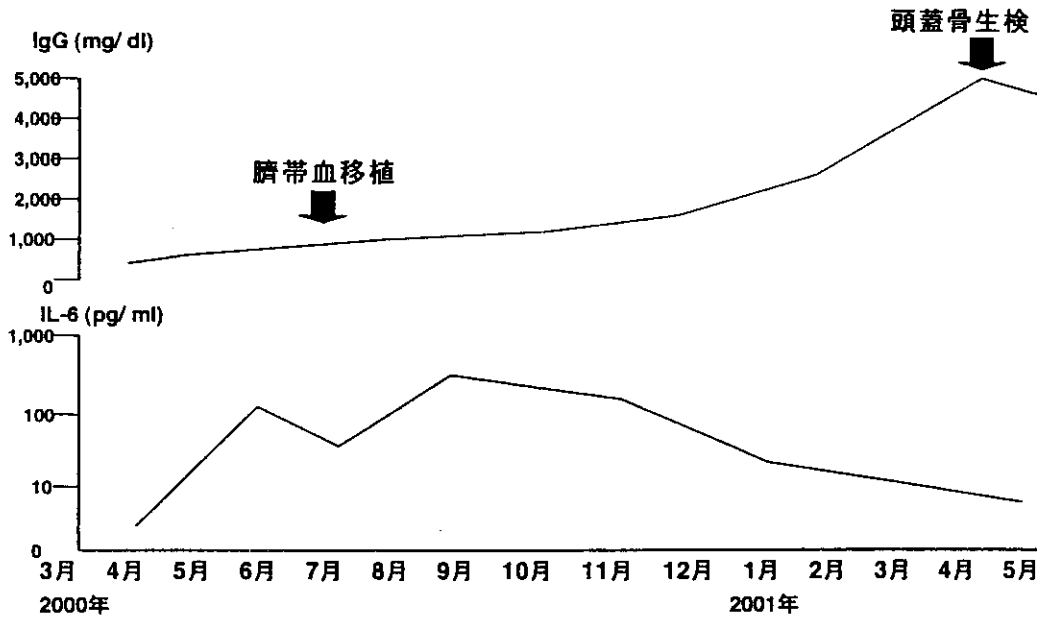
〈貧血〉

Day45頃より貧血の進行が進み、day49,MAP輸血時のクロスマッチ検査にてクームス試験が陽性になった。同時に間接ビリルビンの上昇、ハプトグロビンの低下、IgMの上昇、IL-6の著明な増加を認めた。

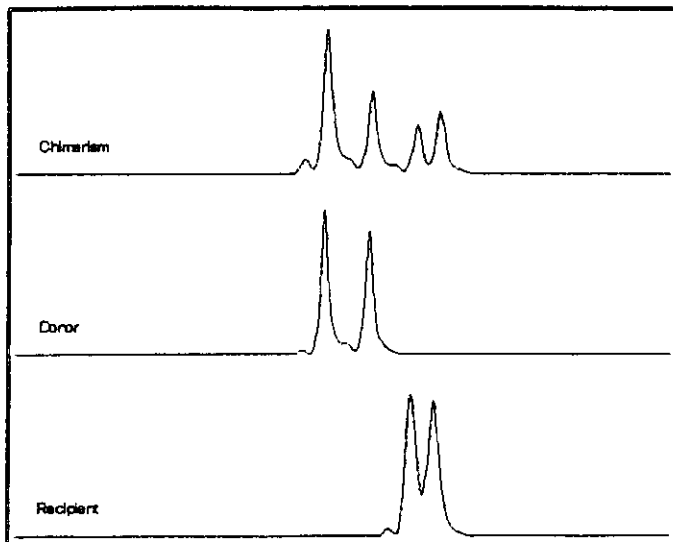
〈頭蓋骨骨吸収像〉

Day230頃より高ガンマグロブリン血症 (IgG 4600mg/dl)、さらに頭蓋骨に多発性の骨吸収像がみられるようになったのでday255に頭蓋骨の生検をおこなった。

血中サイトカイン 免疫グロブリン値の推移



検査項目 キメリズム後-ch20
 検査結果 Recipient 31%



厚生労働省 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

斎藤班「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」

主任研究者：高橋 恒夫 東京大学医科学研究所，細胞プロセッシング研究部門，教授
分担研究者：長村（井上） 登紀子、Zhen Yizhou、森 有加、岡田 ひかる、渡辺 信和、伊倉 宏一

9. タイトル：臍帯血移植成績向上のための戦略：臍帯血造血幹細胞の homing 能の改善と NK/NKT 細胞の増幅による免疫制御研究要旨：近年急速な勢いで増加している臍帯血移植 (CBT) の成績向上のために 遅延する生着速度を速め、生着をより確実にすること、拒絶を防ぐこと、GVHD を抑えた状態でかつ GVL 効果を高めることが今後期待されている。

1. 臍帯血造血幹細胞の homing 能の改善

われわれは まず骨髄 (BM) への Homing に関与する因子として 造血幹細胞の接着因子、Chemokine receptor, Matrix metalloproteinase (MMP) に注目し、臍帯血 (CB) 由来 CD34+細胞分画におけるこれら発現を G-CSF 動員末梢血 (mPB) および骨髄 (BM) 由来 CD34+細胞と比較検討した。CD44, CD11a, CD18, CD62L, CD31 および CD49d については三者ともに 同等の強い発現が認められた。CB 由来 CD34+細胞は mPB, BM に比し有意な CD49e (VLA-5), CD49f (VLA-6), CXCR4 の低下が認められた。また CB, BM 由来 CD34+細胞では mPB に比し CD54 (ICAM1) および MMP2/9 の低下も認められた。この傾向は CB の凍結融解によりさらに増強された。

また ex vivo migratory assay では CB および骨髄由来 CD34+細胞は mPB, に比し 有意に migration 能の低下を認めた。興味深いことに rhuSCF の短時間処理 (4-8 時間以内) によって CB 由来 CD34+細胞上の CD49e, CD49f, CXCR4, MMP2/9 の発現の上昇を伴った migration 能の増加を認め、in vivo での homing および生着速度を高められる可能性が示唆された。

2. NK/NKT 細胞の増幅による免疫制御

臍帯血における免疫担当細胞の一つである NK 細胞は 培養前では細胞傷害活性が全く認められず、また T 細胞も未熟である。われわれは これまで IL15 と Flt3L を用いて臍帯血単核球から NK 細胞を約 3.2-174 倍に増幅活性化し、表面マーカーの解析および細胞傷害活性を検討してきた。表面マーカーは CD56 強陽性, LFA1, VLA4 陽性, perforin 陽性であり RT-PCR にて FasL, Granzyme B も誘導された。近年 NK 細胞の細胞傷害活性は Myeloid Leukemia 有意であるとの報告がある。われわれの検討でも Myeloid 系の細胞株数種においては強い細胞傷害活性が認められたが、特に Ph1+ALL の細胞株においては全く活性が認められず他の免疫細胞群の補助が必要と思われた。

