

臍帯血・臍帯由来 MSC の分離培養・凍結方法の確立とバンキングの研究

研究代表者 長村登紀子 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨

臍帯血と臍帯は共に胎児由来組織であり、前者は主として血液細胞として、後者は間葉系幹細胞（MSC）ソースとして海外では製剤化が進んでいる。H24年度はバンキングシステムのスキームと感染症に対する安全なシステム作りを行った。特に細胞は児に由来する細胞であることから、母親から同意書および付随情報、6か月健診でのデータ等について、ゲノム解析等も含めた体制を構築しまずは研究用として運用を開始する準備を整えた。

一方、基礎的検討として、臍帯からのMSCの採取方法を検討し、特にMSC採取の主な組織である Wharton's jelly(WJ)から ex plant 法(WJe-MSCs)および Collagenase 法(WJc-MSCs)による回収細胞数や表現型の比較検討を行った。両者に特に有意差はなく、1gのWJから中央値  $2 \times 10^6$  のMSCs (=マスターMSCs) が得られることが分かった。またいずれもMSCとしての表面マーカーおよびES細胞マーカー遺伝子の発現を認めた。一方、MSCの中のさらに幼若な表面マーカーと考えられているSSEA3/4の発現について検討し、SSEA3は培養初期で急速に消失するが、SSEA4に関しては長期に発現を認めるも、培養液中のFBS濃度に影響を受けることを見出した。

A. 研究目的

臍帯血は造血細胞ソースとして、臍帯はMSCsのソースとして注目されている。一方で、臨床応用のための系統的資源化（バンキング）のためには、GMPに準じた品質管理システムの構築が欠かせない。臍帯由来MSCsの分離・培養・凍結方法は未だ確立されていない。本研究では臍帯血・臍帯由来MSCの分離培養・凍結方法やバンキングシステムを検討し、品質管理された製剤化を目指すことを目的とする。

平成24年度は特に臍帯 Wharton's jelly (WJ)からのMSCsの分離培養方法について主に2つの方法、explant法(WJe-MSCs)とCollagenase法(WJc-MSCs)について検討し、

両者での効率性を含めた細胞回収率、バイオマーカーの解析等を行った。特にES細胞マーカーの一つである stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4はヒトES細胞で発現している表面マーカーで分化とともに抑制されることが知られている glycosphingolipids に関連した分子である。GangらがBlood (2007 109: 1743-1751) 骨髄由来MSCにおいてはSSEA4+細胞のみに増殖能、分化能が存在し、幹細胞を示すマーカーとして報告したが、その後SSEA3/4の阻害剤の検討などから否定的な報告もあり、未だ結論は得られていない。今回我々は、SSEA3/4がWJ-MSCsの幹細胞含有の指標となりうるかについて検討するため、

WJ-MSCs 中の SSEA3/4 の発現について調べた。

バンキングシステムに関しては公的（東京）臍帯血バンクの品質検査方法に準じて、品質管理システムを考案した。

## B. 研究方法

### 1. 臍帯の処理方法の検討

臍帯受取後：臍帯を受取後、重さ、長さを測定後、50ml チューブに入れる。臍帯を入れたチューブに抗生剤入り P B S（抗真菌剤、抗生剤を加えて浸し、冷蔵庫で数時間置く。

乾熱滅菌したはさみと鉤つきメスを用いて、WJ と動脈、静脈を引き裂くように分ける（図 1）。WJ をメスでみじん切り（約 1-2mm 程度）にする。

Explant 法：細かい間隔でみじん切りした WJ 組織を乾いた組織培養用ディッシュ（Primaria, BD, CA）に貼り付ける。予め空のディッシュの重量を測定しておき、貼り付けた組織の重量を測定する。組織片が、少し乾いて Dish に張り付いた時点で、10% F B S +  $\alpha$ MEM で 37 度 CO<sub>2</sub> 5% で培養を開始する（図 1）。7 日毎に培養液を交換する。なるべく組織がはがれないように注意する。

Collagenase 法：みじん切りにした WJ 組織を 50ml チューブにいれ、重量を測定する。

Collagenase (Clostridium diff.) を 1mg に調整した PBS を 10ml 入れる（図 1）。

約 2 時間振盪しながら 37°C で培養し、形がなくなってきたら培養液を 45ml まで注ぎ、遠心し、上清をゆっくり除く。同様にして 2 回洗浄後ディッシュに播種する。

7 日毎に培養液を交換する。

21 日目培養液を除き、P B S で一回リンスした後に、トリプシン (Tryple, Invitrogen, CA, USA) を加えて 37 度 CO<sub>2</sub> 5% で 10 分培養する。その後、F B S 入り培養液を 1ml 加えてトリプシンの作用を止め、組織片ごと細胞浮遊液をピペット（25ml）で回収し、セルストレイナー（フィルター）を通して組織片を除きながら細胞を回収する。培養液で 2 回洗浄後、細胞数を測定し、これを P0 細胞 (=マスターセルとする)。以降、1~2x10<sup>5</sup> 個/ 10cm dish にて細胞を播種する。

### 2. フローサイトメトリーおよびソーティング

得られた細胞が MSC に特徴的な表面マーカーを呈しているか評価するため、MSC 関連マーカーで染色後、フローサイトメトリーにて解析した。また、SSEA3/4 に関して継続的にその発現を観察するとともに、SSEA4 の発現の有無によって、細胞を分離し、比較検討した。

### 3. 臍帯血分離方法

臍帯血の分離は、東京臍帯血バンク SOP B02 および SEPAX の手順書に準じて有核細胞数を分離した（添付書類 1）。

### 4. 臍帯血と臍帯由来 MSC の検体管理システムと検査体制の構築

臍帯血の採取・臍帯の採取から細胞処理、凍結保存・出庫に関する一連の工程について、検体をラベル保管するシステムを考案した。

（倫理面への配慮）

本研究は、当施設倫理審査委員会にて承認された研究課題 21-18「臍帯血と臍帯由来細胞の基礎的研究」にもとづいて実施した。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1. Explant 法(WJe-MSCs)と Collagenase 法(WJc-MSCs)の比較検討

1g 当たりの WJe および WJc から各々 WJe-MSCs 中央値  $2 \times 10^6$  (range,  $9.1 \times 10^4 \sim 10.3 \times 10^6$ ; n = 23)、WJc-MSCs  $1.7 \times 10^6$  (range,  $9.2 \times 10^4 \sim 7.5 \times 10^6$ ; n = 20).

が得られた(図 2 A)。WJe-MSCs および WJc-MSCs とともに CD73, CD105, CD90, HLA-A, B, C (Class I)陽性、CD45 および HLA-DR(Class II)陰性であり、MSC の特徴を有しており、両者での差は認めなかった(図 2 B)。さらに、WJe-MSCs および WJc-MSCs 共に ES 特異的マーカーである Nanog, Oct-4, Klf4, Rex1, Sox2 遺伝子の発現を認めた(図 2 C)。

臍帯は骨髓や脂肪組織と異なり、Collagen や Hyaluron 酸が非常に抱負であり、細切した切片も粘液質に包まれている。臍帯由来 MSCs の分離方法として Explant 法と Collagenase 法があるが、我々の検討においては両者どちらの回収した MSCs 数や MSCs の定義とされるマーカー(CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, HLA class I<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA class II<sup>-</sup>)を含めた性状の有意な差は認めず、バンキングに関しては非医薬品である Collagenase の使用を必要としない Explant 法にて MSCs を分離する方向で調整することとした。

### 2. SSEA3/4 の発現

我々は WJ-MSCs における幹細胞性(stemness)の品質の指標の一つとして、ES

細胞初期に発現すると言われる SSEA3/4 の発現をフローサイトメトリーにて検討した。WJe-MSCs および WJc-MSCs とともに P0 における SSEA4(図 2 A.)および SSEA3(図 2 B.)の発現%に有意差は認めなかった。SSEA3 の発現は培養早期に低下し、SSEA4 は WJc-MSCs P1 において、一旦低下するものの、WJe/WJc-MSCs とともに p9 まで発現を認めた。興味深いことに、SSEA4+および SSEA4-でソーティング後も SSEA4 の増殖能(図 3 A)および ES 細胞マーカーの遺伝子発現レベル(図 3 B)、脂肪(図 3 C)および骨芽細胞(図 3 D)への分化能は同等であった。

特に SSEA4 の発現のよる差による WJ 由来 MSC の性状の違いが明らかではないこと、FBS 中にもその抗原となる物質の存在が示唆された報告があることから、培養液中の FBS 濃度(0.1%~20%)による SSEA3/4 の発現を検討した。その結果、SSEA4 は FBS の濃度依存性に増加した(図 4)。

今回の検討から、WJ-MSCs においては SSEA4 の発現は培養液中の FBS の影響も受け、発現の有無による性状の違いは認めなかったことから、通常培養条件下では MSCs の幹細胞の指標にはなりえないと考えられた。一方 SSEA3 に関しては、同様に FBS の影響を受けたが、通常培養条件下では培養開始後に急速に発現が低下することから、この分画に関しては今後も検討する必要があると思われた。黒田らは、SSEA3<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup>細胞を MUSE (multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞として MSCs 中の幹細胞の指標として掲げているが、WJ-MSCs における SSEA3 の役割は明らかではなく、他のバイオマーカーの検索とともに検証する必要がある。

### 3. 炎症性サイトカインによる HLA-classII 発現への影響について

MSC は HLA classI の発現はあるが、ClassII の発現を認めないのが特徴であり、これらは低抗原性の根拠ともなっている。しかし、骨髄由来 MSC は炎症状況下において HLA-ClassII の発現を認めると報告されている。一方、臍帯由来 MSC においては、まだ結論が得られていないことから、我々は WJe-MSC における炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  および PHA-L の影響について検討した。その結果、骨髄由来 MSC においては IFN- $\gamma$  存在下で HLA-ClassII の誘導を認めたが、WJe-MSCs においては誘導されなかった(図 5)。なお、共刺激因子の CD80 および CD86 の発現も認めていない(data not shown)。

MSCs の細胞療法の疾患ターゲットの一つとして、移植片対宿主病やクローン病等の炎症性疾患において、抗原性の増加は新たな免疫反応を引き起こしかねない。またバンクドナーソースとして HLA の適合性を考えるに当たり、HLA-ClassII の発現の有無は重要である。まだ Preliminary な結果ではあるが、WJe-MSCs が IFN- $\gamma$  存在下でも HLA-classII の発現が誘導されなかったことは、バンキングを考慮するにあたり朗報と言えるかもしれない。

### 4. 臍帯血と臍帯由来 MSC の検体管理システムと検査体制の構築

臍帯血と臍帯由来 MSC の製剤化を目指したバンキングを進めるにあたり、検体管理システムとラベルは非常に重要である。我々は図 6.に示す通りの 2次元コードを取

り入れた検体管理システムを構築した。

特徴として、採取施設から発行された ID(1<sup>st</sup> ID) は細胞処理施設(東大医科研)にて ID(2<sup>nd</sup> ID)を ISBT128 規格に則った ID に置き換える。これによって母親が知り得る ID と分離製造された製品の ID についての結びつきは不可能となり、匿名化が担保される。また研究目的に外部で使用する場合にはさらに ID(3<sup>rd</sup> ID)を付け替える仕組みとなっている。今年度は未だ臨床用としての臍帯血・MSCs 保存は当院倫理委員会の承認を得ていないが、前段階としての研究使用としての運用は承認された。今後、臨床用バンキング確立のためには、さらに手順書や工程記録等の書類を組み入れたシステムを完成させる必要がある。

### 5. 臍帯血と臍帯由来 MSC の系統的資源化のための倫理的側面の検討

臍帯血・臍帯の提供に当たり、本研究に同意するか否かは提供(予定)者の自由意思に委ねられ、同意しない場合や同意撤回後でも何ら不利益を被らないことが保証される。また、出産を優先し、研究への協力を希望しても臍帯血や臍帯の採取ができない場合もあることを説明する。臍帯血・臍帯に付随する個人情報情報は全て東大医科研にて符号化し、連結可能匿名化をする。個人情報保護法、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。既に基礎的研究に関しては、2009 年 10 月より東大医科研および採取病院である NTT 東日本関東病院での倫理審査委員会の承認は得ている。しかし、臍帯血・臍帯バンキングを行うに当たり、広範囲ゲノム情報・遺伝子解析も必要と考えられることから「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に従い、今年度は、東大医科研のヒトゲノム倫理審査委員会にて新規申請し、2013年1月7日に承認された。2月に採取施設(NTT 東日本関東病院)の委員会に申請し、承認を得た。個々の準備も含めて次年度からの実施に向けて準備を行った。この新規申請中の研究計画においては、臍帯血および臍帯採取対象は疾患の有無に限らず採取をし、フローチャートを図7に示す通りに系統的に保存するものである。なお、臍帯血・臍帯バンキング関連以外の基礎研究に関しては、新規に出てくる可能性のある研究テーマを現時点では限定できないことから、研究テーマに基づいて実施する研究者ごとに当該機関の倫理審査委員会またはヒトゲノム倫理審査委員会等の必要な審査委員会に申請し、その研究に対して本研究で採取した臍帯血・臍帯由来資料(検体と匿名化臨床情報)を研究用として提供する体制とした。次年度以降の運用を目指す。

#### E. 結論

我々は、臍帯血・臍帯由来組織の系統的資源化(バンキング)を目指し、特に臍帯由来MSCsの分離方法、検体管理システムを検討した。MSCsのstemnessの指標となるバイオマーカーに関して、SSEA4は培養条件によって影響を受けることが分かり、他のマーカーの検索も含めて検討を続けていきたい。

#### F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int*. 2013 (印刷中)
2. Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol*. 2013 (印刷中)
3. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T, Tabuchi K, Atsuta Y, Sakamaki H. Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia*. 26,1416-9, 2012
4. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T, Atsuta Y, Sakamaki H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid

- leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia*. 26,461-4, 2012
5. 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*. 2013 Jan 24. (印刷中)
  6. 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,e87-9,2013.
  7. 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
  8. 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(2):247-54, 2012.
  9. 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
  10. 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
  11. 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

## 2. 学会発表

(国内)

1. 長村登紀子 テクニカルセミナー 細胞処理の基本的操作と検査 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 2012/5/25
2. 何 海萍, 長村登紀子, 東條有伸ら. Characterization of primitive markers in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells 臍帯由来間葉系幹細胞における未熟細胞マーカーの解析 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/19
3. 山本由紀, 長村登紀子, 東條有伸ら. mTOR inhibitor の制御性T細胞の誘導増幅に及ぼす影響 The influence of mTOR inhibitor on inducible regulatory T cells 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/20
4. 幸道秀樹, 高橋敦子, 長村登紀子, 菅有紗, 笠根萌美, 星野茂角, 松本太郎, 麦島秀雄, 勝村秀樹 初回移植における生着率 The rate of engraftment in the first cord blood transplantation is higher than those in later. 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/21
5. 湯沢 美紀, 尾上和夫, 山本 由紀, 東條 有伸, 長村(井上) 登紀子ら. 東大医科研における臍帯血移植時の解凍検査について 第134回日本輸血・細胞治療学会関東甲信越支部例会 2012/9/29 (海外)

6. Murata M., T. Nagamura-Inoue, and Suzuki R et al.. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-Versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy 第54回米国血液学会 2012/12/9
7. Aoki K., Ishiyama K., Tokiko Nagamura, et al. Unfavorable Outcome of Single-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndromes 第54回米国血液学会 2012/12/9

## 3..その他、

専門医、一般医等医療従事者への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表)

1. 長村登紀子 制御性T細胞の誘導増幅による免疫抑制療法の可能性について 幹細胞治療研究フォーラム 2012/07/19

患者、家族、患者会や一般市民への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表、マスコミでの発表など)

1. 長村登紀子 造血幹細胞の病変と治療のための輸血について 公的骨髄バンクを支援する東京の会 2012/6/23

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図1. 臍帯からの MSCs の分離方法

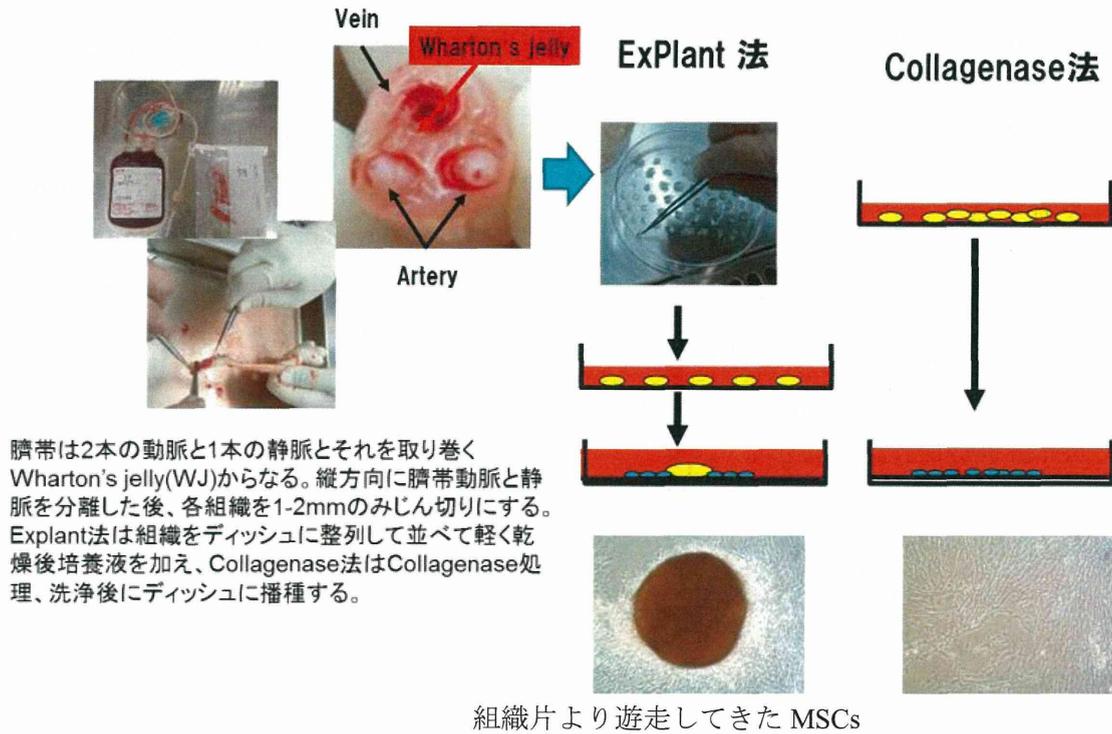


図2. Explants 法と Collagenase 法による細胞回収数と表面マーカーの解析の比較

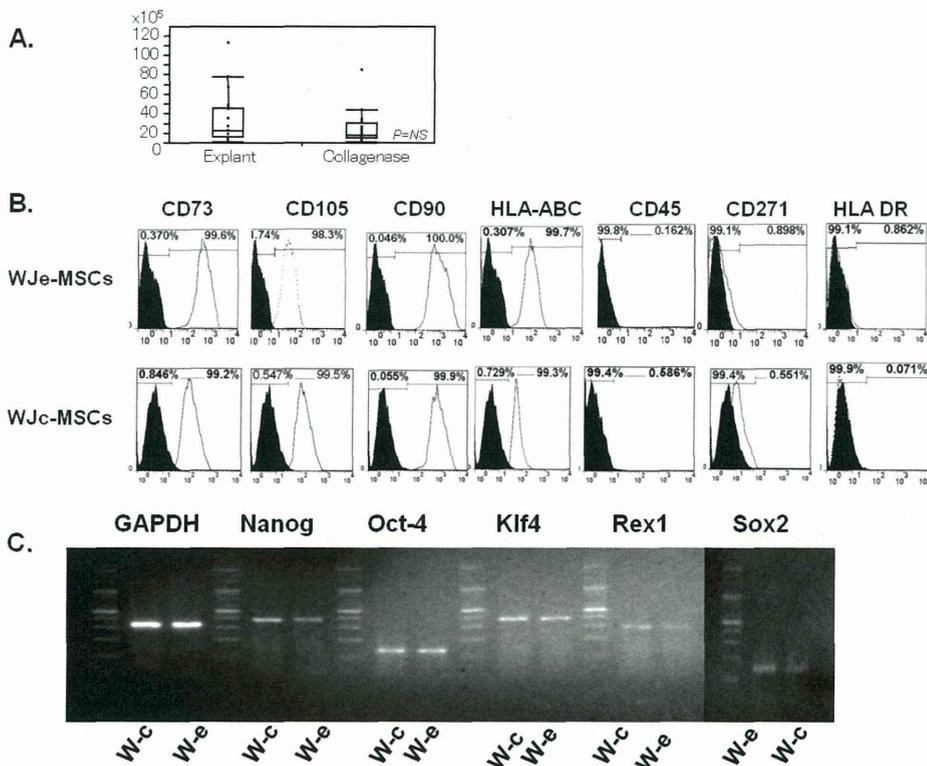
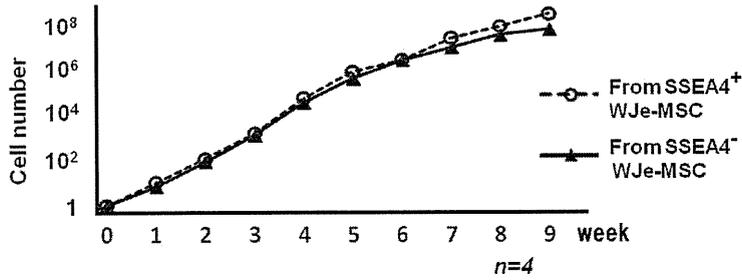
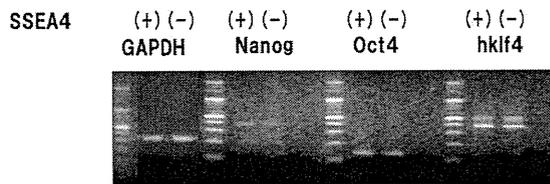


図 3 . WJ 由来 stage-specific embryonic antigen (SSEA)4<sup>+</sup>および SSEA4<sup>-</sup>細胞からの脂肪および骨芽細胞への分化能

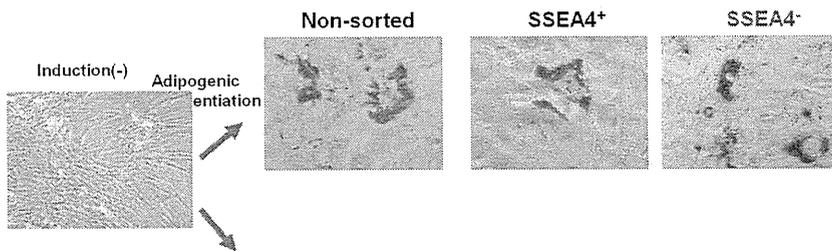
A. Growth curve by SSEA4 expression



B. ES markers by SSEA4 expression



C. Adipocyte differentiation



D. Osteocytic differentiation

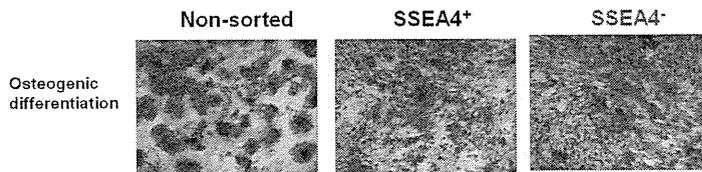


図 4. 培養液中の FBS 濃度の違いによる SSEA4 の発現への影響

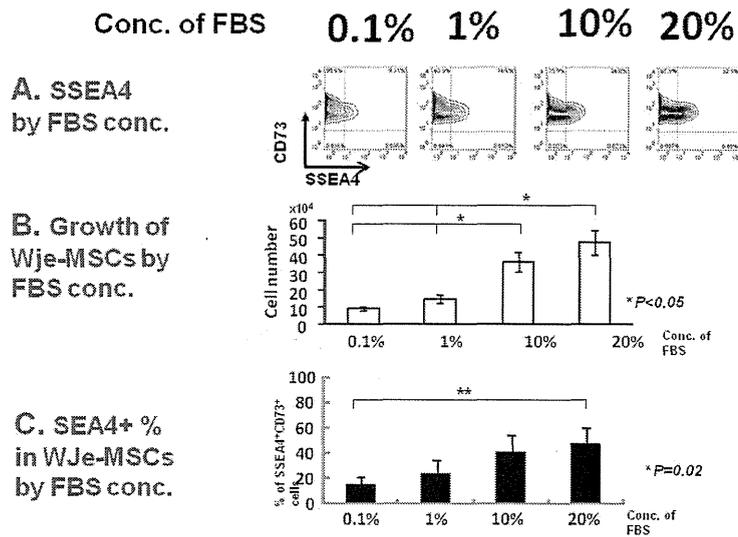
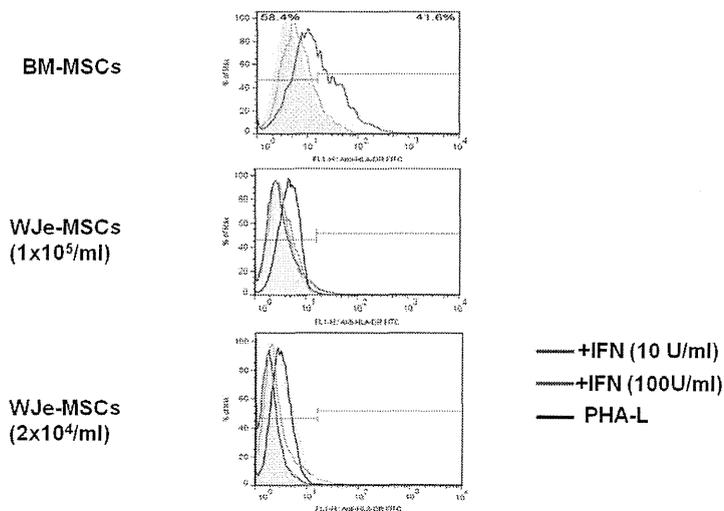


図 5. 炎症性サイトカインによる HLA-class II の発現への影響



骨髄由来 MSC(BM-MSCs)においては IFN- $\gamma$  投与下で HLA-class II の発現が誘導されたが、WJe-MSCs においては誘導は認められなかった。

図 6. 臍帯血と臍帯由来 MSC の検体管理システムと検査体制の構築

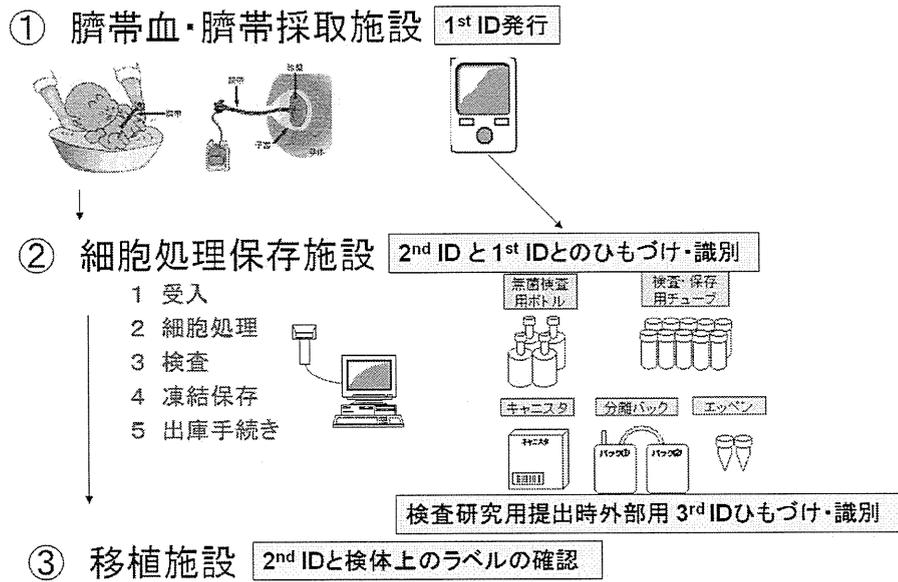
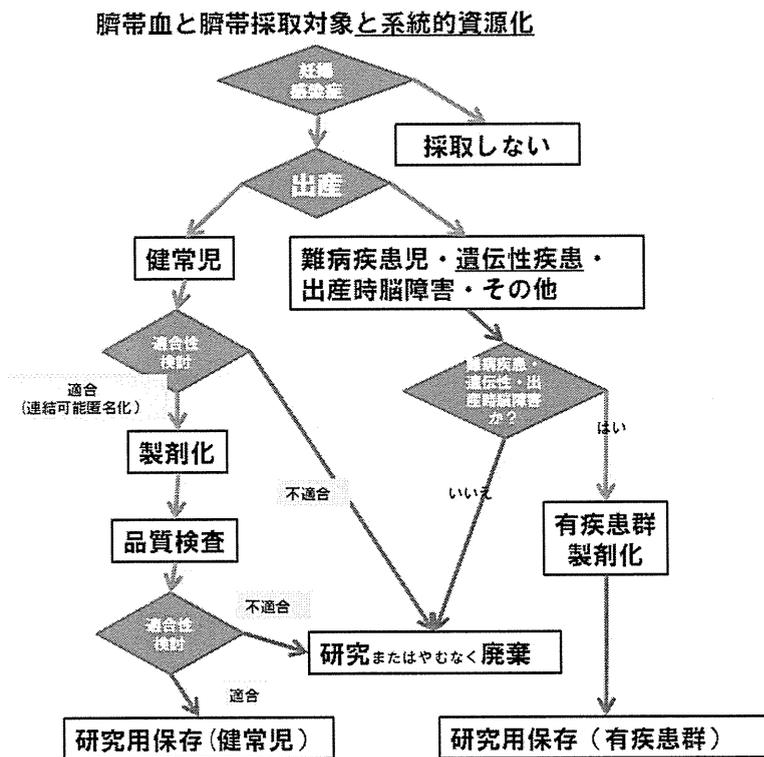


図 7. 臍帯血と臍帯採取の系統的資源化のフロー



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））

分担研究報告書

臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究

研究分担者 角田 肇 NTT 東日本関東病院分娩部 部長

研究要旨 効率的臍帯血及び臍帯の採取方法について、種々の検討を行った。その結果、予定帝王切開分娩時に、臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置することにより、臍帯と同時に100ccの臍帯血を無菌的に採取できる技術を確立した。

**A. 研究目的**

効率的臍帯血、臍帯採取の症例選択基準、採取方法を検討する。

**B. 研究方法**

当科で分娩時に採取した胎盤、臍帯から臍帯血及び臍帯を採取し、本研究の基礎研究に必要な研究材料を提供するのにもっとも効率的な採取方法を検討した。

**C. 研究結果**

自然経膣分娩、計画経膣分娩、予定帝王切開分娩、緊急帝王切開分娩の中では採取者を待機させることができる、予定帝王切開分娩が安定して十分量（約100ccの臍帯血を無菌的に採取することができた。

**D. 考察**

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究には、安定的な臍帯血及び臍帯の採取が極めて重要である。採取者を待機させることにより、予定帝王切開分娩において、基礎研究に必要な臍帯血および臍帯を安定的に供給できることが明らかとなった。

**E. 結論**

臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置することにより、臍帯と同時に100ccの臍帯血を無菌的に採取できる技術を確立した。

**F. 健康危険情報**

本研究を実施するにあたり、特に問題となることはなかった。

**G. 研究発表**

1. 論文発表
2. 学会発表

(国内)

1. 何 海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. Characterization of primitive markers in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells 臍帯由来間葉系幹細胞における未熟細胞マーカーの解析 第 74 回日本血液学会学術集会総会 2012/10/19
2. 山本由紀, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. mTOR inhibitor の制御性T細胞の誘導増幅に及ぼす影響 The influence of mTOR inhibitor on inducible regulatory T cells 第 74 回日本血液学会学術集会総会 2012/10/20

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

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

## 臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究

研究分担者 東條 有伸 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者 長村登紀子 東京大学医科学研究所 講師

### 研究要旨

間葉系幹細胞(MSC)の免疫抑制作用が、臨床面で注目されるようになったのは2004年の『Lancet』に掲載された「造血幹細胞移植後の重症難治性GVHDが第3者由来のMSCの投与によって著名な改善を認めた」というLe Blancらの報告を契機とする。MSCの免疫制御機序については、IL10やTGFβ等のサイトカインの関与が指摘されるものの不明な点も少なくない。本研究では、まず臍帯Wharton's Jelly由来の間葉系幹細胞(WJ-MSC)の表現型を骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)と比較したが、有意な違いは認められなかった。また、混合リンパ球培養の系において、同種樹状細胞刺激によるCD4およびCD8陽性T細胞の増殖を強力に抑制することが確認された。T細胞とMSCの接触を分断するとこの抑制作用が若干低下することから、サイトカイン以外に細胞接着の関与も示唆された。一方、臍帯血の造血幹/前駆細胞から効率的にT細胞やNK細胞を分化誘導する試みについても検討している。

### A. 研究目的

第3者由来のMSCが造血幹細胞移植後の重症難治性GVHDに有効であることは、ヨーロッパ血液・骨髄移植グループ(EBMT)が施行した第II相臨床試験の成績でも確認されている。この報告では奏効率70%と高く、治療抵抗性GVHDに対する治療選択肢の1つとして有望視され、本邦でも第I相試験が行われている。本研究の主目的は、自家及び他家の臍帯由来間葉系幹細胞を免疫制御目的で臨床応用することを見据えて、その作用機序を明らかにすることであり、さらに、MSCを操作して試験管内でT細胞やNK細胞など免疫エフェクター細胞の誘導や増幅を試みる。以上により正負双方向の免疫制御においてMSCの可能性を探る。

### B. 研究方法

#### 1. 混合リンパ球反応(MLR)

臍帯Wharton's Jelly由来間葉系幹細胞(WJ-MSC)はexplant法にて分離培養し、パッセージ数の少ない(~P1)ロットを用い

た。末梢血CD4ならびにCD8陽性T細胞は免疫磁気ビーズ法を用いて分離した。さらに、臍帯血単核細胞をGM-CSF、IL4およびTNFαで処理して成熟樹状細胞(mDC)へ分化誘導した。MLRは、抗CD3モノクローナル抗体を添加した24ウェル培養皿中で $2 \times 10^6$ /mLのCFSE標識T細胞と50Gy照射した $2 \times 10^5$ /mLのDCをWJ-MSCフィーダー層の存在または非存在下で4日間共培養した後、フローサイトメトリーにてT細胞の増殖を観察した。

#### 2. NK細胞の培養

$1 \times 10^6$ /mLの臍帯血単核細胞を5%ヒトAB血清、10 ng/mL IL15、5 ng/mL IL2、10 ng/mL 抗CD3モノクローナル抗体(それぞれ最終濃度)を含む幹細胞用メディアウムSCGM(CellGenix社)にて1週間培養し、チロシンキナーゼ阻害薬ダサチニブ添加の有無で培養前後のNK細胞の割合およびその表現型を比較解析した。(倫理面への配慮)

本研究は、当施設倫理審査委員会にて承認された研究課題 21-18「臍帯血と臍帯由来細胞の基礎的研究」にもとづいて実施した。

## C. 研究結果

### 1. WJ-MSC の免疫抑制作用

臍帯血単核細胞より調整した mDC は、同種 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖を刺激し、4 日間共培養後のフローサイトメトリーにおいて T 細胞を標識した CFSE の蛍光強度は顕著に低下することが確認された。

一方、WJ-MSC を播種した培養皿中で同じく共培養を行った場合、CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖は抑制され、CFSE の蛍光強度はほとんど変化しなかった (図 1)。なお、混合リンパ球(T 細胞+mDC)と WJ-MSC の直接接触を膜フィルターにより分断すると、CFSE 蛍光強度の低下傾向が認められた。

### 2. 臍帯血由来 NK 細胞亜分画の選択的増幅

培養前の臍帯血中 NK 細胞は、末梢血同様 CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup>CD57<sup>+</sup>の形質を示す細胞障害型 NK 細胞であったが、IL15、IL2 および抗 CD3 抗体刺激にて培養後の NK 細胞分画の約 40%は CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> CD57<sup>+</sup>の形質を示す炎症性サイトカイン分泌型 NK 細胞であった。さらに、ダサチニブを添加した場合、その割合は約 2 倍となり、絶対数も約 10 倍に増加した (図 2)。

## D. 考察

WJ-MSC の免疫抑制作用として、従来指摘されているサイトカイン等液性因子の他に細胞接着の関与も示唆された。また、ダサチニブにより炎症性サイトカイン分泌型 NK 細胞が選択的に増幅されたことから、Src ファミリーキナーゼの抑制がこの亜分画の増殖に影響する可能性が示唆された。

## E. 結論

以上より、臍帯 Wharton's Jelly 由来の間葉系幹細胞は、混合リンパ球培養の系において、同種樹状細胞刺激による CD4 および CD8 陽性 T 細胞の増殖を強力に抑制することが確認された。T 細胞と MSC の接触を分

断するとこの抑制作用が若干低下することから、サイトカイン以外に細胞接着の関与も示唆された。また、臍帯血単核球を抗 CD3 抗体および IL2、IL15、ダサチニブの存在下で 1 週間培養することにより、CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>high</sup>の炎症性サイトカイン分泌型の NK 細胞が選択的に増幅された。

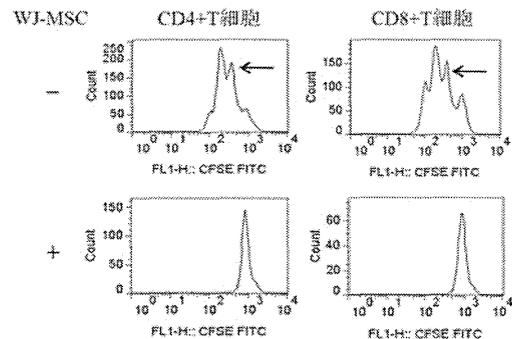


図 1 WJ-MSC による MLR の抑制

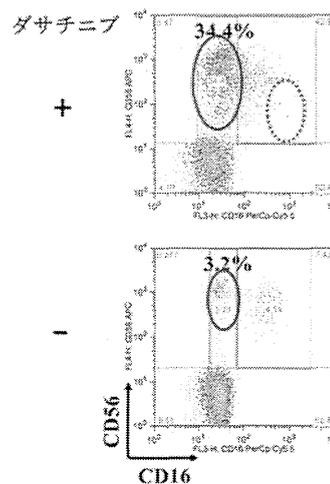


図 2 ダサチニブによるNK細胞亜型の増幅

## F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. *PLoS One*. 2013;8(1):e53728. doi: 10.1371/jour
2. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome (letter to the editor). *Leuk Lymphoma*. 2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
3. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infectious Disease*. 2012 Dec 20. doi: 10.1111/tid.12038. [Epub ahead of print]
4. Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, Tojo A, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. *Int J Hematol*. 2012 Dec 16. [Epub ahead of print]
5. 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 hemophilic arthropathy. *Hemophilia*. 2012 Dec 4. doi: 10.1111/hae.12056. [Epub ahead of print]
6. Chi HT, Ly BT, Kano Y, Tojo A, Watanabe T, Sato Y. ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 3. doi:pii: S0006-291X (12)02079-7. 10.1016/j.bbrc.2012.10.087. [Epub ahead of print]
7. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaru, Tojo A, Tsuji K. Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3 -PBX1 Fusion in an Adult Male with Down Syndrome. *Acta Haematol*. 128:242-243, 2012
8. Oshima Y, Yuji K, Tojo A. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. *New Engl J Med*. 367:1162-3, 2012
9. Oshima Y, Tsukamoto H, Tojo A. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. *Mod Rheumatol*. 2012 Jul 18. [Epub ahead of print] PMID: 22802011
10. Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H.

- Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed, or Ficoll-treated marrow. *Cytherapy*. 14:791-801, 2012
11. Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, Tojo A, Gotoh N. ErbB/NF- $\kappa$ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:6584-9, 2012
  12. Usuki K, Tojo A, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. *Int J Hematol*. 95:409-19, 2012
  13. Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. *Blood*. 119:3123-7, 2012
  14. Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchimarui K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis*. 2:1-10, 2012
  15. Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma*. 53: 1423-4, 2012
  16. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leuk Res*. 6:128-31, 2012
2. 学会発表  
(国内)  
第74回血液学会学術集会  
2012/10/19 (金) 小林誠一郎、東條有伸、他.  
口演 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」  
2012/10/19 (金) 塚田端夫、東條有伸、他.  
ポスター 「リウマチ性多発筋肉痛症を合併したt(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」  
2012/10/19 (金) 何 海萍、長村登紀子、東條有伸、他. ポスター 「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」  
2012/10/20 (土) Chanda Bidisha、東條有伸、他. 「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」  
2012/10/20 (土) 大野伸広、東條有伸、他.

「CD3とCD7の展開によるATL細胞の同定：急性型ATLの治療反応性とTCRレパトア解析」

(海外)

第54回米国血液学会学術集会

2012/12/08 (土) 臼杵憲祐、東條有伸、他.

「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」

2012/12/10 (日) 幸谷 愛、東條有伸、他.

「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」

2012/12/10 (日) 湯地晃一郎、東條有伸、他.

「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」

3. その他、専門医、一般医等医療従事者への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表)

2012/01/28 (土) 第14回下総血液研究会・特別講演 東條有伸 「CML分子標的治療のバイオマーカー」

2012/05/15 (火) 川崎市医師会主催講演会

東條有伸 「血液疾患を疑う症状と所見の見方～専門医との連携について」

2012/06/08 (金) 第9回山梨臨床血液カンファレンス・特別講演 東條有伸 「CML治療の今後を考える」

2012/11/09 (金) 東葛・湾岸エリア下総血液ミーティング・特別講演 東條有伸 「CML治療の今後を考える」

2012/11/30 (金) 盛岡CMLカンファレンス 東條有伸 「ダサチニブによって誘起されるT-LGL/NK細胞の増加について」

4. 患者、家族、患者会や一般市民への情報提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表、マスコミでの発表など)

2012/09/01 (土) 再生つばさの会 札幌医療講演会 東條有伸 「骨髄異形成症候群の病態と治療」

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療開発

研究分担者（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏）  
研究協力者（東京医科歯科大学・大学院・分子細胞機能学分野  
森田育男、小牧基浩、滝敦子、本多泉、森丘千夏子）

**研究要旨**

妊娠 16 日ラット羊水腔内 LPS 投与により、日齢 14 新生仔の脳室周囲白質量の減少を認め、これを実験的子宮内感染症に起因する PVL モデルとした。このモデルを用いた出生後新生仔への臍帯由来 MSC 治療により、日齢 14 における脳室周囲白質用の改善傾向を認めた。

**A. 研究目的**

脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患は早産児の予後を悪化させる主要な合併症であり、その成因に子宮内感染症が関与している。本研究の目的は、実験的子宮内感染症モデルを用いて、子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患の病態における内在性幹細胞の障害と疾患成立への関与を検討し、間葉系幹細胞を用いた新たな治療法を開発することである。治療法については、妊娠母体への治療法、培養上清を用いた再生治療法、内在性幹細胞の機能を改善させることにより自己再生を誘導する治療法について検討し、安全で効率的な再生治療法の開発を目指す。さらに、これらの研究を通して治療の鍵となる生理活性物質を同定し、新たな創薬につなげることを目標とする。

**B. 研究方法**

1. 妊娠 16 日 SD ラットの羊水腔内に LPS 0.2 $\mu$ g を投与し、子宮内感染症を誘発した。
2. LPS 羊水腔内投与に惹起される子宮内感染の評価として、妊娠 20 日において、胎盤組織学的評価を行った。
3. 子宮内感染症に起因する PVL・CLD の程度を評価した。日齢 14 新生仔を対象として、脳病理学的検査として、HE 染色、Myelin basic protein 組織免疫染色を行い、脳器質的変化および脳白質量を評価した。肺病理学的検査として、HE 染色、Masson' Trichrome 染色を行い、RAC(radial alveolar count)法により肺損傷を定量的に評価した。
4. 治療用 UCMSC 採取のため、妊娠 20 日ラット臍帯から out growth法により MSC を培養した。出生後の仔に対する治療として、 $1 \times 10^5$  個の UCMSC および 24 時間無血清培地で培養した MSC 培養上清を

採取し、日齢 1 および 7 の新生児に静脈内投与した。治療効果の判定のため、日齢 14 新生児を対象として、肺および脳の組織学的評価を行った。炎症の評価として、組織におけるマクロファージ、リンパ球、好中球などの炎症性細胞浸潤を調べ、RT-PCR 法にて IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MCP-3 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を調べた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は動物を対象とした実験であり、東京医科歯科大学動物実験委員会のガイドラインに従った。文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」などの各種指針を遵守した研究を行い、動物は研究に最小限の匹数を用い、飼育保管基準をふまえて管理を行い、麻酔により最小の苦痛となるように配慮して行った。研究計画は既に倫理審査委員会の審査・承認を得ている。

### C. 研究結果

1. LPS 羊水腔内投与に惹起される子宮内感染の評価として、妊娠 20 日における胎盤組織における好中球数、CD68 陽性細胞数、MPO 陽性細胞数を測定したところ、いずれも上昇していた。
2. 日齢 14 の新生児における組織学的評価として脳室周囲白質量を Myelin basic protein の陽性面積で調べたところ、LPS 投与群ではコントロール群と比較して有意に低下した。また肺における RAC 数は低下していた。以上より LPS 投与により白質損傷と肺損傷が惹起されたと考えられた。
3. 母体羊水腔内 LPS 投与脳室周囲白質損傷ラットに対する、MSC、または MSC 培養上清の治療効果として、日齢 14 における MBP 陽性領域、つまり白質量は

増加する傾向にあった。培養上清よりも MSC 投与の方が効果があったが有意差は認めなかった。肺損傷には改善傾向は認められなかった。日齢 7 の新生仔脳における炎症性サイトカイン・ケモカインの発現は、各群内ではばらつきが大きく差を認めず、MSC による炎症抑制効果は明らかではなかった。

### D. 考察

今回の実験で子宮内感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の UCMSC 投与が有効である可能性が示された。しかし、有意差がでなかったことよりより効果的な MSC の採取法を検討する必要があると考えられた。予備実験ではコロニー形成細胞を選択的に採取したところ、FACS では CD140b、CD146、CD166 のマーカーが上昇し、また骨分化、軟骨分化がみられたため、より純度の高い MSC になっていると言える。今後これらのコロニー形成細胞を選択し、それを治療に使用することも検討していく。その後 MSC の効果機序として日齢 7 でのオリゴデンドロサイト前駆細胞の数や細胞死数、マイクログリア数などを検討したい。

### E. 結論

子宮内感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の UCMSC 投与は治療効果を有する可能性がある。

### F. 健康危惧情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

### G. 研究発表

1. 学会発表

1. 本多泉、滝敦子、岩崎劍吾、小牧基浩、森田育男：ラット子宮内感染モデルを用いた新生児脳室周囲白質軟化症及び慢性肺疾患に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療の検討、第 33 回日本炎症・再生医学会、福岡、2012 年 7 月 6 日
2. 本多泉、滝敦子、森丘千夏子、杉江学、土井庄三郎、水谷修紀、宮坂尚幸：LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルを用いた研究 第 1 報：胎盤および新生児合併症の解析、第 48 回周産期・新生児医学会、大宮、2012 年 7 月 9 日
3. 滝敦子、本多泉、森丘千夏子、杉江学、宮坂尚幸、土井庄三郎、水谷修紀：LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルと用いた研究：第 2 報：間葉系幹細胞を用いた治療法の開発、第 48 回周産期・新生児医学会、大宮、2012 年 7 月 8 日

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
該当無し