

平成15年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

|                      |   |              |
|----------------------|---|--------------|
| 20030933A<br>KH51041 | 臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究                          | 梨井 康 …… 1    |
| 934A<br>KH51042      | 組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立                  | 廣瀬 雅雄 …… 5   |
| 935A<br>KH51043      | バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発                   | 松浦 善治 …… 10  |
| 936A<br>KH51044      | 細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究              | 最上 知子 …… 16  |
| KH51045              | 粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究                       | 佐多 徹太郎 …… 21 |
| 937A<br>KH51046      | 日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発 | 門脇 孝 …… 24   |
| 938A<br>KH51047      | 呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究         | 竹森 利忠 …… 27  |
| 939A<br>KH51048      | ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発   | 武田 直和 …… 31  |
| 940A<br>KH51049      | ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発                      | 小島 朝人 …… 38  |
| 941A<br>KH51050      | 食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究      | 五十君 静信 …… 43 |
| 942A<br>KH51051      | 安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究                  | 後藤 紀久 …… 48  |
| 943A<br>KH51052      | リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究             | 内田 哲也 …… 55  |
| 944A<br>KH51053      | 肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究                   | 岡部 信彦 …… 61  |
| 945A<br>KH51054      | PPAR $\alpha$ をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発            | 片山 茂裕 …… 64  |
| 946A<br>KH51055      | 感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究                  | 薄井 貢 …… 68   |
| 947A<br>KH51056      | 乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究                        | 西尾 治 …… 71   |
| 948A<br>KH51057      | 可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究    | 田口 文広 …… 77  |
| 949A<br>KH51058      | EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究           | 斎藤 衛郎 …… 86  |
| 950A<br>KH51059      | エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究              | 大坂 寿雅 …… 89  |
| 951A<br>KH51060      | 遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化                      | 清水 博之 …… 93  |
| 952A                 |   |              |

## 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

研究要旨 臍帯血幹細胞を MACS により分離システムを確立・維持し、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。8-OHdG を評価マーカーとして、臍帯血およびランゲルハンス島保存条件の効果を検討するには有用であった。

### 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

### A. 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 Mouse 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した。我々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幹細胞があると考え、その幹細胞を分離・同定し、肝内移植により肝細胞へ分化し、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。また、酸化ストレスのマーカーの1つである 8-OHdG を用いて、臍帯血、ランゲルハンス島の保存およびその他細胞死のマーカーで検討することを目的とした。

### B. 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：  
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を用いて検討した。細胞の精製度は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検討した。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： /Scid マウスに radiation した群としない群に分け抗 asialo GM1 抗体 20  $\mu$ l を腹腔内に投与する。Cre-loxP システムアデノウイルス FasL にて肝障害モデルを作成した。作成したマウスに分離精製した CD34<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> 細胞および CD34<sup>-</sup> lin<sup>+</sup> 細胞を 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cell/500  $\mu$ l を尾静脈投与し、1~5 ヶ月飼育した。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。肝組織はヒトアルブミン抗体を用い検討を行った。また、肝細胞に発現する albumin, AFP, transferrin glutamine synthetase ヒト遺伝子のプライマを用いて、各条件下のマウス肝臓組織中のヒト由来肝細胞の存在を RT-PCR 法を用いて検討を行った。

b. GFP transgenic mouse 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 transgenic mouse から骨髄細胞を無菌的に採取。10<sup>5</sup> 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 を検討した。

### 3) 遺伝子治療法の検討：

遺伝子治療法：初年度において非ウイルス遺伝子導入法としての electroporation (EP) 法を確立したのですが、EP 法よりも遺伝子導入効率が良く、かつ安全性も EP 法に劣らない方法として、第3世代 lenti virus を用いた遺伝子導入および蛋白発現を in vitro で他研究機関との協同研究によって開発した。

### 4) 「高感度 8-OHdG Check」の培養上清中の 8-OHdG の測定

ラットからコラゲナーゼ法で分離したランゲルハンス島を緑茶抽出物ポリフェノールであるカテキンを加えた RPMI 培地に入れ、37°C で培養した。一定期間保存後、「高感度 8-OHdG Check、日本老化制御研究所」を用いて培養上清中の 8-OHdG の測定を行った。また、その他の細胞死マーカーも測定した。さらに、臍帯血中の 8-OHdG の測定を行った。

### (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研究所に移送し、研究材料とした。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、個人情報を守り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、当研究所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。

### C. 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<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞を常に得るようなシステムの維持ができた。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明らかにした。

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<sup>+</sup> (n=2), CD34<sup>-</sup> (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、human 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。また、肝細胞に発現する albumin, AFP, transferrin glutamine synthetase ヒト遺伝子のプライマを用いて、各条件下のマウス肝臓組織中のヒト由来肝細胞の存在を RT-PCR 法を用いて検討を行い、マウス肝臓組織中ヒト臍帯血由来の造血幹細胞から分化できた肝細胞の存在が遺伝子発現レベルでの確認ができた。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。また、GFP 陽性細胞は慢性肝障害モデルでは肝線維化巣に集簇していた。HNF-4 と GFP の蛍光抗体2重染色では両者陽性細胞が肝小葉内に

散見された。一方 radiation を加えた群では GFP 陽性細胞は肝類洞内皮細胞に多く分化する事が確認された。

3) 遺伝子治療法の検討については、HGF 50 $\mu$ 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带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。肝組織像では带状壊死や巣状壊死、PCNA 陽性細胞数には相違は認めなかった。一方肝細胞の apoptosis 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, Bilirubin 値の優位な低下である。特に Bilirubin 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 Albumin はあまり相違は見られず14日目で 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 Sirius 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) ランゲルハンス島培養上清中の 8-OHdG の濃度測定が出来ましたが、カテキンを用いる保護効果についての検討はカテキンの色素が 8-OHdG 測定する際の発色が同じ色であるため妨害になり、測定することができなかった。今後はランゲルハンス島から DNA を抽出して 8-OHdG を測定し、カテキンの抗酸化作用について検討する予定である。しかし、培養上清中の LDH 濃度は、カテキンを加えていないものに比べて加えて培養したものの方が明らかに低かった。また、アポトーシスを検出する ELISA で培養上清を測定したところ、同様にカテキンを加えたものの方が加えていないものよりも値が低かった。以上、培養上清中の細胞死のマーカーで判断する限り、カテキンはランゲルハンス島の細胞死抑制に効果があ

ると考えられる。これらの結果をもとに、ランゲルハンス島の保存条件についてさらに検討を加える予定である。

臍帯血中 8-OHdG は非常に微量であるため、高感度 8-OHdG Check でも測定は難しいと考えられるが、検体数が少なかったため、今後データを蓄積し、再現性をみる必要があると考えられる。また、臍帯血の保存時間による 8-OHdG の増加は見られなかったことから、顕著な酸化進行はなかったと考えられる。

#### D. 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細胞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。

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。

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) 8-OHdG は、人や動物の血清、尿、組織などの生体試料において、広範囲に使用されていて、酸化ストレスによる上昇も多く報告されている。しかし、全く初めての試みであった臍帯血においては、実験系を考え直すことにより、8-OHdG を評価マーカーとして、保存条件の効果をみるのが期待できる。8 検体すべて 0.125ng/ml 以下の低値であった。また、長期間においても 8-OHdG の増加は見られなかったことから、本実験の保存条件は酸化防止効果があると考えられる。また、様々の分野で使われている緑茶中のカテキン成分がランゲルハンス島の細胞死抑制に有効であり、移植する際の組織の保存及び移植後の生存率向上、糖尿病の根治療法であるランゲルハンス島移植の臨床応用の普及に貢献出来ると期待する。

#### E. 結論

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 electroporation (EP) 法を確立し、安全性については高く評価されている第 3 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) 8-OHdG を評価マーカーとして、臍帯血およびランゲルハンス島保存条件の効果を検討するには有用であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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* 52(5):694-700;2003

2) 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* 38(6): 784-92;2003.

3) M. Kawasaki, M. Fujino, X-K. Li, Y. Kitazawa, N. Funeshima, R. Takahashi, M. Ueda, T. Amano, Y. Hakamata, E. Kobayashi. Inducible liver injury in the transgenic rat by expressing liver-specific suicide gene. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 920-928;2003

4) Takahara T, Zhang LP, yata Y, Xue F, Minemura M, Sato H, Watanabe A  
Modulation of matrix metalloproteinase-9 in hepatic stellate cells by three-dimensional type I collagen: its activation and signaling pathway. Hepatol Res, 26:318-326, 2003

5) Takahra T, Smart DE, Oakley F, Mann DA  
Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in 3 dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kB, AP-1 and SP-1. Int J Biochem Cell Biol, 36:353-363, 2004

## 2. 学会発表

野々目和信、高原照美、薛 峰、真野鋭志、矢田 豊、渡辺明治、李 小康 ヒト臍帯血細胞の肝細胞への分化 第3回再生医療学会 幕張 平成16年3月23-25

## G. 知的所有権の取得状況

特になし。

---

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社