

分担研究報告書

3・品質管理の確立

3-2 ex vivo 増幅臍帯血の安全性試験（2）

分担研究者 清水 則夫  
東京医科歯科大学助教授

**研究要旨**

再生医療・細胞治療では生体材料を使用するため最終製品すへてにつき感染因子の否定試験を行なうことか必須である。しかし 現状の検査法により生体材料由来の混入の可能性が有る多くのウイルスの検査をすへて行なうことはコスト、時間の面で難しい。本研究では、実用に耐える迅速・安価・高感度なウイルス検査法の開発とウイルスのスパイク試験法を確立することを目的に研究を行なった。ウイルス検査項目としてHIV-1 -2 HTLV-1 -2 HAV HCV HBV EBV CMV HSV-1 -2 VZV ParvoB19 HHV-6 -7 -8, を選定し 各ウイルスを合計1本のキャピラリーに分けた Multiplex PCR 系を作製した。DNA ウイルスは本検査システムにより、40 copies/Tube の検出感度で測定可能であり、RNA、Retro ウイルスの検出感度は検討中である。また、HIV は多くのサブタイプがある現状のシステムでは不十分なことも判明したため、現在 系の改良を行なっている。ウイルスのスパイク試験に関しては、CMV、EBV の試験を行なう準備を整え、Parvovirus B19 の試験を行なうための準備作業を進めている。

## A. 研究目的

再生医療・細胞治療では生体材料を使用するため最終製品すべてにつき感染因子の否定試験を行なうことが必須である。しかし、現状の検査法により生体材料由来の混入の可能性が有る多くのウイルスの検査をすへて行なうことはコスト、時間の面で難しい。本研究では、実用に耐える迅速・安価・高感度なウイルス検査法の開発とウイルスのスパイク試験法を確立することを目的として研究を行なった。

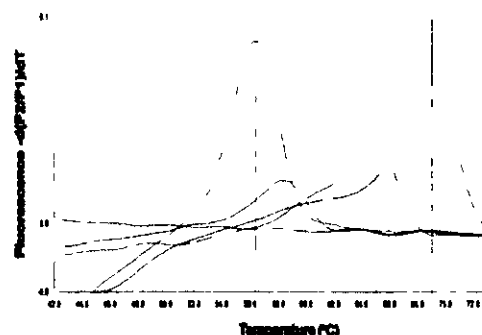
## B. 研究方法

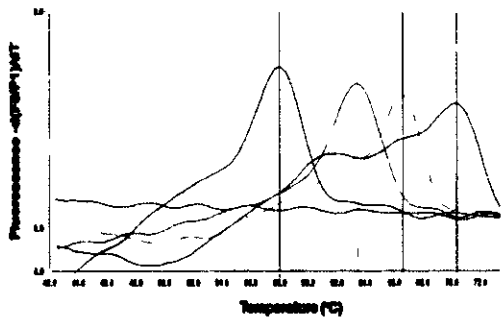
ウイルス検査項目として HIV-1, -2, HTLV-1, -2, HAV, HCV, HBV, EBV, CMV, HSV-1, -2, VZV, ParvoB19, HHV-6, -7, -8, を選定した。これらのウイルスを、40copies/Tube の検出感度で、3時間以内に測定できる検査系の構築を目指し、ライトサイクラーによるキャピラリー管を用いた Multiplex PCR 法および Hybri-probe 法およびメルティング解析による検出を採用した。また、EBV, CMV のスパイク試験を実施するため、B95-8 株 EBV、TOWN 株 CMV を用いたウイルス感染価測定法、ウイルス DNA 定量法 (PCR 法)、ウイルス mRNA 検出法 (RT-PCR 法) の開発を行なった。

## C. 研究結果

各ウイルスを合計 4 本のキャピラリーに分けた Multiplex PCR 系を作製した。

PCR をキャピラリーで行なうライトサイクラーを採用する事により、核酸抽出を含めて3時間以内に終了することが可能だった。本システムでは、PCR の擬陽性反応を排除するため、Hybri-probe 法による検出を採用した。また、メルティング解析により増幅産物の種類を特定できるようにプローブの  $T_m$  値の調整を行なっている。具体的な測定方法は、1 核酸抽出、2 RT 反応 (RNA, Retro ウイルスの場合)、3 PCR 反応、4 Probe 添加と加熱による Hybridization、5 メルティング解析による増幅産物の特定の順で操作を行なった。メルティング解析の例を図1に示す。この例では、1本のキャピラリーで8種類の測定を行なっている。使用する8種類のプローブのうち4種類を蛍光色素 LC640、他の4種類を LC705 で標識したものを使い、F2/F1, F3/F1 チャンネルで測定することにより8種類を区別することが可能となる (上段は LC640 の測定、下段は LC705 の測定を示す)。





DNA ウイルスに関しては、10 copies/Tube の検出感度で測定可能だった。RNA、Retro ウイルスの検出感度は、現在検討中であるか、DNA ウイルスに比較して検出感度が若干低下するようである。

スパイク試験に関しては、B95-8 株 EBV と TOWN 株 CMV のウイルス液を調製し、B 細胞の形質転換による EBV 感染価測定、プラーク法による CMV 感染価測定を終了し、スパイク試験を行なう準備が整った。また、Parvovirus B19 に関しては、ウイルスの感染価測定法の導入を検討している段階である。

#### D 考察

使用するプライマーは、HIV 以外のウイルスに関しては知られているサブタイプをすべてカバーしている。しかし HIV-1, 2 については、多くのサブタイプすべてを検出てくるか否か陽性コントロールを用いて検定する必要がある。したがって、新規分離株の収集とプライマーの変更など継続的な改良が必要である。また Multiplex 専用の試薬を使用しているため RNA virus では PCR の前に RT 反応を行う two step が必要であり、感度をあげるのが難しいことが明らかとなった。今後感度をもう一段あげる事を目指し、ハッファー組成、使用キットなどを再検討することが必要だろう。

#### E 結論

最終製品全ての感染因子否定試験に使用可能な検査系のプロトタイプの開発に成功した。また、EBV、CMV のスパイク試験を行なう体制が整った。

F 健康危険情報 なし

#### G 学会発表

第 18 回ヘルペスウイルス研究会  
網羅的ウイルス検出システムの開発  
第 51 回ウイルス学会  
再生医療・細胞治療の製品保証に関する研究  
多項目迅速ウイルス検査システムの開発

#### H 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

標的核酸の検出法 特願 2003 - 164799

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

3・品質管理の確立

3-3 品質試験－表面マーカーの検討－

分担研究者 佐藤隆

(日本ヘクトン・ディッキンソン(株) 本郷ラボ ディレクター )

研究協力者 松崎正晴

(日本ヘクトン・ディッキンソン(株) ハイオサイエンスラボ 所長)

廣瀬弥保

(日本ベクトン・ディッキンソン(株) )

田中聡

(日本ヘクトン・ディッキンソン(株) )

**研究要旨**

臍帯血由来の CD34 陽性細胞を ex vivo で増幅し治療に用いるためには、GMP 準拠の細胞培養システムを構築すると共に品質管理法の実現が重要である。本分担研究は、増幅培養細胞の品質管理試験として細胞表面マーカーの発現を FACS で測定し、その発現パターンによって培養細胞の品質試験をおこなうことを目的にしている。報告では、CD34/CD45 を中心に、増幅前の細胞表面マーカーと増幅培養 12 日目の細胞表面マーカーの変化を検討した。その結果、増幅培養前後で lineage マーカーを含むいくつかの表面マーカーの発現変化が見られた。この変化を品質管理試験に取り入れることで、増幅培養毎に増幅する細胞数や細胞の分化程度をモニター出来る可能性が示唆された。

## A. 研究目的

臍帯血中の CD34 陽性細胞を複数のサイトカインにより *ex vivo* で増幅培養することか可能となっている。増幅した細胞を移植に用いるためには、その培養工程と増幅細胞の安全性が確認されることか重要であると同時に移植に用いられる細胞の品質についても厳重に管理されている必要がある。本研究では、増幅培養細胞の品質管理手法を確立する目的で、各種の細胞表面マーカーを解析したので報告する。

## B. 研究方法

臍帯血中の CD34 陽性細胞の分離は AutoMACS カラムを用い、QBSF-60 無血清培地に SCF/FL/IL-6/sIL-6R を終濃度で各 100ng/ml、TPO を 10ng/ml になるように添加し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で 12 日間培養した。

FACS 解析は蛍光色素 7AAD により生細胞を選んだうえで、CD45 表面マーカー陽性の細胞に対して、CD34 表面マーカーと他の細胞表面マーカーを組み合わせで解析した。解析に用いた細胞表面マーカーの種類は約 200 種類の細胞表面特異抗体の中から 53 種類を選別して用いた。

コロニーアッセイは当該細胞 250-500 cells をメチルセルロース培地 (MethoCult GF H4434V)/Petri Dish にて 2 週間培養した後、出現したコロニーの種類と数を計測した。

## C. 研究結果

### 1 CD34 陽性細胞数の変化

増幅前、調整した細胞の 99%以上に CD34 表面マーカーの発現が認められたか、12

日間のサイトカインによる増幅培養により、CD34 の発現は平均 20% (18-60%) に低下した。また、この増幅によって全細胞数は平均 130 倍程度に増幅されたことから、CD34 陽性細胞数としては増幅培養によって平均 25 倍以上に増幅された。

### 2 増幅前後の CD34 発現細胞とコロニー形成能の検討

12 日間サイトカインで増幅した細胞の CD34 表面マーカーを調べると図 1 のように、その発現は陰性から強陽性まで幅広く分布した。この細胞集団を 5 つのロジカルゲート (R3-R7) でソーティングし、5 分画 (G3-G7) のコロニーアッセイをおこなった結果を図 2 に示した。

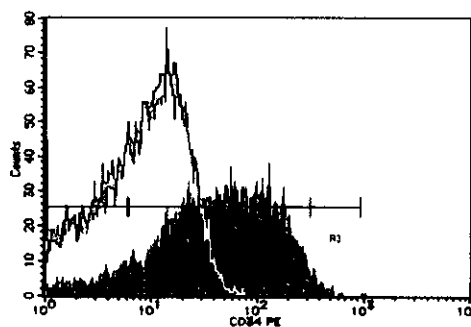


図 1 CD34 陽性細胞増幅後の FACS 解析  
ヒストグラムはネガティブコントロール  
と増幅後細胞の CD34 発現ヒストグラム

増幅前の細胞では CD34 陽性分画に全てのコロニー形成能が認められるのに対して、増幅後の細胞では CD34 弱陽性や陰性の分画にもコロニー形成能が認められた。

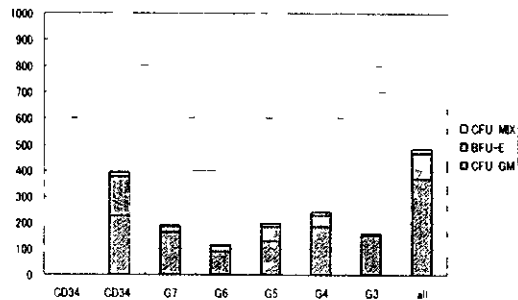
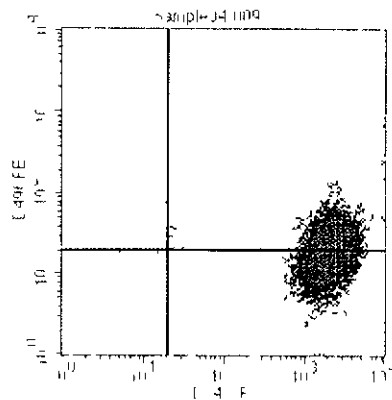


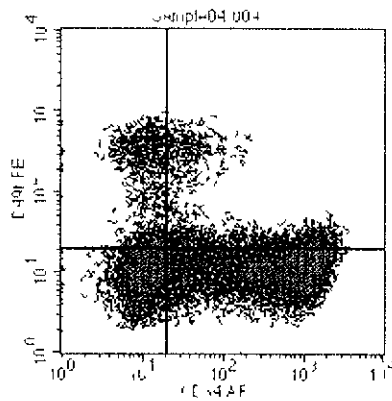
図2 CD34発現別分画細胞のコロニ形成能  
G3 G7分画はR3 R7のコンカルゲートでソー  
ティンクされた細胞画分

### 3 増幅前後の細胞表面マーカーの検討

CD34 表面マーカーと組み合わせて検討した表面マーカーは、接着因子関連では CD11a CD18 CD49e, CD49f, CD62L の 5 種類である。増幅前、これら 5 種類の表面マーカーは CD49f を除く 4 種類で 98-99% の細胞が陽性であった。CD49f は 50% の細胞が増幅前には陽性であった。増幅後に CD49e は 98% の細胞で依然として陽性であり、CD11a では 88% の細胞が増幅後も陽性であった。この 2 種類の表面マーカーに比べて、CD18 および CD62L の表面マーカーは増幅後に半数以上の細胞で発現が認められなくなった。CD49f 表面マーカーは、増幅後に 28% 程度の陽性細胞が残っているか、CD34 表面マーカー陰性もしくは弱陽性分画に、増幅前以上に強く CD49f を発現する細胞集団が認められた。



増幅前



増幅後

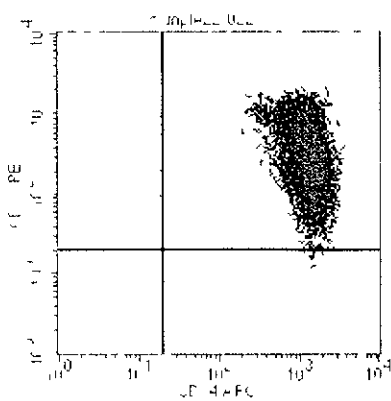
リンパ球系の表面マーカーに関連するものは CD10, CD19, CD20, CD24, CD44, CD86 の 6 種類を検討した。CD44 は増幅前後でほぼ全ての細胞で陽性であるか、増幅後は CD34 陰性の細胞にも強く発現するようになった。また、CD10 は増幅前に 40% 程度陽性であったか増幅後はほとんど検出されなくなった。その他の B 細胞系マーカーは増幅前にもほとんど発現しておらず、増幅後も発現は認められなかった。NK 細胞の表面マーカー CD56 の発現は、増幅前、増幅後とも 97-99% 陰性であった。

骨髄球系の細胞表面マーカーについては CD13, CD14, CD16, CD33, CD64, CD66b, CD144 の 7 種類を検討した。CD13 および

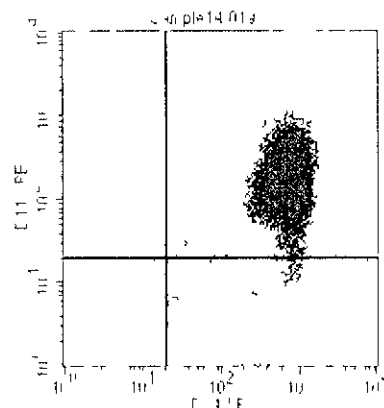
CD33 は増幅前から 90%程度陽性であり、増幅後も 76-77%が陽性であった。

CD38 表面マーカーは、増幅前ほとんどの細胞で陽性であったのに対して、増幅後は CD38 陰性の細胞が増加した。また、CD34 陽性かつ HLA-DR 陰性の細胞も増幅前は全体の 3.8%であったものか、増幅後に 4.8%と微増した。

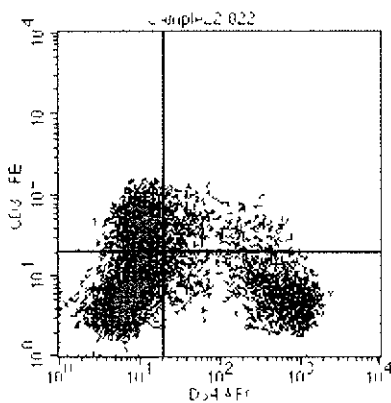
一の CD127、IL-3 レセプターの CD123、GM-CSF のレセプターである Flt3/FLK2 の CD135、gp130 の CD130 などである。そして増幅後に細胞表面の発現が低くなったのは CD117、CD123、CD127、CD135 の各表面マーカーであった。



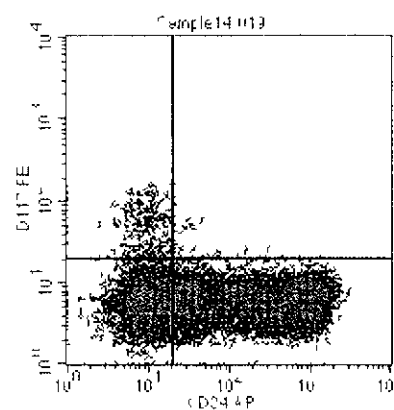
増幅前



増幅前



増幅後



増幅後

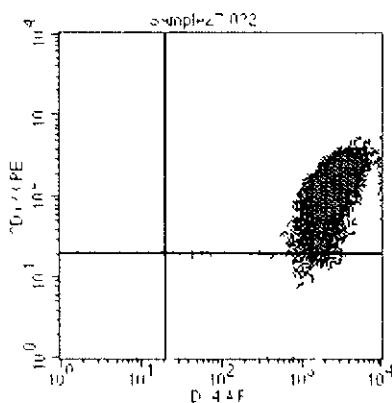
サイトカインレセプターのマーカーは CD110, CD116, CD117, CD120b, CD123, CD127, CDw128b, CD130, CD132, CD135, CD184, CD195,

を用いて検討をおこなった。増幅前から強く発現が認められたマーカーは c-kit レセプターである CD117、IL-7 レセプタ

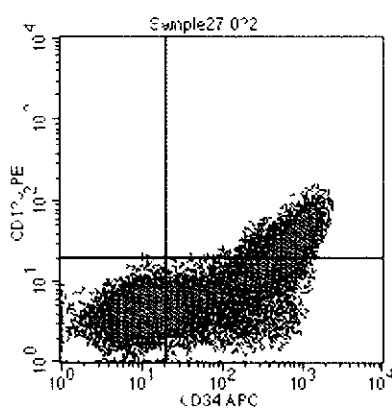
血管内皮細胞系の表面マーカーでもある CD105 と CD144 は、増幅前には全細胞に強く発現していたものか、増幅後には 65-83%がこのマーカーを発現しなくなった。また、トランスフェリンレセプターである CD71 の発現については、増幅前に 87%の細胞が陽性であり、増幅後には CD34

陽性かつ CD71 陽性の割合が 38%、CD34 陰性かつ CD71 陽性の細胞は 57%であった。

未熟な細胞や前駆細胞に出現するその他の表面マーカーとしては CD90, CD133, P-glycoprotein を検討した。CD133 表面マーカーは増幅前の CD34 陽性細胞のほぼ全細胞が陽性であった。増幅後 CD34 陽性かつ CD133 陽性の細胞は全体の 21%程度であった。また CD34 陽性かつ CD133 陰性の細胞は全体の 38%程度であった



増幅前



増幅後

## D 考察

### 1 CD34 陽性細胞数の変化

サイトカインによる臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅では、CD34 陽性細胞数を品質管理上の項目に設定した。増幅前後でその測

定方法は異なるが、CD45 陽性細胞でかつ死細胞を解析から除外する方法を SOP として作成した。CD34 陽性細胞数が何倍に増加するかを判定基準として、移植用細胞の品質保証・品質管理を実施し、本細胞加工が臨床応用されるようにしたい。

### 2 増幅前後の CD34 発現細胞とコロニー形成能の検討

増幅前の細胞については、コロニー形成能から CD34 強陽性細胞分画中に造血幹細胞/前駆細胞が含まれていると考えられる。この結果はこれまでの多くの研究でも支持されている。

サイトカインによる増幅培養細胞は CD34 の発現が幅広く分布し、CD34 陰性もしくは CD34 弱陽性の分画にもコロニー形成能が認められた。造血幹細胞か CD34 陰性の細胞分画に存在するという報告もあるが、造血幹細胞ではない CD34-Lineage-細胞かコロニー形成能を示す可能性も考えられる。実際には、それぞれの細胞分画を NOD/SCID マウスに移植し、どの分画が生着するかをみる必要がある。

### 3 増幅前後の細胞表面マーカーの検討

細胞加工の品質管理上、実際の増幅培養で原料の細胞かどのような細胞に分化したのか、また増えた細胞はどのような細胞なのかを知る事は重要である。

現在、造血幹細胞の表面マーカーを正確に知ることは出来ない。しかし増幅によってどのような細胞が得られるかについては、得られた細胞の表面マーカーを調べることで品質管理することか可能であると考えられる。今回の検討では、



CD45/CD34/CD38 の増幅と、細胞の分化マーカーを CD45/CD34 と組み合わせることによって品質管理をおこなう手法を検討した。その結果、多くの表面マーカーの発現変化が認められた。

## E 結論

サイトカインによる造血幹細胞/前駆細胞の ex vivo 増幅で、CD34 陽性細胞数および各種細胞表面マーカーを測定することにより、増幅培養操作で得られる細胞の品質管理が実施できると考えられた。今後は、症例数を増やして検討し、臨床応用に用いられる品質保証、品質管理のデータを蓄積することが必要である。

## F 健康危険情報

特になし

## G 研究発表

### 1 論文発表

なし

### 2 学会発表

なし

## 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

厚生労働科学研究補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

3・品質管理の確立

3-4 NOD/SCID mouse を用いた品質試験

分担研究者 逢坂 敦

（キリンヒール（株）医薬カンパニー生産本部生産技術センター主任研究員）

研究協力者 渋谷 和壽

（キリンヒール（株）医薬カンパニー開発本部医薬開発研究所）

**研究要旨**

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リカント)、FP6（可溶性 IL-6 受容体と IL6 の融合蛋白質）を含む無血清培地 QBSF-60 で培養することにより体外増幅が可能である。

本分担研究では、上記の方法で得られた ex vivo 増幅臍帯血の非臨床試験として、NOD/SCID 移植モデルを用い、移植した細胞の長期造血再構築能及び多分化能を評価した。その結果、増幅細胞では、マウスの骨髄に長期生着しているヒト白血球の割合（SRC）が増加しており、また、多分化能を有していることが明らかとなった。

## A. 研究目的

本研究グループでは、臍帯血由来のヒト CD34 陽性細胞の体外増幅について検討を行っており、SCF、TPO、FL (Flt3/Flk2 リカント)FP6(可溶性 IL-6 受容体と IL-6 の融合蛋白質)を含む無血清培地で培養することにより、体外増幅が可能であることを確認した。

本分担研究では、上記の方法で得られた *ex vivo* 増幅臍帯血の非臨床試験として、NOD/SCID 移植モデルにおいて、移植した細胞の長期造血再構築能及び多分化能を評価したので報告する。

## B 研究方法

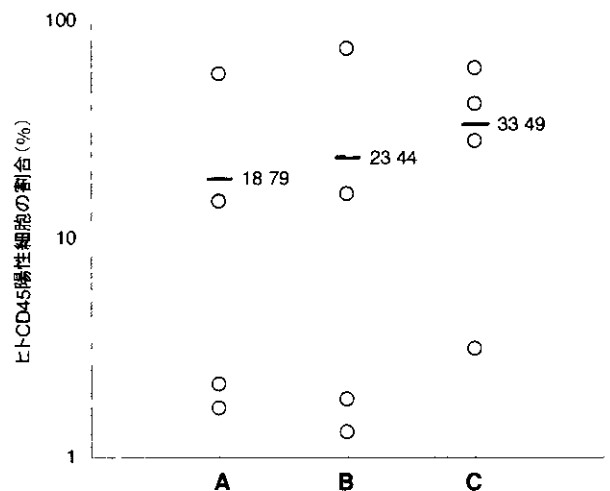
雄性 NOD/SCID マウス (10 週齢) に、X 線照射装置にて 200cGv の放射線を照射し、その後抗アジアロ GM1 抗体を 1 匹あたり 20  $\mu$ L 相当を静脈内投与し、引き続きマウス 1 匹あたり以下に示す細胞を静脈内投与した。

- A 群 40,000 個の未処理 CD34 陽性細胞
- B 群 40,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞
- C 群 20,000 個の未処理 CD34 陽性細胞と 20,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞

移植約 4 ヶ月後に、マウス大腿骨より骨髓細胞を採取し、ヒト白血球 (CD45 陽性細胞) の割合、およびそのヒト白血球が発現している各分化マーカーを FACS Calibur により解析した。なお、CD34 陽性細胞の増幅方法は、TPO、SCF、FL 及び FP6 (各 100 ng/mL) を含む QBSF-60 培地に CD34 陽性細胞を 10,000 個/mL の濃度で、50 mL のフラスコ中で 7 日間培養した。

## C 研究結果

NOD/SCID 移植モデルの検討の結果、増幅細胞を移植したマウスの骨髓におけるヒト CD45 陽性細胞の割合は未処理 CD34 陽性細胞移植群よりも高く、さらに、増幅細胞と未処理 CD34 陽性細胞を同時に移植した場合もヒト CD45 陽性細胞の割合が高いことが判明した。また、増幅細胞を移植されたマウスに生着しているヒト CD45 陽性細胞は、未処理 CD34 陽性細胞を移植されたマウスに生着しているヒト CD45 陽性細胞と同様に、多系統の血球細胞に分化していることが判明した。



	A	B	C
CD34 (造血幹細胞)	18.92±5.54	23.48±3.97	12.01±3.56
CD36 (赤芽球 巨核球)	22.09±2.56	34.57±4.62	15.96±4.39
CD19 (Bリンパ球)	65.95±4.00	62.13±5.60	76.25±2.48
CD33 (骨髓球系細胞)	28.36±6.52	29.48±3.52	18.26±4.97
CD41 (巨核球系)	12.73±5.91	7.85±3.06	4.83±2.49

## D 考察

重症免疫不全であるNOD/SCIDマウスはヒトの造血細胞を拒絶せずに生着することかできる。NOD/SCIDマウスに移植されたヒトの造血幹細胞は、長期にわたってヒトの造血を再構築することかでき、なおかつ多様な血液細胞に分化することか判明しており、幹細胞の定義である自己複製能と多分化能を示すことかできる。近年このマウスを用いてヒトの造血幹細胞の定量が行われるようになり、さらに造血幹細胞のex vivo増幅効率の評価にも用いられるようになった。今回の研究では、このNOD/SCID移植系を用いてex vivo増幅臍帯血の品質を評価した。増幅細胞を移植したマウスの骨髄におけるヒトCD45陽性細胞の割合は未処理CD34陽性細胞移植群よりも高く、さらに、増幅細胞と未処理CD34陽性細胞を同時に移植した場合もヒトCD45陽性細胞の割合が高いという結果から、ex vivo増幅臍帯血ではヒトの幹細胞が増幅されていることを示唆している。また、ex vivo増幅臍帯血は未処理CD34陽性細胞と同様に、多系統の血球細胞に分化していることから、本増幅法は多分化能を失うことなく幹細胞を増加させることか示唆された。

## E 結論

CD34陽性細胞をTPO、SCF、FL及びFP6を用いて無血清培養して得られた増幅細胞では、マウスの骨髄に長期生着しているヒト白血球の割合(SRC)が増加していること、さらに増幅細胞は多分化能を有していることか明らかとなった。

## F 健康危険情報

特になし

## G 研究発表

### 1・論文発表

なし

### 1 学会発表

伊藤仁也、渋谷和憲、井出陽一、後藤真澄美、鈴木秀文、平塚俊男、前川平、金倉譲、中畑龍俊 ex vivo増幅臍帯血の非臨床試験(その3)NOD/SCID移植モデルにおける評価 平成15年12月19日 第26回日本造血細胞移植学会

## H 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

3・品質管理の確立

3-5 NOG mouse を用いた品質管理

分担研究者 平家 俊男

（京都大学医学研究科発達小児科学助教授）

研究要旨

我々は既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また、我々の見出した、ヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。

これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、second transplantation の実験を行った。その結果、second transplantation によっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  か、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることが再確認された。この結果により、我々のサイトカインを用いたヒト造血幹細胞増幅システムの有用性が、in vivo のシステムを用いて確認された。今後、臨床応用に向けたハックを用いた、無血清培養にて増幅したヒト造血幹細胞の活性測定等を行なっている。同時に、骨髄細胞のもつ他組織分化の可塑性についても検討を進めている。

## A 研究目的

Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用の為には、造血幹細胞の異種動物を用いた活性評価が不可欠である。異種動物への移植に際して、移植細胞の生着を許容するには、異種動物の持つ免疫機構が大きな障害となる。我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認している。本研究においては、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  か、ヒト造血幹細胞の幹細胞活性評価における有用性について検討を進める。さらに、近年注目集まっている造血（幹）細胞の他組織への可塑性について、ヒト造血細胞を用いて検討する。

## B 研究方法

ヒト臍帯血由来 CD34+細胞を、放射線照射した免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺への、ヒト細胞の生着の動態を検討する。従来免疫不全マウス NOD/SCID においては、ヒト T 細胞の出現が明らかでない。幹細胞活性の厳密な評価のためには、すべての系統への分化の検証が必要であり、ヒト T 細胞の同定か、ヒト幹細胞活性評価のためには必須である。本研究においてはヒト T 細胞の出現、及びその機能的解析に重点をおき、解析を行う。引き続いて、IL-6/soluble IL-6R を含むサイトカインで ex vivo 増幅を行ったヒト造血幹細胞について、同様の方法にて造血幹細胞活性測定を行う。さらに、ヒト臍帯血 CD34+細胞移植を行った NOD/SCID/ $\gamma$

$c^{null}$  マウス由来骨髄細胞を用いて second transplantation を行い、骨髄再構築の有無について検討する。また、ヒトへの応用を視野に入れ、無血清培地で ex vivo 増幅したヒト臍帯血 CD34+細胞を用いて、同様の実験を行う。一方、現在注目集めている造血幹細胞の可塑性についても、様々な組織障害を与え、肝臓、筋肉、神経等の組織における移植ヒト細胞の再生過程における奇与について、検討する。

## C 研究結果

我々は、既に臍帯血 CD34+細胞を我々の開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  に移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認している。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。これらの T 細胞は、TCR の多様性を持ち、CTL 活性等の機能も有することを明らかにした。また、我々の見出したヒト造血幹細胞の増幅に対して有効である sIL-6R を含むサイトカインの組み合わせを用いて増幅した細胞の幹細胞活性を、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  を用いて検討した。その結果、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、胸腺等においてはヒト T 細胞の出現を確認した。この結果により、我々のサイトカインを用いたヒト造血幹細胞増幅システムの有用性が、in vivo のシステムを用いて確認された。これらの結果を踏まえ、マウス骨髄に、移植可能なヒト造血幹細胞が生着、増幅していることを確認するため、second

transplantation の実験を行った。その結果、second transplantation によっても、上記各種組織にヒト造血細胞の出現が同様に確認され、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  か、ヒト造血幹細胞活性測定に有用であることか、再確認された。今後、臨床応用に向けたハックを用いた、無血清培養にて増幅したヒト造血幹細胞の活性測定等を行なっている。同時に、骨髓細胞のもつ他組織分化の可塑性についても検討を進めている。

#### D 考察

免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  において、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの T 細胞を含む全血球への分化が証明された。マウス、ヒトの異種動物間において、免疫学的バリアーを超えて、ヒト血球細胞の出現が確認できたことは驚きに値する。NOD/SCID マウスと NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスで認める免疫障害の差異を鑑みるに、リンパ球に代表される獲得免疫系に加えて、NK 細胞などの自然免疫系が生着に大きく寄与することか明らかとなった。さらに、NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  マウスに認める樹状細胞などの機能も、ヒト細胞の生着に大きく関与することか推測される。一方、造血幹細胞よりの分化の過程には、サイトカイン、接着分子等の様々な分子が寄与することか判っている。今回、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  においてヒト造血幹細胞の分化が確認されたことにより、マウス、ヒト間において分化に必須な分子は redundancy を有することか明らかとなった。今後、造血幹細胞の可塑性を検討するにおいて、免疫不全マウス

NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  の有用性への期待か、ますます高まった。

#### E 結論

免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導することにより、in vivo での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうることか明らかとなった。今後、骨髓細胞の持つ可塑性を評価できる in vivo でのシステムとなりうるか、検討を進める。

#### F 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G 研究発表

- 1 Hiramatsu, H, Nishikomori R, Heike, T, Ito M, Kobayashi, K, Katamura K and Nakahata T Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  mice model Blood 102 873-880 2003
- 2 Yoshimoto, M, Shinohara, T, Heike T, Shiota, M, Kanatsu-Shinohara M, Nakahata T Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicated the presence of a niche Exp Hematol 31 733-740, 2003
- 3 Mitsui, T, Watanabe, S, Taniguchi Y, Hanada, S, Ebihara Y, Sato, T, Heike, T, Mitsuyama M, Nakahata, T, Tsuji K Impaired neutrophil

- maturation in truncated G-CSF receptor-transgenic mice Blood 101 2990-2995 2003
- 4 Kambe N Hiramatsu H Shimonaka M Fujino H Nishikomori R Heike T Ito M Kobayashi K Ueyama Y Matsuvoshi N Miyachi Y and Nakahata T Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body Blood in press
  - 5 Heike T and Nakahata T Stem cell plasticity in hematopoietic system Int J Hematol in press
  - 6 Ueda K Heike T Yoshimoto M Shioita M Suemori H Luo, H Y Ch u i D H K Torii R , Shibuva M Nakatsuji N and Nakahata T Development of primitive and definitive hematopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro Development in press

## H 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。



厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

## 分担研究報告書

### 4・新 GCP に則った臨床プロトコルの作成

臍帯血造血幹細胞の増幅培養法の比較

分担研究者 伊藤 仁也

（先端医療センター再生医療研究部主任研究員）

分担研究者 村上 雅義

（先端医療センター臨床研究支援部）

研究協力者 丸山 京子

（先端医療センター再生医療研究部技術員）

#### 研究要旨

細胞治療、再生医療において科学的根拠に基づいた臨床プロトコルを作成する研究は、歴史的にまた浅く解析法などの体系が整っていないのが現状である。

我々は体外増幅された臍帯血幹細胞移植を臨床応用するにあたり、海外ですてに行なわれている臨床研究の結果を検証し、細胞のポテンシャルを *In vitro* のデータと相関させ、安全性、効果の予測を行なう試みを行なった。

また、前臨床試験として細胞の安全性と効果の検証から Phase I/II study に相当する臨床プロトコルの作成の準備を開始した。

## A 研究目的

体外で加工した細胞を用いた細胞治療の効果を科学的に検証していくためには、いくつかの難問が存在する。オーダーメイド的治療であることから明確な統計学的見地に基づいた効果の検証が困難であること、投与する細胞が不均一であり、またこれまでに臨床効果と相関するいかなる検査指標が存在しないこと。細胞製剤の体内での動態（体内での分布や体内での細胞の分化、サイトカイン産生など機能的質の変化など）を完全に再現できる系が存在しないため、前臨床試験での安全性の評価に限界があることなどが指摘されている。また、トランスレーショナルリサーチとして基礎の成果を実際の臨床試験へと移行させる際に問題となることは、安全性と効果の予測をいかに行ない、臨床試験の妥当性を示すことである。今回我々は海外で既に行なわれているサイトカインで増幅した臍帯血幹細胞移植の臨床試験で用いられた培養細胞の特性を評価することにより、臨床試験の妥当性を証明することを目的に本研究を行なった。

## B 研究方法

McNiece 法 SCF 100ng/ml+G-CSF 100ng/ml+TPO 100ng/ml  
Kurtzberg 法 GM-CSF 50ng/ml+IL-3 50ng/ml+FL 25ng/ml+EPO 0.1U/ml

Nakahata 法 SCF 100ng/ml+TPO 10ng/ml+FL100ng/ml+sIL-6R/IL-6 100ng/ml

Medium は QBSF60(Quality Biological 社)を用い2週間培養し、それぞれの培養法での臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅率、細胞形態、表面抗原、コロニー形成能を比較した。細胞の形態は培養後の細胞をサイトスピンにて固定し、May-Giemsa 染色、および特殊染色を行ない、細胞の形態分類を行なった。表面抗原の検討は CD34 の陽性率の他、CD38, HLA-DR, CD90, CD117, CD133 などの幹細胞の未熟性の検討および、分化をみるため、CD3, CD19, CD41, Glycophorin A, CD14, CD33 などの lineage marker を検討した。造血前駆細胞の機能的評価としては、メチルセルロースコロニーアッセイを行ない、コロニー形成能を比較した。

## C. 研究結果

### A) 細胞の増殖能の評価

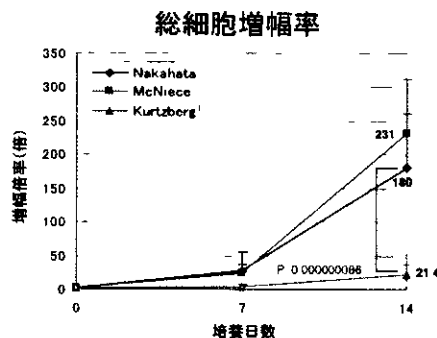


Fig 1-1 total 細胞増幅率 (n=10)

### CD34 陽性細胞増幅率

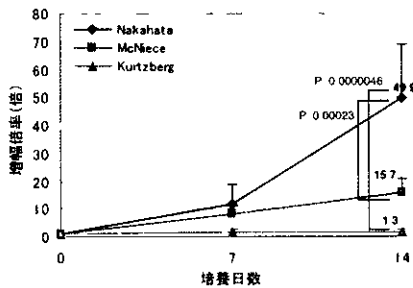


Fig 1-2 CD34 陽性細胞増幅率 (n=8)  
FACS解析よりCD34 /CD45 の細胞を算出 倍率に換算

3 法で総細胞数の増幅率および CD34 陽性細胞の増幅率を比較した。CD34 陽性細胞数の増幅率は Nakahata 法が有意に高かった。

### B) コロニー形成能

#### 総コロニー増幅率

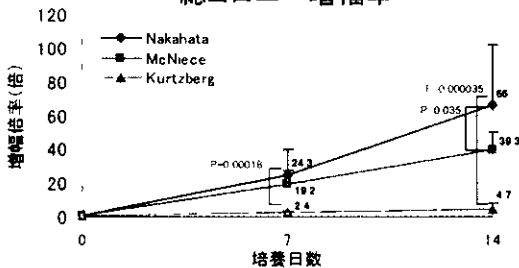


Fig 2-1 total コロニー増幅率 (n=10)  
単位当りのtotal コロニー形成率と培養総細胞数よりコロニー形成培養細胞数を算出 倍率に換算

#### CFU-Mix 増幅率

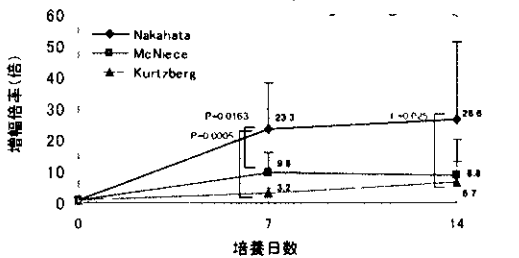


Fig 2-2 CFU-Mix コロニー増幅率 (n=10)  
単位当りのCFU-Mix コロニー形成率と培養総細胞数よりコロニー形成培養細胞数を算出 倍率に換算

コロニー形成能の比較においても Nakahata 法では他の2法と比較してコロニー形成細胞の増幅率が高く、また特に未分化な分画と考えられる CFU-Mix コロ

ニー形成細胞は有意に増殖した。

### C) 形態分類

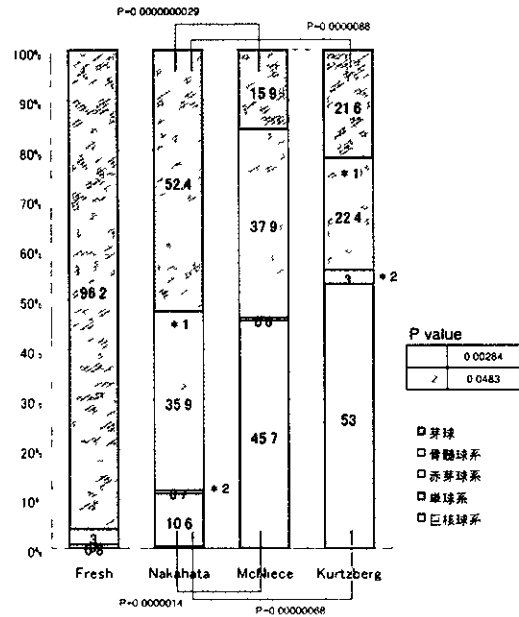


Fig 3 May-Giemsaによる形態分類

3 法で培養した細胞に対し May-Giemsa 染色を行ない、分類を行なった。Nakahata 法においては、有意に芽球の割合が高いのに対し、McNiece 法においては、顆粒球、Kurtzberg 法においては、単球系に分化する傾向がみられた。

### D) NOD/SCID マウスへの造血再構築能の比較

Nakahata 法と McNiece 法で培養した臍帯血を NOD/SCID マウスに移植し、4 カ月後のマウス骨髄でのヒト細胞キメリズムを比較した。Nakahata 法においては、有意に造血細胞再構築能 (SRC 活性) が高いことが確認された。

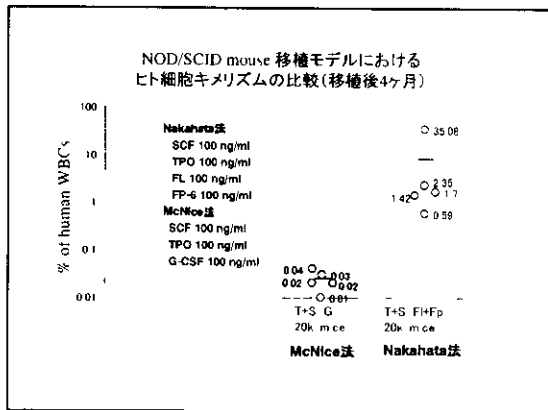


Fig4

#### D まとめと考案

Table 1 に現在行なわれている McNiece および Kurtzberg との培養法の違いによる細胞特性のまとめを示した。

Nakahata 法ではより未分化な幹細胞分画を選択的に増幅させることがわかった。現在、McNiece と Kurtzberg のグループにおいてはすでに臨床試験が進行しており、その結果が報告されている。<sup>1)2)</sup> によると好中球の生着の中央値は前者で 28 日、後者で 22 日と良好な結果を示したか、血小板の生着については生着促進効果は認められていない。その結果現在のところサイトカインで体外増幅させた臍帯血移植の安全性は証明できたか、有効性まで

は証明できていないのか現状である。McNiece らが行なった臨床研究においては、移植した CD34 陽性細胞が体重あたり  $5 \times 10^4$  以上であった時に生着日数が短縮される傾向が認められたと報告しており、我々の方法においては生着促進効果が期待できると考えられる。

#### E 結論

臨床試験に先立ち、海外で行なわれたサイトカインによる増幅臍帯血移植に用いられた細胞特性を *in vitro* で検証した。我々の方法ではより未分化な幹細胞分画を選択的に増幅できることが示され、NOD/SCID マウスを用いたヒト造血細胞再構築能においても上回ったことにおいては、臍帯血幹細胞の *ex vivo* expansion の臨床試験に向けた 1 つの evidence が得られたことと考えられる。我々は安全性らと効果の立証をデザインした臨床試験の準備にとりかかった。

Group	Nakahata	MacNiece	Kutzberg
Combination of cytokine	IL-6&IL-6R+TPO + SCF + FL	G-CSF+TPO + SCF	GM-3 1%CSF/IL-3 + EPO+ FL
Fold of total mononuclear cell	180	230	21.4
Fold of CD34+ cell	49.9	15.7	1.3
Fold of total colony forming cell	66.0	39.3	4.7
Fold of CFU-Mix	26.6	8.8	6.7
Rate of CD34 cell of expanded CB	28.8%	7.1%	7.1%
Rate of CD34+/CD133+ cell	26.8%	8.9%	3.1%

n=8

Table 1 サイトカインの組み合わせによる増幅臍帯血の比較