

図1 幹細胞には hierarchy (階層性) がある

に広範な細胞系列に分化できるが、幹細胞も下位になるに従い自己複製能は低くなり、分化できる細胞系列も限定されてくる。ES細胞は最も上位に位置する幹細胞である。一方、われわれの臓器には、組織特異的な幹細胞（体性幹細胞）が存在し、それぞれの組織の恒常性を維持していると考えられている。造血幹細胞は最も研究の進んでいる体性幹細胞であるが、その他、血管上皮、皮膚、腸上皮クリプトの基底細胞、生殖器などに存在することが知られ、最近では、肝臓、腎臓、網膜のような三次元構造をもった組織や胎児ばかりでなく成人の神経組織においても幹細胞が存在することが明らかにされている（図1）。最近、マウスおよびヒト骨髄や臍帯血中には従来体性幹細胞に比しより広範な細胞系列への分化能力をもった細胞（multipotent adult progenitor cells：MAPCs）の存在も報告されている¹⁾。また、本書ですでに述べられているように篠原らは新生児の精巣からES細胞とほとんど同じ能力をもった細胞の樹立に成功し²⁾（2章-5参照）、さらに最近では、骨髄や末梢血中に卵子のもとになる細胞の存在も報告されており、幹細胞の世界が今後大きく展開する可能性が示唆されている。現在すでに行われている再生医療は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞などの体性幹細胞を利用したものであるが、将来的には、社会的、倫理的に多くの問題を抱えながらもほぼ無限の自己複製能と多分化能をもつES細胞の利用も考えられている。

幹細胞を用いた再生医療を安全に進めるためにはヒト幹細胞を測定することのできるモデル動物を作製する必要がある。平松らにより詳述されるように（3章-8参照）、最近、新た

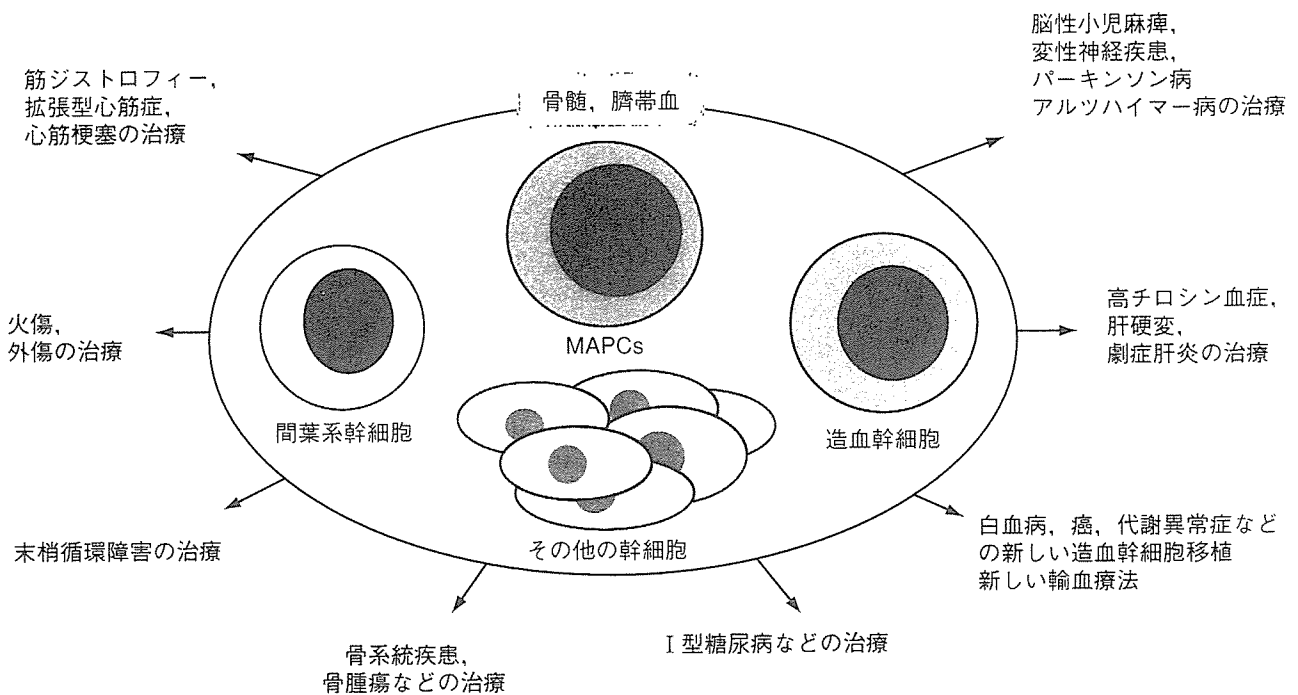


図2 造血幹細胞の可塑性と骨髄、臍帯血を用いたさまざまな再生医療の可能性

なモデルマウスとしてNOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ (NOG) マウスが開発され^{3) 4)}, ヒト造血幹細胞の生着率が著しく高く、再移植してもT細胞を含むすべての血球分化が見られることから、ヒト造血幹細胞の測定系としては画期的なマウスとなった。このマウスはさまざまなヒト体性幹細胞の測定に応用できることが示されつつあり、幹細胞を用いた再生医療の前臨床試験を行うためのきわめて貴重なモデルとなっている。

2. 体性幹細胞の可塑性と再生医療への応用の可能性

最近、体性幹細胞の可塑性を示唆する多くの研究が報告され議論を呼んでいる。2000年のNature誌に、骨髄移植を受けた患者の肝組織を検討すると、肝細胞の一部がドナー細胞に置き換わっていたという衝撃的な報告がなされた⁵⁾。この観察は、造血幹細胞自身の肝細胞への形質転換、骨髄中における肝細胞のもとになる体性幹細胞や未分化幹細胞の存在、造血幹細胞あるいはその子孫と肝細胞の細胞融合などの可能性を示しているが、いまだ結論に達していない。その後、肝不全で早期に死亡する遺伝子変異チロシン血症マウスに正常造血幹細胞分画の細胞を移植したところ、肝機能が著明に改善し、マウスは一生を全うできたことが報告された。この論文では細胞融合については全く触れられていないが、造血幹細胞自身が正常の機能をもった肝細胞の再生を何らかの形で担い、造血幹細胞を用いて重症肝疾患を治療できる可能性を示している⁶⁾。その他、骨髄から血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、骨細胞などが*in vivo*, *in vitro*で形成されたとの報告が見られる。これらは骨髄中に存在する間葉系幹細胞やより未分化な幹細胞によりもた

表1 再生医療の対象となる疾患

血液、腫瘍疾患	白血病、再生不良性貧血、悪性腫瘍など (造血幹細胞や間葉系幹細胞の移植、人工血液による)
神経疾患	パーキンソン病、アルツハイマー病、脳性小児麻痺、脳室周囲白質軟化症 (PVL)、変性疾患、脊髄損傷、末梢神経障害など
循環器疾患	心筋梗塞 (川崎病)、拡張型心筋症、慢性閉塞性動脈硬化症 (ASO)、バージャー病など
筋疾患	各種筋ジストロフィー
肝疾患	劇症肝炎、肝硬変など
内分泌疾患	I型糖尿病など
骨疾患	骨系統疾患、骨欠損など
皮膚疾患	火傷など
その他	先天性難聴、網膜色素変性症、未熟児網膜症など

※赤色は小児も対象

らされているのか、造血幹細胞自身の可塑性を示しているのか、細胞融合によりもたらされているのか明らかではないが、比較的採取が容易な骨髄や臍帯血を用いて、今後、さまざまな再生医療が展開できる可能性を示している (図2)。

一方、骨格筋細胞から分離した細胞を5日間培養すると、骨髄よりも遥かに高頻度に骨髄再構築能をもった造血幹細胞が出現するとの報告や、神経幹細胞を移植すると血液細胞が出現し、神経幹細胞の一部は造血幹細胞としての活性をもつとの報告、神経幹細胞から筋線維に分化したとの報告など、他の体性幹細胞の可塑性を示唆する報告も見られる。

3. 幹細胞を用いた再生医療の現状

現在考えられている幹細胞を用いた再生医療の対象となる疾患を表1に示した。さまざまな疾患が再生医療の対象になると考えられている。将来、再生医療が順調に発展すれば対象になる患者は膨大な数に上ることも想像されている (図3)。その中で造血幹細胞を用いた骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植は、白血病やリンパ腫などの悪性腫瘍、再生不良性貧血などの血液疾患、先天性免疫不全症や先天性代謝異常などさまざまな難治性疾患に対する根治を目指す治療法としての地位が築かれている。このような造血幹細胞移植は再生医療の先駆けと位置づけることができるし、さらに最近では造血幹細胞を体外で増幅する研究が盛んに行われ、増幅した幹細胞を用いた実際の臨床応用も開始されている。

その他にもさまざまな再生医療が始まっている。平成15年度にわれわれが実施したアンケート調査では、われわれの予想を遥かに超える再生医療がわが国ですで行われている、あるいは行われようとしている実態が明らかとなった。例えば骨髄細胞を用いて心筋梗塞の患者に対して自家骨髄を直接心臓組織内に移植する臨床研究が行われている。また、閉塞性動脈硬化症 (ASO)、バージャー病に対して自己の骨髄細胞や末梢血単核球を局所に投与する治療は多数の施設で行われ、骨髄間葉系幹細胞を用いた骨、軟骨疾患の治療が行われるなど、再生医療が爆発的に広がっている実体が明らかになった。

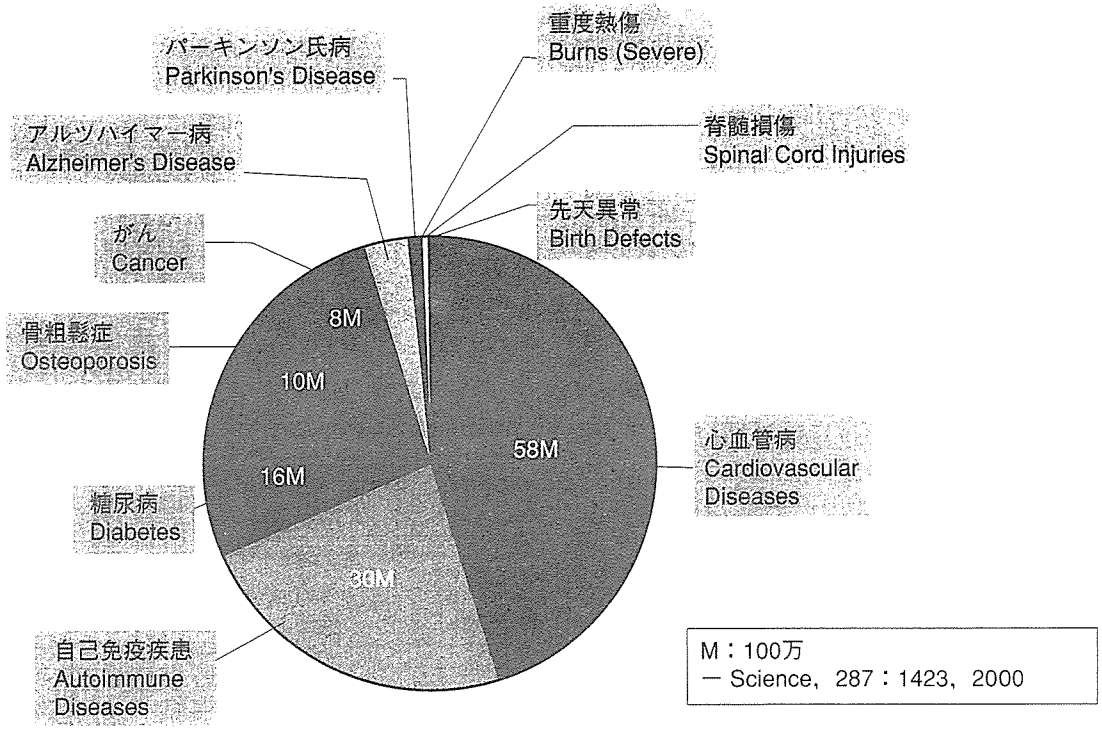


図3 再生医療の可能性
さまざまな疾患をもつ膨大な数の患者が将来再生医療の対象になる可能性がある

第3章では幹細胞を用いた再生医療の研究の中から、特に研究が進んでいる領域について8名の先生方に臨床応用の現状を概説していただいた。また、海外では、倫理的、社会的に大きな問題を抱えている数体の胎児脳組織を移植するパーキンソン病の治療や胎児鼻粘膜細胞を用いた脊髄損傷の治療が行われている。一方、わが国では、胎児脳組織から樹立した神経幹細胞を利用した脊髄損傷や神経変性疾患患者への再生医療に向けた準備が進んでいるが、胎児組織を研究や医療に用いて良いかどうかについてさまざまな意見があり、未だに国としての統一された方針は出されていない。この問題は第4章でとりあげ、4名の先生方にそれぞれの立場からお考えを述べていただいた。

いずれにしても、幹細胞を用いた再生医療がわが国でも爆発的な広がりを見せており、今後、健全な形でこの治療を進めていくためには、倫理性、社会性、科学性、公開性、安全性に十分配慮して進める必要があり、そのための指針作りが緊急の課題となってきた。

4. 幹細胞を用いた臨床研究のための指針

今後、わが国で再生医療を健全な形で発展させていくために、「厚生科学審議会科学技術部会ヒト幹細胞を用いた臨床研究の在り方に関する専門委員会」が発足し、「ヒト幹細胞を利用した臨床研究に対する指針」作成のための検討が進められている。この指針は倫理的な面だけでなく臨床試験研究の安全性を十分に考慮して作成する必要があると考えられ、①ドナーの人権保護と安全性の確保、②採取にあたっての説明・同意、③ドナースクリーニング、④幹細胞の採取方法、⑤幹細胞の加工について（培養、遺伝子操作など）、⑥幹細胞の利用につ

いて（対象とする疾患の範囲，投与手技に対する評価など）などさまざまな問題が検討されている。倫理的検討は再生医療を進めるうえできわめて重要な問題であるが，それに加えて最近では細胞を intelligent drug として位置づけ，従来の薬の生産と同じように安全性をしっかりと担保することが求められている。従来，薬事法に基づき安全性に対して厳密な基準のもとでできた薬の臨床治験と異なり，わが国で行われてきた再生医療はすべて医師主導の臨床研究として各医療機関の倫理委員会をパスすれば良いという形で行われてきた。しかし，細胞を無菌的に処理・加工するための施設を整備することもないまま，各医療機関の倫理委員会のレベルはまちまちで，審査される項目や内容も全くばらばらに行われてきたことから，これまでのやり方を危惧する声が大きくなりつつあり，中央審査も検討されている。幹細胞を分離・培養・加工してから臨床応用に用いるためには，安全性と機能，品質が保証されなければならない。そのため，CPC（cell processing center）内での細胞の処理，細胞の処理に用いる器具や培養液，サイトカインなどのGMP化，標準作業手順書（SOP）の作成と記録の保存，厳格な品質管理体制の確立などの整備を行う必要がある。また体外処理された体性幹細胞の安全性と効果を科学的に証明していくためには質のよい臨床試験のデザインの構築が必要である。

文献

- 1) Jlang, Y. et al. : Nature, 418 : 41, 2002
- 2) Kanatsu-Shinohara, M. et al. : Cell, 119 : 1001-1012, 2004
- 3) Ito, M. et al. : Blood, 100 : 3175-3182, 2002
- 4) Hiramatsu, H. et al. : Blood, 102 : 873-880, 2003
- 5) Alison, M. R. et al. : Nature, 406 : 257, 2000
- 6) Lagesse, E. et al. : Nature Med., 6 : 1229-1234, 2000

ヒト幹細胞測定用動物の開発

中 畑 龍 俊

1. はじめに

最近、再生医学あるいは再生医療という言葉がしばしばマスコミに登場し、医学関係者ばかりでなく広く社会の関心を集めている。再生医療の基盤となる細胞は幹細胞であり、この細胞は自分とほぼ同じ能力を持つ細胞を再生する能力（自己複製能）と多分化能を併せ持った細胞として知られている。この細胞の持つ自己複製能は、再生医療が成立するための理論的根拠を与えている。すなわち、幹細胞を用いた再生医療を一旦患者さんに施すと、幹細胞は分裂し、自分と同じ能力を持った細胞を失うことなく作りながら、一方では求められる機能を持った成熟細胞を生み出し続けることにより治療が成立すると考えられるからである。近年、再生医療が爆発的な広がりを見せようとしている。しかし、このような新しい医療を開発していくためには安全性、科学性の担保が最も重要であり、そのため前臨床試験として同系の実験動物間で移植実験を行うことが一般的に行われてきた。しかし、実際の患者さんに対する臨床試験に移る前に、ヒト幹細胞を用いた *in vivo* 実験が必須と考えられるようになり、そのためヒト幹細胞を測定することのできるモデル動物の開発がヒト幹細胞の基礎的研究の発展のみならず臨床的にも急務となってきた。

2. 幹細胞とは

幹細胞は受精卵を培養して樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞) と我々の体の中に存在する体性幹細胞に分けることができる。幹細胞には階層性 (hierarchy) があり、より未分化な幹細胞は自己複製能が高く、非常に広範な細胞系列に分化できるが、幹細胞も下位になるに従い自己複製能は低くなり、分化できる細胞系列も限定されてくる。ES 細胞は最も上位に位置する幹細胞である。一方、われわれの臓器には、組織特異的な幹細胞 (体性幹細胞) が存在し、それぞれの組織の恒常性を維持していると考えられている。造血幹細胞は最も研究の進んでいる体性幹細胞であるが、その他、血管上皮、皮膚、腸上皮クリプトの基底細胞、生殖器などに存在することが知られ、最近では、肝臓、腎臓、網膜のような組織や従来再生しないと考えられてきた成人の神経組織においても幹細胞が存在することが明らかにされている (図 1)。現在行われている再生医療は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞などの体性幹細胞を利用したものであるが、将来的には、社会的、倫理的に多くの問題を抱えながらもほぼ無限の自己複製能と多分化能を持つ ES 細胞の利用も考えられている。

最近、マウス及びヒト骨髓や臍帯血中には

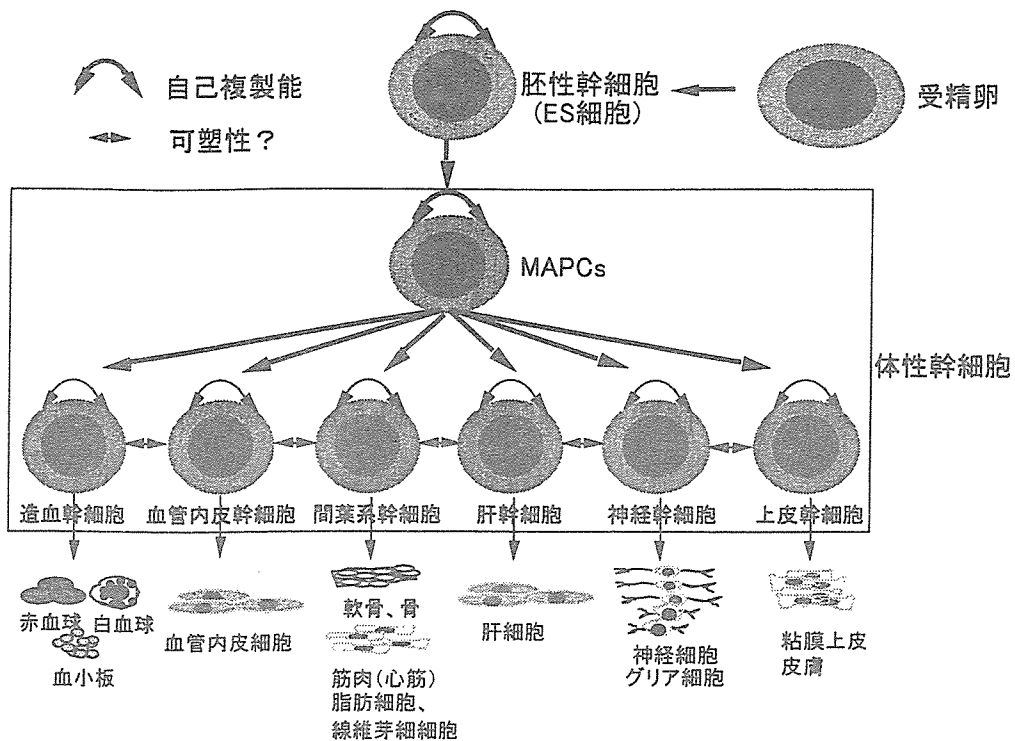


図1 幹細胞と hierarchy

従来の体性幹細胞に比し、より広範な細胞系列への分化能力を持った細胞 (multipotent adult progenitor cells : MAPCs) の存在も報告されている¹⁾。また、新生児の精巣からES細胞とほとんど同じ能力を持った細胞の樹立に成功し²⁾、さらに最近では、骨髓や末梢血中に卵子のもとになる細胞の存在も報告されており、体性幹細胞の概念が今後大きく変貌する可能性が示唆されている。

一方、最近体性幹細胞の可塑性を示唆する多くの研究が報告され議論を呼んでいる。2000年のNature誌に、骨髓移植を受けた患者の肝組織を検討すると、肝細胞の一部がドナー細胞に置き替わっていたという衝撃的な報告がなされた³⁾。この観察は、造血幹細胞自身が肝細胞に形質転換した、骨髓中には肝細胞のもとになる体性幹細胞や未分化幹細胞の存在、造血幹細胞あるいはその子孫と肝細胞の細胞融合などの可能性を示しているが、いまだ結論に達していない。その後、肝不全で早期に死亡する遺伝子変異チロシン血症マウスに正常骨髓造血幹細胞分画の細胞を

移植したところ、肝機能は著明に改善し、マウスは一生を全うできたことが報告された。この論文では細胞融合については全く触れていないが、造血幹細胞自身が正常の機能を持った肝細胞の再生を何らかの形で担い、造血幹細胞を用いて重症肝疾患を治療できる可能性を示している⁴⁾。その他、骨髓から血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、骨細胞等が *in vivo*, *in vitro* で形成されたとの報告が見られる。これらは細胞融合によりもたらされているのか明らかではないが、比較的採取が容易な骨髓や臍帯血を用いて、今後、様々な再生医療が展開できる可能性を示している。しかし、ヒト幹細胞でも同様な現象が起こっているか否かを *in vivo* で実験するためには、ヒト幹細胞を測定することができるモデル動物の開発が必須である。

3. ヒト幹細胞を測定できるモデル動物の開発

腫瘍細胞のように異常な増殖能を獲得した細胞は、異種動物に移植しても比較的容易に生着し、旺盛な増殖、転移によりレシピエントに死をもたらすことが知られている。腫瘍の種類によっても異なるが、通常のマウスやラット、ヌードマウス、ヌードラットなど多くの小動物がこの種の実験に用いられてきた。一方、正常のヒト体性幹細胞に関しては、免疫能がある程度保たれている動物に移植しても組織適合抗原のバリアーは越えられず、宿主側から拒絶されてしまうことは古くから知られてきた。そのため、正常なヒト細胞を拒絶することなく受け入れることのできる様々な免疫不全動物の開発が試みられた。一般に体性幹細胞の中では、最も研究が進み、細胞表面抗原も明らかにされ、移植後の増殖、分化過程の解析も容易な造血幹細胞が生着しうるモデル動物の開発が盛んに行われてきた。造血幹細胞は全ての血球系列へ分化

できる多分化能と自己複製能を併せ持った細胞であり、骨髄移植、臍帯血移植など実際の臨床にも盛んに利用されている。造血幹細胞は実験的骨髄移植により長期骨髄再構築能で評価するのが一般的であり、マウスでは、たった1個で長期に骨髄を再建できる細胞の表面抗原が決定された⁵⁾。一方、ヒトでは *in vivo* の骨髄再構築実験を行うことができないため、従来からマウスなどにヒト造血幹細胞を移植して長期骨髄再構築能を検証しようとする様々な試みがなされてきたが(表1)、実験的に可能となったのは比較的最近である。

1) 従来開発されてきたモデル動物

A. SCID (severe combined immunodeficiency disease) マウス

1983年 Bosma らによって報告された SCID マウスは T 細胞, B 細胞をいずれも欠損した重度の免疫不全マウスで⁶⁾, このマウスにおいてわずかではあるが最初にヒト造血の再構築が可能になった。その後開発されたモデルも SCID マウスを基本として様々な修

表1 ヒト幹細胞を受け入れる免疫不全マウスの開発

マウス	免疫不全の種類	ヒト造血幹細胞の生着
NUDE	T 細胞 ↓	なし
SCID	T 細胞 ↓ B 細胞 ↓	不良 ヒト胎児組織必要
NOD/LtSz / SCID ★NOD/Shi / SCID	T 細胞 ↓ B 細胞 ↓ 補体活性 ↓ MΦ機能 ↓ NK 活性 ↓	不十分 抗asialo GM1 抗体 投与でやや改善
NOD/SCID/ β2m ^{-/-}	T 細胞 ↓ B 細胞 ↓ 補体活性 ↓ MΦ機能 ↓ NK 活性 ↓	不十分 T細胞出現無し
★ NOD/SCID/ γc ^{-/-} (NOG)	T 細胞 ↓ B 細胞 ↓ 補体活性 ↓ MΦ機能 ↓ NK 活性 ↓	極めて良好 T細胞出現あり

★ 我々が開発したマウス

飾を加えたものが多い。

B. SCID-hu モデル

SCID マウスの腎臓被膜下にヒト胎児肝や胸腺などを移植したモデルで最初にヒト造血幹細胞から全ての血球系への分化がみられた実験系である。移植した骨髄や胎児肝から造血幹細胞が供給され、胸腺中では T 細胞系列の分化がみられる⁷⁾。ヒト造血と免疫系が再構築できる系として重要であるが、ヒト胎児組織を必要とすることや定量性の問題のため造血幹細胞アッセイにはほとんど使用されなくなった。

