

臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究  
—個人情報保護のための3段階ID導入について—

NTT 東日本関東病院 産婦人科 角田 肇

従来、採取した臍帯血、及び臍帯の匿名化は採取病院において行なわれていたが、匿名化のステップが1段階であり、個人情報の秘匿化の脆弱性が懸念されていた。

今年度からは、採取病院において2次元コードを用いた1st IDを発行し、検体、同意書、分娩記録とともに、細胞保存処理施設に搬送する。その後に細胞保存処理施設（東大医科研）において2nd ID、3rd IDが発行される3段階IDが導入され、遺伝子解析担当者は採取施設での1st IDは分からず、提供者も3rd IDとの連結は不可能となった。

すなわち、個人情報管理責任機関は採取病院から東大医科研に移管されたことになる。採取病院での採取手順の変更点と実際の運用について報告する。

## 胎児付属物由来幹細胞による造血幹細胞維持能の比較解析

日本大学医学部小児科学分野 西川英里

日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎

【背景】臍帯血移植では生着不全の克服が重要な課題であり、間葉系幹細胞(MSC)と臍帯血の同時移植により生着不全を回避したとの報告がある。胎児付属物由来幹細胞は、採取に伴う侵襲がなく臍帯血と同一ドナーからの調整も可能であるため、生着不全予防を目的とした細胞治療の新たな細胞源として期待できる。【目的】ヒト臍帯、胎盤から単離、培養増殖させた細胞について、造血幹細胞ニッチマーカーの発現や、造血幹細胞の維持能を解析し、造血幹細胞ニッチの機能を有する細胞の同定を試みた。【方法】満期分娩臍帯と胎盤組織の凍結切片に対し、造血幹細胞ニッチマーカーSDF-1 に対する免疫染色を行い、この発現をもとに、造血幹細胞維持能に差があると予想される3種類の組織(胎盤羊膜上皮、胎盤羊膜間質、臍帯 Wharton' s-jelly) を選択し、それぞれから胎盤羊膜上皮幹細胞(AM-Epi)と胎盤羊膜間葉系幹細胞(AM-Mes)、Wharton' s-jelly 間葉系幹細胞(WJ-MSC)を調製した。それぞれの細胞に対し、①免疫細胞染色によるSDF-1、Nestin、SSEA3、SSEA4の発現解析②フローサイトメーターによる細胞表面マーカー解析③臍帯血CD34陽性細胞と共培養による造血幹細胞維持能およびCFU-GMコロニー形成能を比較検討した。【結果】免疫組織化学染色の結果、SDF-1は臍帯羊膜、臍帯WJ、胎盤羊膜、胎盤絨毛に陽性細胞が検出され、特にcytokeratin19陽性の臍帯・胎盤羊膜上皮で高発現を示した。AM-Epi、AM-Mes、WJ-MSCをそれぞれ調製し、細胞免疫染色を行った結果、単離直後の細胞はSDF-1、Nestin、SSEA4の発現が認められ、発現強度はAM-Epi > WJ-MSC >> AM-Mesの順であった。SDF-1、Nestin、SSEA4の発現は継代培養により減弱し、P3では細胞間に差異が見られなくなった。フローサイトメーターによる解析の結果、P2のAM-Epi、AM-Mes、WJ-MSCはいずれもCD90、CD105、CD73陽性、CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DR陰性を示し、MSCのminimal criteriaを満たすプロファイルを示した。臍帯血CD34陽性細胞との共培養において、臍帯血細胞の細胞数はAM-Epi 5.8倍、AM-Mes 7.6倍、WJ-MSC 6.5倍の増加を認めたのに対し、フィーダー細胞のない陰性コントロール(NC)では、細胞増加はほとんど起こらなかった。5日間共培養後の、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞の割合は、AM-Epi 37.8%、AM-Mes 38.8%、WJ-MSC 27.3%、Fibroblast 27.4%であった。CFU-GMコロニー数は、AM-Epi 255.5±21.6、AM-Mes 246.3±28.5、WJ-MSC 118.3±11.8、Fibroblast 147.8±19.0、NC 121.3±6.5であった。統計解析を行った結果、AM-EpiおよびAM-Mesは、WJ-MSC、fibroblast、NCと比べCFU-GM数が有意(p<0.05)に高値を示した。【結論】AM-Epi、AM-MesはWJ-MSCに比べ、高い造血幹細胞維持能を示した。AM-Epi、AM-Mesなどの胎児付属物由来幹細胞は、造血幹細胞移植時の生着率向上を目的とした細胞治療の細胞源として臨床応用が期待できると考えられた。

## **The immunosuppressive effect of Wharton jerry-derived mesenchymal stem cells *in vitro***

<sup>1</sup>Division of Molecular Therapy, Advanced Clinical Research Center, IMSUT. <sup>2</sup>Department of Cell Processing and Transfusion, IMSUT Hospital. <sup>3</sup>Department of Obstetrics, NTT Medical Center

He HP<sup>1</sup>, Nagamura-Inoue T<sup>2</sup>, Yamamoto Y<sup>2</sup>, Mori Y<sup>2</sup>, Tsunoda H<sup>3</sup>, Tojo A<sup>1,2</sup>

We are planning to use umbilical cord Wharton's jelly (WJ) as an alternative source for mesenchymal stem cells (MSCs). However, the mechanism by which WJ-MSCs exert their immunosuppressive effects is not completely understood. WJ-MSCs have spindle-shaped, plastic-adherent characteristics positive for CD105, CD73, CD90 but not for CD45, CD34, HLA-DR. WJ-MSCs efficiently inhibited proliferation of T cells from the same donor in mixed lymphocyte reaction (MLR) triggered by autologous or allogeneic dendritic cells (DCs). Moreover, 3<sup>rd</sup> party WJ-MSCs also strongly suppressed allogeneic T cells responses triggered by allogeneic DCs, indicating that immunosuppressive effect of WJ-MSCs is not restricted by MHC. WJ-MSCs also inhibited T cell proliferation upon PHA stimulation, whereas their inhibitory effects were significantly attenuated by the blockade of cell-to-cell contact using the Transwell membrane. The culture supernatant of WJ-MSCs alone revealed mild inhibitory effects on MLR. These immunosuppressive effects of WJ-MSCs were dramatically canceled by addition of an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor, 1-methyltryptophan (1-MT), in a dose-dependent manner, confirming the critical role of IDO reported previously. In addition, prolonged passage up to P10 did not affect immunosuppressive effects of WJ-MSCs. In summary, immunosuppressive effects of WJ-MSCs may be mediated through not only soluble factor(s) but also direct contact to effector T cells.

## 臍帯・胎盤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

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

森丘千夏子、本多泉、滝敦子、小牧基浩、森尾友宏、森田育男

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、実験的脳室周囲白質軟化症モデルを用いて、炎症に起因する白質損傷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、胎盤・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、児への細胞移植、妊娠母体への移植、培養上清を用いた再生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。

今回我々は、胎盤より採取した MSC を用い、その培養上清の抗炎症効果と組織修復効果について検討した。

### 【胎盤由来 MSC】

ヒトの胎盤の絨毛より MSC を酵素処理法で採取し培養した。FACS 解析において、CD11、CD73、CD105、CD140b、CD146、CD166 は陽性、CD34、CD45 は陰性であった。また、これらの細胞は骨芽細胞、軟骨細胞への分化が可能であった。

### 【白質損傷モデルの作成と MSCCM の効果】

日齢 4 のラットはヒトの妊娠 28 週前後に相当することを利用し、日齢 4 のラットに LPS15mg/kg 投与し新生児白質損傷モデルを作成した。日齢 6 の新生仔脳における炎症性サイトカインの上昇、日齢 12 における脳室周囲白質量 (MBP 陽性領域) 低下により、炎症による白質障害を確認した。

さらに、作製した MSC の培養上清 (MSCCM) を新生仔ラットの日齢 5、8、11 に腹腔内投与し、その効果を検討した。

日齢 6 の脳組織 RT-PCR において、治療群で TNF $\alpha$ 、IL6、IL1 $\beta$  が抑制される傾向にあり、日齢 12 の組織免疫染色において治療群で脳室周囲白質量が増加する傾向にあった。

MSC、MSCCM の抗炎症効果により組織修復を促せる可能性があるが、今後投与時期や投与量を変更し、さらに効果を高めるために検討を続ける予定である。さらに臍帯由来 MSC と比較検討していく予定である。

## 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

東京大学医科学研究所附属病院・小児細胞移植科

海老原 康博

〈はじめに〉間葉系幹細胞は、再生能のみならず炎症・組織障害部位への集積性、抗炎症・抗免疫抑制、組織修復能があると報告され、骨形成不全症や難病疾患への応用が検討されている。本研究では希少・難治性疾患であ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を目指している。今回の検討では、希少・難治性疾患に対して臨床応用するために必要な臍帯由来間葉系幹細胞の性状解析を行った。

〈方法〉Wharton's jelly から explant culture 法にて樹立された3クローンの臍帯由来間葉系幹細胞 (CD00013, CD00035, CD00060) を実験に用いた。10%ウシ胎仔血清を含む培養液で継代培養を行い、confluent になったところで継代を継続している。細胞数、フローサイトメトリーによる解析を行い、回収した細胞の軟骨細胞を含む間葉系細胞への分化能について検討した。

〈結果〉培養中の臍帯由来間葉系幹細胞は健常成人の骨髄間葉系幹細胞と同じような形態を示したが、細胞増殖はクローン間で差があった。フローサイトメトリー解析では健常成人の骨髄間葉系幹細胞と同様のパターンであった。次に誘導された間葉系幹細胞から軟骨細胞を含む種々の間葉系細胞へ分化誘導すると、軟骨細胞、骨芽細胞や脂肪細胞への分化が確認できた。

〈結語〉臍帯由来間葉系幹細胞は、健常成人の骨髄間葉系幹細胞と同等に軟骨細胞を含む種々の間葉系細胞への分化能を有していることが示された。次にマウスを用いた臍帯由来間葉系幹細胞の移植実験を行い、軟骨欠損などに対する臍帯由来間葉系幹細胞の効果を検討していきたい。

## 低フォスファターゼ症に対する臍帯由来間葉系幹細胞の臨床応用に向けた研究

島根大学医学部附属病院輸血部 竹谷健

先天性骨系統疾患は 450 種類以上も存在する、骨だけでなく免疫系や中枢神経系などにも障害を引き起こす希少疾患である。根治療法が存在する疾患はほとんどなく、疾患によっては酵素補充療法や造血幹細胞移植が行われているが、その効果は限定的である。そこで、我々は間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells ; MSC)移植に注目した。すでに MSC は骨芽細胞や軟骨細胞に分化することから、自己 MSC を用いた骨・軟骨再生治療に用いられている。しかし、先天性骨系統疾患の自己 MSC は骨形成能の障害が想定されているため骨再生治療として用いるのは困難と思われる。特に、アルカリフォスファターゼ(ALP)遺伝子変異により骨の石灰化障害をきたす低フォスファターゼ症の MSC は ALP が低く骨形成能も著明に低下し、自己(患者)MSC を治療に使用できない。この疾患の重症型は、生後まもなく発症し、骨の石灰化が徐々に消失して、呼吸障害により乳児期に致死的な経過をとる。この致死的な患者に対して、同種骨髄移植を行った後同じドナーの骨髄から *ex vivo* に増殖した MSC を経静脈的に複数回移植して、全身骨の石灰化の再生を試みている。骨の石灰化は、移植後 6 か月ごろから改善し、骨が全く消失した部位の石灰化も認められている。また、MSC により GVHD が劇的に改善した症例も経験した。さらに、この疾患に合併する難聴や精神発達障害などの中枢神経障害も改善を認めているが、MSC の中枢神経系への関与は明らかではない。キメリズム解析でドナー由来 MSC が骨髄および骨で生存しているため、この臨床的効果が MSC に起因すると思われる。なお、ドナー由来 MSC は有害事象なく投与できており腫瘍化も認めず、同種 MSC は乳児において安全に行える治療であることが明らかとなった。課題として、骨の石灰化の回復が健康な子どもと同程度までは至っていないこと、MSC の骨への遊走能が低いこと、生着しているドナー由来 MSC が少ないことなどが挙げられる。この課題を克服するため、臍帯由来 MSC が骨髄由来 MSC の問題点を克服できるか調べた。臍帯由来 MSC は、ALP の発現およびカルセインによる石灰化能は、骨髄由来 MSC と同程度であった。しかし、石灰化能は、骨髄由来 MSC と同様に個体差を認めた。今後、遊走能や増殖能などを検討する予定である。

## 臍帯バンキングに必要な非臨床試験及び規制対応の研究

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

長村文孝

新たな概念の医療開発においては、規制面での対応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、開発を困難にしている原因となっている。再生医療あるいは細胞療法開発においても同様である。本厚生労働科学研究は、臍帯と臍帯血の難病への応用が目的であるが、そのためには臍帯及び臍帯血のバンキングが必要となる。

今後の開発の方向として、特に臍帯のバンキングのためには細胞製剤の規格を決定し、調製に使用する培養液・薬剤等が生物由来原料基準に合致しているか、マスターファイル登録されているか、あるいは出荷のための条件（標的とする細胞の性状および割合、無菌のチェック等）を決定・確認する必要がある。バンキング自体は薬事法の医薬品（改正予定の薬事法から再生医療製品も薬事法下に組み込まれるが）ではなく、効能・効果として特定の疾患で有効性・安全性を確認して、その疾患・病態に対して承認が得られるスキームのため、薬事法下での治験の実施と、業としてどのように運営していくかが今後の検討材料となる。

再生医療も視野に入れているバンキングを実現するためには、治験を通じた有効性および安全性の確認が必要である。平成 23 年 8 月 31 日までは医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の確認申請が必要であったが、現在は PMDA の薬事戦略相談が確認申請に変わる確認の場となっている。そのため、9 月 13 日に PMDA の薬事戦略相談・事前面談を実施した。今回のプロジェクトの概要説明を基に、開発方針あるいは非臨床試験の実施方針等に関して質疑応答を行った。幾つか確認事項が指摘され、対面助言前にもう一度事前面談を行い、データや論点を整理することとなった。また、細胞調製は IMSUT-CRC 臨床細胞工学室を予定しているが、ここでの製造が適当であるか、設備・構造及び運用手順の両面から査察が必要であるとの指摘を受け、今年度中に査察を受け入れるべく準備をする予定である。

## ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse細胞：新たな概念 Regenerative homeostasis とStem cell failureの提唱

東北大学大学院医学系研究科・細胞組織学分野/人体構造学分野

出澤 真理

間葉系幹細胞は胚葉を超えて3胚葉性の多様な細胞に分化すること、また生体に投与すると一部の細胞は組織傷害部位に生着し、機能的な細胞へ分化して組織の修復に寄与することが報告されている。一般に組織幹細胞は神経幹細胞や造血幹細胞の例に見るように、胚葉の壁を越えた分化はしない。このような特異な性質を示す間葉系幹細胞の真の姿というのは長い間不明であったが、我々は最近、間葉系幹細胞の見せる多様な分化や生体内での組織修復作用を説明するMuse細胞を見出した。この細胞は成人ヒト間葉系組織である皮膚、骨髄、脂肪組織などに存在し、腫瘍性を示さない新たな多能性幹細胞である。Muse細胞は間葉系幹細胞と多能性幹細胞の両方の特性を備えた細胞であり、事実間葉系マーカー(CD105)と多能性マーカー(SSEA-3)のダブル陽性細胞として市販の間葉系培養細胞や骨髄液・生検皮膚、脂肪組織などの生体組織から直接分離可能である。自己複製能と一細胞から3胚葉性の細胞への分化能を有しており、生体に投与するとMuse細胞は損傷組織に遊走・生着し、組織に応じた分化をして修復に寄与することが劇症肝炎、脊髄損傷、皮膚損傷、筋変性等で確認されている。一方、Muse細胞を除いた間葉系幹細胞にはこのような作用が無いことから、間葉系幹細胞でこれまで見られて来た胚葉を超えた分化や生体内での再生効果はMuse細胞によって説明されると思われる。Muse細胞は骨髄内にあるとともに、様々な臓器の結合組織・間葉組織にも散在性に存在する。組織修復機能を有することから生体内のMuse細胞の担う機能として「生体内多能性幹細胞ネットワークによる組織恒常性維持」が想定される。すなわち骨髄から各臓器へのMuse細胞の供給によってRegenerative homeostasisが保たれ、組織の恒常的な維持が行われるということである。Muse細胞の発見は単に幹細胞治療、再生医療への応用にとどまらず、様々な病態機構の解明や疾患予後の予測、幹細胞の動態を制御する新たな創薬、新たな疾患概念の提示にも展開されていくと考えられる。



「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  
その応用に関するに関する研究」

平成25年度 第2回 研究報告会

日時：平成26年 2月1日（土）13:00-15:20

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 H25年度第二回班会議 プログラム

日時：平成26年2月1日（土）13：00-15：20

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

挨拶 研究代表者 長村登紀子 (13：00-13：05)

座長 長村登紀子

1. 「臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究」 (13：05-13：20)

東條有伸<sup>1</sup>、何海萍<sup>1</sup> 高橋敦子<sup>2</sup>、森 有加<sup>2</sup>、長村登紀子<sup>2</sup>

東大医科研<sup>1</sup> 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/細胞リソースセンター

2. 「胎児付属物由来幹細胞による造血幹細胞維持能および免疫制御能の比較解析」

(13:20-13:35)

下澤 克宣<sup>1,2</sup> 西川 英里<sup>1,2</sup> 谷川 俊太郎<sup>1,2</sup> 大熊 啓嗣<sup>1,2</sup> 風間 智彦<sup>1</sup>

松本 太郎<sup>1</sup>

<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>2</sup> 日本大学医学部 小児科学系 小児科学分野

3. 「臍帯・胎盤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」

(13:35-13:50)

本多 泉、森丘 千夏子、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 生殖機能協関学・発生発達病態学・分子細胞機能学

(休憩)

(13：50-14：00)

4. 「臍帯由来間葉系幹細胞(hUCMSC)の骨系統疾患治療への応用可能性検討：hUCMSCの骨分化能解析」 縣 秀樹 住田 吉慶 (14：00-14：15)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 顎・口腔再生外科学分野

5. 「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」 海老原 康博 東大医科研病院・小児細胞移植科

(14：15-14：30)

6. 「低フォスファターゼ症に対する臍帯由来間葉系幹細胞の臨床応用に向けた研究」

竹谷 健 島根大学医学部附属病院輸血部

(14：30-14：45)

7. 「臍帯バンキングに必要な非臨床試験および規制対応の研究」 (14:45-15:00)  
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
8. 「臍帯血・臍帯セミパブリックバンクと臨床研究に向けて」 (15:00-15:15)  
長村 登紀子 東大医科研 附属病院セルプロセッシング・輸血部

閉会

挨拶 研究代表者 長村登紀子

### 臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究

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  
附属病院セルプロセッシング・輸血部／細胞リソースセンター  
高橋敦子、森 有加、長村登紀子

