
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15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16年（2004年）3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15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た。

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きた。

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てきた。

一昨年と昨年度に引き続き、本年度も概ね計画どおりに研究が進行し、多くの原著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た厚生労働省医薬局血液対策課の方々に心から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 15

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 17

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 19

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

I. 総括研究報告

厚生科学研究補助金医薬安全総合研究事業
総括研究報告書

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

昨年度までの研究により、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。本年度は、幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子の単離、増幅された幹細胞を NOD/SCID マウス内でより効率的に評価できるアッセイ系の開発、CMV 抗原特異的 CTL の効率的な増幅法の開発、臍帯血樹状細胞増殖系の確立などの成果がえられた。

A. 研究目的

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には成人の骨髄や末梢血幹細胞よりも旺盛な増力能力があることから、体外で造血細胞や血液細胞を分化増殖させることにより、新たな輸血製剤の供給源となることが期待される。

我々は 1990 年代に臍帯血幹細胞を体外増幅する方法として、マウス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⁺ CD38⁻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して、平成 13～14 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が、平成 15 年度は 13～14 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) CMV-tetramer 陽性細胞を Flow cytometry により解析した。
- 2) CMV-tetramer 陽性細胞を immunobeads により単離した後に peptide pulse DC による刺激を繰り返して大量培養を試みた。

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) ヒト臍帯血より MACS 磁気ビーズ法により CD34 陽性細胞を純化して、NOD/SCID マウス脛骨の骨髄内に移植して定量的 SRC アッセイを行った。
- 2) 骨髄ストローマ細胞 HESS-5 細胞上で SCF, Flk-2 ligand, TPO 存在下に培養した CD34 陽性細胞を骨髄内移植した。

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)

- 1) 臍帯血 CD34+細胞の増幅を支持するマウス骨髓ストローマ細胞 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と想定される遺伝子を半定量的 RT-PCR 法により発現を比較した。
- 2) 同定された遺伝子の蛋白を用いてストローマ細胞を利用することなく臍帯血幹細胞を体外増幅する培養系の検討を行った。

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)

- 1) 臍帯血単核球から MACS beads 法によって CD 3 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。
- 2) 培養後細胞を GM-CSF/IL-4 添加によって骨髓系 DC へと誘導した。

C. 研究結果

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) 移植後患者の血液中に CMV 感染後に有意な CMV-tetramer 陽性細胞の増加を認めた。
- 2) 培養細胞は peptide pulse DC による刺激によって増殖効率が高まり (約 2000 倍の増殖)、peptide pulse auto-DC のみならず CMV 感染線維芽細胞 (A24 陽性) をも殺傷する能力を in vitro で発揮した。

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) 骨髓内直接移植 (iBM) は経尾静脈移植 (iv) と比較して、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。
- 2) iBM 移植で生着したヒト造血細胞は、従来の iv 移植と同様に多分化能と自己複製能を示した。
- 3) 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。

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)

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)

CD34 陽性細胞から効率高く骨髓系 DC 誘導が可能であった (培養後 30-70% が骨髓系 DC に分化した) 一方リンパ系 DC はおよそ数%に留まった。

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- γ 産生能の上昇を認めた。

D. 考案

本年度は一昨年度と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

て詳細な検討を行った。

我々の方法によりヒト臍帯血幹細胞を体外で大量増幅することが可能であることが再度確認され、それぞれの血球への分化と成熟を促すことも可能であることがさらに詳細に明らかにされた。

しかしながら今後の臨床的な応用を考えた場合には、異種動物細胞を一部であっても用いた培養系には種々の問題点があることから、ストローマ細胞に依存しないような培養系に発展させていく必要がある。

E. 結論

1. ウイルス特異的 CTL の誘導法の研究 (分担研究：加藤俊一)

CMV-tetramer 陽性細胞を効率的に分離、培養することに成功した。

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)

検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法として骨髓内移植法を開発した。

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)

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)

