

おり、今後これらの成分についても活性を検討していく予定である。また3,4-dimethoxyphenyl- α - β -D-glucosideは抗酸化作用を持つことが報告されていることから、50 μ M以下で β -hexosaminidase放出量が抑制されたのは抗酸化作用が関与している可能性が示唆された。すなわち、t-BuOOHによる細胞膜過酸化を防御することによって β -hexosaminidase放出を抑制したものと思われる。一方、100 μ M以上でコントロールよりも β -hexosaminidase放出量が増加したのはそのもの高用量における細胞毒性によるものと思われる。

1-4 個体レベルでの研究：マイクロアレイ解析により TRX-Tgと野生型とをきりわけの遺伝子候補として、PCA解析によって843プローブセット、発現強度データの検体により1,063プローブセットを抽出した。これらの遺伝子の変動のうち、細胞周期や apoptosisの関連分子が非誘導的に見出されたことは、造血幹細胞の細胞周期制御に対するTRXの機能を考える上で有用な情報と考えられるので、更に pathway解析などを進めたい。また、得られた既知の酸化的ストレス変動遺伝子の動きの確認もさることながら、ESTなど、機能が未確認の遺伝子の、これとリンクした変動を抽出することは重要な意味をもちつつも、現段階でこれを非誘導的に抽出する方法において問題点がある。SPSS法、autoclass法などを駆使することによって、この点でのマーカー抽出への展望など、技術的前進を図ることが重要と考えられた。

2 誘導機構研究 青じその抽出物のTRX誘導成分は、香り成分ペリルアルデヒドであり、 α , β -不飽和結合をもつアルデヒドがTRX誘導活性を持つことを明らかにした。これらの結果はペリルアルデヒドなどのアルデヒド基を含む香り成分がNrf2-AREシステムの活性化を起し、レドックス制御酵素を誘導することを示している。一方、アルデヒド基はタンパク質のリジンやアルギニン、システインに修飾を起こすことが知られており、脂質過酸化によって生じるアクロレイン、ハイドロキシノネナルなどは細胞障害を起こすことが知られている。Nrf2-AREシステムを活性化する物質は諸刃の剣のように振る舞うと考察される。食品として摂食するぐらいの少量ではペリルアルデヒドのような化合物は細胞の生体防御反応を刺激し、抗酸化物質の誘導につながるが、サプリメントなどの形で大量に服

用すると毒性を示す可能性がある。これまでのスルフォラファンなどのイソチオシアネート類についても同様な議論がなされる必要がある。安全なTRX誘導医薬品の開発のために、TRX誘導およびNrf2-AREシステムの活性化機構の検討を進めることは重要であると考えられる。このペリルアルデヒドはスルフォラファンとは異なる様式でNrf2-AREシステムを活性化している知見を得ており、その機構をさらに解析することが必要である。

また、ヨモギ由来のTRX誘導活性成分については新規のものであるという知見を得ており、その検証や誘導活性化機構についてさらに解析を進めていく必要がある。

さらに、TRXのノックダウンにより蛋白質およびRNAレベルでcyclin D1の発現抑制が起こり、G0/G1期での細胞周期停止が起こった。このことより、TRXは細胞周期制御に重要である。さらにcyclin D1 promoterにおける検討を行い、TRXのノックダウンはcyclin D1遺伝子の転写制御にかかわるシグナル調節の異常を引き起こすことを明らかにした。今後、さらにTRXによるシグナルのレドックス調節の作用点とその詳細な分子機構を明らかにすることにより、細胞内のレドックス調節を制御できる可能性があると思われる。また、抗癌剤であるシスプラチンを用いて細胞死を誘導したところ、コントロール細胞に比べてTRXノックダウン細胞では細胞死が増加した。これらの結果は、反対に、TRX発現量が抗癌剤耐性に影響を与えることを示唆している。TRXはApoptosis kinase 1 (ASK1)などとの相互作用によるアポトーシス制御の機構が報告されており、TRXの発現量をさらに低下させることにより、TRXとASK1によるアポトーシス制御が生理的どの程度重要なのか検証を加える必要があり、現在検討をすすめている。

また、TRXのnegative regulatorとして報告を行っているthioredoxin binding protein-2 (TBP-2)について、TBP-2トランスジェニックマウスではTRXのインシュリン還元活性が低下していた。TBP-2トランスジェニックマウスは高血糖、低脂質を示し、また活性酸素産生が増加していることを明らかにした。また、TBP-2のノックアウトマウスではTRX発現の上昇が観察された。これらのことは、TBP-2の発現が上昇するような条件ではTRXの活性が低下するような機構が存在し、また、TRXの発現自体の制御

について新しい機構が存在することが示唆され、TBP-2の解析を通じてその機構解析の手がかりを得ることが必要であると考えられる。

- 3 ニュートリジノミクス研究 ニュートリジノミクスは、摂取される食品が消化吸収され、生体に取り込まれる過程での生体異物相互作用を、transcriptomicsを手法として、遺伝子の発現プロファイリングをもって理解しようとする新しい生体異物反応学である。これによって、2000年前後から例えば従来生体に好ましい影響が（特に東洋人の間で）信じられてきた大豆イソフラボンの作用に（高用量に限られる影響の様ではあるが）様々の生体障害作用があることが見出されてきた。こうした、いわゆる vegetarian mother症候群と呼ばれる小児の性器奇形やひいては精巣がんにつながるリスクはほとんど知られていなかったものであり、ここにこの手法に期待されるものがある（Wetherill et al. 2005, Strom et al. 1999）。

本研究課題でニュートリジノミクスを取り上げる重要な視点は、従って、大豆イソフラボンのマイクロアレイプロファイリングに無批判に有用性を求めてきた一部のニュートリジノミクス研究者の取ってきた方法に陥らず、TRXの欠失状態や過剰発現状態の動物の反応性を比較しながら、対象食品との生体応答に注目することにある。当該動物の定常状態でのグローバル遺伝子発現のプロファイリングの整備が整い、最終年度での成果獲得にむけて、被検物質による予備検討を進めている。

II. 個別課題開発研究

- 1 ライブラリー・スクリーニング これまで、TRX高発現マウスを用いた研究で、長寿、脳梗塞巣の縮小、腎臓の虚血再灌流障害軽減、急性肺障害の軽減、化学物質による傷害の軽減、インフルエンザウイルス感染への抵抗性、糖尿病モデル等疾患モデルでの障害軽減など、TRXが様々な酸化ストレスに関係する病態に防御作用を示すことが示されてきた。一方、TRXタンパクを投与することによっても、白血球浸潤阻害による急性肺障害、心筋炎等に対する有効性が示されている。潰瘍性大腸炎、や喫煙暴露モデルにおける結果のように、TRXが炎症性サイトカインMIFとの関連が示され、TRXの病態への有効性については、抗酸化作用のみならず、抗炎症作用のメカニズムも詳細に検討する必要があると考えている。

共同で研究を行っている京都大学ウイルス研究所の分担研究では、TRXの機能解析も詳細に検討が進んでおり、医薬品開発上のターゲティングにも重要な検討である。

生体内のTRXを高める方法として、投与あるいは摂取して安全なTRX誘導物質の探索は有力な手段である。誘導物質の探索には、ソースを合理的に選択することが重要であり、ゲラニルゲラニルアセトンやスルフォラファンなどの既知物質や予備検討から得られた候補物質から、共通する化合物の骨格や活性部位を予測し、絞り込みを効率的に行う必要があると考えている。今回、ヨモギ凍結乾燥物のTRX誘導が確認されたことから、今後、細胞障害抑制活性機能の確認や、動物組織での誘導効果の検討を行う予定である。また、誘導活性は水溶性画分にあり、今後、成分の分析を行う予定である。

さらに、TRXによるMIF産生抑制機構は、TRXとMIFが直接相互作用することを介して、MIFの細胞内への移行を抑制することによって、その後の炎症性サイトカインの産生を抑制し、炎症応答を抑制すると考えられる。今後、その結合領域の確認により、より詳細な抗炎症機構の解明を行う。また最近細胞表面のTRXの存在が細胞内への分子の取込みに関与していることが明らかになりつつある。そこで、MIFの細胞内取込みに対する細胞表面のTRXの関与を確認する。

- 2 バイオマーカー・測定系開発 これまで酵素免疫測定法（ELISA）で測定されているTRXについて、短時間で自動測定可能な電気化学発光免疫測定法（ECLIA）を確立することにより、本研究の目的であるTRX類の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発に有効な手段として期待ができる。今後さらに、新規バイオマーカーの測定にも活用したい。
- 3 有効性研究 スクリーニングや有効性の評価としては、真皮繊維芽細胞など皮膚細胞を用いたTRX発現量の定量を評価系として有望視している。当社グループ企業の株式会社ノエビアでは、動物組織や酵母などから抽出したTRXを皮膚に塗布した際、その抗酸化能によって表皮角質層の酸化ストレスが緩和されることを示し、成果を化粧品に応用し製造販売した実績がある。

長寿地域として知られる沖縄を中心とした南西諸島において、独特の風味を持つ黒糖は嗜好品として長く親しまれてきた。黒糖は医薬品添加物でもあ

り、甘味剤・矯味剤として医薬品に利用されている。化粧品としての利用にも歴史があり、黒砂糖石鹸は公正競争規約により黒砂糖の基準使用量が全重量の5%以上と定められている。

サトウキビ由来の成分を残す黒糖は、近年の研究により、抗酸化能を有するポリフェノール類など多くの生理活性成分を含むことが知られている。黒糖からショ糖など糖質を除去し、非ショ糖成分を含む黒糖抽出物 (Unrefined Sugar Extract: USE) を分画したところ、DPPHラジカル消去能の評価により抗酸化活性を確認した。我々は既に、USEの細胞賦活作用として、表皮細胞のATP活性能、線維芽細胞のコラーゲン合成促進能も報告している (日本農芸化学会関西支部第432回講演会, 2003)。しかし、培養細胞による抗酸化あるいは抗アレルギー活性の評価、活性成分の特定までには至っていない。

今回、共同研究者により、RBL-2H3細胞の脱顆粒をUSEが抑制することが示され、USEに抗アレルギー成分としての可能性が示唆された。成分分析から、メトキシフェニルグルコシド類、中でも比較的収量の多い3,4-dimethoxyphenyl-O-β-D-glucoside (図1の1の構造式に相当) が有望視される。このものは抗酸化能だけでなく、糖質や脂質の代謝に関与するとの報告がされており、機能性成分として興味深い。

今後は活性成分の単離、同定に加えて、活性成分の抗酸化能あるいは抗酸化成分誘導の研究も必要だろう。抗酸化活性の評価としては、DPPHラジカル消去による評価に加え、スクリーニング評価系として検討しているTRX誘導の検討も含め、主に皮膚細胞による抗酸化能の評価方法を検討する予定である。さらに、黒糖以外の候補素材について、抗酸化活性、抗アレルギー活性を指標にスクリーニング探索を進める。

- 4 評価法開発 酸化ストレスが、老化、がん、生活習慣病等、様々な病態に関連することは明らかであり、高齢化社会において、抗酸化ストレスメカニズムによる新たな健康増進医薬品あるいはこれらの酸化ストレス疾患を予防あるいは共存していくための機能性食品や機能性化粧品などの開発は期待が大きい。

溶媒に電解還元水を用いることで、TRXの活性を高めることが出来るかについて検討した。その結果、①TRXのインスリン還元活性に対する電解還元

水の直接的な相加的効果は認められなかった。②TRXのダイマー形成阻害に対して、電解還元水による酸化型—還元型比率への直接的な効果は認められなかった。③TRXの胃粘膜細胞への保護効果試験に対しては、電解還元水 (定電流1 A) を用いることで、相加効果が認められた。但し、定電流を5Aにすると、むしろ、TRXの防護作用を抑制することから、電解還元水の電解レベルを定電流1 A電解にすることが重要と考えられる。

日本トリム社が開発してきた電解還元水は、生活の基本である水を高機能化したものであり、本プロジェクトで研究される新たな抗酸化分子との相加相乗作用が期待される。また、分担研究者間で確立してきた評価系を相互利用することで、新しい作用機序の開明にも繋がると考えている。

E. 結論

創薬課題基盤研究として、TRXなど抗酸化的活性酸素種消去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用 (衛研受託研究)、TRX誘導物質の解析 (誘導機構研究)、並びに、ニュートリジノミクスの3点を設定し、個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニング (ライブラリー・スクリーニング)、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発 (有効性研究)、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発 (バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子の機能性評価法の開発 (評価法開発) の4課題を設定し、それぞれ分担協力の下に研究を行った。

研究は、基礎研究、開発の基礎展望、有効性スクリーニング、測定技術開発など戦略的に分担され、それぞれの分野で成果が上がった。ただし、製品については、医薬品1点、医薬部外品1点、及び改良電解還元水1点の計3点を標的とした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:700- 712, 2007.
- (2) Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+) Hematopoietic

Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle. *J Membr Biol* 217: 105-113, 2007.

- (3) Yoshida K, Hirabayashi Y, Wada S, Watanabe F, Watanabe K, Aizawa S, Inoue T. p53 (TRP53) deficiency-mediated antiapoptosis escape after 5 Gy X irradiation still induces stem cell leukemia in C3H/He mice: comparison between whole-body assay and bone marrow transplantation (BMT) assay. *Radiat Res* 167:703-710, 2007.
- (4) Minami A, Tsuboi I, Harada T, Fukumoto T, Hiramoto M, Koshinaga M, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Inflammatory biomarker, neopterin, suppresses B lymphopoiesis for possible facilitation of granulocyte responses, which is severely altered in age-related stromal-cell-impaired mice, SCI/SAM. *Exp Biol Med* (Maywood) 232:134-145, 2007.
- (5) Kobayashi-Miura M, Shioji K, Hoshino Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J; Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. Review. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(5): H2040-2050, 2007
- (6) Hoshino Y, Shioji K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J; From oxygen sensing to heart failure: role of thioredoxin. *Antioxid Redox Signal*. 9(6):689-699, 2007. Review
- (7) Hara T, Kondo N, Nakamura H, Okuyama H, Mitsui A, Hoshino Y, Yodoi J: Cell-surface thioredoxin-1: possible involvement in thiol-mediated leukocyte-endothelial cell interaction through lipid rafts. *Antioxid Redox Signal*. 9(9):1427-1437, 2007
- (8) Kondo N, Ishii Y, Kwon YW, Tanito M, Sakakura-Nishiyama J, Mochizuki M, Maeda M, Suzuki S, Kojima M, Kim YC, Son A, Nakamura H, Yodoi J. lipid raft-mediated uptake of cysteine-modified thioredoxin-1: apoptosis enhancement by inhibiting the endogenous thioredoxin-1. *Antioxid Redox Signal*. 9(9):1439-1448, 2007
- (9) Tan A, Nakamura H, Kondo N, Tanito M, Kwon YW, Ahsan MK, Matsui H, Narita M, Yodoi J; Thioredoxin-1 attenuates indomethacin-induced gastric mucosal injury in mice. *Free Radic Res*. 41(8):861-869, 2007
- (10) Nakamura T, Hoshino Y, Yamada A, Teratani A, Furukawa S, Okuyama H, Ueda S, Wada H, Yodoi J, Nakamura H; Recombinant human thioredoxin-1 becomes oxidized in circulation and suppresses bleomycin-induced neutrophil recruitment in the rat airway. *Free Radic Res*. 41(10):1089-1098, 2007
- (11) Kaimul AM, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J; Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 43(6):861-868, 2007

2. 学会発表

- (1) Inoue T: Attenuation of oxidative stress in the Trx-overexpression mice: Study on benzene induced hemopoietic malignancies. The 4th Meeting of International REDOX Network (2007.11.2)
- (2) Hirabayashi Y, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Inoue T. Xenobiotic response in Thioredoxin gene modified mice The 4th Meeting of International REDOX Network (2007.10.31)
- (3) Yodoi J, Masaki S, Hara T, Nakamura H, Masutani H, Adult T cell leukemia and the thioredoxin system, The

XXIII Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, Freiburg, Germany, September 11, 2007

- (4) Yodoi J, Hara T, Kondo N, Nakamura H, Cell surface thioredoxin; possible target of redox mediated signal transduction, 14th Symposium on Signal and Signal Processing in the Immune System, Lake Balaton, Hungary, September 18, 2007
- (5) Yodoi J, Masutani H, Thioredoxin inducers: Molecular mechanism and Application, 2nd Verona Meeting Phytotherapy Food & Health, Verona, Italy, September 29, 2007
- (6) Masutani H, SFRR Europa 2007 Meeting, Redox regulation of inflammation and metabolic stress by TRX/ TBP-2 system, Vilamoura, Portugal, October 11, 2007
- (7) Yodoi J, Role of TBP-2 and Thioredoxin in the Regulation of Energy Metabolism, Immune Deviation and Aging, 13th Samsung International Symposium on Molecular Medicine, Seoul, Korea, October 13, 2007
- (8) Yodoi J, The 4th Meeting of International Redox Network Anti-Inflammatory role of Thioredoxin as a Natural MIF/GIF Inhibitor, Cheju, Korea, November 2, 2007
- (9) Masutani H, Mochizuki M, Oka S, Yoshihara E, Onishi M, Yodoi J, Redox control of cell growth and metabolism by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)/VDUP1/ Txnip, The 4th Meeting of International Redox Network, Cheju, Korea, Nov 2, 2007
- (10) Mochizuki M, Yong-Won Kwon, Onishi M, Yodoi J, Masutani H, Redox control of cell cycle by Thioredoxin, The 4th Meeting of International Redox Network, Cheju, Korea, Oct 31 – Nov 2, 2007
- (11) Yoshihara E, Oka S, Yodoi J, Masutani H, Thioredoxin Binding Protein-2 (TBP-2) is a critical regulator of PPAR α and SREBP signaling in fasting response, The 4th Meeting of International Redox Network, Cheju, Korea, Oct 31 – Nov 2, 2007
- (12) Yodoi J, Novel Role of Thioredoxin and Its Receptors in Cardiovascular Diseases, American Heart Association Scientific Sessions 2007, Orland, Nov 5, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向け てのトランスレーショナルリサーチ

所 属 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦

研究要旨 臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞調製法を検討し、IL-2 添加の濃度とタイミングを最適化するなど、データを集積した。臍帯血由来活性化 T 細胞の遺伝子発現やサイトカイン産生を末梢血由来のものと比較したところ、制御性 T 細胞に特徴的な転写因子 FoxP3 の発現が高く IL-17 の産生が認められないなど、DLI への高い適性を示唆する結果が得られた。ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおいて、ウイルス特異的な T 細胞応答が証明され、臍帯血 DLI のモデル実験を行う場として適することが示唆された。臍帯血 DLI の安全管理法の一つとして未知ウイルスを検出できる検査系の開発が開始された。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水 則夫
- (2) 東京医科歯科大学医学部 森尾友宏
- (3) 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部 清河信敬
- (4) 国立成育医療センター小児腫瘍科 熊谷 昌明
- (5) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (6) 株式会社リンフォテック 関根暉彬
- (7) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (8) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也

A. 研究目的

臍帯血移植は近年急速に普及しているが、1人のドナーから得られる細胞数が少ないため、移植後の感染症や悪性腫瘍再発に対してドナーリンパ球輸注療法 (DLI) を行うことができないという欠点を有している。我々はこれに対して、移植に用いた臍帯血細胞の一部を凍結保存し、必要に応じて活性化・増幅したのちレシピエントに輸注する治療法 (臍帯血 DLI) を考案し、その基礎および臨床パイロット研究を進めてきた。平成 16~18 年度政策創薬総合研究事業 KH51039「臍帯血移植患者へ

のドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化」においては、新鮮臍帯血からの活性化 T 細胞培養法の確立、活性化臍帯血 T 細胞の性状解析、臍帯血 DLI の動物モデルの作製を行った。本研究はこれに引き続き、実際に治療に用いる凍結臍帯血からの活性化 T 細胞調整法を確立し、臍帯血 DLI 動物モデルを用いた前臨床試験を施行することを目的とする。また、培養加工細胞製剤を安全かつ一定の規格に均一化し GMP に基づいた製品に仕上げるための基盤整備を行なう。

臍帯血 DLI が臍帯血移植後の悪性腫瘍再発や難治性感染症に対する治療法として実用化されれば、これら疾患の治療成績が向上し、ひいては臍帯血移植成功率の向上が期待される。本研究はこの目的へ向けて前臨床試験までを担当するものである。また、細胞治療製剤を GMP に準拠して管理することにより、製剤の効果および安全性の管理を徹底させることが可能となり、さらに、米国・ヨーロッパ・アジアとのあいだで共通の基準をもって情報交換が可能となり、国際的な協力関係の構築が促進される。本研究で開発されるヒト化マウスを用いたウイルス感染モデルマウスは、様々な実験的治療法の評価を可能とし、臍帯血 DLI のみならず、抗ウイルス薬など他の創

薬研究に大きく貢献することが期待される。初年度である今年、臍帯血保存有核細胞分離法の検討、凍結保存臍帯血からの活性化 T 細胞の調整法の検討、活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析、臍帯血 DLI 動物モデルの前段階としてのウイルス感染モデルマウスの解析、臍帯血 DLI の安全管理法の開発等を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血の取得

東京および兵庫臍帯血バンクに提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できなかったものを利用した。

2. 臍帯血保存有核細胞分離法の検討

HES 静置法は、臍帯血採取量の 20% の割合で HES40 (6% ヒドロキシエチルデンプン (40 万) 加 0.9% 食塩液) を加え、1 時間室温にて静置し、上清に浮遊する有核細胞を分離後、遠心濃縮を実施し、HES 遠心法と同様の操作で凍結した。

3. 凍結臍帯血からの活性化 T 細胞調整法の検討

培養の基本条件として、10% 牛胎児血清および IL-2 を添加した RPMI1640+7 培地 (日研生物医学研究所) と OKT-3 固相化フラスコをもちい、1) 抗 CD3 抗体刺激終了時期、2) 培養液中 IL-2 濃度、3) Bag を用いた活性化培養、の 3 点について検討した。また、移植後の残存臍帯血からの活性化培養、米国 FDA 認可を受けた AIM-V 培地の試験使用、臍帯血解凍後安定性試験等も行った。

4. 活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析

RNeasy kit + DNase 処理 (Qiagen 社) を用いて total RNA を抽出し、各 2.5 μ g を用いてマイクロアレイ (Affymetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。また、cDNA 合成キット (GE Healthcare) を用いて single strand cDNA を合成し、各標的遺伝子の配列から特異的に設計したオリゴプライマーのセットを用いて、CYBRGreen-による定量的 PCR を行った。

5. EB ウイルス感染モデルマウスの作製

臍帯血より MACS CD34+ アイソレーショ

ンキット (Miltenyi Biotec) を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離し、NOD/SCID/ γ c^{null} マウス (以下、NOG マウス) に移植した。このヒト化マウスに B95-8 株 EBV を尾静脈より接種した。モデルマウスにおける EBV 特異的 T 細胞応答は、ELISPOT 法およびフローサイトメトリー法により検出した。

6. 臍帯血 DLI の安全管理法の開発

(1) 新しい未知ウイルス検出系開発に関する基礎研究

ウイルス核酸がタンパク質の殻に包まれており核酸分解酵素から保護されている点に着目し、未知ウイルスを検出する実験系を考案した。EB ウイルスをモデルウイルスとし、ウイルス浮遊液に対して DNase I (35U) 処理した。対象として EBV 感染 Raji 細胞から抽出した DNA 溶液を用いた。DNase I 処理後に DNA 抽出操作を行い、GenomePlex complete whole genome Amplification (WGA) kit (シグマ) を用いた全ゲノム均一増幅法によりウイルスゲノムのライブラリーを作成し、塩基配列を決定した。

(2) 環境菌検査法の確立

落下菌はサブローデキストロース寒天培地 (日本 BD 社) を用い、浮遊菌は同培地をせつとしたエアースンプラー (バイオテスト社) を用いて検査した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

表1 臍帯血分離法(HES法)の比較

	静置法	遠心法
HES濃度	20%	
攪拌時間(分)	0~5	5~15
遠心	—	150G
室温静置(分)	40~60	—
細胞分離(分)	10~20	
遠心(濃縮)	450G	
血漿除去(分)	10~30	
DMSO	10%以下	
最終凍結量	25~26ml	
凍結	Bio Archive	
所要時間	1.5~2	2~2.5
有核細胞回収率	90%	82%
最終Hgb(g/dl)	0.3以下	8~20
操作性	容易	やや難

C. 研究結果

1. 臍帯血保存有核細胞分離法の検討

臍帯血分離処理後の有核細胞数回収率(%)は、静置法で 89.9 ± 3.27 、遠心法で 82.1 ± 1.98 、臍帯血凍結後の解凍時における有核細胞、CD34、コロニー、生存率の回収率(%)はそれぞれ 98.8 ± 3.1 、 89.5 ± 12.6 、 96.4 ± 3.1 、 98.1 ± 0.9 であった。凍結保存時のヘモグロビン量は、静置法で 0.21 ± 0.05 、遠心法で 14.16 ± 3.57 であった(表1)。

2. 凍結保存臍帯血からの活性化T細胞の調整法の検討

(1) 臍帯血解凍後安定性試験

解凍後0時間、1時間では細胞生存率に顕著な差はなかったが、2時間以降では徐々に生存率が低下した。しかし、培養後の増殖率で比較すると差は認められず、解凍後24時間経過した細胞も不具合なく増殖が認められた。

(2) 培養液の検討

臨床試験用の培養液として米国FDAの承認を受けているAIM-V培地を、我々が従来用いているRPMI1640+7培地と比較したところ、同等の培養成績が得られた。

(3) 臍帯血バッグからのex vivo CD4T細胞培養

臍帯血移植23症例中19症例において、プラスチック内での拡大培養が可能であったが、 1×10^8 cell/mLに届かず、培養開始時の細胞数および、増殖率において、末梢血あるいは、

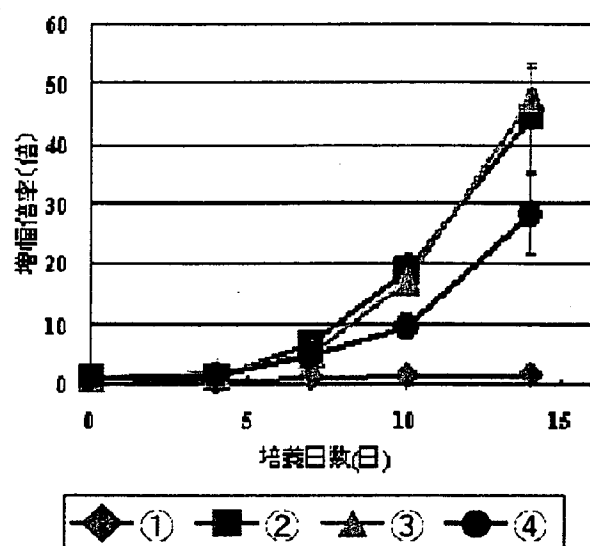


図1. OKT-3 終了時期の変更による細胞増殖率の変化. mean ± SD (n=3)を示す。

新鮮臍帯血に及ばないことが判明した。

(4) 培養CD4T細胞のウイルス検査

19例の活性化臍帯血CD4T細胞のうち1例からEBVが検出された。一方ドナー末梢血由来活性化T細胞44例では、EBVが約10%、HHV7が約8%の症例で検出された。

(5) 抗CD3抗体刺激終了時期の検討

抗CD3抗体刺激に関して①OKT-3刺激を行わない群、②OKT-3刺激を培養4日目に終了する群、③OKT-3刺激を培養7日目に終了する群及び④OKT-3刺激を継続する群の4群を設け、14日間培養を行った。その結果、増殖率および生細胞率の観点から、OKT-3刺激を培養4日目に終了した場合に最も効率よく活性化T細胞が得られた(図1)。

(6) IL-2濃度の検討

175, 350, 700 IU/mlの3段階を比較したところ、増殖率、生細胞率、活性化マーカー発現において差が認められなかった。

(7) Bagを用いた活性化培養

3例のドナーから得られた臍帯血を用いて培養を行ったところ、1例において総細胞数で50倍、CD3陽性細胞数で150倍の増幅が認められた。

3. 活性化臍帯血T細胞の性状解析

1) 網羅的遺伝子発現解析による末梢血由来活性化T細胞との比較

臍帯血由来活性化CD4(+)細胞では、末梢血

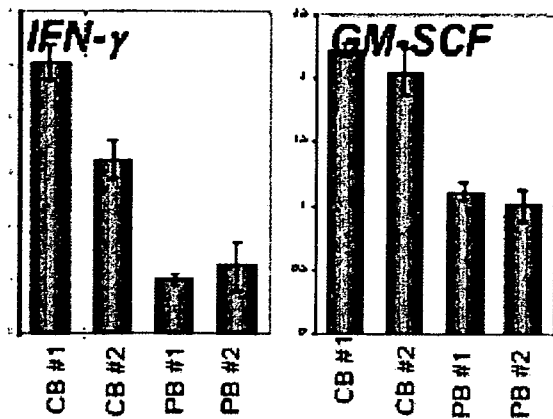


図 2. 活性化 T 細胞の Th1 サイトカイン産生. 臍帯血 (CB) および末梢血 (PB) 各 2 例から活性化 T 細胞を調製し、IFN- γ と GM-CSF の産生量を比較した。

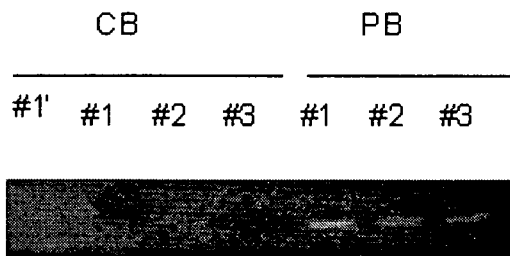


図 3. 活性化 T 細胞の IL-17 産生. 臍帯血 (CB) および末梢血 (PB) 各 3 例から活性化 T 細胞を調製し、IL-17 発現を RT-PCR 法により検出した。

由来のものと比較して、IFN- γ をはじめとする Th1 サイトカインの発現レベルが高い傾向が認められた (図 2)。また、制御性 T 細胞に特徴的な転写因子 FoxP3 は、末梢血由来と比較して臍帯血由来活性化 CD4(+)細胞では高レベルに発現することが示された。さらに、IL-17 およびその発現を正に制御する ROR- γ t については、末梢血由来活性化 CD4(+)細胞では発現が認められたが、臍帯血由来のものでは発現が認められなかった (図 3)。

4. EBV 感染モデルマウスの作製と解析

ヒト化 NOG マウスを用いた EBV 感染モデルでは、高レベルの感染では主にリンパ増殖性疾患が発症し、低レベルでは持続感染状態となることがすでに示されている。今年度はこのマウスにおける EBV 特異的 T 細胞応答を解析した。感染マウス末梢血より CD8(+) T

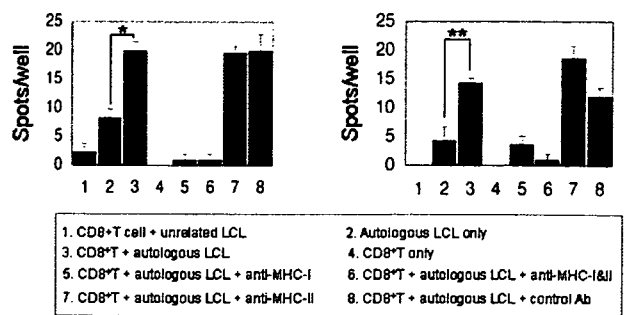


図 4. ELISPOT 法による EBV 感染マウスからのウイルス特異的 T 細胞の検出。

細胞を分離し、この autologous な LCL と共培養したところ、ELISPOT 法により IFN- γ 産生細胞が検出された。一方、CD8(+)細胞のみ、あるいは LCL のみの培養では IFN- γ 産生細胞は検出されなかった。また、IFN- γ 産生は CD8(+)細胞と他者 (allo) の LCL との共培養では認められず、ヒト MHC クラス I に対する抗体により阻害された (図 4)。さらに、EBV 感染 NOG マウスの脾臓より CD8 陽性 T 細胞を分離し、autologous な LCL との共培養の後フローサイトメトリーにより細胞内 IFN- γ を検出したところ、やはり IFN- γ 産生細胞が検出された。以上より、EBV 感染ヒト化 NOG マウスでは、ヒト MHC クラス I に拘束された EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが強く示唆された。

5. 臍帯血 DLI の安全管理法の確立

(1) 新しい未知ウイルス検出法に関する基礎研究

Raji 細胞からの DNA 抽出液では、DNase I 処理により EBV DNA が検出感度以下まで分解されるのに対し、EBV 浮遊液では DNase I 処理を行っても EBV DNA 量がほとんど変わらないことが示された。これは、タンパク質の殻につつまれたウイルス DNA をその他の裸の DNA と区別して解析可能であることを示す。しかし、ランダムプライミングによる全 DNA 増幅後に EBV DNA は検出されなかった。

(2) 環境菌検査

培養を行うクリーンルーム内の安全キャビネット、CO₂ インキュベーター、パスボックスの全てにおいて、落下菌および浮遊菌は検出されなかった。

(3) 血清の検討

ベリタス社より購入したヒト血清 30 ロットについてウイルス検査を行ったところ、HIV-1、HIV-2、HBV、HCV、HTLV-1、ParboB19 は検出されなかったが、GBV は 9/30 と高頻度で検出された。

血清に混入する可能性があるウイルスをガンマ線照射により不活化する実験を行った。指標に用いた ParboB19 では、10 kGy の照射により生物活性が失われたが、定量的 PCR ではウイルス DNA の減少は認められなかった。

6. 臍帯血移植後の免疫再構築の検討 (骨髄移植との比較)

国立成育医療センターにおいて臍帯血移植を行った 7 例のうち長期観察が可能であった 2 例について、移植後の末梢血細胞のマーカー発現を経時的に観察した。これらの例では、骨髄移植例と比較して、移植後 3 ヶ月以降のリンパ球の増加が顕著であった。また、骨髄移植では多くの場合長期にわたり CD4/8 比の逆転がみられるが、臍帯血移植では移植後早期から CD4>CD8 となる点が特徴的であった。

D. 考察

1. 臍帯血保存有核細胞分離法の検討

HES 静置法は、従来実施してきた遠心法よりも有核細胞数が、約 10% 高い回収率を得られると共に凍結後の有核細胞、CD34 陽性細胞、コロニー、生存率の回収率 (%) も良好な成績であった。また、Hgb 量が約 1/50~1/70 であることから、ABO ミスマッチによる副作用が軽減される。HES 静置法を用いて臍帯血を分離することにより、より多くの有核細胞数を確保することが可能となったため、日本大学臍帯分離血保存施設としては現在、本法を採用して分離保存を実施している。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の調整法について

最も効率よく臍帯血リンパ球を増幅、活性化するためには 10% FCS 添加基礎培地に IL-2 を終濃度 175 IU / mL 添加した培養液で培養を行うこと、培養 4 日目に抗 CD 3 抗体刺激を終了することが適していると考えられた。また、個々の臍帯血により差があるものの Bag 培養を行うことでプラスコ培養より細胞を増幅できる可能性が示唆された。

臨床試験の対象としては成人を想定してい

るが、現行の培養法では残存臍帯血から培養した場合、成人に対する移植には細胞数が不十分となる可能性も高く、解凍方法、培養液組成、培養方法にさらなる標準化、最適化が必要である。一方ウイルスの増殖という観点からは、混入の可能性が低いという点で、末梢血と比較して臍帯血には大きな利点があるものと推測された。今後は FCS、ヒト新鮮血清、従来通りの FDA 認可血清の 3 種類を用い、最適かつ確実な培養手技を構築することが肝要であると考えられる。

3. 活性化臍帯血 T 細胞の性状解析

網羅的遺伝子発現解析の結果、臍帯血由来活性化 CD4(+)細胞では、末梢血由来のもの比べて制御性 T 細胞の含有量が高く、また IL-17 は発現が認められなかった。移植における GVHD においては、制御性 T 細胞は抑制的に、逆に IL-17 産生 T 細胞は増悪にむけて作用することが示唆されていることから、臍帯血活性化 CD4(+)細胞は末梢血由来のものより DLI の材料として適している可能性が考えられた。

4. EBV 感染モデルマウスの作製と解析

NOG マウスにおいて EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが示唆された。EBV を含む多くのウイルス感染では液性免疫より細胞性免疫が防御機構として重要であることが知られていることから、NOG マウスにおいて EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることは、このマウスが EBV に対するヒトの防御機構を解析するためのモデルシステムとして有用であることを示唆する。次のステップとして、ここに示された T 細胞応答が NOG マウスにおいて実際に防御機構として働いていることを検証する必要がある。ヒト化 NOG マウスにおいては、造血幹細胞移植後 2 ヶ月以降に B 細胞、4 ヶ月以降に T 細胞が分化するが、T 細胞の分化が不十分な 3 ヶ月で EBV を感染させると、T 細胞が十分分化した 6 ヶ月と比較してリンパ増殖性疾患がより早期に発症し重篤となることが示唆されており、これは T 細胞が防御的役割を果たすことを示唆する。今後は、cyclosporine A や OKT-3 など T 細胞抑制剤の効果を検討することにより、NOG マウスにおける T 細胞の役割についてさらに検証する計画である。次年度以降、この NOG マ

ウスにおける臍帯血 DLI のモデル実験を行いたい。

5. 臍帯血 DLI の安全管理法の確立について

新しい未知ウイルス検出系開発に関する基礎研究では、DNase I 処理によりタンパク質の殻に包まれたウイルス DNA を選択的に増幅することが可能であることが示された。しかし、全 DNA 増幅後にレファレンスとしてもちいた EBV DNA が検出されなかったことから、全 DNA 増幅のステップに問題があることが判明した。今後このステップの改良を進める予定である。

環境菌検査では、我々の用いている環境が十分に清潔であることが示された。また、ヒト血清を用いる際には GBV の混入の可能性に注意を払う必要がある。ガンマ線照射による血清滅菌の可能性が示された。さらに、米国 FDA が承認する AIM-V が使用可能であることが示唆された。

E. 結論

臍帯血 DLI に用いる活性化 T 細胞調製法を検討し、IL-2 添加の濃度とタイミングを最適化するなど、データを集積した。臍帯血由来活性化 T 細胞の遺伝子発現やサイトカイン産生を末梢血由来のものと比較したところ、制御性 T 細胞に特徴的な転写因子 FoxP3 の発現が高く IL-17 の産生が認められないなど、DLI への高い適性を示唆する結果が得られた。ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおいて、ウイルス特異的な T 細胞応答が証明され、臍帯血 DLI のモデル実験を行う場として適することが示唆された。臍帯血 DLI の安全管理法の一つとして未知ウイルスを検出できる検査系の開発が開始された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J. Infect. Dis.* in press.

2) Nakamura H, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K-I, Yajima M, and Fujiwara S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor-kB. *Virus Res.* 2007 Oct. 24 [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.virusres.2007.09.003.

3) Watanabe, S., Ohta, S., Yajima, M., Terashima, K., Ito, M., Mugishima, H., Fujiwara, S., Shimizu, K., Honda, M., Shimizu, N., and Yamamoto, N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ null Mice Transplanted with Hematopoietic Stem Cells under non-Myeloablative Condition Show Prolonged Lifespans and Allow Detailed Analysis of HIV-1 Pathogenesis. *J. Virol.* 81: 13259-13264, 2007.

4) Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int J Hematol* 85:384-389, 2007.

5) Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M. Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with unilateral panuveitis. *Arch.of Ophthalmol.* in press.

6) Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br. J. Ophthalmol.* in press.

7) Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of EBV DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Jap.J. Ophthalmol.* in press.

8) Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Z, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2R γ null mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1

- infection with specific humoral Immune Responses. *Blood*. 109:212-218, 2007.
- 9) Kawaguchi T, Sugita S, Shimizu N and Mochizuki M. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Int. Ophthalmol.* 27:383- 386, 2007.
- 10) Kanno H., Watabe S, Shimizu N. and Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clin.Exp.Immunol.* 151:519-527, 2007.
- 11) Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, Morio T, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, 132: 794-806, 2008.
- 12) Takahashi N, Morio T. Common variable immunodeficiency. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 31:9-16, 2008.
- 13) Suzuki K, Tsugawa K, Oki E, Morio T, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol.* 2008 Jan 12; [Epub ahead of print]
- 14) Sugita S, Iwanaga Y, Kawaguchi T, Futagami Y, Horie S, Usui T, Yamamoto S, Sugamoto Y, Mochizuki M, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T. [Detection of herpesvirus genome by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR in ocular fluids of patients with acute retinal necrosis] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 112: 30-8, 2008.
- 15) Morio T, Kim H. Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:598-603, 2008.
- 16) Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, Morio T, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 87:88-90, 2008.
- 17) Morio T. Strategy to Combat Opportunistic Infections after Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT) - Monitoring of Multiple Pathogens with a Novel Multiplex PCR System and Infusion of Ex-vivo Expanded CD4 T-Cells (CD4-DLI). *Biol Blood Marrow Transplant.* 13: 1400-01, 2007.
- 18) Horibe S, Takagi M, Unno J, Nagasawa M, Morio T, Arai A, Miura O, Ohta M, Kitagawa M, Mizutani S. DNA damage check points prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 10: 2195-8, 2007.
- 19) Tono C, Takahashi Y, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Tandai S, Sato T, Kudo K, Toki T, Tachibana N, Yoshioka T, Nakahata T, Morio T, Nishikomori R, Ito E. Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant.* 39:801-4, 2007.
- 20) Okamoto H, Arai C, Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Kasahara Y, Koizumi S, Kamachi Y, Ishida Y, Inagaki J, Kato M, Morio T, Yachie A. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 148 : 450-60, 2007.
2. 学会発表
- 1) 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ—ウイルス病原性発現機構の解析 (DNA ウイルス)—. 2007 年 10 月、札幌.
- 2) 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第 37 回日本免疫学会学術集会ワークショップ—ヒト免疫—. 横浜. 2007 年 12 月.
- 3) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺 哲、中川 温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤 守、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイ

ルス感染モデルの作製. 第4回 EB ウイルス研究会. 2007年6月、東京.

4) 今留謙一、矢島美彩子、渡辺 哲、中川 温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤 守、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦. ヒト化マウスモデルにおける EB ウイルス特異的免疫応答. 第4回 EB ウイルス研究会. 2007年6月、東京.

5) 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. EB ウイルス感染上皮細胞における CD40 シグナルの働き. 日本分子生物学会・生化学会合同大会. 2007年12月、横浜.

6) 田口 智子、宮川 世志幸、堀内 保臣、斎藤 洋平、竹野内 寿美、北村 紀子、松井 淳、佐藤 伴、鈴木 恭子、斎藤 正博、片桐 洋子、大喜多 肇、藤本 純一郎、清河 信敬. oncostatin M の造血調節作用に関する *in vitro* での検討. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 合同開催, 横浜, 10月11日-13日, 2007.

7) 清水則夫 森尾友宏、滝澤淳、渡邊健、水上美樹: 口腔内骨膜を用いた組織培養におけるマイコプラズマ菌の検出 第7回再生医療学会総会 2008年3月

8) Morio T. Strategy to combat opportunistic infection after umbilical cord stem cell transplantation. The 5th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, May 2007, California, USA

9) K. Terashima, Y. Mochimaru, K. Watanabe, T. Morio, I. Matumoto, S. Watanabe, K. Ohba, M. Taruishi, C. Kishi, N. Yamamoto and N. Shimizu : Follicular dendritic cells (FDC), expressing ependymin related protein (ERP) and GM1, are of pluripotent mesencymal stem cells (pMSC) interfacing immune system and nerous system 13th International congress of immunology, 2007, Rio-Dejaneiro

10) 伊藤仁也、森尾友宏 造血幹細胞移植におけるクオリティーコントロール 細胞治療における品質管理と問題点 活性化リンパ球療法を中心に、第55回日本輸血・細胞治療学会、2007年5月31日-6月2日、名古屋

11) 森尾友宏、清水則夫 造血幹細胞移植後 CMV 感染症、Adenovirus 感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I -II 相試験 平成 19 年度 厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 第1回研究班会議、2007年6月23日、名古屋

12) 寺嶋一夫、持丸葉子、渡邊健、森尾友宏、松本一朗、渡辺哲、大場賢治、垂石みどり、岸千絵子、山本直樹、清水則夫: Follicular dendritic cells (FDC), expressing ependymin related protein (ERP) and GM1, are of pluripotent mesencymal stem cells (pMSC) interfacing immune system and nerous system BMB2007 (日本生化学会、日本分子生物学会学術集会) 2007年12月 横浜

13) 森尾友宏、清水則夫 造血幹細胞移植後の活性化 CD4DLI 療法 平成 19 年度 厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 第2回研究班会議、2008年1月27日、東京

14) 森尾友宏、清水則夫、伊藤仁也 関連学会合同シンポジウム「細胞移植・再生医療における品質管理のあり方」細胞移植の立場から(増殖リンパ球療法を中心として) 第30回日本造血細胞移植学会 2008年2月29日-3月1日大阪

15) 森尾友宏、清水則夫、梶原道子、落合央、峯岸志津子、伊藤仁也、土田昌宏、加藤剛二、小寺良尚、大隅一興、関根輝彬 造血幹細胞移植後難治性感染症に対する CD4-DLI 療法 (臨床 I-II 相試験) 第30回日本造血細胞移植学会 2008年2月29日-3月1日大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

腹膜癒着予防剤の開発と応用

所属 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部
研究者 土肥 多恵子

研究要旨 外科侵襲や炎症に伴う腹膜癒着防止剤の開発を目的とし、ヒト及び腹腔内洗浄液の解析、ケモカイン CCL1 の阻害剤の探索、化合物の合成を行い、さらに、*in vivo* 癒着防止活性試験を行った。その結果ヒット化合物及びマウス生体での癒着阻害活性のある化合物が得られた。

分担研究者

- (1) 国立国際医療センター研究所 代謝疾患研究部・鏑木 康志
- (2) 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部・名取 泰博
- (3) 財団法人 乙卯研究所・村竹 英昭

A. 研究目的

本研究はケモカインを標的とした新規癒着防止剤の創製を目指すものである。

開腹手術後や消化管炎症による腹膜の炎症から起こる腹腔内臓器の組織癒着は、イレウス、不妊など重篤な合併症をもたらす、再手術の原因となるだけでなく、長期にわたる深刻な後遺症を引き起こして患者の QOL を著しく損なう。また、無症候性であっても再手術の際の手術時間延長・出血・他臓器損傷のリスクが高くなることは多くの外科医が認識している。癒着は、救命のため最初に行われる手術の際には重大に取り上げられない合併症で、その実態報告も多くないが、開腹術を受けた患者の 34.1% がその後 10 年間に癒着が原因と思われる理由で再入院しているという報告がある。このように、癒着が原因で医療に費やされる負担は実は非常に大きく、医療経済的にも問題である。このため有効な癒着防止法の開発が強く求められている。近年、吸収性の膜を手術臓器と腹壁との間におく方法が行われるようになり、腸管-腹壁の癒着の頻度は減少したといわれている。しかし、臓器間の癒着防止はこの方法では困難であり、腹腔内に分散して癒着を防止する方法の開発がさらに求められている。また、腹腔鏡下の手術では比較的癒着の発生頻度は低いとされているものの、挿入創への癒着は発生しており、問題が解決されたわけではない。

我々は、これまでにマウスを用いて腹腔マクロファージが炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受け

るとケモカイン CCL1 を産生しその CCL1 および炎症刺激によって腹腔マクロファージも CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現することが明らかになった。このように CCL1 のオートクリン機構には positive feedback 機構が働くことが明らかとなり、このため腹腔マクロファージは傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成すると考えられた。この機構は同時に癒着を誘導するトリガーになっている。我々は、抗 CCL1 抗体投与により炎症に伴う癒着及び開腹手術後の癒着のいずれの *in vivo* モデルにおいても顕著な防止効果が認められ、CCL1/CCR8 が、慢性炎症や術後の腹膜癒着防止のための標的となりうることを明らかにした。本年度の研究目標は、CCL1 の低分子阻害剤を *in silico* 及び *in vitro* で探索すること、ヒト腹腔内洗浄液のプロテオーム解析を行うことである。また、*in vivo* 癒着モデルにおける低分子阻害剤投与の効果を評価することである。

B. 研究方法

(1) 腹腔内滲出細胞におけるケモカイン受容体発現

ケモカイン受容体の発現を RT-PCR により同定した。なお本研究に使用した手術時の標本の採取は、自治医科大学さいたま医療センター外科・河村裕講師、小西文雄教授の協力を得て行った。

(2) 腹腔内洗浄液におけるケモカイン・サイトカイン関連分子の測定

アルブミン除去キットにより濃縮したサンプルを用い、蛋白定量と ELISA (Quantikine human1-309/CCL1, R&D) による CCL1 の定量を行った。また、Bio-Plex を用いて洗浄液中の 27 種類のケモカイン・サイトカイン濃度を測定した。

(3) 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング
アッセイ系として、mouseCCR8 を発現した細胞 CCR8-CHO 細胞を作製し CCL1 を加えたときの Ca^{2+} 流入を測定した。96 ウェルプレートを用いた測定は、学習院大学理学部生命分子科学研究所芳

賀達也所長・市山進助教の協力を得て、モレキュラーデバイス社 FlexStation を用いて行った。スクリーニング対象として、本年度は昨年度とは異なる2種類の低分子化合物ライブラリーを用いた。一つはファルマデザイン社より購入したケモカイン受容体特化ライブラリー(1000化合物を含む)である。また、分担研究者である乙卯研究所村竹らにより合成された低分子化合物134種類も同様にスクリーニング対象とした。化合物は、いずれもDMSOに溶解し10 μMの濃度で一次スクリーニングを行った。

(4) 腹膜癒着を阻害する新規化合物の探索と合成

CCR8発現細胞におけるCCL1誘導Ca動態の阻害活性測定系を指標としてスクリーニングを行ない、ヒットした標品につき類縁化合物を合成、構造活性相関(SAR)を確立する。さらに、上記で有望な化合物においてはマウスで作成した腹膜癒着モデルで*in vivo*活性評価を行ない、*vitro*アッセイ系結果との相関を判定しつつ、結果を新規合成化合物デザインへとフィードバックする。

(5) プロテオーム解析

マウス癒着モデルの腹腔洗浄液及びマクロファージのプロテオーム解析のため、2次元電気泳動の条件検討を行った。また、ヒト下部消化管切除術に際し、開始直後(術前)または終了の直前(術後)に腹腔内を1Lの生食で洗浄し、出来るだけ多くの液量を回収した。細胞分離後、トリクロロ酢酸(TCA)沈殿で濃縮し超遠心の後上清を回収した。PIERCE社 SwellGel Blue Albumin Removal kit及びGEヘルスケア Alubumin IgG removal kit)を用いてアルブミン除去を行った後、アセトン沈殿として蛋白質を回収した。同一患者より得た、術前、術後3症例のセットについて、2次元電気泳動2D-DIGE(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)解析を行った。

(6) CCL1/CCR8阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果と免疫系における影響

分担研究者によりライブラリーから選別されたヒット化合物や、既知の阻害剤に関連構造を持つ低分子化合物について評価した。マウスモデルとして、正中切開による開腹の後、腹壁にischemic buttonを絹糸による結紮で作成し、6日後に開腹して癒着の程度をスコア化する実験を行った。阻害剤は、開腹術終了直後に腹腔内に一回投与を行った。この際、マウスから腹腔内滲出細胞を採取し、フローサイトメトリーで解析した。

倫理面の配慮

動物実験は動物愛護の立場からも考慮して計画し、施設の委員会の承認を得て行った。手術時の標本採取に関しては、被験者の自由意志による

研究協力に基づいて、その安全とプライバシーの確保を担保した計画を立て、国立国際医療センターおよび共同研究先である自治医大大宮医療センターの倫理委員会の審査を受けて承認を得た後に開始した。

C. 研究結果

(1) 腹腔内滲出細胞におけるケモカイン受容体発現

術中、術後の腹腔内洗浄液から回収された細胞から、CCR8のmRNA発現が確認された。

(2) 腹腔内洗浄液におけるケモカイン・サイトカイン関連分子の測定

腹腔洗浄液中の総蛋白濃度は出血を反映していると考えられるが、CCL1は総蛋白濃度に関係なく上昇が見られた。また、術後にTNF-αの濃度が顕著に上昇していることがわかった。このほかにも術後に腹腔内で上昇するケモカイン4種類、サイトカイン2種類が同定された。

(3) 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング
ケモカイン受容体特化ライブラリーのうち600化合物のスクリーニングが終了した。CCL1によるCa²⁺流入を100%としたとき、10 μMの化合物を加えたときに、Ca²⁺流入が27%にまで低下するヒット化合物が1個あった。また、乙卯研究所134化合物のうち、50%以下となるものが9種類あった。これらの化合物の阻害効果の濃度依存性を確認したところ、ケモカイン受容体特化ライブラリーよりの一つと乙卯研化合物の5種に濃度依存性のある阻害活性がみられた。しかし乙卯研化合物の3種類は高濃度(50 μM)でATP誘導による非特異的なCa²⁺流入を強く阻害した。これらの化合物を培養細胞に添加したときの細胞の状態を観察すると、2時間の培養で細胞死誘導あるいは細胞接着の阻害活性が認められ、細胞毒性のためにCa²⁺アッセイも低下していたことが明らかとなった。

(4) 腹膜癒着を阻害する新規化合物の探索と合成

In vitro ランダムスクリーニングの結果、145種低分子化合物のうち、9種にCCL1拮抗作用が認められた。このうち数種は毒性が強かったため、他の有望化合物を*vivo*アッセイ用に追加調製、さらに類縁化合物を*vitro*用に合成した。また、レチノイド活性を有する化合物がマウスを用いた*vivo*アッセイで再現性よく癒着阻害活性を示した。

(5) プロテオーム解析

マウスRAW264.3細胞の2次元電気泳動を行い、1000個以上のスポットを検出する条件を確立した。また、本年度は、マウスおよびヒト腹腔洗浄液なども使い、手術時腹腔内洗浄液を用いたケモカインやサイトカイン等低分子量の微量な蛋白

の二次元電気泳動のためのサンプル調整法、とくにアルブミン除去の過程の比較検討を行った。また、泳動条件検討も行い、最終的に方法の項目に記載した調整法を決定した。手術開始時と終了時の腹腔洗浄液を比較して発現変動を示す分子を同定するためのディファレンシャル解析を開始した。

(6) CCL1/CCR8 阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果と免疫系における影響

分担研究者の乙卯研究所村竹が合成した、マクロファージ機能を修飾すると予測される低分子化合物が、*in vivo* でも術後の癒着を阻害することが明らかになった。癒着抑制効果・促進効果をそれぞれ有する化合物も同定された。

D. 考察

ヒト腹腔内洗浄液中の細胞としては、単球系と、中皮細胞を同定しているが、これらの細胞成分から CCR8 mRNA が確認され、術後洗浄液中の CCL1 濃度の上昇が見られた。また洗浄液中のサイトカインなどは侵襲による出血の影響を大きく受けると予想されるが、出血を反映すると考えられ総蛋白濃度と CCL1 の濃度は必ずしも平行しないことから、腹腔内の応答として放出されたものと思われる。以上の結果より、マウスと同様に腹腔内侵襲時の応答として CCL1/CCR8 系が作用している可能性がある。また、サイトカイン・ケモカインの測定により、腹腔内で、手術侵襲により変動するものが同定されたので、CCL1 を含めて、今後ヒトの *in vitro* 系で細胞凝集をおこすかどうかを検証することが可能となった。また、あらたな癒着診断のための測定の組み合わせを考案することも可能である。プロテオーム解析に関しては今後もディファレンシャル解析を行う症例を蓄積する。そして普遍的に術前後での変動が重要と考えられるスポットを決定し、マススペクトロメトリにより同定する予定である。マウス腹膜癒着の阻害効果については、構造と癒着の促進・抑制効果との間に機能相関を示唆する結果も得られているので、さらに関連の構造を持つ化合物を合成し、*in vitro* および *in vivo* での効果を検証していく予定である。癒着が強い個体で腹腔マクロファージでの発現が減少する表面マーカーについてはその機能がまだ良く理解されていないが、診断や予後推定に使えるかどうか検討を行う価値はあると考える。

CCR8 阻害活性を持つヒット化合物について *in vitro* アッセイで活性を示した化合物はロダニン骨格、チアゾール骨格、フェナレン骨格を有する芳香族カルボン酸化合物であった。この内ロダニン骨格を有する化合物は核内のオーファン受容体等を標的として新たに合成した化合物であるが、目的のリガンド活性は確認でき

なかった化合物であり、受容体の選択性という観点からも興味を持たれる。また、*vivo* アッセイで有効性が示されたレチノイド活性を有する化合物群が、受容体 CCR8 のリガンドとなり得るのか、また、ケモカイン CCL1 に対し直接の拮抗作用を有するのかなどについては今後も検討、解明すべき課題である。このように、ヒット化合物は近縁構造の化合物を発注及び合成中であり、スクリーニングを継続する予定である。

E. 結論

ヒト手術中の腹腔洗浄液から、CCL1 を検出し、また細胞から CCR8 を検出することができた。このほかにも手術侵襲により腹腔内に分泌されるケモカイン・サイトカインを同定した。マウスでの条件棟をもとに手術中の腹腔洗浄液の低分子蛋白質のプロテオーム解析を開始した。マウス *in vivo* 癒着モデルで腹膜癒着阻害効果のある低分子化合物を見いだした。CCR8 阻害活性によるスクリーニングでも有望な化合物群が見つかりつつあり有望な化合物群が見つかりつつあり、継続して検討を行ない、より高活性、かつ選択性の高い化合物を探索することが不可欠であると考ええる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T: Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions. *J Immunol* 178:5296-5304, 2007
2. Mizutani, N., Sakurai, T., Shibata, T., et al.: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J Immunol*, 79:7478-7487, 2007.
3. Yamashita R, Fujiwara Y, Ikari K, Hamada K, Otomo A, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Extracellular proteome of human hepatoma cell, HepG2 analyzed using two-dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Mol Cell Biochem.* (2007) 293, 83-92
4. Nakahara M, Saeki K, Yogiashi Y, Kimura A, Horiuchi A, Nakamura N, Yoneda A, Saeki K, Matsuyama S, Nakamura M, Toda T, Kondo Y, Kaburagi Y, Yuo A. The protein expression profile of cynomolgus monkey embryonic stem cells in two-dimensional gel electrophoresis: a successful identification of multiple proteins using human databases. *J Electrophoresis.* (2007) 51, 1-8
5. Yamaguchi N, Koizumi H, Aoki J, Natori Y, Nishikawa K, Natori Y, Takanezawa Y, Arai H. Type I platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits over-expression induces pleiomorphic nuclei and centrosome amplification. *Genes to Cells* 12:1153-1161, 2007

2. 学会発表

1. Dohi T: Searching targets for the treatment of chronic intestinal inflammation and mucosal injury, JSI-RCAI Workshop 粘膜免疫機構の制御と破綻-粘膜免疫における基礎と臨床の対話-Yokohama, March 14, 2008
 2. Mizutani N, Kawashima R, Kawamura YI, Imai T, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Fractalkine regulates macrophage function in a dose-dependent manner through CX3CR1, 第37回日本免疫学会, 東京, 2007年11月22日
 3. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-sorimachi N, Dohi T: Interleukin-13 disrupts the cell-cell adhesion of intestinal epithelial cells, 第37回日本免疫学会, 東京, 2007年11月21日
 4. 土肥多恵子: IL-13 作用の調節による消化管上皮細胞の再生促進, 第49回日本消化器病学会大会(JDDW), 神戸, 2007年10月19日
 5. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Noriko T-S, Imai T, Dohi T: Fractalkine induces PPAR- γ and regulates cytokine release in macrophages, 13th International Congress of Mucosal Immunology, 2007, July 10
 6. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T: CX3-chemokine fractalkine modulates the macrophage function, 16th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2007, Shizuoka, 2007, June 14
 7. 土肥多恵子: 消化管穿孔性病変における腹腔内生体防御機構, 第44回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2007年7月8日
 8. 土肥多恵子: 消化管炎症における免疫応答と組織修復, 神戸免疫アレルギー談話会, 神戸, 2007年6月14日
 9. Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T: Fractalkine Regulates TNF- α secretion by macrophages with induction of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its ligand, Digestive Disease Week 2007, Washington D.C., 2007 May 23
 10. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Saito Y, Kawamura YJ, Konishi F, Dohi T: Aberrant responses of human colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide in ulcerative colitis: upregulated expression of MD-2 and production of inflammatory cytokines, Digestive Disease Week 2007, Washington D.C., 2007 May 22
 11. 土肥多恵子: 消化管の免疫/炎症と組織修復, 第5回広島消化器免疫研究会, 広島, 2007年4月10日
 12. 山下亮: ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第3回メタボリズムネットワーク研究会, ポスター発表, 大磯, 3月, 2007.
 13. 鏑木 康志, 山下 亮, 安田 和基, 野田 光彦. 初期糖尿病性腎症患者由来尿蛋白のプロテオーム解析. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演, 仙台, 5月, 2007.
 14. 山下 亮, 井狩高平, 安田和基, 関原久彦, 鏑木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第80回の日本内分泌学会学術総会, ポスター発表, 東京, 6月, 2007.
 15. 井狩高平, 山下亮, 郡司眸, 浜田圭子, 安田和基, 野田光彦, 鏑木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの2D DIGEによる検索. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, ポスター発表, 東京, 7月, 2007.
 16. 浜田圭子, 山下亮, 井狩高平, 安田和基, 鏑木康志. IRS 高発現 CHO 細胞の核抽出液でのプロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, ポスター発表, 東京, 7月, 2007.
 17. 鏑木康志. 糖尿病性腎症・早期尿マーカーの2D DIGEによる検索. 第7回 Tokyo Diabetes Seminar, 口演, 東京, 7月, 2007.
 18. 山下亮, 井狩高平, 安田和基, 鏑木康志. ウシ血管内皮細胞における DHEA の抗アポトーシス作用. 第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会, 口演&ポスター発表, 横浜, 12月, 2007.
 19. 井狩 高平, 山下 亮, 郡司 眸, 浜田 圭子, 安田 和基, 鏑木 康志. プロテオーム解析を用いた早期糖尿病性腎症・尿マーカーの検索. 第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会, 口演&ポスター発表, 横浜, 12月, 2007.
 20. 高橋 枝里, 岡村 匡史, 井狩 高平, 平野 久, 安田 和基, 鏑木 康志. LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析. 第30回日本分子生物学会・第8回日本生化学 合同大会, ポスター発表, 横浜, 12月, 2007.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - a) 村竹英昭, 野口真行, 首藤紘一「5員環化合物(レチノイド作用を有する5員複素環化合物)」特願 2007-211649.
 - b) 首藤紘一, 村竹英昭: レチノイドプロドラッグ化合物. 特願 2006-275097.
 - c)
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3.その他
なし

規格化された高品質な成育バイオリソースと異種由来成分を排除した完全ヒト型培養システムの構築—再生医療・細胞治療の有効性、安全性の検証システムの標準化—

所 属 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部
研究者 梅澤 明弘

研究要旨 細胞プロファイリングに使用するリコンビナントレクチンの改良・機能変換の手法として遺伝子変異導入法がある。変異導入後のスクリーニング法としてファージ提示ライブラリーを利用する技術は有用なツールであるが、非特異的結合ファージが増幅されるなどの問題点の改善が必要である。我々はファージ上へのレクチン提示技術に焦点をあて、ファージ上へのレクチン提示率を従来の数10倍以上に向上させ、スクリーニング方法の改善を行った。個々の疾患に関しては、子宮内膜症の分子マーカーとして DIF-1/IgE-dependent Histamine Releasing Factor (HRF) の有用性を見出し、心筋細胞を心臓組織へ移植し生着させる方法を開発すると同時に、その安全性も評価した。細胞プロファイリングに対する新たな技術として、リコンビナントレクチンの改良・機能変換の手法として遺伝子変異導入法の改良を行った。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。

分担研究者

東京医科大学医学部
慶應義塾大学医学部
株式会社ツーセル
ジェイ・エム・エス株式会社
サミット・グライコリサーチ株式会社

黒田 雅彦
三好俊一郎
仁科 博道
鈴木 康二

中外製薬株式会社
セルテスコメディカルエンジニアリング(株)

岡本 英治
樋口 正人

オリンパス株式会社
住友ベークライト株式会社
コニカミノルタテクノロジーセンター

藤沢 章
田村 知明
河村 健司

株式会社ジー・シー

(株)
須田 美彦
山中 克之

A. 研究目的

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、成育バイオリソース (胎盤、臍帯血、骨髄、胎児付属物等) 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

1) 異種動物成分を排除した培養法・維持法の標準化 (完全ヒト型培養システムの開発)

成育バイオリソース (胎盤、臍帯血、骨髄、胎児付属物等) よりヒト間葉系幹細胞を得る。既に、それぞれの組織から間葉系細胞が得られ、それらが少なくとも複数の分化形質を示すことに本申請の中核機関ならびにサブ機関において明らかにすることに成功している。初年度に、臨床試験研究に提供できる新たな間葉系細胞の分離・培養を行う。同時に、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法の開発を目指す。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を行う。中でも、自己再生因子の関与が予想されるが、それについての研究の方向性を明らかにし、必要があれば本研究内でその同定に関する研究を開始する。フィーダー細胞について、最適の細胞を同定しその培養法についての情報を整備する。

2) 間葉系細胞の規格化

pCANTAB5Eファージミドベクターへ、N末端シグナ

ル配列を除いたMAH及びMAL (A10)の構造遺伝子断片を挿入した。これらのベクターを大腸菌TG1株へ形質転換し、ヘルパーファージM13K07を加えて培養後、培養上清より定法にてファージ粒子を調製し、ファージタイターチェックを実施した。さらに調製したファージ表面のpIII蛋白質とMAHまたはMAL (A10)が融合していることを確認するため、抗MAHウサギポリクローナル抗体をMaxiSorp 96 well Plateに固相したものを用いて、レクチン提示ファージ粒子の結合性につき評価した。

3) 幹細胞を用いた治療基盤の確立

ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムの開発ならびに分化形質発現システムを通じた情報収集を行う。ヒト間葉系幹細胞の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討を開始した。具体的には、最新のバイオテクノロジー技術を用いた、細胞シート移植方法を利用して、ラット初代培養心筋細胞シートを作製する。ラット心筋細胞は、その後、拒絶反応の無い、無胸腺ラット心臓表面に移植される。移植された細胞の生着および、心筋への分化度を免疫組織学的検討を行い観察し、さらにホストとの電気的結合の有無を、膜電位感受性色素を用いた光マッピングシステムを用いて観測する。さらに、一部の子宮内膜症患者血清中に DIF-1/HRF タンパク質が上昇していることをウエスタンブロットにて確認している。このことから、DIF-1/HRF が有用な分子マーカーである可能性を考え、ELISA 系の測定法の開発及び抗 DIF-1/HRF モノクローナル抗体の作製を昨年度行った。一方で、昨年度のモノクローナル抗体を用いた ELISA 系は、完成したものの十分な感度を得ることが出来なかった。そこで、今年度、新規に HRF リコンビナントを作成し、抗 DIF-1/HRF モノクローナル抗体の作製と治療応用を試みた。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において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)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

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する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。

実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 結果

月経血、胎盤、臍帯血、骨髄より間葉系細胞の培養を開始しており、それらが少なくとも複数の分化形質を示すことに成功した。ヒト血清ならびにヒト液性因子のみからなる培養法を確立し、Non-stress 培地として数施設に提供し、その妥当性についての報告を受け、新規開発へフィードバックを開始した。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を終了している。ヒト間葉系細胞の規格化については、全長 cDNA レベルでのプロファイルを明らかとした。さらに、網羅的発現遺伝子解析(Affymetrix 社 GeneChip による解析)ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行っており、それらはデータベースとして構築中である。使用するモノクローナル抗体は、ヒト幹細胞のマーカーとして知られている SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補マーカーも含み、ヒト間葉系細胞を免疫することによる新規モノクローナル抗体も申請時において数クローン得ており、そのクローン数は増加中である。

市販品の蛋白提示ファージシステムをそのまま使用した場合、レクチン蛋白提示量が不十分であり、スクリーニング系として使用困難であることが判明した。MAH、PHA-L、LCA の各レクチン遺伝子の上流の gIII シグナル配列に換えて、OmpA signal、DsbA signal、改変 gIII signal を使用することで、各種レクチンの提示量が増加した。MAH と LCA の反応性をそれぞれ ELISA 法にて、ビオチン化ヒト IgG Fc フラグメント及び Sialyl T ポリマーを用いて実施したところ、OmpA signal 及び改変 gIII signal で 10-25 倍のシグナル増加を確認できた。またヘルパーファージを変更し、OmpA signal を MAH に対して使用した場合では、ELISA 法にて約 25 倍のシグナル増加が確認できた。

ヒト間葉系細胞(子宮内膜由来・月経血由来・胎盤由来・羊膜由来)は *in vitro* で心筋への分化誘導が確認出来たが、細胞シートを用いた移植方法では、今のところ、移植細胞の成熟した心筋細胞への分化は確認出来ていないし、しばしば、生着自体が観察されない場合がある。そのため初代心筋細胞で作製した細胞シートを用いた移植を用いる。移植されたシートは、免疫組織学的検討で、ホスト心筋組織上に、横紋構造やギャップ結合を有しており、良好に生着が観察された。光マッピング法を用いた電気的同期性の検討では、ホスト心筋細胞と、移植片との間での電気的結合が観察され、生着のみならず、機能的な同期現象が観察された。

HRF リコンビナント蛋白質をマウスに注射し、ハイブリドーマを作製した。ELISA の検討では、15 種類のクローンが確認され、ウエスタンブロッティングにおいて、特異性の高いクローンを 3 種類同定した。本抗体は、培養上清においても 1000 倍希釈でも

反応した。さらに、本抗体を用いた ELISA プレートの開発に成功した。

D. 考察

細胞移植を行う場合、移植する細胞数を多くするために、細胞培養することが要求され、その過程で生じる細胞老化では単に DNA 合成が阻害されているだけと考えられていた。しかし、実は細胞質分裂も阻害されていることが示され、このことがより安定に増殖停止を起こしている理由の一つと考えられる。その細胞老化が誘導されると ROS の産生が上昇するため細胞周期の複数のチェックポイントが活性化される。このことは老化細胞が安定に増殖停止を起こす原因となっていると考えられるが、もしかすると様々な遺伝子異常を引き起こす原因にもなっている可能性も考えられる。

国立成育医療センターにて提供される成育バイオリソース（胎盤、臍帯血、骨髄、胎児付属物等）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して臨床応用に耐え得る細胞の有効性・安全性の標準化を図る。本研究を遂行することによ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ヒト細胞を適切に提供するシステムを構築すること可能であると考えられた。

E. 結論

従来、細胞移植の妥当性については、移植された組織を採取することにより、病理組織学的に検討をすすめてきた。しかし、患者さんの侵襲は大きく、さらに移植する細胞に対して、遺伝子を導入することでラベルする必要が存在した。遺伝子を導入することは、そのランダムなクロマチンへの導入により、細胞の形質転換の可能性を完全に否定できず、その医療への応用は否定的に考えられてきた。さらに導入する遺伝子がクラーゲ由来の蛍光色素および細菌由来の酵素であったために、その安全性・妥当性に関し、医療現場での使用が難しい面は否定できない。本研究において SPIO による MRI 造影剤の可能性を追求し、再生医療にむけてナノテクノロジーを用いた新素材を応用することにより、医療面における安全性を保持したままで、移植後、数時間から 1 日といった治療後極めて早期に、MRI により検証できる。このことは、極めて低侵襲性の、再生医療に対する検証システムが開発されることを意味する。

また、ヒト細胞を増殖させ、疾病に対する新たな細胞治療法の開発に関する基盤的情報を得ることができ、それらについての情報を米国・欧州のデータベースに登録できた。再生医療・細胞治療に用いる細胞の安全性の検証システムはこのような基盤的情報のデータベース構築からそれを利用するバイオフィーマティクスの確立、さらに実際に細胞を取り扱う際の作業工程におけるバリデーション項目を医薬品製造レベルまで高めていくことが必要不可欠であるとともに、生命倫理に照らし合わせた一つ一つの手続きを踏むことが重要である。

F. 研究発表

論文発表

Toyoda M, Takahashi H, Umezawa A. Ways for a mesenchymal stem cell to live on its own: maintaining an undifferentiated state ex vivo. *Int J Hematol.* 86(1):1-4. 2007.

Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. Working³ cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res.* 313(12): 2550-62. 2007.

Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell.* 18(5):1586-94. 2007.

Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007.

Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res.* 313 :698-706. 2007.

Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and endochondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem.* 100(5):1240-54. 2007.

Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1160(1-2):263-9. 2007.

Shimomura T, Yoshida Y, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Murai R, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatology Res.* 37(12):1068-79. 2007.

Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett.* 581(24):4685-90. 2007.

Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T,

Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem cells*. 25(8):2017-24. 2007.

Miyoshi S, Ikegami Y, Itabashi Y, Furuta A, Umezawa A, Ogawa S. Cardiac cell therapy and arrhythmias. *Circ J*. 2007;71 Suppl A:A45-9.

Zhang J, Hakansson H, Kuroda M, Yuan L. Wapl localization on the synaptonemal complex. A meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes. *Reprod Domest Anim.*, 43:124-6, 2008.

Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, Muroi S, Kuroda M, Hatam F, Littman DR, Taniuchi I: Repression of interleukin (IL)-4 in T helper type 1 (Th1) cells by Runx complex through binding to IL-4 silencer. *J Exp. Med.*, 204:1749-1755, 2007.

Ohyashiki K, Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH: Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2 V617F mutation, *Leukemia*, 21:1578-80, 2007

Ohbayashi T, Oikawa K, Yamada K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Satoh H, Mukai H, Mukai K, Kuroda M: Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability. *Biochem Biophys Res Commun* , 356:699-704, 2007.

Iwaya, K, Oikawa, K, Semba, S, Tsuchiya, B, Mukai Y, Otsubo T, Nagao T, Izumi K, Kuroda, M, Domoto H, Mukai K: Correlation with liver metastasis of the colocalization of Arp2/3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci*. 98:992-999,2007.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし