

## 「妊娠ラット羊水腔内 LPS 投与による脳室周囲白質損傷に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療法の開発」

東京医科歯科大学 大学院発生発達病態学・ナノメディスン (DNP)・分子細胞機能学  
滝 敦子、森丘 千夏子、本多 泉、小牧 基浩、森尾 友宏、森田 育男

【目的】子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症に対する臍帯由来間葉系幹細胞およびその培養上清による治療法を開発する。

【方法】妊娠 16 日ラット羊水腔内 LPS  $0.2 \mu\text{g}$  投与により、妊娠 20 日の胎盤好中球浸潤および日齢 14 における新生仔の体重減少、脳室周囲白質量の有意な減少を認めたため、これを実験的子宮内感染症に起因する脳室周囲白質損傷モデルとした。

妊娠 16 日羊水腔内 LPS 投与母体より出生した新生仔に対して、日齢 1 および 7 に妊娠 20 日ラットより培養した臍帯由来 MSC (LPS-MSC 群)、培養上清 (LPS-MSCCM 群)、細胞培養液 (LPS-無治療群) を静注した。妊娠 16 日に羊水腔内に生食を投与した母体より出生した新生仔をコントロール群とした。日齢 14 の新生仔の脳組織切片を作製し、組織免疫染色により脳室周囲白質量 (MBP 染色陽性領域)、オリゴデンドロサイト前駆細胞数 (NG2 陽性細胞数) を評価し、脳室周囲白質損傷に対する MSC、MSC-CM の治療効果を検討した。

【結果】脳室周囲白質量は、LPS-無治療群では、コントロール群と比較して有意に低値であったが、LPS-MSC 群ではコントロール群レベルまで有意に増加した。LPS-MSCCM 群は LPS-無治療群との差を認めなかった。脳室周囲白質におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞数の割合は、コントロール群と比較して、LPS-MSC 群、LPS-MSCCM 群、LPS-無治療群の 3 群において減少しており、3 群間で差を認めなかった。

【結論】実験的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 MSC 投与は治療効果を有すると考えられた。MSC 投与による脳室周囲白質量回復の機序としては、日齢 14 におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞数に差を認めなかったことから、オリゴデンドロサイトの分化を促進する可能性が考えられる。今後、pre-oligodendrocyte、oligodendrocyte 数について検討していきたい。

## 「幹細胞臨床応用に必要な非臨床試験及び規制対応」

長村文孝

東京大学医科学研究所先端医療研究センター先端医療開発推進分野

新たな概念の医療開発においては、規制面での整備に時間がかかること、また、規制情報の収集と解釈が研究者側にとっては大きな負担であること、等も研究者の開発を困難にしている要因となっている。幹細胞の臨床応用、すなわち再生療法開発においても同様である。本研究においては、存在する障壁のうち、臨床試験の準備に欠かせない非臨床試験に係わる規制面と、有用な細胞リソースの提供を容易にするバンキングについて海外情報を含めて検討を行っていく。

一般的な医薬品開発においては、治験実施に必要な非臨床試験は GLP に規定されており、計画の立案に困難を生じることがまれである。しかし、再生療法を含むバイオテクノロジー応用医薬品では、非臨床試験計画の立案が困難であることが多く、そのため、ICH (International Conference on Harmonisation) においては S6 として「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」としてガイドラインが示されている。これは、免疫系の違い等により動物では人体と類似した生態環境を得ることができないために有効性及び安全性において評価不能であったり、動物種によって動物モデルが限られてしまうためであったり、通常の薬理試験の基本骨格である ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) を評価することが困難であるために新たな指標が必要であったりすることによる。これらの障害を克服するためには、規制面だけではなく、基礎研究あるいは実験動物の観点からも検討が必要であり、類似した研究あるいは使用する細胞ソースに関する情報収集と検討が欠かせない。

幹細胞を用いた臨床応用では、細胞の提供者により、自己細胞を用いて調製後に移植する場合と他家細胞を調製後に移植に大別することができる。また、後者は、特定の提供者から特定の患者調製後移植する場合と、バンキング化しそこから調製後移植する場合に分けることができる。現在、最も成功している細胞のバンクは臍帯血バンクであろう。また、造血幹細胞移植は、現時点で最も成功している再生療法とも言われており、そのノウハウと規制情報は、本研究においても重要な情報となる。2011 年、米国の New York Blood Center の臍帯血が”Hemacord”の商品名で米国 Food and Drug Administration (FDA) から承認を受けた。この背景には、1989 年に始める National Cord Program から始まる National Institute of Health の開発支援と、規制面での FDA との折衝の歴史が存在している。この承認のために FDA から”Guidance Document”も発出されており、この間の情報を解析することは、規制面での課題とその克服方法を考察する上で非常に重要な情報を得ることができると考えられる。また、”Hemacord”の品質を保証するための検査項目等も明らかになっており、これらを参考にして、出荷基準を設定することもできると考えられる。

## 「臍帯血と臍帯の採取について」

角田 肇

NTT 東日本関東病院 産婦人科

臍帯血および臍帯の採取方法自体は特別な技術を要するわけではないが、倫理的側面以外に下記の問題点を有する。

### 基礎研究材料として採取する場合

現在のように（週1検体程度）基礎研究材料として臍帯血・臍帯を採取する場合は、予定帝王切開分娩の妊婦から入院時に個別に説明と同意を取り、予定された日時に手術室において臍帯血・臍帯を採取することにより、スムーズに研究者に研究材料を提供することができる。帝王切開は一般的には術者、助手の2名の産婦人科医により行われるが、煩雑な操作の連続で、臍帯血を術中に採取する余裕はなく、別の採取者を手術中に待機させる必要がある。しかしながら、その採取者を産婦人科医から捻出することは極めて困難である。

### 臨床材料としてより多くの臍帯血と臍帯を採取する場合

説明と同意は、外来通院中にすべての妊婦に対して行うことになる。また、臍帯血・臍帯の採取は、すべての正常経膈分娩、帝王切開分娩（全分娩の23%）が対象となる。外来通院中の同意取得や、分娩時の臍帯血・臍帯の採取は、産婦人科医より多数いる助産師が担当することが合理的と考えるが、職種間で業務分担が明確に分かれている当院のような大規模病院では実際には医師が担当することとなり、このことが律速段階になることが危惧される。

一方、個人経営の産婦人科病院においては医師が雇用者、助産師・看護師が被雇用者の関係にあり、臍帯血、臍帯の採取がよりスムーズに行く可能性がある。

## 「臍帯血と臍帯由来間葉系幹細胞バンキングと細胞治療の可能性について」

長村登紀子

東大医科研病院 セルプロセッシング・輸血部

臍帯血と同時に採取できる臍帯は、間葉系幹細胞(MSC)のソースとして注目されているが、未だ分離方法を含めて治療法として確立されていない。分離、培養方法や幹細胞としてのマーカーについて検討し、細胞治療に応用できる効率的細胞分離保存方法を検討するとともに、安全かつ個人情報にも配慮したバンキングの基本的システム作りの検討が必要である。我々は臍帯を Wharton, Artery, Vein に分けたのち、Explant またはコラゲナーゼ処理後に培養し、培養後の細胞の表面マーカーおよびES 特異的マーカーを検討した。一部、SSEA4 発現の有無にてソーティングし、各々の性状を解析した。分離培養の細胞は、 $CD73^+$   $CD105^+$   $CD90^+$   $HLA\ class\ I^+$   $CD45^-$   $HLA\ Class\ II^-$  and  $CD34^-$  を呈するが、コラゲナーゼ処理法での P0 細胞の CD73 陽性率は 55%程度であった。ES 細胞特異的マーカーといわれる OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 and REX は RT-PCR レベルでいずれも陽性であった。SSEA4 陽性細胞は、どちらも一定の割合で存在し、陰性分画の培養後も陽性分画が出現した。一方、SSEA3 陽性細胞は培養初期に陽性分画を認めるが、継代とともに急速に消失した。これらの分化能の検討が今後の課題である。手技的には explant 法が時間的にも効率的であるが、他の研究者の協力を得ながら、分化誘導能等を検討しながら評価していく。

一方、本研究における臍帯血・臍帯バンキング範囲は、自己、血縁および非血縁ドナーである。現在の公的臍帯血バンクでは自己の臍帯血細胞は保存対象になっていないが、希少疾患を対象とした場合、自己、家族を含めたバンキングシステムの構築および支援体制が必要である。また、再生医療ソースとしての適応を考えた場合、これまでの公的臍帯血バンク以上に児の健康状態の把握は重要である。こうした、背景から倫理的妥当性のある同意書の作成、連結可能匿名化システム(所外からは連結不可能匿名化)について、本研究にてプロトタイプの実行を行ったので紹介する。

「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」

平成24年度 第2回 研究報告会

日時：平成25年 1月26日（土）9:00-12:30

場所：東京大学医科学研究所 1号館2階会議室

## 厚生労働科学研究 長村班 第二回班会議 プログラム

日時：平成25年 1月26日（土）9：00-12：30

場所：東京大学医科学研究所 1号館2階会議室

研究課題名（課題番号）：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（H24-難治等（難）-一般-016）

主任研究者：長村登紀子

座長 長村登紀子

1. 挨拶 班長 長村登紀子 (9：00-09：05)
2. 「班研究の概要と今後の方向性について」 (09：05-09：15)  
長村 登紀子 東大医科研病院 セルプロセッシング・輸血部
3. 「臍帯血と臍帯の採取について」 (9：15-9：30)  
角田 肇 NTT東日本関東病院・産婦人科
4. 「臍帯血由来制御性T細胞の誘導増幅とその応用」 (9：30-9：45)  
長村 登紀子 山本 由紀 東大医科研 セルプロセッシング・輸血部
5. 「臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究」 (9：45-10：00)  
東條 有伸、長村 登紀子  
東大医科研 先端医療センター分子療法分野・セルプロセッシング・輸血部
6. 「臍帯由来間葉系幹細胞（hCMSC）の骨系統疾患治療への応用可能性検討：hCMSCの骨分化能の解析」 (10：00-10：20)  
縣 秀樹 東大医科研 先端医療センター分子療法分野
7. 「先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療法の開発  
胎盤由来間葉系幹細胞を用いた治療法の検討」 (10：20-10：40)  
辻 浩一郎<sup>1</sup>、海老原 康博<sup>2</sup> <sup>1</sup>東大医科研・幹細胞治療研究センター・幹細胞  
プロセッシング分野 <sup>2</sup>東大医科研病院・小児細胞移植科
8. 「希少難治性疾患の治療を目指した臍帯血移植の生着に関する検討」 (10：40-10：45)  
幸道 秀樹 献血供給事業団 東京臍帯血バンク

(休憩) (10：45-10：55)

座長 辻 浩一郎

8. 「臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症の治療法の開発」 (10：55-11：10)  
森丘 千夏子、滝 敦子、本多 泉、小牧 基浩、森尾 友宏、森田 育男  
東京医科歯科大学 大学院発生発達病態学・ナノメディスン（DNP）・分子細胞機能学
9. 「臍帯血中に存在する神経堤由来細胞の解析と神経再生への可能性」 (11：10-11：20)  
松本太郎<sup>2</sup>、Zena Albakri<sup>2</sup>、石毛 美夏<sup>1</sup>、麦島 秀雄<sup>1</sup> 日本大学医学部機能形態学系  
細胞再生・移植医学分野<sup>1</sup> 日本大学医学部小児科学分野<sup>2</sup>

10. 「脳性小児麻痺に対する臍帯血輸注について」 (11:20-11:30)  
鍋谷 まこと 淀川キリスト教病院小児科 新宅 治夫 大阪市立大学医学部
11. 「幹細胞臨床応用に必要な非臨床試験及び規制対応」 (11:30-11:50)  
長村 文孝 東大医科研 先端医療研究センター先端医療開発推進分野
12. 「臍帯血と臍帯由来間葉系幹細胞バンキングと細胞治療の可能性について」  
長村 登紀子 東大医科研病院 セルプロセッシング・輸血部 (11:50-12:00)  
(休憩) (12:00-12:05)  
座長 東條 有伸・長村 登紀子
13. ディスカッション (12:05-12:30)





## 2012年分娩統計

小児科の方針で、次の条件を満たさない場合は、原則として母体搬送を行っている。

- ・ 妊娠36週以降
- ・ 2000g以上

以下の場合の分娩様式は、帝王切開を選択している。

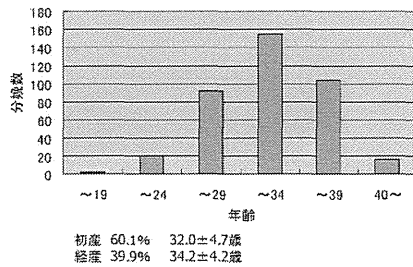
- ・ 既往帝王切開
- ・ 骨盤位

## 2012年分娩統計

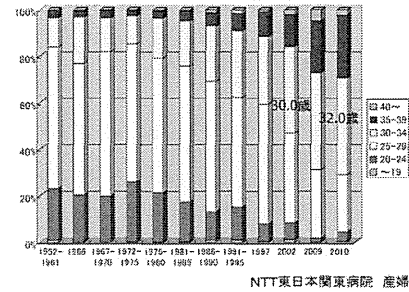
647分娩 647児

正常分娩	468	72.3%
帝王切開分娩	137	21.2% 予定78 緊急59
吸引分娩	38	5.9%
鉗子分娩	4	0.6%
合計	647	

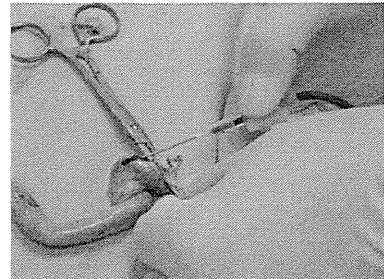
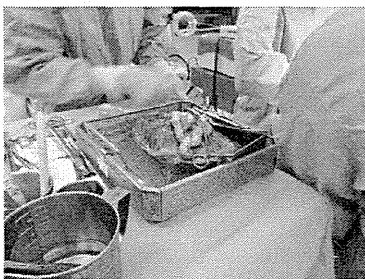
## 2012年初産母体年齢別分娩数

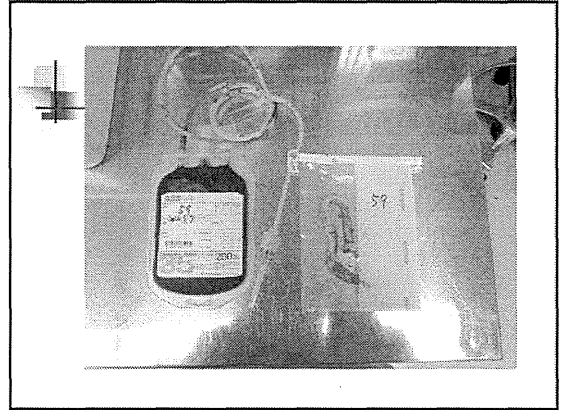
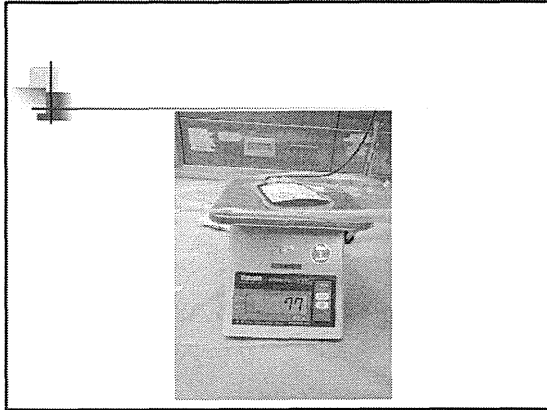


## 初産婦年齢の推移



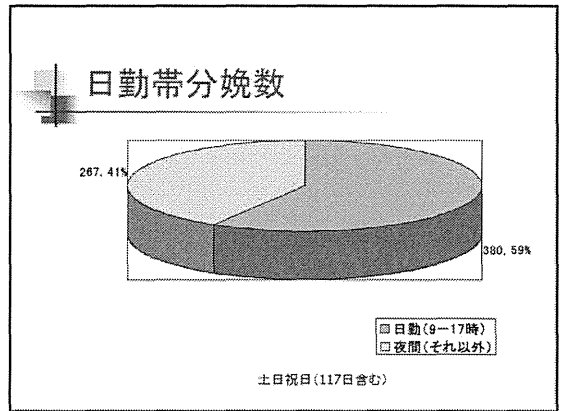
## 臍帯、臍帯血採取の実際





### 基礎研究から臍帯バンキングへ

- 基礎研究
  - 目標 週1例ペース
- 臍帯バンキング
  - 目標 500検体以上
    - 臍帯採取は可能？
    - 臍帯血採取は困難！



### 臍帯血の採取手順(東大医科研版)

- 採取前に
  - 担当医師は臍帯血の採取に関して当直医を含めて連絡をお願いします。
  - 目的:この手順書は血縁者間(Directed)の臍帯血を産科医の先生方に清潔で安全にかつなるべく十分な採取をしていただくことを目的としています。
  - 適応範囲:対象の臍帯血はあらかじめ 同意が得られた臍帯血であり かつ問診等で感染症がないか確認をしておいてください。また採取により危険が伴うと判断された場合には速やかに採取を中止してください。臍帯血採取に伴う問題点や医療事故等、万一発生しましたら速やかに当方にご連絡をお願いします。
  - 実施者:胎盤娩出前の採取は臍帯血採取について理解された担当医師を中心とした医師の方に実施をお願いします。胎盤娩出後の採取はこの限りではありません。担当医師は採取に関して当直医を含めて連絡していただきますようよろしくお願いいたします。
  - 実施時期:採取には胎盤娩出前と娩出後の方法があります。帝王切開の時には安全のため娩出後に採取する方法をお勧めします。
  - 場所:分娩室または手術室でお願います。

### 臍帯血の採取手順

- 1. 準備:**
  - ①白衣、マスク、手袋、ゴム製手袋を使用するとともに、臍帯血型別検査のための検体容器(10mL)の取扱いに注意してください(右側)。またエタノール、70%アルコールの消毒をお願いします。
  - ②臍帯血型別検査には、臍帯血型別検査キット(1人用)を使用し、検体容器下部に検体を入れます。以下同様の方法で採取して下さい。
- 2. 消毒:**
  - ①分娩室が消毒された後、臍帯血採取用キットを開封し、検体容器下部に検体を入れます。
  - ②臍帯血型別検査キットを開封し、検体容器下部に検体を入れます。
  - ③検体容器下部に検体を入れます。
- 3. 臍帯血採取:**
  - ①臍帯血採取キットを開封後、検体容器下部に検体を入れます。
  - ②検体容器下部に検体を入れます。
  - ③検体容器下部に検体を入れます。
  - ④検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑤検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑥検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑦検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑧検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑨検体容器下部に検体を入れます。
  - ⑩検体容器下部に検体を入れます。



## 「臍帯血由来制御性T細胞の誘導増幅とその応用」

長村 登紀子 山本 由紀

東京大学医科学研究所附属病院セルプロセッシング・輸血部

【目的】 制御性T細胞(Regulatory T cells; Treg)は CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>の表面形質を有する特殊なT細胞系列であり、その発生・分化は転写因子 Foxp3 によってプログラムされている。Tregの量的・質的制御は自己免疫疾患・アレルギーの治療だけでなく移植免疫における拒絶防止や免疫学的寛容、造血幹細胞移植においては難治性移植片対宿主病(GVHD)の治療として新たな細胞療法の開発につながることを期待され、Tregの種々の増幅方法が報告されてきた。しかし、従来の方法で誘導・増幅された inducible Treg(iTreg)は、Foxp3の発現の不安定性が課題であった。今回、我々は造血幹細胞移植後の重症GVHD治療に応用することを目指し、少量の臍帯血からより安定したFOXP3を発現したiTregを得るために、従来のiTregの培養系に Mammalian Target of Rapamycin(mTOR)阻害剤(Rapamycin; RAP および Everolimus; EVE)阻害剤を加え、その効果と機能検討を行ったので報告する。

【方法】臍帯血よりCD4<sup>+</sup>T細胞を純化後、固相化抗CD3および抗CD28抗体上でIL2/TGFβ存在下に mTOR 阻害剤を添加し、CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の誘導増幅効率を検討した。また *in vitro*での機能評価法として混合リンパ球反応を用いた。

【結果】 IL2/TGF-β/EVEにおいてiTregの誘導率が有意に高く、リンパ球混合試験におけるアロ抗原刺激によるT細胞の増殖を抑制した。さらに得られたiTreg集団は3rd partyとしてアロT細胞反応も抑制した。

【考察】 mTORは様々な細胞の増殖、代謝等に関与するセリン/スレオニン・キナーゼ複合体であり、高用量では抗がん剤として、低用量ではGVHD治療を含む免疫抑制剤として臨床で使用されている。mTOR阻害薬であるRAPはmTORC1シグナルのみを抑制し、EVEは、mTORC1/C2両方の形成を抑制するといわれている。mTORCの形成阻害剤における制御性T細胞誘導の直接的シグナル機序は明らかではないが、特にmTOR阻害剤EVEは安定したiTregの誘導増幅に有用と思われた。

今後、造血細胞移植における難治性重症GVHDの治療や臍帯由来MSCを用いた再生医療における免疫制御細胞として誘導・増幅した臍帯血由来iTregの応用の可能性について検討していきたい。

# 「臍帯由来間葉系幹細胞による免疫制御」

東條有伸<sup>1</sup>、何海萍<sup>1</sup>、川俣豊隆<sup>1</sup>、長村登紀子<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・分子療法分野

<sup>2</sup> 附属病院・セルプロセッシング・輸血部

**臍帯由来間葉系幹細胞による免疫制御**

東京大学医科学研究所  
先端医療研究センター 分子療法分野

東條有伸  
何海萍  
川俣豊隆

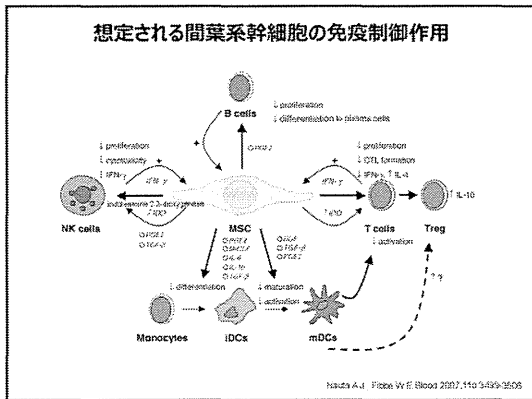
附属病院 セルプロセッシング・輸血部

長村登紀子

**ステロイド抵抗性重症aGVHDに対する間葉系幹細胞治療 (PII)**

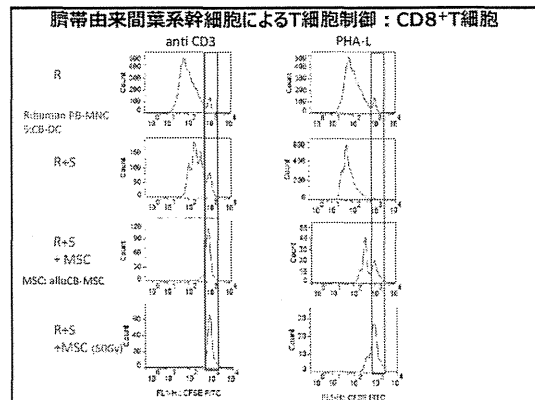
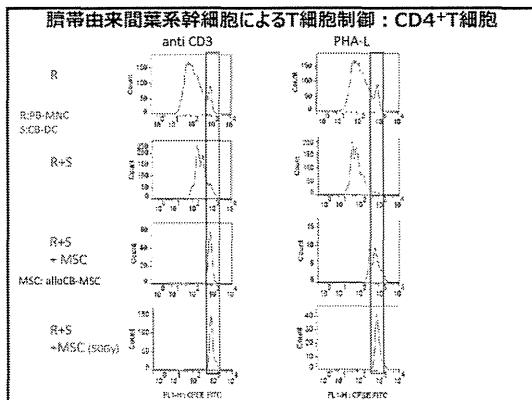
Le Blanc K et al. The Lancet 2008; 371:1579-86

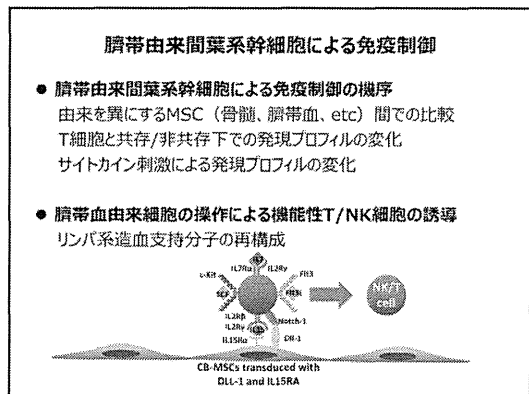
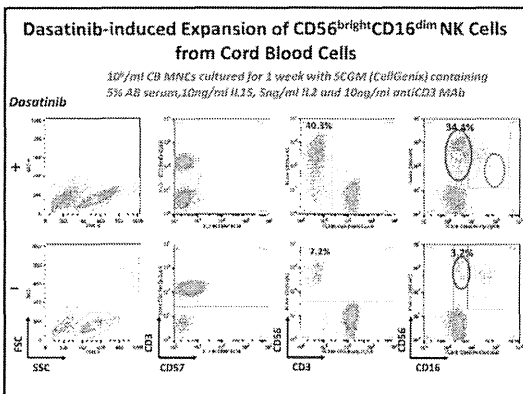
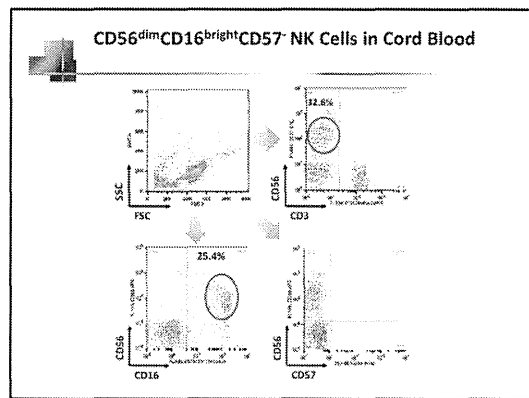
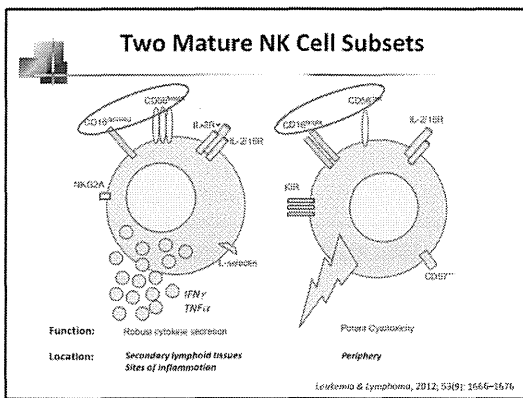
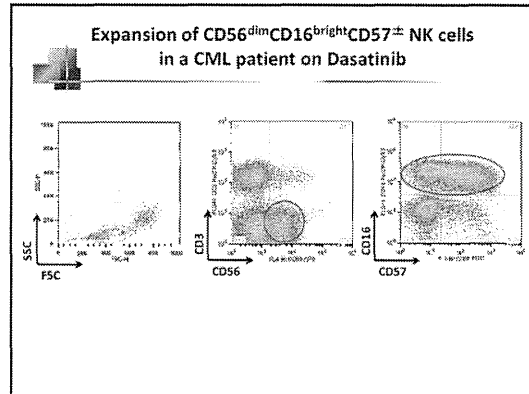
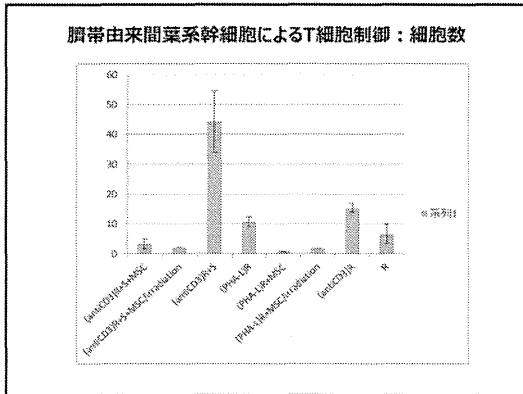
Donors and cells	GVHD response and outcome		
	Children (n=25)	Adults (n=30)	All patients (n=55)
Female donor to male recipient	10		
Male donor to female recipient	9		
HLA-identical sibling	19	Complete response	17
		Partial response	4
Unrelated A, B, DRβ1 identical	25	Stable disease	2
		Progressive disease	11
Mismatched donor	6	Overall response	21
		Survival*	13
Unrelated CB (matched, mismatched)	3,2	Limited chronic GVHD	2
		Extensive chronic GVHD	4



**由来を異にする間葉系幹細胞の表現型の差異**

	骨髄	臍帯	臍帯血
Lineage marker	—	—	—
CD13	+	+	+
CD29	+	+	+
CD34	—	—	—
CD44	+	+	+
CD45	—	—	—
CD49a	—	±	—
CD63	±	±	±
CD73	+	+	+
CD90	+	+	±
CD105	+	+	+
CD133	—	—	—
CD140b	±	±	—
CD166	±	±	±
CD271	—	—	—





「臍帯由来間葉系幹細胞 (hCMSC) の骨系統疾患治療への応用可能性検討  
: hCMSC の骨分化能の解析」

縣 秀樹

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野

骨系統疾患とは、骨、軟骨、靭帯などの骨格を形成する組織の成長や発達に異常をきたす疾患の総称であり、低身長、骨格の変形、運動機能異常、易骨折性を主症状とする希少疾患である。骨系統疾患に分類される疾患は現在 400 種類以上あるが、そのほとんどが遺伝子異常に起因する疾患であるため、本質的な治療は困難と考えられてきた。しかしながら、近年の細胞生物学、再生医学研究の進歩により、骨格形成に重要な細胞（間葉系幹細胞）の単離・培養が可能となったため、骨系統疾患治療の新たな切り札として他家間葉系幹細胞移植が注目を集めている。実際、代表的な骨系統疾患である骨形成不全症や低フォスファターゼ症に対して骨髄由来間葉系幹細胞移植が有効であることが報告されている。しかしながら、骨髄からの間葉系幹細胞採取は痛みや侵襲を伴うため、ドナーの安定した確保は困難であり、骨系統疾患の細胞治療を実現するには新たな細胞源の開拓が必要である。そこで、本研究では臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨系統疾患治療への応用可能性について検討を行うことにした。臍帯組織に間葉系幹細胞が存在することは以前から知られており、採取もドナーの肉体的負担なく行えることから、他家移植に使用する間葉系幹細胞の理想的な細胞源と考えられる。しかしながら、hCMSC の特性、特に骨分化能については不明な点が多く、骨系統疾患治療に用いるためのエビデンスは十分とは言えない。そのため、本年度は hCMSC の骨分化誘導刺激に対する反応性について *in vitro*, *in vivo* で検討を行ってきた。本発表では、これまでの経過から見た hCMSC の骨分化能について考察する。

「先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞  
を用いた治療法の開発  
胎盤由来間葉系幹細胞を用いた治療法の検討」

辻浩一郎<sup>1)</sup>、海老原康博<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター・幹細胞プロセッシング分野

<sup>2)</sup>東京大学医科学研究所・附属病院・小児細胞移植科

骨形成不全症、軟骨無形成症に対する間葉系幹細胞の新たな供給源として、臍帯を付着する胎盤を利用することを検討した。

【胎盤由来間葉系幹細胞の樹立】ドナー母親より同意を得て採取された胎盤中央部の一部(1 cm<sup>2</sup>)を切除し、細切後トリプシン処理して得られた単細胞を、15%ウシ胎仔血清を含む $\alpha$ MEMediumで、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。培養開始後3~4週間で付着細胞が50%コンフルエントに達したら、トリプシン処理した後、1/4倍の濃度で再播種する。再播種後2~3週間後に付着細胞はほぼ100%コンフルエントとなった。

【胎盤由来間葉系幹細胞の性状の検討】付着細胞は10~20継代可能であり、その間は確実に増加し続けた。また、Y染色体FISHにより、継代中の付着細胞が胎児由来であることが確認された。さらに、フローサイトメトリーにより、これらの付着細胞CD45<sup>low</sup> CD31- AC133- CD54+ CD29+ CD44+の間葉系幹細胞に一致する細胞表面形質を示した。また、これらの付着細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化可能であったことより、間葉系幹細胞であることが確認された。

【総括と来年度の予定】臍帯を付着する胎盤を用いることにより、容易に胎児由来の間葉系幹細胞を樹立することができた。樹立された間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できた。来年度は、これらの間葉系幹細胞の性状を、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討することにより、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療法の開発をめざす。



「希少難治性疾患の治療を目指した臍帯血移植の生着に関する検討」

幸道 秀樹

献血供給事業団 東京臍帯血バンク

**厚生労働科学研究班  
長村班一第2回班会議**  
  
 希少疾患への応用を目指した臍帯  
血移植の生着に関する研究  
 Jan 26, 2013  
 幸道秀樹、高橋敦子

**希少疾患への臍帯血の応用**

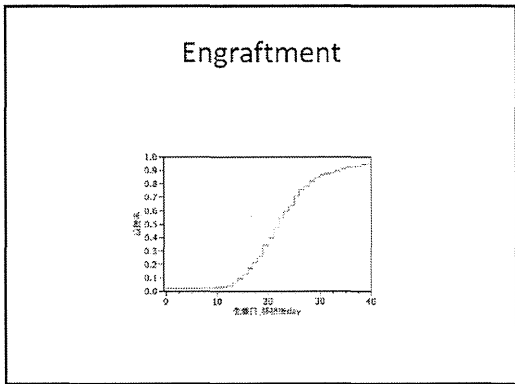
- 細胞移植 or 細胞治療？
- 臍帯血 or 臍帯血由来細胞
- ドナープールの大きさ
  - 通常移植: 患者数 <<< ドナー
  - 希少疾患: 患者数 < ドナー ??
- 生着が必要

**Introduction**

- The engraftment failure is the major obstacle in CBT
- Engraftment failure is reported to be 20.1% by J. Kurtzberg, Blood, 2008 and 24% by J. Kanda, Biol Blood Marrow Transplant, 2012.

**Methods**

- All CB were supplied by Tokyo CBB
- Total was 946 cases
- 205 were excluded because of data insufficiency and so on.
- Total 741 were analysed.



**Engraftment**

First CBT	90.6%
Later CBT	77.4%

厚生労働科学研究班  
長村班一第2回班会議

希少疾患への応用を目指した臍帯  
血移植の生着に関する研究

Jan 26, 2013

幸道秀樹、高橋敦子

希少疾患への臍帯血の応用

- 細胞移植 or 細胞治療？
- 臍帯血 or 臍帯血由来細胞
- ドナープールの大きさ
  - 通常移植: 患者数<<<ドナー
  - 希少疾患: 患者数<ドナー??
- 生着が必要

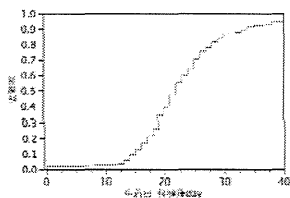
Introduction

- The engraftment failure is the major obstacle in CBT
- Engraftment failure is reported to be 20.1% by J. Kurtzberg, Blood, 2008 and 24% by J. Kanda, Biol Blood Marrow Transplant, 2012.

Methods

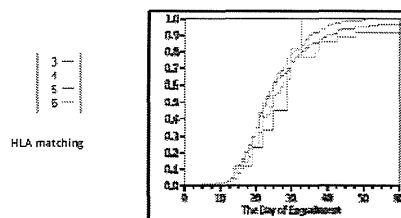
- All CB were supplied by Tokyo CBB
- Total was 946 cases
- 205 were excluded because of data insufficiency and so on.
- Total 741 were analysed.

Engraftment



First CBT	90.6%
Later CBT	77.4%

The engraftment rate and HLA



### The Character of transplanted CB in first Tx

Engraftment	TNC/kg (10 <sup>7</sup> )	CD34/kg (10 <sup>5</sup> )	GM/kg (10 <sup>4</sup> )	CD/TNC (%)
ALL	3.87	1.15	3.50	0.31
YES	3.99	1.23	4.37	0.33
NO	4.34	1.22	3.94	0.29

### 結論

- 血液学的悪性疾患における臍帯血移植では生着不全はあまり問題とならない

### 問題

- 希少疾患は悪性ではない。
- 生着率は血液学的悪性疾患に対する移植より悪いのではないかな？

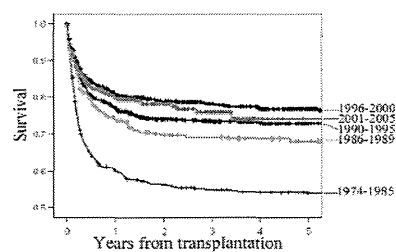


Figure 1. Survival after matched sibling transplantation in severe aplastic anemia, by year of transplantation, from the European Bone Marrow Transplant Registry (courtesy of Jakob Hejblum, on behalf of the Working Party Aplastic Anemia of the EBMT).

## 「臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症の治療法の開発」

森丘千夏子、本多泉、滝敦子、小牧基浩、森尾友宏、森田育男

東京医科歯科大学医歯学総合研究科

分子細胞機能学・発生発達病態学・生殖機能協関学

脳室周囲白質軟化症は早産児の予後を悪化させる重篤な合併症であり、その成因に子宮内感染症が関与している。その根本的な治療方法は確立されておらず、新規治療法が求められている。

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、臍帯由来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。

### 【子宮内感染モデルの作成と MSC の効果】

妊娠 16 日ラット羊水腔内 LPS0.2 $\mu$ g 投与により新生児白質損傷モデルを作成した。

妊娠 20 日の胎盤好中球浸潤、日齢 14 における新生仔の体重減少、脳室周囲の白質量低下により、子宮内感染の存在と新生仔への影響を確認した。

採取した UCMSC とその培養上清を新生仔ラットの日齢 1、7 に全身投与し、日齢 14 の新生仔の脳組織切片を作成した。組織免疫染色により脳室周囲白質量（MBP 陽性領域）を測定し、MSC とその培養上清の効果について検討したところ、MSC とその培養上清の投与した群では脳室周囲白質量が増加する傾向にあった。

実験的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 MSC 投与は治療効果を有すると考えられたが、より効果をだすための検討が必要と考えられ、MSC の性質について検討を加えた。

### 【UCMSC の性質と採取法の検討】

投与した UCMSC は、別の妊娠 20 日ラットから帝王切開にて explant 法で採取し培養した。MSC を FACS 解析したところ CD99、CD44 は陽性であり、CD31 は陰性であったが、CD44 の陽性率は 33%と低値であった。骨、軟骨、脂肪に分化誘導をかけたが、いずれにも分化を認めなかった。

よってより効率の良い MSC の採取方法を検討する必要があると考えられた。

ヒトの組織を使用し、コロニー形成細胞を選択的に採取し、FACS 解析、分化誘導実験を同様に行った。コロニー形成細胞では、形成前の細胞と比較し CD140b、CD146、CD166 が上昇しており、また骨、軟骨に分化が認められた。

今後これらの細胞を子宮内感染モデルに使用し、効果を再検討することを考慮している。