CD34 陽性細胞から効率高く骨髓系 DC 誘導が可能であった

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

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

テトラマーを用い、造血幹細胞移植患者においてサイトメガロウイルス (CMV) 特異的 CD8 陽性 T リンパ球の推移を検討した。移植後は CMV 感染後に有意な陽性率の上昇を認めた。Immunobeads を用いることによって、さらに DC の刺激によって血中のわずかな陽性細胞を分離し、2000 倍に増殖させることが可能となった。増殖細胞は十分な抗 CMV 活性を示すことが *in vitro test* で明らかになった。

A. 研究目的

日本人に最も多い HLA-A24 拘束性の CMV ペプチドを用いた tetramer によって、移植後患者における抗 CMV-CD8 リンパ球の推移を解析した。また将来の抗 CMV 細胞免疫療法確立を目指して、同 tetramer 陽性細胞の分離、培養法を検討した。

B. 研究方法

- 1) 移植患者の末梢血中の CMV-tetramer 陽性細胞を Flowcytometry で解析した。
- 2) A2402-tetramer および beads を用いて健常成人末梢血 100ml から陽性細胞を分離し、IL-2 存在下で培養した。培養細胞はさらに peptide pulse DC による刺激を 1-2 回繰り返した。増殖した細胞の機能については ^{51}Cr -release assay にて解析した。

C. 研究結果

- 1) 移植後は CMV 感染後に有意な tetramer 陽性細胞頻度の上昇を認め、健常成人の平均値 (0.019%) を遥かに越える値であった。
- 2) 培養細胞は peptide pulse DC による刺激によって増殖効率が高まり (約 2000 倍の増殖)、

培養後の細胞は tetramer 90%以上陽性であり、peptide pulse auto-DC のみならず CMV 感染線維芽細胞 (A24 陽性) をも殺傷する能力を *in vitro* で発揮した。

D. 考案

臍帯血は CMV-tetramer 陽性細胞が存在しないために分離培養することは不可能である。しかし移植後にレシピエント体内で感作、誘導される可能性は高い。従って今後は移植患者から同様な方法 (患者末梢血から tetramer 陽性細胞を分離し、IL-2 で培養する) で抗 CMV-CTL が誘導し得るか否かを検討する。

E. 結論

移植後に有意に増加する tetramer 陽性細胞を効率的に分離、培養することに成功した。臍帯血移植への臨床応用が望まれる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

- 1) 著書
小寺良尚・加藤俊一編集「必携造血細胞移植」：執

筆担当;歴史;2-7、治療原理;8-14、先天性疾患

379-390, 医学書院、2004.

2) 原著論文

- Yahata T, Kato S, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*. 2003;101:2905-13.
- Hagihara M, Kato S, et al. The in vitro generation of Ph1+ ALL-specific HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes using a synthetic 16 mer minor bcr-abl peptide. *Leuk Res*. 2003;27:253-7.
- Hagihara M, Kato S, et al. Increased frequency of CD3/8/56-positive umbilical cord blood T lymphocytes after allo-priming in vitro. *Ann Hematol*. 2003 82:166-70.
- Gansuud B, Kato S, et al. Umbilical cord blood dendritic cells are a rich source of soluble HLA-DR: synergistic effect of exosomes and dendritic cells on auto logous or allogeneic T-Cell proliferation. *Hum Immunol*. 2003;64:427-39.
- Inoue H, Kato S, et al. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 2003 77:399-407.
- Ueda Y, Kato S, et al. The effects of alphaGalCer-induced TCR Valpha24 Vbeta 11(+) natural killer T cells on NK cell cytotoxicity in umbilical cord blood. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 52:625-31.
- Yoshihara F, Kato S, et al. Complete resolution of severe chronic active Epstein-Barr virus infection by cultured, activated donor T lymphocyte infusion after nonmyeloablative stem cells allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:107-10.
- Hagihara M, Kato S, et al. Clinical effects of infusing anti-Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes into patients with severe chronic active EBV infection. *Int J Hematol*. 2003 78:62-8.
- Tsuboi K, Kato S, et al. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:903-7.
- Ueda Y, Kato S, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol*. 2003 64:1144-51.
- Muguruma Y, Kato S, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003 31:1323-30.
- Yasuda Y, Yabe H, Kato S, et al. Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. *Neurology*. 2003 Dec 9;61(11):1617-9.
- 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*. 2004 Jan;32(1):95-103.

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業
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。さらに骨髄内移植法を用いることにより感度の高い SRC 測定法が開発された。

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 15 年度は増幅した造血前駆・幹細胞を個体内で効率よく測定する系を開発することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト臍帯血より MACS 磁気ビーズ法により CD34 陽性細胞を純化した。一部の実験ではさらに FACS により Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞を純化して NOD/SCID マウス脛骨の骨髄内に移植して定量的 SRC アッセイを行った。また骨髄ストローマ細胞 HESS-5 細胞上で SCF, Flk-2 ligand, TPO 存在下に培養した CD34 陽性細胞を骨髄内移植した。

C. 研究結果

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。

E. 結論

検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法として骨髄内移植法を開発した。従来体外増幅のようなプロセッシングを受けた造血幹細胞は生着能が低下することが報告されていたが、本法

はそのような細胞にも応用可能であり臨床応用が期待される。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Blood, 101, 2905-2913, 2003.
- 2) J Am Coll Cardiol, 41, 1056-1062, 2003
- 3) Bone Marrow Transplant. 32, 391-398, 2003
- 4) Biomaterials, 24, 3531-3541, 2003
- 5) Exp Hematol. 31, 789-797, 2003
- 6) Exp Hematol. 31, 1323-1330, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 なし

実用新案登録 なし

その他 なし

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業

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。

(Flk-2), G-CSF, GM-CSF, IL-6, leukemia

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 15 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、大腸菌によるリコンビナント Delta-1 を産生した。

B. 研究方法

1. マウス骨髄ストローマ細胞の幹細胞増幅因子の同定

昨年までに臍帯血 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- α , Flk-2/Flt-3、ligand

inhibitory factor (LIF), Stem cell factor (SCF), stem cell growth factor (SCGF), thrombopoietin (TPO), TGF- β , IFN- γ 。本年度も引き続き他の遺伝子の発現の比較、および differential display 法による遺伝子クローニングを行った。

2. 増幅因子蛋白の産生と体外増幅法の再構成

上記により同定された遺伝子の蛋白を CHO 細胞で発現させ、臍帯血幹細胞培養系に添加することにより増幅効率を測定することにより増幅因子の同定を試みた。これらの因子により骨髄ストローマ細胞を利用することなく体外増幅を可能とする培養系を検討した。

C. 研究結果と考察

1. マウス骨髄ストローマ細胞の幹細胞増幅因子の同定

既に報告されている幹細胞増幅因子のいくつかを HESS-5 細胞でも同定した。これらが実際に増幅に関与しているか否か

を現在再構成実験により検討中である。新規因子は現在まで見いだされていない。

2. 増幅因子蛋白の産生と体外増幅法の再構成

現在ヒト型 Delta-1 遺伝子産物を大腸菌より産生し、ストローマ細胞非存在下に臍帯血幹細胞を増幅可能であるか否かを検討中である。

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」により異種のスト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引き続き 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. 77, 152-158, 2003
- 2) Int J Hematol. 77, 164-170, 2003
- 3) Blood, 101, 2905-2913, 2003.
- 4) Bone Marrow Transplant. 32, 391-398, 2003
- 5) Bone Marrow Transplant. 32, 903-907, 2003
- 6) Biomaterials, 24, 3531-3541, 2003
- 7) Exp Hematol. 31, 1323-1330, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究補助金高度先端医療研究事業
分担研究報告書

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 を用いた臍帯血樹状細胞 (DC) 増殖の系確立を試みた。主に骨髓系 DC へに分化誘導が可能であったが、一方でリンパ系 DC への誘導は困難であった。

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。樹状細胞 (dendritic cells=DC) は免疫系をオーガナイズする細胞として重要であり、細胞起源から骨髓系とリンパ系に分類される。今回は既に樹立したマウス stroma 細胞を用いた系で各系統 DC の誘導を試みた。特に後者は IFN α 産生を介してウイルス排除に働く細胞として重要である。

B. 研究方法

HESS-5 を用いた臍帯血 CD 3 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 CD 3 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/TP0) 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 添加によって骨髓系 DC へと誘導した。

一方、CD34 陽性細胞を異なるサイトカイン (IL-3/FLT3/IFN α /IL-7) によってリンパ系 DC 誘導を試みた。

それぞれ DC は FLOWCYTOMETRY (骨髓系 DC ; CD11c+, CD123-, リンパ系 DC ; CD11c-, CD123+) で解析した。

C. 研究結果

CD34 陽性細胞から効率高く骨髓系 DC 誘導が可能であった (培養後 30-70% が骨髓系 DC に分化した)

一方リンパ系 DC はおよそ数%に留まった。

D. 考案及び結論

今回研究により臍帯血 CD 3 4 陽性細胞から DC は主に骨髓系に偏っていると考えられた。あるいはリンパ系への分化には今回は用いていない因子の存在が必要なのかもしれない。

実際の臍帯血中のリンパ系 DC も成人血と比し優位に低頻度であり (Ueda Y, et al. Hum Immunol. 2003, 64, 1144-51.), この点が臍帯血移植後のウイルス感染症が高頻度である要因とも考えられ、今後さら

に検討を要する課題である。

E. 倫理的配慮

本研究は学内倫理委員会、臍帯血バンク委員会の了承をえて実験を行った。また個人情報情報は匿名化された後に研究者に譲渡された。

F. 健康危害情報

なし

G. 成果

論文

Tazume K, Hagihara M, Kato S, et al. Induction of cytomegalovirus-specific CD4-positive cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. *Exp Hematol*, 2003, 32(1): 95-103.

Ueda Y, Hagihara M, Kato S, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and

normal healthy adults. 52, 625-31. *Hum Immunol*. 2003, 64, 1144-51.

Ueda Y, Hagihara M, Kato S, et al. The effects of alphaGalCer-induced TCRValpha24 Vbeta11(+) natural killer T cells on NK cell cytotoxicity in umbilical cord blood.

Cancer Immunol Immunother. 2003, 52(10): 625-31

IV. 研究成果の刊行 に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表業績：著者氏名・発表論文名・学協会誌名・発表年（西暦）・巻号・最初と最後の頁

1) 著書

小寺良尚・加藤俊一編集「必携造血細胞移植」：執筆担当；歴史；2-7、治療原理；8-14、先天性疾患 379-390, 医学書院、2004.

2) 原著論文

Yahata T, Kato S, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*. 2003;101:2905-13.

Hagihara M, Kato S, et al. The in vitro generation of Ph1+ ALL-specific HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes using a synthetic 16 mer minor bcr-abl peptide. *Leuk Res*. 2003;27:253-7.

Hagihara M, Kato S, et al. Increased frequency of CD3/8/56-positive umbilical cord blood T lymphocytes after allo-priming in vitro. *Ann Hematol*. 2003 82:166-70.

Gansuud B, Kato S, et al. Umbilical cord blood dendritic cells are a rich source of soluble HLA-DR: synergistic effect of exosomes and dendritic cells on auto logous or allogeneic T-Cell proliferation. *Hum Immunol*. 2003;64:427-39.

Inoue H, Kato S, et al. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 2003 77:399-407.

Ueda Y, Kato S, et al. The effects of alphaGalCer-induced TCR Valpha24 Vbeta 11(+) natural killer T cells on NK cell cytotoxicity in umbilical cord blood. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 52:625-31.

Yoshiba F, Kato S, et al. Complete resolution of severe chronic active Epstein-Barr virus infection by cultured, activated donor T lymphocyte infusion after nonmyeloablative stem cells allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:107-10.

Hagihara M, Kato S, et al. Clinical effects of infusing anti-Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes into patients with severe chronic active EBV infection. *Int J Hematol*. 2003 78:62-8.

Tsuboi K, Kato S, et al. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:903-7.

Ueda Y, Kato S, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol*. 2003 64:1144-51.

Muguruma Y, Kato S, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003 31:1323-30.

Yasuda Y, Yabe H, Kato S, et al. Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. *Neurology*. 2003 Dec 9;61(11):1617-9.

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*. 2004 Jan;32(1):95-103.