C. NOD/SCID (nonobese diabetic/scid) マウス

1995 年アメリカの Jackson 研究所の Shultz らは、SCID マウスと様々な免疫不全マウスを掛け合わせて作成したマウスを検討し、その中で NOD/SCID (nonobese diabetic/scid) マウスにヒト造血細胞がよく生着することを初めて報告した⁸⁾。NOD マウスは自己免疫性のランゲルハンス氏島炎から I 型糖尿病をきたす疾患モデルマウスであるが、マクロファージの活性化障害、NK 活性の低下、補体活性の低下などの自然免疫に障害を持っている。NOD/SCID マウスは T、B 細胞の欠損に加えこれらの免疫異常を併せ持ち、これが優れた生着性に関与していると考えられている。現在このマウスはヒト造血解析モデルとして広く使われてはいるが、胸腺腫の発症のため造血幹細胞の活性が短期間しか観察できないことや、マウス体内で分化したヒト血球は B 細胞系に偏る傾向があり T 細胞系列への分化がみられないなどの大きな欠点を有している。また、ヒト造血により達成されるキメラ率は今のところ十分とはいえ、高いキメラ率を得るためには大量の細胞を必要とし、実験を行う上で大きな制約となっている。

D. beige/nude/xid (bnx) マウス

bg 遺伝子 (NK 活性低下)、*nu* 遺伝子 (無毛、無胸腺)、*xid* 遺伝子 (低 γ グロブリン血症) を併せ持つマウスで、最初はヒト腫瘍モデルとして報告された。その後、遺伝子工学的にヒトサイトカインを産生するようにした骨髄間質細胞を同時に移植すると、ヒト造血幹細胞の生着がみられることからヒト造血幹細胞アッセイにも使用されている⁹⁾。このマウスモデルは胸腺腫の発生が少なくより長期に飼育が可能 (~1.5 年) という利点を有しているが、達成されるキメラ率が低く、B 細胞系への分化はみられないかまたは低下していることから余り用いられていない。

E. NOD/SCID/ $\beta 2$ microglobulin^{tm1} マウス

Jackson 研究所では NOD/SCID マウスに $\beta 2$ microglobulin ノックアウトマウスを掛け合わせた、NOD/SCID/ $\beta 2$ microglobulin^{tm1} マウスを開発し、このマウスが従来の NOD/SCID マウスよりも優れたヒト造血幹細胞のレシピエントであることを報告した¹⁰⁾。NOD/SCID マウスに残存する NK 活性を消失させたことが高い生着性につながったと考えられている。しかし、このマウスにおいても依然としてヒト造血幹細胞の生着率は低く、T 細胞がほとんど出現しないことが明らかとなった。

F. fetal sheep

免疫学的に未熟な胎仔では前処置をしなくても同種造血幹細胞が拒絶されないことから、1992 年 Zanjani らはヒト胎児肝の細胞をヒツジ胎仔に子宮内移植し、出生したヒツジの造血がヒトとキメラ状態になっていること、いろいろなヒト血球が 2 年以上にわたって末梢血中に見られることを報告した¹¹⁾。fetal sheep モデルはこれらの観点から優れたモデルであるといえるが、実際に実験を行うことができる施設は極めて限られており、ハンドリングの問題から一般的にはなっていない。

い。

2) 新たなヒト幹細胞アッセイモデル NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ (NOG) マウス

われわれは欧米で使用されている NOD/SCID マウス (NOD/LtSz-scid) と strain の異なる, 我が国で開発された NOD/Shi-scid マウスを用いてヒト造血幹細胞測定を行ってきた¹²⁻¹⁴⁾. さらに, NOD/SCID マウスでは NK 活性が残存していることに着目し, 抗アジアロ GM1 抗体投与によってマウスの NK 活性を抑制することがヒト造血幹細胞の生着性の向上につながることを見いだした¹⁴⁾. そこで完全な NK 活性の抑制を目指して NOD/Shi-scid マウスと common γ 鎖 (γ_c) ノックアウトマウスを掛け合わせ, 新たな NOD/SCID γ_c^{null} マウス (NOG マウス) を作成した¹⁵⁾. common γ 鎖は IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 の受容体に共通して用いられているモチーフでそのノックアウトマウスは,

T, B リンパ球の極端な減少と NK 細胞活性の完全な欠損を生じることがわかっている. 新たに作成した NOG マウスは従来の NOD/SCID マウスの免疫異常を持ちつつ, NK 活性を完全に消失していることが確認された. このマウスと従来の NOD/SCID マウスにヒト造血幹細胞が含まれる臍帯血 CD 34 陽性細胞を同数ずつ移植し, 経時的にヒト血球の割合を flow cytometry (FACS) を用いて比較した. 末梢血, 骨髄, 脾臓でのヒト血球 (CD 45 陽性細胞) の比率を比べてみると NOG マウスで圧倒的に高いキメラ率を示した (図 2). 骨髄, 脾臓などにおけるヒト細胞の表面抗原解析では赤芽球, 好中球, 好酸球, 好塩基球, 巨核球, 血小板, 単球, マクロファージ, T 細胞, B 細胞, NK 細胞, NKT 細胞, 樹状細胞, 肥満細胞など我々の体内に存在する全ての血球系譜への細胞分化を認めた¹⁵⁻¹⁷⁾. また, ヒト CD 34 陽性細胞が骨髄中で著明に増幅していることが観察され

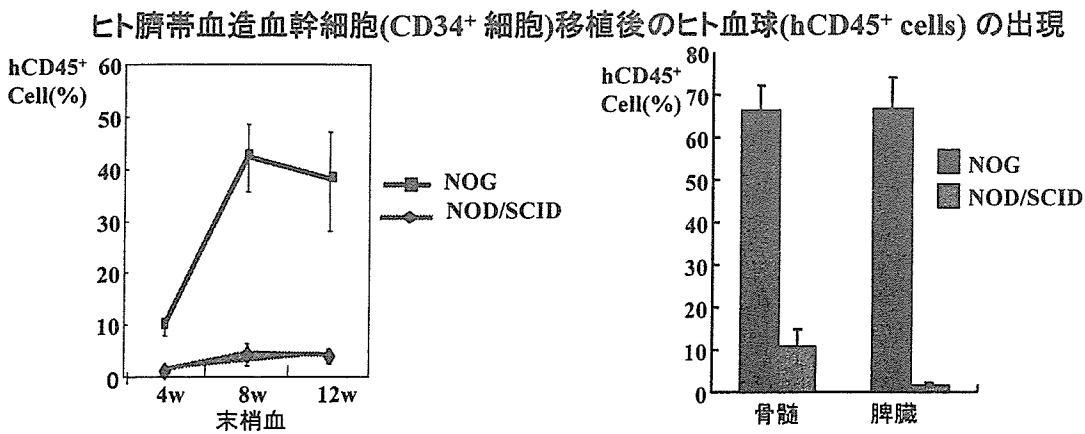
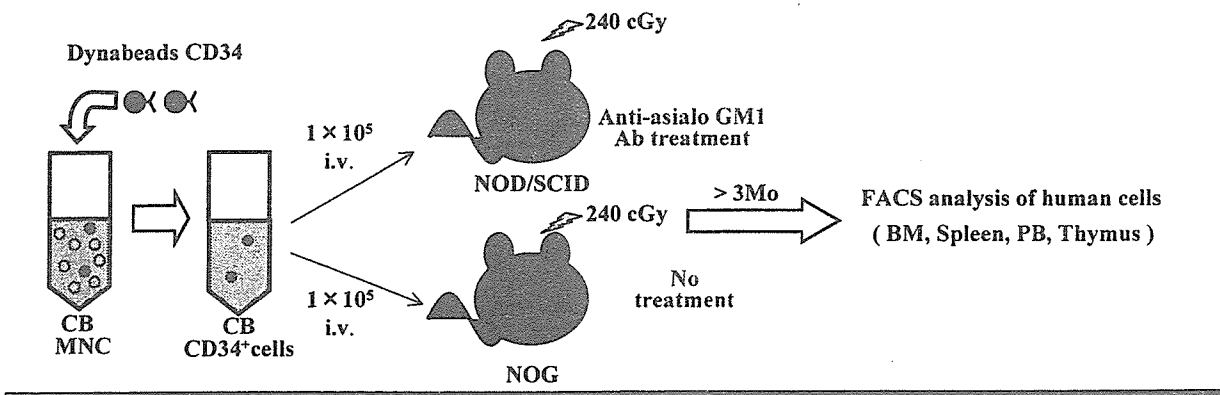


