

びフローサイトメトリーにより結果を確認した。

4. 制御性 T 細胞 (Treg) の増幅培養法

抗 CD3 および抗 CD28 抗体を固相化したフラスコと、IL-2 および TGF- β を添加した培養液を用いた。

5. EB ウイルス感染モデルマウスの作成

臍帯血より Miltenyi Biotec 社のキットを用いて CD34⁺造血幹細胞を分離し、NOD/SCID/ γ c^{null} マウス (以下、NOG マウスと略す) に移植した。ヒトリンパ球の分化をフローサイトメトリーにより確認した後 B95-8 株 EBV を尾静脈より接種した。

6. 臍帯血 DLI の安全管理法

1) マイコプラズマ検出試験

nested PCR 法と培養法の 2 法を用いた。nested PCR は 1 本のチューブで行える方法を開発した。

2) 迅速真菌検査法の開発

マルチプレックス検出系と網羅的 PCR の 2 法を用いた。

3) 多項目迅速ウイルス検出法

マルチプレックス PCR 法を用いた従来の方法に改良を加えた。

4) 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)、浮遊菌は同培地をセット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。

7. 臍帯血 DLI に関するアンケート調査

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」班との共同作業により、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。

8. 臍帯血 DLI の臨床試験

第 I 相試験の予定される概要は以下の通りである。

試験の内容：臍帯血移植生着後に 5×10^6 /kg の CD4⁺ T 細胞を 2 週間おきに 2 度投与し、早期有害事象を評価する。

対象疾患：臍帯血移植を実施する白血病、原発性免疫不全症、先天性代謝疾患

対象年齢：制限なし

適格基準：HLA 適合 5/6 以上 (phenotype)

除外基準：ハイリスク移植 (移植後 30 日以内の死亡の危険性が高いもの)、投与時に III-IV GVHD, VOD, 全身感染症、心不全、肝不全、腎不全などの臓器不全など

評価方法：CD4⁺ DLI 後 30 日までの有害事象
目標症例数：5 例～10 例

(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。

C. 研究結果

1. T 前駆細胞定量法の確立

臍帯血 Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞をストローマ細胞 Tst-4/D11 と共培養し、CD5⁺CD3⁻の未熟 T 細胞に分化させ、これを定量可能とした。

2. 臍帯血 CD4⁺ T 細胞の活性化培養法に関する検討

固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を培養液に加える方法を改良し、臍帯血より高純度の活性化 CD4⁺ T 細胞を調製する方法を確立した。現在、GMP、GTP に準じた各種手順書の整備を進めている。また、臍帯血解凍後の安定性試験、培養液メーカーの比較、至適 IL-2 濃度の検討、バッグを用いた活性化培養法など様々な検討を行い至適条件を決定した。培養開始後 1 週間は抗 CD3+抗 CD28 抗体で、次の 1 週間は抗 CD3 抗体のみで刺激した場合に最もよい結果が得られた。

培養液メーカーの比較では、日研生物医学研究所の RPMI+7 (+7 と略す) と細胞科学研

研究所の ALyS 505N-0 (ALyS と略す) を比較したところ、ALyS 培地によりやや良好な T 細胞の増殖が認められたが、活性化マーカーの発現には差が認められなかった。

臍帯血から探索的 T 細胞培養を行ったところ、採取された臍帯血を 24 時間以内に培養に供する場合にはほぼ 100% の確率で T 細胞培養が成功すること、ウイルスは混在しないこと、一方凍結検体からの培養では、増殖が悪い場合があることが明らかになった。また東京医科歯科大学を中心に 7 名での臍帯血 CD4-DLI の探索的臨床研究(投与)を行った。

3. 制御性 T 細胞 (Treg) の増幅培養

固相化抗 CD3/CD28 抗体と IL-2 及び TGF- β を添加する培養法により、CD4⁺T 細胞のうち CD25⁺FoxP3⁺細胞を平均 65.2%含む、Treg に富む細胞分画の調製に成功した。またこの Treg による GVHD 治療の動物実験にも成功した。

4. 活性化臍帯血 CD4 細胞の遺伝子発現解析

臍帯血 DLI の実用化にあたり、臍帯血から調製した CD4⁺活性化 T 細胞が、末梢血から調製した CD4⁺ 活性化 T 細胞と比較して、T 細胞性機能にどの程度の差があるのかを検討する必要がある。そこで、両者の遺伝子発現様式をマイクロアレイ、リアルタイム定量 PCR 等により比較した結果、T 細胞機能に関する遺伝子群の発現様式に差が認められた。特に、臍帯血 CD4⁺T 細胞の方が Foxp3 の発現が相対的に高く、IL-17 の発現が低い傾向を認めた。また、FoxP3 蛋白の発現についてはフローサイトメトリーにより同様の傾向を確認した。

5. EB ウイルス感染モデルマウスの作成

ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおいて以下の点を明らかにした。①EBV 感染マウスには、EBV 特異的な T 細胞免疫応答が惹起されること (ELISPOT 法および cytokine flow cytometry 法) (図 5, 6)、②T 細胞応答が EBV 感染に対する防御機構として機能すること (T 細胞除去実験および Transformation regression assay)。また、EBV 感染直後に自然免疫応答が誘導されることが示唆された。

6. 臍帯血 DLI の安全管理法

PCR による主要ウイルスおよびマイコプラズマ迅速検出法、寒天培地による無菌試験、

エンドトキシン検出試験を開発・導入した。特にマイコプラズマ検出試験においては、一つのチューブで nested PCR を行う方法を開発し、コンタミネーションの危険を大きく減らすことができた。

7. 臍帯血 DLI に関するアンケート調査

対象とした 146 施設のうち 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。

8. 臍帯血 DLI 臨床試験

厚生労働科学研究・免疫アレルギー疾患予防・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 (加藤班) と合同で、内科医 5 名、小児科医 3 名から成るプロトコル策定委員会を設置した。プロトコルコンセプトが策定された。

D. 考察

T 前駆細胞の定量法が確立されたことにより、臍帯血移植あるいは臍帯血 DLI に適した臍帯血の判別が可能となる可能性が生じた。

臍帯血 T 細胞活性化培養の様々なファクターについて、詳細かつ実地的な条件検討を行い、至適条件を決定できたことから、GMP 準拠の培養プロトコルの確定に近づいた。

臍帯血より Treg を増幅培養する方法を確立し、それを用いて GVHD 治療の動物実験にも成功したことから、臍帯血 DLI の副反応となる可能性がある GVHD の予防或いは治療に Treg を使用できる可能性が生じた。

臍帯血由来と末梢血由来活性化 T 細胞の遺伝子発現の網羅的解析により、臍帯血 CD4⁺T 細胞の方が、潜在的なポテンシャルとして、制御性 T 細胞に分化する細胞を多く含み、逆に IL-17 産生細胞に分化する細胞が少ないことが示唆された。従って、DLI 療法の治療上の目的や、GVHD 発症の危険性等を考慮した場合、臍帯血の方が CD4⁺T 細胞のソースと

してより適している可能性が考えられた。

ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルにおいて、EBV 特異的 T 細胞が誘導され感染防御機構として貢献することが示されたことから、本モデルを用いて臍帯血 DLI の前臨床試験を行うことの理論的根拠が得られた。

E. 結論

①臍帯血より高純度の活性化 CD4 細胞を調製する培養法を確立した。②安全管理法として、ウイルス、細菌、真菌、およびマイコプラズマの迅速検出法を開発・導入した。③ Th17 細胞が少なく、制御性 T 細胞が多いため、GVHD リスクの低下が期待される点など臍帯血活性化 T 細胞の特長が示された。④臍帯血より制御性 T 細胞 (Treg) を増幅培養する方法を確立し、Treg による GVHD 治療の動物実験に成功した。⑤細胞治療製剤の規格化を行うために、標準作業手順書等の作成を進めた。⑥臍帯 DLI の前臨床試験に使用する EBV 感染モデルマウスの作成と解析を完了した。⑦厚生労働科学研究・加藤班との共同作業により、臍帯血 DLI 第 I 相臨床試験のプロトコールコンセプトを策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyagawa, Y., Kiyokawa N., Ochiai, N., Imadome, K., Horiuchi, Y., Onda K., Yajima, M., Nakamura, H., Katagiri, U., Okita H., Morio, T., Shimizu, N., Fujimoto, J., and Fujiwara, S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128: 405-419, 2009.
- 2) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis.* 200: 1611-1615, 2009.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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.
- 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) 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.

3. 学会発表

1) Fujiwara S, Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, and Yamamoto N. T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Oct. 6-8, 2009, Kobe.

2) 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)

3) 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 (増殖リンパ球治療を中心として) 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

4) 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、関根暉彬 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

5) 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)

6) 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)

7) 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)

8) 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)

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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ーヒト免疫ー. 横浜. 2007年12月.

15) 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.

16) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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実用化へ向けてのトランスレーショナルリサーチを行い以下の成果を得た。①抗CD3/CD28抗体で1週間、抗CD3抗体のみで次の1週間刺激する方法により良好かつ安定な臍帯血T細胞活性化培養が可能となった。②臍帯血由来活性化CD4⁺T細胞は末梢血由来のものと比較して、制御性T細胞が多くTh17細胞が少ないことが示唆された。③臍帯血DLI安全管理法の一環として、1チューブnestedPCR法によるマイコプラズマ検査法を開発した。④抗CD3/CD28抗体およびIL-2+TGF- β による刺激を加え、臍帯血から制御性T細胞を増幅培養する方法を確立し、この細胞によるGVHD治療の動物実験に成功した。⑤免疫ヒト化マウスにEBウイルスを感染させ、NK細胞からのIFN- γ 産生を検出した。⑥臍帯血DLIの第I相臨床試験のプロトコール委員会を立ち上げ、プロトコールコンセプトを策定した。

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) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (5) 株式会社リンフォテック 関根暉彬
- (6) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (7) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也
- (8) 東京大学医科学研究所 長村登紀子

A. 研究目的

臍帯血移植は近年急速に普及し、症例数において骨髄移植に肩を並べた。しかし、ドナーが乳幼児であるため、十分な数のリンパ球を得ることができず、移植後の感染症や原疾患再発に対してドナーリンパ球輸注療法(DLI)を実施できないことが欠点である。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。本研究は、凍結臍帯血からの活性化T細胞調整法を確立し、得られた細胞の性状を解析すること、治療に用いる細胞製剤の安全管理法を確立すること、臍帯血DLI動物モデルを用いた前臨床試験を実施すること、安全性の確認を主目的とする第I相臨床試験を実施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が臍帯血移植後の原疾患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。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。

B. 研究方法

1. 臍帯血T細胞活性化培養法

臍帯血は、東京臍帯血バンクに提供された

もののうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。凍結臍帯血を融解後 2% ヒト血清と 350 U/ml IL-2 を添加した AIM-V 培地 (Invitrogen 社) で培養した。リンパ球の活性化には、抗 CD3 抗体 (オルソクロン社の医薬品 OKT-3) および抗 CD3/CD28 抗体 (Invitrogen 社、クリニカルグレード) を用いた。なお、用いたヒト血清は米国ベリタス社のトレーサビリティ保証製品であり、HIV 等数種類のウイルス感染が否定されている。AIM-V 培地は米国 FDA の認可を受けた唯一の T 細胞用培地であり、これまで多くの養子免疫療法に用いられている。

2. 活性化臍帯血 CD4⁺ T 細胞の遺伝子発現解析

臍帯血、および健常人末梢血よりファイコール比重遠心法により単核球を分離し、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 (700 IU/ml) 添加 (リンフォテック社、TLY CULTURE™ キット 25 を使用) により 2 週間培養して、T 細胞を活性化・増幅した後、マグネットビーズ法 (Dyna-beads, Dynal 社、あるいは MACS, Miltenyi Biotech 社) により CD4 陽性細胞を分離した。

増幅 CD4⁺ T 細胞から total RNA を RNeasy kit + DNase 処理 (Qiagen 社) で抽出し、マイクロアレイ (Affimetrix 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。一部の遺伝子については、マイクロアレイの結果を定量 RT-PCR 法により確認し、さらにフローサイトメトリーにより蛋白質レベルでも確認した。

3. 1 チューブ nested PCR 法によるマイコプラズマ検査系の開発

ABI-Prism 7300 (アプライドバイオシステム社) を使用した。プライマーセットは以下の通り。

1) 温度差利用による方法

Outer Primer

5': TAGTGATTTGGACCCGAAATCTGACA

3': AGCAACGCGAACCCCTTGGGCC

1ST Inner Primer

5': CGCATAATGGCGGACCTA

3': CAAACAAGCCCACTCCCCCTG

2nd Inner Primer

5': GGCCTAAAACCCCA

3': ATTCCCTTTTCCCCTCTA

Probe: CTATGGTTGGCTGCGCTGCTGCTATC

2) 結合阻害プライマーを用いる方法

Outer Primer

5': TAGTGATTTGGACCCGAAATCTGACA

3': AGCAACGCGAACCCCTTGGGCC

1ST Inner Primer

5': CGCATAATGGCGGACCTA

3': CAAACAAGCCCACTCCCCCTG

結合阻害 Primer :

CTATGGTTGGCTGCGCTGCT-GCTATC

4. 臍帯血制御性 T 細胞 (Treg) の体外増幅

固相化抗 CD3/CD28 抗体で刺激した末梢血または臍帯血 CD4⁺ T 細胞を 5% ヒト AB 血清含有培地に浮遊させ IL2+TGF-β 存在下にて 2 週間培養した。また、FOXP3 遺伝子の脱メチル化に関連する因子である All Trans Retinoic acid (ATRA) や mTOR を標的とする新規免疫抑制剤 Rapamycin (RAPA) を培養液に加え、Treg 増幅への効果を調べた。さらに、ルシフェラーゼ導入 T 細胞を移植して異種 GVHD を発症させた免疫不全マウスに Treg を投与し、生体発光シグナルを追跡することにより、その GVHD に対する治療効果を判定した。

5. EB ウイルス感染モデルマウスにおける自然免疫応答の解析

NOD/ Shi-*scid* / γc^{null} マウス (NOG マウス) に臍帯血造血幹細胞を移植し、免疫ヒト化マウスを作成した。ヒト化マウスに IL-15 および IL-15 受容体を投与し、NK 細胞の分化を促進した。EBV を静脈内接種した 48 時間後に脾臓から単核細胞を採取し、IL-2 を添加した培養液で 48 時間培養し、上清の IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。

6. 臍帯血 DLI 臨床試験のプロトコール策定

以下のメンバーによるプロトコール委員会を立ち上げ協議した。

先端医療センター、伊藤仁也；東海大学医学部、鬼塚真仁；虎ノ門病院、谷口修一；国立がんセンター、田野崎隆二；九州大学医学部、豊嶋崇徳；東京都健康長寿医療センター、宮腰重三郎；日本大学医学部、谷ヶ崎博；東京医科歯科大学医学部、森尾友宏。

(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。

C. 研究結果

1. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の改良

前年度までに抗 CD3 のみでなく抗 CD28 抗体を追加すると良好な活性化培養が可能であることが示唆されていた。そこで本年度はこの点について詳細に検討した。2 週間の培養期間中、①抗 CD3 のみ、②抗 CD3/CD28 のみ、③前半は抗 CD3/CD28、後半は抗 CD3 のみ、の 3 通りの培養法を試みた。その結果、③の方法が明らかに優れていることが示された (図 1)。

2. 活性化臍帯血 CD4⁺ T 細胞の遺伝子発現解析

昨年度までに臍帯血由来活性化 CD4⁺ T 細胞では FoxP3 の発現が高く、末梢血由来活性化 CD4⁺ T 細胞では IL-17 の発現が高いことが示唆されていた。本年度は臍帯血、末梢血 4 検体ずつを追加解析し、この点の確認を試みた。RNA レベルの発現解析では、上記の違いが確認された。両者間の FoxP3 発現の違いは培養開始後 2 週間目で特に明らかであり、逆に IL-17 では 1 週間目でより違いが明らかであった (図 2)。また、ドナーの個体差が大きいことも示唆された。フローサイトメトリーによる解析では、上記の FoxP3 の発現の違いが培養開始後 1 週間目でより明らかであり、RNA レベルとの乖離が認められた (図 3)。IL-17 発現の違いはフローサイトメトリーに

よる確認が困難であった。

3. 1 チューブ nested PCR 法によるマイコプラズマ検査法の開発

Outer primer と inner primer に異なる Tm 値を設定する方法では良好な結果が得られなかった。一方、2 段目の PCR 反応の際に、1 段目のプライマーに対して結合阻害プライマーを反応させる方法は、良好な結果をもたらした (図 4)。

4. 臍帯血制御性 T 細胞の体外増幅法の確立とそれによる GVHD 治療の動物実験

臍帯血 CD4⁺T 細胞を固相化 CD3/CD28 抗体で刺激し IL-2⁺TGF β 存在下で培養することにより、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞を 65%前後の割合で含む Treg 濃縮集団が得られた。また ATRA あるいは RAPA を添加することにより Treg の増幅効率が向上した (図 5, 6)。得られた Treg を異種 GVHD モデルマウスに投与することにより治療効果が認められた (図 7)。

5. EB ウイルス感染モデルマウスにおける自然免疫応答の解析

EBV 接種後 48 時間のマウスの脾臓細胞を短期間 (48 時間) 培養した上清には、コントロールマウスと比較して多量の IFN- γ が産生されていることが示唆された。NK 細胞を除去することにより IFN- γ 産生は著名に減少したことから、NK 細胞が主たる IFN- γ 産生細胞であると考えられた (図 8)。

6. 臍帯血 DLI 第 I 相臨床試験のプロトコールコンセプトの策定

プロトコール委員会の討議により、CD4 細胞を分離せず活性化全 T 細胞を投与すること、有害事象の検討を主体とする第 I 相試験を行うことなどが決定した。プロトコールコンセプトを添付する。

D. 考察

1. 臍帯血 T 細胞活性化培養法の改良

2 週間の培養期間のうち、前半は抗 CD3/CD28 抗体で、後半は抗 CD3 抗体のみで刺激することにより良好な結果が得られた。今後この方法により活性化臍帯血 T 細胞が安定的に供給されうると考えられた。この活性化培養法で得られる T 細胞は effector memory T 細胞が多いが、臍帯血 DLI では central

memory T 細胞が最も有効であることが推測されるので、central memory T 細胞を増幅する培養技術の開発が必要である。今後、ヒト血清を使用せず無血清培養液あるいは牛血清添加培養液の使用が義務づけられる可能性があるため、その方向への研究も必要である。また、販売中止となる予定の OKT-3 抗体の代替品の選定も必要である。

2. 活性化臍帯血 CD4⁺ T 細胞の遺伝子発現解析

臍帯血由来活性化 CD4⁺ T 細胞では FoxP3 の発現が高く、末梢血由来活性化 CD4⁺ T 細胞では IL-17 産生細胞の割合が高いことが確認された。移植後の GVHD では、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ことが示唆されているので、臍帯血由来 CD4⁺ T 細胞の方が末梢血由来と比べて、DLI 療法を安全に施行できるという点で適していることが示唆された。また、活性化 CD4⁺ T 細胞の遺伝子発現には個体差が大きいことが示唆されたので、実際に治療に用いる前にモニタリングを行うことの有用性が考えられた。

3. 1 チューブ nested PCR 法によるマイコプラズマ検査法の開発

臍帯血 DLI の安全管理に関しては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」および「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」を遵守する必要があるが、これらには「マイコプラズマ汚染を否定すること」と記載されている。日本薬局方に記載されている nested PCR 法では、キャリアオーバーによる擬陽性が生じる可能性が高い。今回開発された 1 チューブ法ではチューブのふたの開閉や電気泳動が不要となるため、キャリアオーバーによる擬陽性が生じる危険性が著しく低減していると考えられる。

4. 臍帯血制御性 T 細胞の体外増幅法の確立

これまでの臍帯血 DLI 探索的臨床研究において GVHD は観察されていない。しかし、今回臍帯血から制御性 T 細胞を体外で増幅する技術が確立され、それを用いての実験動物レベルでの GVHD 治療実験が成功したことは、臍帯血 DLI の安全管理の面からも重要な進展と考えられる。

5. EB ウイルス感染モデルマウスにおける自然免疫応答の解析

免疫ヒト化マウスでは EBV 感染直後に NK 細胞が IFN- γ を産生し、防御機構の第一陣として機能することが示唆された。臍帯血 DLI においては、抗原特異的 T 細胞のみでなく自然免疫系の細胞が関与する可能性がある。ヒト化マウスを用いた臍帯血 DLI の治療実験では、自然免疫系の役割も解析が可能であると考えられた。

6. 第 I 相臨床試験のプロトコールコンセプトの策定

今回策定されたコンセプトにもとづきプロトコールを策定し、速やかに臍帯血 DLI の臨床試験を実施する計画である。

E. 結論

臍帯血 DLI 実用化へ向けてのトランスレーショナルリサーチを行い以下の成果を得た。①抗 CD3/CD28 抗体で 1 週間、抗 CD3 抗体のみで次の 1 週間刺激する方法により良好かつ安定な臍帯血 T 細胞活性化培養が可能となった。②臍帯血由来活性化 CD4⁺ T 細胞は末梢血由来のものと比較して、制御性 T 細胞が多く Th17 細胞が少ないことが示唆された。③臍帯血 DLI 安全管理法の一環として、1 チューブ nested PCR 法によるマイコプラズマ検査法を開発した。④抗 CD3/CD28 抗体および IL-2+TGF- β による刺激を加え、臍帯血から制御性 T 細胞を増幅培養する方法を確立し、この細胞による GVHD 治療の動物実験に成功した。⑤免疫ヒト化マウスに EB ウイルスを感染させ、NK 細胞からの IFN- γ 産生を検出した。⑥臍帯血 DLI の第 I 相臨床試験のプロトコール委員会を立ち上げ、プロトコールコンセプトを策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin.

Immunology. 2009 Nov;128(3):405-19.

- 2) 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 Murine Leukemia Virus-Derived Retroviral Transduction with Recombinant Fibronectin for Stem Cell Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2009 Jul;20(7):777-83.
- 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.* 11: 429-433, 2009.
- 4) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis.* 200: 1611-1615, 2009.
- 5) Ishige I., Nagamura-Inoue T., et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord, *Int. J of Hematology*, 90,261-9, 2009.
- 6) Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network, Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 10,69-77,2009
- 7) Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Kato S, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H; Japan Cord Blood Bank Network. Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 15:439-46. 2009
- 8) Atsuta Y., Suzuki R., Nagamura-Inoue T., Taniguchi S., Takahashi S., Kai S., Sakamaki H., Kouzai Y., Kasai M., Fukuda T., Azuma H., Takanashi M., Okamoto S., Tsuchida M., Kawa K., Morishima Y., Kodera Y., and Kato S., for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network; Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. *Blood*, 113,1631-8, 2009.
- 9) Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr.* 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 10) Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, Morio T, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 17882-5. 2009.
- 11) Yoshida H. Kusuki S. Hashii Y. Ohta H. Morio T. Ozono K.: Ex vivo-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer* 52:895-897, 2009.
- 12) Tabata S, Shimoji S, Murase K, Takiuchi Y, Inoue D, Kimura T, Nagai Y, Mori M, Togami K, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K, Takahashi T. :Successful allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome complicated by severe pulmonary alveolar proteinosis. *Int J Hematol* 90;407-412. 2009
- 13) Inoue D, Nagai Y, Kimura T, Shimoji S, Mori M, Togami K, Tabata S, Kurata M, Matsushita A, Ito K, Hashimoto H, Maruoka H, Yamashita E, Nagai K, Imai Y, Shirane H, Takahashi T. Refractory de novo myeloid sarcoma.: A case report and therapeutic strategy based on bone marrow minimal residual disease. *Int J Hematol* 90(1);120-3. 2009 Jul
- 14) Mori M, Togami K, Fujita H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Nagai Y, Tabata S, Kurata M, Ito K, Hashimoto H, Matsushita A, Nagai K,

Kaji S, Takahashi T. Successful allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelomonocytic leukemia complicated by refractory aortitis. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Aug 31. Epub ahead of print

15) 鹿村真之, 伊藤仁也, 大隈一興, 関根暉彬. リンパ球活性化培養中の細胞表面抗原の経時的変化 *Biotherapy* 23, 257-262, 2009

16) 伊藤仁也, 中畑龍俊 体外増幅造血細胞移植 *医学のあゆみ* Vol.229 No.9 786-792, 2009.

2. 著書

なし

3. 学会発表

1) Kiyokawa N, Onda K, Imadome K-I, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Morio T, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. 第39回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12月2日-4日, 2009.

2) 矢島美彩子, 今留謙一, 中川温子, 渡辺哲, 寺嶋一夫, 中村浩幸, 伊藤守, 清水則夫, 山本直樹, 藤原成悦. EBV感染ヒト化NOGマウスモデルにおけるT細胞応答. 第6回EBウイルス研究会, 2009年6月5日, 東京.

3) 今留謙一, 矢島美彩子, 川野布由子, 清水則夫, 中川温子, 伊藤守, 中村浩幸, 山本直樹, 藤原成悦. NOGマウスを用いた慢性活動性EBウイルス感染症異種移植モデルの作製と解析. 第6回EBウイルス研究会, 2009年6月5日, 東京.

4) 今留謙一, 矢島美彩子, 川野布由子, 清水則夫, 中村浩幸, 渡辺哲, 寺嶋一夫, 山本直樹, 藤原成悦. EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの作成と解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009年10月25日, 東京.

5) 矢島美彩子, 今留謙一, 渡辺哲, 寺嶋一夫, 中村浩幸, 清水則夫, 山本直樹, 藤原成悦. EBV感染ヒト化NOGマウスにおけるT細胞応答. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009年10月25日, 東京.

6) 今留謙一, 矢島美彩子, 山本直樹, 中村浩幸, 藤原成悦. NOGマウスを用いた慢性活動

性EBV感染症異種移植モデル. 第39回日本免疫学会学術集会. 2009年12月2日, 大阪.

7) 矢島美彩子, 今留謙一, 渡辺哲, 寺嶋一夫, 中村浩幸, 伊藤守, 山本直樹, 藤原成悦. EBV感染ヒト化NOGマウスにおけるT細胞応答の宿主防御的役割について. 第39回日本免疫学会学術集会. 2009年12月2日, 大阪.

8) Tomohiro Morio: Infusion of Ex-vivo Expanded Donor T-Lymphocytes for Intractable Infections and Leukemia. 第32回日本造血細胞移植学会シンポジウム「Cell Therapy for Intractable Infections and Malignant Diseases」2010年2月19日~20日, 浜松

9) 森尾友宏, 渡辺信和, 高橋聡, 中内啓光: HLA-Flow法によるSCID-臍帯血ミニ移植後のキメリズム解析 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成21年度班会議 2010年1月29日 東京

10) 梶原道子, 森尾友宏: ex vivo増殖臍帯血T細胞

輸注療法臨床試験プロトコール 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」班平成21年度第二回班会議, 2010年1月30日, 東京

11) 清水則夫, 森尾友宏: 平成21年度厚生労働科学研究(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」研究代表者 谷口修一, 2010年1月31日 東京

12) 長澤正之, 小野敏明, 遠藤明史, 青木由貴, 磯田健志, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀: 当科における同種造血幹細胞移植(1995-2007年)の検討, 第112回日本小児科学会学術総会, 2009年4月17日~19日, 奈良

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

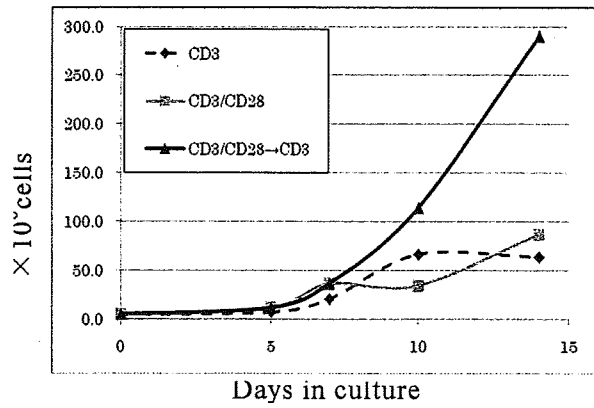


図 1. 細胞増殖曲線. day7 以降、増殖に顕著な差が認められ、day14では CD3/CD28→CD3での条件が最も細胞増殖が認められた。

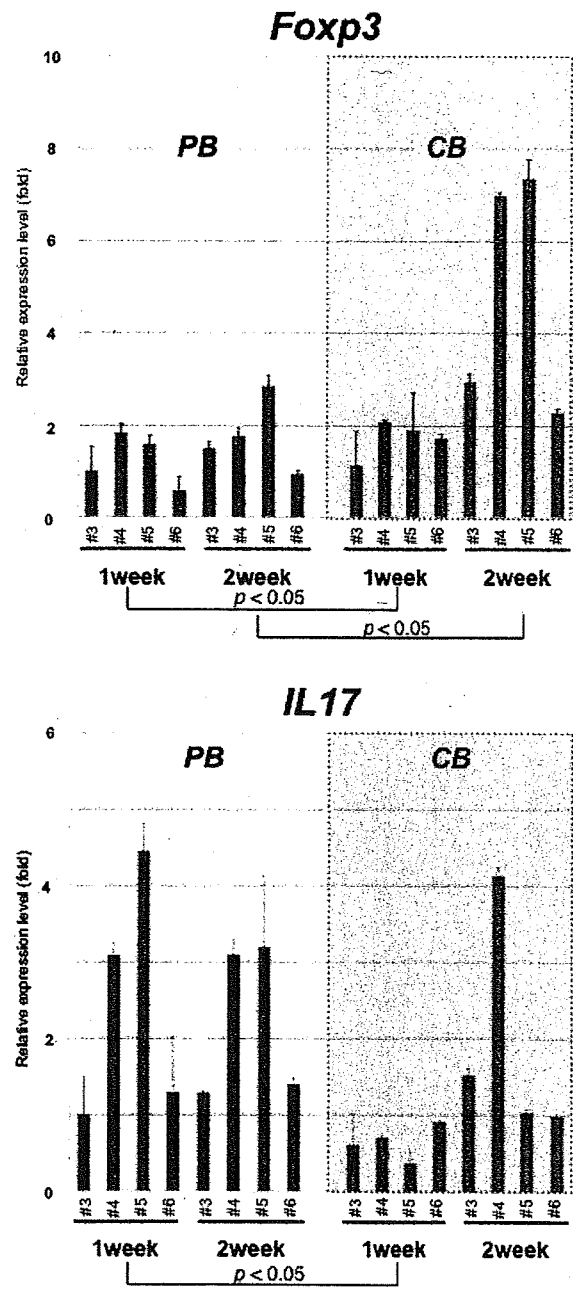


図 2. 臍帯血および末梢血由来の活性化 CD4 (+) T細胞の定量 PCR による Foxp3, IL-17 の遺伝子発現解析

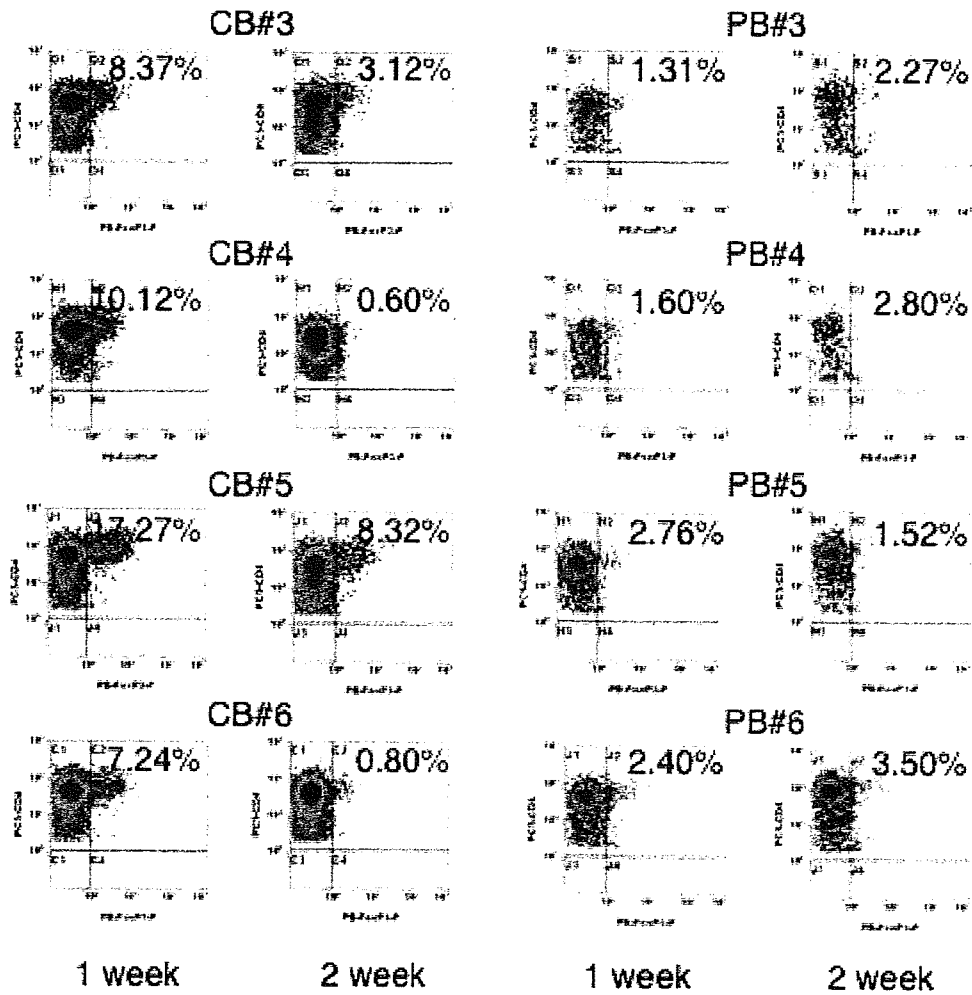


図 3. 臍帯血と末梢血由来活性化 CD4 (+) T 細胞のフローサイトメトリーによる Foxp3, IL-17 の遺伝子発現.

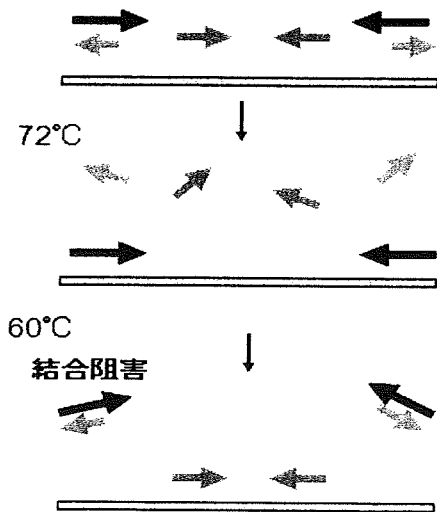


図 4A. 結合阻害プライマーを用いた 1 チューブネステッド PCR (概念図)

74°C 35cycle → 60°C 40cycle
M e8 e7 e6 e5 e4 e3 e2 e1 N M



図 4B. 結合阻害プライマーを用いた 1 チューブ nested PCR 法の結果

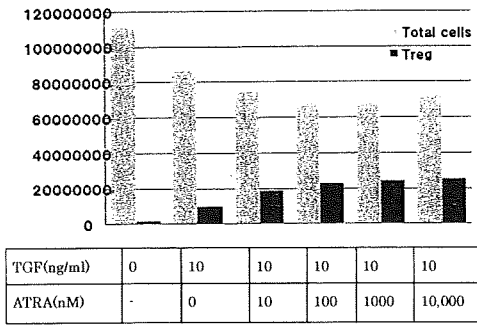


図 5. ATRA 添加における培養後総細胞数と Treg% (n=7)

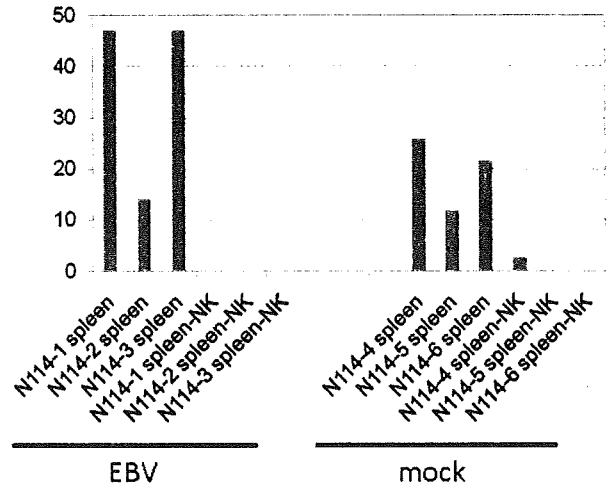


図 8. EBV 感染マウス (N114-1, 2, 3) および mock 感染マウス (N114-4, 5, 6) から脾臓単核細胞を分離培養し、その培養上清の IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。一部の細胞からは磁気ビーズ付加抗 CD56 抗体により NK 細胞を除去した (-NK と記したもの)。

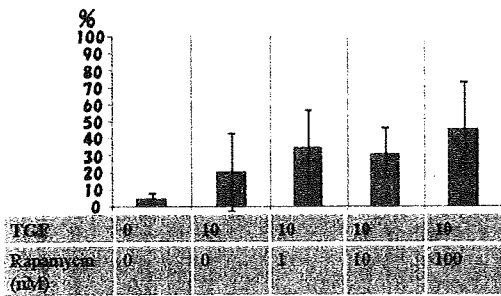


図 6. RAPA 添加における培養後総細胞数と Treg% (n=3)

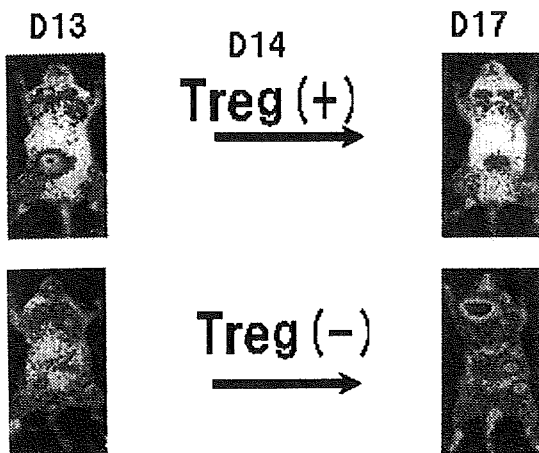


図 7. ex vivo で増幅した制御性 T 細胞による GVHD 治療実験. ルシフェラーゼ導入 T 細胞の増加が Treg により抑制されている。

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

研究者 梅澤 明弘

研究期間 平成 19 年 4 月—平成 22 年 3 月

研究要旨 本研究では、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。また、卵巣黄体化顆粒膜細胞と極めて類似した、ステロイドホルモン産生細胞への分化誘導に成功した。臍帯血由来の間葉系幹細胞を用いることで、卵巣黄体化顆粒膜細胞と極めて類似したステロイドホルモン産生細胞への分化誘導法を開発した。さらに、ヒト間葉系幹細胞を用いた心筋細胞移植方法の実現に向けた前臨床試験を行った。その細胞ソースとして主に、活性化ヒト(あるいはイヌ)骨髄間葉系幹細胞による自己細胞移植を、心筋梗塞モデルでの有効性を検証した。

研究分担者

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| ①. 慶應義塾大学医学部循環器内科
三好俊一郎 | ⑤. アルプラスト株式会社 井上 剛臣 |
| ②. 福井大学・医学部 医学科生命情報医科学
宮本 薫 | ⑥. (株)カネカ ヘルスケアプロダクツ事業本部
櫻井 裕士 |
| ③. 株式会社ツーセル 仁科 博道 | ⑦. 中外製薬(株)育薬研究部 森口 佳之 |
| ④. ジェイ・エム・エス(株) 鈴木 康二 | ⑧. セルテスコメディカルエンジニアリング(株)
藤沢 章 |
| | ⑨. オリンパス株式会社 田村 知明 |

- ⑩. 株式会社ミラキュア 松崎 正晴
- ⑪. 株式会社ジー・シー 山中 克之
- ⑫. サミット・グライコリサーチ株式会社
- ⑬. 岡本 英治
- ⑭. コニカミノルタテクノロジーセンター (株)
須田 美彦

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

心筋分化細胞に関する前臨床試験・臨床プロトコルの作製・検討

細胞ソースとして、ヒト (またはイヌ) 骨髄間葉系幹細胞を、培養期間中に PPAR- γ 活性化物質ピオグリタゾンにて前処置した細胞と、無処置の細胞を準備。免疫学的反応の無い、NudeRat 心筋梗塞モデル、あるいはイヌ自己骨髄間葉系幹細胞を用いてイヌ心筋梗塞モデルに移植、血圧・心臓超音波検査・マッソントリクローム染色による心筋梗塞領域の検討を行うと同時に、EGFP ラベルした間葉系幹細胞を移植し、その心筋への分化を免疫組織化学の実験で評価した。

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。

ステロイドホルモン産生細胞の分化誘導

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞にレトロウイルスを用いて、転写因子 LRH-1 を導入し、恒常的発現細胞株を樹立した。これらの細胞株に cAMP を加え、さらに 2-7 日培養しステロイドホルモン産生細胞への分化誘導を行った。細胞分化は、StAR, CYP11A1, CYP17, CYP21A2, CYP11B1 等のステロイド合成酵素遺伝子の発現を RT-PCR により検出することで解析し、同幹細胞に SF-1 を導入して作製したステロイドホルモン産生細胞の遺伝子発現と比較検討した。

ヒト細胞におけるp16転写阻害による安全性の確保

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および細胞生物学的手法により調べる。

FLAGタグ付加組換え体レクチンMAHのパキユロウウイルス発現系での発現

Bac-To-Bac Baculovirus System を用いて Sf9 細胞に MAH 及び遺伝子改変 MAH を発現させた。まず、Wild-type MAH 及び改変 MAH (Mutant 2~10) の cDNA を pFastBact 1 に組み込みドナーベクターとし、DH10Bac を形質転換した。インサートが確認されたコロニーより組み替え Bacmid DNA を単離した。この Bacmid DNA を常法に従い Sf9 細胞にトランスフェクションし 72 時間培養後ウイルス液を回収し、これをさらに 4 日間培養・増幅したものを最終ウイルス液とした。このウイルス液を Sf9 細胞に感染させ 3 日間培養し、その培養上清を組換え体レクチンの精製に供した。

FLAGタグ付加組換え体レクチンMAHの糖結合活性の確認

レクチンの糖結合活性は表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて測定した。また、細胞表面糖鎖への結合能は赤血球凝集活性及びフローサイトメトリー (FACS) で測定した。

3) -1 SPR 測定

ビオチン化 Sialyl-T 抗原をストレプトアビジン固相化チップに結合させ、0.1mg/ml に調製した天然 MAH 及び組換え体 MAH をアナライトとし、ピアコア 3000 (ピアコア) にて測定した。

3) -2 赤血球凝集活性

赤血球凝集活性は 2% ヒト O 型血液とレクチンの希釈系列を混合し、室温 1 時間反応後凝集の有無を観察した。

3) -3 FACS

組換え体レクチン (改変体) を ECL Protein Biotinylation Module (GE ヘルスケア社) を用いてビオチン標識し、ヒト白血病由来細胞 U937 と反応させた。さらにストレプトアビジン-Alexa488 と反応させ、FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン) で測定した。

FLAGタグ付加組換え体レクチンMAHの保存安定性の確認

組換え体レクチンを 0.5mg/ml in 50mM リン酸カリウムバッファー (pH7.4) に調整し、-20℃、4℃、37℃で 7ヶ月まで保存し、SDS-PAGE と銀染色で一次構造の変化を、SPR により糖結合活性を測定し保存安定性を検討した。また、マメ科レクチンに必須であるカルシウムイオン (CaCl₂)、マンガンイオン (MnCl₂) の添加による安定性への効果を検討した。

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。SPI0 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。SPI0 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の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。

(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. 研究結果

心筋分化細胞への分化

ピオグリタゾン前処置によってヒト骨髄間葉系幹細胞の心筋誘導効率は、 $1.9 \pm 0.2\%$ から、 $39.5 \pm 4.7\%$ に有意に増大した。このピオグリタゾン前処置心筋細胞を、NudeRat 心筋梗塞モデルに移植する事で、非処理動物に比べて、移植後の左室短縮率変化率が有意に改善 ($-4.8 \pm 2.1\%$ $n=17$ vs $5.2 \pm 1.5\%$, $n=30$) した。左室収縮期血圧も 107.5 ± 4.3 から 124.8 ± 2.3 mmHg に改善した。心筋梗塞領域も $15.7 \pm 1.5\%$ から $11.0 \pm 0.8\%$ と有意に改善した。また pioglitazone 前処置を行う事で、Cardiac troponin-I で明瞭な横紋を有するヒト骨髄間葉系幹細胞由来の心筋細胞の生着が in vivo で著明に改善した ($0 \pm 0\%$ vs $0.07 \pm 0.04\%$)。一方でイヌ心筋梗塞モデルを作製、同様の検証を行い、左室駆出率変化率で、 $-3.3 \pm 2.3\%$ ($n=2$) から $+17.8 \pm 4.2\%$ ($n=3$) と著明改善傾向を認め、現在例数を増やして検証をすすめている。

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 \cdot 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 \cdot CD45 陰性である。また同様のマウス骨髄間葉系幹細胞は CD34 \cdot CD117 \cdot CD45 陰性である。

ステロイドホルモンの産生

ヒト骨髄間葉系幹細胞にレトロウイルスを用いて、転写因子 SF-1 あるいは LRH-1 を導入し、それぞれ恒常的発現細胞株を樹立した。これらの細胞株に cAMP を加え、さらに 2-7 日培養しステロイドホルモン産生細胞への分化誘導を行い、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現および培養液中に分泌されるステロイドホルモンを測定した。その結果、LRH-1 は SF-1 と全く同等の分化誘導能を持つことが明らかとなった。ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現パターン、および培養液中に分泌されたステロイドホルモンの量及びパターンも、ほとんど差がなかった。これらの実験結果は、SF-1 だけでなく、もうひとつの NR5A ファミリーである LRH-1 にも間葉系幹細胞をステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導する活性が存在することが明らかとなった。

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。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH のパキキュロウイルス発現系での発現

組換え体レクチンをパキキュロウイルス発現系で安定的に発現することが可能となり、0.5~1L/回の培養スケールで数回の発現培養を行い、Wild Type MAH 及びその改変体を、それぞれ約 10mg 発現させることに成功した。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の affinity 精製

陽イオン交換精製では発現上清を酸性 (pH3.0) に調製する必要があるが、酸による活性への影響を赤血球凝集活性で検討したところ、pH 依存的に、また時間依存的に糖結合活性が失われることがわかった。そこで、培養上清を直接 anti-FLAG agarose を使った affinity 精製で処理する方法について検討した。その結果培養上清の濃縮や pH、塩濃度の至適化により、迅速・大量に、かつ高純度で精製する方法を確立することができた。また、天然 MAH と同様に糖結合活性を利用した Fetuin agarose への結合と EDTA 溶出による精製が可能であり、anti-FLAG agarose と同等の純度で精製品が得られた。

FLAG タグ付加組換え体レクチン MAH の糖結合活性の確認

チップ上に固相化した Sialyl-T への結合を SPR で測定したところ、すべての組換え体レクチンで結合活性が確認された。特に改変体 Mutant 2、5、6、10 では Wild Type よりも高い結合能を示した。FACS 測定においても、ビオチン化組換え体レクチンの濃度依存的に蛍光強度が上昇し、細胞表面への結合が確認された。

精製した組換え体 MAH レクチンの安定性

組換え体レクチンの -20℃、4℃、37℃での安定性を調べた。その結果 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4) 中で、-20℃、4℃では7ヶ月保存で一次構造及び糖結合活性が保たれ、少なくとも半年間は安定であることが明らかとなった。また 37℃保存では、添加物が無い状態では2時間で活性が50%まで低下したが、保存溶液に 0.1mM CaCl₂ 及び 0.1mM MnCl₂ を添加したところ 72 時間後でも活性を保っていた。

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。

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・トレー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

自家 (患者自身の細胞を由来とする) もしくは同種 (ドナーの細胞を由来とする) の培養細胞・組織を対象とした生産において、細胞採取や細胞増殖のための経代培養さらには必要に応じて分化を誘導する組織培養など、培養を主とした細胞加工 (セルプロセッシング) が不可欠となる。その際、医療機関内や企業内では、細胞を安全に操作して品質を確保するための施設であるセルプロセッシングセンター (CPC) にて、熟練オペレータが煩雑な一連の培養作業を実施している。操作の安定性、多大な労力やクロスコンタミネーション・作業ミスの予防等、安全性を担保するための課題があり、培養操作の簡略化や自動化が望まれている。今後、セルプロセッシングについて培養装置を自動化することにより、培養細胞・組織 (製品) の品質向上と人的作業ミスの排除が実現でき安全性と有効性の保証に貢献することが考えられる。一方、培養の研究の進展に伴い、より高機能な培養細胞・組織を調整するため培養工程も煩雑化され、人手では困難な培養方法が研究されている。よって、培養装置による操作の自動化は、質の高い培養細胞・組織を生産する手段として不可欠なものとなる。

幹細胞医療を遂行するに当たり、遵守すべき省令としては以下のものがあげられる。工程・品質管理について、「細胞・組織加工医薬品等がそれぞれの適用を受ける医薬品および医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令 (平成 16 年厚生労働省令第 179 号、GMP 省令)」、施設について「治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備管理 (治験薬 GMP) について (平成 9 年 3 月 31 日付け薬発代 480 合厚生省薬務局長通知) →改定 (薬食発第 0709002 号、平成 20 年 7

月9日付け)、品質・安全性については、「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質および安全性の確保について(薬食発第0208003号、旧薬食発第1314号(ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について)の改訂版)となる。

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により、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こ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。本複合化シートに用いた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デーショナル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 SPI0 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。

ピオグリタゾン前処置骨髄間葉系幹細胞は、自己細胞を用いたヒト心臓再生医療の切り札となるだろう。特に現在安全性がクリアーされていて施行可能な細胞治療法として、心筋再生を期待出来る初めての方法となる。

間葉系幹細胞に転写因子 SF-1/LRH-1 を導入することで、ステロイドホルモン産生細胞への分化誘導に成功しているが、本研究により再生医療では欠かせない組織特異的ステロイドホルモン産生のための制御因子を同定することができた。この成果は、組織特異的ステロイドホルモン分泌を再現できる幹細胞分化誘導法の開発につながるものと期待される。

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デーショナル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

1 論文発表

1. Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of Extraembryonic Mesodermal Origin Confer Human Dystrophin in the Mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Cell Physiol* (in press)

2. Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through 3-dimensional tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009, doi:10.1089/ten.TEC.2009.0459. (in press)
3. Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum Mol Genet*. 19(3):480-493, 2010.
4. Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 14(12):1395-1404, 2009.
5. Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*. 221(2):335-342, 2009.
6. Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 315(16):2727-2740, 2009.
7. Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 78(2-3):137-142, 2009.
8. Yazawa T, Inanoka Y, Mizutani T, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology*. 150(8):3885-3893, 2009.
9. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Lau LF, Tamamura Y, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A. CCN3 and bone marrow cells. *J Cell Commun Signal*. 3(2):135-145, 2009.
10. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, Ezura Y, Umezawa A, Sekiya I. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res*. 27(4):435-441, 2009.
11. Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells.

PLoS One. 4(2):e4634, 2009.

12. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*. 454(7202):345-349. 2008
13. Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod Biomed Online*. 16(1):41-50. 2008
14. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(35):12921-12926. 2008
15. Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*. 3(11):e3709.. 2008
16. Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS ONE*. 3(12):e3945. 2008
17. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. 28(7):2125-2137. 2008
18. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 26(7):1695-1704. 2008
19. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE*. 3(6):e2407. 2008
20. 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*, in press.2007
21. 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*. in press.2007
22. 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 enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. in press.2007
23. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stemcells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
24. 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*, in press.2007
25. 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*. in press.2007
26. 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 enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. in press.2007
27. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stemcells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
28. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells*. 24(10):2270-8. 2006
29. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL)cells and colony-forming units in spleen(CFU-S)following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. *J. Cellular Physiology* 208:188-194.2006
30. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology*. 147(9):4104-11. 2006
31. Ikegami Y, Miyoshi S(corresponding author), Nishiyama N, Hida N, Okamoto K, Miyado K, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells.