

## 9) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

本研究で肝細胞の分化誘導や成熟化を制御する microRNA の機能を明らかにした。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にこの microRNA が有効かどうかを判定する実証研究を続ける必要が有る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Enosawa S, Yamazaki T, Kohsaka H, Tokiwa T. Repopulation of human origin hepatocyte progenitor-like cell line, THLE-5b, in the Scid mouse liver under p21-mediated cell growth arresting conditions. *Cell Transplant* 21; 447-452, 2012, DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368911X605358>
- 2) Enosawa S, Miyamoto Y, Kubota H, Jomura T, Ikeya T. Construction of artificial hepatic lobules-like spheroids on a 3-dimensional culture device. *Cell Medicine* 3; 19-23, 2012 DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639478>
- 3) Shigeta T, Matsuno N, Obara H, Mizunuma H, Kanazawa H, Tanaka H, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Uemoto S, Enosawa S. Functional recovery of donation after cardiac death liver graft by continuous machine perfusion preservation in pigs. *Transplant Proc* 44; 946-947, 2012 doi:10.1016/j.transproceed.2012.01.078
- 4) Shigeta T, Matsuno N, Huai-Che H, Obara H, Mizunuma H, Hirano T, Uemoto S, Enosawa S. A basic consideration for porcine liver preservation using a novel continuous machine perfusion device. *Transplant Proc* 44; 942-945, 2012 doi:10.1016/j.transproceed.2012.03.013
- 5) 絵野沢 伸. 臓器移植から細胞治療へ 医薬品としての肝細胞の可能性. *Human Science* 23(2); 31-33, 2012
- 6) Katsuda T, Sakai Y, Ochiya T. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes. *J Stem Cells* 7:1-17, 2012
- 7) Furuichihi K, Shintani H, Sakai Y, Ochiya T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. *Clin Exp Nephrol* 16(5):679-89, 2012 doi:10.1007/s10157-012-0614-6. Epub 2012 Mar 8
- 8) Ishikawa T, Hagiwara K, Ochiya T. Generation and hepatic differentiation of human iPS cells. *Methods Mol Biol* 826; 103-114, 2012
- 9) Kasuya K, Oshiro H, Saito K, Suzuki Y, Kikuchi S, Kyo B, Matsudo T, Nagakawa Y, Itoi T, Tsuchida A. Comparison of preoperative images with gross and histopathological findings of liver slices in patients with liver metastases from colorectal cancer after chemotherapy. *Hepatogastroenterology* 59 (116); 981-985, 2012
- 10) 松野直徒、小原弘道、平野俊彦、武藤 眞、許 懐哲、絵野沢 伸、水沼 博. 臨床応用を目指した肝移植用持続灌流保存装置の開発と温阻血障害肝を用いた研究. *Organ Biology* 18(1); 87-91, 2011
- 11) 浅野武秀監修、剣持 敬、福寫教偉、絵野沢 伸編. 移植のための臓器摘出と保存. 丸善出版 ISBN 978-4-621-06494-8 C3047 平成 24 年 3 月 5 日発行
- 12) 粕谷和彦、永川裕一、鈴木芳明、土田明彦、青木達哉、杉本勝俊、糸井隆夫、斉藤和博、永井毅、島津元秀. 肝微小転移の画像診断、治療診断、病理診断. *臨床外科* 66(10); 1297-1305, 2011
- 13) 大和田哲男. CAS 機能技術の食品食材から医学医療への応用開発. *Organ Biology* 18(1); 71-78, 2011
- 14) Miyamoto Y, Teramoto N, Hayashi S, Enosawa S. An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, sericin, in the serum-free solution. *Cell Transplant* 19(6):701-706, 2010 doi:10.3727/096368910X508799. Epub 2010 Jun 3
- 15) 絵野沢 伸. ヒト幹細胞の産業応用における法と指針. *バイオインダストリー* 7 月号 27(7); 54-62, 2010
- 16) 松野直徒、小原弘道、水沼 博、武藤 眞、平野俊彦、絵野沢 伸. 臨床における臓器保存方法の最近の進歩 -持続灌流保存. *Organ Biology* 17;245, 2010
- 17) Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation* 79(2):65-73, 2010 doi:10.1016/j.diff.2009.10.002. Epub 2009 Nov 1
- 18) Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 10;107(32):14223-14228, 2010 doi:10.1073/pnas.1009582107. Epub 2010 Jul 26
- 19) Chowdhury MM, Katsuda T, Montagne K, Kimura H, Kojima N, Akutsu H, Ochiya T, Fujii T, Sakai Y. Enhanced effects of secreted soluble factor preserve better pluripotent state of embryonic

stem cell culture in a membrane-based compartmentalized micro-bioreactor. *Biomed Microdevices* 12(6):1097-1105. doi: 10.1007/s10544-010-9464-8

20) 山田泰弘. 創薬段階におけるハイスループット分析技術. *日薬理誌* 135;109, 2010

## 2. 学会発表

1) 絵野沢 伸. 形態制御が与える機能面の変化肝細胞初代培養の経験から. シンポジウム 2 細胞接着と細胞機能制御の最先端 日本組織培養学会第 85 回大会 平成 24 年 5 月 17~18 日 京都

2) 齋藤 亮、絵野沢 伸. 凍結保存肝組織からの肝細胞分離. 日本組織培養学会第 85 回大会 平成 24 年 5 月 17~18 日 京都

3) 許 懐哲、松野直徒、絵野沢 伸. 細胞ソースとしての心停止ドナー肝 一温阻血肝組織における CPD 加ユーロコリンズ液灌流の有効性一. 第 30 回日本肝移植研究会 2012 年 6 月 14, 15 日 福岡

4) 絵野沢 伸. 肝臓の細胞治療確立に必要な細胞工学的アプローチについて. シンポジウム II 細胞工学と再生医療. 第 39 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会 福島 2012 年 11 月 16, 17 日

5) Ikeya T, Takahashi Y, Hayashi H, Enosawa S. Cytological advantages of the cell array three-dimensional culture of human cryopreserved hepatocytes evaluated by comprehensive gene expression. 27th Japanese Society for the Study of Xenobiotics, JSSX, Chiba, 2012/11/20-22 (池谷武志、高橋由里子、林 仁寿、絵野沢 伸. 初代肝細胞の 2 次元培養と 3 次元培養における網羅的遺伝子発現比較. 日本薬物動態学会第 27 回年会 千葉 2012 年 11 月 20~22 日)

6) Enosawa S. Viable hepatocytes from cryopreserved liver and CAS system. Symposium 1 Innovative freezing techniques - CAS and regeneration and transplantation medicine. "Cryomedicine 2012" The 39th Annual Meeting of Japan Society for Low Temperature Medicine, Tokyo, November 21-22, 2012 (絵野沢 伸. 凍結肝組織からの肝細胞分離と CAS. シンポジウム 1 新しい凍結技術-CAS と再生移植医療. 第 39 回日本低温医学会総会 2012 年 11 月 21 日~22 日 東京)

7) Hsu HC, Matsuno N, Tanaka R, Enosawa S. Negative effect of warm ischemia on hepatocyte isolation and an attempt to increase the recovery. "Cryomedicine 2012" The 39th

Annual Meeting of Japan Society for Low Temperature Medicine, Tokyo, November 21-22, 2012 (許 懐哲、松野直徒、田中 綾、絵野沢 伸. 温阻血がもたらす肝実質細胞収量の低下とその克服. 第 39 回日本低温医学会総会 2012 年 11 月 21 日~22 日 東京)

8) Ikeya T, Takahashi Y, Hayashi H, Enosawa S. Comparison of comprehensive gene expression after 14 days culture on the cell array three-dimensional culture (Cell-able) and conventional monolayer culture of human cryopreserved hepatocytes. Symposium for new technology for cell-based drug assay. Tokyo, December 10, 2012 (池谷武志、高橋由里子、林 仁寿、絵野沢 伸. 凍結ヒト肝細胞の Cell-able 上三次元培養 14 日後の遺伝子発現の網羅的解析の通常培養との比較. シンポジウム 細胞アッセイ技術の現状と将来 2012 年 12 月 10 日 東京)

9) 絵野沢 伸. 臨床肝細胞移植の視点から見た幹細胞分化治療用肝細胞が具備すべき形質について. 公開シンポジウム ヒト iPS 細胞由来分化細胞の実用化 ~再生医療と創薬応用に必要な機能獲得をどう評価するか?~ 主催: 国立医薬品食品衛生研究所 2013 年 2 月 14 日 東京大学 (東京都文京区)

10) 絵野沢 伸. 肝細胞移植臨床研究に向けた準備と今後の課題. 第 3 回先進医療開発コアセンターシンポジウム 平成 25 年 3 月 19 日 東北大学 (宮城県仙台市)

11) Ochiya T. Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer. DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF EXOSOMES, Molecular Diagnostics Europe, London, England. May 7-13, 2012.

12) Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for breast cancer stem cells. Asia 2012, Singapore. August 28-31, 2012.

