

---

6. 同種細胞再生医療における免疫反応制御と  
安全性確保のための監視システムに関する研究  
(免疫寛容誘導技術と移植後の液性因子・細胞表面発現  
による同種細胞制御モニタリングに関する研究)

澤 芳樹

細胞移植・組織移植におけるアロ応答に関するモニタリングと制御に関する研究  
分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 教授

### 研究要旨

アロ骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）移植における心機能、細胞移植後の生着率の推移および免疫応答を評価した。アロ MSC 移植群（A 群）は同系 MSC 移植群（S 群）と同様に、対照群（C 群）と比して左室短縮率が高く、繊維化率が低く、血管密度が高かった。また移植細胞は移植後 7 日で大部分が脱落していた。MSC は低酸素条件下の培養で VEGF を分泌し、MSC 移植によりレシピエント心臓組織における VEGF 転写量の上昇および血中 VEGF 濃度の上昇を認めた。A 群において移植後 1 日で移植部位における T 細胞浸潤を認めず、強度のマクロファージ集積像を認めた。炎症性サイトカインの上昇は移植後 1 日をピークとした一過性のもので、移植後 28 日では正常値であった。MSC は副刺激シグナル分子が陰性であり、リンパ球混合培養試験から ACI 由来 MSC は LEW 由来リンパ球の増殖刺激能を認めなかった。以上から重症心不全に対する MSC 移植療法において、治療効果の一因は VEGF を介した液性因子のパラクラインによるものであること、アロ MSC 移植で炎症は間接認識経路を介した一過性のものであることが示唆され、再生医療において移植細胞源としてアロ細胞が有用性である可能性が示された。

#### A. 研究目的

細胞移植による再生治療は将来有望な治療法であるが、より広く臨床応用可能な医療に発展させるには、治療用細胞の安定供給、質的保証や緊急時対応の面での問題を克服する必要がある。移植細胞源に同種細胞を使用する事が可能になれば、これらの問題が緩和されると考えられる

心臓組織に対する細胞移植では移植細胞の多くが脱落していることが報告されている。さらに昨今では、細胞移植による治療効果の理由として、当初考えられていたである細胞自身の心筋細胞への分化転換が否定されつつある。このことは治療効果に必ずしも細胞の生着が必要でないこ

とを示唆しており、自己細胞に拘泥する根拠が失われるものである。

そこでアロ免疫応答による拒絶反応への対処が必要になる。再生医療において強く期待されている細胞源のひとつである骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）に関して、免疫原性が低いことを示唆するデータが多数報告されている。

我々は重症心不全に対する MSC 移植において、治療効果に移植後の細胞生着が必要でなく、免疫原性も低いために、アロ MSC 移植でも自家 MSC 移植と同等の治療効果得られると考えた。

本年度は、細胞移植療法の有力な細胞源である MSC において、心筋梗塞に対する細

胞移植における治療効果、生着細胞数、アロ MSC 移植による免疫応答、*in vitro* における免疫原性の評価を行い、アロ MSC 移植の有用性を評価した。

## B. 研究方法

動物実験に関しては、National Institute of Health により刊行された”Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”に従い、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

オスの LEW ラットおよび ACI ラットから既に報告されている方法で MSC を単離、培養した。MSC における MHC class I、II、B7.1、B7.2 の発現をフローサイトメトリーで解析した。ACI 由来細胞との混合培養時における LEW リンパ球増殖を WST 法で定量した。低酸素条件下における MSC の培地中への VEGF 分泌を ELISA 法で測定した。

メスの LEW ラットで冠状動脈前下降枝結紮による心筋梗塞モデルを作製し、急性期に細胞移植を施行した。移植細胞  $5 \times 10^6$  個をハンクス緩衝液に懸濁し、梗塞部周縁の 5 か所に 30G 針で注入した。LEW 由来 MSC をドナーとする細胞移植 (S 群) は MHC 完全一致の同系細胞移植であり、自家移植を模擬している。ACI 由来 MSC をドナーとする細胞移植 (A 群) は MHC 完全不一致の異系細胞移植であり、他家細胞移植を模擬している。細胞なしの緩衝液のみ注入した対照群 (C 群) は無治療を模擬している。

