

20030398

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 英彦

平成16(2004)年 3月

平成15年度総括・分担研究報告書

はじめに

本報告書は、厚生科学研究費補助金「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」の一つである「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班における平成15年(2003年)度の研究成果をまとめたものである。本研究班は、平成12年(2000年)に始まったミレニアム・プロジェクト「発生・分化・再生」事業の一環として臍帯血の自己修復能力を用いた治療法の実現を目的とするものである。

1997年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、2004年3月末には1,600例にとどく急速な発展を見せており、今や骨髓移植と肩を並べて造血細胞移植の一翼を担っている。我が国で行われたすべての臍帯血移植症例の臨床成績を詳細に解析し予後因子を同定するとともに、prospectiveな無作為臨床試験を行い临床上の疑問に答えることは、日本人におけるEBM(根拠に基づく医療)を確立する意味でも、また国際的な情報発信の点からも重要であると考えられる。さらに臍帯血幹細胞、間葉系細胞や免疫担当細胞に関する研究は国際的に競争の激しい分野であるが、我が国の研究者が先行している点もある。さらに研究を進展させて臨床に結びつけていくことが必須である。

本研究班の本年度の目標は以下の三つである。

(1) 臍帯血移植のEBM(根拠に基づく医療)を確立し、造血移植医療における位置づけを明らかにする。そのために、これまで施行された非血縁者間臍帯血移植の臨床成績を引き続き、収集・解析する。また、前向き臨床試験を推進する。

(2) 臍帯血移植の成人への適応拡大ならびに一層の安全性向上のため、造血幹細胞の生着促進、体外増幅、未分化性の維持に関する研究を行う。また、臍帯血移植後の免疫系の再構築を促進し、再発や感染症を予防するための免疫療法を開発する。

(3) 臍帯血を用いた臓器再生医療を視野に入れ、臍帯血や胎盤に含まれる間葉系細胞の性状を明らかにし、体外での増幅・分化さらに生体内での臓器再生に関する基礎研究を行う。

本報告書は各分担研究者の年度末研究業績をまとめたものであり、精力的に研究を進めた班員および研究協力者の方々に厚くお礼を申し上げます。

2004年3月

齋藤 英彦

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」平成15年度名簿

(50音順)

	氏名	所属・職名
班長	齋藤英彦	国立名古屋病院 院長
班員	小澤敬也	自治医科大学血液学講座 教授
	加藤俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授
	高倉伸幸	金沢大学がん研究所細胞制御研究部門細胞分化研究分野 教授
	高橋恒夫	東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門 教授
	直江知樹	名古屋大学大学院医学研究科病態内科学講座分子細胞内科学 教授
	仲野 徹	大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野 教授
	中畑龍俊	京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授
	原 宏	兵庫医科大学総合内科学 教授
	堀田知光	東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 教授
研究協力者	東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長
	石井榮一	佐賀医科大学小児科 助教授
	加藤剛二	名古屋第一赤十字病院小児科 副部長
	小島勢二	名古屋大学大学院医学系研究科発育・加齢医学 教授
	佐藤博行	福岡県赤十字血液センター 副所長
	高梨美乃子	東京都赤十字血液センター 研究二課長
	西平浩一	神奈川県厚木保健所 所長
	矢崎 信	名古屋市立守山市民病院小児科 部長
事務局	齋藤英彦	国立名古屋病院 〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 TEL:052-951-1111(2200) FAX:052-951-0559

目 次

I. 総括研究報告	1
齋藤 英彦	
II. 分担研究報告	
1. 臍帯血造血幹細胞による血管新生誘導法の確立	5
高倉 伸幸	
2. 臍帯血あるいは胚性幹細胞培養による造血幹細胞や血管内皮細胞への増殖・分化に関する研究	6
仲野 徹	
3. 胎盤由来間質細胞を用いた再生医療	7
高橋 恒夫	
4. 臍帯血移植後の免疫再構築と血管再生に関する研究	12
直江 知樹	
5. 1) 間葉系幹細胞との共培養による臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅に関する研究	15
原 宏	
2) 臍帯血移植とHLA適合性	17
原 宏	
6. 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究	23
堀田 知光	
7. 臍帯血移植患者血清中のHLA抗体が臍帯血移植に及ぼす影響に関する検討	25
加藤 俊一	
8. 臍帯血移植の安全性に関する検討	28
小澤 敬也	
9. 造血幹細胞の体外増幅の基盤整備	30
中畑 龍俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV. 研究班会議発表者報告書(資料)	45

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究

主任研究者 齋藤 英彦 国立名古屋病院長

研究要旨

我が国における小児に対する非血縁者間臍帯血移植 440 例を集計、解析し、小児急性白血病の standard risk 群(123 例)の 5 年無病生存率は欧米の成績と同等であることを示した。「至適 GVHD 予防法」、「臍帯血を用いたミニ移植」の臨床研究を進めた。成人への適用拡大のために「複数ドナーからのさい帯血同時移植」の臨床試験で 7 例の移植を行い安全性を確認した。造血幹細胞の体外増幅の研究では、無血清培養法や閉鎖系培養システムの開発など GMP に準拠した臨床応用への基盤整備を進めている。基礎的研究として造血幹細胞の未分化性維持と自己複製機構、移植後の免疫システムの構築、臍帯血や胎盤に由来する間葉系細胞の研究を進めた。

分担研究者

小澤敬也（自治医科大学血液学講座 教授）、加藤俊一（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授）、高倉伸幸（金沢大学がん研究所細胞分化研究分野 教授）、高橋恒夫（東京大学医科学研究所細胞⁷部門 教授）、直江知樹（名古屋大学大学院医学研究科病態内科学講座 教授）、仲野 徹（大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野 教授）、中畑龍俊（京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授）、原 宏（兵庫医科大学総合内科学 教授）、堀田知光（東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科 教授）

研究協力者

東 寛（北海道赤十字血液センター 研究部長）、石井榮一（佐賀医科大学小児科 助教授）、加藤剛二（名古屋第一赤十字病院 副部長）、小島勢二（名古屋大学医学部小児科 教授）、佐藤博行（福岡県赤十字血液センター 副所長）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター 課長）、西平浩一（神奈川県厚木保健所 所長）、矢崎 信（名古屋市立守山市民病院 部長）

A. 研究目的

（1）臍帯血移植の EBM（根拠に基づく医療）を確立し、造血移植医療における位置づけを明らかにする。そのために、これまで施行された非血縁者間臍帯血移植の臨床成績を引き続き、収集・解析する。また、「GVHD 予防法」、「複数臍帯血同時移植」、「臍帯血を用いたミニ移植」に関する臨床試験を推進する。

（2）臍帯血移植の成人への適応拡大ならびに一層の安全性向上のため、造血幹細胞の生着促進、体外増幅、未分化性の維持に関する研究を行う。また、臍帯血移植後の免疫系の再構築を促進し、再発や感染症を予防するための免疫療法を開発する。

（3）臍帯血を用いた臓器再生医療を視野に入れ、臍帯血や胎盤に含まれる間葉系細胞の性状を明らかにし、体外での増幅・分化さらに生体内での臓器再生に関する基礎研究を行う。

B. 研究方法

（1）わが国で行われたすべての臍帯血移植の臨床成績を 6 ヶ月に一回の月例報告と年一回の詳細報告により全国調査し解析す

ると共に、検体収集のシステムを確立し前向き登録による臨床研究を推進する。臍帯血移植における「至適 GVHD（移植片対宿主病）予防法」の臨床研究をひき続き行う。また、「複数ドナーからの臍帯血同時移植」の臨床研究を開始する。また、「臍帯血を用いたミニ移植」の多施設共同研究を国立がんセンターの高上洋一医長の研究班を共同で開始する。

（2）臍帯血造血幹細胞の体外増幅法の臨床応用を目指した基盤整備を進める。造血幹細胞の未分化性の維持に必要な分子機構を解明する。臍帯血 CD34 陽性細胞をマウスに移植して免疫システムの再構築を評価するモデルを確立する。

（3）ヒト胎盤から間葉系細胞を採取・分離して、in vitro にて分化能を検討する。

（倫理面への配慮）

（1）臨床成績の収集・解析に際しては、患者やドナーに関わるプライバシーの保護に配慮し、データの匿名化を行う。一方、班研究で明らかになった結果や成果については、公開シンポジウムやインターネット等を通じ一般にも公開する。「GVHD 予防に関する前向き無作為比較試験」、「複数ドナーからの移植」、「臍帯血を用いるミニ移植」の臨床研究にあたっては、各施設の倫理委員会の承認と患者および患者家族から十分なインフォームドコンセントを得て行う。

（2）臍帯血や胎盤を研究目的で使う場合には、ドナーに研究目的、期間、プライバシーの保護などにつき説明し同意を得た上で実施する。研究全般を通じて、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。ヒト胚性幹細胞に関しては、これを使用しない。

C. 研究結果

（1）本年度は小児における非血縁者間臍帯血移植の調査結果を解析した。小児に於ける非血縁者間臍帯血移植 440 例の 350 例（8 割）は腫瘍性疾患に対するのもので、

小児急性白血病の standard risk 群（123 例）の 5 年無病生存率は 53.5%であった。この結果は欧米の成績と同等である。一方、high risk 群（87 例）の 4 年無病生存率は 17.3%であった。さらに、小児急性リンパ性白血病の standard risk 群（75 例）の 6 年無病生存率は 44.1%であった。小児急性骨髄性白血病の standard risk（37 例）の 6 年無病生存率は 39.2%であった。また、小児 MDS27 例の 1 年後の無病生存率は 22.7%であった。臍帯血移植の短所の一つは生着不全が多いことで、その一因として HLA 抗体の存在が考えられる。しかし、臍帯血移植患者血清中の HLA 抗体の有無は臍帯血移植後の生着不全の原因ではないことが判明した。また、好中球生着速度にも HLA 抗体は影響しなかった。

「至適 GVHD 予防法」の無作為比較試験には 54 例の登録が今までにあったが、さらに登録を増やす必要がある。「複数ドナーからの臍帯血同時移植」の有用性と安全性を検討する臨床研究を 4 施設で開始し、これまでに 7 例に実施し安全性を確認した。「臍帯血を用いたミニ移植」の臨床研究には 4 例の登録を得た。

臍帯血は将来「細胞医薬品」として扱われる可能性があるため、「医薬品」としての観点から臍帯血の定義や安全性の基準を検討した。

（2）造血幹細胞の体外増幅法については、臍帯血バンクに保存された凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞を「サイトカインカクテル法」により効率よく増幅できる無血清培養法を確立した。また、増幅した細胞の有用性と安全性を免疫不全マウスへの移植により確認した。さらにバッグ培養による閉鎖系培養システムの構築など GMP に準拠した基盤整備を進めている。また、増幅した造血幹細胞を効率的に移植するために新しく骨髄内移植法を考案した。この方法は従来の経静脈的投与法に比較して約 15 倍の検出感度を持つことを示した。

（3）造血幹細胞には血管新生を誘導する機能がある。その機序の一つとして造血幹

細胞を含め血液細胞ほぼ全般に発現するニューロピリン-1 (NP-1) は血管内皮細胞増殖因子である VEGF と結合し、血液細胞上で形成された NP-1-VEGF の複合体は血管内皮細胞上の VEGF 受容体、Flk-1 を VEGF 単独に比し強く活性化し、血管形成を促進することが判明した。また、OP9 細胞を用いたマウス胚性幹細胞からの分化誘導において GATA-1 のコファクターで巨核球分化に必須な FOG-1 は巨核球の初期分化過程では増殖を抑制するが後期には促進することを明らかにした。さらに、造血幹細胞の未分化性維持にがん抑制遺伝子 PTEN のシグナルが関与していることを示した。ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞をヒト間葉系幹細胞と共培養すると巨核球系コロニーが増加することが判明した。

IL2 受容体の common γ 鎖をロックアウトした NOD/scid- γ c-/-マウス (NOG マウス) を用いて免疫系の再構築を検討した。臍帯血移植 NOG マウスに activated CD4 リンパ球移植を併用し、抗原特異的 IgG 産生が認められるまでに免疫機能が回復することを示した。移植後 6 週の臍帯血単核球 (CBMNC) 単独移植マウスでは、骨髓、脾臓ともに生着ヒト血液細胞の 90% 以上は CD3 陽性 T 細胞で占められ、CD19 陽性 B 細胞はほとんど認めなかった。免疫組織学的検討では、脾臓においては濾胞構造の欠如した無秩序な CD3 陽性 T 細胞の浸潤増殖を示し、少数の CD20 陽性 B 細胞が散在性に認めるのみで、形質細胞は認めなかった。骨髓においても、B 細胞の存在はわずかであり、形質細胞は認めなかった。一方、CBMNC + activated CD4 リンパ球移植マウスにおいては、骨髓、脾臓ともに生着ヒト血液細胞に占める CD3 陽性 T 細胞の割合は 70% 程度に減少し、CD19 陽性 B 細胞のみならず、CD38、CD138 陽性形質細胞の存在が確認された。また、脾臓では、ほぼ正常な T 細胞及び B 細胞からなるリンパ球分布と濾胞構造の構築が認められ、免疫組織学的に CD38 強陽性形質細胞が骨髓、脾臓両者に確認された。

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 単独移植群では、抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体のみの産生が認められ、IgG 抗体は認められなかったが、CBMNC + activated CD4 リンパ球移植マウスでは、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 抗体の産生を認めた。

ヒト胎盤絨毛から均一な間葉系マーカーを発現する細胞を得る方法を開発し、培養系において骨髓由来間質細胞と同様に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞へ分化誘導可能であることが明らかになった。また造血細胞増幅支持能も確認された。

D. 考察

我が国における臍帯血移植の症例数の増加と共に、欧米と比較したあるいは骨髓移植と比較した成績が蓄積しつつある。本年度は小児急性白血病の standard risk の五年無病生存率が欧米と同等であることを示した。このことは今までは臍帯血移植が第一選択枝ではなかったことを考えると良い成績であると思われる。「GVHD 予防の前向き臨床試験」は、徐々に症例が蓄積されているが、あと一年で結論をだすことが求められている。新しく始めた「複数ドナーからの臍帯血同時移植」は 10 例を目標としており、7 例は実施した。また、「臍帯血を用いたミニ移植」は各施設の倫理委員会の審査が終わり症例の登録が今後増えることが期待される。

E. 結論

臍帯血移植の EBM を確立するための臨床成績の集計、解析により日本人における個別の疾患に対する予後も明らかになりつつある。新しいエビデンスを創るための前向き臨床研究をさらにスピードアップする必要がある。また、臍帯血移植の適応を拡大するために不可欠な体外増幅法は臨床応用に近づきつつある。基礎的研究では臍帯血中の造血幹細胞の未分化性維持機構、臍

帯血移植後の免疫系再構築過程、胎盤の間葉系細胞の分化能などが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

代表的論文

- 1) Nishihira H, Kato K, Isoyama K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H: The Japanese cord blood bank network experience with cord blood transplantation from unrelated donors for haematological malignancies: an evaluation of graft-versus-host disease prophylaxis. **Br J Haematol** 120(3):516-522, 2003.
- 2) Isoyama K, Ohnuma K, Kato K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H, Nishihira H.: Cord Blood Transplantation from Unrelated Donors: A Preliminary Report from the Japanese Cord Blood Bank Network.. **Leukemia and Lymphoma** 44 (3):429-438, 2003.
- 3) Nagamura-Inoue, T., Shioya, M., Sugo, M., Cui, Y., Takahashi, A., Tomita, S., Zheng, Y., Takada, K., Kodo, H., Asano, S. and Takahashi, A.T.: Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank, Tokyo Cord Blood Bank. **Transfusion**. 43:1285-1294, 2003
- 4) Yahata T, Ando K, Sato T, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T.: A highly sensitive strategy for scid-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. **Blood** 101:2905-2913, 2003.
- 5) Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, Saito M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. **Nature Immunol** 4:457-63, 2003
- 6) Yanada M, Yamamoto K, Emi N, Naoe T, Suzuki R, Taji H, Iida H, Shimokawa T, Kohno A, Mizuta S, Maruyama F, Wakita A, Kitaori K, Yano K, Hamaguchi M, Hamajima N, Morishima Y, Kodera Y, Sao H, Morishita Y. Cytomegalovirus antigenemia and outcome of patients treated with pre-emptive ganciclovir: retrospective analysis of 241 consecutive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 32:801-7; 2003.
- 7) Akatsuka Y, Nishida T, Kondo E, Miyazaki M, Taji H, Iida H, Tsujimura K, Yazaki M, Naoe T, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. **J Exp Med** 197: 1489-500,2003.
- 8) Yamada Y, et al.: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. **Blood** 101:1801-1809, 2003
- 9) Kami M, Hamaki T, Miyakoshi S, Murashige N, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Taniguchi S, Hirai H, Ozawa K, and Kasai M: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. **Br J Haematol** 120: 304-309, 2003
- 10) Tazume K, Hagihara M, Kato S, et al. Induction of cytomegalovirus-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. **Exp Hematol** 32(1) :95-103, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----------|
| 1. 特許取得 | 該当するものなし |
| 2. 実用新案登録 | 該当するものなし |
| 3. その他 | 該当するものなし |

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

臍帯血造血幹細胞による血管新生誘導法の確立

分担研究者：高倉 伸幸 金沢大学がん研究所教授

以前我々は造血幹細胞は血管内皮細胞より無血管野に先に到達し、血管内皮細胞の発現する TIE2 受容体のリガンド、アンジオポエチン-1 (Ang1) を分泌して内皮細胞の遊走を促進し、血管新生を誘導する機能を有することを報告してきた。今回造血幹細胞を含め血液細胞ほぼ全般に発現するニューロピリン-1 (NP-1) は血管内皮細胞増殖因子である VEGF と結合し、血液細胞上で形成された NP-1-VEGF の複合体は血管内皮細胞上の VEGF 受容体、Flk-1 を VEGF 単独に比し強く活性化し、血管形成を促進することが判明した。以上から造血幹細胞による血管新生の誘導は血管再生技術に大いに貢献するものと考えられる。そこで、血管再生医療への応用の為にも、現在骨髄再建術に利用されている臍帯血造血幹細胞を、本血管治療にも応用すべく、造血幹細胞の試験管内増幅を可能にするため、臍帯血由来造血幹細胞を TIE2 の機能制御により増幅する技術の開発に着手した。その結果、マウスで得られてきた解析結果と同様、ヒト造血幹細胞は TIE2 の活性化した血管内皮細胞上で未分化性がある程度維持されることが判明した。

A.研究目的

造血幹細胞には血管新生を誘導する機能があり、このような幹細胞の血管新生誘導能の詳細を解明するとともに、臍帯血中に存在する造血幹細胞を効率良く増幅させ、新規血管を誘導する血管再生医療に応用する為、造血幹細胞が骨髄内で自己複製を営む分子機序を明らかにし、本機序を利用して試験管内で幹細胞を増幅する技術を開発することを研究の目的とする。

B.研究方法

1) 我々は可溶性の2量体 NP-1 は VEGF と結合し、この複合体は外来性に効率良く血管内皮細胞の Flk-1 をリン酸化して血管形成を促進することを報告した。しかし可溶性2量体 NP-1 が実際には生体内に存在せず、血液細胞の発現する NP-1 につき、可溶性 NP-1 と同様の機能につき検討した。

2) 造血幹細胞は TIE2 を発現し、この受容体発現の維持が、造血幹細胞性の維持に重要であり、この TIE2 の発現制御につき血管内皮細胞と造血幹細胞との細胞間相互作用を検討した。

3) ヒト臍帯血幹細胞が TIE2 の制御により未分化性を維持可能かをマウス血管内皮細胞とヒト臍帯血造血幹細胞との共培養にて解析した。

(倫理面への配慮) 特記事項なし。

C.研究結果

1) 造血幹細胞を含む、ほぼ全ての血球系細胞系列の細胞は量的な差異はあるものの NP-1 を発現することが明らかになった。血液細胞上で NP-1 は VEGF165 に特異的に結合し、内皮細胞の Flk-1 を VEGF 単独に比し、強くリン酸化した。NP-1 陽性の血液細胞では VEGF とともにマウスの角膜に移植すると効率良く血管新生を誘導したが、NP-1 -/-マウス由来血液細胞ではこの効果は認められなかった。

2) TIE2 プロモーター制御下に GFP を発現するマウス由来の造血幹細胞 (Lin⁻c-Kit+GFP+) をマウス骨髄由来血管内皮細胞と共培養することにより、非常に稀ではあるものの、血管内皮細胞が幹細胞上の GFP の発現を維持し、自己複製を誘導することが明らかになった。

3) ヒト臍帯血由来造血幹細胞 (Lin⁻CD34+c-Kit+) マウス造血を支持する血管内皮細胞株 MSS31

と共培養した際、MSS31 に恒常的活性化 TIE2 遺伝子を導入した内皮細胞では幹細胞は内皮細胞の下に潜伏し、ある程度未分化性が維持されることが判明した。

D.考察および結論

造血幹細胞は Ang1 を分泌して血管新生を誘導するのみならず、NP-1-VEGF の系により血管形成を促進することから、無血管領域ではもとより VEGF の産生が亢進することから造血幹細胞移植により効率の良い血管再生医療が可能である。また、血管内皮細胞はマウスだけでなくヒトの造血幹細胞の未分化性あるいは自己複製に関わる可能性が高く、幹細胞の自己複製を効率良く誘導する幹細胞因子が血管内皮細胞から単離できる可能性がある。

E.健康危険情報 特になし。

F.研究発表

1.論文発表

1. Yamada Y, et al.: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101:1801-1809, 2003

2. Nakajima M, et al.: Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev.* 120: 657-667, 2003

3. Li Z, et al.: Defective smooth muscle development in *qkl* deficient mice. *Development Growth Differ.* 45:449-462, 2003

2.学会発表

Yamada Y. et al.: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. International meeting on angiogenesis in cancer. June 26-28, 2003 Reykjavik, Iceland
他、7件

G.知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

出願・取得：なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

臍帯血あるいは胚性幹細胞培養による造血幹細胞や血管内皮細胞への増殖・分化に関する研究
分担研究者 仲野 徹 大阪大学 微生物病研究所 教授

研究要旨 マウス胚性幹細胞から巨核球分化における転写因子の機能解析をおこなった。また、幹細胞の未分化性維持に、がん抑制遺伝子 PTEN のシグナルが関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

臍帯血の移植では、血小板の回復が遅延することが知られている。マウス ES 細胞の研究により、人為的な操作によって巨核球・血小板への増殖・分化を促進すること、を目的に研究をおこなった。また、幹細胞の未分化性維持における、がん抑制遺伝子 PTEN の機能解析をおこなった。

B. 研究方法

マウス ES 細胞をストロマ細胞 OP9 との共生培養をおこない、血液細胞へと分化誘導をおこなった。テトラサイクリン遺伝子誘導システムを用いて、造血前駆細胞の段階でいろいろな転写因子を発現させ、巨核球への分化に対する影響を調べた。

がん抑制遺伝子 PTEN は、PI3 キナーゼの機能を負に制御する脂質フォスファターゼである。その組織特異的ノックアウトマウスを用いて、PTEN/PI3K シグナルの幹細胞システムにおける作用を解析した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮が必要な研究は施行していない。

C. 研究結果

マウス ES 細胞からの分化誘導において、トロンプオエチン (TPO) 存在下に、GATA-1 のコファクターで巨核球分化の必須な FOG-1 の機能解析をおこなった。その結果、FOG-1 は、巨核球の初期分化過程においては増殖を抑制するが、後期には促進することが明らかになった。また、それぞれにおいて、必要とする binding partner が異なることが明らかになった。

B 細胞特異的に PTEN を欠損するマウスでは、幹細胞に似た性質を示す B 細胞亜群である B1a 細胞の増加が認められた。また、始原生殖細胞特異的に PTEN を欠損するマウスでは、生殖系からの脱分化が認められた。

D. 考察

FOG-1 と同様に、他の転写因子においても、発現させるタイミングにより、異なった機能

を発揮させられる可能性が拓かれた。PI3 キナーゼシグナルの亢進が幹細胞の未分化性を増強する可能性が示唆された。

E. 結論

臍帯血の造血細胞に遺伝子操作をおこない、巨核球への分化を促進できる可能性があること、また、PI3 キナーゼのシグナルを増強することにより、幹細胞の性能を改変できる可能性があること、を明らかにした。

F. 健康危険情報

マウス細胞を用いた研究のため、特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表：

Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, Sasaki T, Mak TW, Nakano T. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*, 197: 657-67, 2003

Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, Ikeuchi M, Nagy A, Mak TW, Nakano T. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Development*, 130: 1691-1700, 2003

Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, Nakano T, Kitamura T, Saito M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nature Immunol*, 4:457-63, 2003

Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, Tani Y, and Nakano T. Differences between peripheral and cord blood in the kinetics of lineage-restricted hematopoietic cells. Implications for delayed platelet recovery following cord blood transplantation. *Stem cells*, 21:143-51, 2003

Nakano T Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. *Trends Immunol*, 24: 589-594, 2003

他、原著論文による発表 8 件
それ以外 (レビュー等) の発表 6 件

2. 学会発表

Toru Nakano, Context dependent function of transcription factors. Gordon Research Conference, Red Cells, May 2003, Italy, 他

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む) なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）分担研究報告書

研究課題：胎盤由来間質細胞を用いた再生医療
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：伊倉 宏一、張 旭紅、高橋 賢次、森 有加、渡辺 信和、
長村（井上）登紀子 同研究部門

タイトル：胎盤由来間質細胞を用いた再生医療

研究要旨 臍帯血採取後の胎盤は医療廃棄物として処理されている。この胎盤組織中に幹/前駆細胞が存在すれば、臍帯血と同様に細胞を確保するためにドナーに侵襲を加えることなく、安全性や倫理面においても問題のない細胞供給源として期待される。我々は、胎盤の胎児側組織の絨毛から explant 培養法により間葉系前駆細胞 (PDMPs) の単離法を確立した。PDMPs はヘテロな細胞集団で、紡錘状および扁平な細胞形態を示した。その細胞集団の細胞表面抗原は CD13、CD44、CD73、CD90、CD105、HLA-class I を発現していたが、CD31、CD34、CD45、HLA-DR は陰性であった。これらの細胞は培養系で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞および神経系細胞に分化誘導可能であり、また PDMPs との共培養により臍帯血由来造血幹細胞支持能に関して 骨髄由来 Stroma 同様の増幅率を認めた。これらより細胞治療や組織工学に利用可能な細胞ソースであると考えられた。一方、PDMPs は培養系で分裂能力に限界があり有限寿命（最終寿命 21 population doubling level; PDL）であるためクローナル解析が困難であった。そこで、我々は PDMPs の不死化を目的とし、レンチウイルスベクターを用いて、*ink4a* によりコードされた p16 腫瘍抑制遺伝子を抑制する Bmi-1 遺伝子および細胞分裂に伴うテロメア短縮を阻止する酵素であるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 (hTERT) を PDMPs に導入した。Bmi-1 および hTERT 遺伝子を導入した PDMPs は 70PDL 以上（現在進行形）分裂可能である。現在、これらから得られた数十のクローンについて分化能を解析中である。

I. PDMPs の単離法の確立および分化能の解析ならびに造血支持能の検討

A. 研究の目的

近年、骨髄間質細胞の集団には中胚葉由来の骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞などに分化する他に、外胚葉由来の神経系細胞や内胚葉由来の肝細胞にも分化する多能性幹/前駆細胞が存在することが報告されてきた。我々は胎盤組織中に骨髄間質細胞同様な多能性幹/前駆細胞が存在について検討することを目的とした。なお胎盤は胎児および母体由来の組織から構成されている。今回、われわれは胎児側組

織である絨毛から間質細胞を単離し、骨芽細胞および軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞への分化能について解析した。また単離した間葉系細胞の造血幹細胞支持能についても検討した。

B. 研究方法：PDMPs の単離および細胞表面抗原の解析：臍帯血採取後に提供された妊娠後 38-40 週の男児である胎盤から絨毛を切除し、DMEM-low glucose + 10% FBS で explant 培養法により PDMPs を単離・増幅した。性別 FISH 解析により、単離した細胞集団中に母体由来の細胞が含有していない

ことを確認した。FACSにより、CD13、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105、HLA-class I、HLA-DR について解析した。PDMPs の分化能：骨芽細胞への分化誘導は DMEM-low glucose 培地に FBS、デキサメサゾン、アスコルビン酸-2リン酸、 β グリセロフォスフィトを加え培養し、アルカリフォスファターゼ活性、コッサ染色、カルシウムの定量を行った。軟骨細胞への分化誘導は DMEM-high glucose 培地にデキサメサゾン、インスリン、ピルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸-2リン酸、プロリン、ITS+Premix、TGF- β 、BMP-2 を加え培養した。RT-PCR 解析により Sox9、COL2A1、aggrecan、COL10A1 遺伝子の発現、トルイジンブルー染色、タイプ II コラーゲンについて免疫染色を行った。脂肪細胞への分化誘導はデキサメサゾン、インスリン、インドメタシン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを加え培養し Oil Red 染色した。神経系細胞への分化誘導は DMEM/F12 (1:1)培地に B27 supplement、ブチルヒドロキシアニソール、ジメチルスルフォキシド、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、ジブチル cAMP、bFGF を加え培養した。神経系細胞マーカーの nestin、NSE、GFAP、MBP を免疫染色した。造血支持能の評価は PDMPs を feeder cell として、臍帯血から分離した CD34 陽性細胞と共培養し、SCF、TPO、Flt3L、IL3 存在下にて、共培養5日後の総細胞数、CD34 陽性細胞数を測定した。