図 2 NOG マウスを用いたヒト造血幹細胞の測定

た(図3). 特に注目すべきことは従来モデルではみられないT細胞の出現を認めたことである. そこで胸腺, 脾臓及び骨髄におけるヒトT細胞の出現パターンを調べたところ, 移植後6週の胸腺においてはCD4, 8 double negative, double positive T cellが

ほとんどであり, 9週になるとCD4, 8 single positive T cellが見られるようになり, この時期になって初めて脾臓などの末梢リンパ組織にT細胞が出現することが明らかとなった(図4). 胸腺で見られるT細胞のT cell receptorはほぼ全て $\alpha\beta$ 型であるこ

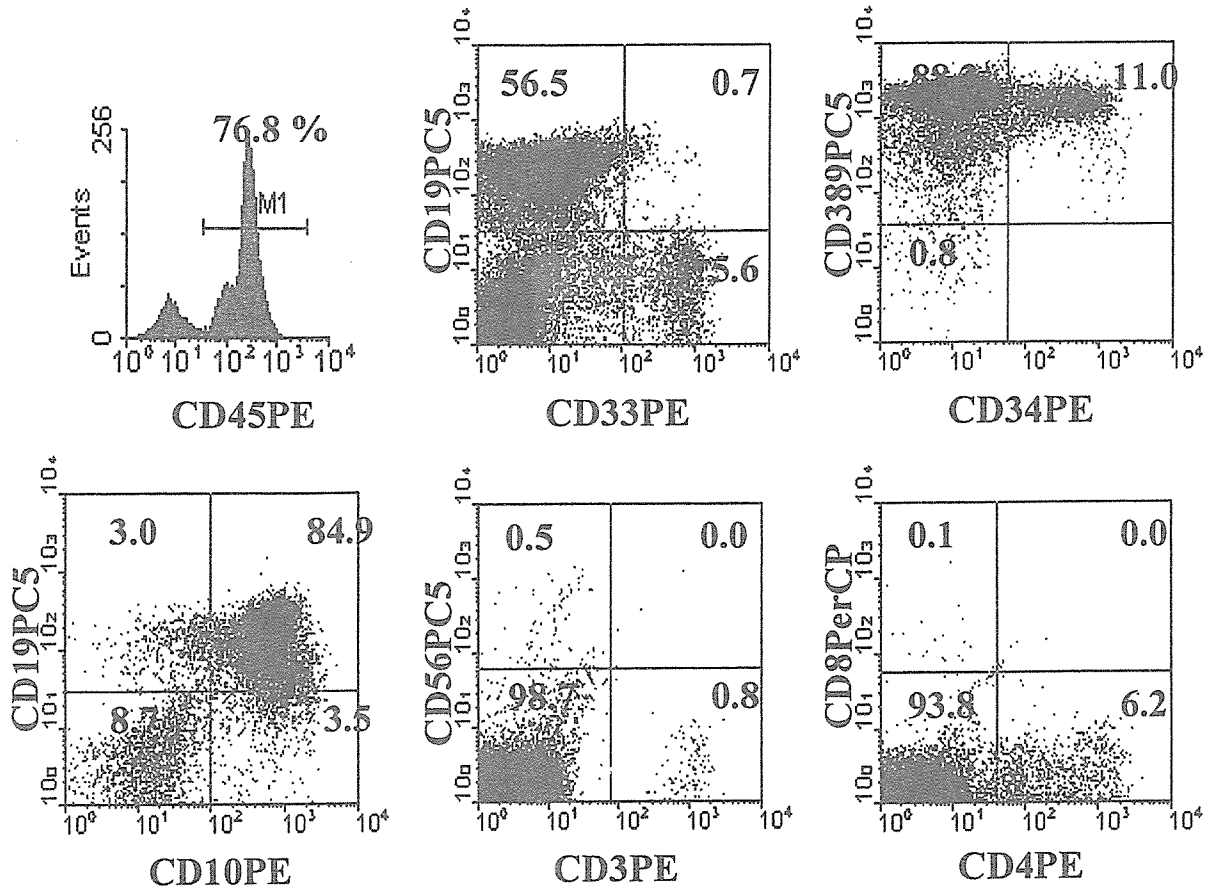


図3 ヒト臍帯血 CD 34⁺細胞移植後12週のマウス骨髄

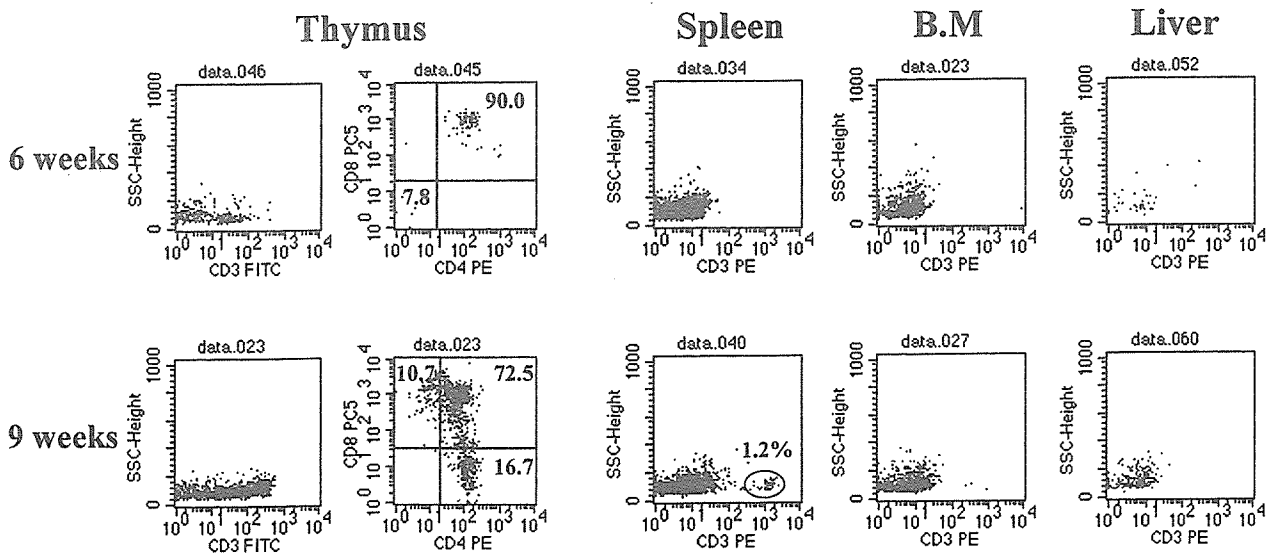


図4 NOGマウスに移植されたヒト造血幹細胞からのT細胞分化

と、また、naive T cellと考えられるCD45RA陽性の分画が多数存在することが確認された。一方、脾臓や骨髄ではCD4もしくはCD8 single positive T cellを主体とし $\gamma\delta$ 型T細胞もみられた。以上のことから移植されたヒト造血幹細胞は骨髄で増幅後、胸腺に移動ホーミングし、ここがヒトT細胞の分化の主たる場であると考えられる¹⁶⁾。我々のNOGマウスとJackson研究所が開発したNOD/SCID/ $\beta 2$ microglobulin^{null}マウスは共にNOD/SCIDマウスに残存しているNK細胞活性を完全に消失させることを目的として作成されたにもかかわらず、後者ではキメラ率が低く、ヒトT細胞分化がみられないことは興味深い。このことは単にマウスNK細胞活性だけではNOGマウスの優れた生着性を説明できず、このマウスにユニークな環境が存在していると考えられる。NOGマウスではcommon γ 鎖がロックアウトされたことによりIL-15刺激が入らないため樹状細胞

からの γ インターフェロンの産生が著減しており、このこともユニークな環境の一つを与えているのではないかと考えている。

B細胞の初期分化はマウスで言われているように骨髄で起こり、脾臓などの末梢リンパ組織で成熟していくことがヒト造血幹細胞を移植されたNOGマウスにおいても観察された。興味深いことに移植後5か月後のマウスの血液中にはヒト型の免疫グロブリンIgG、IgM、IgAが検出され、マウス体内においてヒト免疫の再構築が起こっている可能性が示唆された(図5)。このマウスにわずか100個のヒト臍帯血CD34陽性細胞を移植しても、生着がみられ、長期骨髄再構築が得られることから極めて鋭敏なヒト造血幹細胞のアッセイ系であることが判明した。