移植後 1 日の心臓組織における CD4、

CD8、および CD11b 陽性細胞の浸潤を免疫染色で解析した。S 群における移植後 15 分から 28 日の移植細胞数を心臓組織内の雄性遺伝子コピー数を定量 PCR 法で測定し評価した。移植後 15 分から 28 日の心臓組織における IL1 $\beta$  と MCP-1 の転写量を定量 RT-PCR で測定した。

細胞移植後 28 日に左室拡張末期径、左室収縮末期径を心臓超音波で測定し、左室径短縮率を算出した。繊維化率をマッソン・トリクロム染色で測定した。微小血管密度を Factor VIII の免疫染色で測定した。細胞移植後 28 日の心臓組織における VEGF 転写量を定量 RT-PCR で測定した。細胞移植後 28 日の血中 VEGF 濃度を ELISA 法で測定した。

## C. 研究結果

### 1. 心筋梗塞急性期に対するアロ細胞移植の治療効果

A 群および S 群は、C 群と比して左室径短縮率が高く (図 1)、左室繊維化率が低く、血管密度が高かった (図 2)。A 群と S 群の間に有意な差は認めなかった。

### 2. 治療効果のメカニズムの解析

S 群において、細胞移植後 28 日までに移植細胞の大部分が脱落した (図 3)。*In vitro* で MSC は培養液中に VEGF の分泌を認めた。低酸素条件下の培養で MSC の VEGF 分泌量が増加した。A 群および S 群は、C 群と比して心筋における VEGF 転写量および血中 VEGF 濃度が高かった。

### 3. アロ細胞移植に対する免疫応答

移植後 1 日で、いずれの群の心臓組織においても IL1b および MCP-1 の転写量の上

昇を認め、A群は、S群およびC群と比して有意に高かった。移植後1日でいずれの群においてもT細胞浸潤像を認めず、A群の細胞移植部位においてマクロファージが多く集積していた(図4)。移植後28日でいずれの群においてもIL1bおよびMCP-1の転写量は正常値であった。MSCはin vitroでMHC class I(+), MHC class II(+du11), B7.1(-), B7.2(-)であり、interferon  $\gamma$ を添加してもB7分子の発現を認めなかった。ACI由来MSC刺激によるLEWリンパ球増殖を認めず、interferon  $\gamma$ 存在下で培養したACI由来MSC刺激においても同様の結果であった。

#### D. 考察

心筋梗塞急性期に対するMSC移植による治療効果のメカニズムとして、長期の細胞生着は必要なく、早期の移植部位における移植細胞によるVEGF分泌、および亜急性期のVEGFパラクライン作用を介した全身性のVEGF濃度の上昇、血管新生効果の惹起および血行再建が一因であることが示唆された。

アロMSC移植による免疫応答について、アロMSCは免疫原性が低くT細胞を介した拒絶反応を惹起せず、脱落してゆく移植細胞に対するマクロファージによる一過性のものに過ぎないこと、この炎症は心機能増悪因子にはならないことが示唆された。

以上より将来的に他家細胞移植は自家細胞に代替しうるアプリケーションとなりうることが示唆された。

#### E. 結論

心筋梗塞急性期における骨髄由来間葉系幹細胞移植において同種他家細胞の有用性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 研究発表

重症心不全における細胞移植療法における同種アロ細胞の有用性の検討 第6回日本再生医療学会総会 2007年3月13-14日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

左室径短縮率(%)

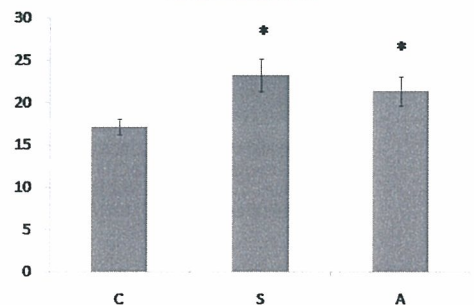


図1. 心臓超音波による心機能評価

細胞移植後28日に左室拡張末期径、左室収縮末期径を心臓超音波で測定し、左室径短縮率を算出した。S群およびA群は、C群と比して左室径短縮率が高かった。

毛細血管数(/mm<sup>2</sup>)

