

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

月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系幹細胞の
提供システムのすみやかな確立と成育疾患への適応

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成17(2005)年4月

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

月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系幹細胞の
提供システムのすみやかな確立と成育疾患への適応

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成17(2005)年4月

目 次

| | | |
|-----|--|----|
| I | 総括研究報告書 | 1 |
| | ヒト月経血・臍帯血・末梢血・骨髓由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング | 3 |
| | 梅澤 明弘 | |
| II | 分担研究報告書 | 11 |
| | 1, 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による「移植細胞の生着促進」に関する臨床応用の検討 | 13 |
| | 室井 一男 | |
| | 2, ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と細胞移植後の組織学的検証 | 17 |
| | 武田 伸一 | |
| | 3, 末梢血由来の間葉系幹細胞の調整 | 21 |
| | 落合 淳志 | |
| | 4, 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞の分化機構に関する分子レベルでの解明 | 23 |
| | 望月 直樹 | |
| III | 研究成果に関する一欄表 | 27 |
| IV | 研究成果の刊行物・別冊 | 35 |

I 総括研究報告書

ヒト月経血・臍帯血・末梢血・骨髄由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

梅 澤 明 弘

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

月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系幹細胞の提供システムのすみやかな 確立と成育疾患への適応

(H16-再生-009)

主任研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨

間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担う。臨床においても、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に骨髄間質細胞の移植が行われている。同時に、骨髄移植において生着不全を防ぐことを目的に、骨髄間質細胞移植が始められている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。本研究では、マウスのみならずヒト骨髄からも比較的増殖能力の高い間葉系細胞を数種類、分離、培養した。しかしながらこれらの細胞も通常の培養では、その細胞増殖には限界があり細胞治療への応用までは至っていない。ヒト骨髄由来間葉系細胞の寿命が延長するという発見を元に、多くのヒト骨髄間質細胞の寿命延長に成功し、心筋細胞、神経、骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋への分化をさせ、独自に確立した間葉系細胞培養システムを用いて、子宮内膜、臍帯血、末梢血由来の間葉系細胞を単離し、増殖させ、細胞移植の供給源とする細胞提供システムを速やかに構築することを目指す。国立成育医療センター研究所の施設に有する GMP 基準に沿った機関内細胞プロセッシング・センターにおいて、日本国内の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供することを開始した。間葉系細胞は胎盤、臍帯血、骨髄から得ることになり、間葉系細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになり、この提示された過程に従い、提供医療施設を増やしていくと同時に公的細胞バンクに寄託する倫理的手続きを進めている。現在の間葉系細胞培養に使用されている条件は、ウシ血清、ウシ胎児血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は否定できない。このため治療法としての安全性、有効性の基準の確立は急務であり、日本国内で進められている様々な幹細胞に対するフィーダー能を有するのみならず、その細胞自身が多分化能を有する間葉系細胞を適切に提供するシステム構築は、分子基盤を明らかにすると同時に推進していくことが社会への責務である。ヒト月経血・臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞の増殖をコントロールし移植への系を確立することは移植医療の新たなパラダイムの獲得につき、さらに先天性代謝疾患を含めた成育疾患は細胞移植の最もよい対象であり、その治療法の確立をめざし、臨床応用までを視野に入れた具体的なアプローチとする。

A. 研究目的

骨髄間質細胞は、臨床においても米国において、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に移植が行われて始めている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。そのような状況の中で、近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、*in vivo*において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担い、骨髄細胞と共に細胞治療における事実上の標準となっている。骨髄由来間葉系細胞の寿命延長を可能とした「ストレスのない培地 (Stress-free medium)」の開発経験に基づき、月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞を増殖させ、先天性代謝疾患を含めた遺伝病および細胞治療が有効とされる疾病に対する新たな細胞治療法を開発する。具体的には、ヒト間葉系細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、培養細胞の寿命延長過程における細胞の検討を行う。それらの細胞を移植することにより、免疫不全化 (SCID) した疾病モデル動物に対する治療効果を詳細に明らかにする。

B. 研究方法

月経血・臍帯血・末梢血由来のヒト間葉系幹細胞を用いる。同時に対象として、従来より蓄積されている骨髄由来のヒト間葉系細胞を用いる。

(1) 細胞治療用ヒト月経血・臍帯血由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング (梅澤)

既に国立成育医療センター・倫理委員会 (承認番号 25, 26, 27, 49, 55, 全て平成 15 年)にて、承認を受けた臍帯血・骨髄由来の間葉系細胞を単離、培養を行い、さらに月経血、末梢血より単離した間葉系細胞に対しても、同様に後の研究を進めるために蓄積した。ならびに、慶應義塾大学倫理委員会にて承認された分離培養したヒト間葉系細胞の性質を細胞表面マーカー、gene chip (Affymetrix) を用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を詳細に検討を終了した。そのデータを利用して、これらの細胞が多分化能を有す状態を保つ培養条件、方法等を確立するための解析を進行させている。

(2) 免疫不全マウスへのヒト間葉系細胞の移植 (梅澤)

ヒト由来の細胞移植には、免疫不全マウス (NOG: NOD/SCID/IL-2R γ ノックアウトマウス) を利用した。病理形態学的解析を中心に、移植後の病理組織学的な解析を行い、その解析は光学顕微鏡レベルのみならず、超微形態学的検討も同時に遂行した。

(3) 培養条件によるヒト細胞寿命の延長と分子レベルにおける解析 (望月、梅澤)

清野ら (Nature, 1999) により発見されたヒト細胞寿命の延長に関わる遺伝子を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討した。その際、寿命延長には、p16INK4a の上昇を介した Rb 経路が関わることが知られ、この経路に関するシグナル伝達を細胞毎に検討できるよう、シグナル伝達にかかわる分子の定量ならびにリン酸化状態を検討した。またその際のヒト細胞

の染色体、遺伝子レベルでの検討、遺伝子導入効率に対する基盤的研究を同時に行った。

(5) 疾病（リソゾーム病・筋ディストロフィー）モデルマウスの SCID 化（梅澤、武田）

既に疾患モデルとして確立されているムコポリサッカライドーシス VII 型疾患モデルマウスを、免疫不全マウス（SCID または NOD/SCID）と交配し、ヒト細胞を移植可能とした。さらに筋疾病モデルである mdx マウスについても同様に免疫不全マウスと交配し、ヒト細胞を移植可能とした。

(6) 臨床応用への具体的な検討（室井、梅澤）

細胞の臨床応用を視野におき、医薬品 GCP（平成 9 年厚生省令第 28 号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」）と等しいレベルでの科学性および倫理性を確保する。①治療プロトコルに関しては、分担研究者の室井（指導：小澤敬也教授）らが検討し、②ヒト細胞に関しては、具体的な手続き（due process）を通じて、倫理委員会における議論の元に調整する。

C. 研究結果

1) ヒト間葉系細胞の培養

マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌの骨髄から多分化能を有する間葉系細胞を多数樹立し、心筋細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨格筋細胞、神経細胞への分化を示し、ヒト間葉系細胞に関しては月経血、胎盤、臍帯血、骨髄より間葉系細胞の培養を開始しており、それらが少なくとも複数の分化形質を示した。これらを培養するにあたり、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみか

らなる培養法を確立し、Non-stress 培地として数施設に提供し、その妥当性についての報告を受け、新規開発へフィードバックしている。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を終了している。これらの細胞について、さらに網羅的発現遺伝子解析

（Affymetrix 社 GeneChip による解析）ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行っており、一部はホームページ上で公開（<http://1985.jukuin.keio.ac.jp/umezawa/link.html>）し、それらはデータベースとして構築中である。使用するモノクローナル抗体は、ヒト幹細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/-4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーを含む。幹細胞を用いた治療基盤確立のための準備状況としては、分化能検定の開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行っている。特に生体への移植は、実験中央研究所より供与を受けている免疫不全動物（NOD/SCID/IL-2 受容体γノックアウトマウス）への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を進行中である。これらの成果を利用して目的の細胞へ分化しうる月経血・臍帯血・末梢血由来のヒト間葉系細胞を選別し、疾患モデル動物で確立された治療戦略をヒトへ応用することを着実に進めている。

2) 成体幹細胞の特性を決定

成体幹細胞に関する網羅的な遺伝子発現に関し、米国 NIH/NIA のグループとの共同研究を行い、国際誌に発表し（PLoS Biology, 1: 410-419, 2003）、その成果は Nature 誌の News に取り上げられた。また、その情報は Web 上に公開

(http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/NIA_7_4k.html)しており、すべての医療関係者に共有可能となっている。

3) Cell processing center 設立と各種手順書・基準書作製

国立成育医療センター研究所が保有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養技術ならびに製造管理及び品質管理規則 (Good Manufacturing Practice, GMP 基準) を満たすセル・プロセッシング・センターを基盤として、動物由来成分を排除しヒト由来成分のみで構成される幹細胞培養法を確立した。「セル・プロセッシング・センター (CPC)」設立が承認され、厚生労働省直轄研究機関としては初の CPC として整備された。国立成育医療センターでは、上記 CPC を使用したヒト間葉系幹細胞の培養ならびに臨床研究への供給を課題として、研究部横断的な推進体制を構築した。

D. 考察

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞、胎児由来細胞、組織幹細胞があげられる。胚性幹細胞は、その増殖能、多分化能より、将来的に期待されているものの、臨床応用を開始するまでは多くの基盤研究ならびに細胞の整備が必要となり、時間がかかると予想される。胎児由来の神経細胞を初めとする細胞は、細胞移植によりパーキンソン病に効果があることが示されて久しいものの、ヒト中絶胎児を細胞治療の供給源とすることが許容される可能性は高くない。組織幹細胞は分化能が限られているが、目的の細胞に分化させることは比較的容易であり、現在最も注目をあびている。特に、骨髄由来細胞は、虚血四肢に用いら

れ効果が示され、臨床応用が拡大している。本研究に用いる月経血・臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞は、既に培養を進行させており、その初期培養された細胞が蓄積されている。さらにこれらの細胞を用いた神経、心筋、骨組織を構築する研究が進行している。ヒト間葉系細胞に関する国外における研究状況は、大きな2つの流れとしてとらえられる。Verfaillie 博士による Multipotent adult progenitor cells (MAPC) である。もう一方は Prockop 博士らを中心としたヒト骨髄間質細胞である。いずれもその間葉系に由来する幹細胞としての可塑性を利用し細胞治療への動物モデルを提唱し示唆をしている。間葉系幹細胞は驚くべき多岐に渡る胚葉を越えた可塑性を有し、試験管内においても生体外培養にて増殖させることが可能である。この体性幹細胞の利用は、自己の細胞を使用できるため倫理的な面からも臨床応用への理解が得られやすく現段階では、再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 細胞の分離培養技術の確立、2) 細胞のカタログ化、3) 細胞品質管理の標準化がある。細胞の分離培養技術であるが、これらは造血幹細胞の領域で既に臨床応用され多くの実績を得てきている。このような現状では特に①月経血・臍帯血・末梢血由来のヒト細胞を移植することによる細胞治療戦略の確立、②ヒト間葉系細胞の寿命延長、増殖法の研究から得られる結果に基づくバイオインフォマティクスからの情報の蓄積、臨床への探索的研究への着手が必要であり、

ヒト間葉系細胞を薬品、医療機器の範疇としてとらえ米食品医薬品局 (FDA) 基準を指標とする、細胞提供システムの確立、ならびにそれらの方法の安全性、科学性、倫理性を確立したうえで、再生医療を具体的に推進するために「細胞移植供給源としての月経血・臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞提供に関するシステム構築」を目指すことが肝要である。

E. 結論

先天代謝異常症、とくにリソゾーム蓄積症の分子遺伝学的、細胞生物学的研究は、近年急速な進歩を遂げ、遺伝子変異の解析や病態の解明から新しい治療法の開発へと研究の主体はシフトしている。本研究では、先天代謝異常を対象として骨髄間質幹細胞を含めた体性幹細胞を利用した細胞治療法の確立に向けた基盤研究を行う。さらに、これらの幹細胞を臨床応用するための安全かつ効果的な培養システムの確立を目指している。ヒト間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞と共に再生医療という治療戦略の重要な一翼を担い、細胞治療における供給源のひとつとなっている。ヒト細胞の寿命延長を可能とした「ストレスのない培地」の開発経験に基づき、骨髄、月経血、臍帯血、末梢血由来のヒト間葉系細胞の分離培養、細胞のプロファイルの確定後、培養細胞の寿命延長過程における細胞の検討し、それらの細胞を移植することにより、免疫不全化 (SCID 化) した疾病モデル動物を用いた細胞治療法の安全性と治療効果をみた。先天代謝異常症に対する細胞療法においては、移植された細胞が必要とされる酵素を長期間にわたり供給することが必要である。細

胞は骨髄間葉系幹細胞を用い、ライソソーム病のひとつであるムコ多糖症 VII 型 (β -グルクロニダーゼ欠損症、MPS VII) モデルマウスの脳内に移植して、中枢神経や腹腔臓器におけるライソソーム酵素活性値の変化、病理所見、行動を検討した。

これらの知見を基に、国立成育医療センター内に臨床研究を前提とした ad hoc 委員会を設立し、臨床試験研究への具体的なロードマップを作製し、医療に提供できる新たな間葉系細胞の分離・培養を行い、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を終了した。また、ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行い、国立成育医療センター研究所が有する GMP 基準に沿った機関内の細胞プロセッシング・センターにおいて日本国内の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供することを可能とした。運用は「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針 (未定稿)」に沿うレベルで、各組織由来のヒト細胞を移植することによる細胞治療戦略を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。ヒト由来細胞を用いた研究に関しては、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査された。ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面に

において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 12 月追加承認、受付番号 88、平成 16 年 8 月承認、受付番号 89、平成 16 年 8 月承認、受付番号 90、平成 16 年 8 月承認）。医療を前提とした品質管理システムの構築、標準操作手順書の作製、試薬等の受入試験検査、ならびに細菌・真菌・ウイルス等の汚染の危険性排除については、それらの記録、最新技術の反映を含めて検討した。また、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針（未定稿）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮している。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行っている。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター動物実験指針に準拠して研究を実施している。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめ、またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなっている。

H. 研究発表

論文発表

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press 2005

Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T.: Immortalization of human fetal cells: The life

span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol. Biol. Cell*, in press. Correspondence to AU.

Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A.: Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet. *Cell Tissue Res*, 316: 141-153, 2004

Umezawa, A.: Mesenchymal stem cells and epigenetics, *Brain & Development*, 26: 417-418, 2004

Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Eto, Y.: Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Therapy*, 11(19):1475-1481, 2004

Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.: Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression. *Cancer Res*, 64: 3545-3549, 2004

Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.: Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer letter*, in press.

Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A.: "Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?", *J Gene Med*, 6(8): 833-845, 2004.

Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.: Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes, *Biomacromolecules*, 5(5): 1770-1774, 2004.

Kato, Y., Imabayashi, H., Mori, M., Tani, T., Taniguchi, M., Umezawa, A., and Tsunoda,

Y.: Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal: Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells. Biol Reprod, 70: 415-418, 2004

梅澤明弘：精子形成にかかわるエピジェネティクス、特集「精子」、Hormone Frontier in Gynecology, 11 (3): 24-28, 2004

梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平：化学工学, 2004

梅澤明弘：間葉系幹細胞を用いた細胞治療、7章再生治療モデル、「ヒト疾患モデルー難病の病態解明と診断・治療への応用」、秦順一編集、文光堂、2004年4月21日

梅澤明弘：遺伝子変異、病理と臨床「病理診断における分子生物学」、22:47-53, 2004

梅澤明弘：細胞分離・幹細胞工学、「図解 再生医療工学」第3章 再生医療のキーテクノロジー 技術編5、(株)工業調査会、2004

梅澤明弘：書評「絵でわかる 血液のはたらき」(八幡義人著)、医学のあゆみ、209 (2): 115, 2004

高橋祐司、細井美彦、梅澤明弘、齊藤英和、入谷明：クローン技術・卵細胞質移植と核移植、産婦人科の世界、増刊号、2004

梅澤明弘：再生医療とエピジェネティクス(6章)、「エピジェネティクス」、佐々木裕之編、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社、2004

梅澤明弘：ヒト幹細胞を用いた再生医療、昭和医会誌、64(1): , 2004

梅澤明弘：骨芽細胞から神経細胞への分化、再生医療、3(1): 61-68, 2004

梅澤明弘、五條理志：間葉系幹細胞の基礎と臨床、40(12), Molecular Medicine, 2004

梅澤明弘、竹田征治：骨髄間質細胞の可塑性、実験医学、22(1): 12-16, 2004

I. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

(a) 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内(第372826号、平成11年12月28日)

「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際(PCT/JP00/001148、平成13年2月28日)

「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際(PCT/JP00/07741、平成13年11月2日)

「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際(PCT/JP00/09323、平成13年12月27日)

出願人：協和醗酵株式会社

(b) 「骨の再生方法」

発明者：梅澤明弘、秦順一、立石哲也、牛田多加志、陳国平

出願日：第251365号、平成13年8月22日

出願人：梅澤明弘、牛田多加志、独立行政法人産業技術総合研究所

(c) 「間葉系細胞から膵β細胞を形成する方法」

発明者：梅澤明弘、伊澤良兼

出願日：平成14年4月17日

出願番号 特願2002-115201、

出願人：大塚製薬株式会社

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

Ⅱ 分担研究報告書

1. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による「移植細胞の生着促進」に関する臨床応用の検討
室井 一男
2. ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と細胞移植後の組織学的検証
武田 伸一
3. 末梢血由来の間葉系幹細胞の調整
落合 淳志
4. 月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞の分化機構に関する分子レベルでの解明
望月 直樹

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

「月経血・臍帯血・末梢血由来間葉系細胞による「移植細胞の生着促進」に
関する臨床応用の検討」

分担研究者 室井 一男 自治医科大学血液学 助教授

研究要旨 間葉系幹細胞を臨床応用するために、臨床試験に耐える品質管理システム(GMP)の構築を試みた。「第3者から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の予防または治療」の臨床試験に参加した。

A. 研究目的

間葉系幹細胞を臨床応用するためには、平成12年12月に通知された「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について(医薬発第1314号)」を遵守する必要がある。そこで、上記の指針に従い臨床試験に耐える品質管理システムの構築を試みる。また、「第3者から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の予防または治療」の臨床試験を行う。

B. 研究方法

医薬発第1314号の中の「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的な考え方」と「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」に基づき、現在有する設備と指示書を照合し不備な点を洗い出す。臨床試験については、国内外の関係者と打ち合わせを開き第1相及び第2相臨床試験のプロトコールを作成する。

C. 研究結果

品質管理システムの構築に関しては、数年前に設置した臨床用の細胞プロセッシング室が既に稼働している。この細胞プロセッシング室の設計と設備を確認したところ、内部はクラス1万の清浄度であること、内部が陽圧のため外部からの感染因子が侵入し難いこと、安全キャビネット付きクリーンベンチが2台、インキュベータが4台、遠心機2台等を有し、十分な無菌環境で細胞操作ができることが確認された。造血幹細胞移植に用いる細胞の処理に関する手順書は既に備わっているので、これらを基に骨髄間葉系幹細胞の処理に関する手順書や記録書の様式を検討した。骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験は、既に米国では行われている。平成16年7月、「第3者から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の予防または治療」の臨床試験を行うため関係者と話し合いをした。サイト

メガロウイルスやEBウイルスの罹患率は米国の方が低いことから、米国在住の健康人から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いることが決定された。第1相臨床試験は10例程度の少数例で安全性を確認した後、速やかに第2相臨床試験に進むことが確認された。移植片対宿主病の予防と治療のどちらを目的とするかについては結論が出ず、次回の議題に持ち越された。海外から骨髄間葉系幹細胞を治療抵抗性移植片対宿主病の治療に用いた症例報告が平成16年5月Lancet誌に発表された。その後、非公式ではあるが、さらに海外で5例程度行われているとの情報が得られた。

D. 結論

骨髄間葉系幹細胞の臨床試験に対応できる品質管理システムはほぼ構築されたが、手順書や記録書の整備についてはさらなる検討が必要と考えられた。「第3者から得られた骨髄間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の予防または治療」の臨床試験については、第1相臨床試験の早急な実施が必要と認識された。

E. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

論文発表

Nagashima, T., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Komatsu, N., Ozawa, K.: Paraproteinemia after hematopoietic stem cell transplantation. Leuk. Lymphoma 45(1):135-137, 2004.

Tarumoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Mitsugi, K., Nakano, S., Muroi, K., Komatsu, N., Ozawa, K.: Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. Exp. Hematol. 32(4):375-381, 2004.

Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Nagashima, T., Mori, M., Matsui, K., Murakami, Y., Ikeda, U., Ozawa, K.: Analysis of hematopoietic progenitors in bone marrow from patients with peripheral artery disease. *Leuk. Res.* 28(9):999-1000, 2004.

Eizawa, T., Ikeda, U., Murakami, Y., Matsui, K., Yoshioka, T., Suzuki, C., Takahashi, M., Muroi, K., Kamisawa, O., Fuse, K., Shimada, K.: Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair. *Heart Vessels* 19(3):107-110, 2004.

Eizawa, T., Ikeda, U., Murakami, Y., Matsui, K., Yoshioka, T., Takahashi, M., Muroi, K., Shimada, K.: Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 90(6):685-686, 2004.

Kikuchi, S., Muroi, K., Takahashi, S., Kawano-Yamamoto, C., Takatoku, M., Miyazato, A., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N., Ozawa, K.: Severe hepatitis and complete molecular response caused by imatinib mesylate: possible association of its serum concentration with clinical outcomes. *Leuk. Lymphoma* 45(11):2349-2351, 2004.

Takatoku, M., Muroi, K., Kawano-Yamamoto, C., Nagai, T., Komatsu, N., Ozawa, K.: Involvement of the esophagus and stomach as a first manifestation of varicella zoster virus infection after allogeneic bone marrow transplantation. *Intern. Med.* 43(9):861-864, 2004

佐藤一也、森政樹、目黒明子、三好拓児、永井正、室井一男、小松則夫、小澤敬也。骨髓壊死による膝関節痛が先行出現した minor bcr/abl キメラ遺伝子陽性急性リンパ性白血病。臨床血液、45(11):1203-1207, 2004.

佐藤一也、永井正、室井一男、小松則夫、小澤敬也。特発性血小板減少性紫斑病に対する *Helicobacter pylori* 除菌療法-*Helicobacter pylori* の活動性と血小板数の相関-。臨床血液、45(12):1252-1254, 2004

学会発表

菊池悟、高德正昭、高橋さと子、畑野かおる、森政樹、永井正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：プロテアゾーム阻害剤(bortezomib)が奏効したサリドマイド抵抗性難治性多発性骨髄腫の1症例。臨床血液 45(1)p. 87-88, 2004.

翁 家国、宮里 彰、佐藤一也、外島正樹、大嶺 謙、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：濾胞性リンパ腫再発例に対する Rituximab 併用 DHAP 療法の有用性と安全性の検討。日本内科学会雑誌

93(Suppl) : 191, 2004.

小原陽子、永井 正、外島正樹、森 政樹、菊池 悟、宮里 彰、高德正昭、室井一男、小松則夫、小澤敬也：壊疽性膿瘡を伴う緑膿菌敗血症を合併した急性骨髄性白血病。臨床血液 45(6) : p. 487, 2004.

菅野直子、近江俊徳、小峰聖子、田村光子、大槻郁子、尾島佐恵子、渡邊一枝、小野崎文子、小幡 隆、岸野光司、中木陽子、永嶋貴博、山本千鶴、森 政樹、岩本禎彦、小澤敬也、室井一男：カラム法における直接抗グロブリン試験と赤血球結合 IgG。日本輸血学会雑誌 50(2) :p. 329, 2004.

小野崎文子、小峰聖子、大槻郁子、尾島佐恵子、渡邊一枝、小幡 隆、田村光子、菅野直子、岸野光司、中木陽子、永嶋貴博、山本千鶴、森 政樹、小澤敬也、室井一男：当院の日当直時の手術における血液製剤の使用状況。日本輸血学会雑誌 50(2) :p. 305, 2004.

目黒明子、高德正昭、大嶺 謙、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：急性呼吸不全で発症し救命できた真性赤血球増加症。日本内科学会関東地方会 5 1 8 回演題要旨 : p. 34, 2004.

多々良礼音、佐藤一也、宮里 彰、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：急激な臨床経過をたどった aggressive NK cell lymphoma/leukemia の1 剖検例。臨床血液 45(4) :p. 326, 2004.

高德正昭、目黒明子、畑野かおる、菊池 悟、三好拓児、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、加納康彦、小澤敬也：難治性多発性骨髄腫に対するボルテゾミブ併用療法の可能性。臨床血液 45(8) :p. 750, 2004.

小原陽子、菊池 悟、大嶺 謙、外島正樹、内田美栄、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：著明な髄外浸潤を来たし、閉塞性黄疸と腎不全にて発症した trisomy 4 AML の1 例。臨床血液 45(8) :p. 839, 2004.

高橋さと子、菊池 悟、外島正樹、宮里 彰、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、弘中 貢、川井俊郎、斎藤 建、小澤敬也：骨髄線維化・肝脾腫を伴い診断が困難であった diffuse large B-cell lymphoma。臨床血液 45(8) :p. 848, 2004.

渡邊純子、翁 家国、窓岩清治、大嶺 謙、外島正樹、宮里 彰、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、

小松則夫、坂田洋一、小澤敬也：深部血栓症を合併した特発性血小板減少性紫斑病。臨床血液 45(8) :p. 888, 2004.

目黒明子、宮里 彰、翁 家国、佐藤一也、外島正樹、大嶺 謙、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、小松則夫、小澤敬也：Cladribine 使用後に遷延する血球減少を認めた難治性濾胞性リンパ腫の3例。臨床血液 45(8) :p. 979, 2004.

目黒明子、室井一男、三好拓児、山本千鶴、永嶋貴博、外島正樹、大嶺 謙、宮里 彰、高德正昭、永井 正、森 政樹、小松則夫、小澤敬也：骨髄移植後に偽膜性腸炎を併発した3例。第27回日本造血細胞移植学会総会抄 p. 187, 2004.

永嶋貴博、室井一男、三好拓児、山本千鶴、外島正樹、大嶺 謙、宮里 彰、高德正昭、永井 正、森 政樹、小松則夫、小澤敬也：造血幹細胞移植後にみられる脳脊髄液中の細胞数の増加。第27回日本造血細胞移植学会総会抄録集 p. 185, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. その他（雑誌及び書籍）
書籍

1. 室井一男：造血幹細胞移植のポイント、血液内科診療マニュアル、小澤敬也、坂田洋一編集、日本医学館、東京、2004、p. 11-20.
2. 山本千鶴、室井一男：フローサイトメトリー、血液内科診療マニュアル、小澤敬也、坂田洋一編集、日本医学館、東京、2004、p. 223-229.

雑誌

1. 室井一男：間葉系幹細胞の造血幹細胞移植への応用、血液フロンティア、vol15, p. 75-81, 2005.

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

ヒト間葉系細胞の移植システム検証のための mdx/SCID 開発と
細胞移植後の組織学的検証

分担研究者 武田伸一

国立精神・神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 部長

研究要旨 骨格筋多能性幹細胞の候補として、SP 細胞を FACS で分離、CD31、CD45 を用いて更にサブセットに分画し、CD31-CD45-SP 細胞を新たに見いだした。それぞれの SP サブセットの筋再生での動態、分化能を検討した。この細胞は脂肪細胞、骨細胞、筋細胞に分化し、間葉系幹細胞様の性質を有していると考えられた。また NOD/SCID に筋芽細胞と共移植すると、著しく筋再生を促進した。今後はこの細胞の筋再生における役割を更に解析していく必要がある。

A. 研究目的

骨格筋は障害を受けると再生し、それは主に筋衛星細胞の増殖によって達成する。近年、成体の骨格筋の中にも多能性幹細胞が存在し、筋再生に参加する事が報告されているが、その性質はよくわかっていない。我々は、ヘキスト色素を効率よく排出する SP 細胞に注目し、骨格筋に存在する SP 細胞の解析を行い、その筋再生における役割を明らかにする事を試みた。

B. 研究方法

C57Bl/6 あるいは C57Bl/6-GFP のマウス骨格筋をコラゲナーゼで処理し、単核の細胞を分離、ヘキスト 33342 で染色後、CD31、CD45 で染色、FACS で解析、あるいはソーティングした。筋再生モデルとしてマウス全脛骨筋にカルジオトキシンを筋注し、筋壊死を引き起こした。細胞移植には免疫不全マウスの NOD/SCID を用いた。

C. 研究成果

成体のマウス骨格筋には、ヘキスト色素を効率よく排出する SP 細胞分画が存在したが、この分画は CD31 と CD45 の発現により 3 つの分画：CD45+CD31-SP、CD45-CD31+SP、CD45-CD31-SP に分ける事ができた。通常の状態では骨格筋 SP 細胞の殆どは CD31+CD45-SP 細胞であり、血管内皮細胞様の局在を示し、筋再生に関して殆ど増殖しなかった。CD45+CD31-SP 細胞は、骨髓移植実験から、骨髓由来である事がわかった。CD45-CD31-SP 細胞は、通常は非常にマイナーな細胞分画であるが、筋再生時に増殖し、いろいろな間葉系マーカーを発現し、また VEGF、Ang1 を発現していた。In vitro では脂肪細胞、骨細胞へ分化誘導可能

であり、in vivo の移植実験では、筋線維へ分化した。5-FU を筋注し、内因性の増殖細胞を抑制し、カルジオトキシンで筋再生を引き起こした前脛骨筋に 1) 筋芽細胞 2) CD31-CD45-SP 3) 1)+2) の組み合わせで移植すると、3) の筋芽細胞 + CD31-CD45-SP を移植した群で、筋再生が著しく改善した。

D. 考察

骨格筋の SP 細胞の殆どは、表面マーカー、遺伝子発現、局在等、血管内皮に類似した細胞で、筋再生に関して特に増殖して、筋再生に関与する事はなかった。一方我々の見いだした CD31-CD45-SP 細胞は、本来 SP 細胞の中でもマイナーな分画であるが、筋再生時に増殖し、筋線維再生に参加するとともに、共移植実験の結果から筋芽細胞の筋分化、成熟を促進する因子を分泌している可能性が示唆された。また、in vitro の分化誘導実験から、この CD31-CD45-SP 細胞は間葉系幹細胞様活性を持っている事が示唆された。

E. 結論

筋再生に関与する新たな SP 細胞分画 (CD45-CD31-SP 細胞) を見出した。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

I. 論文発表
< 英文 >

1. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S: e-Sarcoglycan compensates for lack of a-sarcoglycan in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2005 Feb; [Equb ahead of

- print]
2. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL: Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol.* 168(4): 655-66, 2005
 3. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. *J Gene Medicine*, 7(2): 237-48, 2004
 4. Yoshimura M, Sakamoto M, Ikemoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther*, 10(5): 821-828, 2004
 5. Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, Adachi K, Xiao X, Takeda S, Takahashi K, Weiner HL, Tabira T: Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 6(5):483-8, 2004
 6. Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Mac-1low early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commu*, 2004 Sep 3; 321(4): 1050-61
 7. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M: Laminin alpha 1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha 2 chain deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2004, 13(16): 1775-1784.
 8. Fukada S, Higuchi S, Segawa M, Koda K, Yamamoto Y, Tsujikawa K, Kohama Y, Uezumi A, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H: Purification and cell-surface marker characterization of quiescent satellite cells from murine skeletal muscle by a novel monoclonal antibody. *Exp Cell Res.* 2004 Jun 10; 296(2): 245-55.
 9. Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M: Identification and characterization of e-sarcoglycans in the central nervous system. *Mol Brain Res.* 125(1-2): 1-12, 2004
 10. Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K:

alpha 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem.* 279(15): 15091-5, 2004

<和文>

1. 武田伸二：筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。第45回日本神経学会総会シンポジウム、遺伝性筋ジストロフィーの根本的治療をめざして 臨床神経、44: 911-913, 2004

II. 学会発表

<国外>

1. Fukada S, Uezumi A, Segawa M, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Molecular characterization of quiescent satellite cells and their application to cell therapy Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
2. Uezumi A, Fukada S, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Identification of a novel subpopulation of SP cells during muscle regeneration. Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Alberta, Canada, Feb 13, 2005
3. Yoshioka H, Shiga K, Takeda S, Imamura M: In vitro analysis of assembly of the sarcoglycan complex containig z-sarcoglycan. the American Society for Cell Biology, Washington DC, USA, Dec 7, 2004
4. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Muscle stem cells as a tool for cell therapy of muscular dystrophy Molecular Therapy of Muscular Dystrophy /Part II, International Symposium Organized by Japanese Muscular Dystrophy Research Group, Tokyo, Nov 12, 2004
5. Takeda S: The role of muscle stem cells in muscle regeneration. Seminar at Hammer Smith Hospital, London, UK, Nov. 8, 2004
6. Takeda S: Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses. The 12th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, Finland, Nov 5, 2004
7. Takeda S: Therapeutic approaches to dystrophin-deficient muscular dystrophy. Seminar at Genethon, Evry, France, 7 Sep, 2004
8. Takeda S: A novel sub-population of muscle Side Population (SP) cells and

- their roles in muscle regeneration. Seminar at Pasteur Institute, Paris, France, Sep 6, 2004
9. Yoshida M, Ampong BN, Mochizuki Y, Imamura M, Takeda S: Dysferlin may interact with dihydropyridine receptor. 9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
 10. Takeda S, Mochizuki Y, Uezumi A, Ojima K, Masuda S: Contribution of bone marrow derived cells to denervated skeletal muscle. 9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg, Sweden, 2 Sep, 2004
 11. Takeda S: Gene transfer in Duchenne muscular dystrophy. Monaco Round Table Discussion -Micro-dystrophin from concept to clinical trials-, Monte Carlo, Monaco, 6.19, 2004
 12. Takeda S: AAV vector and microdystrophin. Lecture at the 7th Summer School of Myology, Institut de Myologie, Paris, France, 6.17, 2004
 13. Takeda S, Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y: An AAV vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient mdx myofibers still improved the mdx phenotype through compensatory hypertrophy. 7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.4, 2004
 14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S: Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses. 7th Annual Meeting, The American Society of Gene Therapy, Minneapolis, USA, 6.3, 2004
- <国内>
1. 深田総一郎、上住聡芳、瀬川雅司、増田 智、鈴木友子、山元 弘、武田伸一: 骨格筋特異的幹細胞（筋衛星細胞）の遺伝子発現解析。第4回日本再生医療学会総会、大阪、3.1, 2005
 2. 鈴木直輝、望月靖史、上住聡芳、深田総一郎、増田 智、深瀬明子、鈴木友子、武田伸一: 骨髄キメラマウスを用いた後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋肥大メカニズムの解析。第4回日本再生医療学会総会、大阪、3.1, 2005
 3. 上住聡芳、尾嶋孝一、深田総一郎、増田智、鈴木友子、武田伸一: 骨格筋 Side Population (SP) cells の筋再生における機能。第4回日本再生医療学会総会、大阪、3.1, 2005
 4. 武田伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の pre-clinical study -筋ジストロフィー骨格筋で認められた免疫応答の克服-。ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究成果発表会、東京、2.25, 2005
 5. 武田伸一: 骨格筋・幹細胞と筋再生の分子機構。慶應大学医学部セミナー・日本横紋筋肉腫研究グループ (J R S G)、東京、2.14, 2005
 6. 武田伸一、石浦章一、鈴木友子: 内因性ユートロフィンの発現増強による筋ジストロフィーの画期的治療法の開発。こころの健康科学 (神経分野) 研究成果発表会 (研究者向け)、東京、2.9, 2005
 7. 武田伸一、鈴木友子、増田 智、深田宗一郎、鈴木直輝、望月靖史、上住聡芳: 微小重力による筋萎縮の分子メカニズム。-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-、第27回日本分子生物学会年会、神戸市、12.10, 2004
 8. 二川 健、平坂勝也、久田記美子、後藤淳平、不老治治美、大西ゆう子、岸 恭一、小川貴之、鈴江直人、安井夏生、石堂一巳、埜中征哉、武田伸一: Unloading による筋・骨萎縮におけるユビキチン・システムの重要性ユビキチンリガーゼの結合蛋白質の解析を中心に。-メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端-第27回日本分子生物学会年会、神戸市、12.10, 2004
 9. 武田伸一: 骨格筋幹細胞と筋再生。東京大学大学院セミナー、11.19, 2004
 10. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する生殖医療と遺伝子治療。埼玉県筋ジストロフィー協会創立40執念記念大会関連シンポジウム「遺伝子疾患 (筋ジストロフィーなど) と生殖医療」、9.18, 2004
 11. 武田伸一: 骨格筋の幹細胞を巡る進歩。東北大学医学部セミナー、宮城県仙台市、9.17, 2004
 12. 武田伸一: 将来の治療。平成16年度神経・筋疾患政策医療ネットワーク研修会、東京、9.16, 2004
 13. Ikemoto M, Yoshimura M, Sakamoto M, Mochizuki Y, Yuasa K, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: An AAV-vector-mediated micro-dystrophin expression in relatively small percentage of dystrophin-deficient mdx myofibers still improved the mdx phenotype. 日本

遺伝子治療学会、東京、8.5, 2004

14. Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N, Sato K, Miyagoe-Suzuki Y, Howell MJ, Takeda S: Successful AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle required suppression of excess immune responses. 日本遺伝子治療学会、東京、8.5, 2004
15. 上住聡芳、尾嶋孝一、増田智、深瀬明子、鈴木友子、武田伸一：骨格筋再生過程における side population (SP) cells の解析。第 25 回日本炎症・再生医学会、東京、7.14, 2004
16. 望月靖史、尾嶋孝一、上住聡芳、増田智、武田伸一：骨格筋の脱神経病変に対する骨髄由来細胞の関与。第 25 回日本炎症・再生医学会、東京、7.13, 2004
17. 武田伸一：筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。三菱ウエルファーマ 横浜 5.28, 2004
18. 武田伸一：筋ジストロフィーモデル動物における遺伝子治療研究の現況と展望。第 45 回日本神経学会総会シンポジウム 東京 5.14, 2004
19. 吉村まどか、池本 円、坂本美喜、望月靖史、湯浅勝敏、辻 省次、武田伸一：アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによるマイクロ・ジストロフィン遺伝子の導入効果。第 45 回日本神経学会総会、東京、5.14, 2004
20. 上住聡芳、尾嶋孝一、深田宗一郎、増田 智、深瀬明子、鈴木友子、武田伸一：骨格筋再生過程による Side Population(SP) 細胞の解析。第 2 回幹細胞シンポジウム、4.26, 2004.

H. 知的所有権の出願・登録状況
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

抹消血由来間葉系幹細胞の提供システムの速やかな確立と育成疾患への適応の研究

分担研究者 落合淳志 国立がんセンター研究所支所臨床腫瘍病理部

研究要旨

末梢血由来間葉系幹細胞取得のための手技の樹立を目指し、肺がん患者の肺動脈内に存在する間葉系幹細胞の培養を目指した。ヒト肺がん患者の肺動脈内には間葉系幹細胞が存在することが明らかになり、また高率に間葉系幹細胞の培養が可能であることを初めて明らかにした。

研究目的

ヒトの末梢血内に間葉系幹細胞が存在し、その間葉系幹細胞を採取可能になれば、比較的簡単に間葉系幹細胞を採取し、利用することが可能になる。実際のヒト抹消血における間葉系幹細胞の存在を確認すると共に、その採取のための条件を検討する。

研究方法

肺がん患者の切除された肺組織において、がん近傍である肺動脈および肺静脈から血液をそれぞれ10ml採取し、細胞成分を分画し通常のRPMI1640培地に1%牛胎児血清または市販の幹細胞培地により培養する。肺がんにおけるがん組織への流入動脈としての肺動脈中における血液内の間葉系前駆細胞が存在するかを検討した。次に、培養できた間葉系前駆細胞が幹細胞であるかを脂肪細胞、骨芽細胞、そして軟骨細胞への分化を検討した。ヒト患者検体を使うために国立がんセンター倫理審査基準に準じ患者へのICを取った上で行った。

研究成果

ヒト肺がん患者の肺動脈ならびに肺

動脈に存在する血液内には幹細胞培地で増殖する細胞の存在することが明らかになった。この細胞は、肺動脈内血液の方が肺静脈内血液に比べて多く認められた。この細胞は、脂肪細胞および骨芽細胞へ分化することが可能であることが示された。現在軟骨への分化の可能性について検討中である。

考察

これまで間葉系幹細胞は骨髄細胞由来のものが多く使用されていたが、今年度の成果としてヒトの末梢血内に間葉系幹細胞が存在し、高率に間葉系幹細胞を採取する可能性が存在することが初めて示された。過去にヒト成人末梢血内に存在する間葉系幹細胞について検討した論文は広範囲熱傷患者の血液中に間葉系幹細胞が存在したことと、多量の血液ストック中に少数の間葉系幹細胞が存在することを報告されただけであり、10mlといった少量の血液内に間葉系幹細胞を見つけ出したことは全く新しい。現在、採取した血液内に存在する間葉系幹細胞の性状の把握と、今回がん患者の末梢血に認められたことより、がんの生物学的悪性