

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。研究期間中臍帯血幹細胞を MACS により分離システムを確立し、肝細胞へ分化の可能性を示唆した。また、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。さらに抗酸化茶摂取による酸化損傷バイオマーカーの改善が認められた。

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。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マウスに移植し、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かを目的とする。本実験を行うにあたって、初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、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。本年度ではわれわれが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を目的とした。さらに、企業側では、初年度老化やガン・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ル技術を使って偵察することを目的とした。また、体内におけるミネラルの重要性がうたわれている。その中でも銅は酸化障害における酸化の前駆物質である一方、活性酸素を消去する SOD の構成成分となっている。本年度は血清中の銅と亜鉛濃度を測定し、性別、年代別での評価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した。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。造血幹細胞 In vivo の確認は NOD/Scid mouse への移植により行った。さらに、生体内での造血幹細胞から肝細胞に分化しやすい宿主肝臓環境づくりについて検討した。

2) 造血幹細胞の肝細胞への分化誘導実験：

A. 臍帯血幹細胞から肝細胞への分化：8~12 週齢の雌 NOD/Scid マウスに 2.5Gly(0.8Gly/min)を radiation した群としない群にわけそれぞれに抗 asialo GM1 抗体 20 μ l を全量 500 μ l となるように PBS にて調製した後、腹腔内に投与する。その後アデノウイルスを用いた Cre-loxP システムにて肝障害モデルを作成する。FasL(6 \times 10⁹ pfu/ml)70 μ l および c-myc(6 \times 10⁸pfu/ml)500 μ l および Cre のカクテルを作成

した後マウスの尾静脈から静注する。作成したマウスに分離精製した CD34⁺ lin⁻ 細胞および CD34⁻ 細胞を 5×10^4 cell/500 μ l を尾静脈投与し、1~5 ヶ月飼育した。なお分離精製した CD34⁺ lin⁻ 細胞は純度 80% 以上のものを用いることとした。投与後 1 ヶ月、5 ヶ月経過の後マウス肝組織、骨髄、脾臓、末梢血について検討した。肝組織は OTC コンパウンドにて包埋し、液体窒素にて凍結保存する。その後クライオスタットにて 4 μ m の薄切、風乾、PBS の洗浄をおこない Formol Calcium にて 2 分間固定をへて PBS 洗浄後、人アルブミン一次抗体 (sheep anti human albumin:HRP 大日本製薬株式会社) 反応を 1~3 時間行い、再度 PBS 洗浄する。次に DAB による発色、核染を行った。なお一次抗体は NOD/SCID マウスに一度静注をおこなった後その血清を用いることでマウス肝に対する非特異的反応を取り除いてある。骨髄、脾臓、末梢血は細胞を抽出し、 1.0×10^6 細胞を human CD45-PE にて 4°C 20 分抗体反応させた後、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、PBS 1ml に混濁して FACS による解析を行った。

B. GFP トランスジェニックマウスを用いた骨髄細胞から肝細胞への分化の実験方法の確立：GFP トランスジェニックマウスから骨髄細胞を無菌的に採取。 10^5 個の細胞を同系マウスに移植し骨髄細胞の分化過程を検討して肝細胞への分化の trigger を検討中である。予備実験では、四塩化炭素障害による慢性肝障害マウス、放射線照射 (900 rad) + 四塩化炭素障害による慢性肝障害マウス、対照群で比較した。

3) 動物モデルの確立および遺伝子治療法の検討：

急性肝障害モデル：マウスを用い、HGF 投与群は HGF 50 μ 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 μ 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。

遺伝子治療法：初年度は非ウイルス遺伝子導入法としての electroporation (EP) 法を確立した。本年度では、EP 法よりも遺伝子導入効率が高く、かつ安全性も EP 法に劣らない方法として、第 4 世代 lenti virus を用いた遺伝子導入および蛋白発現を in vitro で開発した。現在、用いられている lenti virus は第 2 世代あるいは第 3 世代のものであり、安全性については高く評価されているが、その安全性をより高めた第 4 世代 lenti virus を他研究機関との協同研究によって開発した。

4) 抗酸化性即席緑茶 (抗酸化茶) および血清中銅と亜鉛濃度の測定の検討：

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。また、抗酸化茶摂取プロトコールでは、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。さらに、血清中銅と亜鉛濃度の測定は男性 93 名、女性 99 名の計 184 名で行った。血清サンプルを用い ICPS-8000 (島津製作所) で銅と亜鉛の濃度を測定した。測定値を性別、年代別にまとめ、評価を行った。

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。

3. 研究成果

1) 臍帯血造血幹細胞の FACS 解析において分離精製システムによって 99.25% CD34⁺Lin⁻細胞を得た。造血幹細胞の分化能の確認については、NOD/Scid マウスに 5.0×10^4 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 にて解析を行い、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⁻細胞を投与したマウスでは検出されなかったことがわかった。さらに、生体内での造血幹細胞から肝細胞に分化しやすい宿主肝臓環境作りの検討では、FasL 遺伝子導入により肝臓の障害を確認したところ、肝障害を起こしていることが確認できたことから、適切な量で行えば肝臓障害の方法として使用できることがわかった。

2) 造血幹細胞の肝細胞への分化誘導実験では、臍帯血造血幹細胞を投与していない NOD/SCID マウスの肝切片は人アルブミン陽性細胞は認められなかった。Radiation 障害のみのマウスでは人アルブミン陽性細胞は切片中にごくわずかに認められるのみであった。一方、FasL を用いた肝障害を与えた群は radiation のみの群に比べアルブミン陽性細胞は増加を認めた。CD34⁺ (n=2), CD34⁻ (n=1)での結果では両群ともに人アルブミン陽性細胞がみとめられ有意差は認められなかった。また、ヒト CD45-PE の FACS 解析においては、FasL および radiation 処置を施した NOD/SCID マウスでは CD45-PE 陽性細胞のピークが末梢血、骨髄、脾臓中に認められたが、FasL のみの群では末梢血でピークを認めるものの骨髄および脾臓中ではごくわずかであった。マウス骨髄を用いた検討については、四塩化炭素単独、放射線併用群で優位に GFP 陽性細胞が、主に肝障害部位に集簇していた。さらに放射線照射の有無による影響を検討したところ、放射線照射マウスがより GFP 陽性細胞がより広範に観察された。移植後の経時的観察では GFP 陽性細胞が 1 週目から強く見られ 3 週目には陽性範囲も増加した。GFP 陽性細胞は 2 重蛍光抗体法で検討すると、Factor VIII 陽性の内皮細胞とアルブミン陽性の肝細胞の両者に分化していた。今後さらに肝細胞分化に関わる因子の遺伝子群を検討する予定である。

3) 遺伝子治療法の検討については、HGF 50 μ 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。また、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。一方肝細胞のアポトーシス像は HGF 群で低下し画像解析により優位に低下を認めた。さらに、慢性肝不全モデルでは、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、ビリルビン値の優位な低下である。特にビリルビン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。一方アルブミンはあまり相違が見られず 14 日目 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

4) 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。抗酸化能力の改善では、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 μ M (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で

は、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。銅と亜鉛のどちらにおいても、女性のほうが高値となった。(銅:男性平均 93 μ g/dl、女性平均 106 μ g/dl 亜鉛:男性平均 803ng/ml、女性平均 822ng/ml) また、明確な年代別の差は見られなかったが、男性の亜鉛が年代をおうごとに減少していく傾向があった。

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、マウス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。造血幹細胞の肝細胞への分化誘導実験では、FasL を用いた肝障害を与えた群は radiation のみの群に比べアルブミン陽性細胞は増加を認めた。マウス骨髄を用いた検討については、四塩化炭素単独、放射線併用群で優位に GFP 陽性細胞が、主に肝障害部位に集簇していた。GFP 陽性細胞は 2 重蛍光抗体法で検討すると、Factor VIII 陽性の内皮細胞と アルブミン陽性の肝細胞の両者に分化していた。今後さらに肝細胞分化に関わる因子の遺伝子群を検討する予定である。

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 a. 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、b. 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、c. 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。また、銅は、臨床的には炎症性疾患と妊娠時に上昇することが知られている。しかし、酸化ストレスや老化という観点から見ると、酸化の前駆物質であり、SOD の構成成分であるということが注目される。そこで、性別、年代別にデータをまとめたが、性別による違いが見られた。(p<0.01) エストロゲンの分泌により銅の値が上昇することが原因と考えられる。また、年代別の差は見られなかった。一方、亜鉛は正常な生命維持に不可欠な微量元素で、発生、成長、組織の修復、骨の維持、生殖、感覚、食欲、免疫機能などさまざまな機能が亜鉛に依存している。特に最近では、亜鉛欠乏による

味覚障害に注目が集まっている。また銅と同様に、SOD の構成成分である。データにおいては性別では、銅と同様に女性のほうが高い傾向が見られたが、有意差は見られなかった。また、年代別の差も見られなかった。銅、亜鉛のどちらにおいても年代を追うごとに減少することが期待されたが、その傾向は見られなかった。まだn数が 200 前後と少ないため、今後データを蓄積し、解析していくことが必要だと考えられる。微量ミネラルの重要性はいろいろなところで注目が集まっている。実際のデータを解析し、老化や酸化ストレスとの関連をさがしていくことで、よりその重要性が増すと考えられる。

5. まとめ

1) 臍帯血からの造血幹細胞を自動磁気分離装置用い、分離、精製システムを確立し、In vivo において肝細胞へ分化の可能性を示唆した。2) 非ウイルスベクター遺伝子導入法としての EP 法を確立し、安全性については高く評価されている第 4 世代 lentivirus vector を用いた遺伝子導入法を開発した。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去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、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

1.Xue F, Takahara T, Yata Y, Minemura M, Morioka CY, Takahara S, Yamato E, Dono K, Watanabe A. Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation. Gut. 2002; 50:558-62.

2.Oka Y, Waterland RA, Killian JK, Nolan CM, Jang HS, Tohara K, Sakaguchi S, Yao T, Iwashita A, Yata Y, Takahara T, Sato S, Suzuki K, Masuda T, Jirtle RL. M6P/IGF2R tumor suppressor gene mutated in hepatocellular carcinomas in Japan. Hepatology. 2002;35:1153-63.

3.Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li XK, , Yamato E, Watanabe A. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. Gut (In press)

4.Y. Fukuhara, A.Hirasawa, X-K. Li, M. Kawasaki, M. Fujino, N.Funeshima, S. Katsuma, S.Shiojima, M. Yamada, T. Okuyama, S. Suzuki, G. Tsujimoto. Gene Expression Profile in the Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy. Journal of Hepatology (In press)

7. 知的所有権の取得状況 特になし。