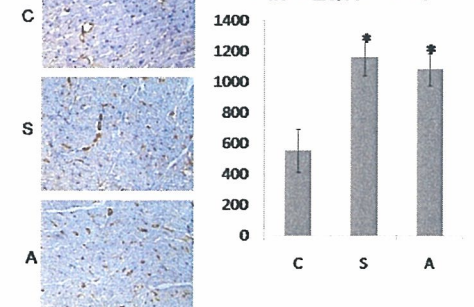
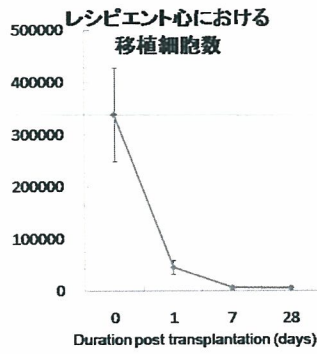
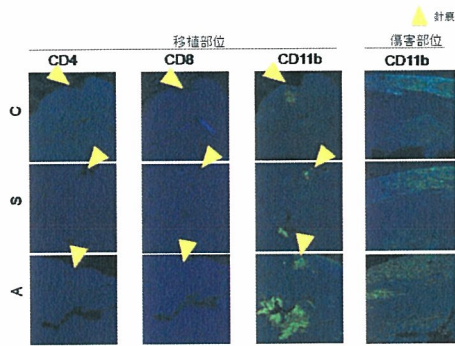


図2. 血管密度に関する組織学的検討

毛細血管密度をfactorⅧ免疫染色で測定した。S群およびA群は、C群と比して毛細血管密度が高かった。



**図3. 移植細胞数定量**  
 S群における移植後15分から28日の移植細胞数を心臓組織内の雄性遺伝子コピー数を定量PCR法で測定した。移植後1日で移植細胞の大部分が脱落し、移植後28日で移植細胞数は検出限界以下であった。



**図4. 免疫組織学的検討による細胞移植後心臓組織における炎症評価**  
 移植後1日の心臓組織におけるCD4、CD8、およびCD11b陽性細胞の浸潤を解析した。いずれの群もT細胞浸潤を認めなかった。A群はC群、S群と比して移植部位におけるCD11bの浸潤の程度が強かった。

---

7. 血液幹細胞の品質管理に関する研究  
(感染リスク排除、癌化等の精査、培地、  
培養工程、凍結保存等の高い安全性確保技術の開発)

高橋 恒夫

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寄付研究部門

研究協力者：張曉紅、伊倉宏一、西村俊秀、平井雅子、山口暁、吉村浩太郎

## 研究要旨

間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪などに分化することが知られており、さまざまな細胞・組織に存在することが報告されている。ヒト骨髄間葉系幹細胞では分離後に増殖、目的とする組織細胞に *in vitro* で分化させて移植、再生医療に供する方法が行われている。しかし自己の骨髄採取は患者への負担、年齢が高い場合や遺伝性疾患などからつねに自己の骨髄由来間葉系細胞を用いることは難しい。非自己（アロ）細胞が移植可能になれば適応は飛躍的に拡大すると考えられ、臍帯血から間葉系細胞を回収して分化誘導することで安全性の高い細胞ソースに成りうると考えられる。臍帯血由来間葉系幹細胞も骨髄と同様な手法が可能と考えられるが臍帯血に多分化能を有する間葉系幹細胞の存在には相反する報告出されていた。しかし最近では臍帯血の 20-40% の確率で得られるという報告が多いが、臍帯血由来間葉系幹細胞の効率的な採取に関する研究は少ない。臍帯血由来の細胞はドナーへの負担や危険性がなく、また間葉系細胞の免疫源性も低いとされる。我々はこれまで臍帯血の提供時に得られる胎盤から、胎盤絨毛組織由来間葉系細胞（胎児側）の分離法を確立し、*in vitro*、*in vivo* において胎盤由来間葉系細胞の骨、軟骨、脂肪細胞、神経系細胞への分化誘導能を調べてきた。今回、臍帯血中の間葉系幹細胞を効率に分離するための条件を検討し、間葉系幹細胞の分化誘導能、特に骨・軟骨への分化誘導能を調べた。さらに、免疫特性に注目し、臍帯血由来間葉系幹細胞の骨・軟骨の再生医療におけるアロ移植のための細胞ソースとしての可能性を調べた。