C. 研究結果：PDMPs は紡錘状および扁平な細胞形態から成るヘテロな細胞集団であった。その細胞表面抗原は CD13、CD44、CD73、CD90、CD105、HLA-class I を発現し

ていたが、CD31、CD34、CD45、HLA-DR は発現しておらず、骨髓由来間質細胞と同様の細胞表面抗原を示した。骨芽細胞への分化能について骨芽細胞分化誘導培地にて培養2週目から骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性の増大を認めた。培養3週目から石灰分の沈着がコッサ染色により観察され、カルシウム沈着量も増大した。軟骨細胞への分化能については軟骨細胞分化誘導培地にて培養2週目で軟骨細胞関連遺伝子の Sox9、COL2A1、aggrecan、COL10A1 遺伝子の発現が確認され、培養3週目で軟骨細胞が産生する酸性ムコ多糖類がトルイジンブルー染色により観察され、Type II collagen が免疫染色により陽性反応を示した。脂肪細胞への分化誘導は培養3週目からごくわずかな割合で Oil Red により染色された脂肪滴が観察された。神経系細胞への分化誘導では培養後24時間には神経系様細胞形態を示し、神経系細胞マーカーの nestin、NSE、GFAP、MBP が免疫染色により陽性反応を示した。また PDMPs との5日間の共培養により臍帯血由来 CD34+細胞数 58.3 ± 17.9 倍、CD38-CD34+細胞 153.8 ± 13.9 倍、CFU-Mix 17.7 ± 14.4 倍であり、骨髓由来 Stroma 細胞と同等の増幅率を認めた。

D. 結語：PDMPs は培養系において骨髓由来間質細胞と同様に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞へ分化誘導可能であることが明らかになった。また造血細胞増幅支持能も確認された。我々が開発した PDMPs はドナーへの負担が全くなく医学的にも倫理的にも安全な採取が可能であり、また骨髓由来間質細胞との比較におい

て遜色なく分化誘導可能であり新たな同種 (Allo-) の細胞ソースとなる可能性があることが考えられた。

II. PDMPs への Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入

A. 研究目的：我々はヒト胎盤絨毛から単離した PDMPs が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経系細胞に分化誘導が可能であり、さらに造血幹細胞支持能を有していることも明らかになった。しかしながら、PDMPs はヘテロな細胞集団であり、約 21 PDL で分裂停止し細胞寿命に達する。そのため、分化能についてのクローナル解析が困難である。本研究では PDMPs を不死化させるために、レンチウイルスベクターを用い、*ink4a* によりコードされた p16 腫瘍抑制遺伝子を抑制する Bmi-1 遺伝子および細胞分裂に伴うテロメア短縮を阻止するための酵素であるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 (hTERT) を PDMPs に導入し、その細胞の分裂回数 (PDL)、テロメラーゼ活性、テロメア長を解析すると共にサブクローニングを行うことを目的とした。

B. 研究方法：レンチウイルスベクターを用い、Bmi-1 および hTERT 遺伝子を PDMPs (7 PDL) に導入した。テロメラーゼ活性は TRAP assay を行った。テロメア長の測定は Telomere length Assay Kit を用いた。クローン作製は、6 cm 培養皿に 2,000 cells 播種し、クローニングカップを用いて Single cell から形成されたコロニーを回収し、増幅させた。

C. 研究結果：Bmi-1 および hTERT 遺伝子を

導入した PDMPs はテロメラーゼ活性が認められ、70 PDL に達してもいまだ分裂し続けている。また、テロメア長も遺伝子導入時に比べ伸長した。造血幹細胞支持能に関しては Stroma free における CD34 陽性細胞の増幅率は 1.8 倍であったのに対して Tert/Bmi-1 導入細胞との共培養では 5.5 であった。Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入した PDMPs から数十クローンを分離樹立した。

D：結語：Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入することにより PDMPs の分裂回数が延長し、数十のクローンが分離樹立できた。現在、分離したクローンでの分化能について解析中である。

(倫理面への配慮) 臍帯血の採取保存に関しては東京大学医科学研究所倫理委員会の承認を得、東京臍帯血バンク規定に準じ個人情報等機密保持を徹底した。

F. 健康危険情報

臍帯血に関しては、特に本研究において本項目に該当するものはない。

G. 研究発表

論文発表

1. Takahashi K., Igura K., Zhang X., Mitsuru A., Takahashi AT. Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal part of human placenta. Cell Transplantation (in press)
2. Nagamura-Inoue T., Mori Y., Zheng, Y., Watanabe N., Takahashi, TA. Differential expansion of umbilical cord blood mononuclear

- cell derived natural killer cells dependent on the dose of Interleukin 15 with Flt3L. *Exp. Hematology*, 32, 202-209, 2004.
3. Tsuneko A. Takahashi, Paolo Rebulla, Sue Armitage, Jacqueline van Beckhoven, Hermann Eichler, Riitta Kekomäki, Magdalena Letowska, Fawzi Wahab, Gary Moroff: Multi-laboratory evaluation of procedures for reducing the volume of cord blood: influence on cell recoveries, *Vox Sanguinis* (in press)
 3. Zheng Y, Watanabe N., Nagamura-Inoue T, Igura K., Nagayama H., Tojo A., Tanosaki R., Takaue Y., Okamoto S., Takahashi A.T.: The lack of homing-essential molecules on umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells can be reversed by recombinant human stem cell factor treatment to increase their in vivo homing potential. *Experimental Hematology*, 31, 1237-1246, 2003
 4. Nagamura-Inoue, T., Shioya, M., Sugo, M., Cui, Y., Takahashi, A., Tomita, S., Zheng, Y., Takada, K., Kodo, H., Asano, S. and Takahashi, A.T.: Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank, *Tokyo Cord Blood Bank. Transfusion*. 43,1285-1294, 2003
 5. Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchimaruru K, Oyaizu N, Inazawa T, Yamasaki T, Enomoto M, Nakaoka T, Nakamura T, Maekawa T, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Asano S, Tani K, Takahashi TA, Yamashita N.: Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2, *Melanoma Res.* 13: 521-530, 2003
 6. Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immuno.* 47: 109-116, 2003.
 7. Kashiwakura I, Takahashi TA, Kuwabara M. Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 122, 479-488,2003.
 8. Nishihira H, Kato K, Isoyama K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H. The Japanese cord blood bank network experience with cord blood transplantation from unrelated donors for haematological malignancies: an evaluation of graft-versus-host disease prophylaxis. *Br J Haematol.* 120(3): 516-522, 2003.
 9. 凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞測定法—ProCOUNT 法と 7-AAD 法による比較検討—:塩谷美夏、長村(井上)登紀子、須郷美智子、崔硯、高橋敦子、平井雅子、高橋恒夫: 日本輸血学会雑誌(印刷中)
 10. 岩元潮、大石真人、高橋賢次、後藤三郎、高橋恒夫: 国際臍帯血バンクネットワーク組織 NETCORD ウェブサイト登録のための東京臍帯血バンクコンピューターシステムの構築: 日本輸血学会雑誌

49,559-564,2003

11. 高田圭, 長村(井上)登紀子, 須郷美智子, 塩谷美夏, 高橋敦子, 崔硯, 平井雅子, 田口淳史, 渡辺信和, 高橋恒夫: 臍帯血バンクにおける ISO9002 品質保証システムの導入と運用, 日本輸血学会雑誌

49,473-479,2003

H. 知的財産権の出願/登録状況

特に本項目に該当する出願、登録および予定は無い。

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

研究課題：臍帯血移植後の免疫再構築と血管再生に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院医学系研究科教授
研究協力者 清井 仁 名古屋大学医学部付属病院講師
山本 晃士 名古屋大学医学部付属病院助手

研究要旨 臍帯血移植 NOG マウスに activated CD4 リンパ球移植を併用し、抗原特異的 IgG 産生が認められるまでに免疫機能が回復することを示した。NOG マウスを用いた臍帯血移植システムは、造血幹細胞移植後の GVHD、再発、感染症コントロールを研究する上でも有用な実験モデルであり、今回、抗原特異的 IgG 産生のメカニズムの一端を示せたことで、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。また臍帯血は血管新生ポテンシャルの高い血管内皮前駆細胞を比較的多く含んでいると考えられ、それを *ex vivo* expansion するなどの方法により、血管再生細胞治療のための幹細胞ソースとして利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、造血器腫瘍における移植後 GVHD、難治性ウイルス感染症、あるいは再発に対する活性化リンパ球療法の有用性が報告されていることから、活性化リンパ球療法を併用することにより、臍帯血移植における免疫不全状態に起因する合併症を克服できる可能性が考えられる。しかし、活性化リンパ球療法の作用機序や有効性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を作成すると同時にその有効性を検討した。

また、血液幹細胞による血管再生治療が注目されるなか、そのメカニズムの解明とともに、臨床的にもっとも有効かつ安全な血管再生治療を実現するためにどのような幹細胞ソースを用いるべきかを検討することは重要な課題である。本研究は、臍帯血中に存在する血管内皮前駆細胞の質的・量的な評価を分子細胞学的手法を用いて行い、骨髄幹細胞や末梢血単核球分画と比較検討した上で、血管再生細胞治療のための幹細胞ソースとしての可能性を検討した。

B. 研究方法

NOG マウスに 2.5Gy の TBI 照射後、1. 臍帯血単核球 (CBMNC)、2. CBMNC + 同一検体より作成した activated CD4 リンパ球、3. activated CD4 リンパ球を移植し、ヒト血球細胞の生着様式を検討すると同時に、これらのマウスにヒト血清アルブミンを免疫し、抗ヒト血清アルブミン IgM および IgG 抗体の産生が生じるかにつき検討した。activated CD4 リンパ球は、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。臍帯血 数 ml から単核球を分離し、total cellular RNA を抽出した。一方、臍帯血の一部を培養し、血管内皮細胞に分化すると考えられる紡錘型の付着細胞の増殖を確認して分離後、cellular RNA を抽出した。それぞれの RNA および基準となる standard cRNA を用いて血管内皮細胞およびその前駆細胞マーカー分子につき real time RT-PCR を行い、各分子の mRNA 発現量を定量した。同時に FACS によって細胞表面における各マーカー分子の発現パターンを解析し、臍帯血に含まれる血管内皮前駆細胞の質的・量的な評価を行った。

(倫理面への配慮)

臍帯血は、東海臍帯血バンクより各種条件によりバンク登録不可となったものを、東海臍帯血バン

ク運営委員会の承認の上、研究用として供与戴いている。マウスの実験は、名古屋大学動物実験ガイドラインに従い行った。

C. 研究結果

作成された activated CD4 は大半が CD25 陽性細胞であり、また約半数の細胞は、CD154 (CD40L) 陽性で、CD45RA 細胞はごくわずかに残るのみであった。対して CBMNC には CD4/CD25 陽性細胞はごくわずかに存在するのみであり、CD4 陽性細胞のほとんどは CD45RA 陽性であった。また、CD154 陽性細胞は認めなかった。

移植後 6 週の CBMNC 単独移植マウスでは、骨髓、脾臓ともに生着ヒト血液細胞の 90% 以上は CD3 陽性 T 細胞で占められ、CD19 陽性 B 細胞はほとんど認めなかった。免疫組織学的検討では、脾臓においては濾胞構造の欠如した無秩序な CD3 陽性 T 細胞の浸潤増殖を示し、少数の CD20 陽性 B 細胞が散在性に認めるのみで、形質細胞は認めなかった。骨髓においても、B 細胞の存在はわずかであり、形質細胞は認めなかった。一方、CBMNC + activated CD4 リンパ球移植マウスにおいては、骨髓、脾臓ともに生着ヒト血液細胞に占める CD3 陽性 T 細胞の割合は 70% 程度に減少し、CD19 陽性 B 細胞のみならず、CD38、CD138 陽性形質細胞の存在が確認された。また、脾臓では、ほぼ正常な T 細胞及び B 細胞からなるリンパ球分布と濾胞構造の構築が認められ、免疫組織学的に CD38 強陽性形質細胞が骨髓、脾臓両者に確認された。activated CD4 リンパ球単独移植マウスではヒト血液細胞の生着は確認されなかった。

移植マウスより得られたヒト CD19 陽性細胞上の CD40 発現や、CD4 陽性細胞上の CD25 発現の程度には有為な違いを認めなかった。

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 単独移植群では、抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体のみの産生が認められ、IgG 抗体は認められなかったが、CBMNC + activated CD4 リンパ球移植マウスでは、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

の産生を認めた。

臍帯血 (n=8) 数 ml から約 2×10^7 個の単核球が得られ、10–30 microg の total cellular RNA を回収できた。単核球 0.1 microg RNA あたりの血管内皮前駆細胞マーカーの mRNA 分子数は、平均で Flk-1: 6.9×10^5 、CD133: 5.5×10^5 、VE-cadherin: 2.0×10^5 であり、骨髓由来単核球には及ばないものの、臍帯血は未分化な血管内皮前駆細胞を多く含んでいると考えられた。FACS による表面マーカーの解析結果もほぼ同様の傾向を示した。また、臍帯血単核球の培養後に得た付着細胞においては上記マーカー分子の mRNA 発現量が増加し、血管内皮前駆細胞を高密度に含んでいると考えられた。

D. 考察

NOG マウスへの CBMNC 移植においては、T 細胞の浸潤性増殖をきたすのみで、脾臓における濾胞形成も認められず、免疫系再構築は不可能であった。しかし、CBMNC に activated CD4 リンパ球を同時に移植すると、移植後早期から、脾臓への正常なリンパ球分布が生じ、抗原接種に対しても正常な抗原特異的抗体産生の反応が生じたことは、細胞療法の有効性を示唆するものである。この現象は、移植した activated CD4 リンパ球と CBMNC における CD40L 発現の違いから、通常の CBMNC あるいは CBCD34 陽性細胞移植では、CD40L の発現あるいは機能が障害されており、CD40-CD40L interaction が生じていない可能性が考えられる。しかし、activated CD4 リンパ球単独移植では、移植後 6 週時点で生着細胞を確認できないことより、抗原特異的 IgG 産生に直接関与している可能性は低いことが予想される。むしろ、活性化された regulatory T 細胞が移植時点で存在することによって、過剰な T 細胞の増殖が抑制され、個々の免疫担当細胞が正常に生着、分化できる環境が整うことが重要かもしれない。これらの検討を進めることで、個々の免疫担当細胞が果たす役割や分化過程を明らかにし、移植後 GVHD、感染症コントロール、細胞・免疫療法への応用が期待される。

臍帯血中の単核球には、Flk-1 や CD133 等の分

子を高発現する血管内皮前駆細胞が多く含まれていると考えられた。また、臍帯血単核球の培養後に得られる付着細胞群は、血管内皮前駆細胞を含む分画としてより純度が高いと推測された。今後、ストローマ細胞との共培養による変化などにつき、検討したい。

E. 結論

臍帯血移植 NOG マウスに activated CD4 リンパ球移植を併用することにより抗原特異的 IgG 産生が認められるまでの免疫学的再構築が可能であることを証明した。細胞・免疫療法の in vivo モデルを確立することは造血器疾患のみならず、各種固形癌の治療戦略を考える上でも重要である。NOG マウスを用いた臍帯血移植システムは、造血幹細胞移植後の GVHD、再発、感染症コントロールを研究する上でも有用な実験モデルであり、今回、抗原特異的 IgG 産生のメカニズムの一端を示せたことで、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

臍帯血は血管新生ポテンシャルの高い血管内皮前駆細胞を比較的多く含んでいると考えられ、それを *ex vivo* expansion するなどの方法により、血管再生細胞治療のための幹細胞ソースとして利用できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Yanada M, Yamamoto K, Emi N, Naoe T, Suzuki R, Taji H, Iida H, Shimokawa T, Kohno A, Mizuta S, Maruyama F, Wakita A, Kitaori K, Yano K, Hamaguchi M, Hamajima N, Morishima Y, Kodera Y, Sao H, Morishita Y. Cytomegalovirus antigenemia and outcome of patients treated with pre-emptive ganciclovir: retrospective analysis of 241 consecutive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant.

32:801-7, 2003.

2: Akatsuka Y, Nishida T, Kondo E, Miyazaki M, Taji H, Iida H, Tsujimura K, Yazaki M, Naoe T, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. J Exp Med. 2003 197:1489-500, 2003.

3: Isoyama K, Ohnuma K, Kato K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H, Nishihira H; Japanese Cord Blood Bank Network. Cord blood transplantation from unrelated donors: a preliminary report from the Japanese Cord Blood Bank Network. Leuk Lymphoma. 44:429-38, 2003.

4: Nishihira H, Kato K, Isoyama K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H. The Japanese cord blood bank network experience with cord blood transplantation from unrelated donors for haematological malignancies: an evaluation of graft-versus-host disease prophylaxis. Br J Haematol. 120:516-22, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし