

200.21653

---

厚生科学研究費補助金  
医薬安全総合研究事業  
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14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

HEALTH AND LABOUR SCIENCES RESEARCH GRANTS  
RESEARCH ON PHARMACETUTICAL AND MEDICAL SAFETY  
THE MINISTRY OF HEALTH, WELFARE AND LABOR, JAPAN

主任研究者 加藤 俊一

平成15(2003)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14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。

昨年度に引き続き、本年度も計画どおりに研究が進行し、多くの論文として発表することができた。研究分担者ならびに協力者の努力の結果であると自己評価すると同時に、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	3
II. 研究組織	7
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	13
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	16
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	18
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	20
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	23

# 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

主任研究者 加藤俊一 東海大学医学部再生医療科学・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ことが期待できる。

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<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>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。

平成14年度は13年度の成果をさらに発展させるために、以下のような研究を行った。

B. 研究方法

1. ウイルス特異的細胞傷害性リンパ球の臍帯血からの誘導法（分担研究：加藤俊一）
  - 1) 臍帯血中の樹状細胞(DC)の頻度
  - 2) より成熟度の高いDCを臍帯単球から誘導する方法
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T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) 幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子の同定
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 CD 3 4 陽性細胞から DC 細胞の誘導法の検討
- 2) CD 3 4 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) NK T 細胞の増幅と DC による活性化の検討

## C. 研究結果

### 1. 臍帯血中の DC に関する検討 (分担研究:加藤俊一)

臍帯血中の DC の頻度は、DC1;  $0.15 \pm 0.03$ 、DC2;  $0.05 \pm 0.05$  であり、いずれも成人末梢血コントロール (DC1;  $0.28 \pm 0.12$ 、DC2;  $0.11 \pm 0.06$ ) と比べて有意に低値であった。

また、臍帯単球由来 DC は TNF 単独では十分な成熟が得られず、TNF+IL-1+IFN 添加において有意な成熟が得られた (CD80; TNF 単独 38% → TNF+IL-1+IFN 72%)。

### 2. 臍帯血幹細胞から T リンパ球への誘導 (分担研究:安藤 潔)

NOG マウスを利用することにより臍帯血 CD34 細胞が成熟 T 細胞まで分化することを確認した。

すなわち臍帯血 CD34 細胞を移植した NOG マウスでは移植後 1 2 週頃より末梢血中にヒト CD3 細胞が出現し、これらの細胞は CD4 細胞 50%、CD8 細胞 47% であり、TCR  $\alpha\beta$  陽性であった。胸腺では CD4+CD8+細胞、CD4 細胞、CD8 細胞、脾臓では CD4 細胞、CD8 細胞を検出した。TCRV $\beta$  のクロナリティーは健康成人末梢血の T 細胞と同様なポリクローナルなパターンを示した。さらに脾臓の T 細胞は PHA、IL-2 および同種抗原に反応したが、マウス細胞および自己非 T

細胞には反応を示さなかった。

### 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)

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。幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子として SCGF および Delta-1(Notch ligand family)遺伝子を単離した。

### 4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発 (分担研究:萩原政夫)

臍帯血 CD 3 4 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 1 0 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- $\alpha$  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。

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- $\gamma$  産生能の上昇を認めた。

臍帯血 NKT 細胞は  $\alpha$ 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 $\gamma$ ) 優位なサイトカ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

本年度は昨年度の研究成果をさらに発展させ、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とそのメカニズムについての詳細が検討された。

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. ウイルス特異的 CTL の誘導法の研究

臍帯血中 DC 頻度は、成人末梢血に比し有意に低値である。又臍帯単球からサイトカイン (GM-CSF+IL-4+TNF $\alpha$ ) を用いて誘導した DC は、細胞表面特に CD80 抗原発現が弱い。これに対して IL-1 $\beta$ +IFN- $\alpha$  を添加することによって、有意な発現の上昇が得られた。

##### 2. 体外増幅臍帯血幹細胞から B 細胞の誘導の検討

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。増幅幹細胞は新たに開発さ

れた NOG マウスを用いて T リンパ球に分化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

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。幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子として SCGF および Delta-1 (Notch ligand family) 遺伝子を単離した。

##### 4. マウス stroma 細胞を用いた臍帯血樹状細胞増幅系の開発

マウス stroma を用いた培養系によって、臍帯血 CD3 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。

## 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	平成15年3月まで 東海大学総合医学 研究所 細胞移植学 平成15年4月より 東海大学医学部 細胞移植、再生医学	研究計画立案と総括 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医薬安全総合研究事業  
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 東海大学医学部再生医療科学・教授

研究要旨

臍帯血中 DC 頻度は、成人末梢血に比し有意に低値である。又臍帯単球からサイトカイン (GM-CSF+IL-4+TNF $\alpha$ ) を用いて誘導した DC は、細胞表面特に CD80 抗原発現が弱い。これに対して IL-1 $\beta$ +IFN- $\alpha$  を添加することによって、有意な発現の上昇が得られた。

A. 研究目的

本研究においては、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を開発することを最終目的としているが、臍帯血 naïve T 細胞から抗 CMV-CTL を誘導するに際して、樹状細胞 (dendritic cell、DC) は不可欠である。

本年度は、臍帯血中の DC 頻度について 4 color flowcytometry 法によって明らかにし、さらにより成熟度の高い DC を臍帯単球から誘導する方法について検討した。

B. 研究方法

1) 臍帯全血から各種 lineage marker (CD3,14,16,33,19,56)陰性かつ DR 陽性分画をさらに CD11c 陽性又は CD123 陽性領域に分け、各々 DC1, DC2 と定義した。それぞれ頻度について測定し、成人末梢血の DC1, DC2 と比較した。

2) 臍帯血から CD14 陽性細胞を MACSbeads で分離した。同細胞を GM-CSF+IL-4 にて DC へと誘導した。培養 7 日目において、成熟因子として従来より用いられる TNF- $\alpha$  単独又は TNF+IL-1 $\beta$ +IFN- $\alpha$  を添加し 48 時間後のマーカー (CD80,86) の発現頻度

について比較検討した。

C. 研究結果

1) 臍帯血中の DC の頻度は、DC1;0.15 $\pm$ 0.03、DC2;0.05 $\pm$ 0.05 であり、いずれも成人末梢血コントロール (DC1;0.28 $\pm$ 0.12、DC2;0.11 $\pm$ 0.06 と比べて有意に低値であった (図 1 a, b)。

2) 臍帯血単球由来 DC は TNF 単独では十分な成熟が得られず、TNF+IL-1+IFN 添加において有意な成熟が得られた (CD80;TNF 単独 38% $\rightarrow$ TNF+IL-1+IFN 72%、図 2)。

D. 考案

臍帯血には本来 DC が十分含まれていないことを考えると、抗原特異的 CTL 誘導にはその前駆細胞から誘導した DC の補助が必要である。

ただし他の報告にもある如く、臍帯単球由来は機能的成熟が得られにくい。我々の検討でも、最も重要な表面抗原である CD80 発現の有意な上昇は TNF に加え、IL-1, IFN を添加することによって得られた。

今後の課題は、この様に表面抗原上成熟化した臍帯血単球由来 DC が、さらに機能的

にも成人 DC と比べ遜色ないものか否かを明らかとし、これを用いることによって in vitro で CTL 誘導が可能か否かを明らかとすることである。

#### E. 結論

臍帯血中 DC 頻度は、成人末梢血に比し有意に低値である。又臍帯単球からサイトカイン (GM-CSF+IL-4+TNF $\alpha$ ) を用いて誘導した DC は、細胞表面特に CD80 抗原発現が弱い。これに対して IL-1 $\beta$ +IFN- $\alpha$  を添加することによって、有意な発現の上昇が得られた。

#### 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髄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。

加藤俊一：造血幹細胞移植。「血液・造血器疾患の治療と看護」堀田知光他編、南江堂 242-272、2002。

##### 2. 論文発表

Tsuchiya T, Hagihara M, Shimakura Y, Ueda Y, Gansuud B, Munkhbat B, Inoue H, Tazume K, Kato S, Hotta: The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cell. Int J Hematology, 2002; 75:55-62.

Gansuud B, Hagihara M, Ying Y, Inoue H, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Ando K, Nakamura Y, Munkhtuvshin N, Kato S, Thomas JM, Hotta T: Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. Human Immunology, 2002; 63:164-175.

Hagihara M, Gansuud B, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Tazume K, Inoue H, Kato S, Hotta T: Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCR Valpha24+ NKT cells against normal and malignant hematological cells in

vitro: a comparative study with NK cells or OKT3 activated T lymphocytes or with adult peripheral blood NKT cells. Cancer Immunology

Immunotherapy, 2002; 51: 1-8.

Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S, Hotta T: Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetes/Shi-scid, IL-2 receptor  $\gamma$  null mice. J Immunol, 2002; 169:204-209.

Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y: The clinical significance of human leukocyte antigen(HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. Blood, 2002; 99:4200-4206.

Li C, Ando K, Kametani Y, Oki M, Hagihara M, Shimamura K, Habu S, Kato S, Hotta T.: Reconstitution of functional human B lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted with ex vivo expanded CD34(+) cord blood cells. Exp Hematol, 2002; 30:1036-43.

Kojima S, Matsuyama T, Kato S, Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta K, Kodera Y.: Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. Blood, 2002; 100:799-803.

Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S: Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV<sup>r</sup>) herpes simplex virus type 1: emergence of Foscarnet-resistant virus originating from the ACV<sup>r</sup> virus. Journal of Medical Virology, 2002; 68:99-104.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特許取得・実用新案登録

図1. 成人末梢血中と臍帯血中のDC頻度

a) DC1

b) DC2

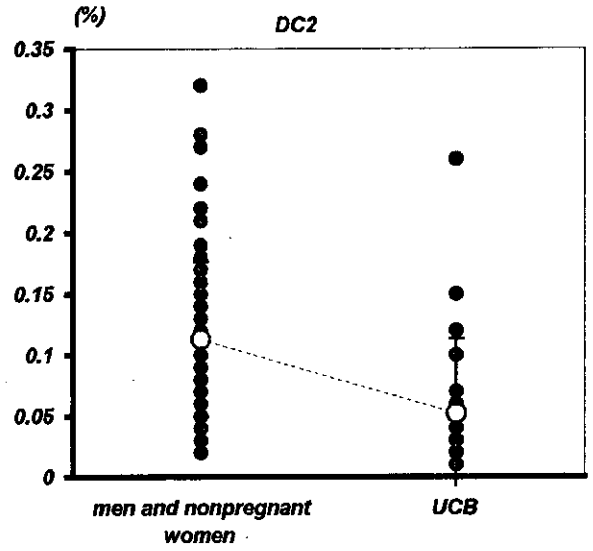
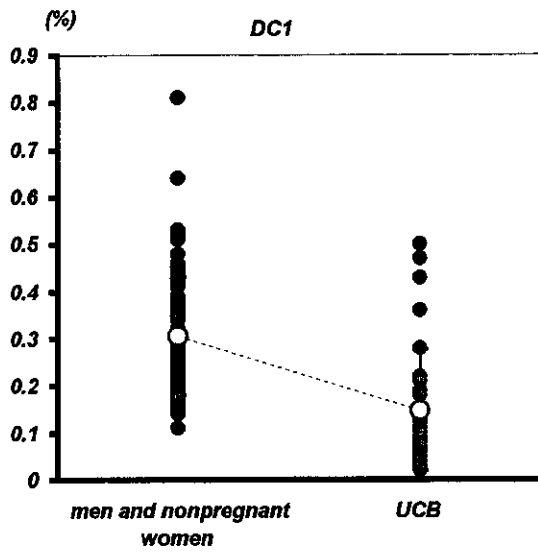
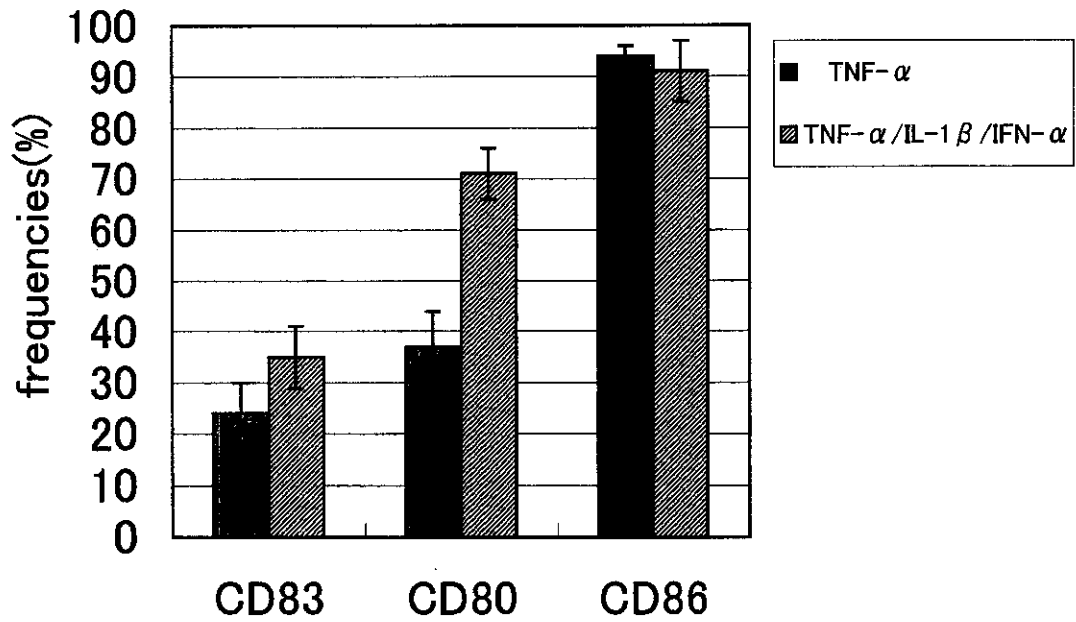


図2. 臍帯血 DC の成熟誘導



厚生科学研究補助金医薬安全総合研究事業  
分担研究報告書

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。また、増幅幹細胞は新たに開発されたNOGマウスを用いてT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14年度は増幅した造血前駆・幹細胞をT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

ヒト造血幹細胞からT細胞への分化は従来、ヒト胎児胸腺と造血幹細胞を免疫不全マウスに移植したSCID-Huマウスあるいはマウス胎児胸腺を用いた胎児胸腺器官培養(FTOC)により解析されてきた。しかしながら前者はヒト胎児組織を利用することが困難であること、後者は成熟T細胞まで分化させることが困難である等の問題点があった。

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T細胞への分化能を検討するために、実験動物中央研究所の伊藤らが開発したNOD/Shi-scid, IL-2R・欠損(NOG)マウスに移植した。

C. 研究結果

実験動物中央研究所の伊藤らが開発したNOD/Shi-scid, IL-2R・欠損(NOG)マウスを利用することにより臍帯血CD34細胞が成熟T細胞

まで分化することを確認した<sup>36)</sup>。すなわち臍帯血CD34細胞を移植したNOGマウスでは移植後12週頃より末梢血中にヒトCD3細胞が出現し、これらの細胞はCD4細胞50%、CD8細胞47%であり、TCR $\alpha\beta$ 陽性であった。胸腺ではCD4+CD8+細胞、CD4細胞、CD8細胞、脾臓ではCD4細胞、CD8細胞を検出した。

TCRV $\cdot$ のクロナリティーは健康成人末梢血のT細胞と同様なポリクローナルなパターンを示した。さらに脾臓のT細胞はPHA, IL-2および同種抗原に反応したが、マウス細胞および自己非T細胞には反応を示さなかった。

D. 考案

以上の結果より増幅された臍帯血CD34+細胞がマウス胸腺内でCD4+細胞あるいはCD8+細胞に分化し、これらの細胞はポジティブおよびネガティブ選択を受けた成熟T細胞として末梢リンパ組織に分布していることを示している。この系を利用することによっても体外増幅された臍帯血CD34+細胞がアロ特異的T細胞まで分化可能であることが示される。