本稿では我々が開発した新しいモデルマウスであるNOGマウスがヒト造血幹細胞の測定に極めて有用であることについて述べたが、このマウスは各種ヒト体性幹細胞の測

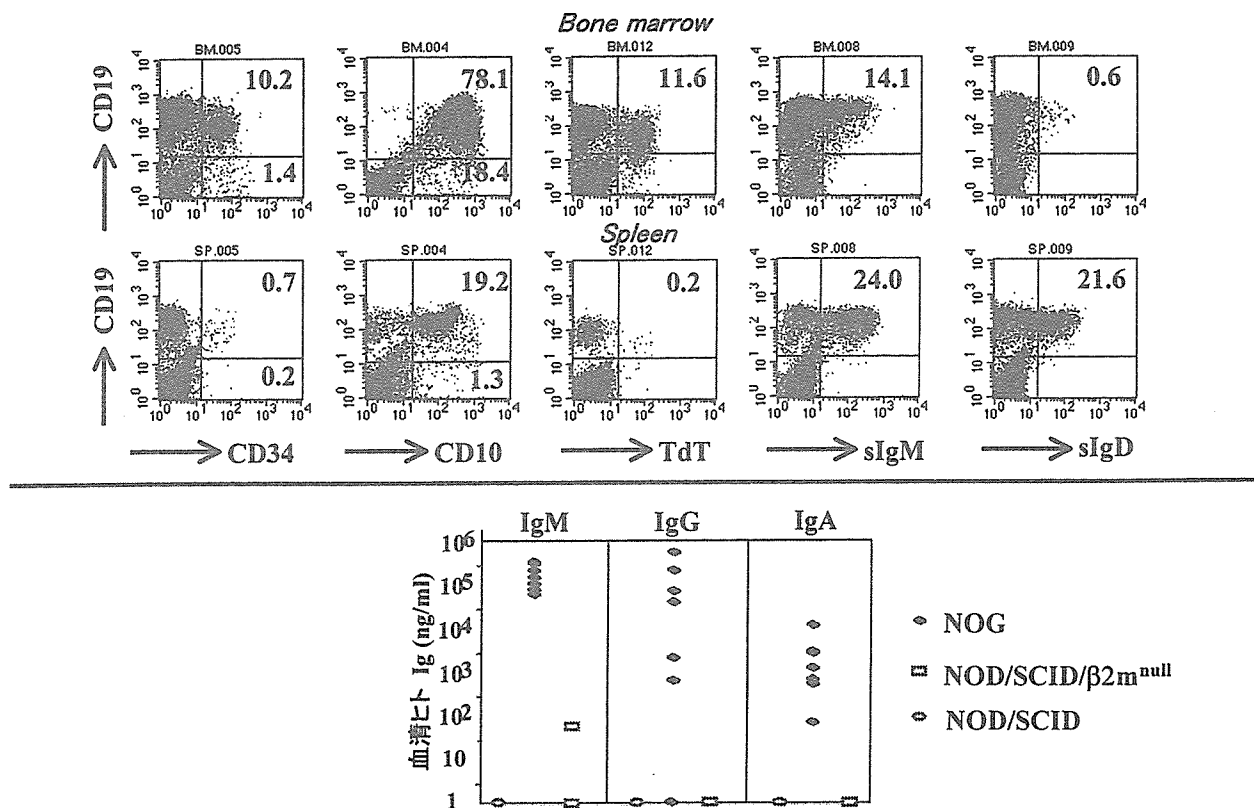


図5 ヒト造血幹細胞からのB細胞への初期分化と免疫グロブリンの産生

定，幹細胞の可塑性の有無などにも盛んに応用されてきている。NOG マウスモデルはヒト体性幹細胞のホーミングや増殖・分化の分子機構の解明などの基礎的研究やヒト幹細胞を用いた再生医療の発展に有用であると考えられる。ヒトの幹細胞研究はマウスでの知見を後追いする形で進んできたが，このような新たなモデルの登場により，この分野のさらなる発展が期待される。

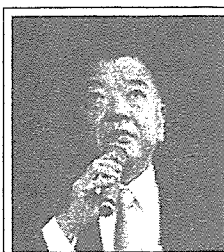
■ 参 考 文 献 ■

- 1) Jlang Y. et al: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41, 2002.
- 2) Kanatsu-Shinohara M. et al: Generation of multipotent stem cells from postnatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012, 2004.
- 3) Alison M.R. et al: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406: 257, 2000.
- 4) Lagesse E. et al: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 6: 1229-1234, 2000.
- 5) Osawa M. et al: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD 34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245, 1996.
- 6) Bosma G.C. et al: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530, 1983.
- 7) McCune J.M. et al: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-1639, 1988.
- 8) Shultz L.D. et al: Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180-191, 1995.
- 9) Mule J.J. et al: Disseminated human malignant melanoma in congenitally immune-deficient (bg/nu/xid) mice. *J Natl Cancer Inst* 83: 350-355, 1991.
- 10) Glimm H. et al: Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta 2 microglobulin-null mice. *J Clin Invest* 107: 199-206, 2001.
- 11) Zanjani E.D. et al: Engraftment and long-term expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J Clin Invest* 89: 1178-1188, 1992.
- 12) Xu M. et al: Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cells. *Blood* 192: 2032-2040, 1998.
- 13) Ueda Y. et al: Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by a combination of stem cell factor, Flk 2/Flt 3 ligand, thrombopoietin and a complex of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *J Clin Invest* 105: 1013-1021, 2000.
- 14) Yoshino H. et al: Natural killer cell depletion by anti-asialo GM 1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant* 26: 1211-1216, 2000.
- 15) Ito M. et al: NOD/SCID γ_c^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182, 2002.
- 16) Hiramatsu H. et al: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD 34+ cells using NOD/SCID/ γ_c^{null} mice model. *Blood* 102: 873-880, 2003.
- 17) Kambe N. et al: 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.

中畑 龍俊 (なかはた・たつとし)
京都大学大学院医学研究科 教授

How to comply with cGMP during early phase of translational cell therapy at academia

Taira Maekawa, Dept of Transfusion Medicine and Cell Therapy,
Center for Cell & Molecular Therapy, Kyoto University Hospital



Professor Taira Maekawa, M.D.,
D.M.Sci., Dept of Transfusion Medi-
cine and Cell Therapy, & Director,
Center for Cell & Molecular Therapy,
Kyoto University Hospital

1. Cell Processing Center - Concept

This caricature roughly represents the concept of a cell processing center or CPC (Fig. 1). The CPC is mandatory for cell therapy as shown here, in which donors or patients provide their own cells to a reception area. Those cells are then divided or separated into different components and then we introduce a gene or expand them with cytokines by sequencing in order to develop it. Then the quality control unit confirms the safety and sterility of new product and after that we hand it over to the clinical ward. This is the concept of CPC.

2. KUH - Center for Cell & Molecular Therapy

In order to develop the CPC in Kyoto University, we kept a 200-square meter wide space (Fig. 2). My previous office and secretary's room were located in this building. To keep adequate space, I removed my office and secretary's room and some laboratory room to make way for CPC, called the Center for Cell & Molecular Therapy (CCMT).

The CCMT is located on the third floor of the Clinical Building of Kyoto University Hospital, just next door to the Department of Transfusion Medicine.

3. Layout/Floor plan of CCMT

I will now give you a virtual tour of the inside of CCMT (Fig. 3). The entrance to the Center is accessible only to authorized personnel. This is the entrance with security card system (Fig. 4). This is the monitoring room where we can monitor everything. We can monitor the room pressure and temperature and CO₂ levels of incubators and everything else in each room (Fig. 5). We can also monitor the cleanliness of the air in each room. We've installed particle counter in every room so we can monitor easily for any type of air contamination. The air direction is one-way pass through. So this is the room where we prepare pancreatic islet cells. This is the incubator, safety cabinet, and this is COBE 2991 machine. This is the cryo-storage room (Fig. 6). Unlike in your laboratory in France, we have only two liquid-nitrogen tanks in our lab because of limited space. We store samples using two-directional bar-cord system.

4. Products developed in CCMT

We now have about 5 or 6 products (Fig. 7). Two of them have already reached the clinic. One is islet pancreatic transplantation. The other one is dendritic cells for immunotherapy to leukemia

patients. And then we have cardiovascular regeneration, bone tissue regeneration for bone necrosis disease and culture of inner skin. We have already finished the SOP (Standard Operating Procedures) of these two and we are now waiting of the acceptance by the IRB (Institutional Review Board) in our university hospital. Each projects are going to proceed by the responsible doctors of each clinical department, and medical doctors shown in this slides of my department usually consult with these doctors from the corresponding department.

5. News coverage on success of pancreatic islet cell transplantation

Last year we succeeded in performing pancreatic islet cell allo-transplantation from a living donor (Fig. 8). This procedure was done by Dr. Matsumoto as chief of the pancreatic islet cell transplantation team. An article about this success

appeared in the online edition of Lancet on April 19 last year. On the same day, Nature Journal cited this study in one of its articles. And then BBC, USA Today, Forbes and other major print and broadcast media around the world made mention of this successful study. Finally, Aljazeera Broadcast of Iraq reported this therapeutic strategy.

6. CGMP elements

Current GMP or cGMP consists of ten elements (Table 1), namely, facility and equipment, production and process controls, personnel management, recordkeeping, calibration, validation, error management, SOPs, labeling and quality control and auditing. So in order to satisfy these ten elements of cGMP, we have to do a lot of very tough work. However, conventional cGMP rules can be preferentially applied for drugs or tablets produced in big pharmaceutical companies.

Fig. 1 CPC is mandatory for Cell Therapy

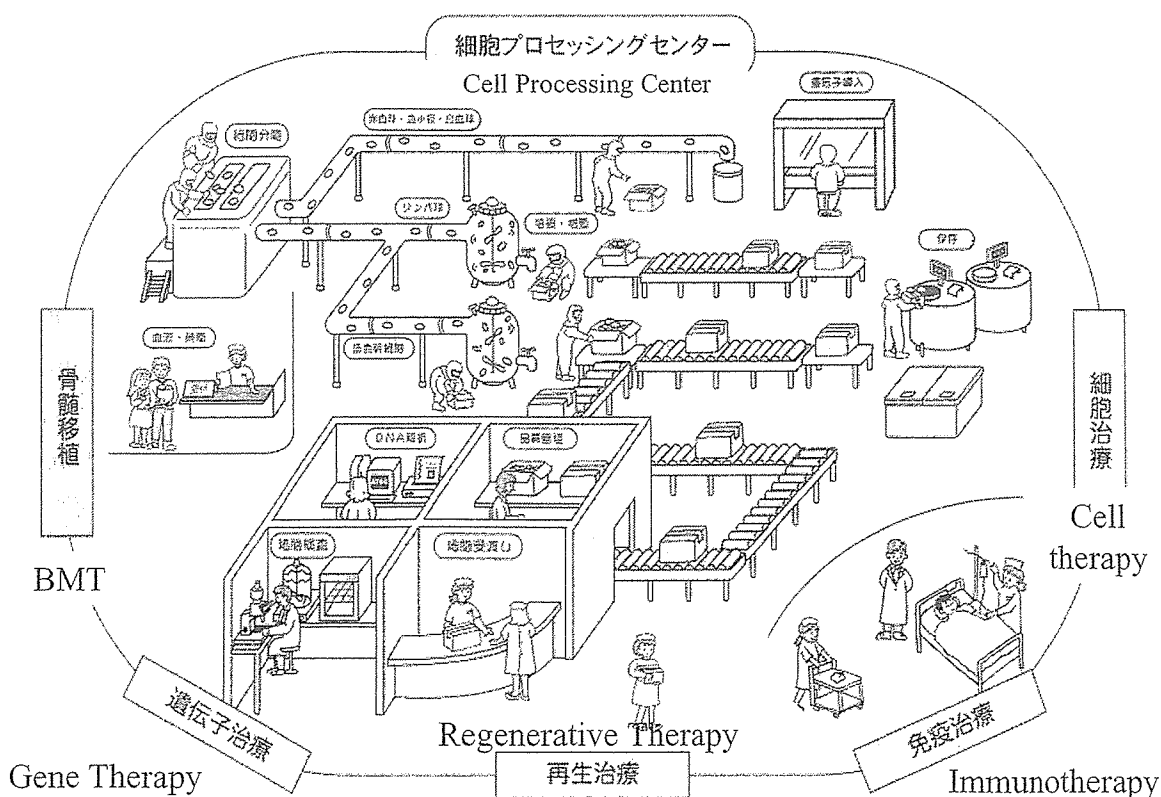


Fig. 2 Center for Cell & Molecular Therapy

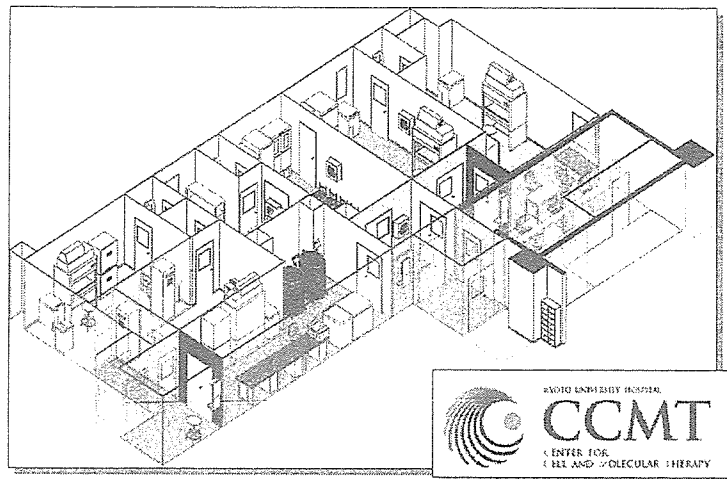


Fig. 3 Inside of CCMT

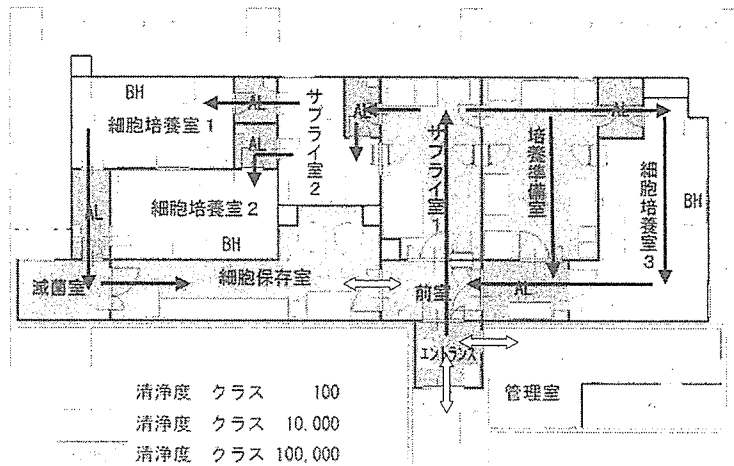


Fig. 4 Inside of CCMT (continue)

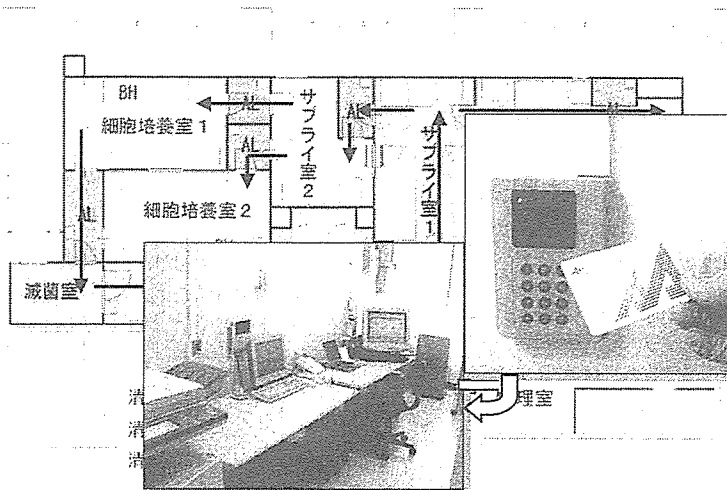


Fig. 5 Inside of CCMT (continue)

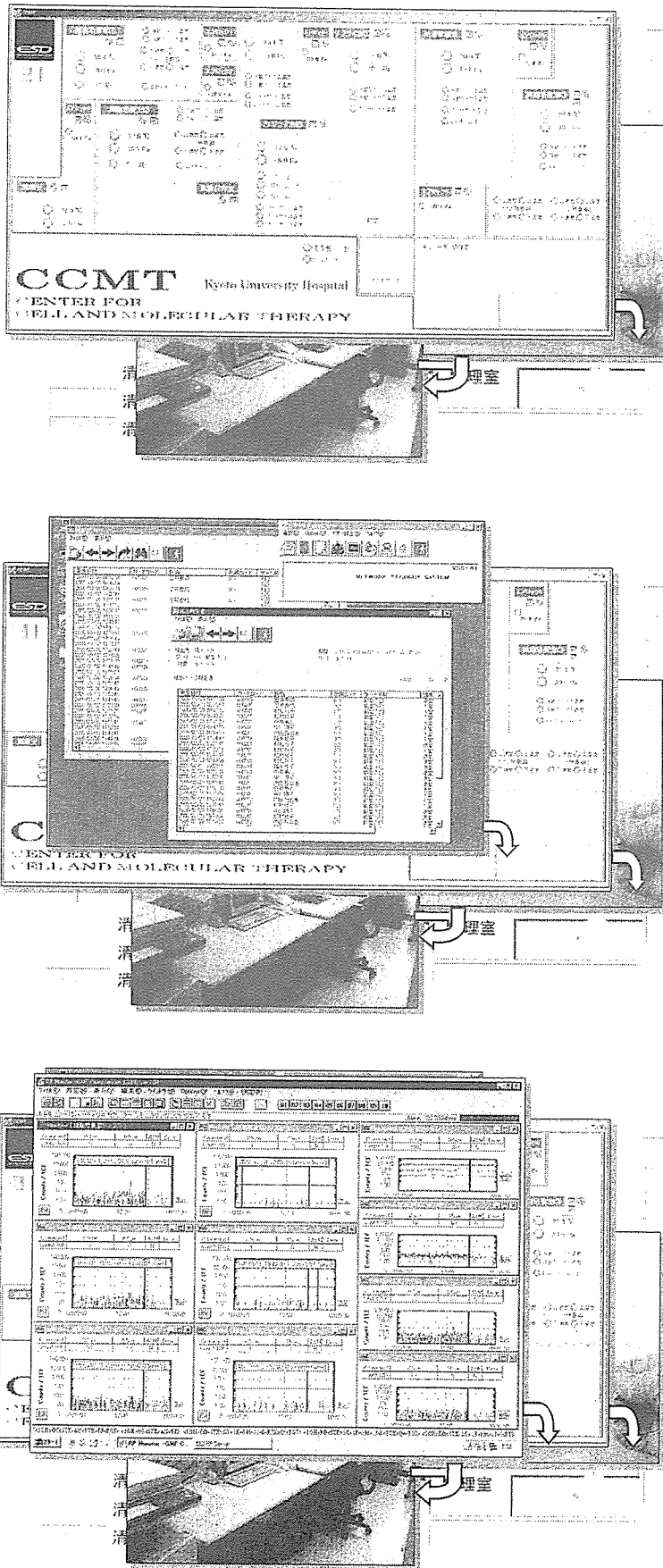


Fig. 6 Inside of CCMT (continue)

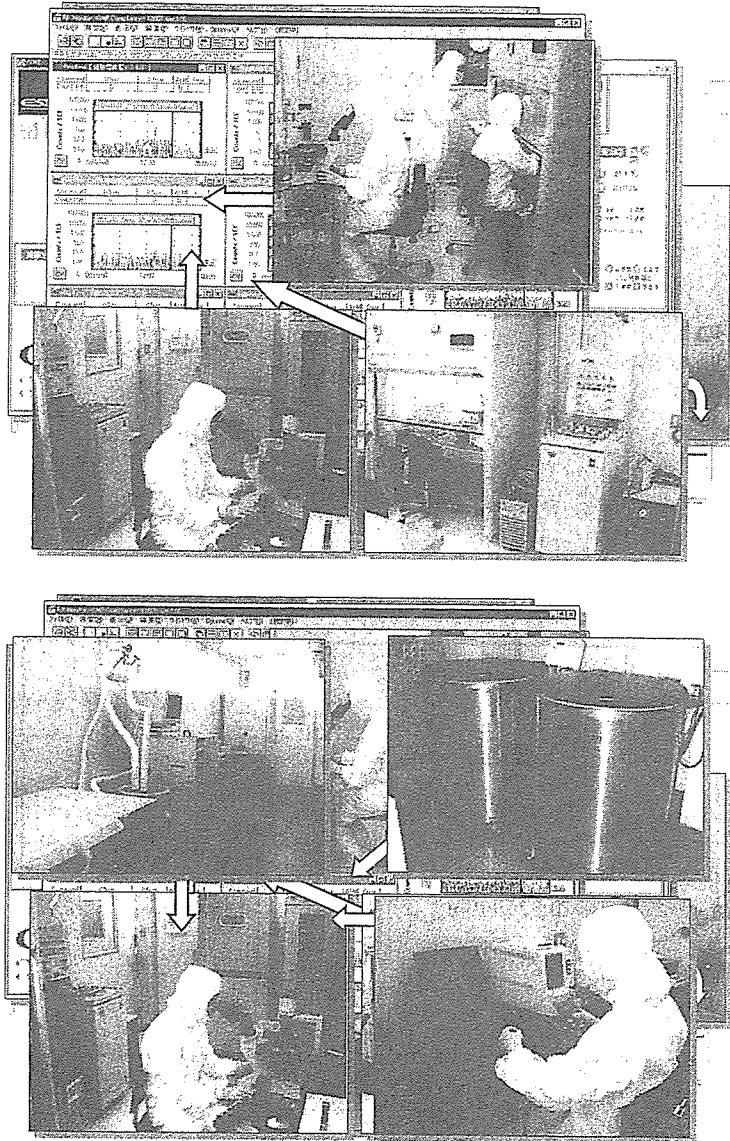



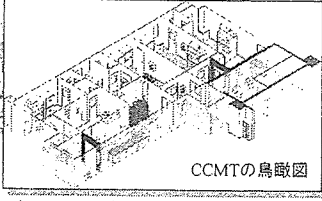
Fig. 7 Cell Therapy Projects at Kyoto University Hospital

京都大学
医学部附属病院
分子細胞治療センター

Please visit our HP !!
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ccmt/>



CCMT



CCMTの鳥瞰図

Islet transplantation

研究責任者 松本慎一

CCMTでのプロセス 採出された膵臓からの胰岛分離作業

Dendritic cells

研究責任者 竹田明弘

CCMTでのプロセス 樹状細胞の培養

Cardiovascular regeneration

製造管理責任者 本村 剛

CCMTでのプロセス 発芽芽からの単核球分離

Bone tissue regeneration for bone necrosis

製造管理責任者 竹田明弘

CCMTでのプロセス 骨髄間質幹細胞の培養

Culture of inner skin... and more

Bone tissue regeneration for bone necrosis

Fig. 8 Success of pancreatic Islet Cell Transplantation from Related Living Donar



Table 1 Ten Elements of cGMP

<ol style="list-style-type: none"> 1. Facility and equipment 2. Production and process controls 3. Personnel management 4. Record-keeping 5. Calibration 6. Validation 7. Error management 8. Standard operating procedures (SOPs) 9. Labeling 10. Quality control and auditing 	<p>Apply for...</p> <p>drugs or tablets produced in pharm.</p>
---	---

7. Cell processing - special characteristic

I would like to explain the special characteristic of cell processing (Table 2). Cell processing is not the production of conventional pharmaceutical drugs like tablets or injections. And, unlike a pharmaceutical company, the academic institution has not adequate size of staffs for cell processing in general.

8. Special validations in cell processing

We have some impossible validations for cell processing if we apply cGMP regulations used for conventional pharmaceutical drugs (Table 3). For

example, performance qualification (PQ) - PQ for worst case validation using pancreas tissue from donor is impossible, although dry-run or water-run is possible. Another example is process validation. Process validation is required to confirm the quality of products using at least three batches of the product. However, in most cases, cell processing products do not comprise the batch. And there are more.

9. Characteristics of early phase TR cell therapy

In these kinds of research in the academia (Table 4), only very small number of patients is

enrolled in most cases - 5 or 10 patients. We have to support multiple clinical trials - pancreatic islet cells, dendritic cells and so on. But we have to efficiently manage our projects with limited or inadequate size of staffs.

10. Stepwise approach in cGMP development in cell therapy

Rather than cGMP, I propose to adopt the institutional GMP or iGMP in cell therapy. Stepwise approach (Fig. 9) is necessary for development of novel gene and cell therapy of early phase I or translational stage in the academia as regulatory requirements increase with product development. And therefore I think that iGMP is specifically re-

quired of cell processing for early phase I study or translational research and should be appropriate for academia.

We tried to develop this iGMP but authorities are concerned that there will be double standard of GMP and they do not like to complete the documentation for this iGMP. But I believe that iGMP should be established to advance translational or exploratory cell therapy in academia. So under this concept, we will develop the cell products in our facility. In future, when these novel therapies could be truly confirmed to be effective after Phase 3 and thereafter patients would be routinely received these treatments, most of these cell products will be produced in a blood center and in

Table 2 Cell Processing is Unique by its “Boutique” Quality

<ul style="list-style-type: none"> • Cell processing is Production of conventional pharmaceutical drugs • Academic institution is Pharmaceutical company
--

Table 3 Impossible Validations for Cell Processing

<p>Performance Qualification (PQ) e.g. PQ for worst case validation using pancreas tissue from donor is impossible, although dry-run or water-run is possible</p> <p>Process Validation (PV) e.g. PV requires to confirm the quality of products using at least three batches of them. However, Cell Processing Products do not consist the batch in most cases.</p> <p>....and more</p>
--

Table 4 Characteristics of Early Phase (TR) Cell Therapy in Academia

<ul style="list-style-type: none"> • Enroll very small numbers of patients • Support multiple clinical trials • Manage projects with inadequate size staff
