

果を評価し、その有用性を検討することを試みた。

B. 研究方法

動物実験は、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skMBを単離、培養した。skMB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。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成し、急性期に細胞移植を施行した。移植細胞 5×10^6 個をハッ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SKMB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SKMB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。細胞移植による免疫応答は処置後0、1、4、7、28日の左心室組織におけるIL2RおよびIFN γ の転写量を定量RT-PCRで解析した。移植細胞数の推移は処置後0、1、4、7、28日の左心室組織における雄性特異的遺伝子の定量PCRで算出した。細胞移植後14日で左室拡張末期径(LVDD)、左室収縮末期径(LVDs)

を心臓超音波で測定し、以下の式から左室駆出率(LVEF)を算出した。

$$LVEF(\%) = (LVDD^3 - LVDs^3) / LVDD^3 \times 100$$

C. 研究結果

1. アロ筋芽細胞移植の免疫原性に関する検討

skMBはRT1A陽性、RT1B陰性、CD80弱陽性、CD86陰性で、インターフェロングamma(IFN γ)刺激によりRT1Aの発現増強およびRT1Bの発現を認めた。CD80、86の発現は変わらなかった(Figure 1)。

細胞移植部位へ免疫担当細胞の浸潤程度を評価するために、直接的な指標であるインターロイキン受容体(IL2R)および間接的な指標であるIFN γ について経時的に定量RT-PCRを行った。移植後7日のA群においてIL2R、IFN γ ともに顕著な発現の上昇を認めた(Figure 2)。

2. 心筋梗塞移植部位におけるアロ筋芽細胞数

心筋梗塞の左室組織における移植細胞数は、移植後15分(day 0)ではA群およびS群と同程度であるが、その後1、4、7、28日でいずれもA群はS群と比して有意に低い値であった。移植後28日でA群のドナー細胞は検出限界以下であった(Figure 3)。

3. 心筋梗塞急性期に対するアロ細胞移植の治療効果

S群においてC群と比してLVDs、LVDDが小さい傾向をみとめたが、A群においてはC群と比して有意に大きかった。EFはS群において移植後4週から高い傾向を認め、移植後8週で有意に高かったが、A群

では C 群と同程度であった。

4. 心筋梗塞に対する FK506 投与

心筋梗塞ラットに対し FK506 を投与したところ、C 群と比して顕著な左室内腔拡大および EF の低下を認めた。

D. 考察

skMB は MHC 分子 (RT1A、RT1B) を発現し、かつ B7.1 を発現することから免疫応答を惹起しうる細胞であることが示唆された。アロ skMB 移植実験により、活性化 T 細胞のマーカーである IL2R の発現上昇を認めたことから、アロ skMB 移植により免疫拒絶反応を惹起したことが示唆された。

心筋梗塞部における移植 skMB 数を経時的に測定した。移植直後の 0 日では A 群の検出細胞数は S 群と同程度であるが、移植後 1 日以降は有意に低く脱落が早いことが示唆された。

心機能評価より A 群は心機能増悪抑制効果を有しないことが示唆された。

以上よりアロ skMB 細胞は免疫原性を有し、心筋梗塞急性期に対する細胞移植において、免疫拒絶を惹起すること、その結果移植細胞の脱落が早く、治療効果が無いことが示唆された。また、FK506 投与により心機能が著しく増悪したことから虚血性心不全に対するアロ細胞移植療法における使用は慎重に検討する必要がある。

E. 結論

心筋梗塞急性期における骨格筋筋芽細胞移植において同種他家細胞の有用性を認めず、今後慎重に検討する必要があるこ

とが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

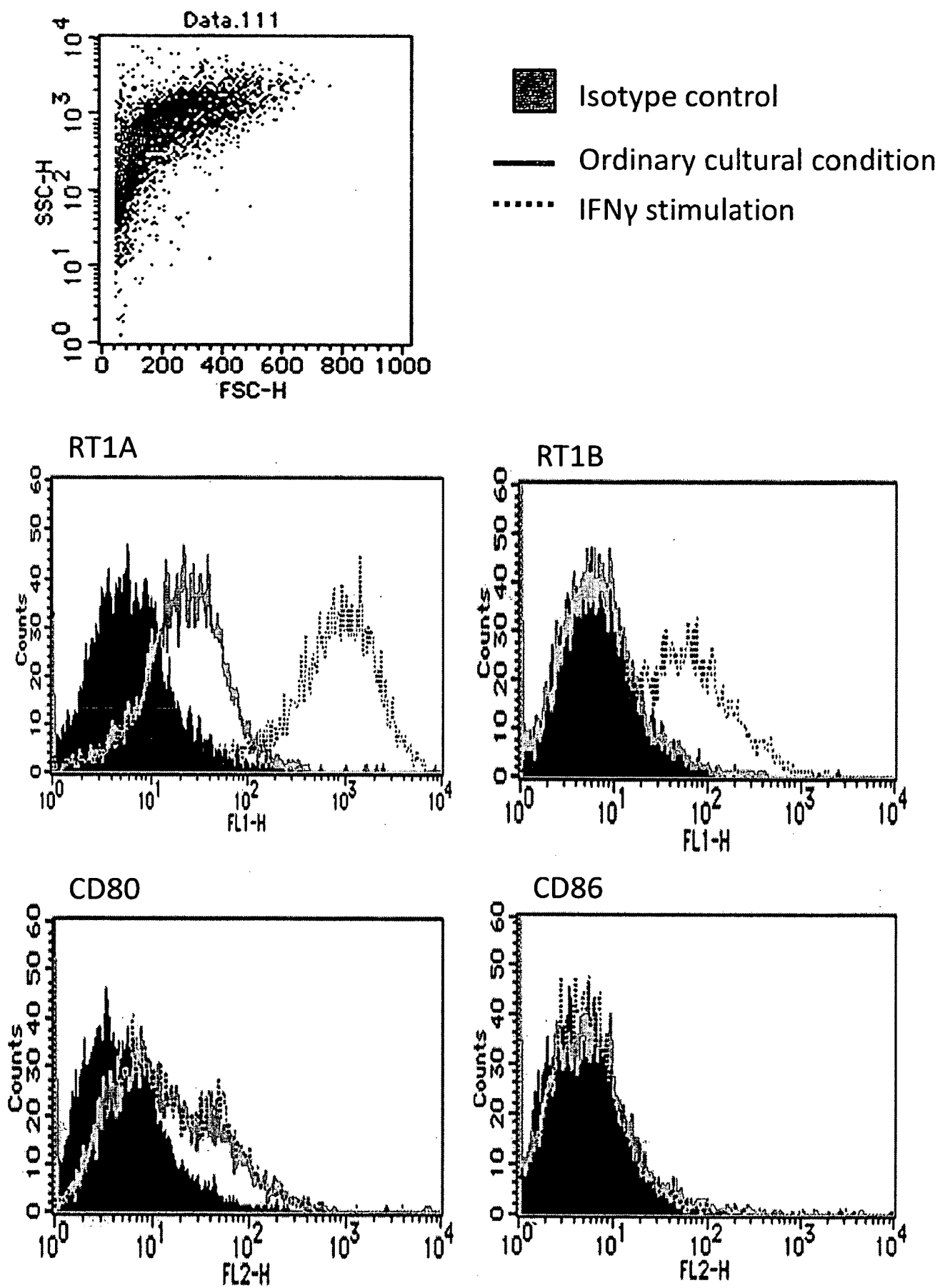


Figure 1. Immunity of a transplanted cell based on expression of cell-surface molecules

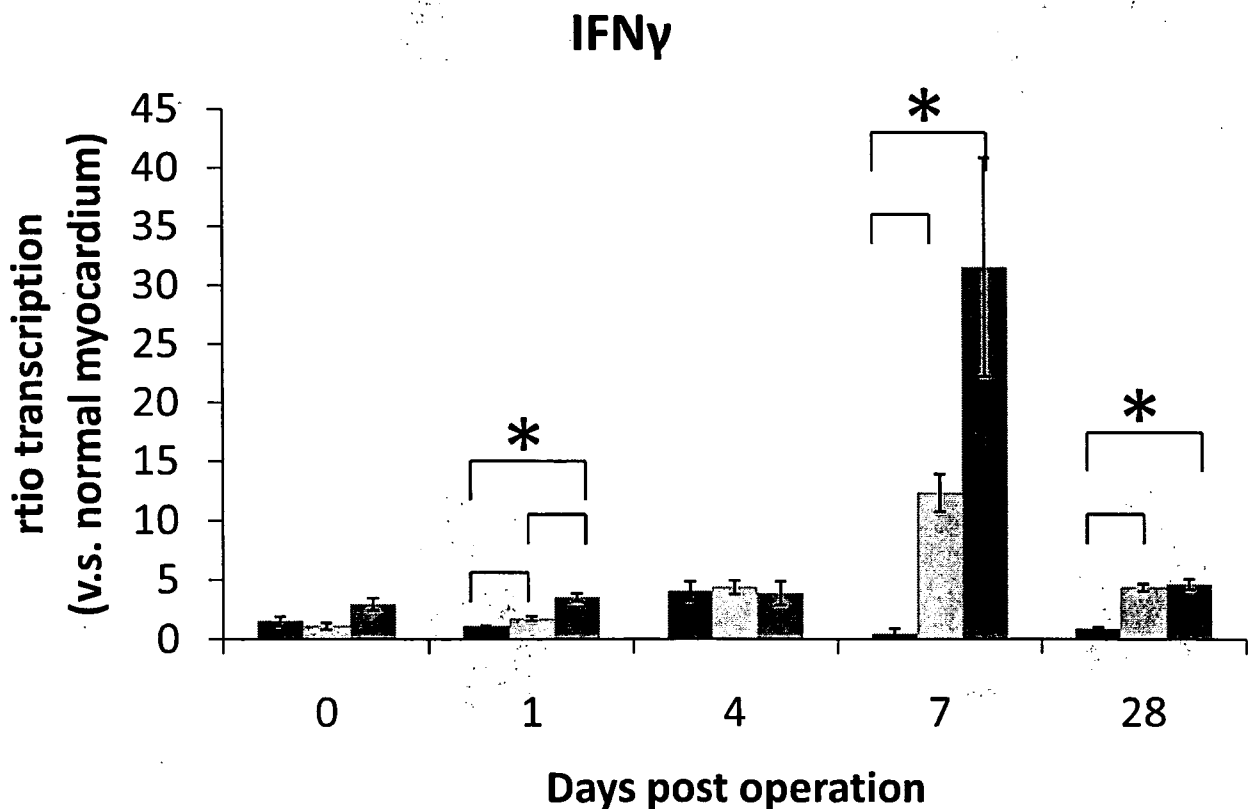
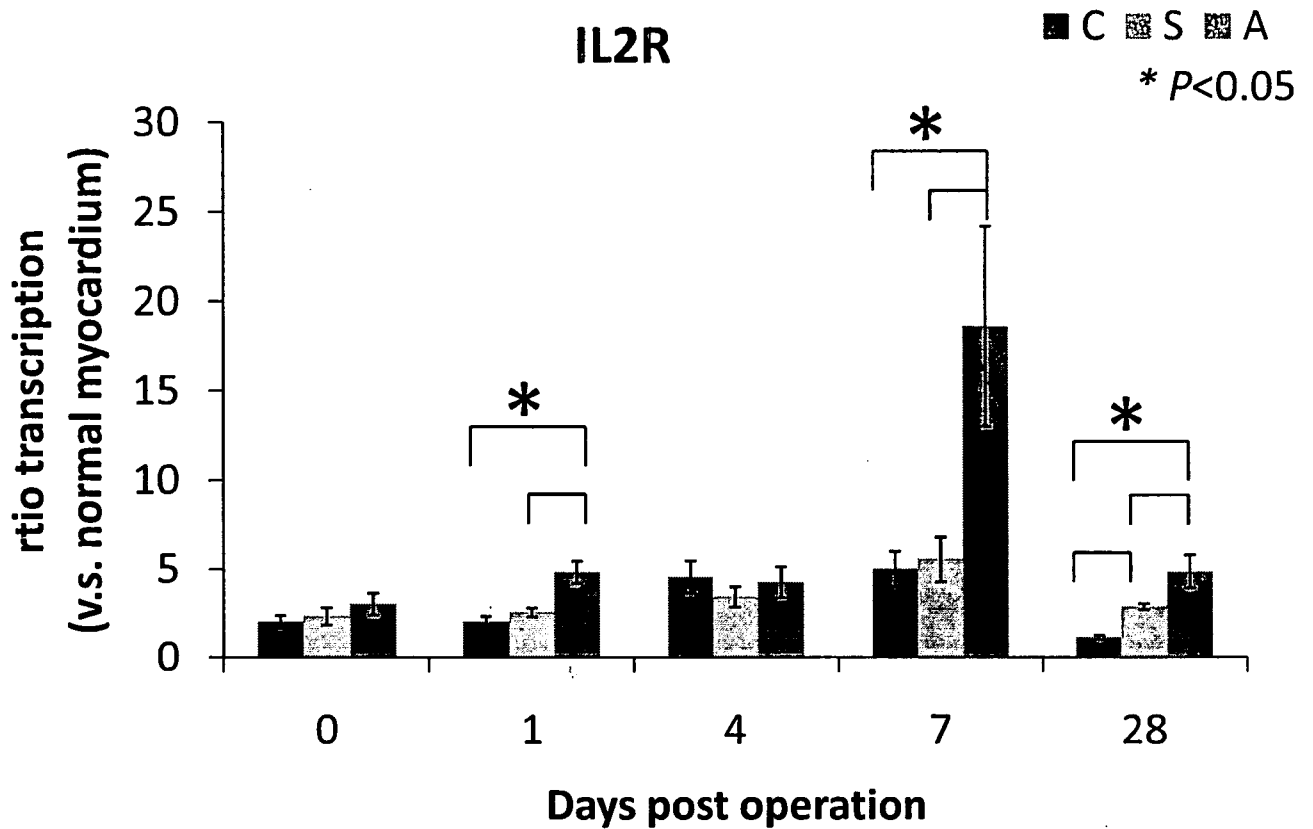


Figure 2. Serial transcriptional levels of IL2R and IFN γ in the recipient hearts. Data was showed as mean \pm sem. * $P < 0.05$

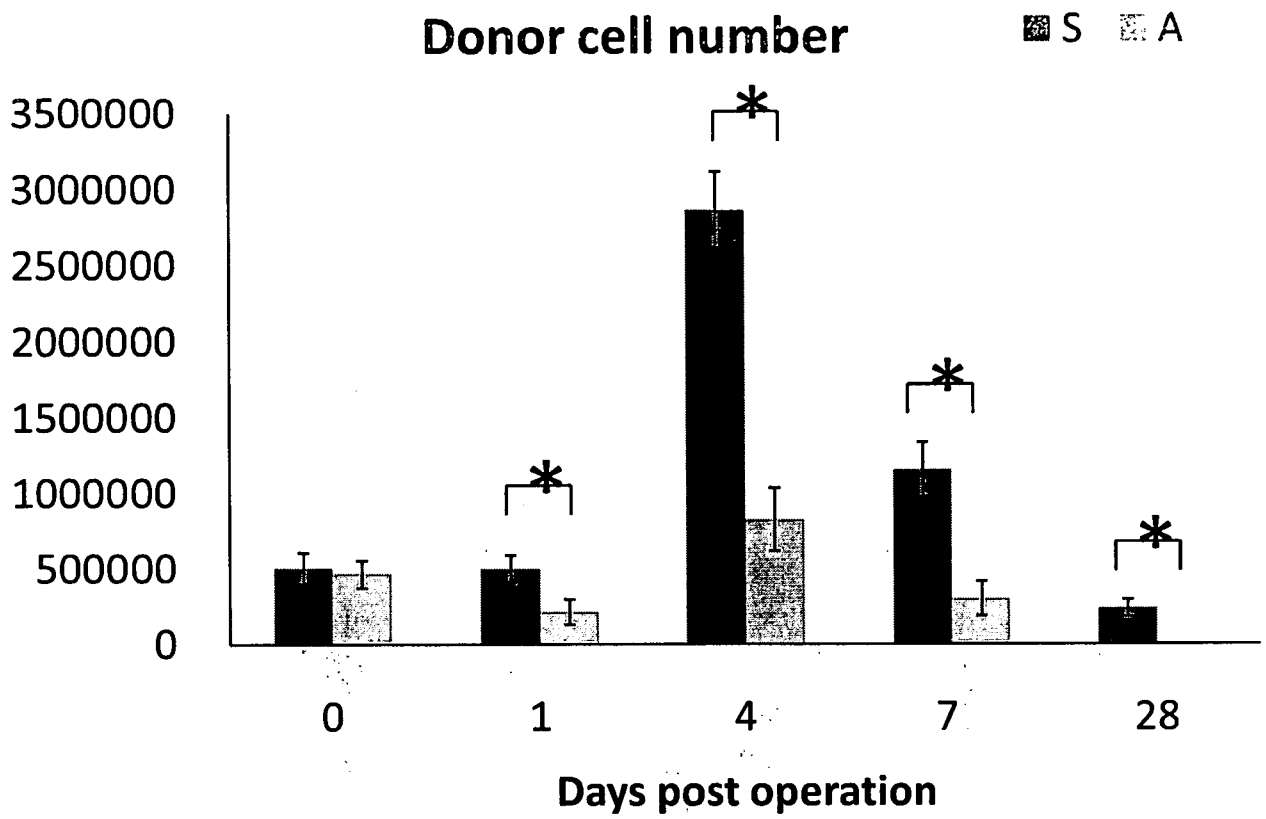


Figure 3. Serial analysis of the number of transplanted cells in recipient hearts. Data was showed as mean +/- sem. * $P < 0.05$

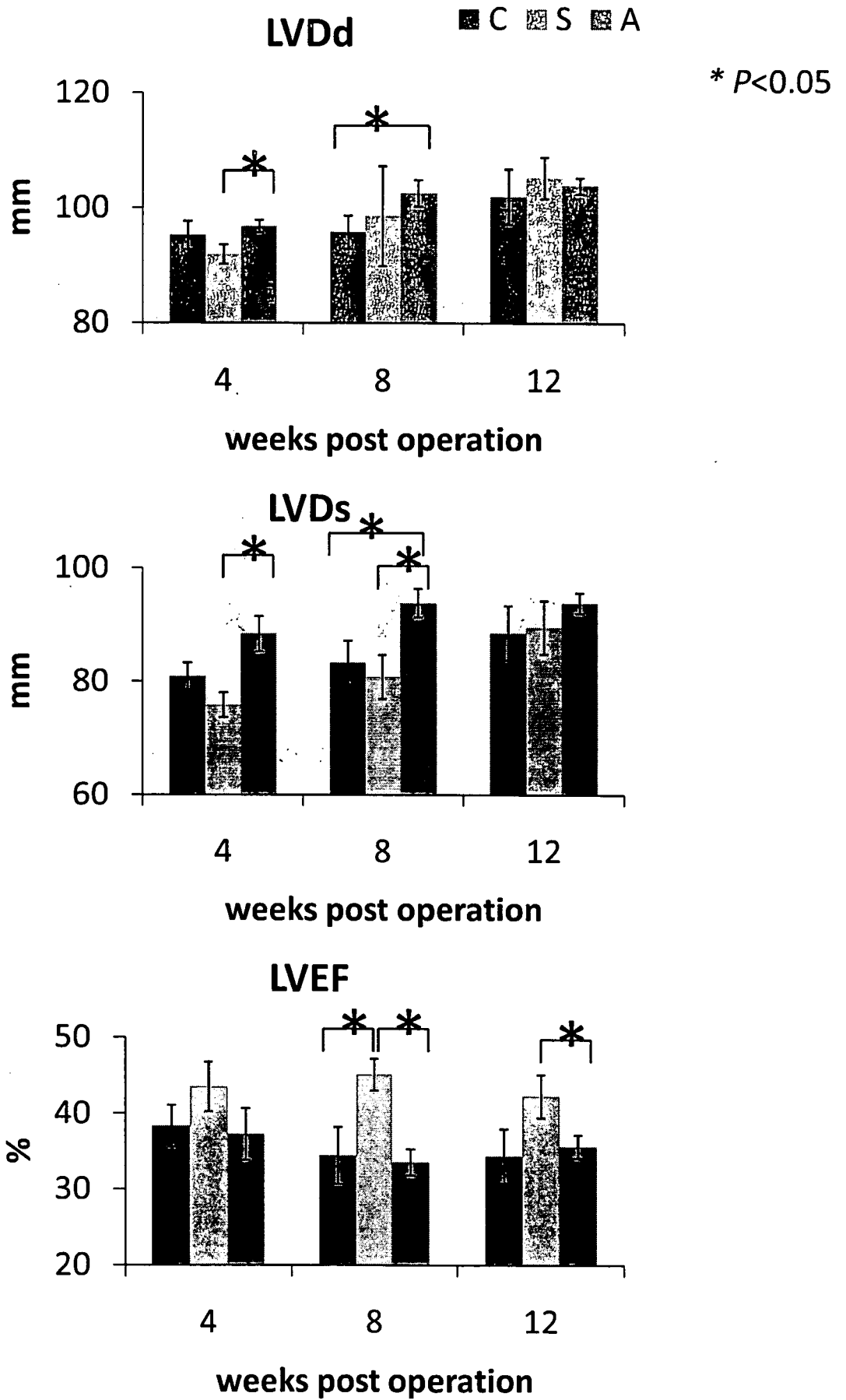


Figure 4. Evaluation of cardiac performance. Data was showed as mean +/- sem. * $P < 0.05$

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、培地工程、凍結保存等の

高い安全性確保技術の開発)

高橋 恒夫

厚生労働科学研究費補助金（土屋班）

分担研究報告書

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・客員教授

研究要旨

臍帯血中の間葉系幹細胞が安全性の高い非自己の細胞ソースに成りうるか、細胞を分離、分化誘導してその可能性を探る研究を進めてきた。これまでの研究において、臍帯血から間葉系幹細胞の単離、増殖法を確立し、それにより得られた細胞は線維化細胞の形態を示し、骨髄細胞と同じ間葉系細胞の表面マーカーを持っていた。またその細胞の軟骨、骨細胞へ分化能を *in vitro* 及び *in vivo* で確認した。しかし臍帯血由来間葉系幹細胞の分離は骨髄由来間葉系細胞より低く、また継代を重ねた細胞が形質転換する可能性は調べられていなかった。今回われわれは臍帯血から間葉系幹細胞を効率良く分離するための条件を調べ、生体内の環境に近い低酸素での培養も検討した。臍帯血由来間葉細胞の安全性に関して、増殖した細胞の安全性について、核分析法を用いて染色体異常を引き起こす可能性について検討した。臍帯血由来間葉系幹細胞は軟骨細胞への分化能が高く、軟骨への分化と関連する遺伝子の発現を検討した。さらに、細胞の免疫抑制能に関しては、活性化したヒト末梢血リンパ球と共培養し、そのリンパ球細胞増殖抑制能を他の細胞と比較した。これらの検討の結果、臍帯血由来間葉系幹細胞が再生医療における非自己の間葉系幹細胞ソースとしての可能性が示唆された。

A. 研究目的

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いる。臍帯血から間葉系幹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なりうると考えられる。最近臍帯血の 20-40% の確立で得られるという報告が多いが、われわれは臍帯血由来間葉系細胞を効率的に得るには採取から分離までの時間と臍帯血の容量に影響をうける結果を得た。今回われわれは臍帯血から間葉系細胞の単離と増殖を生体内の環境に近い低酸素条

件で培養を検討した。また、分化に関する遺伝子と免疫特性に関して骨髄、脂肪由来間葉系細胞と比較した。さらに、臍帯血由来分離増殖した細胞の安全性の指標として、増幅細胞の核分析を行った。

B. 研究方法

臍帯血は移植に不適な臍帯血のインフォームドコンセントを得て使用した。臍帯血をフィコールに重層し、比重遠心後に単核球層を回収した。WBC の数が 2×10^8 以上の場合は 2 枚の 100mm シャーレ上に接種し、20% と 5%

酸素の培養条件でそれぞれ培養した。WBC の数が 2×10^8 以下の場合、1 枚の 100mm シャーレに接種し 5 % 酸素条件下で培養した。培養 3-4 週間後、形成コロニーを回収して計数後、増殖細胞の形態を観察し、5 % 酸素濃度で単離、増殖した細胞は *in vitro* での骨、軟骨分化能を調べた。また、臍血由来間葉系細胞は分化に関連する遺伝子発現を RT-PCR で調べ、骨髄および脂肪由来間葉系細胞と比較した。

免疫抑制能については、マイトジェン (PHA) で処理したヒト末梢血由来 T 細胞と臍血由来間葉系細胞と共培養し、活性化した T 細胞の増殖を ^3H -チミジンの取り込みにより調べた。さらに、増殖した細胞の安全性を確認するために、20 から 40 PDL まで増殖した細胞の核分析を行い染色体異常の有無を調べた。

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の規定において細胞数等の面から移植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

5 % 酸素の培養条件で培養した場合、コロニーを形成する間葉系幹細胞の回収は採取した臍帯血ユニットの 42% から可能であり、20% 酸素の通常の培養条件に比べやや高い傾向が見られた。また同じ臍帯血ユニット由来の間葉系細胞では 5 % 酸素培養は 20% 培養より良く増殖した。この 5 % 酸素の培養条件で得られ細胞は *in vitro* での骨、軟骨細胞へ分化能も維持していた。臍帯血由来間葉系細胞の分化に関わる遺伝子発現は Oct4, Runx-2, PPAR- γ 1, BMP receptor, Smad などは骨髄あるいは脂肪由来間葉系細胞と同様に発現していたが、臍帯血由来間葉系細胞は軟骨細胞分化関連遺伝子 SOX9 の発現は高かった。免疫寛容実験において、臍帯血由来間葉系細胞は骨髄あるいは脂肪由来間葉系細胞と同様に PHA 刺激リンパ球に添加、間葉系細胞はリンパ球増幅を濃度依存的に抑制し、また ConA 刺激、混合リンパ球培養試験でも同様な増殖抑制効果が示さ

れた。増殖間葉系細胞の安全性について 20 から 40 PDL まで増殖した間葉系細胞に染色体の異常は見られなかった。

D. 考察

低酸素培養条件は臍帯血由来間葉系細胞の単離と増殖へある程度影響するがわかった。また臍帯血由来間葉系細胞は骨髓由来細胞と同じように免疫抑制能を示し、長期間培養後細胞にも染色体の異常がみられなかった。また高い SOX9 の遺伝子発現はこの細胞が軟骨細胞へ分化しやすいことと関連する可能性が考えられた。今後 in vivo での分化能実験を追加するとともに、臍帯血間葉系細胞を恒常的に分離増幅し凍結保存するシステムを開発し、既存の臍帯血バンクを利用して臍帯血が再生医療におけるアロの細胞ソースにするよう検討をすすめていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhning HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, and Strom SC. Isolation and characterization of cell from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cell. Stem Cell. Online, Nov. 8, 2007.

2. 学会発表

Takahashi TA.

Mesenchymal stem cell derived from human placenta and cord blood. 2nd Korea Mesenchymal Stem Cell Symposium Nov. 2007 Seoul, Korea.

Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, and Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering.

International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. March 2007, Brescia, Italy.

Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Bai Y, Mitsuru A, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A, and Takahashi TA.

Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. March 2007, Brescia, Italy.

張曉紅、平井雅子、伊倉宏一、高橋恒夫.

ALDEFLUOR Kit による臍帯血の造血幹、前駆細胞の同定. 第 29 回日本造血細胞移植学会総会, p173 2007

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. 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—

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。本研究では間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子メカニズムを解明することに焦点を当て、その機能に関わる因子の同定を試みている。

昨年度ヒトの MSC (hMSC) がマウスの活性化脾臓細胞の増殖を抑制することを報告した。そこで今回、MSC の免疫抑制効果に関与する分子を探索する目的で、定常状態の hMSC (コントロール) とマウス脾臓細胞を活性化させた状態と共培養した hMSC (=抑制効果を発揮している hMSC) の間で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化のある遺伝子の同定を試みた。その結果、コントロールに対して抑制効果を発揮している MSC で発現が二倍以上になった遺伝子が数十個抽出されてきた。現在これらの詳細な解析を進めており、免疫抑制効果との関連性を検討している。

一方、MSC を再生医療の細胞ソースとして用いるには培養過程で異種動物由来である血清タンパク質の混入が少ない方がより安全であると考えられる。そこで、従来の 10% FBS 含有の培地と無血清培地での培養による比較を行い MSC の免疫抑制効果に変化がないかの確認を行ったところ、無血清培地で MSC を培養しても活性化 T 細胞の細胞増殖を抑制する機能は維持されていることが確認できた。この結果から特に臨床応用をめざした MSC の培養では無血清培地を使用することで、より安全で安定した品質の細胞を提供できるようになると考えられる。

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

が低いだけでなく、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。また MSC を臨床応用に用いる場合、より安全で安定した MSC を供給するためには培養過程で異種動物由来のタンパク質の混入は少ない方がよい。つまり無血清で培養できるにこしたことはないと考えられる。これまでの研究から hMSC を無血清で培養すると、10% FBS 含有培地培養と比べて、1：増殖促進効果、2：多分化能の維持（亢進）が確認されている。しかしながら MSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対して無血清培地がどのような影響を与えるかは調べられていない。そこで MSC を無血清培地で培養した際の MSC の免疫抑制効果に変化があるか検討した。

B. 研究方法

1 抑制に関わる因子の探索

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 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 で刺激を与え一晚培養した後、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)

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内でマウス splenocytes (2.5×10^6) と BMDC (4.125×10^5)を共培養した。

II：Mitogen による刺激

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内にマウス splenocytes (2.5×10^6) をまき、PMA, ionomycin (2.5 ng/ml, 125 ng/ml)で刺激した。

III：anti-CD3/anti-CD28 による刺激

6 well plate の各ウェルに culture inserts (NUNC 0.4 um pore size)を挿入し、insert 内にマウス splenocytes (2.5×10^6)をまき、anti-CD3/anti-CD28(2.5 ug/ml, 0.5 ug/ml)で刺激した。

3) 活性化 T細胞と hMSC の共培養

hMSC の前処理

6 well plate の各ウェルに hMSC (2.5×10^5)を播種し、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。その上に 2)の方法で活性化させた T細胞を

共培養させた。

4) RNA 回収

培養 3,4(MLR のみ)日目に、RNeasy (QIAGEN)を用いて RNA を精製した。

5) DNA マイクロアレイ解析

a: ハイブリダイゼーション

Agilent 社製 Whole Human Genome 4 x 44 を用いて行った。

b: データ解析

GeneSpring を用いて、コントロールに対して二倍以上発現の異なるものを抽出した。

2 無血培地の MSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討

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、もしくは STK2 培地 (ツーセル) 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 で刺激を与え一晩培養した後、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 (2×10^5)と BMDC (3.3×10^4)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 (1×10^5)をまき PMA, ionomycin (2.5 ng/ml, 125 ng/ml)で刺激した。

III: anti-CD3/anti-CD28 による刺激

96 well plate の各ウェルにマウス splenocytes (1×10^5)をまき anti-CD3/anti-CD28 (2.5 ug/ml, 0.5 ug/ml)で刺激した。

3) 活性化 T 細胞と hMSC の共培養

hMSC の前処理

96 well plate の各ウェルに hMSC を播種し、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。その上に 2)の方法で活性化させた T 細胞を共培養させた。

4) 細胞増殖測定

培養 2,3,4 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 2,3,4 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℃で保存した。サイトカインの測定は Mouse IL-2 および Mouse IFN- γ (DouSet ELISA Development kit: R&D SYSTEM)で行った。

C. 研究結果

1. 抑制効果に関わる因子の探索

これまでに、MSC の免疫抑制効果には液性因子が関与しているという報告と、細胞間の相互作用が関係しているとの報告があるが、今回は液性因子による抑制効果に着目して解析を行っていった。MSC の活性化 T 細胞に対する抑制効果は MSC と T 細胞の種が異なる場合でも維持されていることを昨年の研究により確認済みであったので、定常状態の hMSC (コントロール) とマウス脾臓細胞を活性化させた状態と共培養した hMSC (=抑制効果を発揮している hMSC) の間で DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量に変化のある遺伝子の同定を試みた。GeneSpring を用いてコントロールに対して抑制効果を発揮している MSC で発現が二倍以上になった遺伝子を抽出したところ、数十個の候補遺伝子を得ることができた。

(図 1,2) 現在。これらの遺伝子と免疫抑制効果の関連性を検討している。

2. 無血培地の hMSC の活性化免疫細胞の抑制効果に対する影響の検討

hMSC と活性化 T 細胞の共培養の系を 10% FBS 含有の MSCGM 培地もしくは無

血清培地である STK2 で培養してみたところ、Mitogen 刺激および anti-CD3/anti-CD28 刺激で T 細胞を活性化させた系では hMSC による細胞増殖抑制効果は MSCGM での培養でも、STK2 での培養でも大きな変化はなかった。一方、MLR の系では STK2 で培養すると MLR の反応自体がほとんど起こらなくなり、hMSC による抑制効果を観察することができなかった。(図 3) STK2 培地の培養過程で抗原提示能を有している DC が不活性化されている可能性がある。そこで、hMSC を MSCGM および STK2 で前培養し、活性化 T 細胞との共培養の過程では MSCGM で培養することにした。(図 4) その結果、MLR の系でも前培養が MSCGM であろうが STK2 であろうが hMSC の細胞増殖抑制効果は維持されていることが確認できた。また、mitogen 刺激および anti-CD3/anti-CD28 刺激の系でも増殖抑制効果が維持されていることが確認された。

(図 5) しかも、MLR の系および Mitogen 刺激の系では細胞増殖抑制が STK2 で前培養していた方が早期に始まっていることがわかった。(図 5) 一方、サイトカインに関しては MSCGM 培養、STK2 培養で異なった結果を得ている。MLR の系では前培養を STK2 で行った方が IL2 は多く、IFN- γ は逆に少なくなっていた。(図 6) Mitogen 刺激の系では前培養を STK2 で行った方が IL2、IFN- γ ともに多くなっていた。(図 7) これに対し、anti-CD3/anti-CD28 刺激の系では IL2、IFN- γ ともにどちらの培地で培養してもその量に差がなかった。(図 8)

D. 考察

再生医療への間葉系幹細胞の応用はこれまでの様々な研究から期待はされてきている。しかしながら特に間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子メカニズムについては詳細な解析がなされていないのが現状である。この研究で Whole Human genome DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析の結果、定常状態の hMSC と抑制効果を発揮している hMSC の間で発現量が二倍以上異なる遺伝子を得られてきた。その中には既知の報告でサイトカインに特化したアレイでの解析結果で抑制効果を発揮している MSC で発現が高い遺伝子として同定されてきた IL-6 遺伝子が含まれており、この実験系が上手く動いていることが確認された。よって、この系で得られている候補遺伝子の中に MSC の免疫抑制効果に直接関与している遺伝子が含まれている可能性が高いと考えられる。今後これらの詳細な解析を進め、間葉系幹細胞の免疫抑制効果の分子機構が解明されれば、間葉系幹細胞が組織の修復・再生だけでなく、アロ移植際、ドナーとレシピエント間の組織不適合性のため起こる拒絶反応 (HVG・GVHD) をその原因である免疫反応を減弱させることで軽減できるツールとして、安全に利用できる評価を行うことが可能になると思われる。

現在 MSC の培養にはウシの血清(FBS)が入った培地を用いられていることが多い。ウシの血清にはロット差があるだけでなく、異種動物由来の血清タンパク質の混入が移植の際、免疫応答を引き起こしてしまうと

いった問題点がある。仮にヒトの血清の使用するにしても個体差、肉体的、経済的負担が大きい。より安全で安定した品質の MSC を供給するためにはその培養過程で無血清培地を用いるのが良いと考えられる。今回の結果から、STK2 培地で培養された hMSC は活性化した T 細胞の細胞増殖抑制効果は維持していることが確認できた。しかしながら、サイトカインの量は血清含有の培地で培養した系と異なるパターンをしめしていた。これは 1) サイトカインの検出に ELISA 法を用いているため、real time でのサイトカインの発現量を反映していないという検出法の問題が関わっている可能性、2) T 細胞の分化 (Th1, Th2, Th17, Treg) のプロファイルが変わっている可能性などが考えられる。今後、各サイトカインおよび各分化マーカーを用いた細胞内染色 FACS や RT-PCR を行い詳細な解析を行う必要があると思われる。

E. 結論

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。今回、MSC の免疫抑制効果に関わる因子の同定を試み、いくつかの候補遺伝子を得られてきた。今後、これらの遺伝子と免疫反応の関連性を検討し、免疫抑制機構カニズムの解明をめざしたい。ここで得られた結果は、MSC を用いた細胞組織医療機器を作製する際、より適切な細胞を選択する為のよい指

標になるだけでなく、移植の際の拒絶反応の軽減に応用できると期待される。

さらに無血清培地によるMSCの培養では、その免疫抑制効果は失われないことが確認され、無血清培地の有用性が示された。これらの結果から、特に臨床応用をめざしたMSCの培養では無血清培地を使用することで、より安全で安定した品質の細胞を提供できるようになると考えられる。

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 Cell: MSC) の免疫調節に関わる因子の解析」 第7回日本再生医療学会 (2008. 3)

図1: MSCの免疫抑制効果に関与する分子の探索

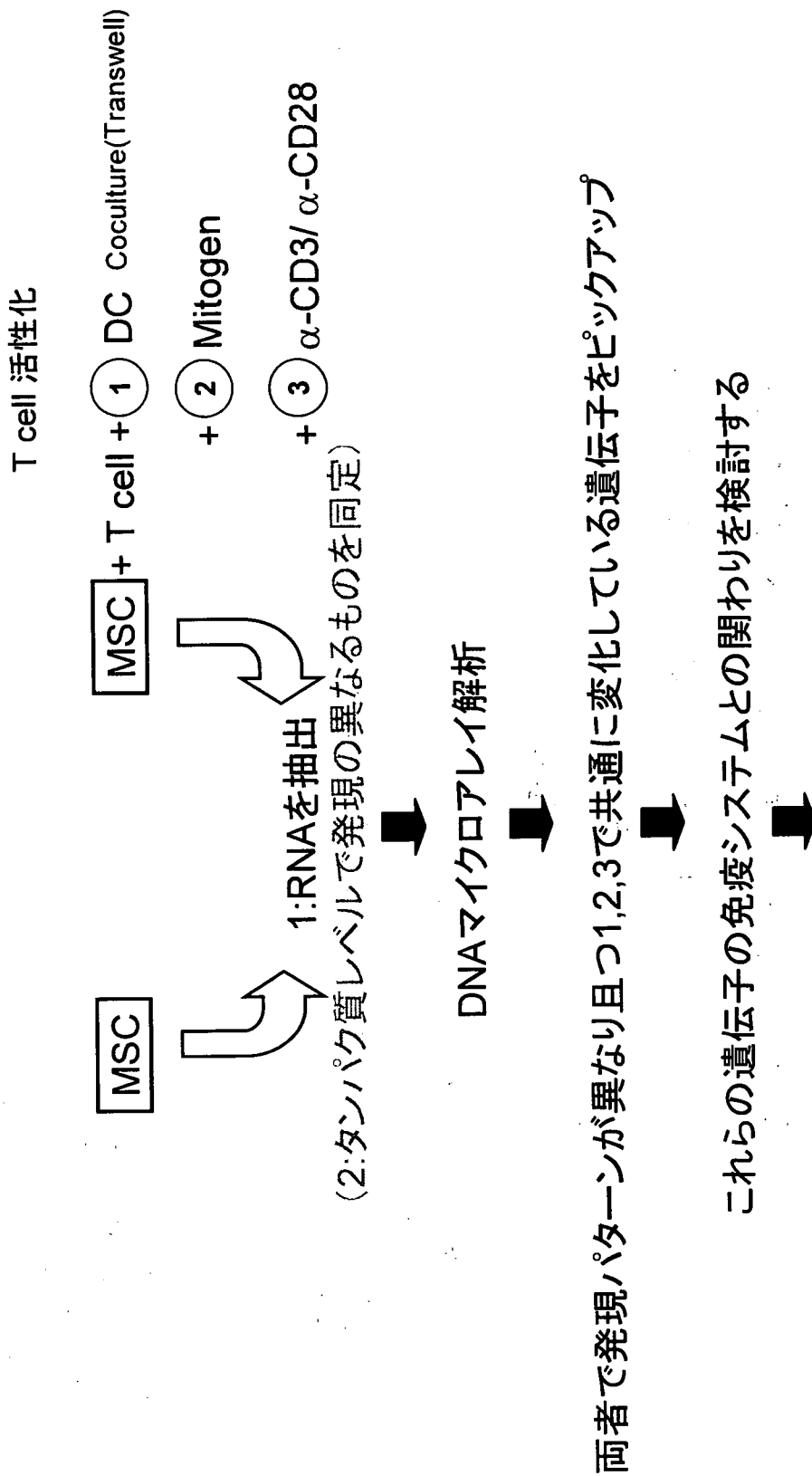


図2: DNAマイクロアレイ解析(途中経過)

Whole Human Genome 4 x 44 (Agilent : 遺伝子・転写物数: 約41,000)

GeneSpringを用いてコントロールに対して条件1, 2, 3で共通に発現量が二倍以上の遺伝子を抽出



53 遺伝子

- ・IL-6
- ・炎症状態になると発現が上がる遺伝子
- > 実験系はワークしているようだ
- ・その他: 主に細胞間シグナル、シグナル伝達、代謝などに関与する遺伝子、機能不明な遺伝子

参考:

Stem Cell 2007, 25; 2025-32

Primary human MSC

MLR: mouse splenocytes

Human Cytokine/Receptor Atlas Nylon cDNA Expression Array (BD Biosciences)

Upregulated gene: IL-6 precursor, VEGF B precursor, IL-2R γ

今後、得られたデータの詳細な解析を行い免疫抑制機能との関連性を明らかにする

図3: 活性化T細胞へのhMSCの影響
 - MSCGM培地とSTK2(無血清培地)の違い -
 proliferation