### A. 研究目的

我々は間葉系幹細胞のソースとして、臍帯血に注目し、臍帯血中の間葉系幹細胞を効率に分離するための条件を検討し、その分化誘導能、特に骨・軟骨への分化能について調べた。さらに、免疫特性にも注目し、臍帯血由来間葉系幹細胞の骨・軟骨の再生におけるアロ移植の細胞ソースとしての可

能性を調べた。

### B. 研究方法

臍帯血由来間葉系幹細胞の分離は、異なる量および異なる採取時間の臍帯血から Ficoll-Paque™ を用いた遠心分離法により単核細胞を分離し、 $>2 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> で通常の組織培養皿に播種し、DMEM（低グル

コース) + 20% FBS + 0.1  $\mu$ M デキサメサゾンにより培養した。増幅した細胞を FACS により抗原解析した。分化能は Pittenger ら (Science 284, 143-147, 1999) の方法により骨、軟骨、脂肪に分化誘導を行った。実験動物での骨または軟骨再生実験について、細胞をコラーゲンスポンジ、または  $\beta$ -TCP に包埋した。1 週間誘導培養後、5 週齢のヌードマウス皮下に移植し、骨は 8 週間、軟骨は 3 週間後移植片を摘出し解析を行った。免疫寛容の実験は mitogen (PHA または ConA) により処理したヒト末梢血由来リンパ球と臍帯血由来間葉系幹細胞と共培養し、活性化したリンパ球の増殖について  $^3$ H-チミジンの取り込みにより検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は実地に際して「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、その内容を本研究所倫理審査委員会に申請し、審査承認を受けている。研究に用いる臍帯血は本研究施設と資料譲渡契約と結んでいる採取医療機関 1 施設 (東京臍帯血バンク採取医療機関) において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で分娩後に採取している。分娩後の採取のため、採取に際してドナーの安全性は完全に確保されている。また、研究に用いる臍帯血は東京臍帯血バンクより細胞数等の面から移植用としては適さない臍帯血について、ドナーの同意を得た上で提供を受けている。なお、提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認を受けている。また、採取に

際しては、東京臍帯血バンクにおいてドナーに対して問診および家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴のあるドナーからの臍帯血の採取は行わない。臍帯血は東京臍帯血バンクにおいて感染症検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診および家族歴等の個人情報 は東京臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処置を講じている。以上より、提供を受けた試料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に研究従事者の安全性も確保されている。

### C. 研究結果

臍帯血の容量 > 60 g、採集後から分離までの時間が 5 時間以内のサンプルにおいて、コロニーを形成する間葉系細胞の回収率約 70% 得られた。そのコロニーから増幅させた細胞集団について FACS により細胞表面抗原を解析したところ、CD29、CD44、CD49e、CD73、CD90、CD105、CD166 が陽性および CD14、CD31、CD34、CD45 が陰性反応を示し、一般的に知られている間葉系幹細胞マーカーを発現している細胞集団であった。骨、軟骨、脂肪への分化誘導について検討したところ、骨、軟骨には分化しやすいが脂肪には分化しにくい傾向がみられ、臍帯血サンプルによっては多分化能を保持していない細胞集団もあった。骨再生動物モデル実験において、移植後 8 週目での移植片を HE 染色したところ、正常な骨組織と同じ微細構造をもつ新生骨を形成することが確認された。軟骨再生動物



モデル実験では移植後 3 週目で白く堅い組織が形成された。その組織のパラフィン切片を作製しトルイジンブルー染色したところ、トルイジンブルーにより赤紫色に染色され、円形の軟骨様細胞がみられた。また、軟骨細胞マーカーのタイプ II コラーゲンに対する抗体により免疫染色したところ、円形の軟骨様細胞の周囲に陽性反応が示された。これらの結果から、臍帯血由来間葉系幹細胞はヌードマウス皮下環境において軟骨細胞への分化が増強されることが明らかになった。