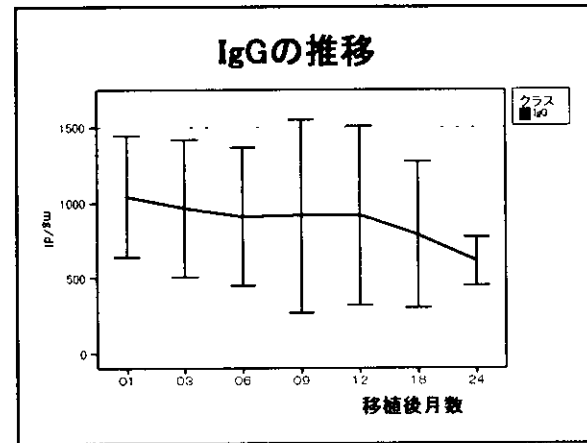
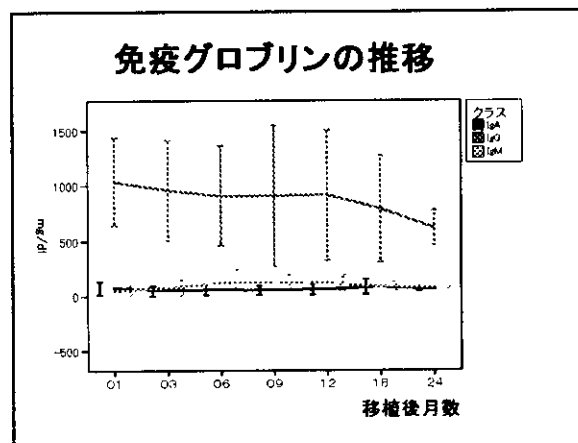
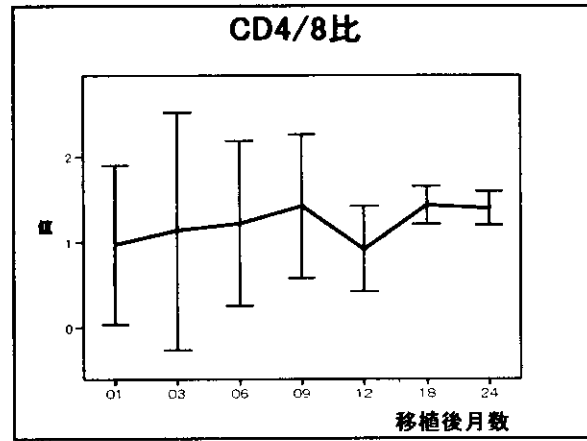
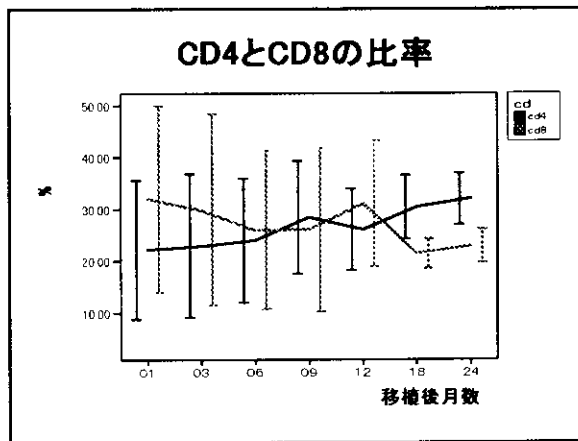
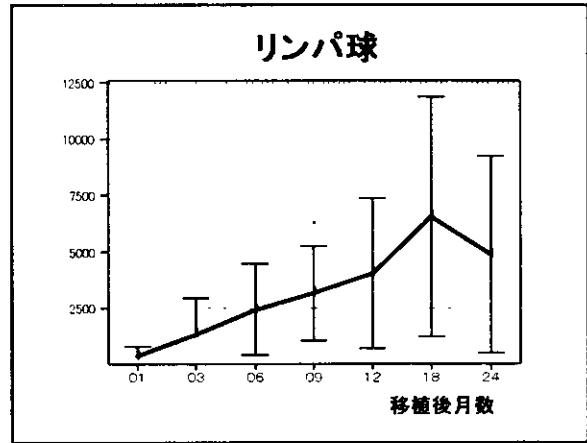
一方、われわれは 高濃度の IL15+Flt3L をベースとして α Galactoceramide の添加により CD4⁺CD8⁻V α 24/V β 11NKT の増幅 (約 3,000 倍) させることを可能とした。

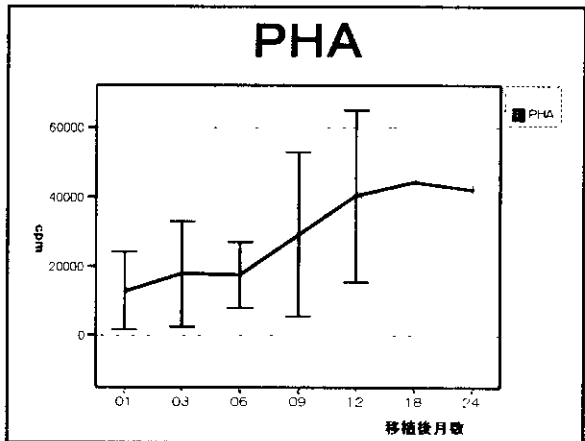
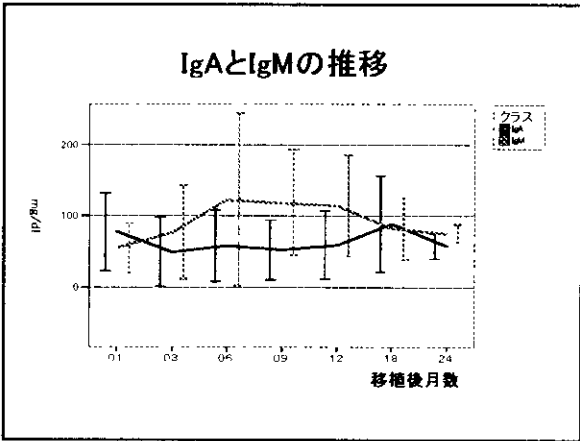
以上、免疫担当細胞の効率的かつ選択的増幅活性化を 臨床ニーズによって使い分けることで治療成績の向上につながる可能性があると思われた。

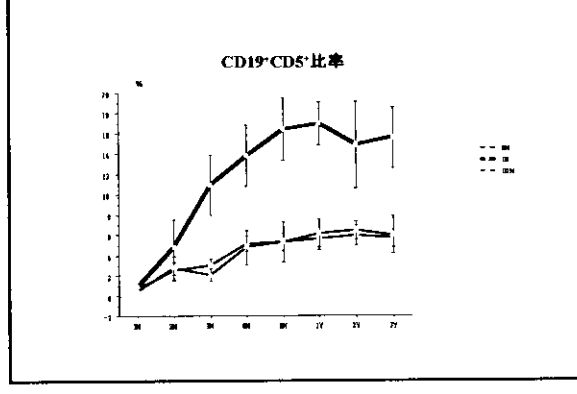
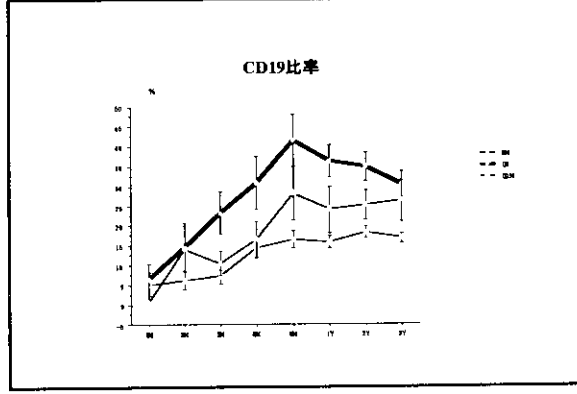
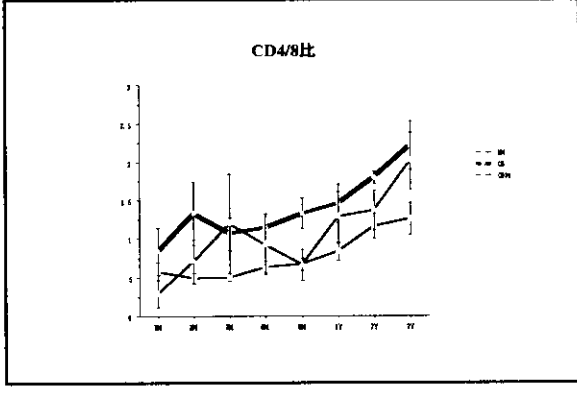
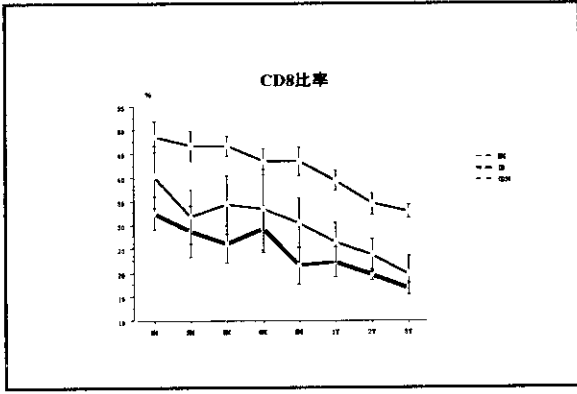
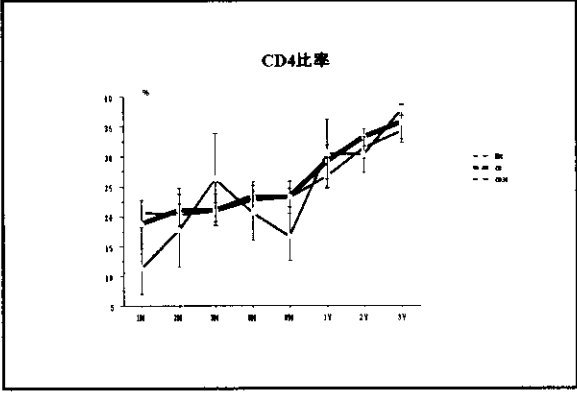
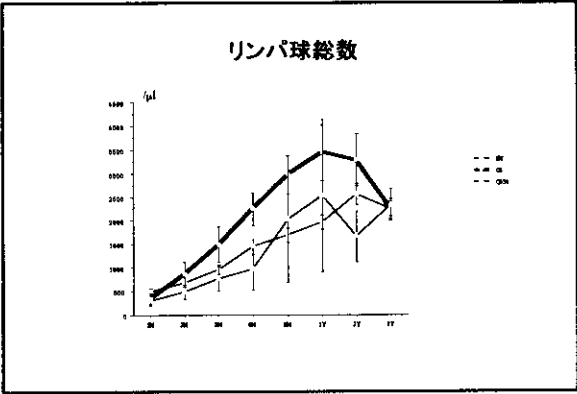
10. 臍帯血移植後の免疫グロブリンの推移

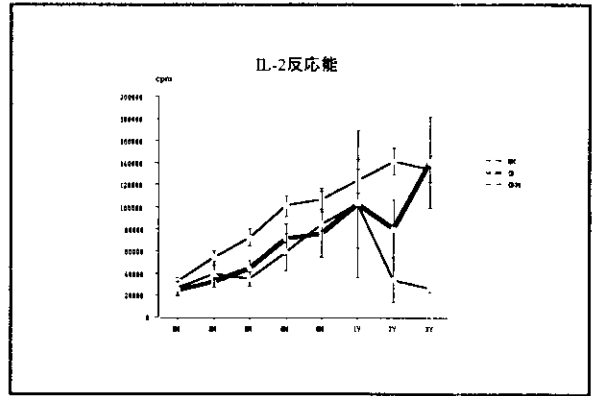
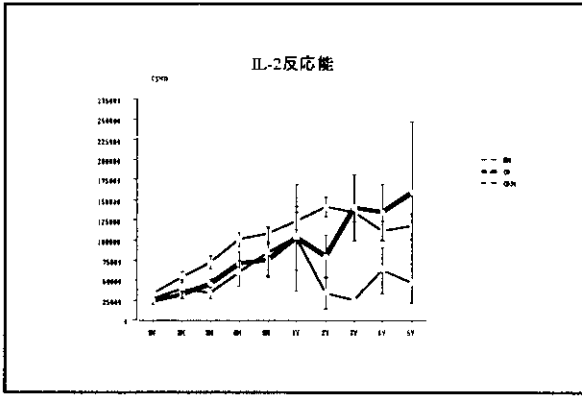
臍帯血移植後の免疫回復
—全国データからの解析—

- 症例数: 231例
- 解析項目
 1. リンパ球総数
 2. CD4、CD8陽性細胞比率
 3. CD4/CD8比
 4. 免疫グロブリン(IgG、IgA、IgM)
 5. PHA反応









11. 兵庫さい帯血バンクの現況と移植成績

班員 兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 原 宏

保存臍帯血有核細胞数と出庫

有核細胞数 (x10e8)	保存 臍帯血数	出庫件数	利用率	累計利用率 (降順)
5>	77	1	1.3%	9.7%
5-10>	532	23	4.3%	10.5%
10-15>	206	33	16.0%	22.6%
15-20>	53	22	41.5%	43.8%
20=<	11	6	54.5%	54.5%
	879	85	9.7%	9.7%

兵庫さい帯血バンク 2002.3.31 現在

HLA 適合度

(HLA-A,B serological, HLA-DRB1 DNA high resolution)			
HVG direction	GVHD direction		
6/6 match	7例	6/6 match	8例
5/6 match	23例	5/6 match	24例
4/6 match	28例	4/6 match	26例
3/6 match	16例	3/6 match	16例
Unknown	2例	unknown	2例

ABO 型

Major mismatch	28例
Minor mismatch	23例
Match	23例
Unknown	2例

兵庫さい帯血バンク

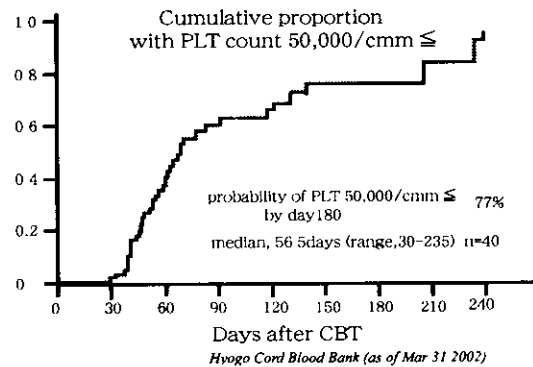
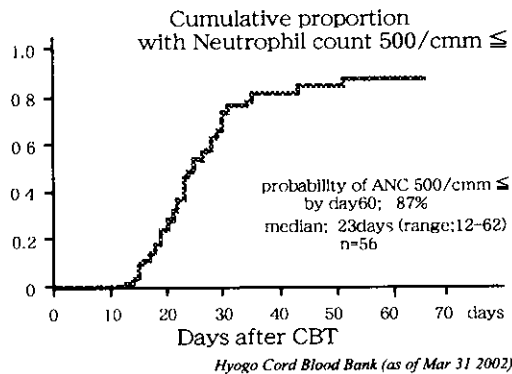
	実施件数	陽性数
HLA タイピング検査 (確認検査)	105 件	
クロスマッチ検査	71 件	2 件 (2.8%)
HLA 抗体検索検査 (LAT 法)	54 件	6 件 (11.1%)

対象 H11.04~H14.5

臍帯血移植症例 (兵庫臍帯血バンク) (2002.3.31 現在)

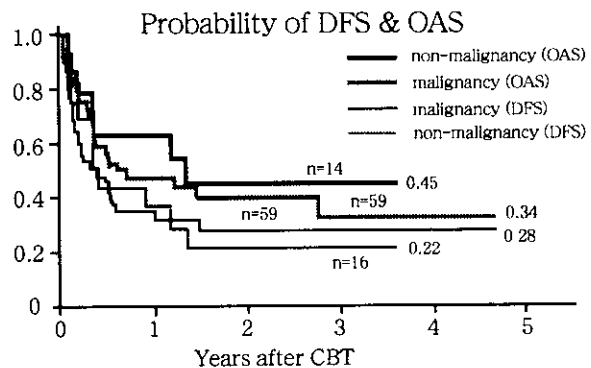
移植症例数: 74 例 (76 回)
 性 (男/女): 43 例 (44 回) / 31 例 (32 回)
 年齢 (中央値): 4 ヶ月 ~ 6 4 歳 (9 歳 6 ヶ月)
 体重 (中央値): 6 ~ 8 0 k g (26.5 k g)
 疾患:
 悪性疾患 60 例
 ALL 19 例 AML 21 例 AMLL 4 例 NK-leukemia 1 例
 CML 5 例 ATL 1 例 JMML 2 例 MDS 2 例
 NHL 2 例 HD 1 例 FEL 2 例
 非悪性疾患 14 例
 ADL 1 例 CDA 1 例 (2) CGD 2 例 PRCA 1 例
 SAA 2 例 (3) C-EBV 1 例 SCID 3 例 WA-S 2 例
 HPS 1 例
 移植時期:
 標準危険群 19 例
 高度危険群 29 例
 造血幹細胞移植の既往あり 11 例

凍結保存有核細胞数 (中央値): 1.69-15.47x10e7/kg (3.37x10e7/kg) 凍結保存 CFU/GM 数:
 0.02~3.08x10e5/kg (0.19x10e5/kg)
 凍結保存 CD34 陽性細胞数: 0.23~38.31x10e5/kg (1.24x10e5/kg)



GVHD 予防法と AGVHD

GVHD 予防法	n	AGVHD		
		NE	II=<	III<
CSA alone	8	0	3(37.5%)	0(0%)
CSA/CS	8	2	2(33.3%)	0(0%)
CSA/MTX	27	3	11(45.8%)	4(19%)
CSA/MTX/CS	4	0	4(100%)	0(0%)
FK506 alone	12	3	3(33.3%)	2(22.2%)
FK506/CS	11	3	3(37.5%)	1(12.5%)
FK506/MTX	5	1	2(50%)	1(25%)



平成14年度厚生労働科学研究
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班
「造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究」班
合同班会議

日時：2003年3月1日（土）9:00-12:00

場所：東京医科大学第一研究教育棟第1講堂(3F)

新宿区西新宿6-7-1 TEL：03-3342-6111

*発表原稿はA4用紙で80部ご用意願います。

*発表時間は発表 7分、質疑応答 3分の計10分でお願いします。

*CDまたはMOにおとしたWindowsのみ対応のPCプロジェクターを用意致します。

(9:00-9:10)

はじめに
ご挨拶

国立名古屋病院 齋藤英彦
厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室 日下英司

(9:10-9:40)

1. 造血幹細胞の均等分裂に関わる分子の単離、同定

【司会：名古屋大学 直江知樹】
金沢大学がん研究所 高倉伸幸

2. 臍帯血由来NK/T細胞の増幅、活性化と臍帯血移植後のT細胞の動態解析

東京大学医科学研究所 長村登紀子、渡辺信和

3. NOGマウスへの臍帯血移植におけるGerminal center形成と抗原特異的IgG産生

名古屋大学医学部 廣瀬由佳、清井 仁、直江知樹

(9:45-10:15)

4. インターロイキン-18はヒトさい帯血Vα24⁺ Vβ11⁺ natural killer T (NKT) 細胞からのTh1, Th2
サイトカイン産生を制御する

【司会：大阪大学微生物病研究所 仲野 徹】

兵庫医科大学 藤盛好啓、藤林由佳、粕本育代、三澤真人、甲斐俊朗、原 宏

5. 転写因子の巨核球分化における機能

大阪大学微生物病研究所 仲野 徹

6. ヒトさい帯血由来血管内皮前駆細胞株の移植によるラット大腿動脈虚血に対する効果

兵庫医科大学 藤盛好啓、仇 恵英、西岡啓介、藤林由佳、三澤真人、甲斐俊朗、原 宏、
杉原綾子、寺田信行、国立循環器病センター 永谷憲歳、神田宗武

(10:20-10:50)

