

害する活性が誘導されるかどうかは重要なポイントとなる。そこで本年は transformation regression assay によりこの点を検討した。EBV 未感染のヒト化マウスから分離した末梢血単核細胞に EBV を感染させた後、EBV 感染マウスから分離した CD8 陽性細胞を混合して培養すると、感染細胞の増殖が阻害されることが示された。一方未感染マウスから分離した CD8 陽性細胞は増殖阻害作用を示さなかった。

5. 臍帯血造血幹細胞の分化・増殖メカニズムに関する研究

7日間共培養後、Dll-1 発現培養に比較し、Jagged-1 発現培養では未分化造血前駆細胞である CD34+/CD38-細胞及び血管内皮系細胞である CD31+/KDR+細胞の増加が認められた。また Jagged-1 刺激培養では VEGF-A や eNOS 発現が増加していた。In vivo での検討でも、Dll-1 刺激細胞に比較し、Jagged-1 刺激細胞は虚血肢の血流が改善し、血管密度の増加が認められた。

6. 臍帯血 DLI に関するアンケート調査

臍帯血 DLI の実施に向けて、全国 146 施設を対象としてアンケート調査を行った。これは、厚生労働省厚生労働科学研究（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班との共同作業である。質問の項目は以下の通り。

- A) 将来的に ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞輸注治療に参加する可能性
- B) 臍帯血 CD4-DLI の適応として重要と思うもの
- C) 仮に一部の細胞を培養に供することが正式に承認された場合、供与できる量
- D) 臨床第 I 相試験への協力の意思
- E) プロトコル委員としての参加の意思
- F) 臍帯血移植後において応用を希望する細胞治療についての自由意見

67 施設から回答を得た。61 施設から治療への参加の可能性があるとの回答を、50 施設から第 I 相臨床試験の協力の可能性があるとの回答を得た。目的としては、原疾患の再発、生着不全、移植後日和見感染症、EBV 関連リンパ増殖性疾患などが挙げられ、それに比すれば予防投与の要望は多くなかった。もし各

条件が整い、バッグから供与できる体制となった場合には、0.5-1.0ml 程度を供与可能、あるいは総細胞数によって決めるべきとの意見が多かった。

本研究班と上記研究班との共同研究体制は極めて重要であり、研究内容の棲み分けについて協議を重ねた。その結果、臍帯血培養 T 細胞の基礎的検討、標準作業手順書の作成、培養条件の至適化、臨床研究の枠組みの策定、臨床研究プロトコル作成、実際の臨床研究などを、両班で振り分け、より迅速に研究が進められるような研究体制が確立しつつある。平成 21 年度にはプロトコル委員会を立ち上げ、第 I 相試験を開始できる体制が整った。

D. 考察

1. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の検討

+7、ALyS 共に迅速かつ効果的な二次免疫応答、三次免疫応答に重要な TEM 等の記憶 T 細胞を増幅することが可能であった。+7 では TEM が主として増幅され、ALyS では Naive、Effector、TEM、TCM の 4 分画がほぼ同等に増幅された。従って、ALyS を用いた培養では Effector や E. M. による迅速な免疫応答が誘導され GVL 効果が発揮され、Naive により新規に感染したものにも対応できると考えられた。以上より、臍帯血 T リンパ球を十分に活性化し且つ増幅する点において、ALyS が +7 と比べて優れていると考えられた。

臍帯血 T 細胞活性化方法の再検討を行ったところ、増殖細胞数、活性化マーカー発現、培養後期での増殖能の維持、細胞形態の全てにおいて、CD3+CD28 抗体で処理した群は、抗 CD3 抗体単独で処理した群と比して良好であった。特に、培養後期に順調な増殖が継続する点で、これまでの（抗 CD3 単独による）活性化法に比べて優れていると考えられた。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現解析

活性化臍帯血 CD4 細胞では末梢血由来のものと比較して、IL-17A、IL-17F、ROR- γ t の発現が低く、FoxP3 の発現が高いことが強く示唆された。移植における GVHD 反応については、FoxP3 を発現する制御性 T 細胞は抑制的に、逆に IL-17 産生 T 細胞は増強的に作用する可能性が示唆されている。この点を考慮すると、臍帯血 CD4 (+) T 細胞の方が抑制性 T

細胞の性格が強く、逆に IL-17 産生 T 細胞の性格が弱いと考えられ、より DLI 療法に適している可能性がある。しかしながら上記の結果については、血液ドナーによるばらつきも大きいため、今後さらに検体数を増やして確認する予定である。

3. 臍帯血 DLI の安全管理法の確立について

PCR 法によるマイコプラズマ検出は nested PCR を用いるため、コンタミネーションを否定するために、他の方法との併用が必要となる。今回用いた培養法は迅速性に問題があるため、今後マイコアラート法を導入することを検討している。

迅速真菌検査については、今年度はヒトに感染する真菌種について、マルチプレックス検査系を構築した。今後は、環境から混入するおそれのある真菌について同様の検査法を開発する予定である。また、網羅的な検査法についてもさらに開発を進める予定である。

4. EBV 感染モデルマウスの作製と解析

EBV 感染モデルマウスにおいて、感染マウス由来の CD8 陽性 T 細胞が、EBV による B リンパ球不死化の過程、あるいは不死化リンパ球の増殖を阻害することが示唆された。臍帯血 DLI の作用メカニズムとしては、CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞の抗原特異的な作用も重要な役割を果たすことが示唆されていることから、この結果は、この感染モデルを用いて臍帯血 DLI の作用メカニズム解析が可能であることを示すと考えられる。

5. 臍帯血造血幹細胞の分化・増殖メカニズムに関する研究

骨髄ニッチにおける CB CD133 陽性細胞に対して、Jagged-1 は未分化前駆細胞の維持および血管系への増殖・分化を促し、Jagged-1 発現 HESS-5 を用いてヒト血管新生に効率的な細胞を増幅することが示された。

E. 結論

臍帯血 DLI の臨床試験実施に向けて、活性化臍帯血 T 細胞調製法の改良、遺伝子発現の網羅的解析による活性化臍帯血 T 細胞の特性の検討、臍帯血 DLI 前臨床試験の場としての EBV 感染モデルマウスにおける抗ウイルス免疫応答の解析、活性化臍帯血 T 細胞製剤の安全管理法としてのマイコプラズマ検出法の

確立と迅速真菌検査法の開発を行った。また、厚生労働科学研究（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班との共同作業を開始し、アンケート調査などを通じて臨床試験の実施体制を整えた。平成 21 年度に 5~10 例を目標として、安全性の確認を主目標とする第 1 相試験を実施する予定である。

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.* 198: 673-682, 2008.

2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., 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- κ B. *Virus Res.* 131: 170-179, 2008.

3) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.

4) Shiozawa Y, Takenouchi H, Taguchi T, Saito M, Katagiri YU, Okita H, Shimizu T, Yamashiro Y, Fujimoto J, Kiyokawa N. Human Osteoblasts Support Hematopoietic Cell Development in vitro. *Acta Haematologica.* 2008;120(3):134-145.

5) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N. Kinetics and effect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a

- recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther.* (in press)
- 6) Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Jap.J.phthlmalol*, 52(2):136-138, 2008
- 7) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br. J. Ophthalmol*, 92(7): 928-932, 2008.
- 8) Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br.J.Ophthalmol*. 92(4):505-8. 2008.
- 9) Kanno H, Watabe D, Shimizu N, 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, 2008.
- 10) Yamamoto S. Sugita S. Sugamoto Y. Shimizu N. Morio T. Mochizuki M. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. [Journal Article] *Japanese Journal of Ophthalmology*. 52(6):463-7, 2008
- 11) Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizuatni S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 2008 Jul 17. [Epub ahead of print]
- 129 Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga 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*.92(4):505-8、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.* 23: 1005-1008, 2008.
- 14) Morio T, Kim H. Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:598-603, 2008.
- 15) 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.
- 16) Takahashi N. Morio T. Common variable immunodeficiency. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 31(1):9-16, 2008
- 17) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 92:928-32, 2008.
- 18) 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.
2. 著書
- 1) 藤原成悦. 動物モデル「EBウイルス」(高田賢蔵 監修). 診断と治療社、東京, pp88-92、2008.
3. 学会発表
- 1) 伊藤 仁也 : Ex vivo 増幅臍帯血移植 第90回血液学会地方会近畿血液学会 (2008.11.22)
- 2) 伊藤 仁也 : 造血幹細胞の ex vivo 増幅技術の開発と応用 第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム (2008.12.12)
- 3) 伊藤 仁也 : Ex vivo 増幅臍帯血移植を行った急性骨髄性白血病の1例 第31回日本造血細胞移植学会 (2009.2.6)
- 4) 鹿村真之、伊藤仁也、大隅一興、関根暉彬 「リンパ球活性化培養法による細胞表面抗原の経時的変化について」

第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会(2008.11.18)

5) 鹿村真之、伊藤仁也、大隅一興、関根暉彬「リンパ球活性化培養法による Foxp3 発現の経時的変化について」

第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (2008.11.18)

6) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、服部高明、渡辺睦房、富満弘之、横田隆徳、水澤英洋、今留謙一、藤原成悦. 化学療法後に運動神経優位の末梢神経障害を認めた慢性活動性 EB ウイルス感染症. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

7) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、今留謙一、藤原成悦. Capizzi 療法 AraC 投与時に高度の発熱、心不全を合併した慢性活動性 EB ウイルス感染症成人例 3 例の臨床経過の検討. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

8) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. EB ウイルス研究会. 2008 年 7 月 18 日、米子.

9) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26 日、岡山.

10) 堀内保臣、宮川世志幸、片桐洋子、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬. 免疫不全マウスを用いたヒト造血細胞に対する放射線照射生物影響の生体内解析系. 第 50 回日本小児血液学会, 千葉, 11 月 14-16 日, 2008.

11) 和田美夏、権相模、江口正倫、伊藤理恵、小堀みちる、穂積勝人、松本太郎、麦島秀雄、増田治史、浅原孝之、ヒト CD133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞における Notch シグナルの役割. 東京、第 8 回日本再生医療学会, 2009.3.5-7.

12) 森尾友宏、高橋尚美、水谷修紀 ICOS 欠損症における T 細胞機能異常、第 2 回日本免疫不全症研究会、2009 年 1 月 30 日、東京

13) Tomohiro Morio Ex vivo expansion of CD4

T-cells from cryopreserved cord blood and its application in adaptive immunotherapy post cord blood transplant. 第 35 回日本低温医学会総会、2008 年 11 月 21 日、東京

14) 森尾友宏、造血幹細胞移植後の細胞治療の現状と展望、第 3 回新潟細胞再生療法フォーラム、2008 年 10 月 24 日、新潟

15) 森尾友宏、造血細胞移植後 ex vivo 増幅 CD4T 細胞輸注療法、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10 日-12 日、京都

16) 森尾友宏、増殖リンパ球による細胞療法、第 15 回ヘルペス感染症フォーラム、2008 年 8 月 22 日-23 日、札幌

17) 森尾友宏、梶原道子、清水則夫、伊藤仁也、藤原成悦、大隅一興、関根暉彬、造血幹細胞移植後ウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法、第 56 回日本輸血・細胞治療学会、2008 年 4 月 26 日、福岡

18) Morio T, Watanabe F, Takahashi N, Sato M, Sato R, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Domenico Delia, Nakamura K, Richard Gatti, Mizutani S. Ataxia-Telangiectasia in Japan: Phenotypic variations in affected siblings with Ataxia-Telangiectasia. Ataxia telangiectasia workshop 2008, Ohtsu, April 22-25, 2008.

19) Morio T Ataxia telangiectasia: Involvement of ATM in immunodeficiency and leukemogenesis. Symposium on Recent Advances in Cell Function and Defense Mechanism, Seoul, April 18, 2008.

20) Morio T. Immunodeficiencies with impaired DNA damage response. Recent Advances in DNA Damage Response, Seoul, April 18, 2008.

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
研究期間 平成18年4月～平成21年3月

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、手術中の腹腔内洗浄液中の細胞表面マーカーやケモカイン受容体発現解析を行うとともに、手術前後の腹腔内洗浄液中のサイトカイン・ケモカインを定量した。腹腔内洗浄液に含まれる低分子蛋白質の網羅的解析を目的としてプロテオーム解析の条件を決定し、術前後での変化を2次元電気泳動で定量的に解析した。また、癒着を誘導するケモカイン CCL1 の阻害剤を、2種類の低分子化合物ライブラリーからスクリーニングした。得られたヒット化合物の活性を、*in vivo* 腹膜癒着動物モデルで検証し、癒着阻害活性を示す化合物が複数得られた。

分担研究者

- (1) 国立国際医療センター研究所 鎌木 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(20年3月まで)
- (3) 乙卯研究所 村竹 英昭

A. 研究目的

1. 研究目的

本研究の目的は新規癒着防止剤の創製である。

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。我々は、これまでに、マウスでは、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、それによって腹腔マクロファージも CCL1 とその受容体 CCR8 を特異的に発現するためにこのため腹腔マクロファージは傷害中皮細胞の局所で細胞塊を形成することを見いだした。この機構は同時に癒着を誘導するトリガーになっており、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。本研究の目標は次の3点である。

(1) 癒着に関連する腹腔内に放出される分子の網羅的解析による診断治療のターゲット探索。開腹手術時のマウス腹腔内及び血清中蛋白を解析するとともにヒト腹腔内洗浄液のプロテオーム解析を行い、腹腔内のサイトカイン/ケモカイン応答を理解する。

(2) CCL1/CCR8 の低分子阻害剤の *in silico* 及び *in vitro* ハイスクリーンによる探索とヒット標品についての類縁化合物の合成と

構造活性相関 (SAR) の確立、有望化合物の絞り込み。

(3) ヒット化合物について *in vivo* での効果および細胞毒性等につき評価する。術後癒着以外の腹腔内疾患(癌腹膜播種や子宮内膜症)における CCL1/CCR8 系の意義も検討する

B. 研究方法

(1) 癒着に関連して腹腔内に放出される分子の網羅的解析。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。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。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 Albumin 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。

(2) 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング・腹膜癒着を阻害する新規化合物の探索と合成。アッセイ系として、mouse CCR8 を発現した細胞 CCR8-CHO 細胞を作製し CCL1 を加えたときの

Ca²⁺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 mMの濃度で一次スクリーニングを行った。同じ検出をヒト細胞の系で行うためヒトCCR8発現細胞の作成を行った。ヒットした標品につき類縁化合物をライブラリーより選別あるいは合成し、構造活性相関(SAR)を検討した。(3)CCL1/CCR8阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果

上記の *in vitro* スクリーニング系でのヒット化合物に加え、ライブラリーから選別された化合物および関連構造を持つ低分子化合物を合成し、これらについて *in vivo* 評価した。マウスモデルとして、次の3種類を検証に用いた。(1)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無菌状態での癒着形成モデル。(2)開腹して盲腸先端を結紮し、注射針で、穿孔を作って閉腹する Cecal ligation and puncture (CLP)モデル。(3)開腹して盲腸先端を電気メス凝固モードで焼灼する Cecal ablation モデル。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または腹腔内投与を術後2日に追加した。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。阻害剤は、開腹術終了直後に腹腔内に一回投与を行った。また、癒着性腹膜炎以外の腹膜病変への応用の可能性を探るため、ヌードマウスにおけるヒト消化管癌細胞の腹膜播種モデル、子宮内膜症モデルの作成を行った。さらにヒトCCR8発現細胞を作成しモノクローナル抗体の作成を開始した。

倫理面の配慮

動物実験は動物愛護を十分考慮して計画し、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さいたま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)癒着に関連する腹腔内に放出される分子の網羅的解析。

術中、術後の腹腔内洗浄液から回収された細胞から、CCR8 mRNA 発現が確認された。術前後で大きな発現レベルの相違は確認できなかった。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。IL-6 および CCL5(RANTES)濃度は術後に5~40倍に著増した。IL-1 β , IFN- γ に加え、主要なマクロファージケモカイン MCP-1, MIP1- α , MIP1- β もすべての症例で増加がみられた。興味深いことにTNF- α の増加は7例中5例でみられなかった。IL-17は術前に既に200-1200 pg/mlの濃度で検出されたが、増加のみられたのは7例中3例のみであった。

(プロテオーム解析)

1.ラット血清を最も多い7種の蛋白を除去するアフィニティ・カラム(ProteomeLab IgY-R7, Beckman-Coulter)にて処理した後に、疾患モデルラット血清、正常ラット血清を各々13C6-NBS 試薬、12C6-NBS 試薬で標識した。これらの試料を混合後にトリプシン消化し、標識ペプチドをLCにて分画した。各分画をLC-MS/MS解析し、13C6-NBS 及び12C6-NBSにて標識されたペアピークの相対定量比を算出し、MS/MS解析にてアミノ酸配列を決定して蛋白を同定したが、全分画を通じて定量可能であった蛋白は24種類にすぎなかった。

2.マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞抽出液をアセトン沈殿後に二次元電気泳動にて解析して1000個以上の蛋白スポットを検出した。マウス腹腔内マクロファージでも同様な解析が可能であった。

3.マウス腹腔内洗浄液での二次元電気泳動による解析については、マウス腹腔内洗浄液からのアルブミン、IgG等の高含有量蛋白除去を検討した結果では、特異抗体を用いたProteomeLab IgY-R7(Beckman-Coulter)の除去効率が最も良好であった。マウスに腹部手術を行う前に採取した腹腔内洗浄液について、術後に癒着のみられたマウスと癒着のないマウスの2群に分けて解析を行った。マウス腹腔内洗浄液の前処理法としては、前年度に確立した沈殿法、限外濾過での濃縮にProteomeLab IgY-R7処理を組み合わせる方法を用いた。前処理後のサンプルを癒着のあるサンプルをCy3(赤)、癒着のないサンプルをCy5(緑)にてラベルし、2D DIGE法を用いたディファレンシャル解析にて2倍以上の変動を示す蛋白スポット検索した。その結果、癒着有りて増加する蛋白スポット70個、減少する蛋白スポット31個を認めた。

4.ヒト由来検体については4例の外科手術前後に採取された腹腔洗浄液を用いて解析した。前処

理法としては、第1段階として抗体を用いないアルブミン吸着カラム (SwellGel Blue Albumin Removal kit, Pierce) にてアルブミンを除去し、さらに第2段階として特異抗体カラム (Albumin IgG Removal kit, GE Healthcare) にてアルブミン及びIgGを除去した。これらのサンプルを Saturation Labelling Dye (GE Healthcare) にて標識し、2D DIGE法を用いたディファレンシャル解析にて有意な変動(2倍以上、 $p < 0.05$)の変動を示す蛋白スポットを検索した。その結果、手術後に有意に増加する蛋白スポット38個、減少する蛋白スポット1個を認めた。

(2) 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あまりの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 mM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 mM)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。したがって、細胞毒性の低いCCL1/CCR8阻害活性を持つ化合物はこのスクリーニングでヒットが3種類得られた。

(3) CCL1/CCR8阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果

In vitroでのヒット化合物に加え、乙卯研究所で合成された、レチノイド関連化合物をあわせて15種類の化合物をin vivoでの癒着モデルに使用し、癒着疎外効果を検証した結果、3種類の化合物に癒着予防効果がみられた。構造の違いにより、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。癌転移、子宮内膜症については、モデル確立を行った。

D. 考察

ヒトにおいても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明らかとなったが、その他にも、術後に上昇しているサイトカイン・ケモカインが見いだされヒトにおける新規ターゲットに関する情報が得られた。またスクリーニングによりCCL1/CCR8阻害および腹膜癒着阻害活性のある化合物が新たに見つかった。これらは腹膜癒着だけでなく、アレルギー免疫疾

患治療のための薬剤のシーズとなる可能性もある。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。

CCR8阻害活性を持つヒット化合物について 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が持たれる。3種類あるRARサブタイプ(α , β , γ)別活性選択性と腹膜癒着阻害活性の相関について、更なる知見の蓄積を要する。我々は特に $-\alpha$, $-\beta$ 選択性を指標とした活性化合物を絞り込みつつあり、近年 $-\gamma$ が炎症誘起性の受容体であると言われていたことを考慮すると、これらの癒着阻害活性に興味を持たれる。また、レチノイド活性を有する化合物群のin vivoアッセイでの効果にCCL1/CCR8阻害作用がどの程度貢献しているかについては今後解明すべき課題である。

プロテオーム解析に関しては、実験動物及び患者由来サンプルからLC-MS/MSを組み合わせたシステムを用いて、安定同位体ラベル化法を利用した定量法の一つであるNBS法を試みた。現行のion-trap MS/MS(LCQ, Thermo Scientific)での解析では、血清から24種類の蛋白の定量評価が可能であったにすぎないため、本研究計画での腹腔手術時の腹腔洗浄液での解析には不適であると考えられた。このため、ゲルを用いない安定同位体ラベル化法を利用した定量法での解析は中止し、最終的には二次元電気泳動を用いた定量法のみで評価することとした。また本研究計画の中で確立したヒト及びマウス由来腹腔洗浄液の前処理法を用いて、2D-DIGE法にて外科手術前後及び術後癒着の有無によって変動する蛋白を網羅的に検索した。その解析結果では、腹膜癒着に関連する蛋白スポットが数10個検出されており、今後CCL1/CCR8シグナル伝達を修飾する薬剤投与による変化の検討及びそれらの蛋白のLC-MS/MSによる同定によって、CCL1/CCR8シグナル伝達系を介して癒着促進に関与しうる蛋白の検索が可能である。

E. 結論

ヒト手術前後の腹腔洗浄液の比較形跡の結果から、CCL1を含むケモカイン・サイトカインの変化を明らかにした。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。

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. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T, DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer *Gastroenterology* 2008;135:142-151
 6. Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. *J Mass Spectrom Soc Jpn.* In press
 7. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS., Jakubowski A and Burkly LC.. TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology* 136:912-923, 2009
 8. 土肥多恵子 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009
6. 学会発表
1. 土肥多恵子, 中島 淳: 炎症における Th2 免疫応答の偏りによる大腸炎症発癌の促進, DDW-Japan, シンポジウム 1 炎症と消化器発がん, 札幌, 2006 年 10 月 11 日、札幌
 2. Mizutani N, Kawashima R, Kawamura YI, Imai T, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Fractalkine negatively regulates macrophage function, 第 36 回日本免疫学会学術集会, 大阪, 2006 年 12 月 13 日
 3. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Kawamura Y, Dohi T: Aberrant responses of colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide (LPS) in ulcerative colitis (UC), 第 36 回日本免疫学会学術集会, 大阪, 2006 年 12 月 13 日
 4. 井狩高平、山下亮、浜田圭子、大友明日香、安田和基、鎗木康志: IRS-1, IRS-2 高発現ヒト肝細胞のプロテオーム解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月、名古屋
 5. 浜田圭子、山下亮、井狩高平、大友明日香、安田和基、鎗木康志: インスリン/IGF 受容体による遺伝子発現制御の比較解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月、名古屋
 6. 土肥多恵子: 半導体ナノ粒子を用いた、腹腔内炎症における細胞交通と腹膜癒着機構の解明, Biomarker と DDS-ナノ技術の多元と諸相, 神戸, 2007 年 2 月 15 日
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 井狩高平、山下亮、郡司眸、浜田圭子、安田和基、野田光彦、鎗木康志. 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.
 14. 浜田圭子、山下亮、井狩高平、安田和基、鎗木康志. 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.

15. 鍋木康志. 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.
 16. 井狩 高平, 山下 亮, 郡司 眸, 浜田 圭子, 安田 和基, 鍋木 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, 1 2 月, 2007.
 17. 高橋 枝里, 岡村 匡史, 井狩 高平, 平野 久, 安田 和基, 鍋木 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, 1 2 月, 2007.
 18. 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
 19. Kawashima R, Kawamura IK, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occludin and claudin-2. 第 38 回日本免疫学会学術集会、京都、2008 年 12 月 2 日
- 海外
1. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Shirai Y, Saito Y, Toyama-Sorimachi N, Konishi F, Kawamura YJ, Dohi T: Aberrant response to indigenous lipopolysaccharide in the colonic lamina propria mononuclear cells in ulcerative colitis, The 4th Annual Meeting of JSIBD, Tokyo, Dec 1st, 2007
 2. Dohi T: TL1A deficiency reduces macrophage infiltration and colitis severity, 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, 2007, July 11
 3. 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
 4. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Saito Y, Kawamura YJ, Fumio, Konishi, 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
 5. Dohi T: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, 13th. US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo, June 13th, 2008
 6. Dohi T, Borodovsky A, Kawashima R, Wu P, Kawamura YI, Burkly LC. Tweak/Fn14 Pathway: Role in the Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Digestive Disease Week 2008, Selected as *Poster of distinction*, San Diego, U. S. A., May 18th, 2008
 7. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β -Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells. Digestive Disease Week
- G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
1. 特許取得
 1. 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.
 2. 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.

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、手術前後の腹腔内洗浄液中のサイトカイン・ケモカイン分泌の定量を行った。腹腔内洗浄液のプロテオーム解析の条件を決定し、術前後での変化を2次元電気泳動で定量的に解析した。また、癒着を誘導するケモカイン CCL1 の阻害剤を、低分子化合物ライブラリーからスクリーニングした。この結果得られたヒット化合物は、*in vivo* 癒着防止活性試験でも、阻害活性が示された。

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・楠木 康志
- (2) 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剤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 の低分子阻害剤の *in silico* 及び *in vitro* での探索を継続するとともに、*in vivo* モデルでの検証を進めること、手術前後のヒト腹腔内洗浄液中のケモカイン・サイトカイン測定及びプロテオーム解析を行う症例を蓄積し、定量的な解析に供することである。

B. 研究方法

(1) 開腹術の際に腹腔内に放出される分子の解析。本研究に使用した手術時の標本の採取は、自治医科大学附属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。下部消化管手術の際 1L の生理的食塩水で腹腔内を洗浄し可能な限りその液を回収するという方法で、同一の患者から手術前後に洗浄液を回収した。7 症例について Multi-Plex アッセイ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。

(2) 低分子化合物ライブラリーのスクリーニング・腹膜癒着を阻害する新規化合物の探索。昨年度に引き続きアッセイ系として、mouse CCR8 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、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、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 mMの濃度で一次スクリーニングを行った。同じ検出をヒト細胞の系で行うためヒトCCR8発現細胞の作成を行った。ヒットした標品につき類縁化合物をライブラリーより選別あるいは合成し、構造活性相関（SAR）を検討した。

(3)CCL1/CCR8 阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果 上記のヒット化合物に加え、ライブラリーから選別された化合物および関連構造を持つ低分子化合物を合成し、これらについて *in vivo* で検討した。マウスモデルとして、次の3種類を検証に用いた。(1)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無菌状態での癒着形成モデル。(2)開腹して盲腸先端を結紮し、注射針で、穿孔を作って閉腹する Cecal ligation and puncture (CLP)モデル。(3)開腹して盲腸先端を電気メス凝固モードで焼灼する Cecal ablation モデル。また、阻害剤の癒着性腹膜炎以外の腹膜病変への応用の可能性を探るため、ヌードマウスにおけるヒト消化管癌細胞の腹膜播種モデル、子宮内膜症モデルの作成を行った。さらにヒトCCR8発現細胞を作成しモノクローナル抗体の作成を開始した。

(4)プロテオーム解析

1. 患者及び実験動物由来検体からの網羅的蛋白同定を目的として、特に二次元電気泳動ゲル上で検出困難な低分子量の微量蛋白をディファレンシャル解析することを目標として、ラット血清を試料として同位体標識による2-D LC-MS/MSを用いた定量法（NBS法、島津製作所）を試みた。

2. 前年度は、マウス腹膜由来浸出液及び外科手術時に採取されたヒト由来腹腔洗浄液を試料として、沈殿法あるいは限外濾過にて濃縮後に、アルブミン、IgG等の高含有量蛋白除去をアフィニティ・カラム処理で除去する前処理法を確立した。これらの前処理法にて処理したサンプルを用いて二次元電気泳動を行い、2D-DIGE法による網羅的ディファレンシャル解析にて有意に変動する蛋白スポットを検索した。

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)開腹術に際して腹腔内に放出される分子の網羅的解析

術中、術後の腹腔内洗浄液から回収された細胞から、CCR8 mRNA 発現が確認された。CCL1は総蛋白濃度に関係なく術後に上昇が見られた。IL-6濃度は術後に5~40倍に著増した。IL-1b, IFN-gに加え、主要なマクロファージ遊走ケモカインもすべての症例で増加がみられた。興味深いことにTNF-aの増加は顕著でなく、IL-17は術前に既に200-1200 pg/mlの濃度で検出されたが、増加のみられたのは7例中3例のみであった。

(2)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 mM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145化合物ライブラリーのうち、50%以下となるものが10種類以上あった。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得られた化合物と乙卯研化合物のほとんどに濃度依存性のある阻害活性がみられた。細胞毒性などを確認した結果、CCL1/CCR8阻害活性を持つ化合物はヒットが4種類得られた結果となった。

(3)CCL1/CCR8 阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果

ランダムスクリーニングでのヒット化合物に加え、乙卯研究所で合成した、核内受容体の一種RAR (retinoic acid receptor)のリガンド候補として調製した化合物のあわせて15種類の化合物を *in vivo* での癒着モデルに使用し、癒着阻害効果を検証した結果、4種類の化合物に癒着予防効果がみられた。構造の違いにより、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。

(4)プロテオーム解析

1. ラット血清を、血清中で最も多い7種の蛋白を除去するアフィニティ・カラム (ProteomeLab IgY-R7, Beckman-Coulter)にて処理した後に、等量の疾患モデルラット血清由来蛋白、正常ラット血清由来蛋白を各々13C6-NBS試薬、12C6-NBS試薬で標識した。これらの試料を混合後にトリプシン消化し、NBS試薬で標識されたペプチドをフェニムカラムにて回収し、さらにHPLCにて分画した。各分画をLC-MS/MSにて解析し、13C6-NBS及び

12C6-NBSにて標識されたペアピークの相対定量比を算出し、LCQ Deca XP Plus (Thermo Electron)を用いたMS/MS解析にて標識ペプチドのアミノ酸配列を決定して蛋白を同定した。その結果、全分画を通じて定量可能であった血清蛋白は24種類にすぎず、二次元電気泳動を用いたディファレンシャル解析(2D DIGE法)と比較して有用性は認められなかった。このため、腹腔洗浄液の網羅的解析にはもっぱら2D DIGE法を用いることとなった。

2. マウスに腹部手術を行う前に採取した腹腔内洗浄液について、術後に癒着のみられたマウスと癒着のないマウスの2群に分けて解析を行った。マウス腹腔内洗浄液の前処理法としては、前年度に確立した沈殿法、限外濾過での濃縮にProteomeLab IgY-R7処理を組み合わせた方法を用いた。前処理後のサンプルを癒着のあるサンプルをCy3(赤)、癒着のないサンプルをCy5(緑)にてラベルし、2D DIGE法を用いたディファレンシャル解析にて2倍以上の変動を示す蛋白スポット検索した(図1)。その結果、癒着有りて増加する蛋白スポット70個、減少する蛋白スポット31個を認めた。また、ヒト由来のサンプルについては、4例の外科手術前後に採取された腹腔洗浄液を用いて解析した。前処理法としては、第1段階として抗体を用いないアルブミン吸着カラム(SwellGel Blue Albumin Removal kit, Pierce)にてアルブミンを除去し、さらに第2段階として特異抗体カラム(Albumin IgG Removal kit, GE Healthcare)にてアルブミン及びIgGを除去した。これらのサンプルをSaturation Labelling Dye(GE Healthcare)にて標識し、2D DIGE法を用いたディファレンシャル解析にて有意な変動(2倍以上、 $p < 0.05$)の変動を示す蛋白スポットを検索した(図2)。その結果、手術後に有意に増加する蛋白スポット38個、減少する蛋白スポット1個を認めた。

D. 考察

術後に上昇しているサイトカイン・ケモカインが見いだされヒトにおける新規ターゲットに関する情報が得られた。またスクリーニングによりCCL1/CCR8阻害活性および腹膜癒着阻害活性を有する化合物が新たに見つかった。CCL1はアレルギー反応に伴って産生されるケモカインでもあるので、これらは腹膜癒着だけでなく、アレルギー免疫疾患治療のための薬剤のシーズとなる可能性もある。また、RAR(retinoic acid receptor)のリガンド候補として調製した*in vitro*アッセイに供した化合物群は、長年に亘り様々な目的で合成した化合物であり、その骨格官能基は非常に多

岐にわたる。そのうち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オーファン受容体ROR等を標的として新たに合成したものの目的のリガンド活性は確認できなかった化合物であり、CCR8受容体に対する選択的活性が期待できるならば、その類縁体調製は比較的容易な化合物群である。しかしながらこれら骨格自体にCCL1拮抗作用があるとまでは判定できず、その周辺化合物の合成、評価およびその結果のフィードバックによる再合成は、その可能性と時間的、経費的な負担を考慮すると必ずしも得策とは言えない。

RARリガンド候補化合物には*vivo*試験において安定した活性を示すものがあり、有望と考えられる。今後、3種類あるRARサブタイプ(α , β , γ)別活性選択性と腹膜癒着阻害活性の相関について、更なる知見の蓄積を要する。我々は特に-a, -b選択性を指標とした活性化化合物を絞り込みつつあり、近年 γ が炎症誘起性の受容体であると言われていたことを考慮すると、これらの癒着阻害活性に興味を持たれる。

プロテオーム解析に関しては、今回、実験動物及び患者由来サンプルからLC-MS/MSを組み合わせたシステムを用いて、安定同位体ラベル化法を利用した定量法の一つであるNBS法を試みた。現行のion-trap MS/MS(LCQ, Thermo Scientific)での解析では、血清から24種類の蛋白の定量評価が可能であったにすぎないため、本研究計画での腹腔手術時の腹腔洗浄液での解析には不適であると考えられた。このため、ゲルを用いない安定同位体ラベル化法を利用した定量法での解析は中止し、今回の研究では二次元電気泳動を用いた定量法のみで評価することとした。また前年度までに確立されたヒト及びマウス由来腹腔洗浄液の前処理法を用いて、2D-DIGE法にて外科手術前後及び術後癒着の有無によって変動する蛋白を網羅的に検索した。上記の2D-DIGE法での解析結果では、腹膜癒着に関連する蛋白スポットが数10個検出されており、今後CCL1/CCR8シグナル伝達を修飾する薬剤投与による変化の検討及びそれらの蛋白のLC-MS/MSによる同定によって、CCL1/CCR8シグナル伝達系を介して癒着促進に関与する蛋白の検索が可能である。

E. 結論

マウス*in vivo*癒着モデルで腹膜癒着阻害効果の有望な化合物群が見出されつつある。少なくとも低分子化合物の骨格と官能基の配置については重要な知見が得られたと考えている。継続した検

討により、高活性な低分子化合物得られる可能性は高い。

ヒトにおいて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。腹膜癒着を制御する分子機構を解析するために、マウス癒着モデルの腹腔洗浄液及び外科手術前後のヒト由来腹腔洗浄液から腹膜癒着に関与しうる蛋白を2D-DIGE法にて網羅的に検索する実験系を確立した。今後この実験系を用いて、マウス由来腹腔内マクロファージ及び腹腔洗浄液、ヒト腹腔洗浄液等を試料として、腹膜癒着を予測しうるマーカー蛋白、CCL1-CCR8 制御系を介して腹膜癒着を制御する新規治療標的となりうる蛋白の発見が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 土肥多恵子 腹膜癒着を引き起こす、腹腔マクロファージの特異的ケモカイン応答臨床免疫・アレルギー科 51(2):168-173, 2009
2. Kaburagi Y, Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, Noda M. Proteomic Studies on Investigations of Diabetes. J Mass Spectrom Soc Jpn. In press

2. 学会発表

1. Dohi T: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, 13th. US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo, June 13th, 2008
2. 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
3. Eri Takahashi, Tadashi Okamura, Kohei Ikari, Hisashi Hirano, Kazuki Yasuda, Yasushi Kaburagi. Proteomic analysis of serum from diabetic LEA/Sendai rats. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis. August 2008, Sapporo
4. 鍋木康志、井狩高平、山下亮、郡司眸、浜田圭子、高橋枝里、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. 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会, 2008年7月、大阪
5. 鍋木康志. 糖尿病におけるプロテオミクス研究の現状と今後の展望. 第35回BMSコンファレンス, 口演, 2008年7月、裏磐梯
6. 鍋木康志、山下亮、井狩高平、郡司眸、浜田圭子、高橋枝里、平野久、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51回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演&ポスター発表, 2008年5月、東京
7. 高橋枝里、岡村匡史、井狩高平、平野久、安田和基、鍋木康志: LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 口演&ポスター発表, 2008年5月、東京

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. 2 実用新案登録
なし
3. 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 本研究では、既に主任研究者らの研究室で確立された骨髄由来の間葉系細胞培養システムを用いて、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する細胞提供システムを速やかに構築することを目指す。国立成育医療センター研究所の施設に有する GMP 基準に沿った機関内細胞プロセッシング・センターにおいて、日本国内の研究施設より要請があった場合に高い安全性を有し、標準化された培養システムによって増殖する間葉系細胞を提供する。これらの一連の作業を行うことにより間葉系細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになり、この提示された過程に従い、提供医療施設を増やしていくことになる。現在の間葉系細胞培養に使用されている条件は、ウシ血清、ウシ胎児血清、ならびに動物細胞、大腸菌等で作製されたヒト増殖因子が利用されており、外来種由来感染源の混入は否定できない。このため治療法としての安全性、有効性の基準の確立は急務であり、日本国内で進められている様々な幹細胞に対するフィーダー能を有するのみならず、その細胞自身が多分化能を有する間葉系細胞を適切に提供するシステム構築は、分子基盤を明らかにすると同時に推進していくことが社会への責務である。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う。臨床においても、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に骨髄間質細胞の移植が行われている。同時に、骨髄移植において生着不全を防ぐことを目的に、骨髄間質細胞移植が始められている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、in vivo において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。分化した細胞の同定はされていないが、間葉系幹細胞が最も近い位置にあると考えられている。ヒト組織由来の間葉系細胞の増殖をコントロールし移植への系を確立することは移植医療の新たなパラダイムの獲得につながり、さらに先天性代謝疾患を含めた成育疾患は細胞移植の最もよい対象であり、その治療法の確立をめざした本研究は、臨床応用までを視野に入れた具体的なアプローチである。疾患モデル動物に対して用いるために、ヒト間葉系細胞の分化誘導に関する条件をより具体的に確定する。ヒト細胞採取についての研究に関しては、国立成育医療センターおよび慶應義塾大学医学部における倫理委員会の既に審査を受け、承認を受けている。

- | | | |
|---------------------------|-------|-------------------------------------|
| 分担研究者 | | 藤沢 章 |
| (1) 東京医科大学医学部 | 黒田 雅彦 | (8) オリンパス株式会社 田村 知明 |
| (2) 慶応義塾大学医学部 | 三好俊一郎 | (9) 住友ベークライト株式会社 河村 健司 |
| (3) 福井大学医学部 | 宮本 薫 | (10) アルプラス株式会社 井上 剛臣 |
| (4) 株式会社ツーセル | 仁科 博道 | (11) コニカミノルタテクノロジーセンター
(株) 須田 美彦 |
| (5) ジェイ・エム・エス株式会社 | 鈴木 康二 | (12) 株式会社ジー・シー 山中 克之 |
| (6) 中外製薬株式会社 | 森口 佳之 | |
| (7) セルテスコメディカルエンジニアリング(株) | | |

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

ヒト細胞における安全性の確保

- 1). ヒト正常線維芽細胞における細胞老化の誘導に重要な働きをしている p16/RB-経路の作用機序を様々な分子生物学的および細胞生物学的手法により調べる。
- 2). p16^{INK4a} 遺伝子の発現を化学発光により正確かつ高感度に検出出来るベクターを開発し、そのベクターを組み込んだ細胞を用いて薬剤スクリーニングに応用できる系の確立を行う。

移植の供給源となる細胞のラベル

ヒト骨髄液より樹立した骨髄間質細胞を用いた。細胞培養液に Resovist を添加、細胞を一定時間暴露後することで細胞への導入を行った。導入の確認は鉄染色 (Berlin Blue 染色) にて行った。SPIO でラベルした細胞の T2 短縮効果の発現は、NMR spectrometer (NMS 120 Minispec, 0.47T) にて細胞 suspension の T2 を CPMG 法で測定し確認した。SPIO ラベル細胞 1×10^6 個/0.2mL を免疫不全マウスの大腿部筋層内に注入、T2-weighted fast spin-echo (TR/TE = 3000/80) にて MR イメージングを行うとともに、組織像との比較を行った。また、細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。ヒト骨髄間質細胞のラベルならびに通常病理学的評価に耐えられるマーカーの同定を行った。マーカーはクラゲ由来の蛍光色素 (Green fluorescent protein)、 β -ガラクトシダーゼ、Y 染色体、BrdU を候補に考えている。しかし、発現が低くとも検出感度が高いものであり、毒性を鑑み、病理検査に耐えられるものであれば検討対象とする。分化した骨格筋細胞、心筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞を、それぞれの組織に移植し、生体内での生着を明らかにすること。全ての研究は、医療を念頭においた場合の妥当性を検討することである。

1. 我々が独自に開発した分化誘導プロトコールに従い、骨髄間質細胞から目的とした分化した細胞を作製する。その作製された細胞においても発現が見られるような転写調節領域を準備する (ミ

オシン軽鎖, トロポニン, ネスチンなどのプロモーター)。

2. 細胞分化プロトコールの更なる改良を目指す。特に分化効率の向上および生着後脱分化しないことにしぼり、検討を加える。
3. 移植したマーカーが日常業務で使用する免疫組織化学により、同定可能かどうかを検討する。最終的には、組織における分化を病理学的に検討する。
4. 長期間にわたる組織への生着の有無を検討できるようなマーカーを同定する。
5. マーカー自体の細胞毒性を検討する。

間葉系幹細胞の心筋分化アッセイ

マウス細胞に対しては脱メチル化剤を処理することにより、心筋分化を誘導する。ヒト細胞に対しては、マウス胎児心筋細胞との共培養により、心筋分化誘導する。心筋分化は、拍動、心筋関連遺伝子発現、活動電位測定、免疫細胞化学によって行う。

(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

ヒト細胞における p16 転写阻害による安全性確保

1) ヒト正常線維芽細胞の細胞老化では p16/RB-経路と増殖因子が協調して ROS の産生を促進するために染色体分配並びに細胞質分裂の進行も抑制されていることを見出した。このため、一旦細胞老化が誘導されると、その後で p16/RB-経路を遮断しても老化細胞は増殖を再開出来ないことが分かった。

2) p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることにより、様々な DNA 障害を誘発する刺激が p16 蛋白の発現を誘導することを見出した。

間葉系細胞の心筋への分化と生体内の心拍動に関する検討

マウス骨髄より CD34・CD117 陽性、CD45 陰性の細胞株を取得し、本細胞が心筋に対する分化能を有することを見出した。間葉系に対する分化能のみを有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞は CD90 陽性、CD34・CD45 陰性である。また同様のマウス骨髄間葉系幹細胞は CD34・CD117・CD45 陰性である。ヒト間葉系細胞に関しては、CD

移植細胞の生着に関する生着の検討

細胞移植の病理組織学的検討に用いる際の骨髄間質細胞のマーキング法を決定した。鉄を含有する SPIO を用いることで、新しいナノバイオ・トランスシステムを確立した。日常の診断検査に有用であることを特に念頭におき、再生医療・細胞移植における MRI (磁気共鳴画像診断装置) で撮影する際の造影剤として SPIO を、移植する細胞のトレーサーとして用いた。従来の MRI の造影剤である SPIO を、目的の細胞に試験管内にて導入した。細胞移植後、SPIO による MRI 造影剤を用いることにより、細胞移植の妥当性を検討した。Resovist 添加培地 48 時間の暴露で 98% の細胞に Berlin Blue 陽性を確認した。spectrometer にて細胞量に依存した T2 短縮効果を認めた。移植後 3 時間の T2 強調像にて移植部位に境界明瞭な低信号領域が確認され、組織学的に同領域に生存する移植細胞の局在を認めた。低信号領域は移植後 8 週にても確認可能であった。しかし、組織学的には移植後 2 週以降においてレシピエント由来の Berlin Blue 陽性細胞出現が確認され、4 週では移植部位にて大多数を占める結果であった。また非ラベル細胞を移植したコントロール群では MR 信号の変化を認めなかった。

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。

骨髄間質細胞は、臨床において、すでに造血幹細胞の生着促進を目的に骨髄移植と同時に移植が行われ始めている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。そのような状況の中で、近年、間葉系幹細胞に純化しないままの骨髄細胞を用いて、in vivo において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。本研究の成果によって、これらの間葉系細胞

を用いた細胞治療の実現化に向けて、月経血、臍帯血、末梢血を供給源として示されたことは骨髄のみならず、他の組織を利用して細胞を得ることができることを意味している。また、本研究は骨髄間葉系細胞を用いた研究成果を生かす点でも極めて重要な意味をもち、政策医療の観点からも急務であり、欠くことの出来ない問題である。

心筋細胞が in vitro で大量に確保できるという状況が現れれば、それらの細胞を用いた細胞移植という方法論で、末期重症心不全の治療に用いることが可能であろう。In vivo において、胎児心筋細胞を用いて心臓への移植の可能性が証明されて以来、遺伝子を導入した細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、無処置の骨髄細胞などがドナー細胞として用いられてきた。また、胎児性幹細胞を用いた実験も報告されているが、倫理的な問題を含んでいる。現在、ヒト胎児由来の間葉系細胞および間質由来の間葉系細胞の培養に成功し、転写因子を導入することで細胞移植の供給源として提供できるよう研究をすすめている。

外骨腫に由来する細胞のみで骨形成可能である。細胞と足場を組み合わせることで、任意の形状・大きさの骨を形成することが可能となっている。整形外科領域のみならず、心筋への細胞移植が次々と進められている現在、新たな供給源を次々と増やしており、提供可能な状態としている。高分子担体には天然高分子と合成高分子のふたつが存在する。天然であるコラーゲンは細胞保持性に優れているものの、形状の維持が困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究が進んできたが、疎水性であるが故に細胞接着性に乏しいという欠点が存在する。両者の問題点を解決するため、合成高分子にて作製したスポンジ形状をした培養担体にコラーゲンを複合化することで初期強度に優れ、かつ細胞接着性に優れた培養担体を開発、骨・軟骨再生における有用性を報告してきた。本研究によって、適度な強度を有する合成高分子シートに、コラーゲンマイクロスポンジを複合化することで高い細胞接着性が得られることが明らかとなった。従来の合成高分子で作製したスポンジ形状体は、立方体内部への細胞播種が困難なため均一な組織を得にくいという欠点があった。形状をシート状にしたことで細胞の分布を均一化することが可能となったものと考えられる。頭蓋骨欠損モデルでの移植においては、本シートのみでの骨形成が起らなかったことより、細胞治療の有用性が示された。可塑性のある複合化シートは細胞播種後に重層化することで厚みを持たせたり、丸めることで管状構造を作製、さらに既成の構造物に貼り付けることで任意の形状を作製することが可能となるため手術中での操作が容易である。荷重に耐えうる強度には至らないため、骨基質のひとつであるハイドロキシアパタイトの表面に用いたり、早期の骨分化を促すために成長因子の固相化も可能である。さらに使用する細胞の接着に有用な細胞接着因子を付加することでより高い接着性も期待できるなどその応用範囲は広いと思われる。本複合化シ

トに用いた PLGA およびアテロ化コラーゲンはそれぞれ FDA 基準を満たし既に臨床にて使用されているものであるため早期の臨床化が見込まれる。また、この新規培養担体は骨再生のみならず、軟骨再生や他細胞移植に用いる培養担体として優れているものと考えられる。

E. 結論

正常細胞において一旦 p16/RB-経路が活性化されると、ROS を介して様々な細胞内生理状態が変化することを明らかにした。また、p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることにより、細胞老化を誘導する因子の同定が可能となった。特に多くの細胞を得る際に、増殖因子を用いる場合に、パラドキシカルに細胞老化が誘導されることが分かっており、これらの経過を明確にできることは極めて価値がある。また、p16 蛋白の発現を化学発光によりモニター出来る細胞を用いることで、ヒト正常細胞の分裂寿命を規定する分子メカニズムを明らかにし、正常な細胞機能を保持したまま分裂寿命の延長を可能にする薬剤等のスクリーニングシステムを構築することができることになり、当初の目的が達成された。

間葉系細胞を規定する表面抗原として、CD13, CD29, CD44, CD59, CD105, CD166 が挙げられる。これらは抗体を用いたマーカーの検証となる。造血系幹細胞においては、CD34, CD133 で規定する前では、WGA を用いており、間葉系細胞においても MAH によって規定されることは再生医療におけるバリケーションシステム構築の一助になる。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ある存在した。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、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インフォマティクスの確立、さらに実際に細胞を取り扱う際の作業工程に

おけるバリケ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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

人由来組織利用研究円滑化のための社会的・技術的インターフェースの整備

所属 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部
研究者 絵野沢 伸

研究要旨：ヒト組織調達・供給面；エイチ・エー・ビー研究機構が人試料委員会にて検討を重ねてきた本邦における心停止ドナーからの移植用臓器提供後の研究用肝組織由来初代肝細胞採取の技術的検討を行った。**肝細胞保存**；磁界強度調節型 CAS 凍結機の磁界強度ならびに槽内での分布、および溶媒の冷却曲線を調べた。**肝細胞長期培養**；新しい三次元培養ツール「細胞アレイ」が Cell Able として本研究参加の（株）トランスパレント社より商品化された。そこで細胞アレイ使用時のデータの追試およびデータの追加としてプールド肝細胞（数ロットを混合したもの）を用いた薬物動態実験への応用を行った。また新たな利用目的の模索として Cell Able に株化肝細胞を播種しその挙動を調べた。形態的に良好なスフェロイド形成が行われた。細胞増殖は数で見ると 6 日間培養では増殖を続けた。一方、DNA 合成は培養 3 日目、6 日目ではいくらか鈍化することが認められた。形態面では Cell Able にラット初代肝細胞を培養し、その組織構造を光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡で調べた。フィーダー細胞であるウシ大動脈内皮細胞と肝実質細胞は肝小葉類似の構造体を形成することが、顕微鏡観察によってわかった。**新培養素材開発**；効率的にスフェロイドを誘導するパターンニング材料として、フォトレジストの分子構造に着目して詳細な検討を行った。さらに、高機能初代肝細胞スフェロイドアレイの作製を目指し、肝細胞とフィーダー細胞との共培養における組み合わせについて検討を加えた結果、線維芽細胞との共培養で特に高い機能が確認された。**幹細胞分化肝細胞**；ヒト脂肪組織中間葉系幹細胞の肝細胞分化をより短期間で完了するための方法を検討した。その結果、従来のサイトカイン、増殖因子による刺激の過程を工夫することで、アルブミン陽性の肝細胞の分化誘導を 14 日間で完了することに成功した。

分担研究者

- | | |
|--------------------|-------|
| (1) 東京医科大学外科学第三講座 | 青木達哉 |
| (2) 東京理科大学理学部応用科学科 | 大塚英典 |
| (3) 国立がんセンター研究所 | 落谷孝広 |
| (4) 帝京平成大学薬学部 | 石館光三 |
| (5) 聖マリアンナ医科大学 | 熊井俊夫 |
| (6) (NPO) HAB 研究機構 | 鈴木 聡 |
| (7) (株) アビー | 大和田哲男 |
| (8) 田辺三菱製薬 (株) | 山田泰弘 |
| (9) 東洋合成工業 (株) | 池谷武志 |
| (10) (株) トランスパレント | 佐倉武司 |

A. 研究目的

医学研究において人由来研究資源の需要は年々増加している。例えば、創薬研究に中心的役割を有する肝細胞は、欧米の移植不適合肝由来の凍結細胞が日本に輸入され、用いられている。しかしながら、生存生着のよい細胞は少なく、また凍結融解操作に不確定要素が多いため、円滑な研究が進んでいるとは言いがたい。その他の人由来研究資源も輸入に依存しているが、我が国の創薬を真に推進するには、国内における供給体制の整備が必要である。

本研究ではこれらの問題を解決すべく、1) 肝細胞の供給、2) 保存、3) 長期培養、4) 培養ツ

ル、について官民共同研究として取り組んでいる。本年度は特に細胞培養ツールとして研究を行ってきた細胞アレイがトランスパレント社より Cell Able として市販されるに至った。これを用いた実験を含め、本報告では 3 年計画の 2 年目の進捗を述べる。

B. 研究方法

ヒト初代肝細胞はコラゲナーゼ灌流法によって分離した。基本的操作は既報（絵野沢他、ブタ肝細胞分離法、Organ Biology 7: 61-7, 2000）によった。

ヒト肝細胞は日本農産工業より XENOTECH 社製凍結ヒト肝細胞を購入、使用した。

磁界強度の測定はテスラメーター（株式会社佐藤商事）によった。溶媒の冷却曲線の測定はデータロガー（TMI-Orion）によった。

JCRB 細胞バンクより入手の株化ヒト肝細胞 HepG2、Huh7 ならびに、Cell Able 標準プロトコールでフィーダー細胞として使用する HH を、Cell able (96 穴タイプ) 上で培養し、細胞数と放射性チミジン取込を測定した。

Cell Able 上でのラット初代肝細胞培養はトランスパレント社の標準プロトコールに従った。電子顕微鏡観察は（独）労働安全衛生総合研究所の久保田久代研究員によった。

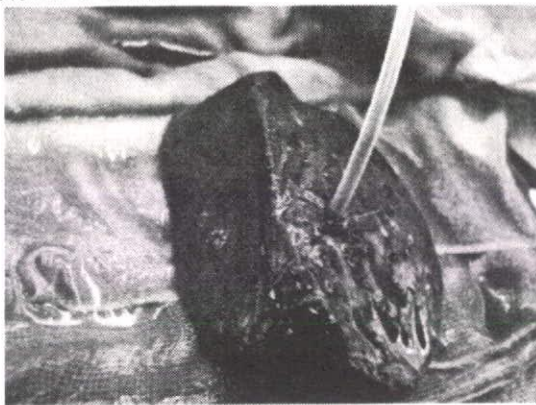
(倫理面への配慮)

ヒト肝細胞を利用した実験は国立成育医療センターの倫理審査を受け実施した(受付番号 305)。ラットを用いた実験は国立成育医療センター動物実験委員会の承認を得て行った(No.2000-001)。分担研究者の研究においては、その所属施設の倫理審査によった。

C. 研究結果

1) 国立成育医療センターでは、平成 18 年 10 月より生体部分肝移植にて得られる手術摘出肝組織のうち、病理検査用の組織を採取した残りの部分から肝実質細胞等を採取し、研究に用いている(図 1)。

図 1 国立成育医療センター研究所にて行った肝細胞分離の一例。肝組織小片にカニューレ挿入し、前灌流を行っている状態。



この場合の肝組織は、広い断面を有する部分組織であり、通常のラット、マウス肝からの細胞採取とは異なる技術とノウハウが必要である。すなわち、断面に露出した大きめの血管を選び出し、灌流用のチューブを挿入、固定しなくてはならない。また状況によっては短絡して漏出する灌流液を結紮その他の方法で阻止しなくてはならない。その経験から確立した肝組織の肝細胞分離方法を、心停止ドナー由来肝組織からの肝細胞採取に対応できるように実地に検討を行った。

平成 21 年 1 月 20 日に米国 NDRI よりエイチ・エー・ビー研究機構市川研究所に送られてきた米国内調達の移植不適合肝を使用した。送られてきた全肝を、左葉外側区域の中でさらに末梢側をハサミにて切断し、320g の小片を作成した。その後、絵野沢が確立した方法で血管を確保し、灌流回路を接続した(図 2 A B C)。その後、コラゲナーゼ溶液を灌流し細胞分離を行った(図 3 A B C)。以上の操作のタイムスケジュールならびに細胞収量などを表 1 にまとめた。

表 1 細胞分離作業のタイムスケジュールと細胞の収量等

1/18	15 時 (米国時刻)	脳死判定 (53 歳、白人男性)
1/19	9 時 (同上)	肝摘出
1/20	18 時 (日本時刻)	HAB 市川研究所着
	18:30	作業開始
	19:00	コラゲナーゼ灌流開始
	19:30	同灌流終了
	20:30	肝実質細胞調製終了
使用組織片	320g	残滓 200g
生細胞率	50%	生細胞数 2×10^9 細胞

2) CAS 磁界は直流磁場と交流磁場によって構成されていた。直流磁場は槽内の位置のずれによって強度が大きく変化した。槽中央はその変化がほとんどないので、交流磁場の測定および凍結実験はその位置で行うこととした。CAS 目盛を増加させると交流磁場が正比例をもって増加した。溶媒の冷却曲線は交流磁場の変化に従っていくらかの違いを見せた。

3) 12 穴タイプ細胞アレイを用いて凍結ヒト肝細胞を三次元培養した場合、高い CYP 活性と CYP 誘導能が長期間維持された。すなわち平成 18 年度の結果が確認できた。また、同様な確認としてプレートへの接着率が低い凍結ヒト肝細胞でも三次元で長期間培養が可能であり、CYP 誘導評価に応用可能であった。また、今回新たな実験として 96 穴タイプの細胞アレイを用い、3 ドナーの肝細胞およびそれらを同数混合したプールド肝細胞の活性を測定した。この時、前者の平均に極めて近い値がプールド肝細胞でも得られた。このことは、96 穴タイプの穴間誤差が極めて少ないことを意味しており、プールド肝細胞による代謝活性測定にも適することがわかった。

4) 培養 6 日までの間、HH、HepG2、Huh7 の数は増加を続けた。このうち HH と Huh7 は初期細胞数 10000/穴の条件が 6 日目に最も増加していた。HepG2 は初期細胞数と 3 日目と 6 日目の細胞数が同順位で推移した。一方、チミジン取込は、3 種の細胞とも細胞数依存的に取込み量が変化した。しかしながら HH 細胞では 6 日目の取込みは各細胞密度ともに同程度であり、この時期には細胞増殖が鈍化しつつあることが推察された。尚、ここには示さなかったが、すべての細胞において、Cell Able 基板上で良好なスフェロイド形成がみられ、スフェロイド間の bridging (スフェロイド間に細胞が架橋すること) は見られなかった。(詳細は絵野沢分担報告参照)

5) 最初に基板面に播かれた血管内皮 HH 細胞は、肝細胞スフェロイドが完成された時には、肝実質細胞を包み込むように位置していた(図 2)。接触面の微細構造は、肝臓で類洞上皮と実質細胞の間に存

在するディッセ腔に似た構造も見られた(図3)。尚、本研究は(独)労働安全衛生総合研究所の久保田久代研究員の協力のもとに行った。

図2 スフェロイドの断面の観察。光学顕微鏡像。トルイジンブルー染色。

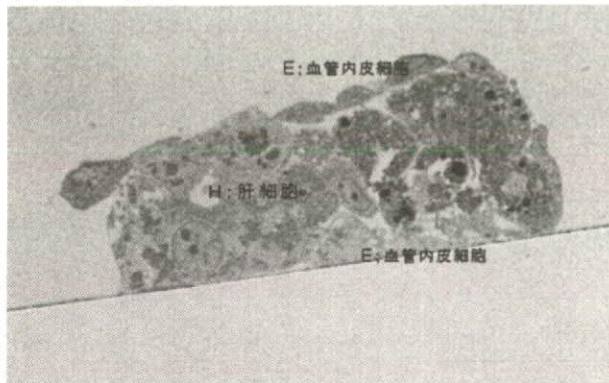
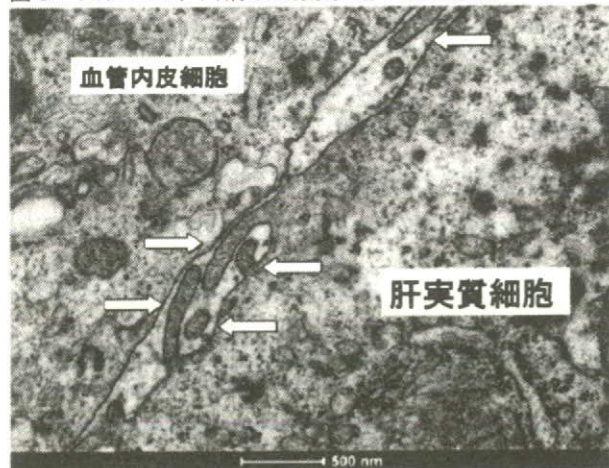


図3 スフェロイド断面の観察。電子顕微鏡像。



6) パターン状に肝細胞を3D化する培養器の大量生産可能なプロセスを、東洋合成工業はリソグラフィ技術を援用し確立した。その結果、現在の研究用途での使用する需要に、即応できる安定供給体制が整った。この基板を用い、ラット並びにヒト初代肝細胞の細胞アレイにおける培養条件の最適化を進めた。その上で、薬物代謝活性の評価を行い、第I相(CYP)の代謝酵素活性のみならず、第II相(抱合)酵素活性も有する系であることを明確にした。評価は、テストステロンの 6β OH化(CYP)と、グルクロン酸抱合体の生成量で評価した。100 μ Mのテストステロンを4時間暴露したところ、ラット肝細胞ではそれぞれ 6β OH化テストステロンが0.94 μ M、グルクロン酸抱合体が36.23 μ M検出された。

7) 大塚分担者はヒト肝由来細胞の有効利用を目指し、適切な細胞培養系を確立し、簡便にかつ大量なスフェロイドアレイ培養基板を作成するための手法確立をさらに推進した。特に効率的にスフェロイド

を誘導するパターンニング材料として、フォトレジストの分子構造に着目して詳細な検討を行った。さらに、高機能初代肝細胞スフェロイドアレイの作製を目指し、肝細胞とフィーダー細胞との共培養における組み合わせについて検討を加えた結果、線維芽細胞との共培養について、特に高い機能が確認された。また、ES細胞スフェロイド形成を行い、培養条件の最適化を行った。(詳細は大塚分担報告参照)

8) 落谷分担者はヒト脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞の肝細胞分化に関する研究を行っている。同細胞は多様な可塑性を持つステム細胞であり、肝細胞様に分化することが判明している。昨年度報告でこのステム細胞から分化誘導した細胞は薬物代謝に係るCYP1A2, 2B6, 2C19, 2D6, 3Aの発現を認めた。本年度はこの間葉系幹細胞の肝臓細胞分化誘導系をより短期間で完了するための方法を検討した。その結果、従来のサイトカイン、増殖因子による刺激の過程を工夫することで、アルブミン陽性の肝細胞の分化誘導を14日間で完了することに成功した。本方法により薬物代謝の検討を比較的安定な分化誘導系で検討することが可能となった。(詳細は落谷分担報告参照)

D. 考察

エイチ・イー・ビー研究機構ではすでに全肝や部分肝からの肝細胞分離を行っているので、概ね必要な器具や試薬類は揃っていた。絵野沢が持参したのは肝小片組織からの細胞採取に必要なマイクロ鉗子、細めの糸付き針、カニューレ程度であった。さらに同機構スタッフは従来の方法に熟達しており、今回の作業は極めて円滑に行われた。

今回搬入された肝の状態はよかった。肉眼所見で脂肪肝と認められなかっただけでなく、コラゲナーゼ灌流の間に同液に胆汁の混入が観察されたことで、細胞の状態もよいと推察された。しかしながら得られた細胞の生細胞率が50%と低く、またその後の培養細胞の生存程度も期待していたほどではなかった。この原因のひとつに生成胆汁が灌流液に混ざり、細胞障害性に作用したことが考えられた。全肝や部分肝の灌流では、肝外胆管が付属しているため、灌流中に産生される胆汁を灌流液に混入させないことが可能である。ところが肝小片組織では胆汁は断面からびまん性に出るため溶液中への混入を防げない。この対策として、前灌流を加温しながら徹底的に行い胆汁産生の予備力を低下させる(今回は前灌流は室温で行い量も500mLであった)、胆汁毒性を中和する薬剤あるいは試薬を灌流液に加える、など検討すべきと考えられた。

心停止ドナーの腎提供の機会に肝組織提供を受けるスキームでは迅速な、具体的には5分程度の所作で肝組織を採取することが望ましい。上記の