

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 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成 18 (2006) 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 .....	9
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 .....	11
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 .....	15
武田 伸一	
3, 末梢血由来の間葉系幹細胞の調整 .....	19
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 .....	21
望月 直樹	
III 研究成果に関する一欄表 .....	25
IV 研究成果の刊行物・別冊 .....	31

## 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

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研究所

生殖医療研究部 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。我々は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、骨格筋への分化に成功した。また独自に確立した間葉系細胞培養システムを用いて、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、細胞移植の供給源とする細胞提供システムの速やかな構築を目指す。

**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 化) 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**

ヒト細胞に関しては、月経血・臍帯血・末梢血由来の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間葉系細胞を用いる。本申請は基盤的な開発研究であり、月経血・臍帯血・末梢血由来のヒト間葉系幹細胞が多分化能を有する状態を保つ培養条件、方法を確立し、それらの細胞に細胞寿命の延長をはかり、移植に必要な細胞量を確保する。

### (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

月経血、末梢血より単離した間葉系細胞に対して、後の研究を進めるための蓄積を図った。すでに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検討した。

### (2) 末梢血由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

成人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。実際の成人末梢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した。31症例の肺がん患者より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した。肺動脈中における血液内の間葉系前駆細胞がどのような細胞表面抗原を有しているかを、各種細胞表面マーカーを用いてFACSにて検討した。次に、これら細胞が間葉系前駆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。

### (3) 免疫不全マウスへのヒト間葉系細胞の移植

ヒト由来の細胞移植には、免疫不全マウス (NOG: NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ ノックアウトマウス) を利用した。移植後の病理組織学的な解析を推進し、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。

### (4) 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

清野らにより発見されたヒト細胞寿命の延長に関わる遺伝子(Nature,1999)を導入、高発現させ、それに伴う細胞の増殖能の増加、寿命の延長を検討する。その

際、寿命延長には、p16INK4aの上昇を介したRb経路に関わることが知られている。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可視化を行った。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梅澤らが行った。

### (5) 疾病 (リソゾーム病など) 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する。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する。

### (6) 臨床応用への具体的な検討

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、梅澤が具体的な手続き (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) 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

中胚葉に由来する幹細胞の供給源として、子宮内膜、月経血、臍帯血を利用した。マイクロアレイ解析から、これらの幹細胞は元の組織の性質を保持すると同時に各組織に由来する間葉系細胞に多様性があることが明らかとなった。これらの細胞を組織、特に心臓への移植細胞として現実的な供給源とするには、心機能を回復させるほどの十分な細胞量を確保し、その克服のために心筋誘導率を有する手法を開発することに成功した。子宮

内膜、月経血、臍帯血由来の間葉系細胞に対し、同様に心筋分化誘導を行ったところ、細胞間で明確な心筋分化率に差がでた。また、心筋分化であったとしても、供給源により作業心筋細胞、ペースメーカー細胞となることが明らかになった。骨髄細胞に比較し、子宮内膜および月経血由来の間葉系細胞は初期値として心筋前駆細胞に近い細胞である可能性があった。

## (2) 末梢血由来の間葉系細胞の調整とプロファイリング

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間葉系細胞が存在し、この間葉系細胞は脂肪細胞および骨芽細胞へ分化し、軟骨への分化を示さないことが示された。また、これら間葉系前駆細胞はCD105陽性細胞画群に濃縮されていることが明らかになった。

## (3) 免疫不全マウスへのヒト間葉系細胞の移植

骨格筋多能性幹細胞の候補として、筋再生時に増殖するCD31-CD45-SP細胞を新たに見出した。この細胞は*in vitro*にて間葉系細胞（骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞）に分化した。また免疫不全マウスに筋芽細胞と共移植すると、著しく筋再生を促進したが、C57BL/6マウス骨格筋をX線照射し、内因性の筋衛星細胞とSP細胞を抑制した後に移植すると、筋芽細胞の分化を抑制し、脂肪細胞に分化した。CD31-CD45-SP細胞はマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、炎症反応を制御するST-2分子を特異的に発現した。CD31-CD45-SP細胞は筋再生時に微小環境に応じてそのfateを変え、筋ジストロフィーで見られる繊維化、脂肪化に関与する可能性が示唆された。

## (4) 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

臓器再生のために利用可能な間葉系細胞の分化への情報伝達のメカニズムと多分化能の維持機構を分子レベルで解明することを目的に研究を行った。月経血・

臍帯血・末梢血由来の間葉系細胞のコントロールの目標は、目標とする分化誘導シグナルの同定と、多分化能を保持したままの増殖である。ヒト骨髄間質から得られた細胞に特異的発現する分子を同定することにより、①分化誘導シグナルを受ける受容体②シグナルを増幅するような因子を探索すること③多分化能の維持に不可欠な接着や増殖にかかわる分子を明らかにすることを目的として、シグナルシーケンストラップ法(SST法)でこれらの因子の同定を試みた。細胞から分泌される因子、細胞膜表面分子などシグナルシーケンスをもつ300以上の蛋白質を見つけた。この内、機能未知の分子PTK7についてその機能の解析に着手した。

## (5) 疾病（リソゾーム病など）モデルマウスのSCID化

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)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

臨床試験に用いる治療用の骨髄間葉系幹細胞を製造するため、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）」に従い、臨床用細胞プロセッシング室を整備し細胞処理に係る必要な書式の作成を試みた。血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」を計画し、院内の倫理委員会へ申請し臨床試験実施の許可を得た（臨05-63号）。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治療」の第1/II相臨床試験の試験計画作成に参加するとともに、本研究に

関連した海外における臨床試験の情報を収集し、骨髄間葉系幹細胞を投与した17例中10例に効果が認められ、重篤な副作用はみられなかった。

#### D. 考察

現在の培養方法では異種の物質を含むため、樹立培養されたヒト幹細胞にはヒト組織には存在しないはずの糖鎖が含まれていることが報告された。ヒトの免疫系はこの異質な糖鎖を認識し抗体を産生し免疫反応がおこる。また、異種動物からのレトロウイルス感染、異種タンパク質（狂牛病プリオンを含む）混入の危険性も憂慮しなくてはならない。そのような中で異種由来物質を排除したヒト幹細胞培養方法の確立は、将来の再生医療への応用にむけ急務の課題となっている。ヒト幹細胞樹立培養液の組成から牛胎児血清に代えてヒト血清や成長因子を組み合わせるにより、異種由来物質を排除することが可能となる。異種由来物質の混入については液体クロマトグラフィー質量分析計で解析し、ヒト細胞表面に認められるNアセチルノイラミン酸と非ヒト糖鎖であるNグリコシルノイラミン酸を検証することが可能である。また、異種由来物質を排除した条件では、ヒト幹細胞の継代数が増えていくとゲノムレベルで異常が蓄積する危険性が極めて高いことが報告されている。このゲノムレベルの異常を抑えるために、ヒトフィーダー細胞の利用と酸化ストレス軽減のため低酸素濃度（10%以下）に保った環境で培養することにより、ゲノム変異を生じない安全なヒト幹細胞を樹立・培養できる。月経血・末梢血および臍帯血由来の間葉系細胞の提供システム確立には上記のことを念頭におくことが、さらに安全で高品質の細胞を医療に提供できる体制を構築することになる。

また、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。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

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終了した。

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ながり、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となる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 倫理面への配慮

国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、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 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認）。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た。

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研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号 2003-002,2005-003)。

## H. 研究発表

### 論文発表

1. Matsumoto, S., Shibuyaa, I., Kusakari, K., Segawa, K., Uyama, T., Shimada, A., Umezawa, A. "Membranous osteogenesis system modeled with KUSA-A1 mature osteoblasts." *Biochim Biophys Acta.*, 1725:57-63,2005
2. Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. "Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood." *J Lab Clin Med.* 146(5): 271-8.2005
3. Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. "Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis." *Lab Invest.* 85(10): 1210-23. 2005
4. Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, Makino H, Matsumoto K, Saito H, Ogawa S, Sakamoto M, Hata J, Umezawa A. "Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential." *Mol Cell Biol.* 25(12): 5183-95. 2005
5. Katagiri YU, Kiyokawa N, Nakamura K, Takenouchi H, Taguchi T, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J. "Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by



- monoclonal antibody Raft.2.” Biochem Biophys Res Commun. 15;332(4): 1004-11. 2005
6. Higuchi A, Shindo Y, Gomei Y, Mori T, Uyama T, **Umezawa A**. “Cell separation between mesenchymal progenitor cells through porous polymeric membranes.” J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 74(1): 511-9. 2005
  7. Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, **Umezawa A**, Mukai K. “Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.” Cancer Lett. 18:221(1):21-8. 2005
  8. Kawashima N, Shindo K, Sakamoto K, Kondo H, **Umezawa A**, Kasugai S, Perbal B, Suda H, Takagi M, Katsube K. “Molecular and cell biological properties of mouse osteogenic mesenchymal progenitor cells, Kusa.” J Bone Miner Metab. 23(2): 123-33. 2005
  9. Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, **Umezawa A**, 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. 16(3): 1491-9. 2005
  10. Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, Inagaki M, Matsuoka K, Kosuga M, Kosaki R, Shimazaki T, Endo H, Umezawa A, Okano H, Takahashi T, Okuyama T. Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells. Mol Ther. 2005, in press.

出願日：特願 2005-151229

出願人：(株)TMセリサーチ・成育医療センター

④ 「間葉系幹細胞増殖培地」

発明者：梅澤明弘、高橋秀和

出願日：特願 2005-151237

出願人：(株)TMセリサーチ

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

## I. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

① 「心筋細胞への分化能を有する細胞」

発明者：梅澤明弘、三好俊一郎、小川聡

出願日：特願 2005-015539

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

② 「瘢痕のない創傷治癒能を有する細胞およびその調製方法」

発明者：梅澤明弘、佐藤博子、貴志和生

出願日：特願 2005-51661

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

③ 「細胞増殖培地」

発明者：梅澤明弘、高橋秀和

## 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

## 「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 教授

### 研究要旨

骨髄間葉系幹細胞を臨床応用するため、「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治療」の第I/II相臨床試験の試験計画作成に参加するとともに、本研究に関連した海外における臨床試験の情報を収集した。血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」を作成し、院内の倫理委員会へ申請し臨床試験実施の許可を得た（臨05-63号）。昨年引き続き、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）」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、上記の臨床試験（臨05-63号）に備えシュミレーションを行った。

### A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞を用いた2つの臨床試験、(1)「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治療」と(2)血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」の臨床試験計画書を作成する。「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」に係る設備と手順書を構築し、この基準に従い(2)の臨床試験に用いる細胞を実際に製造し患者に投与する。

### B. 研究方法

骨髄間葉系幹細胞の臨床応用は、血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験の方が、非血縁の第3者から得られ

た骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験より倫理面および実行性の点から実施可能性が高いと判断された。そこで、健常ヒト骨髄細胞から培養フラスコへ付着する骨髄間葉系幹細胞を分離し、分離した骨髄間葉系幹細胞を液体培地で増殖させ、細胞表面抗原検査と脂肪細胞と軟骨細胞への分化能から得られた細胞が骨髄間葉系幹細胞の性質を有することを確認する。細胞の分離、培養と増幅は、医薬発第1314号の指針に基づき臨床用細胞プロセッシング室で行い、骨髄間葉系幹細胞の分離から投与に至る一連の過程のシュミレーションを行う。

### C. 研究結果

「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治療」の第I/II相臨床試験を行うため関係者と話し合いをした。移植片対宿主病の予防に骨髄間葉系幹細胞を用いる場合、既存の予防法との優劣の比較が困難なため、骨髄間葉系幹細胞は難

治性の移植片対宿主病の治療に用いることが決められた。同時に、症例の適格性や併用薬等について詳しい基準が決められた。骨髄間葉系幹細胞を移植片対宿主病の治療に用いた報告が昨年末の米国血液学会で報告され、骨髄間葉系幹細胞を投与した17例中10例に効果が認められ重篤な副作用はみられなかったことが判明した。本邦では、造血幹細胞移植後にステロイド不応性の難治性の移植片対宿主病を発症した場合、健康保険で認可された治療法は存在しない。そこで、造血幹細胞移植後にステロイド不応性の難治性の移植片対宿主病を発症した患者を対象として、血縁者骨髄移植ドナーまたは骨髄移植ドナーではない血縁者から骨髄血を採取し、*in vitro*で骨髄間葉系幹細胞を培養・増幅し、得られた骨髄間葉系幹細胞を患者に投与する臨床試験を計画した。院内の倫理委員会へ「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」の臨床試験計画書を提出し承認を得た(臨05-63号)。実際に骨髄間葉系幹細胞の投与を想定し、一連のフローチャートを作成した。フローチャートに従い、①健常ヒトから骨髄血の採取と②臨床用細胞プロセッシング室での骨髄間葉系幹細胞の分離と増幅を行い、③得られた細胞が間葉系幹細胞の性質を有することを表面抗原検査と脂肪細胞および軟骨細胞への分化能で確認した。得られた骨髄間葉系幹細胞の安全性を確認するため、細菌と真菌の培養、主なウイルスのPCR検査、染色体分析等を行う予定である。

#### D. 結論

骨髄間葉系幹細胞の臨床試験を実施できる臨床試験計画書を作成し、倫理委員会の承認を得た。骨髄間葉系幹細胞の実際の投与を前提としたシミュレーションを行い、骨髄間葉系幹細胞の臨床試験が実施可能であることを確認した。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

(研究業績「英文」)【原著】

- (1)Sato K, Izumi T, Toshima M, Nagai T, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K. Retropharyngeal abscess due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a case of acute myeloid leukemia. *Intern Med*, 44(4):346-349, 2005.
- (2)Miyoshi T, Nagai T, Ohmine K, Nakamura M, Kano Y, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K. Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines. *Biochem Pharmacol*, 69(11):1585-1594, 2005.
- (3)Nagashima T, Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Miyoshi T, Ohmine K, Toshima M, Miyazato A, Takatoku M, Nagai T, Mori M, Komatsu N, Ozawa K. Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation. *Med Sci Monit*, 11(3):CR91-94, 2005

#### 著書

- (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、15(2): 75-81, 2005.
- (2) 室井一男：Flow cytometryによるMRD検出。別冊・医学のあゆみ 血液疾患 ver. 3、坂田洋一、小澤敬也編、医歯薬出版、p365-368, 2005.

#### 学会発表

- (1) 角田三郎、和泉 透、阿久津美百生、上田智基、白畑 亨、白井俊孝、増田義洋、大嶺謙一、永嶋貴博、上田真寿、室井一男、小澤敬也、加納康彦：MTX-HOPE療法:再発難治性悪性リンパ腫に対する低用量サルベージ療法。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.433, 2005.
- (2) 藤原慎一郎、外島正樹、三好拓児、大嶺 謙、尾崎勝俊、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、小澤敬也：真菌性肝膿瘍に対するamphotericin Bの肝動脈門脈注入療法の有用性について。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.418, 2005.
- (3) 山本千鶴、室井一男、森 政樹、永嶋貴博、目黒明子、藤原慎一郎、吉田こず恵、畑野かおる、菊池 悟、佐藤一也、三好拓児、外島正樹、大嶺 謙、高德正昭、永井 正、小澤敬也：女性患者に対する卵巣機能保護を目的としたGnRHアナログの投

与。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.405, 2005.

(4) 佐藤一也、尾崎勝俊、目黒明子、翁 家<sup>ノ</sup>、森 政樹、永井 正、室井一男、小澤敬也：間葉系幹細胞(MSC)を用いた移植片対宿主病制御の臨床応用に向けた基礎的検討: ヒトMSCの培養と性状解析。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.396, 2005.

(5) 高德正昭、佐藤俊彦、上田真寿、山本千鶴、外島正樹、大嶺 謙、森 政樹、室井一男、永井 正、小澤敬也：低形成骨髓異形成症候群に対するPositron Emission Tomography(PET)診断の有用性に関する検討。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.321, 2005.

(6) 菊池 悟、大嶺 謙、外島正樹、三好拓児、多々良礼音、尾崎勝俊、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、小澤敬也：当科における再発・難治性AML症例の治療に関する検討。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.286, 2005.

(7) 上澤光世、佐藤一也、外島正樹、大嶺 謙、尾崎勝俊、高德正昭、森 政樹、永井 正、室井一男、小澤敬也：免疫賦活薬のシゾフィランによるβ-Dグルカンの異常高値を示した急性リンパ性白血病症例。日本内科学会関東地方会529回演題要旨, p.22, 2005.

(8) 室井一男、村上善昭：血管新生療法。第121回日本輸血学会関東甲信越支部例会抄録集, p13, 2005.

(9) 森 政樹、室井一男、三好拓児、山本千鶴、松 春子、藤原慎一郎、小原陽子、菊池 悟、多々良礼音、目黒明子、佐藤一也、永嶋貴博、外島正樹、大嶺 謙、高德正昭、永井 正、小澤敬也：難治性GVHDに対するmycophenolate mofetil(MMF)を用いた治療。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会プログラム・抄録集, p.244, 2005.

(10) 西川彰則、高德正昭、尾崎勝俊、上田真寿、外島正樹、大嶺 謙、森 政樹、永井 正、室井一

男、小澤敬也、佐藤俊彦：骨髄増殖性疾患における造血動態のPositron Emission

Tomography(PET)解析。臨床血液, 46(7):550, 2005.

(11) 釜田康行、岩本雅弘、高橋裕子、青木葉子、松井圭司、村上善昭、室井一男、池田宇一、島田和幸、簗田清次：膠原病関連阻血指趾に対する自己骨髄血および末梢血由来単核細胞を用いた血管新生療法。炎症・再生, 25(4):338, 2005.