免疫寛容実験に関しては、臍帯血由来間葉系幹細胞を PHA 刺激ヒト末梢血由来リンパ球に添加し、そのリンパ球増幅を濃度依存的に抑制し、ConA 刺激、混合リンパ球培養試験でも同様な抑制効果を示した。

#### D. 考察

臍帯血由来間葉系幹細胞の最適な採取に関わる要因、時間、容量条件が得られた。また骨、軟骨細胞へ分化しうる細胞が存在していること、特に軟骨細胞への分化能が高いことが明らかになった。アロ移植ではドナーとレシピエント間で組織不適合により GVHD などの拒絶反応が起きる。この拒絶反応を軽減させる方法として免疫寛容を誘導する必要がある、間葉系幹細胞が免疫寛容を誘導することが報告されている。我々は、骨・軟骨再生のアロ移植のための細胞ソースとして考えられる臍帯血由来間葉系幹細胞が免疫寛容を誘導できるかについて、mitogen (PHA または ConA) によ

り刺激したリンパ球と臍帯血由来間葉系幹細胞との共培養系によるリンパ球の増殖能を評価したところ、活性化リンパ球の増殖能は著しく低下した。このことから、臍帯血由来間葉系幹細胞は免疫寛容を誘導することが可能であり、臍帯血由来間葉系幹細胞から分泌される何らかの活性化リンパ球の増殖抑制因子によることが示唆された。

今後、in vivo での詳細な実験を追加するとともに、臍帯血間葉系幹細胞をコンスタントに得て凍結保存するシステムを開発し、臍帯血バンクシステムを利用し臍帯血中の間葉系幹細胞が再生医療にも有効にもなりうるべく検討をすすめていく予定である。

#### E. 結論

臍帯血には間葉系幹細胞が存在するが、その分離には臍帯血の採取量や採取から細胞分離までの時間が重要であることを示した。臍帯血由来間葉系幹細胞は、骨、軟骨細胞に分化能を有しているおり、免疫寛容を誘導する可能性も示唆され、骨・軟骨再生の細胞ソースの一つとして期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

高橋恒夫、張曉紅、伊倉宏一. 臍帯血と胎盤組織由来細胞を用いた再生医療の可能性。ティッシュエンジニアリング 2006. 田原泰彦、岡野光夫 (編)。日本組織工学会監修。

日本医学館（東京）、pp175-186, 2006.

Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K,  
Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA.

Mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun. 340, 944-952, 2006.

Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Mitsuru A, Bai Y, Ogia K, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A, Takahashi TA. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. Biochem Biophys Res Commun. 351, 853-859, 2006.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

---

8. アロ移植における免疫寛容誘導の分子機構に  
関する研究

加藤 玲子

幹細胞を用いた細胞組織医療機器の安全性評価に関する研究  
—間葉系幹細胞の免疫制御(寛容)システムに関する研究—

分担研究者 加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells : MSC) はその多分化能を有することと免疫調節性の性質から組織の修復・再生だけでなく免疫制御性の細胞治療において前途有望なツールになると期待されている。しかしながら、未だに免疫調節性の詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト(マウス)間葉系幹細胞 (hMSC, mMSC) の免疫抑制作用について *in vitro* の系で検討した。

まず、hMSC が T 細胞の活性化を抑制することを検証するため、T 細胞を活性化させた状態 (1 : アロ免疫応答、 2 : mitogen による刺激) に hMSC を共培養したもの、しないものの両方で増殖アッセイおよびサイトカイン (IL-2, IFN- $\gamma$ ) の測定を行った。その結果、hMSC はいずれの T 細胞活性化の経路においても、T 細胞の増殖を抑制することが確認された。一方、サイトカインの産生に関しては、mitogen の刺激による T 細胞の活性化における IL-2, IFN- $\gamma$  の産生は既知の報告と同様に hMSC により抑制されることが確認できた。しかしながら、アロ免疫応答の際の IL-2 の産生は hMSC により促進されるとの報告があるのに対して本研究では抑制されるという結果を得た。さらに hMSC はアロ免疫応答の際の IFN- $\gamma$  の産生を促進することが示された。本研究ではマウスの T 細胞の活性化の系にヒトというゼノ (異種) の MSC が種の壁を越えて T 細胞の増殖を抑制することを確認できたが、サイトカインの産生に関しての結果の相違はその系の違いを反映している可能性が考えられた。そこで同様の実験をマウスの MSC で行ったところ、活性化 T 細胞 (アロ免疫応答、mitogen 刺激共に) の細胞増殖の抑制、および IL-2, IFN- $\gamma$  の産生の減少がみられた。このことから、アロ反応時における活性化 T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生に対する MSC の影響は、ヒトとマウスで異なっている可能性もあるし、ゼノの系の場合にみられる現象なのかもしれない。今後、この違いを検討する必要がある。一方、MSC の活性化 T 細胞への抑制効果は液性因子の関与が示唆されていることから、高分子量、低分子量の各分画で、抑制効果がみられるか検討したところ、低分子量の分画で抑制効果がみられた。分子量から候補因子の一つとしてプロスタグランジン E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) が候補因子と考えられたので、その合成酵素のインヒビターを用いて PGE<sub>2</sub> の合成阻害を行ったが MSC による活性化 T 細胞の抑制 (細胞増殖、サイトカインの産生) に影響はなかった。このことは MSC による活性化 T 細胞の抑制には PGE<sub>2</sub> はほとんど関与していないことを示唆する。今後、定常状態の MSC と活性化 T 細胞と共培養した MSC 間で DNA マイクロアレイ解析や、その両者間の上清中のタンパク質の比較解析を行うことで、MSC の免疫制御 (寛容) システムに関する分子メカニズムを解明する予定である。

## A. 研究目的

MSCは骨髄、脂肪細胞、歯根膜、頭皮細胞といった成人の組織からだけでなく胎盤、臍帯血、胎児の種々の細胞などから単離することができ、しかも *ex vivo*(生体外)で培養し増幅できる。さらに複数の間葉系(骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞)だけでなく、非間葉系(神経前駆細胞、肝細胞)の系譜の細胞に分化可能であることから、再生医療へのMSCの応用が期待されている。

その一方で、MSCはそれ自身の免疫原性が低だけでなく、様々な免疫エフェクター細胞(T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞)の機能に影響を及ぼすことが示されてきており、免疫反応に関わる種々の疾患の治療へのMSCの応用も期待されるようになってきている。それにもかかわらず、観察されている現象の根底にある分子基盤の解明は未だになされていない。MSCを細胞利用した治療に利用していく上でMSCの機能とそのメカニズムを明らかにすることはその有効性、安全性の面からも必須であり今後の課題である。

そこで本研究では、今年度、MSCの免疫抑制作用について *in vitro* の系で検証し、その分子メカニズムに関わる因子の探索を試みた。本研究の最終目標は、MSCの免疫制御システムの分子メカニズムを解明し、免疫応答の制御法の確立を目指すことである。

## B. 研究方法

### 1 活性化T細胞への間葉系幹細胞の免疫抑制効果についての検証

### 1) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞:hMSC (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.) は Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS) を加えた培地で培養した。

マウス間葉系幹細胞:mMSC; KUSA-A1 (RIKEN Cell Bank) は POWEREDBY10(MED-SHIROTORI) で培養した。

マウス splenocyte は日本チャールズリバー(株)より購入したC3H(H-2k)の脾臓をすりつぶし、溶血させた後1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)に懸濁したものを実験に用いた。

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)は日本チャールズリバー(株)より購入したBALB/c(H-2d)から骨髄細胞を回収し、溶血させた後GM-CSFを入れた1% FBS /Advanced PRMI (GIBCO)で一日おきに培地交換をし、培養6日目にLPSで刺激を与え、洗浄しガンマセル40イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

### 2) T細胞の活性化

#### I : Mixed Lymphocyte culture Reaction (MLR)

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes と BMDC を共培養した。

#### II : Mitogen による刺激

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes をまき

##### a)PMA, ionomycin

## b) ConA

のいずれかで刺激した。

## 3) 活性化 T 細胞と MSC の共培養

### a) MLR の場合

各ウェルに hMSC もしくは mMSC をまき張り付いたのを確認してからガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂を阻害した。

### b) Mitogen 刺激の場合

hMSC, mMSC とともに各ウェルに播種し、a と同様に細胞分裂を阻害した。

## 4) 細胞増殖測定

培養 3,4 日目に各ウェルに  $[^3\text{H}]$ -Thymidine を加え培養した。Thymidine の取り込みは細胞をガラスフィルターに吸着させた後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 5) サイトカイン測定

培養 3,4 日目に細胞上清を回収し、各種サイトカインの測定をするまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。サイトカインの測定は Mouse IL-2 および Mouse IFN- $\gamma$  (DouSet ELISA Development kit: R&D SYSTEM)で行った。

## 2 抑制に関わる因子の探索

### 1) 培養上清の分画

PMA と ionomycin で刺激したマウス splenocytes と mMSC を 3 日間共培養した上清を  $0.22\ \mu\text{m}$  のフィルターをかけた後、遠心式フィルターを利用して粗分画した。

2) 1 で分画した上清を PMA と ionomycin で刺激したマウス splenocytes の系に添加し、2 日間培養した。2 日目に細胞増殖とサ

イトカインの測定を行った。

## 3 PGE<sub>2</sub> 合成阻害

アロ抗原刺激および Mitogen 刺激による活性化 T 細胞と mMSC の共培養の系に NS-398 (Cox-2 inhibitor) および indomethacin (Cox-inihibitor) を添加した。

## C. 研究結果

### 1 活性化 T 細胞への間葉系幹細胞の免疫抑制効果についての検証

マウスの MLR での細胞増殖をヒトの MSC が抑制するとの報告 (Blood,2003;102, 3837-44) があったので、その真偽について 3 ラインの hMSC を用いて細胞増殖だけでなくサイトカインの産生への効果の確認を行った。その結果、hMSC は MLR および Mitogen 刺激による活性化 T 細胞 (マウス由来) の細胞増殖を抑制できることが確認できた。一方、サイトカインの産生は MLR および Mitogen 刺激ともに IL-2 の産生量が hMSC と共培養することで減少していたが、IFN- $\gamma$  の産生量に関しては Mitogen 刺激の場合は減少していたが、MLR の場合は逆に増加させていた。マウスの MSC で同様の実験を行うと MLR でも Mitogen 刺激の場合でも細胞増殖抑制はもちろん IL-2 だけでなく IFN- $\gamma$  の産生量の減少が観察された。

## 2 抑制に関わる因子の探索

活性化 T 細胞と mMSC の共培養の上清を粗分画して、それぞれの分画に抑制効果がみられるか検討した結果、低分子量の分画に活性化 T 細胞の増殖およびサイトカインの産生を抑制する効果があることが分かった。

## 3 PGE<sub>2</sub> 合成阻害による MSC の抑制効果への影響

各種インヒビターを用いて PGE<sub>2</sub> 合成阻害をして、mMSC の活性化 T 細胞の増殖抑制効果および IL-2, IFN- $\gamma$  の産生量の減少にほとんど影響を与えなかった。

## D. 考察

複数の hMSC (ヒト由来) でマウスの MLR および Mitogen 刺激による活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制できたことから MSC による抑制の普遍的なメカニズムは種のバリアを超えているかもしれないことが示唆される。一方、サイトカインの産生に関しては Mitogen 刺激による活性化 T 細胞からの IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生量は mMSC であろうと hMSC であろうと減少させていたが、MLR による IFN- $\gamma$  の産生量は mMSC は減少させたのに対して hMSC は増加させていた。(IL-2 はいずれも減少させていた。) この違いは、マウスの系にヒトの MSC を共培養させたゼノの系であったためなのか、それともマウスの MSC とヒトの MSC の本来の性質の違いであるのか

今回の結果からは判断できない。ただし、今回のマウスの活性化 T 細胞に対する抑制効果はマウスの MSC の方がヒトの MSC よりも強かった。(予備実験より) もしかすると、サイトカインの測定のタイミングをもう少し早くするとマウスの MSC でも IFN- $\gamma$  の産生量を上げている可能性もある。これは今後検討する予定である。

抑制に関わる液性因子の探索の結果、低分子量の分画に活性化 T 細胞の増殖およびサイトカインの産生を抑制する効果があることが分かったが、この効果には PGE<sub>2</sub> はほとんど関与していないようであった。免疫細胞の抑制に Nitric oxide が関与しているとの報告もあり、MSC の抑制効果での NO の関与も検討する必要がある。

## E. 結論

アロ抗原および Mitogen 刺激により活性化されたマウス Splenocyte (主に T 細胞) の細胞増殖は同種である mMSC だけでなく異種の hMSC でも抑制されることが確認された。mMSC による活性化 T 細胞からの IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生は、その刺激がアロ抗原であろうと Mitogen であろうと抑制された。一方、hMSC は Mitogen 刺激による活性化 T 細胞からの IL-2 および IFN- $\gamma$  の産生は抑制していたが、アロ抗原による刺激の際は IL-2 は抑制していたが IFN- $\gamma$  は産生量の増加がみられた。この mMSC と hMSC での違いを検討する必要がある。

Mitogen 刺激したマウス Splenocyte と mMSC の共培養の上清の粗分画の実験か

ら低分子量の分画に MSC が活性化 T 細胞の抑制に関与する液性分子が存在することが示唆された。その候補の一つとして PGE<sub>2</sub> が考えられたが、その合成阻害をしても MSC による活性化 T 細胞の抑制(細胞増殖、サイトカインの産生)にほとんど影響を与えなかったことから、別の因子が関与している(もしくは組み合わせで)と考えられる。今後、定常状態の MSC と活性化 T 細胞と共培養した MSC 間で DNA マイクロアレイ解析や、その両者間の上清中のタンパク質の比較解析を行うことで、MSC の免疫制御(寛容)システムに関する分子メカニズムを解明する予定である。細胞を利用した治療に MSC を利用していく上で MSC の機能とそのメカニズムを明らかにすることはその有効性、安全性の面からも必須であると思われる。

## F. 研究発表

### 2. 学会発表

加藤玲子、土屋利江「間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)の免疫免疫制御システムに関する研究」第 6 回日本再生医療学会 (2006. 3)



---

## 9. 動物組織由来製品の安全性に関する研究

黒澤 努

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

—動物組織由来製品の安全性に関する研究—

分担研究者 黒澤努 大阪大学医学系研究科実験動物医学教室

医療機器に動物由来製品が使われているが、BSE等プリオン病の発見以来、医療機器の安全性の見直しが国際的に行われている。こうした安全性試験の国際的、国内的情報を獲得し、解析し、国内外研究機関に流布する。

A. 研究目的

再生医療に使用される原材料中の BSE やウイルス汚染などの感染因子の国際標準化に関する研究を行う。

B. 研究方法

わが国の生物由来製品に関連する科学的見地にたった規格を国際規格として提案し、国際調和に貢献する。また、動物組織安全性に関する国際委員会である TC194SC1WG 2 で議論され文書化が進んでいる内容（動物ソース、収集、取り扱い）に関して調査研究を行い、わが国の規制との関係を明らかにする。

（倫理面への配慮）

本研究では情報の収集と研究機関への流布を目的としており、個人情報保護の観点で研究を進めた。

C. 研究結果

ISO/TC194 医療機器の生物学的安全性試験のうち、SC1 動物由来製品の安全性に出席するなどして情報を収集し、研究機関等に伝達した。

D. 考察

医療機器の開発は医学者、工学者が主にあたっている。残念ながらこうした研究者は医療機器の安全性試験についての十分な知識を持ち合わせていない事が多い。迅速に医療機器を開発し国民の健康と福祉を損新させるためには、関連の国際情報の収集が欠かせない。

本研究においてはこうした情報を獲得し、流布することにより、我が国の医療機器開発の推進が期待される。本年は情報の伝達を主に行ったが、やがてそれらの技術的確認を行う必要が出てくるものと思われる。

## E. 結論

医療機器開発における生物学的安全性試験の情報獲得と流布により一層の医療機器開発推進の基盤を構築できた。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特にない

2. 学会発表  
特にない

3. その他

ISO/TC194 医療機器の生物学的安全性試験国内委員会において収集した情報を審議し、我が国の専門家と意見を調整のうえ、我が国の主張を ISO/TC194 に提案した。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特にない

2. 実用新案登録  
特にない

3. その他  
特にない

### III 研究成果の刊行に関する一覧表