13) Ochiya T. Exosome as a novel regulator of tumor microenvironment. The International Center Microenvironment Society, Suzhou, China. November 12-18, 2012

14) 落谷孝広. エクソソームによる肝疾患の診断治療への応用. 8th 肝免疫・ウイルス・フロンティア (Liver 2012) 2012 年 4 月 14 日 東京

15) 落谷孝広. エクソソームを標的としたバイオマーカー開発の最前線. 21th 日本抗加齢医学会総会 2012 年 6 月 22~24 日 横浜

15) 三森佳代、近藤祐樹、吉橋幸美、荻原留理、岩尾岳洋、松永民秀. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離・凍結保存法の検討. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11~14 日 福岡

16) 粕谷和彦、土方陽介、高橋恒輔、岩崎謙一、

- 松土尊映、菊池 哲、許 文聰、永川裕一、鈴木芳明、土田明彦. 肝薄切検体を用いた大腸癌肝微小転移の検索、術前画像 EOB-MRI との対比. 第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会 2012 年 5 月 30 日～6 月 1 日 大阪
- 17) Enosawa S, Takahashi Y, Jomura T, Ozeki E, Ikeya T. Functional evaluation of 3D-culture of human hepatocytes on Cell-able under newly optimized condition. 17th North American Regional ISSX Meeting, International Society of Study for Xenobiotics (ISSX), Atlanta, USA, 16 - 20, October, 2011
- 18) 絵野沢 伸. 福田晃也、阪本靖介、重田孝信、中澤温子、笠原群生. 肝細胞移植 EBM 化に向けた取り組み. 第 47 回日本移植学会総会 仙台 平成 23 年 10 月 4-6 日
- 19) Enosawa S, Takahashi Y, Jomura T, Ozeki E, Ikeya T. Human hepatocyte 3D culture on Cell-able using newly optimized medium and its functional evaluation. 26th JSSX Annual Meeting, Hiroshima, 16 ? 18, November, 2011 (絵野沢 伸、高橋由里子、城村友子、小関恵美子、池谷武志. 新規培地を用いた Cell-able によるヒト肝細胞 3 次元培養の最適化と機能評価. 日本薬物動態学会第 26 回年会 広島 平成 23 年 11 月 16-18 日)
- 20) 絵野沢 伸、齋藤 亮. 凍結肝組織からの肝細胞分離. 第 38 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 仙台 平成 23 年 11 月 25-26 日
- 21) 絵野沢 伸. 肝細胞移植治療 標準化に向けた取り組み. 再生医療におけるヒト組織・細胞の利用. バイオジャパン 2011 主催者セミナー 平成 23 年 10 月 6 日 東京
- 22) 落谷孝広. 分泌型 microRNA の生物学的意義と疾患診断への応用. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 平成 23 年 5 月 13~14 日 広島
- 23) 落谷孝広. 幹細胞の創薬利用の将来: 分化誘導と肝細胞培養法. 15th 薬物動態談話会セミナー 平成 23 年 8 月 24~26 日 大阪
- 24) 落谷孝広. 間葉系幹細胞による再生医療実現に向けて. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会 平成 23 年 9 月 15~16 日 福岡
- 25) 近藤祐樹、岩尾岳洋、三森佳代、吉橋幸美、大森 栄、松永民秀. ヒト人工多能性幹細胞からの肝細胞への効率的な分化方法の検討. 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 平成 23 年 7 月 9 日 名古屋
- 26) 粕谷和彦、永川裕一、松土尊映、遠藤光史、許文聰、鈴木芳明、土田明彦、青木達哉. 化学療法後の転移性肝癌の CT、MRI 画像と肝マクロ所見、組織所見との対比. 第 23 回日本肝胆膵外科学会学術集会 平成 23 年 6 月 8~10 日 東京
- 27) 粕谷和彦、松土尊映、菊池 哲、許文聰、遠藤光史、永川裕一、鈴木芳明、土田明彦、島津元秀、青木達哉. 肝微小転移の治療的診断法の試み. 第 73 回日本臨床外科学会総会 平成 23 年 11 月 17~19 日 東京
- 28) Oowada N. Wonderful cooling method for foods; Cells Alive System. Luncheon Session I, The 4th International Hypothermia Symposium, September 15 to 17, 2011, Tokyo
- 29) 高橋由里子、城村友子、小関恵美子、池谷武志. 細胞非接着性表面処理による 3 次元培養基板を用いたヒト初代肝細胞機能評価. 日本組織培養学会第 84 回大会 平成 23 年 5 月 27, 28 日 東京 (奨励賞受賞)
- 30) 絵野沢 伸、高橋由里子、川口太知、池谷武志. 細胞アレイ、Cell-able 上で形成されたヒト肝細胞スフェロイドのトランスポーター能. 日本組織培養学会第 83 回大会 岡山 5/20, 21, 2010
- 31) 高橋由里子、池谷武志、絵野沢 伸. 手術摘出肝組織由来新鮮ヒト肝細胞を用いた Cell-able 上スフェロイド培養の肝機能評価. 第 17 回エイチ・エー・ビー研究機構学術年会 東京 5/21, 22, 2010
- 32) Enosawa S, Yamada Y, Takatsu H, Suzuki S, Ochiya T. Highly significant CYP activities of hepatocyte-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The 25th Annual Meeting of the Japan Society for the Study of Xenobiotics (JSSX), 10/7-9, 2010, Omiya 絵野沢 伸、山田泰弘、高津久恵、鈴木 聡、落谷孝広. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝細胞様細胞への分化 第 25 回日本薬物動態学会 平成 22 年 10 月 7-9 日 2010 年 大宮ソニックシティー (ベストポスター受賞)
- 33) 絵野沢 伸、高橋由里子、川口太知、池谷武志. 新規三次元培養基板 Cell-able 上のヒト肝細胞スフェロイドのトランスポーター能. 第 37 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会. 平成 22 年 11 月 19 日~20 日 新潟グランドホテル
- 34) 絵野沢 伸. 薬物動態研究における肝細胞スフェロイドの有用性: ラットおよびヒト肝細胞培養の経験から. シンポジウム 3 代替法に有用な細胞培養システムへの生物学的アプローチ. 日本動物実験代替法学会第 23 回大会 平成 22 年 12 月 3 日?5 日 北里大学薬学部、東京
- 35) 落谷孝広. 間葉系幹細胞の生物学的特性の解明と再生医療への応用. 日本医工学治療学会 第 26 回学術大会 平成 22 年 4 月 2 日~4 日 東京
- 36) 落谷孝広. 肝細胞分化指向性の高いヒト Hepa-iPS 細胞の作製. 第 26 回日本 DDS 学会学術集会 平成 22 年 6 月 17 日~18 日 大阪

37) 落谷孝広. State of the Art of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell Therapy. The 4th International Symposium Safety of adipose mesenchymal stem cells and efficacy on spinal cord injury・講演 (2010.6.27-28 京都)

38) 落谷孝広. 脂肪組織に由来する間葉系幹細胞を用いた再生医療の可能性. 第8回長崎障害者支援再生医療研究会 平成22年7月20日～21日 長崎

39) 落谷孝広. 幹細胞による肝臓機能再構築の現状. 日本動物実験代替法学会第23回大会・講演 平成22年12月3日～5日 東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 創薬研究における人由来初代細胞および 幹細胞の利用円滑化に向けた研究

国立成育医療研究センター  
臨床研究センター  
絵野沢 伸

**研究要旨** 手術摘出検体からのヒト初代肝細胞の研究利用方法の拡大と、幹細胞分化肝細胞の創薬研究への応用可能性を検討した。ヒト初代肝細胞に関する研究では、クエン酸加ユーロコリンズ液による初期灌流が分離生肝細胞数を増加させることを見出した。また昨年度ブタ肝組織を用いて開発した凍結組織から肝細胞を分離する技術をヒト肝組織に応用し、薬物代謝活性を有する生肝細胞の分離に成功した。本研究において官民共同研究のコアである細胞アレイ (Cell-able) 培養では網羅的遺伝子解析の結果、平面培養よりも初期遺伝子発現を維持できることがわかった。また昨年度確立した手術摘出肝組織の大型薄切標本によりマクロからミクロまでの連続的な観察が可能となる全肝 thin slice 法により臨床検体の分析を行い、化学療法後の手術標本では微小転移内に生きたがん細胞はほとんどないことがわかった。ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化誘導研究では、肝細胞分化培養時における継代と凍結保存条件の最適化と、分化誘導を規定する可能性のある肝臓発生初期過程の non-coding RNA 候補について検討を行った。

### 研究分担者

- |                  |       |
|------------------|-------|
| (1) 国立がん研究センター   | 落谷孝広  |
| (2) 名古屋市立大学      | 松永民秀  |
| (3) 東京医科大学       | 土田明彦  |
| (4) 株式会社アビー      | 大和田哲男 |
| (5) 田辺三菱製薬株式会社   | 山田泰弘  |
| (6) 東洋合成工業株式会社   | 池谷武志  |
| (7) 株式会社トランスパレント | 城村友子  |

### A. 研究目的

創薬研究に必須のヒト由来初代肝細胞・組織の保存と長期培養技術を、国立成育医療研究センターの手術摘出肝組織および市販凍結人肝細胞を用い、開発・改良する。保存は食品の冷凍保存の革新的技術である磁界内 CAS 凍結法を発展させる。長期培養は、東洋合成工業製作の細胞アレイ基板 Cell-able を用い、トランスパレント社が有する培養プロトコールによる肝細胞の長期機能維持培養法をヒト肝細胞向けに改良する。一方、初代肝細胞に代わり発展性が期待される幹細胞からの肝細胞様細胞分化誘導法を開発・改良し、創薬研究に使用可能な水準の薬物代謝活性、同誘導能、実用に耐えうる細胞数の確保をめざす。また、分化細胞を用いた肝がん発症を薬効薬理試験モデルとして検討し、新たな動物実験代替法をめざすものである。

### B. 研究方法

- 1) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

雄性 SD ラット (200~300g) を用い、エンフルラン麻酔下で開腹の後、門脈から灌流液、コラゲナーゼ液を流し、肝細胞を分離した。肝実質細胞の生細胞率、生細胞数はトリパンブルー排除法により計測した。温阻血は門脈カニューレションの後に肝門部の門脈、肝動脈を結紮することによった。灌流液は、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> free-Hanks 液、ユーロコリンズ液、CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) 加ユーロコリンズ液を用いた。

- 2) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

生体肝移植時の余剰肝組織 (120g 前後) に 10% dimethylsulfoxide、10% 牛胎仔血清を含む DMEM 培地を 200mL 灌流し、ビニール袋 (フリーザー用のジッパー付き袋を使用) に入れ昨年度までに確立した方法で凍結した。その後、液体窒素中で 7 日間保存した後に解凍し、コラゲナーゼ灌流法で肝実質細胞を分離した。解凍方法も昨年度までに開発した急速解凍方法、すなわち、液体窒素保管容器から室温下に取り出し 1 分間放置の後、温浴中で 1 分間加温、さらにビニール袋内に予め 38℃ に温めた生理的食塩水 250mL を流し込んだ。肝組織の消化は通常のコラゲナーゼ消化法に加え、DNase I (162.5unit/mL) を添加した。

肝実質細胞の生細胞率はトリパンブルー排除

法によった。薬物代謝活性はテストステロン 6 $\beta$  水酸化によった。

### 3) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

凍結ヒト肝細胞は Xenotech (lot HC1-18) を使用した。培養には三次元培養用細胞アレイ、Cell-able (96 穴) を用い、対照として 96 穴コーゲンコートプレート (住友ベークライト) を用いた。Cell-able の使用に際してフィーダー細胞としてマウス 3T3 細胞を 1 穴当たり  $8 \times 10^3$  細胞播種した。その後、肝実質細胞は 1 穴当たり生細胞として  $2 \times 10^4$  細胞播種した。培地は RM101 (トランスパレント社) を用いた。

培養は 14 日間行い、遺伝子発現を Agilent 社製 microarray によって測定した。

### 4) ヒト iPS 細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討 (松永、山田)

国立成育医療研究センターにおいて樹立されたヒト iPS 細胞株 (Windy) を用いた。ヒト iPS 細胞を activin A 処理することで内胚葉に、続いて dimethyl sulfoxide にて肝芽細胞に分化させ、oncostatin M、dexamethasone、hepatocyte growth factor によって成熟させる方法にて肝細胞に分化誘導した。

立体培養、培地及び低分子化合物 X 添加による肝細胞への分化誘導に与える影響の検討は、上記分化法を基に行った。立体培養の効果の検討は、肝細胞の分化誘導開始 12 日目に collagenase type IV と Accutase を併用して剥離を行い、Matrigel もしくは Cell-Able 上に播種して行った。培地の検討は、肝細胞への分化誘導に使用する培地としてプライマリーセル社の COS medium 004 for Hepatocyte/F12based もしくはトランスパレント社の RM101 を用いて行った。低分子化合物 X 添加の検討は、分化誘導時に低分子化合物 X を添加し行った。分化誘導終了後、薬物代謝酵素活性の測定を行った。

剥離及び凍結保存の条件検討は、以下の通り行った。内胚葉への分化誘導後、細胞外マトリックスとしてゼラチンもしくは Matrigel 上に継代した。剥離・凍結保存は肝芽細胞誘導後に行い、Matrigel 上に継代・播種した。剥離は collagenase type II、collagenase type IV (IV) もしくは dispase と Accutase (A) の併用もしくは trypsin-EDTA を、保存は Cell Reservoir One、霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液もしくはセルバンカーを用いた。分化後の細胞について、mRNA 発現解析及び薬物代謝酵素活性の測定を行った。尚、代謝物測定は田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所にて行った。

### 5) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

多発性両葉肝転移に対し、肝区域切除以上を施行した 5 例を対象とした。症例 1 と 4 は二期的に肝右葉切除を行った。術前の肝臓の画像診断は、造影 CT は 1mm 厚、EOB-MRI は 3mm 厚で撮像し、化学療法前後に撮影したすべての造影 CT と EOB-MRI 画像を参考に、対象となる肝区域または葉切除部位の転移個数を算出した。切除肝区域または肝葉は以下の方法で薄切検体を作成した。まず切除肝は割を入れずに Whole でホルマリンに浸け、肝動脈または胆管よりホルマリンを 4 週間灌流した。その後 50%、70% のアルコールの持続注入を 1 週間行い十分に脱水した。食用寒天粉末を用い、沸騰溶解させて 3.5% 寒天溶液を作成した。肝臓は立方体のプラスチック容器に移し、粗熱をとった寒天溶液で満たし、1 夜、冷蔵庫にて寒天を固めた。翌日、直方形に固定された寒天に撮影位置マーカーとして径 1mm の穴を 2 か所開けた。その後、市販のミートスライサーを用い 0.5-1mm 厚に均等にスライスした。スライスした肝は定位置より写真撮影し、連続画像として記録した。その後、スライスした肝は裸眼またはルーペを用いて肉眼観察し、転移巣の存在する可能性のある部位を point out した。同部位をパラフィン包埋し、HE 染色にて検鏡、最終病理診断とした。

### 6) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

すでに開発した HIFC 分化誘導方法を改良してヒト iPS 細胞からの肝細胞分化及び成熟化促進を計る。本年度は分化誘導の過程を大幅に効率化する目的で、従来の増殖因子による分化誘導効率を促進する因子を検索する事に重点をおき、特に本年度は初年度の成果で見いだされた肝臓の分化成熟に関与する microRNA148a に焦点を絞り、マウス幼若肝細胞の成熟化促進の有無を様々なパラメーターから検討した。さらに、このマイクロ RNA の効果を、従来の HIFC サイトカインカクテルで誘導した未成熟肝細胞様細胞に導入し、分化成熟等を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト由来検体利用実験については各研究機関においてそれぞれ研究計画申請を行い、許可を受けて行った。

## C. 研究結果

### 1) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

30 分の温阻血後の肝細胞分離で、生細胞率は 83.5% から 61.6% に低下し、生細胞数は著しく低

下した (対照  $4.57 \pm 0.39$  vs 温阻血群  $0.76 \pm 0.21$ , それぞれ  $\times 10^8$ )。温阻血肝を CPD 加ユーロコリンズ液で灌流すると生細胞数は  $2.37 \pm 0.12 \times 10^8$  に増加した。CPD を加えないユーロコリンズ液ではそれほど顕著な改善は見られなかった。さらに 60 分の温阻血後に分離すると、生細胞率は 52.2%、生細胞数は  $0.70 \pm 0.04 \times 10^8$  に低下した。この時も CPD 加ユーロコリンズ液で灌流すると生細胞数は  $1.68 \pm 0.34 \times 10^8$  に改善した。すなわち 60 分温阻血という過酷な条件下においても対照の 36.8% の回収率で生肝実質細胞が得られた。

## 2) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

凍結方法、解凍方法を改良することによって肝組織が割れることなく常温に戻すことが可能となった。得られた細胞の生細胞率は 72.4% で形態的にも膜表面の状態がよく保たれていた。コラゲナーゼによる組織消化率は 12.0% で、生細胞数  $1.8 \times 10^7$  個、 $3.0 \times 10^6$  個/g 肝湿消化重量、分離細胞の薬物代謝活性は  $3.7 \text{fmol/hr/cell}$  であった。この値は市販凍結ヒト肝細胞の活性平均値 ( $15.7 \pm 4.6 \text{fmol/hr/cell}$ ) の 23.6% であった。

## 3) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

14 日間培養した肝細胞において 2 倍以上の変化 (2 倍以上の発現上昇あるいは 0.5 倍以下の発現低下) を起こした遺伝子数は、Cell-able で 6,900、対照の平面培養群で 8,586 と、明らかに Cell-able 群で少なかった。すなわち 14 日間の培養を経ても Cell-able による培養は、初期発現値との相違が少なかった。

また、14 日間培養した肝細胞において培養穴 (Well) 間の発現を比較したところ、明らかに Cell-able 群でばらつきが少なく抑えられていた。すなわち 14 日間の培養を経ても Cell-able による培養は、各試験穴間の誤差が少なく、均一に保たれていた。

## 4) ヒト iPS 細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討 (松永、山田)

肝細胞の分化誘導開始 12 日目に一旦継代した後、そのまま 2 次元あるいは 3 次元 (Cell-able) にて分化誘導後の細胞について、薬物代謝酵素活性測定を行った。その結果、ミダゾラム 1'-水酸化活性 (CYP3A) をはじめ、各種 CYPs による活性が認められた。フェナセチン O-脱エチル化活性 (CYP1A)、ブプロピオン水酸化活性 (CYP2B) 及びブフラロール 1'-水酸化活性 (CYP2D) は、RM101 を用いた三次元培養群において高い傾向が認められた。立体培養を行い、COS medium 004 for

Hepatocyte/F12based を用いて低分子化合物 X を添加した群でジクロフェナク水酸化活性 (CYP2C) 及び 7-ヒドロキシマリングルクロン酸抱合活性 (UGT) は増加が認められたものの、ブプロピオン水酸化活性 (CYP2B) 及びミダゾラム 1'-水酸化活性 (CYP3A) は検出限界以下であった。肝細胞分化後の細胞について mRNA 発現解析を行ったところ、肝細胞マーカーである albumin (ALB)、tyrosine amino transferase (TAT)、ヒト成人の主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 等の発現が認められた。この条件を基本とし、肝芽細胞誘導後の細胞で剥離の条件検討を行った。3 種類の剥離液 (collagenase type II、collagenase type IV もしくは dispase) と Accutase を併用し比較したところ、3 種類の剥離液の間で肝細胞マーカー及び薬物代謝酵素の発現量に大きな差異は認められなかった。しかしながら、これらの細胞剥離液では単一細胞に剥離できず、細胞同士が接着したシート状となった状態での回収であった。剥離液として trypsin-EDTA を使い、細胞外マトリックスの検討を行ったところ、内胚葉分化後の継代時にゼラチン上に播種した細胞は、肝芽細胞分化後にシート状ではない状態での剥離が可能であった。また、肝芽細胞分化後に剥離を行わなかった群では、ゼラチンと Matrigel の間で肝細胞マーカーの mRNA 発現に大きな差異は認められなかった。肝芽細胞誘導後の細胞の剥離・凍結保存に至適な条件を詳細に検討するため、細胞外マトリックスとしてゼラチンと Matrigel の比較、剥離液として collagenase type IV と Accutase の併用と trypsin-EDTA の比較を行った。肝芽細胞誘導後の細胞の剥離に collagenase type IV と Accutase を併用した群では、肝芽細胞誘導後の細胞の剥離を行わなかった群と比較して肝細胞マーカー発現の大幅な減少が認められたが、trypsin-EDTA を使用した群ではその減少が抑制された。剥離液として trypsin-EDTA を使い、細胞外マトリックスとしてゼラチンを用いた群では、Matrigel を用いた群と比較して肝細胞マーカーの発現は同等であった。しかし、剥離液の処理時間を比較すると、ゼラチン群は 10 分間処理によって剥離が可能であったのに対し、Matrigel 群では剥離に 30 分を要した。

細胞外マトリックスとしてゼラチンを、剥離液として trypsin-EDTA を用いた条件で剥離した細胞を、セルバンカー、霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液もしくは Cell Reservoir One を用いて凍結保存し、分化させたところ、セルバンカーを用いた群では、肝細胞マーカーである ALB、alpha-fetoprotein (AFP) 及び TAT の発現の大幅な減少が認められた (Fig. 5)。一方で、CYP3A4 については霊長類 ES/iPS 細胞用凍結保存液を用

いた群において最も高い発現量を示したが、生存細胞数は少なかった。ALB、TAT、プレグナン X 受容体 (PXR) については Cell Reservoir One を用いた群において最も高い発現量を示した。

これらの細胞において、肝細胞の重要な機能の一つである薬物代謝酵素活性を測定したところ、内胚葉分化後にのみ継代を行った群 (control) で各々の薬物代謝酵素により生成される代謝物が検出された。これらの代謝物は肝芽細胞分化後に継代を行った群で減少し、CYP1A2 により生成される代謝物は検出限界以下であった。また、Cell Reservoir One を用いて凍結保存を行った群では UGT 活性は減少し、CYP1A2、CYP3A4/5、SULT の活性は検出できなかったものの、CYP2C9 及び CYP2D6 については凍結保存を行わなかった群と比較して同レベルの活性が認められた。CYP2B6 及び CYP2C19 に関しては、すべての群において代謝物が検出出来なかった。

#### 5) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

化学療法前後、薄切肝標本の病理診断での転移数について、造影 CT と EOB-MRI では EOB-MR の検出感度が優れていた。症例 1 は EOB-MRI 上の転移個数は化学療法前の 19 個から化学療法により 12 個の減じていた。薄切標本の肉眼所見では 12 個が point out され、すべてが病理組織で癌であった。術後に化学療法を施行したが、4 カ月後に残肝再発し、8 カ月後に皮膚と脾臓に転移を来した。症例 2 では化学療法前には単純 CT のみが施行されており、転移個数をカウントは出来なかった。化学療法後の EOB-MRI では 12 個、薄切標本の肉眼所見では 16 個が point out され、そのうち 13 例が癌であった。術前に EOB-MRI で描出されず、かつ薄切検体にて肉眼的に転移巣の可能性のある部位として 4 か所を point out した。うち 1 個に微小転移を認めた。病巣の大きさは径 3mm で肉眼的に白色調を呈しており、病理組織学的には癌細胞の壊死は少なく viable であった。他の 3 か所の径は 1mm 程度であり癌細胞を認めなかった。同部は単一細胞レベルでの肝細胞壊死とグリソン鞘の限界板の乱れ、細胆管の増生所見、脂肪化がみられ、薬剤性肝障害に伴う再生結節と判断された。Outcome については術後に化学療法は施行せず、術後 11 カ月で無再発生存中である。症例 3 は化学療法前後の EOB-MRI 上の後区域病巣数はいずれも 3 個であった。薄切標本の肉眼所見では 10 個が point out され、そのうち 3 例が癌であり、すべてが EOB-MRI で病巣を指摘された部位であった。病巣はほとんど線維化しており、辺縁に viable な癌細胞を認めた。癌でなかった 7 病巣の径は 1mm 程度であり、いずれも高度に脂肪変性を

伴った小葉単位の結節であった。症例 4 は手術所見は肉眼的に癌の遺残があった (R2)。術前 EOB-MRI で描出された結節数、薄切標本の肉眼所見、病理組織所見のいずれも 4 個であり、すべて一致した。癌遺残部から残肝再発した。症例 5 は化学療法前後の EOB-MRI 上の後区域病巣数はいずれも 10 個であった。薄切標本の肉眼所見では 14 個が point out され、そのうち 10 個が癌であり、すべて EOB-MRI で描出された病巣であった。癌でなかった残りの 4 病巣の径は 1mm 程度であり、いずれも高度に脂肪変性を伴った小葉単位の結節であった。

#### 6) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

成熟型の肝細胞分化誘導に深く関与する microRNA148a はメチル化の維持等に重要な分子として有名な DNMT を制御する事が明らかとなった。

この microRNA を幼若肝細胞へ導入する事により、DNMT1 の発現が抑制され、同時に肝細胞特異的な成熟肝細胞マーカーである microRNA122、アルブミン、トランスサイレチンなどの遺伝子が発現上昇したことから、肝細胞の分化あるいは成熟化に microRNA148b は、DNMT を介している事が示唆された。

#### D. 考察

本年度は 3 年計画の本事業の最終年度として各プロジェクトがそれぞれのまとめがなされることを目的に研究を行なった。

手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化は、移植用臓器の研究転用ができないわが国にとって必須の課題である。本年度の温阻血処置は昨年度の 10 分、15 分より大幅に延長し、30 分から 60 分とした。そのような過酷な条件においても CPD 加 Euro-Collins 液による灌流が有効であった。コラゲナーゼ灌流法が血管系を利用していることから、クエン酸含有液が微小循環を復元していることが考えられた。現在、この成果をもとに、手術摘出肝組織からの肝細胞分離にもクエン酸加溶液の灌流による脱血処置を行い、好成績を得ている。

また、人組織・細胞の研究利用に極めて重要な凍結保存について、昨年度までブタ肝組織で行なってきた研究を初めてヒト肝組織で検証した。得られた細胞は生細胞率が 72.4% と、凍結を経た細胞としては非常に高く、また薬物代謝活性も十分検出できた。これらのことから組織凍結は新しいヒト由来研究資源の凍結方法になり得ると考えられた。

本研究グループが精力的に取り組んできた初代肝実質細胞の三次元培養ならびに混合培養に



についても、網羅的遺伝子発現という新たな切り口から、平面培養より優れることがわかった。つまり、Cell-able を用いた凍結ヒト肝細胞の培養は、通常の平面培養に比べ正常肝細胞の遺伝子発現状態を維持しながら培養でき、また実験上生じる穴間差も Cell-able を用いる方が小さいことがわかった。今まで薬物代謝活性、同誘導能として評価してきたことがさらに基礎的な細胞生物学的な現象としても裏付けられたものと考えている。

ヒト iPS 細胞由来肝細胞は、ソースとなる iPS 細胞が増殖可能であること、多数の個人から iPS 細胞パネルを形成できることなどから創薬への利用に期待が高まっている。しかしながら、克服すべき技術上の課題は数多い。その中で、本研究グループでは継代培養時の剥離のし易さと凍結保存について検討をした。その結果、ゼラチン基質と trypsin-EDTA はヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離に有用であることが明らかになった。また、Cell Reservoir One はヒト iPS 細胞由来肝細胞の保存液として有用であった。これらは創薬の研究基盤を支える貴重な知見であると考えられる。

前述のようにわが国の研究用ヒト組織は手術摘出組織に依存している。肝組織の場合、がん手術に伴って摘出される組織から正常肝細胞を採取することが行なわれている。この時、肉眼的に正常と考えられる組織中の微小転移の診断は以前から問題になっていた。その検討をマクロ切片の作成という新規技術、全肝 thin slice 法によって行なうことができるようになった。本年度は、実際の臨床検体である肝両葉多発転移に対する術前化学療法例を対象とし、術前の画像診断と切除検体の肉眼所見と病理組織所見を詳細に対比した。その結果、術前化学療法により微小転移巣は文字通り完全奏功を得て、病巣そのものが消失している可能性を示し得た。

肝細胞の分化誘導技術の効率化として microRNA に着目した研究も行なった。microRNA122、microRNA148b が肝細胞の分化誘導や成熟化を制御する機能を明らかにした。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にこの microRNA の有効性を判定する研究に期待がかかっている。

以上述べたように、多面的なアプローチで創薬研究における人由来初代細胞および幹細胞の利用円滑化に向けた研究が達成できたと考えている。また分担研究者それぞれが有する技術を持ち寄り、相互に協力して研究を遂行してきたことをここに申し添えたい。

## E. 結論

### 1) 手術摘出肝組織からの肝実質細胞採取効率化 (絵野沢)

30 分から 60 分という長時間の温阻血を経た肝

組織から酵素灌流法によって肝細胞分離を行う場合にも CPD 加 Euro-Collins 液による灌流が有効であった。実際の手術において温阻血 (約 40 分) を経た肝組織からもこの方法によればより多くの生肝細胞が得られると考えられた。

### 2) 人組織・細胞の凍結における CAS 装置の評価 (大和田、絵野沢)

昨年度までの研究で開発した凍結肝組織からの肝実質細胞分離をヒト肝組織で検証した。種々の値から新しいヒト由来研究資源の凍結方法になり得ると考えられた。

### 3) 三次元培養ならびに混合培養の創薬研究上の価値評価 (池谷、城村、絵野沢)

Cell-able を用いた凍結ヒト肝細胞の培養は、通常の平面培養に比べ正常肝細胞の遺伝子発現状態を維持しながら培養できることがわかった。また実験上生じる穴間差も Cell-able を用いる方が小さいことがわかった。

### 4) ヒト iPS 細胞由来肝細胞に至適な剥離・凍結保存法の検討 (松永、山田)

本研究の結果、ゼラチン基質と trypsin-EDTA はヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離に有用であることが明らかになった。また、Cell Reservoir One はヒト iPS 細胞由来肝細胞の保存液として有用であった。

### 5) 手術摘出肝組織における微小転移の診断に向けた標本作製法の開発 (土田)

肝両葉多発転移に対する術前化学療法例を対象とし、術前の画像診断と切除検体の肉眼所見と病理組織所見を詳細に対比した。その結果、術前の画像診断では EOB-MRI がもっともすぐれた検査方法であり、ほぼすべての病巣を描出することが出来た。また viable な癌細胞を全く認めない微小癒痕の存在が全く確認されなかったことから、術前化学療法により微小転移巣は文字通り完全奏功を得て、病巣そのものが消失している可能性を示し得た。

### 6) 肝細胞の分化誘導技術の効率化 (落谷)

本研究で肝細胞の分化誘導や成熟化を制御する microRNA の機能を明らかにした。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導にこの microRNA が有効かどうかを判定する実証研究を続ける必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Enosawa S, Yamazaki T, Kohsaka H, Tokiwa T.

Repopulation of human origin hepatocyte progenitor-like cell line, THLE-5b, in the Scid mouse liver under p21-mediated cell growth arresting conditions. *Cell Transplant* 21; 447-452, 2012, DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368911X605358>

2) Enosawa S, Miyamoto Y, Kubota H, Jomura T, Ikeya T. Construction of artificial hepatic lobules-like spheroids on a 3-dimensional culture device. *Cell Medicine* 3; 19-23, 2012 DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639478>

3) Shigeta T, Matsuno N, Obara H, Mizunuma H, Kanazawa H, Tanaka H, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Uemoto S, Enosawa S. Functional recovery of donation after cardiac death liver graft by continuous machine perfusion preservation in pigs. *Transplant Proc* 44; 946-947, 2012 doi:10.1016/j.transproceed.2012.01.078

4) Shigeta T, Matsuno N, Huai-Che H, Obara H, Mizunuma H, Hirano T, Uemoto S, Enosawa S. A basic consideration for porcine liver preservation using a novel continuous machine perfusion device. *Transplant Proc* 44; 942-945, 2012 doi:10.1016/j.transproceed.2012.03.013

5) 絵野沢 伸. 臓器移植から細胞治療へ 医薬品としての肝細胞の可能性. *Human Science* 23(2); 31-33, 2012

6) Katsuda T, Sakai Y, Ochiya T. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes. *J Stem Cells* 7:1-17, 2012

7) Kasuya K, Oshiro H, Saito K, Suzuki Y, Kikuchi S, Kyo B, Matsudo T, Nagakawa Y, Itoi T, Tsuchida A. Comparison of preoperative images with gross and histopathological findings of liver slices in patients with liver metastases from colorectal cancer after chemotherapy. *Hepatogastroenterology* 59 (116); 981-985, 2012

## 2. 学会発表

1) 絵野沢 伸. 形態制御が与える機能面の変化肝細胞初代培養の経験から. シンポジウム 2 細胞接着と細胞機能制御の最先端 日本組織培養学会第 85 回大会 平成 24 年 5 月 17~18 日 京都

2) 齋藤 亮、絵野沢 伸. 凍結保存肝組織からの肝細胞分離. 日本組織培養学会第 85 回大会 平成 24 年 5 月 17~18 日 京都

3) 許 懐哲、松野直徒、絵野沢 伸. 細胞ソースとしての心停止ドナー肝 ー温阻血肝組織における CPD 加ユーロコリンズ液灌流の有効性ー. 第 30 回日本肝移植研究会 2012 年 6 月 14, 15 日 福岡

4) 絵野沢 伸. 肝臓の細胞治療確立に必要な細胞工学的アプローチについて. シンポジウム II 細胞工学と再生医療. 第 39 回日本臓器保存生物医学学会定期学術集会 福島 2012 年 11 月 16, 17 日

5) Ikeya T, Takahashi Y, Hayashi H, Enosawa S. Cytological advantages of the cell array three-dimensional culture of human cryopreserved hepatocytes evaluated by comprehensive gene expression. 27th Japanese Society for the Study of Xenobiotics, JSSX, Chiba, 2012/11/20-22 (池谷武志、高橋由里子、林 仁寿、絵野沢 伸. 初代肝細胞の 2 次元培養と 3 次元培養における網羅的遺伝子発現比較. 日本薬物動態学会第 27 回年会 千葉 2012 年 11 月 20~22 日)

6) Enosawa S. Viable hepatocytes from cryopreserved liver and CAS system. Symposium 1 Innovative freezing techniques - CAS and regeneration and transplantation medicine. "Cryomedicine 2012" The 39th Annual Meeting of Japan Society for Low Temperature Medicine, Tokyo, November 21-22, 2012 (絵野沢 伸. 凍結肝組織からの肝細胞分離と CAS. シンポジウム 1 新しい凍結技術-CAS と再生移植医療. 第 39 回日本低温医学会総会 2012 年 11 月 21 日~22 日 東京)

7) Hsu HC, Matsuno N, Tanaka R, Enosawa S. Negative effect of warm ischemia on hepatocyte isolation and an attempt to increase the recovery. "Cryomedicine 2012" The 39th Annual Meeting of Japan Society for Low Temperature Medicine, Tokyo, November 21-22, 2012 (許 懐哲、松野直徒、田中 綾、絵野沢 伸. 温阻血がもたらす肝実質細胞収量の低下とその克服. 第 39 回日本低温医学会総会 2012 年 11 月 21 日~22 日 東京)

8) Ikeya T, Takahashi Y, Hayashi H, Enosawa S. Comparison of comprehensive gene expression after 14 days culture on the cell array three-dimensional culture (Cell-able) and conventional monolayer culture of human cryopreserved hepatocytes. Symposium for new technology for cell-based drug assay. Tokyo, December 10, 2012 (池谷武志、高橋由里子、林 仁寿、絵野沢 伸. 凍結ヒト肝細胞の Cell-able 上三次元培養 14 日後の遺伝子発現の網羅的解析の通常培養との比較. シンポジウム 細胞アッセ

イ技術の現状と将来 2012年12月10日 東京)

9) 絵野沢 伸. 臨床肝細胞移植の視点から見た幹細胞分化治療用肝細胞が具備すべき形質について. 公開シンポジウム ヒト iPS 細胞由来分化細胞の実用化 ～再生医療と創薬応用に必要な機能獲得をどう評価するか?～ 主催: 国立医薬品食品衛生研究所 2013年2月14日 東京大学(東京都文京区)

10) 絵野沢 伸. 肝細胞移植臨床研究に向けた準備と今後の課題. 第3回先進医療開発コアセンターシンポジウム 平成25年3月19日 東北大学(宮城県仙台市)

11) Ochiya T. Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer. DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF EXOSOMES, Molecular Diagnostics Europe, London, England. May 7-13, 2012.

12) Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for breast cancer stem cells. Asia 2012, Singapore. August 28-31, 2012.

13) Ochiya T. Exosome as a novel regulator of tumor microenvironment. The International Center Microenvironment Society, Suzhou, China. November 12-18, 2012

14) 落谷孝広. エクソソームによる肝疾患の診断治療への応用. 8th 肝免疫・ウイルス・フロンテ

ィア (Liver 2012) 2012年4月14日 東京

15) 落谷孝広. エクソソームを標的としたバイオマーカー開発の最前線. 21th 日本抗加齢医学会総会 2012年6月22-24日 横浜

15) 三森佳代, 近藤祐樹, 吉橋幸美, 荻原留理, 岩尾岳洋, 松永民秀. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の剥離・凍結保存法の検討. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 福岡

16) 粕谷和彦, 土方陽介, 高橋恒輔, 岩崎謙一, 松土尊映, 菊池 哲, 許 文聰, 永川裕一, 鈴木芳明, 土田明彦. 肝薄切検体を用いた大腸癌肝微小転移の検索, 術前画像 EOB-MRI との対比. 第24回日本肝胆膵外科学会学術集会 2012年5月30日-6月1日 大阪

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

# 多能性幹細胞を医薬応用へ活かす生体親和性 次世代スケーラブル培養システムの確立

国立成育医療研究センター研究所  
生殖・医療研究部幹細胞・生殖学術研究室  
阿久津英憲

## 研究要旨

現在、幹細胞による医療応用は体外での培養が主体となっている。さらには、ヒト ES 細胞や iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞は、その創出から体外培養系が母体となり、産業応用でも安定的に性質を保持して維持することは基盤技術として重要である。しかし、ES 細胞などの幹細胞研究から、現在標準化されている 2D 培養システムでの限界（ゲノムの不安定性誘因や分化誘導細胞の幼若性による不完全な機能獲得などの問題点）が明白になってきた。そのため細胞培養環境の領域は、次世代医療を確かで安全な品質を付加していくために重要な基盤研究領域である。本研究課題では、新たな細胞培養空間の開発を基盤とするが、マイクロデバイス開発のような高度な先端的ナノテクノロジーからのアプローチではなく、より細胞の生命活動の観点に立ち細胞コミュニケーションと足場の研究を展開する。すなわち、本研究成果を効率的に、時間的にもより早く社会へ還元するために従来の汎用されている細胞培養システムの基盤を応用することで経済的にも技術的にも汎用性を高めたヒト iPS 細胞研究を行う。本研究事業を各委託研究との枠組みから 4 つの項目（1. 安全性の高いヒト iPS 細胞創出、2. 幹細胞性質の保持とゲノム安定化の足場の開発、3. iPS 細胞のゲノム安定性の解析、4. 分化誘導に優れた足場の開発）に分け研究を遂行し、全体としてはシナジスティックに進め成育医療研究センター（研究代表者：阿久津）がハブとして機能し最終的に統合して研究が加速化できる。

## 研究分担者

- |                       |           |
|-----------------------|-----------|
| (1) (公財) がん研究会 がん研究所  | 原 英二      |
| (2) 横浜市立大学医学部         | 梁 明秀      |
| (3) 慶應義塾大学医学部         | 浜谷敏生      |
| (4) 大日本印刷（株）研究開発センター  | 土屋勝則      |
| (5) 日油（株）筑波研究所        | 山田 智      |
| (6) (株)DNA チップ研究所     | 的場 亮      |
| (7) ライフテクノロジーズジャパン（株） | 小柳智義      |
| (8) (株)セルシード          | 遠藤孝雄 渡邊広也 |
| (9) ユニーテック（株）         | 新井貴博      |

## A. 研究目的

本研究では、独自のマイクロファブリケーション技術を iPS 細胞研究へ応用しスケーラブル細胞培養デバイス構築を目指す。加えて、液性細胞外基質として生体適合性ポリマーも含めたヒト多能性幹細胞の新規的培養空間の創出を行う。

### 【厚生科学研究における必要性・重要性】

本研究に係る研究者らがこれまで進めて来た系幹細胞に関するゲノム安定性や細胞の規格化等は指針策定に関して重要なエビデンスを供給し、政策医療の一躍を担ってきた。

### 【国内・国外における研究状況及び研究計画の新規性・独創性】

マイクロファブリケーション技術の基盤研究をヒト iPS 細胞へ応用し、汎用性のあるスケーラブルな培養デバイスと開発し、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた新規的培養システムを構築し、iPS 細胞等多能性幹細胞研究の医薬研究基盤底上げと促進に貢献する。

### 【明らかにすること】

細胞を活かす・保護する・増やす・(機能を)保つための体外培養環境での評価と改善は次世代医薬研

究の基盤となる。細胞の足場の観点から新規的培養空間の創出と足場がポイントとなる疾患の病因メカニズム解明を行う。そのために必要なステップとして、1) 安全性の高いヒト iPS 細胞創出、2) iPS 細胞間応答の明確化、3) ゲノム安定化を維持する培養環境の開発、4) 細胞が主体となるマイクロファブリケーション技術の展開と生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発、を行い医薬研究の底上げをする。

## B. 研究方法

### ヒト多能性幹細胞を活かす多角的ゲノム評価の解析

主任研究者らが貢献してきたヒト ES 細胞培養の標準化システムを用いた環境下でのヒト iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行う。本研究で得られる iPS 細胞の遺伝子発現データをヒト ES 細胞とのデータとで *in silico* 解析を行っていき、遺伝子発現レベルから ES 細胞との類似性あるいは相異性を明らかにしていく。(成育、DNA チップ研、癌研究所)

### 幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術を応用して細胞の足場の創成を行い、テンプレートに依存したヒト iPS 細胞の細胞応答性を解明する。2D デバイスのパターンニング開発をから新規的な足場を創成する。(成育、大日本印刷、日油) 生体適合材料として 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) の低吸着性に着目し細胞間応答に基づく液性細胞外基質としての MPC 研究開発からヒト iPS 細胞の性質を制御する培養空間を作成する。(成育、日油、大日本印刷)

### iPS 細胞のゲノム安定性の解析

ヒト iPS 細胞培養環境が *in vivo* 分化動態に与える影響の検討

ヒト iPS 細胞培養の要素が免疫不全マウスへ移植した後の分化動態に与える影響を解析する。これまでの前実験的にゼノフリー培養により分化効率が上がることを見出してきた。本研究では、移植前の培養環境が *in vivo* での分化動態に及ぼす影響を検討する。移植後継時的に観察しサンプル回収後、組織化学的解析により分化状態を解析する。酵素なしでも継代可能となるナノインテリジェント表面をもつ培養ディッシュでヒト iPS 細胞の培養維持性を検討する。ヒト iPS 細胞をナノインテリジェント器材で少なくとも 5 継代培養維持を試み、培養細胞の性質評価を行う。(成育、ユニテック、セルシード、癌研究所、横浜市立大学、DNA チップ研、慶應大学)

### 分化誘導に優れた足場の開発

分化誘導を制御するテンプレート開発を行う。分化制御の質は、構築できる分化細胞がどれだけ均

一なものかを遺伝子発現やタンパク質レベルの特異的マーカー解析により行う。均一性に関しては、70%以上の効率で目的分化細胞が獲得できることを目指す。(成育、日油、大日本印刷)

### (実験動物に対する動物愛護上の配慮)

各参画機関の動物実験の指針を遵守し、動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに実施する。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。

国立成育医療センター研究所動物実験規程

<http://www.nch.go.jp/anim/animalkitei.htm>

国立成育医療センター動物実験に関する指針

<http://www.nch.go.jp/anim/animalshishin.htm>

### (倫理面への配慮)

### ヒト細胞に対する倫理面への配慮-iPS 細胞の樹立に用いるヒト細胞

国立成育医療研究センター研究所においては、ヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け承認を受けている。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。

国立成育医療研究センター倫理審査委員会

<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>

## C. 研究結果及び考察

### ヒト多能性幹細胞を活かす多角的ゲノム評価の解析

iPS 細胞とヒト ES 細胞株を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。階層的クラスタリング解析により iPS 細胞と ES 細胞はクラスター化され、さらに iPS 細胞は由来により分けられた。網羅的遺伝子発現マイクロアレイ解析 (Agilent 44K) とそのデータ解析として PCA 解析を行い、ヒト iPS 細胞と ES 細胞の比較検討を行った。PCA 解析では、X 軸で未分化な iPS と ES 細胞と「分化胚様体 (EB)」「親株」に分かれていた。ただし、一部には iPS 細胞が EB に近く、さらに親株に近い傾向をもつ細胞株も見受けられた。Y 軸では、未分化 iPS と EB および親株は明確に分けられた。

### 幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、それが、特定に分化挙動を誘導することが示された。パターンニングがあらゆる形状が可能であり、足場を制御することで空間への増殖性も間接的に制御できることが示唆され、今後分化誘導を行う上でこれまでの限界因子をブレイクすることが

できる。

### iPS 細胞のゲノム安定性の解析

外胚葉・内胚葉・中胚葉の各組織へ分化していることが細胞形態のおよび免疫組織染色により確認ができた。今後の課題としては、移植後奇形腫形成過程において時間軸でみて未熟組織成分の割合がどの程度低下していくのか、その割合には三胚葉間で指向性があるのかを検討する必要がある。種々のナノインテリジェントディッシュの継代酵素フリー培養を検討した結果、良好に培養出来ることを見出した。細胞株間による若干の反応性の差があることも判明し、グローバルな培養方法を開発していくリード的な要素を見出すことができた。

### 分化誘導に優れた足場の開発

細胞が主体となる生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発特に、分化移行環境では、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた底面加工非接着系培養プレートにより、これまで胚様体形成分化誘導が不安定であったヒト iPS 細胞が安定的に効率よく胚様体形成が可能となり、網膜色素上皮や消化管組織等へ再現性をもって分化組織を構築できることができた。

## D. 考察

ヒト ES 細胞と iPS 細胞を区別する遺伝子発現群が存在する。遺伝子発現とヒト多能性幹細胞の性質を比較検討することで、性質を予測する分子マーカー等の開発研究の基盤データとする。さらに、iPS 細胞は由来する細胞毎に遺伝子発現グループが分けられる。網羅的遺伝子発現解析データを PCA 解析することで生物学的特性を明確に判別できる分子群を抽出できることが示唆された。

ヒト iPS 細胞は適切な細胞外マトリックスを選択することによりフィーダー細胞フリーで未分化維持をすることが可能であった。ファブリケーション技術により細胞接着域を制御することで空間への細胞増殖を誘導することが示唆された。多能性幹細胞は、その極めてユニークな性質から基礎生命科学のみならず、再生医療、創薬、薬剤毒性検定等次世代の医療としても大いに期待されている。しかし、現在世界的に標準化されている方法においては改善されるべきポイントが存在する。1) 2D 培養システムでの幹細胞ゲノム不安定性、2) 分化誘導細胞の不完全な機能獲得、3) 異種由来物の因子した培養システム、であり幹細胞の実用化を促進するためには早急に対応しなければならない。本研究は、細胞外マトリックスとしてマイクロファブリケーション技術による上記 1) 及び 2) に対する効果的な scaffolds の開発を行い、より簡便な幹細胞デバイスを提供することにより幹細胞研究の底上げに貢献する。

ヒト ES 細胞と iPS 細胞を区別する遺伝子発現群が存在する。遺伝子発現とヒト多能性幹細胞の性質を比較検討することで、性質を予測する分子マーカー等の開発研究の基盤データとする。さらに、iPS 細胞は由来する細胞毎に遺伝子発現グループが分けられる。iPS 細胞のリプログラミングに由来細胞のエピジェネティック状態を一部残すことが示唆され、今後遺伝子発現に加えエピジェネティック制御と幹細胞性質を関連させることでヒト多能性幹細胞性質を決定付ける分子メカニズムを明らかにしていく。

ヒト iPS 細胞の応用には、長期培養工程が必須であり、造腫瘍性とも密接に関連する細胞のゲノム安定性は品質管理の最重要項目の 1 つである。今回、クローン間で細胞のゲノム・エピゲノム情報の維持に必要な細胞周期チェックポイント機構の作動状態が多少異なることが示された。このことは、iPS 細胞を今後医療応用する際には、作成した iPS 細胞の中から細胞周期チェックポイント機構がより完全な状態で保たれている細胞クローンを選択することが必要であることを強く示唆している。今後より高品質の iPS 細胞を選択する方法の開発が必要になってくると予想される。

## E. 結論

マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、細胞外マトリックスを選択することで異種成分を使用しない培地でも幹細胞の未分化性が維持できることが示された。安定した scaffolds は多能性幹細胞研究を行う上で必要不可欠であり、未分化維持が安定的に行える技術が整備できた。パターンニングがあらゆる形状が可能であり、足場を制御することで空間への増殖性も間接的に制御できることが示唆され、今後分化誘導を行う上で有効になる成果が得られた。

ヒト多能性幹細胞はその性質から細胞治療を含めた再生医療や創薬開発等の幹細胞産業化に期待されている。今回、ヒト ES 細胞と iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析による比較検討から細胞性質を裏付ける分子メカニズム解析の基盤となる重要なデータを得ることができた。今後は、多角的にゲノム及びエピゲノム解析を行い、分子的エビデンスに基づいた幹細胞評価を行っていく。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

- 1) Akutsu H. "iPSCs for regenerative medicine". International Conference on "Stem Cell and Regenerative Medicine: Research to Business", Mar 24, 2012, Hyderabad, India.
- 2) Akutsu H. "A NOVEL XENO-FREE DEFINED

CONDITION FOR CULTURE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS WITH NOVEL HUMAN FEEDER LAYERS". ISSCR 10<sup>th</sup> annual meeting, Jun 13-16, 2012, Yokohama, Japan.

- 3) Miyoshi N, Endo T, Minami K, **Akutsu H**, Umezawa A and Watanabe H. "HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL ON TEMPERATURE-RESPONSIVE CULTURE DISH CAN BE PASSAGED WITHOUT THE USE OF ENZYME OR MANUAL SELECTION". ISSCR 10<sup>th</sup> annual meeting, Jun 13-16, 2012, Yokohama, Japan.
- 4) **Akutsu H**. "Human ES cells: acquired pluripotency from blastocysts." Asia Pacific Initiative on Reproduction 2012, Aug 31, 2012; Osaka, Japan
- 5) 阿久津英憲: 「ゼノフリーヒト ES/iPS 細胞の培養システムの確立」(シンポジウム)日本組織培養学会第 85 回大会, 京都 京都大学百周年記念ホール, 5 月 17 日, 2012 年
- 6) 阿久津英憲. 「ヒト ES 細胞～小児難治疾患へ挑む～」第 48 回大会日本小児循環器学会総会・学術集会, 京都, 7 月 5 日, 2012 年

## 2. 論文発表

### 英文

- 1) Ukai T, Sato M, **Akutsu H**, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res*. 2012 ; 30: 1915-1922.
- 2) Nishi M, Sakai Y, **Akutsu H**, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW and Ryo A. Induction of cells with cancer stem-cell properties from non-tumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, in press.
- 3) Kawada J, Kimura H, **Akutsu H**, Sakai Y, Fujii T. Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation. *Lab Chip*. 2012;12:4508-4515.
- 4) Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, **Akutsu H**, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep*. 2012; 2:930.

### 邦文

- 1) 阿久津英憲, 梅澤明弘: 「クローン技術を応用するヒト ES 細胞の可能性」母子保健情報, 66:80-84, 2012.

2) 阿久津英憲, 川田治良, 藤井輝夫: 「多能性幹細胞とマイクロデバイスのインテグレーション・アプリケーションの可能性」バイオマテリアル-生体材料-, 30(4), 242-244, 2012.

3) 阿久津英憲, 福田篤, Dieter Egli. 「クローン胚からの ES 細胞作製」実験医学, 30(10), 1621-1625, 2012.

4) 阿久津英憲, 福田篤. 「生殖細胞の分化誘導」Medical Science Digest, 38(6), 253-256, 2012.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得  
なし
- 2) 実用新案登録  
なし
- 3) その他  
なし

# 臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注を 可能とするための基盤整備と第 I 相臨床試験

国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部  
藤原成悦

**研究要旨** 臍帯血活性化 DLI の臨床第 I 相試験の実施に向けて、マウスモデルを用いた前臨床研究、無血清培養液を用いる活性化 T 細胞調製法の検討、GMP 基準に則った培養プロトコルの作成、誘導制御性 T 細胞調製法の改良、末梢血リンパ球の迅速解析法の開発などを行った。

## 研究分担者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水 則夫
- (2) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 森尾友宏
- (3) 国立成育医療研究センター研究所 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 茅野真一
- (6) 虎の門病院 谷口修一
- (7) 医療法人神鋼会 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

骨髄移植後の再発や感染症に対し、ドナーのリンパ球を大量に輸注するドナーリンパ球輸注療法 (DLI) が有効であるが、臍帯血移植の場合は、ドナーが乳幼児であるため必要量のリンパ球を得ることができず、従来の方法による DLI は不可能である。本研究では、臍帯血移植後の DLI を可能とするために、臍帯血 T 細胞を十分な安全管理のもとに GMP (Good Manufacturing Practice) 基準に則って活性化培養するシステムを確立すること、またこれにより得られた細胞を用いて行う DLI (臍帯血活性化 DLI) の臨床第 I 相試験を行うことを主な目標とする。また、臍帯血由来の制御性 T 細胞を効率よく増殖させる培養法を確立し、これを用いて重症 GVHD 治療の前臨床研究を行うことを第二の目標とする。

臍帯血活性化 DLI では、移植後の残存臍帯血から、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を用いる 2 週間程度の培養により、 $10^{8\sim 9}$  オーダーの活性化 T 細胞を調製し、患者に輸注する。これまでの探索的臨床研究により、臍帯血移植後のサイトメガロウイルス日和見感染、コクサッキーウイルス腸炎、混合キメラ状態などに有効であることが示唆された。また、臍帯血移植や臍帯血活性化 DLI 後の移植片対宿主病 (GVHD) に対する対処を目的として、末梢血及び臍帯血より高純度の制御性 T 細胞 (Treg) を調製する方法を見だし、マウスにおける前臨床研究によりその GVHD に対する有効性を確認している。本年度は、主に GMP 準拠臍帯血活性化 T 細胞調製プロトコルの確立、臍帯血 iTreg 細胞調整法の確立、マウスモデルによる臍帯血活性化 DLI の前臨床研究、マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現の解析に焦点を当て研究を進めた。

## B. 研究方法

### 1. 臍帯血活性化 T 細胞の調製に用いる無血清培養液の検討

以下の 9 種類の培養液を、血清要求性の高い細胞株 SNK6 および SNK8、末梢血 T 細胞を用いてテストした；② Optimizer T Cell Expansion SFM 培地 (invitrogen)、③ AIM-5 培地 (invitrogen)、④ KBM540 培地 (コージンバイオ)、⑤ ALyS505 培地 (細胞科学研究所)、



⑥ALyS705 培地 (細胞科学研究所)、⑦SKY-2 培地 (スカイセルサイエンス)、⑧BMN 培地 (日水製薬)、⑨MHDR 培地 (日水製薬)、⑩NS-A2 (日本テクノサービス)。対象として①血清添加培養液を用いた。

## 2. 臨床試験に向けての臍帯血活性化 T 細胞調製の予行試験

固相化抗 CD3 抗体と IL-2 を添加した培養液を用いる基本培養プロトコールは昨年度までに確立されている。本年度は GMP に準拠した細胞培養法を確立するために、使用する器具・試薬を再検討し、より安全性を重視した培養方法の確立を試みた。培養工程中使用する器具・試薬類は、原則として医薬品・医療用具を使用することとし、それが不可能な場合は GMP グレードまたは FDA グレードで製造され、トレーサビリティが確保されているものを選定した。

## 3. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現解析

FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7、APC、APC-Alexa-700 (Alexa-700)、APC-Alexa-750 (APC-Cy7)、Pacific-Blue、KromeOrange (Cascade-Yellow) の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる蛍光染色を行い、Beckman-Coulter 社 Galios を用いて 3 レーザー 10 カラー解析を行った。

## 4. 臍帯血誘導制御性 T 細胞 (iTreg) の体外増幅法

臍帯血 CD4<sup>+</sup>T 細胞を、固相化抗 CD3/CD28 抗体上で培養するという基本条件のもとで、IL-2、TGF- $\beta$  や mammalian Target of Rapamycin (mTOR) を標的とする新規免疫抑制剤 Rapamycin (Rap) あるいは Everolimus (Eve) を培養液に加えその効果を検証した。具体的には以下の条件を検討した。①IL-2(700u/ml)単独、②IL-2/TGF- $\beta$  (10ng/ml)、③IL-2/TGF- $\beta$  /Rap(10nM)、④IL-2/TGF- $\beta$  /Eve (10nM)、⑤IL-2/Rap または⑥IL-2/ Eve にて 2 週間培養し CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>細胞の比率および細胞数を算出した。in vitro 免疫抑制機能の評価は、CFSE 染色したレスポンド細胞と同種成熟樹状細胞との混合リンパ球反応 (MLR) に、PKH26 染色した上記培養細胞 (iTreg 含む) を添加し CFSE 輝度の変化を測定した。

## 5. EB ウイルス感染モデルマウスにおける臍

## 帯血 DLI の前臨床研究

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。このマウスに Akata 株の EB ウイルス (EBV) を尾静脈より接種した。臍帯血 DLI には、対象マウスをヒト化するのに用いた臍帯血から autologous な T 細胞を活性化培養して一旦凍結保存した後、DLI 実験の時期に合わせ再度活性化培養して用いた。ヒト化マウスに EBV を接種後 real time-PCR により末梢血中に EBV DNA が出現したことを確認してから、体重 (kg) あたり約  $5.0 \times 10^6$  cells の活性化臍帯血 T 細胞を、1 週間隔で 3 回、尾静脈から投与した。27 頭の EBV 感染マウスを 2 群に分け、14 頭には臍帯血活性化 DLI を施行し、13 頭には PBS を同じスケジュールで投与した。これらのマウスの生存曲線を Logrank 法で比較した。臍帯血由来活性化 T 細胞を投与した後定期的に (1 週間毎) マウスより採血し、抗 CD19、CD3、CD4、CD8、CD56、HLA-DR 抗体などにより染色し、フローサイトメトリーによりヒト化を確認した。また、ヒト HLA-A\*2402 により提示された 5 種類の EBV ペプチド (LMP2, BRLF1, BMLF1, EBNA3A, EBNA3B) の混合物により EBV 特異的 CTL を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」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、連結不可能匿名化されるため、個人情報漏洩の恐れはない。探索的臨床研究における治療に際しては、担当施設における倫理委員会の承認を得て十分な説明を行った上で同意を得た。今後多施設共同臨床研究を行う際には、各種臨床研究指針に則り、全施設での倫理審査委員会の承認を得た後研究を開始する。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研究センター

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. 臍帯血活性化 T 細胞の調製に用いる無血清培養液の検討

SNK6, SNK8, 末梢血単核細胞のすべてにおいて NS-A2 培養液 (日本テクノサービス) が最もよい成績であった (図 1)。末梢血 T 細胞の増幅においては、血清添加培養液の 90% 程度の収量があった。得られた細胞の 97% が CD3<sup>+</sup>であり、T 細胞の純度においては血清添加培養液と差がなかった。ヒトに対し繰り返し投与される細胞製剤の調製には同種あるいは異種血清を用いないことが、「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」により求められているため、臍帯血活性化 DLI においても無血清培養液の使用が必要となるが、NS-A2 培養液はその有力な候補となる。今後、詳しい組成の開示と製造過程の GMP 化を求めていく必要がある。

#### 2. 臨床試験に向けての臍帯血活性化 T 細胞調製の予行試験

医療用具・医薬品・GMP グレード、FDA グレードまたはそれに準じた規格品を選定基準とし、以下の器具・試薬を採用した。

(1) 医療用具：50mL シリンジ (TERUMO)、(2) 医薬品：IL-2(Chiron)、OKT-3 注(オルソクロン)、生理食塩水 (大塚)、ヒト血清アルブミン (日赤)、(3) GMP グレード：凍結保存バッグ (Miltenyi)、ガス透過性培養用バッグ (Miltenyi)、(4) DA グレード：AIM-V(Invitrogen)、(5) FDA 準拠：ピペット (BD)、遠心管(BD)、(6) その他：細胞培養フラスコ(住友ベークライト)、牛胎児血清 (FBS) (ニチレイ)、細胞凍結保存液 (CP-1) (極東製薬工業)。

細胞培養フラスコ、FBS、細胞凍結保存液については、医薬品または GMP などの第三者機関が定めた規格製品が存在しないため、以下の理由により採用した。住友ベークライト社製フラスコは、材料安全性、滅菌条件、異物管理について特別に設定した品質基準を満たしているため。ニチレイ社製 FBS は、BSE 対策として原産国をオーストラリアに限定し、

トレーサビリティの記録保管が永年となっているため、またγ線照射によるウイルス不活化処理、「EMEA/CPMP/BWP/1793/02」に則ったウイルス検査が行われているため。細胞凍結保存液 CP-1 は、国内において骨髄細胞、臍帯血の凍結保存液として臨床の場で採用されており、有害事象の報告がないため。

#### 3. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現の解析

臍帯血活性化 DLI 施行後のリンパ球解析の予備実験を、健常者末梢血を用いて行った。10 カラー解析により、細胞表面抗原の解析は 25-200 μl の血液で解析が可能であったが、細胞内抗原の発現を解析する場合はその約 5 倍の血液量を要することが分かった。このため、まず細胞表面抗原に関する解析法の確立を図った。NK 細胞の解析については、CD56 と CD244 と併用で、CD56+CD3-CD244+の NK 細胞、CD56+CD3+の NKT 細胞、CD3+CD8+CD244+の細胞障害性 T 細胞の割合を解析可能であった (図 5)。さらに、CD4+CD45R0+CD62L+CD27+のセントラルメモリー T 細胞タイプ、CD4+CD45R0+CD62L-CD27-のエフェクターメモリー T 細胞タイプ、CD45RA+ CD27+のナイーブ T 細胞タイプなどの詳細な分布が、1本のチューブで同時に解析可能であった。

#### 4. 臍帯血 iTreg 細胞の体外増幅と解析

純化した CD4<sup>+</sup>T 細胞より、研究方法に示した①～⑥のプロトコールで 2 週間培養して回収した産物中の CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>率は、③ IL-2/TGF-β/Rap、④ IL-2/TGF-β/Eve では 68.5±21.0%、75.4±17.4%と高く、⑤ IL2+Rap または⑥ IL2+Eve のみでは各々 26.0±18.4%、29.3±14.4%と低かった (図 2)。また、② IL-2/TGFβ、③ IL-2/TGF-β/Rap、④ IL-2/TGF-β/Eve によって誘導増幅された T 細胞は CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup>であり、CD26 の発現は低下していたが、① IL-2、⑤ IL2+Rap または⑥ IL2+Eve 下で誘導された T 細胞は CD25 および CD26 は高く CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD26<sup>+</sup>であった。

同種樹状細胞抗原刺激を用いた MLR において、レスポンダー (ドナー) と同ドナー由来の iTreg および 3rd party 由来 iTreg を用いて MLR の抑制効果を検討した (図 3)。その結果、③ IL-2/TGF-β/Rap または④ IL-2/TGF-β/Eve にて誘導された iTreg は同一

ドナー由来のみならず、第3者由来 iTreg においても MLR 増殖抑制効果を示した。さらに、iTreg の割合の低い⑤IL2+Rap または⑥IL2+Eve によって誘導されたドナー由来または第3者由来 T 細胞においても MLR の抑制効果が見られた (図 3)。

#### 5. EB ウイルス感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の治療実験

##### 1) 臍帯血活性化 DLI による生存期間の延長

27 頭の EBV 感染マウスを 2 群に分け、14 頭には臍帯血活性化 DLI を施行し、13 頭には対照として PBS を同じスケジュールで投与した。その結果、治療群は対照群と比較して有意に生存期間が延長していた ( $P < 0.05$ 、Logrank 法) (図 4)。

##### 2) 臍帯血活性化 DLI を施行したマウスにおける EBV 特異的 CTL の変化

臍帯血 DLI を施行したマウス 5 頭の脾臓あるいは肝臓から分離した CD8<sup>+</sup> T 細胞の EBV テトラマー陽性率は平均 0.0212%、標準偏差 0.0194%であった。一方対照として PBS を投与したマウス 3 頭では平均 0.00754%、標準偏差 0.00526%であった。統計学的有意差は認められなかったが、臍帯血 DLI を施行したマウスにおいてテトラマー陽性率が高い傾向が認められた。

#### D. 考察

##### 1. 臨床試験に用いる臍帯血活性化 T 細胞調製の予行試験

医薬品、医療用具、GMP グレード、FDA グレードなどを基準として使用する試薬、器具類を選定し、培養予行試験を行ったところ、良好な培養結果を得ることができたため、今後可及的速やかに臨床試験を開始できるよう、各手順書、製品標準書の作成に重きを置き活動を行う計画である。

##### 2. 臍帯血 iTreg 細胞の体外増幅法の確立について

IL-2/TGF- $\beta$ /Rap、IL-2/TGF- $\beta$ /Eve にて、高い FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>iTreg を誘導することができた。またドナー由来のみならず 3rd party 由来の iTreg においても *in vitro* で免疫抑制効果を認めたことから、GVHD 治療に用いる iTreg ソースの選択幅が広がる可能性があると考えられた。さらに iTreg の割合が低く CD26 高発現の IL2/Rap または IL2/Eve で誘導された

ドナー由来または 3rd party 由来 CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>CD26<sup>+</sup>細胞においても MLR の抑制効果が見られた点は非常に興味深く、新規 iTreg の可能性が示唆された。

##### 3. EBV 感染モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果と作用メカニズムについて

臍帯血活性化 DLI のランダム化された臨床試験は行われておらず、統計学的な有効性の検証はおこなわれていない。今回ヒト化マウスを用いたモデル実験において有意な生存期間の延長が認められたことは重要な知見であり、今後の臨床試験の必要性和妥当性を示すものと考えられる。臍帯血活性化 DLI の作用メカニズムは不明だったが、今回テトラマー法により EBV 特異的 T 細胞を定量した結果、統計学的な有意性には達しなかったものの、臍帯血活性化 DLI 施行群のマウスで高い値のテトラマー陽性率が認められたことは、EBV 関連リンパ増殖性疾患に対する臍帯血活性化 DLI の最終エフェクターの一つが、EBV 特異的 CTL であることを示唆している。

#### E. 結論

臍帯血活性化 DLI の臨床第 I 相試験実施に向けて基盤的研究を行い以下の結果を得た。治療に用いる活性化 T 細胞の調製に用いる無血清培養液の候補として、NS-A2 培養液を選定した。GMP 基準に則った培養プロトコールを作成するために使用する器具・試薬類を選定した。10 種類の蛍光を同時に測定するフローサイトメトリーを応用し、少量の血液から迅速にリンパ球を解析する方法を確立した。臍帯血から固相化抗 CD3/CD28 抗体、IL-2、TGF- $\beta$ 、Everolimus、Rapamycin を加える培養法により iTreg 細胞を効率よく調製する方法を確立した。モデルマウスを用いた前臨床研究では、臍帯血 DLI が生存期間を延長させる効果を持つことが実証された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through

- allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med* 51: 777-782, 2012.
- 2) Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae* 2012, 3:1.
- 3) Imadome K, Fukuda A, Kawano F, Imai Y, Ichikawa S, Mochizuki M, Shigeta T, Kakiuchi T, Sakamoto S, Kasahara M, Fujiwara S. Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers. *Pediatr Transplant.* 2012 Nov;16(7):748-57.
- 4) Arai A, Nogami A, Imadome K, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O. Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy. *Int J Hematol* 96(5): 669-673, 2012.
- 5) Iijima K, Yamada H, Miharu M, Imadome K, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N. ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis. *Eur J Immunol* 42(12): 3405-3415, 2012.
- 6) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica.* In press, 2013.
- 7) Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of haemophilic arthropathy. *Haemophilia.* 19, e89-9, 2013
- 8) Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in Cytokine Production in Human Macrophages and in Virulence in Mice Are Attributable to the Acidic Polymerase Protein of Highly Pathogenic Influenza A Virus Subtype H5N1. *J Infect Dis.* 207, 262-71, 2013
- 9) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y. Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 19:247-54, 2012.
- 10) Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry. *Bone Marrow Transplant.* In press, 2012
- 11) Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y. Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia.* 27,286-94, 2012
- 12) Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood.* 119, 2141-8. 2012.