

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15～16年度 総合研究報告書

主任研究者 齋藤 英彦

平成17(2005)年 3月

平成 15～16 年度 総合研究報告書

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「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班における平成 15-16 年度の 2 年間の研究成果をまとめたものである。本研究班は、平成 12 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指したものである。

1997 年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、2005 年 2 月末には 2,200 例にもものぼる急速な発展を見せており、今や骨髄移植と並び造血細胞移植の重要な一翼を担っている。この目覚ましい普及には日本さい帯血バンクネットワークなどの社会的基盤の整備によるところが大きい。一方、臍帯血移植は歴史が短いために有効性、安全性に関する評価が国際的にも充分には確立していない。このような時に臍帯血移植の日本人における EBM(根拠に基づく医療)を確立することは急務である。prospective な無作為臨床試験を行い臨床上の疑問に答えることは国際的な情報発信の点からも重要である。また臍帯血幹細胞の体外増幅や臍帯血中の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、我が国独自の研究を推進する必要がある。

本研究班では以下の三つの目標をもって研究を進めた。(1) 造血幹細胞移植における臍帯血移植の位置づけを明らかにするために、我が国で行われるすべての臍帯血移植の臨床成績を集計、解析し骨髄移植とも比較して成績の向上に役立てる。また、前向き無作為臨床試験により EBM を確立する。(2) 臍帯血の体外増幅法の開発・基盤整備を行う。(3) 臍帯血の特性を生かしつつその弱点を克服するため、臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持/増幅、移植後の造血・免疫システムの早期再構築に関する研究を促進する。本研究班では基礎から臨床にわたる 9 名の分担研究者と臨床の 8 名の研究協力者をもって進め、全国の移植医療関係者、日本さい帯血バンクネットワーク、地域さい帯血バンクの協力の下に行われた。

2 年間で振り返って成果を自己評価すると、臨床成績の解析による予後因子の同定や基礎研究はほぼ計画通りに成果を出せた。また、臍帯血の ex vivo の増幅法は臨床応用が近い所まで来ており、世界をリードしている。一方、無作為前向き臨床試験は症例登録の遅れから終了することは出来なかった。今後継続して答えを出したいと考えている。また、臍帯血は血液細胞以外の幹細胞を含む再生医療の材料の宝庫であり、今後益々の基礎研究の発展が期待される。

本報告書は各分担研究者の 2 年間の研究業績をまとめたものであり、関係者のご参考になれば幸いである。

2005 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15～16年度名簿

(50音順)

| | 氏名 | 所属・職名 |
|-------|-------|---|
| 班長 | 齋藤英彦 | 国立病院機構名古屋医療センター 院長 |
| 班員 | 小澤敬也 | 自治医科血液学講座 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 | 大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座 教授(平成16年度) 大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野 教授(平成15年度) |
| | 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 | 昭和大学藤が丘病院小児科 客員教授(平成16年度) 神奈川県厚木保健所 所長(平成15年度) |
| | 矢崎 信 | 名古屋市立東市民病院第一小児科 部長(平成16年度) 名古屋市立守山市民病院小児科 部長(平成15年度) |
| | 事務局 | 齋藤英彦 |

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総合研究報告 | 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 | 6 |
| 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 | 7 |
| 仲野 徹 | |
| 3. 胎盤由来間質細胞を用いた再生医療 | 8 |
| 高橋 恒夫 | |
| 4. 臍帯血移植後の造血・免疫再構築促進に関する研究 | 13 |
| 直江 知樹 | |
| 5. 臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究 | 19 |
| 原 宏 | |
| 6. 臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究 | 27 |
| 堀田 知光 | |
| 7. わが国における非血縁者間臍帯血移植成績 | 28 |
| 加藤 俊一 | |
| 8. 臍帯血移植の安全性に関する検討 | 39 |
| 小澤 敬也 | |
| 9. Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用に関する研究 | 42 |
| 中畑 龍俊 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 44 |
| IV. 代表的論文 | 60 |

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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 国立病院機構名古屋医療センター院長

研究要旨

非血縁者間臍帯血移植 1304 例を集計・解析し、移植成績を左右する予後因子を同定した。生着と最も強い相関があったのは移植された CD34 陽性細胞数であり、無イベント生存率（EFS）と相関したのは、移植時期、患者年齢、疾患の種類であった。11 例中 7 例の複数臍帯血同時移植は一年後に無病生存しており短期の副作用も認めなかった。体外増幅した臍帯血による移植の臨床応用に向けた基盤整備を完了した。臍帯血造血幹細胞の未分化性維持、血管新生誘導、胎盤の間葉系細胞の再生医療への応用の研究を進めた。

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 教授）、仲野 徹（大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座 教授）、中畑龍俊（京大大学院医学研究科発達小児科学 教授）、原宏（兵庫医科大学内科学 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 課長）、西平浩一（昭和大学藤が丘病院小児科 客員教授）、矢崎 信（名古屋市長東市民病院第一小児科 部長）

A. 研究目的

（1）臍帯血移植の EBM（根拠に基づく医療）を確立する。そのために我が国における非血縁者間臍帯血移植例の臨床成績の収集・解析、予後因子の同定、骨髄移植との比較を行う。また、

2つの前向き臨床試験「GVHD 予防法」、「臍帯血を用いたミニ移植」を推進する。さらに、臍帯血の医薬品としての有効性、安全性に関する基準の策定を図る。

（2）成人への適応拡大のために安全で効率的な GMP に準拠した臍帯血の体外増幅法を開発する。また、複数臍帯血同時移植を実施する。

（3）臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持・増殖、移植後の免疫システムの再構築、血小板回復に関する研究を実施する。

（4）胎盤由来の間葉系細胞の再生医療への応用に関する研究を推進する。

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。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、「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と共同で開始する。

（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。「複数ドナーからの臍帯血同時移植」の臨床研究を 4 施設において開始する。適応症例は HLA 一致血縁ドナーおよび HLA 一致非血縁骨髄ドナーを見出せず、さらに、HLA 4/6 以上適合の 3×10^7

/kg の細胞数を含む単一臍帯血を見出せない患者とした。

(3) 造血幹細胞の未分化性の維持、造血幹細胞による血管新生誘導、臍帯血移植後の造血・免疫再構築に関する研究を進める。

(4) 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、本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」、「臍帯血を用いたミニ移植」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) 1,304 例の臍帯血移植（小児：553 例、成人：751 例）の解析により以下の予後因子を同定した。生着と最も強い相関があったのは移植された CD34 陽性細胞数であり、無イベント生存率 (EFS) と相関したのは、移植時期、患者年齢、疾患の種類であった。小児急性リンパ性白血病 (121 例) の 5 年 EFS は 46.3%、小児急性骨髄性白血病 (49 例) では 53.8%であった。急性 GVHD と HLA 一致度との間には相関はなかった。本研究の成果として、小児急性白血病に対しては臍帯血移植が非血縁者間骨髄移植とほぼ同等の安全性、有効性を持つことを明らかにし、我が国に於ける臍帯血移植の増加と共に日本人における EBM を確立しつつある。一方、成人に対する臍帯血移植（主としてミニ移植）の成績は一部の施設を除いては劣っており、今後慎重に進める必要がある。臍帯血の「細胞医薬品」としての安全性に関しては、日本さい帯血バンクネッ

トワークおよび欧米のバンクの実態、欧米各国における臍帯血の規制の現状調査を行い、我が国のバンクの臍帯血は同程度に安全であることを確認した。しかし、将来、臍帯血が「細胞医薬品」として扱われるような事態に備えてより高いレベルに目標をおくことが重要と考えられる。

「至適 GVHD 予防法の無作為臨床試験」は 58 例の登録があったが、目標の 112 例まで達しなかった。今後も継続して患者登録を進める。高上班との合同研究「臍帯血を用いたミニ移植」は 8 施設で研究を開始したが、目標 37 例に対して 6 例の登録があった時点で、6 例中 4 例で治療不成功および条件を満たす患者が少ないという理由で登録を中止した。

(2) 複数臍帯血同時移植は 4 施設に於いて 11 例行い、7 例が無病生存しており短期の副作用も認めなかった。現在の所、一年生存率は 72% と良好であり、さらに症例を増やしていく予定である。臍帯血中の造血幹細胞の *ex vivo* 増幅については、無血清培養法の安全性を確認し、前臨床試験でマウスにて増幅細胞が T、B 細胞を含む全ての血球へ分化することを示した。新 GCP に準拠した臨床プロトコールを作成し先端医療センターの倫理委員会で承認された。まもなく体外増幅した臍帯血を用いた急性白血病に対する移植の Phase I/II study が予定されている。世界的にも最先端をいく研究である。

(3) 血液細胞が発現する NP-1 が VEGF と結合し、VEGF-NP-1 複合体が血管内皮細胞の増殖を VEGF 単独に比べ増強すること、造血幹細胞が血管構造の安定化、成熟化に関与することを明らかにした。ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の NOG マウスへの移植モデルにおいて、活性化 CD4 リンパ球輸注が液性免疫能を回復することを示した。またヒト臍帯血は未分化な血管内皮前駆細胞を多数含んでいることを見いだした。転写因子 GATA-1 を欠損するマウス ES 細胞から分化した前赤芽球様細胞は長期培養が可能であることを示した。また、幹細胞の未分化性維持に癌抑制遺伝子 PTEN のシグナルが関与することを認めた。ヒト肝細胞増殖因子 (HGF) の遺伝子治療により、急性 GVHD を抑制し移植片対腫瘍効果 (GVL) を温存することがマウスでは可能であった。昨年度に

開発した骨髄内移植法を用いて、約 15%のクローンが体外増幅可能であり多分化能と自己複製能を持つことを明らかにした。

(4) 胎盤絨毛由来の間葉系細胞(PDMPCs)は、テロメラーゼや Bmi-1 遺伝子導入による不死化後も、骨細胞及び軟骨細胞への分化能を維持していることを示した。PDMPCs はドナーへの負担が全くなく再生医療のソースとして有望であると思われる。

D. 結論

我が国における非血縁者間臍帯血移植の成績を集計・解析し、小児急性白血病に対しては非血縁者間骨髄移植とほぼ同等の有効性、安全性を持つことを明らかにした。11例の複数臍帯血同時移植を行い、短期の安全性を確認した。臍帯血造血幹細胞の体外増幅法の基盤整備を行い、臨床プロトコルの承認を倫理委員会で受けた。臍帯血造血幹細胞の未分化性維持機構、血管新生誘導能などの研究を進め、また胎盤由来の間葉系細胞の再生医療への可能性を検討した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

代表的論文

1. Nishihira H, Takahashi TA, Kato S, Naoe T, Saito H, et al.: 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. Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T, Takakura N.: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101:1801-1809, 2003
3. Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev* 120: 657-667, 2003.
4. 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.
5. Kitajima K, Tanaka M, Jie Z, Sakai-Ogawa E, Nakano T.: In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells to hematopoietic cells on an OP9 stromal cell monolayer. *Methods Enzymol* 365:72-82, 2003.
6. Eto K, Lewitt AL, Nakano T, Shattil SJ.: Development and analysis of megakaryocytes from murine embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 365: 142-157, 2003.
7. Nakano T: Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. *Trends Immunol* 24: 589-594, 2003.
8. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, Igura K, Nagayama H, Tojo A, Tanosaki R, Takaue Y, Okamoto S, Takahashi TA: Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol* 31: 1237-1246, 2003.
9. Kashiwakura I, Takahashi TA.: Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *Br J Haematol* 122: 479-88, 2003.
10. 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(11):1489-500, 2003.
11. 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.
 12. 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* 77:399-407, 2003.
 13. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, and Ozawa K: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.
 14. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., Nakahata T.: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using NOD/SCID/ γ_c^{null} mice model. *Blood* 102:873-880, 2003.
 15. Heike T. Nakahata T.: Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int Hematol.* 79:7-14,2003.
 16. Okada Y, Matsuura E, Tozuka Z, Nagai R, Watanabe A, Matsumoto K, Yasui K, Jackman RW, Nakano T, Doi T: Upstream stimulatory factor stimulates transcription through the E-box motif in the PF4 gene in megakaryocytes. *Blood* 104:2027-2034, 2004
 17. Komazawa N, Matsuda M, Kondoh G, Mizunoya W, Iwaki M, Takagi T, Sumikawa Y, Inoue K, Suzuki A, Mak TW, Nakano T, Fushiki T, Takeda J, Shimomura I.: Enhanced insulin sensitivity, energy expenditure and thermogenesis in adipose-specific Pten suppression in mice. *Nat Med* 10:1208-15, 2004
 18. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6: 543 - 553, 2004.
 19. 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* 13: 337-341, 2004.
 20. 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.
 21. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Takahashi S, Hirabayashi N, Hiraoka A, Kanda Y, Tanosaki R, Okamoto S, Iwato K, Atsuta Y, Hamajima N, Tanimoto M, Kato S.: Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant* 34: 331-7, 2004
 22. Imado T, Iwasaki T, Kuroiwa T, Sano H, Hara H : Effect of FK506 on donor T-cell functions that are responsible for graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Transplantation* 77: 391-398, 2004.
 23. Imado T, Iwasai T, Kataoka Y, Kuroiwa T, Hara H, Fujimoto J, Sano H, : Hepatocyte growth factor preserves

- graft-versus-leukemia effect and T-cell reconstitution after marrow transplantation. *Blood* 104(5): 1542-1549, 2004.
24. Yahata T, Ando K, Miyatake H, Uno T, Sato T, Ito M, Kato S and Hotta T: Competitive repopulation assay from two cord blood units of CD34+ cells in NOD/SCID/ gnull mice. *Mol Ther* 10(5): 882-891, 2004
25. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K: Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104: 3581-3587, 2004
26. Tazume K, 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: 95-103, 2004.
27. Peters C, Kato S, et al.: Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 104: 881-888, 2004.
28. Yahata T, Kato S, et al.: Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice. *Blood* 105: 882-891, 2004.
29. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, and Hasegawa M: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med* 6: 22-31, 2004.
30. Kambe N., Hiramatsu H., Shimonaka M., Fujino H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Ueyama Y., Matsuyoshi N., Miyachi Y., 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* 103:860-867,2004.
31. Iida M., Heike T., Yoshimoto M., Baba S., Doi H., Nakahata T.: Identification of cardiac stem cells with FLK1 expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 19:371-378, 2004.
32. Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba T., Kazuki Y., Toyokuni S., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T.: Generation of multipotent stem cells from postnatal mouse testis. *Cell* 119:1001-1012, 2004.
33. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, and Takakura N: Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* in press
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - リコンビナントアルブミンを利用した造血幹細胞用無血清培地と培養法：特願 2004-13291（中畑龍俊）
 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

造血幹細胞が血管新生を誘導することを 2000 年に我々が報告して以来、バジャー病や心筋梗塞など、虚血性疾患の患者の患部に造血幹細胞を移植して、血管を誘導再生する血管治療が行なわれるようになってきた。この治療は、血管内皮前駆細胞移植とは異なる治療概念として現在受け入れられるようになってきている。純化した造血幹細胞を医療に用いることが治療に適しているとは考えられるが、従来より炎症領域や腫瘍領域において種々の血液細胞が血管新生を促進する作用があることが知られており血液細胞による血管形成の分子メカニズムをさらに詳細に解析する必要があると考えられる。我々は本事業において、種々の血液細胞が発現する NP-1 が VEGF と結合し、この血液細胞上で形成された VEGF-NP-1 複合体が血管内皮細胞の増殖を VEGF 単独に比べ増強すること、造血幹細胞が血管構造の安定化、成熟化に関与することを明らかにした。臍帯血に存在するこれらの細胞による血管再生の方法論が確立されたと考えられる。

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をより詳細にするるとともに、血液細胞による血管新生の誘導がいかなる機序で生じるのかを解明し、骨髄あるいは臍帯血を用いて効率良く血管を再生する方法論を確立することを研究の目的とする。

B.研究方法

1) Neuropilin-1 は血管内皮細胞に発現し Flk-1 とダイマーを形成する他、VEGF と結合して Flk-1 のリン酸化を増強する。ほぼ全ての系譜の血液細胞に発現する NP-1 につき、血管形成に与える影響を観察した。
2) 造血幹細胞が血管新生を誘導した後にいかなる運命をたどるのかにつき、胎児期の血管形成の現場に存在する造血幹細胞をフローサイトメトリーを用いて分画採取し、試験管内で血管細胞への分化を観察した。
3) 成体で血管新生が旺盛に生じる腫瘍領域における造血幹細胞の局在を明らかにし、これら造血幹細胞が血管形成に対していかなる機能を有するのかを造血幹細胞に発現し、造血幹細胞の生存に関わる c-Kit の中和抗体を用いて解析した。

(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、外来性に強くリン酸化した。個体内での血管新生の解析法である角膜法、マトリゲル法にて NP-1 陽性血液細胞は VEGF が存在すると血管新生を増強することが判明した。
2) 造血幹細胞の発生の抑制される AML1 遺伝子のノックアウトマウスでは、壁細胞による血管内皮細胞への裏打ちが観察されず、血管の破綻による脳内出血が観察された。胎生 11 日目に脳内に存在する造血幹細胞分画の細胞は PDGF-BB の存在下で、平滑筋アクチン陽性の血管壁細胞に分化することが明らかになった。また、大腿動脈の結紮により誘導されたマウスの末梢血においては、CD45 陽性で CD11b 陽性の細胞分画から血管壁細胞が発生することが明らかとなった。
3) 腫瘍の発生早期に造血幹細胞が腫瘍周囲に集合し、

腫瘍周囲間葉組織内に毛細血管が発生するとその周囲に動員され血管拡張ならびに血管のリモデリングが誘導されることが判明した。このような血管新生時の造血幹細胞による血管拡張、リモデリングは造血幹細胞が分泌する Ang1 によることが判明した。

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、血管新生により誘導した新生血管の成熟化に寄与することが判明した。また種々の血液細胞系譜に発現する NP-1 は NP-1-VEGF の系により血管形成を促進することが解明された。造血幹細胞にも VEGF および NP-1 が発現することから造血幹細胞移植により血管安定化を伴う効率の良い血管再生医療が可能と考えられた。臍帯血中造血幹細胞にも血管壁細胞へ分化可能な細胞が含まれており、血管治療に臍帯血幹細胞の応用が考慮された。

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. Okamoto R, et al. : Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. Blood in press.
3. Fukuhara S, et al. : Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. Mol Cell Biol, 25: 136-146, 2005 他 2 件

2.学会発表

- 1 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 1 3 件。

G.知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）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 転写因子の発現調節、あるいは、がん抑制遺伝子 PTEN のシグナルを制御することにより、幹細胞および前駆細胞の未分化性を制御できる可能性を見出した。

A. 研究目的

臍帯血からの造血幹細胞移植においては、臍帯血に含まれる造血幹細胞の数が少ない、巨核球・血小板への分化が遅延するという二つの大きな問題がある。

これらの問題に対する基礎研究として、マウス ES 細胞における転写調節を改変することにより、これらの問題を克服する方法の開発をおこなった。また、がん抑制遺伝子 PTEN のシグナルを改変することにより、幹細胞の未分化性維持の分子機構を明らかにした。

B. 研究方法

種々の転写因子の発現制御が可能なマウス ES 細胞を作成した。そして、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。また、造血システムを含む、いろいろな組織における PTEN 欠損マウスを作成し、PTEN シグナルの生体における機能を解析した。

(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

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。

GATA-1 を欠損する前赤芽球様細胞は、無限に増殖することが可能であった。また、培養条件を変更することにより、顆粒球、マクロファージ、マスト細胞といった、赤血球以外の骨髄系細胞に分化することも可能であった。

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

転写因子の発現制御をおこなうことにより、巨核球系細胞の増殖・分化を促進することが

可能であること、また、多能性の造血前駆細胞を長期間にわたり培養できることが明らかとなった。さらに、PTEN のシグナルが、いろいろな組織幹細胞の未分化性維持に機能していることが明らかとなった。

E. 結論

転写因子の制御や PTEN シグナルの制御により、臍帯血をより有効に利用できる可能性が示唆された。

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

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

Tanaka T, Zheng J, Kitajima K, Kita K, Yoshikawa H, Nakano T. Differentiation Status Dependent Function of FOG-1. *Genes to Cells*, 9:1213-26, 2004

Kataoka TR, Komazawa N, Morii E, Ohboki K, Nakano T. Involvement of connective tissue type mast cells in Th1 immune responses via Stat4 expression. *Blood*, 105:1016-20, 2005

他、原著論文による発表 16 件

それ以外（レビュー等）の発表 11 件

2. 学会発表

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

Toru Nakano, PTEN/PI3K signal in stem cell systems. The Third International Symposium of Stem Cell (Shenyang, China 2004) 他

II. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

平成 15, 16 年度

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 曉紅、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 医療廃棄物質として処理されて胎盤は、倫理面や安全面においてその利用に比較的問題が少ない細胞である。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 培養により間葉系前駆細胞(PDMPCs)の単離法を確立した。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 は陰性であって、これは報告されたヒト骨髄由来間葉系細胞の表面抗原と同様であった。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 PDMPCs 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。また、in vivo にも骨、軟骨様組織の形成が可能であった。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、胎盤由来間葉系細胞は、一定の分裂回数を経ると細胞老化がおこり、増殖が停止してしまう傾向があり、クロナル解析の障害となっている。そこで、我々は PDMPCs の不死化を目的として、レンチウイルスベクターを用いて、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 PDMPCs に導入した。Bmi-1 および hTERT 遺伝子を導入した PDMPCs は 100PDL 以上（現在進行形）分裂可能である。得られた数十のサブクローンに軟骨、骨、神経様細胞へ分化誘導可能な細胞が存在した。

I. PDMPCs 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：PDMPCs 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 PDMPCs 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。PDMPCs 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。In vivo にてヌードマウス背部皮下における異所骨形成能については検討した。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。in vivo にヌードマウスとラットを用いて皮下と膝関節欠損モデルに2週間軟骨細胞へ誘導した胎盤由来間葉系細胞を移植し、その細胞は in vivo 環境に生存の可能性、また、軟骨組織の形成の可能性について検討した。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。胎盤由来間葉系細胞の脳内分布を検討するために、マウス新生児の脳内に胎盤由来間葉系細胞を移植した。造血支持能の評価は PDMPCs 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：PDMPCs 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、骨髄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。ヌードマウスの背部皮下にコラーゲンスポンジと移植、5 週後に、移植した細胞とスポンジのパラフィン包埋切片を作製し、H. E. 染色、type-I collagen とヒト特異的 osteocalcin の免疫染色を行った。H. E. 染色で骨の基質を検出された、また、type-I collagen とヒト特異的 osteocalcin の免疫染色は陽性だった。ヌードマウス背部皮下における異所骨様組織形成を示唆された。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。in vivo 皮下移植に軟骨細胞へ誘導した胎盤絨毛由来間葉細胞は生存を維持でき、さらに大量の軟骨細胞外 matrix を合成、分泌した。膝関節欠損モデルに軟骨組織形成を観察した。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。マウス新生児脳内に移植した胎盤由来間葉系細胞の脳内分布については解析中である。

また PDMPCs 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、骨髄由来 Stroma 細胞と同等の増幅率を認めた。

D. 結語：PDMPCs は培養系において骨髄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 PDMPCs 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、また骨髄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. PDMPCs 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 PDMPCs 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、PDMPCs 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 PDMPCs 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ゼ逆転写酵素遺伝子 (hTERT) を PDMPCs に導入し、その細胞の分裂回数 (PDL)、テロメラゼ活性、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 PDMPCs (7 PDL) に導入した。テロメラゼ活性は 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、10 cm 培養皿に 100cells 播種し、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 PDMPCs はテロメラゼ活性が認められ、100 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 PDMPCs から数十サブクローンを分離

樹立し、軟骨、骨、神経細胞へ分化誘導可能な細胞が存在した。しかし、細胞増殖と共に分化能が落ちる傾向が認められた。

D: 結語: Bmi-1 および hTERT 遺伝子導入することにより PDMPCs の分裂回数が延長し、数十のサブクローンが分離樹立できた。寿命が延長した細胞でも軟骨、骨、神経細胞へ分化誘導であった。

(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. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 6, 543 - 553, 2004.
2. 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* 13, 337-341, 2004.
3. 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.
4. Tsuneo A. Takahashi, Paolo Rebutta, 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)*.
5. 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
6. 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
7. Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchimar 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
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. ヒト胎盤由来間葉系細胞の軟骨への分化誘導：張曉紅、伊倉宏一、高橋賢次、高橋恒夫：日本炎症、再生医学会雑誌。(印刷中)
12. 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)
13. 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
14. 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IS09002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。

分担研究報告書

研究課題：臍帯血移植後の造血・免疫再構築促進に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学大学院分子細胞内科学教授
研究協力者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院血液内科
山本 晃士 名古屋大学医学部附属病院輸血部
清井 仁 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部

臍帯血移植後の造血・免疫の再構築を促進する目的で、(1) 臍帯血中リンパ球の増幅方法を検討した。(2) 増幅・活性化 CD4 リンパ球の、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の NOG マウスへの移植モデルに与える影響について解析し、活性化 CD4 リンパ球輸注が液性免疫能を回復させうる可能性を示した。さらに、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探るため (3) 臍帯血中に存在する血管内皮前駆細胞の質的・量的な評価を行った。

A. 研究目的

臍帯血移植は急速に普及してきたが、より安全で質の高い移植法として確立されるため、造血・免疫の再構築を促進することが必要である。また、臍帯血を再生医療分野のソースとして活用する方策についても検討を始める必要がある。

我々は、増幅・活性化リンパ球に着目し、(1) 臍帯血中からの CD4 または CD8 陽性細胞の各種分離法・増幅法について比較検討し、得られた増幅リンパ球の解析を行った、(2) ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の免疫不全 NOG マウスへの移植モデルを用いて、造血・免疫再構築に及ぼす、活性化 CD4 リンパ球輸注の影響について検討した。さらに、(3) 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

(1) 細胞は健常成人ボランティアより採取した末梢血単核球、不要となった臍帯血単核球を用いた。単核球からの CD4 陽性細胞分画および CD8 陽性細胞分画の分離は、Miltenyi human MicroBeads または Dynal positive isolation kit を用いて行った。細胞増幅はそれぞれの beads 法に続いて MACS Human T Cell Activation/Expansion Kit、Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander を用いて行

った。培養液は5-10%ヒト血清加RPMI、または5%ヒト血清加Xvivo15を用いた。また抗CD3抗体 (OKT3) およびIL-2存在下に、第3者の末梢血単核球およびEBV-transformed-LCL (いずれも⁶⁰Co照射) と共培養する増幅法 (REP法) でも増幅を行った。

(2) 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。

(3) 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)

この研究の実施にあたり、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。

C. 研究結果

(1) 健常成人末梢血単核球を採取し、一旦凍結保存し解凍した。その上でDyna kitを用いてCD4陽性分画、CD8陽性分画に分離し、それらCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、および未分画 (bulk) 細胞 Dynabeads Expanderを用いて増幅したところ、14日後の増幅効率はそれぞれ約160倍、40倍、5倍だった。但し、このときのbulk細胞には死細胞が混入しておりそれが不十分な増幅効率の原因と考えられた。次に保存臍帯血を解凍し同様に分離増幅を行った。図のごとく、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞、bulk細胞のいずれもが、培養14日後に600倍以上に増幅された。このとき用いたIL2の濃度は50U/mLだが、75U/mL、100U/mLと濃度を高くしても増幅効率はほぼ同等だった。REP法を用いて増幅した場合も500-1000倍と良好な増幅効率が得られた。現在Miltenyi kitを用いて臍帯血中CD4陽性細胞、CD8陽性細胞の増幅効率を様々な条件で検討中であるが、今のところDynabeads kitを上回る効率は得られていない。今後培養条件を最適化したのち、培養前後の細胞表面マーカーの変化やTCR repertoireについて評価を行い、またしばしば臍帯血移植で用いられる