## E. 結論

ヒト造血幹細胞を増幅し、それらがアロ特異的 T 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) Int J Hematol. 75, 370-375, 2002
- 2) Exp Hematol 30, 1036-1043, 2002
- 3) J Immunology 169, 204-209, 2002
- 4) J Cell Biol, 157, 571-577, 2002
- 5) Human Immunol, 63, 164-175, 2002
- 6) Int Immunol. 14, 1113-1124, 2002
- 7) Blood, in press, 2003
- 8) J Am Coll Cardiol, in press, 2003

## 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

厚生科学研究補助金医薬安全総合研究事業

分担研究報告書

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。幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子として SCGF および Delta-1(Notch ligand family)遺伝子を単離した。

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14年度はマウス骨髄ストローマ細胞株 HESS-5 で発現の増加している分子として SCGF および Delta-1(Notch ligand family) 遺伝子を単離した。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34+細胞の増幅を支持するマウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 および支持能の低い MS-5 より mRNA を抽出して、幹細胞増幅に関与することが想定される以下の遺伝子について半定量的 RT-PCR 法により発現を比較した。

Bone morphogenetic protein 4, sonic hedgehog, Jagged-1, Delta-1, Delta-4, VCAM-1, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , Flk-2/Flt-3 ligand(Flk-2), G-CSF, GM-CSF, IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF), Stem cell factor (SCF), stem cell growth factor (SCGF), thrombopoietin(TPO), GF- $\beta$ , IFN- $\gamma$

2. HESS-5 より mRNA を抽出して、マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 および支持能の低い MS-5cDNA の全長を RT-PCR cloning した。

C. 研究結果と考察

マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 は支持能の低い MS-5 と比較して、SCGF および

Delta-1 の遺伝子発現が高かった。

Delta-1 は Notch の ligand であることが知られている。Notch はショウジョウバエの変異体より見いだされた遺伝子で、未分化な腹側外胚葉(神経外胚葉)の発生運命を制御する細胞間相互作用にかかわる受容体である。ニューロブラストと表皮細胞の分化選択を制御している。その後、Notch は広く多様な細胞の分化能、分化状態を制御する機能があることが明らかとなってきた。血液細胞に関しても、CD4/CD8 細胞や TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$ 細胞などの T 細胞の分化や骨髄系細胞の分化制御にも関与することが報告されている。造血幹細胞は Notch-1, 2 を発現しており、可溶性 Jagged-1, Delta-1, Delta-4 は試験管内で造血前駆細胞の増殖を促すことが報告されている。以上の結果より骨髄微小環境の中で Notch-Notch ligand 系も造血幹細胞の増幅に関与しているものと考えられている。HESS-5 においてもこれらの遺伝子がヒト造血幹細胞の増幅に関与している可能性が考えられ、今後ストローマ細胞を代替できる因子として検討していく予定である。



## E. 結論

2002年7月9日の厚生労働省医政局研究開発振興課長による通知「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」により異種のスローマ細胞を利用して増幅したヒト造血幹細胞を移植することは異種移植に該当することとなり、今後は HESS-5 細胞を代替できる因子として Delta-1 などの分子の検討を行う必要がある。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Int J Hematol. 75, 370-375, 2002
- 2) Exp Hematol 30, 1036-1043, 2002
- 3) J Immunology 169, 204-209, 2002
- 4) J Cell Biol, 157, 571-577, 2002
- 5) Human Immunol, 63, 164-175, 2002
- 6) Blood, in press, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 CD3 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 CD3 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 CD3 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) CD3 4 陽性細胞由来NK細胞誘導及びDCによる活性化；CD3 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 $\gamma$ 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 $\alpha$ GalCer+IL-2 (100U/ml)によって2週間刺激培養し、増殖したTCRV $\alpha$ 24/V $\beta$ 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 $\gamma$ ・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 CD 3 4 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- $\alpha$  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- $\gamma$  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  $\alpha$  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  $\gamma$ ) 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 CD 3 4 陽性細胞から大量の DC が増幅可能であることが明らかとされた。これは理論上、1 CD 3 4 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 NK T 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 TCRValpha24+ 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. Enhancement of Human Cord Blood CD34+Cell-Derived NK Cell Cytotoxicity By Dendritic Cells. J Immunol 2001, 166, 1590-1600