7. 骨髄内移植法によるヒト造血幹細胞測定法の確立

【司会：東海大学医学部 堀田知光】

東海大学医学部 八幡 崇、安藤 潔、堀田知光

8. 臍帯血移植後の免疫能の回復遅延

名古屋大学大学院医学研究科 渡辺修大、工藤寿子、小島勢二

9. Ex vivo増幅造血幹細胞移植へ向けた基盤整備

京都大学大学院医学研究科 中畑 龍俊、伊藤 仁也

(10:55-11:45)

10. 非血縁者間臍帯血移植における臍帯血の母親のHLAタイピングの意義

【司会：兵庫医科大学 原 宏】

東海大学総合医学研究所 加藤俊一、萩原政夫、土田文子、佐藤 薫

11. 臍帯血と患者間のHLAのミスマッチが臍帯血移植に及ぼす影響

東海臍帯血バンク 矢崎 信、加藤剛二、加藤 道、石川伸子、伊藤智子、柴山真貴子、小河ひろみ

12. 乳児ALLに対する臍帯血移植療法の成績と問題点

佐賀医大小児科 石井榮一、磯山恵一、加藤剛二、小阪嘉之、乳児白血病協同研究会

13. 小児および成人造血器悪性腫瘍に対するさい帯血移植成績の比較検討：兵庫さい帯血バンクから
提供した移植例の解析

兵庫医科大学 甲斐俊朗、三澤真人、山口雅生、陳 明修、田畑雅彦、原 宏

14. 非血縁臍帯血移植の治療成績とRisk Factors

神奈川県厚木保健所 西平浩一、磯山忠一、生田孝一郎、豊田恭徳

平成14年度厚生労働科学研究

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班

「造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究」班 合同班会議

2003年3月1日

1.造血幹細胞の均等分裂に関わる分子の単離・同定

金沢大学がん研究所 高倉伸幸

幹細胞の可塑性や多様性に関心が高まっているが、我々は造血幹細胞が血管新生を誘導する機能を見出し、本概念はすでにパージャーマ病や慢性閉塞性下肢の虚血疾患等の患者の虚血部へ骨髄移植、あるいは末梢血中の CD34 陽性細胞を移植して、血管を再生するという血管細胞治療の臨床応用に発展した。これら幹細胞を用いた再生医療が発展するためには、体外での造血幹細胞の増幅技術の開発に期待がかかる場所であり、その基盤として造血幹細胞の自己複製の分子機序の解明が必要である。そこで我々は、造血幹細胞の自己複製のメカニズムを詳細にするために、幹細胞が未分化な状態を維持し、自己複製を営む生態学適所 (niche; ニッチ) を明らかにし、本ニッチを構成する細胞と造血幹細胞の細胞間相互作用の分子機序を解析してきた。従来より我々は造血幹細胞のニッチを構成する細胞は血管内皮細胞であるという仮説のもとに、造血幹細胞と血管内皮細胞の両者に共通して発現するレセプター型チロシンキナーゼ TIE2 の機能に注目して、造血幹細胞の未分化性や自己複製のメカニズムの解析を行ってきた。

その結果、本年度我々は

- 1) 血管内皮細胞と造血幹細胞の両者の TIE2 受容体が活性化することがニッチの条件であること
- 2) 恒常的活性化型の TIE2 遺伝子を TIE2 プロモーター下で発現するコンディショナルトランスジェニックマウスの解析結果、強度の TIE2 の活性化のもとでは、造血幹細胞の増殖速度およびその分化が抑制されること

を明らかにし、これらの基本概念を利用して、造血幹細胞の体外増幅を目指して、企業との連携で造血幹細胞の自己複製を誘導する培養機器の開発を開始した。

また、未分化造血幹細胞と分化した血液細胞とのサブトラクションより得られた、未分化造血幹細胞分画に発現特異性の観察される新規遺伝子の解析を行なったところ、細胞分裂において均等分裂に関わる遺伝子を同定し、本遺伝子の造血幹細胞における均等、不均等分裂に関わる可能性につき検討している。

厚生労働省 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

齋藤班「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」

分担研究者：高橋 恒夫、東京大学医科学研究所、細胞プロセッシング研究部門

研究協力者：長村（井上） 登紀子、渡辺 信和

2. タイトル：臍帯血移植後の T 細胞の動態解析と臍帯血由来 NK/T 細胞の増幅、活性化

臍帯血移植における問題点として、生着遅延による CMV 等の感染症の発症や、DLI のような抗腫瘍細胞療法が確立していないことがあげられる。これらの病態を理解して治療法を開発するためには、臍帯血移植後の免疫再構成の解析は不可欠である。

我々は、まずはじめに臍帯血移植後の T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプおよび CMV 特異的 T 細胞の解析結果を報告する。対象は、東京大学医科学研究所・附属病院で 2002 年 10 月から 12 月までに臍帯血移植を受けた 4 名の造血器悪性腫瘍患者と、5 名の健常人である。ナイーブ・メモリーフェノタイプの解析は、フローサイトメーターを用いて細胞表面の CD45RA と CD62L を測定して行った。CD8⁺ T 細胞に関しては、各フェノタイプの細胞内 perforin 分子の発現レベルを測定した。CMV 特異的 CD4⁺ T 細胞は移植後 25 日頃までは検出されないが、4 例とも 35 日目には検出された。1 例の患者が CMV 抗原血症を発症し、移植後 56、83、および 90 日目に CMV 特異的 CD4⁺ T 細胞、CMV 特異的 CD 8⁺ T 細胞を検出した。これらの CMV 特異的 T 細胞は CD45RA⁻CD62L⁻perforin^{dim} が主体で、CMV 陽性の健常人や同種骨髄移植後にみられる CD45RA⁺CD62L⁺perforin⁺の成熟した CTL は、移植後 90 日を過ぎても 10%以下であった。これらの所見は、臍帯血移植後の CMV 感染症に対する細胞療法・ワクチン療法のデザインを考えるとき、参考となる。

一方、NK 細胞および T 細胞は、臍帯血における細胞性免疫を担う重要な細胞集団である。これまでわれわれは、IL15 と Flt3L を用いて臍帯血単核球から NK 細胞を増幅活性化し、表面マーカーの解析および細胞傷害活性について報告してきた。今回 NK 細胞の細胞傷害活性を、特に Ph1 陽性細胞株を Target として比較検討したので報告する。Target 細胞として p210^{BCR/ABL}、CML type 細胞株として K562、IMS BC1、IMS BC2 と p190^{BCR/ABL} タイプの細胞株として OM9:22、KOPN30、KOPN57、KOPN72 を用いた。NK 細胞の細胞傷害活性は Flt3L+IL15 培養後 E/Tratio10:1 において p210^{BCR/ABL} タイプの細胞株では K562、BC 1、BC2 では 100%近い細胞傷害活性を認めた。一方 p190 BCR/ABL タイプの細胞株（pre-B cell ALL type）では NK 細胞による細胞傷害活性は OM9:22、KOPN30、KOPN57、KOPN72 とともに著明な低下を認めた。これらの HLA class I の発現は K562、BC1 では低下していたが、その他では発現を認め、また NK 細胞と腫瘍細胞の接着に影響する ICAM1 は P210^{BCR/ABL} および p190^{BCR/ABL} 共に強く発現していた。NK 細胞の細胞傷害活性の違いは myeloid 優位であることが予想された。今後、NK 細胞と CTL を含めて T 細胞をバランスよく増幅させ、特に ALL に対する抗腫瘍効果を誘導していくことが課題である。

3. 「NOG マウスへの臍帯血移植における Germinal center 形成と抗原特異的 IgG 産生」

名古屋大学医学部附属病院難治感染症部 廣瀬 由佳、清井 仁

名古屋大学医学部大学院分子細胞内科学 直江 知樹

[目的] 造血幹細胞を用いた治療は、造血器疾患のみならず、その適用の範囲を拡大しつつある。臍帯血移植に関しては、現在のところほぼ造血器疾患に限られた目的で使用されているが、今後さらに臍帯血移植を推進するにあたっては、解決すべき問題が残されている。その一つは、免疫能に代表される臍帯血自身の immature な character をどのように克服あるいは活用するかということであり、移植後 GVHD や感染症コントロールといった臨床に直結した問題を含んでいる。また、近年、移植後 GVHD、感染症、再発あるいは各種癌における活性化リンパ球療法が注目されており、臨床的に有効であるとの報告がなされているが、これらを評価検討するための *in vivo* モデルは確立されていない。我々は、最近開発された免疫不全 NOG マウスを用いて、免疫療法のモデルマウス作成に関し検討したので、報告する。

[方法] NOG マウスに 2.5Gy の TBI 照射後、1.CBMNC、2.CBMNC+同一検体より作成した activated CD4、3.activated CD4 を移植し、これらのマウスにヒト血清アルブミンを抗原として接種後の抗ヒト血清アルブミン IgM および IgG の産生が生じるかにつき検討した。activated CD4 は、CBMNC より CD4 陽性細胞を分離後にヒト IL-2 と抗 CD3 抗体の存在下で 10 日間の培養を行い作成した。

[結果と考察] 移植後 6 週の CBMNC 単独移植マウスでは、CD3 陽性細胞を中心とした無秩序なヒト細胞の生着増殖を認めたが、骨髄には明らかな形質細胞は存在せず、CBMNC+activated CD4 移植マウスの脾臓で、ほぼ正常なリンパ球分布と骨髄での CD38 強陽性形質細胞が確認されたことと比較し、明らかな違いを認めた。Activated CD4 単独投与マウスではヒト細胞の生着は確認されなかった。また、これらのマウスにヒト血清アルブミンを免疫したところ、CBMNC 単独投与群では、抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体のみがみられ、IgG 抗体はみられず、CBMNC+activated CD4 移植マウスでは、抗原接種後の一過性の抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体上昇とその後の減少に引き続き、抗ヒト血清アルブミン IgG 抗体産生を認めた。これらの違いを生じた原因として、投与細胞および移植後マウスより得られた細胞の FCM 解析による結果から、T 細胞における CD40L の発現の有無等が関与している可能性があると考え、さらに解析を進めており、今後、免疫療法の機序や有効性を検討するためのモデルとしての応用が期待されると考えている。

平成14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

4. インターロイキン-18はヒトさい帯血V α 24+ V β 11+ natural killer T (NKT) 細胞からのTh1, Th2サイトカイン産生を制御する

藤盛好啓¹⁾、藤林由佳²⁾、粕本育代¹⁾、三澤真人²⁾、甲斐俊朗³⁾、原 宏^{1)2) 3)}

¹⁾兵庫医科大学 先端医学研究所細胞移植部門、²⁾同 総合内科学
血液・腫瘍科、³⁾同 輸血部

【緒言】 Natural killer T (NKT) 細胞は、T 細胞とNK細胞の中間の形質を有し、腫瘍免疫や自己免疫疾患・移植片対宿主病の制御に重要な役割を担っている。IL-18はIFN- γ 誘導因子として発見されそのTh1増強作用が知られているが、近年その機能の多様性が注目されている。最近マウスの系でT細胞のみならずNK1.1+NKT細胞がIL-18に反応することが示された。我々は、ヒト臍帯血のV α 24+V β 11+ NKT細胞のIFN- γ 、IL-4産生とIL-18への反応性を検討した。

【方法】 臍帯血単核球をPE標識抗V α 24抗体で染色後、抗PEインミュノビーズを反応させ、AutoMACSで分離し、この分画をflow cytometryで解析した。さらに、 α -galactosylceramide (KRN7000)とIL-2で2週間培養した後、IL-2、IL-12、IL-18で刺激して上清中のIFN- γ 、IL-4の産生をELISA法で検討した。

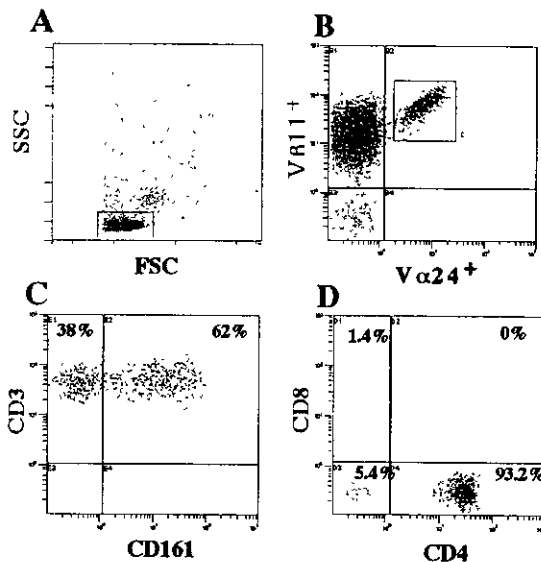


Fig. 1

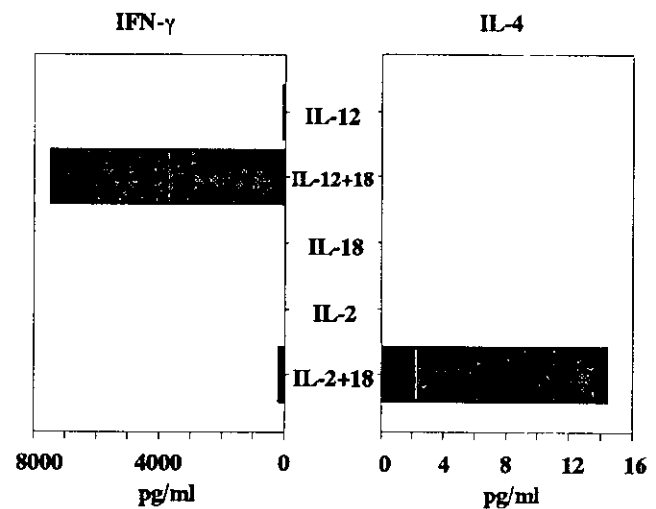


Fig. 2

【結果】

- 1) 臍帯血V α 24+ NKT細胞はCD4+が97%をしめ、DNが75%を占める成人と対照的であった。(Fig. 1)
- 2) 臍帯血V α 24+ NKT細胞はIL-18レセプターを発現していた。
- 3) 臍帯血V α 24+ NKT細胞はIL-12の存在でIFN- γ を産生し、これはIL-18との協調により著明に増強された。また、IL-2とIL-18の協調によりIL-4の産生を促進した。(Fig. 2)

【考察】 臍帯血V α 24+ V β 11+NKT細胞は、CD4+phenotypeが多く、二次刺激でIFN- γ 、IL-4を分泌し得る。IL-18は、IL-12存在下でIFN- γ 産生を促進し、IL-2存在下でIL-4産生を促進した。IL-18は、異なるサイトカインとの共存下でTh1とTh2サイトカイン産生を制御する。

5. 転写因子の巨核球分化における機能

平成14年度厚生労働科学研究 合同研究会

転写因子の巨核球分化における機能

大阪大学 微生物病研究所
仲野 徹

OP9システムによる分化誘導

5日目

中胚葉系細胞

8日目

多能性造血前駆細胞

14日目

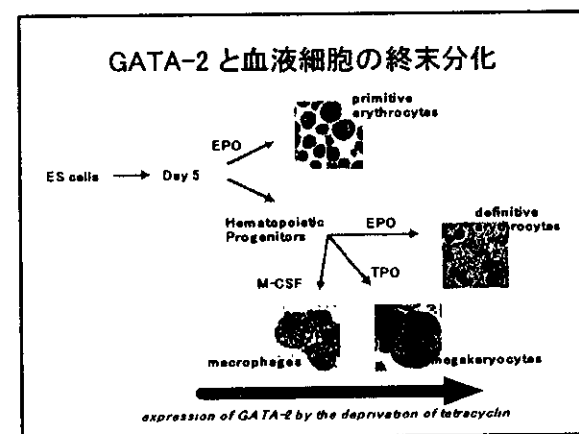
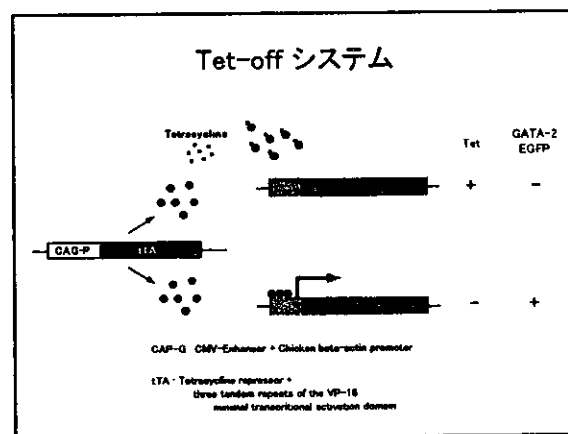
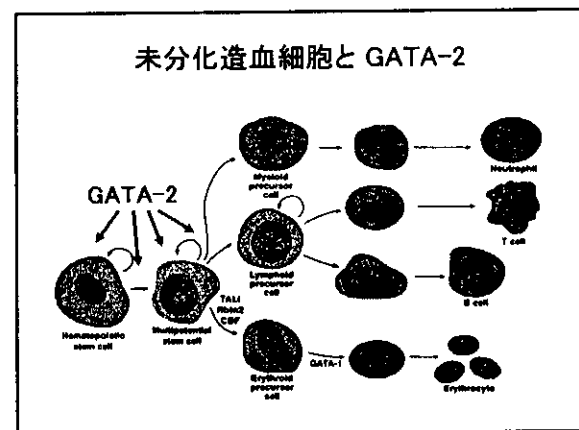
血液細胞

赤血球、顆粒球、
巨核球、マクロファージ、
 mast細胞、B細胞

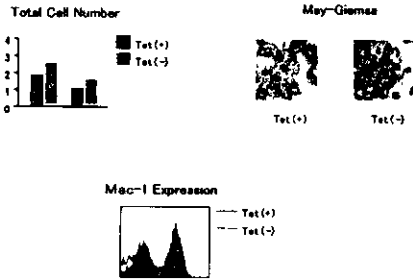
1/500 ~ 1/1000

OP9 システムにおける転写因子の発現

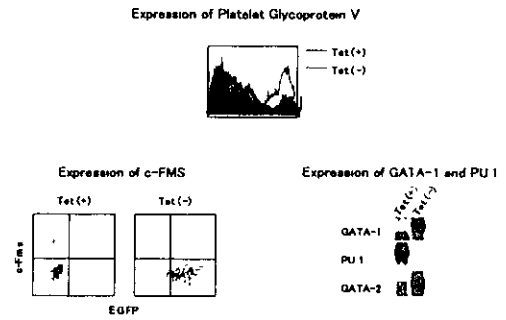
	5	6	7	8	9		5	6	7	8	9
GATA-1						PU.1					
GATA-2						c-myb					
FOG-1						SCL					
						GAPDH					



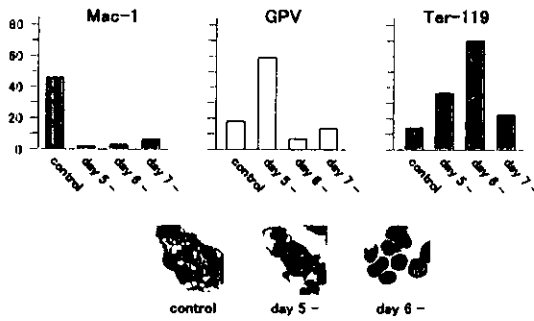
GATA-2 によるマクロファージ分化の阻害



GATA-2 による "Lineage Switch"



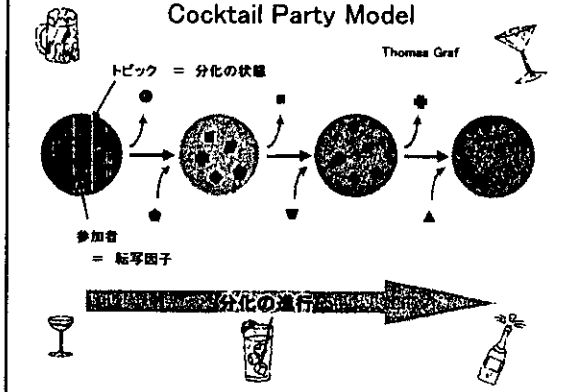
GATA-2 による分化の攪乱



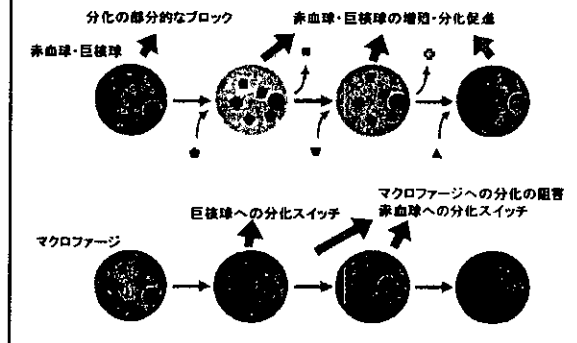
GATA-2 の発現による分化への影響

	day 5	day 6	day 7	day 8
マクロファージへの分化ブロック	++	++	+	-
巨核球系への誘導	++	-	-	-
赤血球系への誘導	+	++	+	-
GATA-1 の発現	+	+	+	+
PU.1 の抑制	+	+	+	-

Cocktail Party Model



GATA-2 の機能



6. ヒトさい帯血由来血管内皮前駆細胞株の移植によるラット大腿動脈 虚血に対する効果

藤盛好啓¹⁾、仇 恵英²⁾、西岡啓介²⁾、藤林由佳²⁾、三澤真人²⁾、甲斐俊朗³⁾、原 宏¹⁾²⁾³⁾
杉原綾子⁴⁾、寺田信行⁴⁾、永谷憲歳⁵⁾、神田宗武⁵⁾

1)兵庫医科大学 先端医学研究所細胞移植部門、2)同 総合内科学 血液・腫瘍科
3)同 輸血部、4)同 第一病理学、5)国立循環器病センター心臓内科

【目的・方法】 さい帯CD34陽性細胞を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遺伝子を導入することにより血管内皮前駆細胞株HYCEC-1を樹立した。今回、この細胞株をもちいて、左大腿動脈を結紮したヌードラットの阻血に対する効果を検討した。

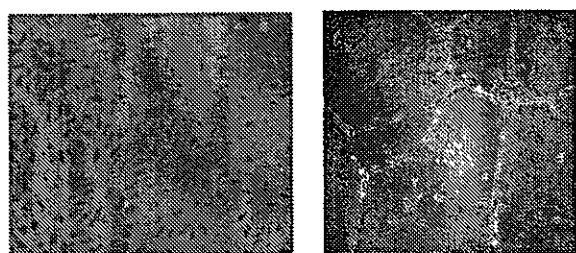


Fig. 1

Fig. 2

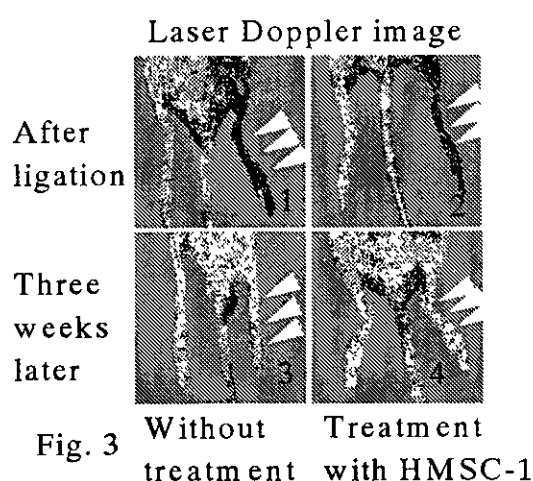


Fig. 3

Blood flow analysis
by laser Doppler

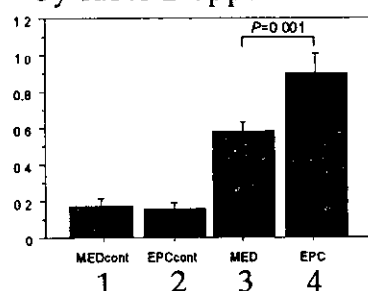


Fig. 4

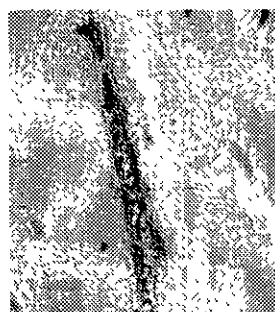


Fig. 5



Fig. 6

【結果】 さい帯血CD34(+)細胞よりSV-40T遺伝子導入することにより細胞株HYCEC-1を得た(Fig. 1)。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、CD34弱陽性であり、マトリゲル上に血管様構造を形成した(Fig. 2)。ラット大腿動脈結紮後の局所にHYCEC-1を筋注することにより、血流を改善し(Fig. 3, 4)、組織所見で血管内皮形成を確認した(Fig. 5, 6)。

【考察】 さい帯血由来血管内皮前駆細胞株HYCEC-1はin vitroで血管様構造形成した。ラット大腿動脈虚血部位にHYCEC-1を筋注することにより、血流を改善し、組織所見で血管内皮を形成した。HYCEC-1は血管内皮の再生に有用と考える。

平成14年度厚生労働科学研究

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議

平成15年3月1日 於 東京医科大学第一研究教育棟第一講堂

7. 骨髄内移植法によるヒト造血幹細胞測定法の確立

班員：東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 堀田知光

協力者：東海大学医学部再生医学センター・造血再生部門 八幡 崇、安藤 潔、
佐藤忠之、宮武浩子、中村嘉彦、六車ゆかり、加藤俊一

【目的】ヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能を調べる研究では NOD/SCID マウス尾静脈よりヒト幹細胞を移入する方法 (SRC 法) が一般的である。造血幹細胞は骨髄環境の中で支持され、分化・成熟していくが、ヒト/マウス間移植においては血流中から骨髄環境に到達 (homing) するまでに肺や肝臓に捕捉される等様々な障害があり造血の場である骨髄環境内に辿りつける幹細胞は経静脈移入した細胞の数%以下であるとされており、非常に効率が悪い。そこで我々は、造血幹細胞の homing を阻害する因子を排除することを目的として、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞をマウス骨髄内に直接移植することにより、より高感度な生体内ヒト造血再構築能測定法の開発を試みたので報告する。

【方法と結果】骨髄内直接移植 (iBM) と経尾静脈移植 (iv) による臍帯血由来 Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞集団に含まれる幹細胞の頻度 (SRC frequency) の検出感度の違いを限界希釈法により比較した。その結果、iv 移植では 660 個に 1 の頻度で幹細胞が検出された。一方、iBM 移植では 44 個に 1 個の頻度で幹細胞が検出され、iv 移植のおよそ 15 倍高い感度でヒト造血幹細胞を解析できることが明らかとなった。iBM 移植で生着したヒト造血細胞は、移植した骨髄のみならず反対側の骨髄、脾臓および末梢血中で検出され、それら生着した造血細胞は従来の iv 移植と同様に多分化能と自己複製能を示した。さらに、一次移植により生着したヒト造血細胞を iBM 移植によって二次移植を行うことによって、iv 移植に比べて非常に高い生着率が得られることを見いだした。また、生着に関わるとされている各分子に対する抗体を用いた阻害実験により、本 iBM 移植法がヒト造血幹細胞の生着に関わる分子機構を解析するための優れた手法であることを示した。