(12) 永井純正、佐藤一也、外島正樹、大嶺 謙、高德正昭、永井 正、森 政樹、室井一男、小澤敬也：重症サイトメガロウイルス腸炎を合併した成人T細胞白血病。臨床血液46(4):290-291, 2005.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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、筋再生時に増殖する CD31-CD45-SP 細胞を新たに見出した。この細胞は *in vitro* にて間葉系細胞（骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞）に分化した。また免疫不全マウスに筋芽細胞と共移植すると、著しく筋再生を促進したが、C57BL/6 マウス骨格筋を X 線照射し、内因性の筋衛星細胞と SP 細胞を抑制した後に移植すると、筋芽細胞の分化を抑制し、脂肪細胞に分化した。CD31-CD45-SP 細胞はマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、炎症反応を制御する ST-2 分子を特異的に発現する。CD31-CD45-SP 細胞は筋再生時に微小環境に応じてその fate を変え、筋ジストロフィーで見られる繊維化、脂肪化に關与する可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

成体の骨格筋由来の多能性幹細胞が報告されており、筋再生治療への応用が期待される。我々は、ヘキスト色素を効率よく排出する骨格筋 SP 細胞の解析を行い、その筋再生における役割と筋ジストロフィーに対する細胞移植治療の可能性を検討した。

**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、単核細胞を分離、ヘキスト色素 33342、CD31 抗体、CD45 抗体で染色後、FACS で解析しソーティングした。筋再生モデルとしてマウス前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 ① 5-FU 投与した免疫不全マウスの NOD/SCID と②内因性の筋衛星細胞、SP 細胞の増殖を抑制する目的で、後肢に放射線（18Gy）を局所照射した C57BL/6 マウスを用いた。

**C. 研究成果**

成体のマウス骨格筋の SP 細胞分画は CD31 と CD45 の発現により CD45+CD31-SP、CD45-CD31+SP、CD45-CD31-SP の 3 つの亜分画に分ける事ができた。CD31+CD45-SP 細胞は血管内皮細胞様の細胞であり、筋再生中殆ど増殖しなかった。CD45+CD31-SP 細胞は骨髄由来であった。CD45-CD31-SP 細胞は、通常はマイナーな細胞分画であるが、筋再生時に増殖していた。活性化された状態で発現する ST-2 という分子に対する抗体で再生筋の組織切片を免疫染色すると、CD45-CD31-SP 細胞が筋再生時に間質で増殖する像が認められた。同細胞では、*in vitro* で分化誘導すると脂肪細胞、骨芽細胞へ分化したが、*in vivo* の移植実験では、もっぱら筋線維へ分化した。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。一方、C57BL/6 マウス

の後肢を X 線照射 (18Gy) して内因性の筋衛星細胞、SP 細胞の増殖を抑制し、その後、① 筋芽細胞、② CD31-CD45-SP、③ ①+②の組み合わせで移植すると、SP 細胞は線維芽細胞、脂肪細胞へ分化し、移植した筋芽細胞による筋再生は著しく抑制された。活性化された CD31-CD45-SP は *in vitro* にて容易に脂肪細胞へ分化し、その脂肪細胞への分化は LiCl<sub>2</sub> によって阻害された。従って *in vivo* における脂肪細胞の誘導にも GSK-3 の活性化が関与する事が示唆された。

#### D. 考察

NOD/SCID への移植実験の結果から、CD31-CD45-SP 細胞は、筋再生時に増殖し、筋線維再生に参加するとともに、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、CD31-CD45-SP 細胞は間葉系幹細胞に近い性質を持っている事が示された。放射線照射して内因性の筋衛星細胞と SP 細胞を抑制したマウス骨格筋に CD31-CD45-SP 細胞を移植すると線維芽細胞様細胞の増殖が観察され、CD31-CD45-SP 細胞自身が高率に脂肪細胞へ分化している事が明らかになった。この結果は、CD31-CD45-SP 細胞が微小環境の変化によって、筋細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、あるいは脂肪細胞へ分化しうる事を示しており、筋ジストロフィーが進行したときに認められる線維化、脂肪化に深く関係している可能性がある。

#### E. 結論

筋再生に関与する新たな SP 細胞分画 (CD45-CD31-SP 細胞) は間葉系幹細胞の性質を持ち、微小環境によってその fate を変え、筋再生過程を多いに修飾していることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

##### < 英文 >

1. Suzue N, Nikawa T, Onishi Y, Yamada C, Hirasaka K, Ogawa T, Furochi H, Ksaka H, Ishidoh K, Gu H, Takeda S, Ishimaru N, Hayashi Y, Yamamoto H, Kishi K, Yasui N: "Ubiquitin ligase Cbl-b down-regulate bone formation through suppression of OGF-1 signaling in osteoblasts during denervation" *J Bone Mineral Res* (in press)
2. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: "Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle" *Biochem Biophys Res Commun*, 341: 864-73, 2006
3. Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S: "Intracellular localization of Dysferlin and its association with the Dihydropyridine receptor." *Acta Myologica*, XXIV: 134-144, 2005
4. Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, Urasawa N, Tomohiro M, Nakura M, Tanigawa M, Nakamura A, Takeda S: "Major clinical and histopathological characteristics of canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ." *Acta Myologica*, XXIV: 145-154, 2005
5. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. "Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration." *Science*, 2005 Jul 8;309(5732):314-7.
6. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S. "Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise." *Biochim Biophys Acta*, 2005 Jun 10; 1740(3):326-31. Epub 2004 Dec 30.
7. Okano T, Yoshida K, Nakamura A, Sasazawa F, Oide T, Takeda S, Ikeda S. "Chronic exercise accelerates the degeneration-regeneration cycle and downregulates insulin-like growth factor-1 in muscle of mdx mice." *Muscle Nerve*. 2005 Jun 2; [Epub ahead of print]
8. Mochizuki Y, Ojima K, Uezumi A, Masuda S, Yoshimura K, Takeda S.

Participation of bone marrow-derived cells in fibrotic changes in denervated skeletal muscle.

*Am J Pathol*, 2005 Jun;166(6):1721-32.

#### <和文>

1. 大島幸子、武田伸一 「筋ジストロフィーの動物の心筋障害。」神経内科, 62(6): 539-546, 2005
2. 吉村まどか、武田伸一 「筋ジストロフィーの遺伝子治療。」BRAIN MEDICAL, 17(3): 221-228, 2005
3. 西山章代、武田伸一 「筋ジストロフィーのモデル動物と遺伝子治療」Neurological Science, 14(1): 8-9, 2005
4. 武田伸一、鈴木友子 「筋ジストロフィーの発症メカニズムと治療研究. -疾患解明 Overview-」実験医学, 23(10): 1590-6, 2005

#### II. 学会発表

##### <国外>

1. Takeda S: Therapeutic approaches using micro- dystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy. Seminar in Faculté des Sciences, Université de Genève, Genève, Switzerland, Apr 14, 2005
2. Takeda S: Muscle stem cells and muscle regeneration. Seminar in the Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
3. Takeda S: Therapeutic approaches using micro- dystrophin and an AAV vector to dystrophin-deficient muscular dystrophy. Seminar in the Regional Conference Center of the Academy of Sciences in Szeged, Hungary, Apr 19, 2005
4. Takeda S: Therapeutic approaches to dystrophin- deficient muscular dystrophy. Seminar in the Department of Enzymology of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Hungary, Apr 21, 2005
5. Takeda S: Muscle stem cells and muscle regeneration. Seminar in the Agricultural Research Center of Molecular Biology, Gödöllő, Hungary, Apr 21, 2005
6. Takeda S: The Japanese approach to molecular diagnosis and therapy; special reference to ethical and legal issues. Ethics Conference of the Hungarian Medical Chamber in Pilisszentkereszt, Hungary, Apr 22, 2005
7. Takeda S: Participation of muscle stem cells in muscle regeneration.

EMBO/FEBS workshop "The Molecular and Cellular Mechanisms underlying Skeletal Muscle Formation and Repair", Fontevraud, France, Sep 29, 2005

8. Takeda S: Gene therapy approach to dystrophin- deficient muscular dystrophy. Clinical Sciences Centre Symposium in honor of Terry Partridge "From Satellite Cells to Gene Therapy", The Zoological Society of London, London, UK, Oct 1, 2005
9. Takeda S: Contribution of CD31-negative/CD45-negative Side Population cells to skeletal muscle regeneration. Workshop "Musculo-Skeletal: Myogenic Stem Cells and Regeneration" 8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
10. Ikemoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Takeda S: An AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle. 8th annual meeting, American Society of Gene Therapy, St. Louis, USA. Jun 2, 2005
11. Takeda S: AAV vector mediated micro-dystrophin transfer into dystrophin-deficient skeletal muscle. 6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
12. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S: Increased  $\epsilon$ -sarcoglycan expression ameliorates muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan deficient mice, a model for LGMD2D. 6th Japanese-French workshop on muscular dystrophies, Paris, France, July 2, 2005
13. Nishiyama A, Yuasa K, Yoshimura M, Ohshima S, Ikemoto M, Miyagoe-Suzuki Y, Howell JM, Hijikata T, Takeda S: AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle. 13th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Prague, Czech Republic, 10.30-11.1, 2005

##### <国内>

1. 深田総一郎、上住聡芳、池本 円、増田 智、瀬川将司、山元 弘、鈴木友子、武田伸一：骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の純化、動態、網羅的な遺伝子発現解析。第3回幹細胞シンポジウム、淡路島、4.21, 2005
2. 鈴木友子、武田伸一：骨格筋幹細胞の同定とその筋再生における役割。第82回



- 日本生理学会、仙台市、5.20, 2005
3. 武田伸一：最近わかった筋ジストロフィーの病態と治療「ジストロフィン欠損における新たな分子病態」第 47 回日本小児神経学会シンポジウム、熊本市、5.18, 2005
  4. 深田宗一郎、上住聡芳、池本 円、増田 智、瀬川将司、山元 弘、鈴木友子、武田伸一：骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の純化、動態、網羅的な遺伝子発現解析。第 26 回日本炎症・再生医学会、東京、7.13, 2005
  5. 鈴木直輝、望月靖史、上住聡芳、深田宗一郎、増田 智、深瀬明子、鈴木友子、武田伸一：後肢懸垂・再荷重モデルにおける筋萎縮・再成長メカニズムの解析。第 26 回日本炎症・再生医学会、東京、7.13, 2005
  6. 鈴木友子、武田伸一：骨格筋前駆細胞の維持、増殖、分化の分子機構：横紋筋肉腫の分子的理解に向けて。平成 17 年度厚生労働省がん研究助成金 森川班第 1 回班会議、東京、7.29, 2005
  7. Yuasa K, Yoshimura M, Nishiyama A, Ikemoto M, Ohshima S, Miyagoe-Suzuki Y, McC Howell J, Hijikata T, Takeda S: AAV vector-mediated gene transfer into canine skeletal muscle. The 11th Annual Meeting Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, 7.29, 2005
  8. 武田伸一：筋ジストロフィー治療の最前線。シンポジウム“再生医療（幹細胞移植など）の臨床的応用に関する倫理的・社会的問題” 東京、9.9, 2005
  9. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する遺伝子治療の進歩。日本筋ジストロフィー協会施設見学会、東京、9.11, 2005
  10. 武田伸一：筋ジス治療の現状と未来。秋田筋ジストロフィー協会シンポジウム、秋田市、9.16, 2005
  11. 武田伸一：筋ジストロフィーの臨床遺伝学。第 2 回遺伝医療倫理討論-ピアカウンセラー養成講座-、秋田市、10.22, 2005
  12. 武田伸一：筋ジストロフィーに対する治療戦略-遺伝子治療から薬物治療まで-日野市、帝人ファーマ社内講演会、1.25, 2006
  13. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) as a therapeutic tool for Duchenne muscular dystrophy (DMD). “AAV and its application to Gene therapy & regenerative medicine” The 2nd Nikko International Symposium 2005, 9.30, 2005
- H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

## 「抹消血由来の間葉系幹細胞の調整」

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に、肺がん患者の肺動脈内に存在する間葉系幹細胞の形質を検討した。ヒト肺がん患者の肺動脈内に存在する間葉系幹細胞はCD105陽性の細胞分画内に存在することを初めて明らかにした。

### A. 研究目的

成人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。実際の成人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。

### B. 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。肺動脈中における血液内の間葉系前駆細胞がどのような細胞表面抗原を有しているかをFACSにて検討した。次に、これら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Informed consentを取った上で行った。

### C. 研究結果

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間葉系細胞が存在し、この間葉系細胞は脂肪細胞および骨芽細胞へ分化し、軟骨への分化を示さないことが示された。また、これら間葉系前駆細胞はCD105陽性細胞画群に濃縮されていることが

明らかになった。

### D. 考察

これまでの研究により、ヒトの末梢血内に間葉系幹細胞が存在し、また採取可能であることを初めて示してきた。今年度は、この成人末梢血内に存在する間葉系前駆細胞がCD105陽性分画に濃縮されていることを明らかにした。また、CD105より採取された細胞をクローン化することにより、これら細胞が多分化能を有していることを初めて示すことが出来た。これは成人血液中における前駆細胞を用いた検討としてはこれまで報告はない。今後、末梢血における間葉系幹細胞の生物学的意義についても検討する必要があると考えられた。

### E. 健康危険情報

なし。

### F. 結論

成人ヒト抹消血中から間葉系前駆細胞を採取すること、またCD105陽性細胞群に濃縮されていることが示された。採取された間葉系前駆細胞の性状について今後の検討が必要と考えられた。

### G. 研究発表

#### 1. (研究業績「英文」)【原著】

1. Sangai, T., Ishii, G., Kodama, K., Miyamoto, S., Aoyagi, Y., Itoh, T., Magae, J., Nagashima, T.,

Miyazaki, M., **Ochiai, A.** Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. Int. J. Cancer, 115: 885-892, 2005.

2. Ishii, G., Sangai, T., Sugiyama K, Ito, T., Hasebe, T., Endoh, Y, Magae J, **Ochiai, A.** In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. Stem cells, 23: 699-706, 2005.

3. Ishii G, Sangai T, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Sasaki H, Harigaya K, **Ochiai A.** In vivo and in vitro characterization of human fibroblasts recruited selectively into human cancer stroma. Int J Cancer. 2005 Nov 1;117(2):212-20.

2. 学会発表  
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

「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」

分担研究者 望月直樹  
国立循環器病センター研究所  
循環器形態部 部長

**研究要旨**

骨髄間葉系細胞がさまざまな分化を示す。このときに、分泌される分子あるいは細胞外からの分化刺激を受ける受容体を同定する目的でsignal sequence trap (以下SST) を用いて受容体分子・分泌因子を探索した。その結果分泌因子としては、コラーゲン・フィブロネクチンなどの接着に関与する因子が多数検出された。そのほか細胞膜に発現する分子として、PTK7, Nodal modulator 1, neuropilin, VCAM などの分子を同定することができた。

**A. 研究目的**

骨髄・臍帯血・月経血間葉系細胞の多分化能のための情報伝達系のトリガーとなる分子を同定する目的で骨髄間葉系細胞に特異的に発現もしくは、分泌する因子の探索を行った。間葉系細胞が多分化能を有するのはそれぞれの系への分化を制御する情報伝達が存在すると考えられる。その鍵となるのが、リガンド-受容体系でこれを間葉系細胞で明らかにすることが重要であると考えた。

また、間葉系細胞がstemnessを維持するための環境として細胞間接着も重要であり細胞膜で発現する分子を網羅的に探索することで、分化機構、維持機構に関与する分子を同定可能であると考え、signal sequence trap法(SST法)を用いて候補分子の同定を試みた。

**B. 研究方法**

**1. SSTに用いたヒト骨髄間葉系細胞**

ヒト骨髄間葉系細胞からえたRNAは本研究の主任研究者梅澤より入手した(成育医療センターの倫理委員会で承認を得ている)。提供されたRNAからcDNAライブラリーを作製した。このライブラリーcDNAをSST-REXで使用するレトロウイルスベクターに組み込んだ。

**SST-REX法による膜分子あるいは分泌分子の同定**

SST法は東京大学医科学研究所北村教授の開発された方法(SST-REX, retrovirus-mediated expression screening, Nat. Biotech. 17: 487 (1999))を用いた。IL-3刺激がなくても、signal

sequenceを有する分子は増殖し続けることが可能であることを利用した方法である。

**C. 研究結果**

**骨髄間葉系細胞は多数のシグナルシーケンスを有する分子を発現する：**

SST-REXにより、300個以上のsignal sequenceをもつ分子のmRNAを骨髄間葉系細胞が転写していることがわかった。これは、SST-REXで得られたcolonyからsignal sequenceを有する分子をretrovirusに挿入されたDNAの塩基配列を決定することで解析した。

① 骨髄間葉系細胞は細胞外マトリックスを分泌する

コラーゲンType I, III, IV, V, VI, VIIをSSTで同定したので、これらの細胞外基質を間葉系細胞が分泌している可能性が示唆された。また、フィブロネクチン1アイソフォームも同定した。

② 増殖因子や分泌蛋白質も間葉系細胞は分泌する

Thrombospondin, testican, granulin, GM-CSF, BMP1 isoform, follistatin などの分泌蛋白質を生成している可能性が示唆された。

③ 膜貫通型蛋白質や細胞膜アンカー型蛋白質も複数同定した。

Nodal modulator, protein tyrosine kinase 7, protein kinase C substrate, membrane alanine aminopeptidase precursor, Neuropilin, VCAM-1, syndecan, B7hlog, integrin alpha, NCAM-1 など