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。2008 年には、EBMT による 第 II 相臨床試験での 55 例の成績を同じく『Lancet』に報告した。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。本邦でも既に、同種骨髄由来 MSC の第 I/II 相臨床試験の成績が報告されている。いっぽう、MSC の免疫制御機序については、IDO や NO、IL10、TGFβ 等の可溶性分子が主役として指摘されるものの細胞接着の関与を含め不明な点も少なくない。本班研究では、臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC) の免疫抑制作用について解析してきた。その結果、WJ-MSC の免疫抑制作用は、①CD4/8 細胞に対して HLA 非拘束性に発揮されること、②継代数の影響を受けないこと (10 代以内)、③IDO が主たる責任分子であること、④可溶性分子だけでなく細胞接着の関与もあること、が判明している。さらに、同種抗原で刺激したリンパ球 (MLR) と共培養した WJ-MSC の発現プロファイルの解析結果から、既報の通り各種ケモカインの関与が示唆されたが、NO の関与は否定的であった。また、IDO 誘導の主因は IFN $\gamma$  であることが明らかになった。最近、MSC は炎症環境中の IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  濃度が高いと抑制作用を示すが、低いと寧ろ促進的に働くことが指摘されており、MSC の臨床応用時の留意点と考えられる。いっぽう、MLR によって IDO 同様 WJ-MSC に誘導される Hba/β については IFN $\gamma$  の関与はなく、その誘導機序と意義の解明は今後の課題である。

## 胎児付属物由来幹細胞による造血幹細胞維持能と免疫制御能の比較解析

日本大学医学部 機能形態学系 細胞再生・移植医学分野\*1

日本大学医学部 小児科学系小児科学分野\*2

下澤克宜\*1,2、西川英里\*1,2、谷川俊太郎\*1,2、大熊啓嗣\*1,2、風間智彦\*1、松本太郎\*1

【目的】臍帯血移植において生着不全の克服が重要な課題である。近年、間葉系幹細胞(MSC)と臍帯血の共移植により生着不全やGVHDを回避したとの報告がある。本研究では、臍帯や羊膜より調製したMSCを用いてその形質解析および機能解析を行い、臍帯血移植後の生着不全や急性GVHDの予防に適した細胞治療用ドナー細胞のスクリーニングおよび至適治療法の確立を目指す。

【方法】在胎37週以上の健康な母親から同意を得て、予定帝王切開時に同一ドナーに由来する臍帯と胎盤を採取し、Wharton's jelly由来MSC(WJ-MSC)、羊膜間質由来幹細胞(AMC)、羊膜上皮由来幹細胞(AEC)を培養調製した。WJは臍帯から臍帯動静脈を機械的に除去した後に細断し、羊膜上皮は羊膜間質から用手的に剥離し分離した。WJ-MSCはExplant法で、AMCとAECは酵素処理法で調整した。比較対照としてヒト皮膚線維芽細胞(FB)を用いた。それぞれの細胞についてFACSによる細胞表面抗原解析を行い、CFU-F形成能を比較検討した。また造血ニッチマーカーSDF-1の免疫染色やヒト臍帯血CD34陽性細胞との共培養(5日間)を行い、造血幹細胞支持能を比較検討した。また、TNF $\alpha$ (10ng/ml, 3日間)やIFN $\gamma$ (150U/ml, 3日間)でそれぞれの細胞を刺激し、免疫原性(HLA-DR、CD40、CD80、CD86、CIITAなど)、免疫制御(IDO-1、PTGS2、HGF、TRAIL、TSG-6、PD-L1など)に関する因子の発現変化を遺伝子、蛋白レベルで解析した。またこれらの細胞をヒト末梢血単核球(PB-MNC)と共培養(4日間)し、リンパ球増殖抑制能をCFSEによるcell division assayを用いて評価した。

【結果】<CFU-F形成能>AMC>AEC>WJ-MSCの順で高かった。AMCはP1から多くのコロニーを形成するのに対し、AECはP3以降でコロニー数が漸増する傾向があった。WJ-MSCは継代数に関係なくコロニー形成能は低かった。

<造血幹細胞ニッチ>SDF-1免疫染色においてはAMCでは陰性、Cytokeratin19陽性を示すAECで強陽性、WJ-MSCで弱陽性であったが、継代培養に伴い減弱しP3で消失した。臍帯血CD34陽性細胞との共培養ではいずれの細胞もcontrolに比べてCD34陽性細胞を増加させ、造血前駆細胞(CD34+CD45-)と造血幹細胞(CD34+CD38-)を維持していた。共培養後の臍帯血CD34陽性細胞のCFU-GM形成能をみると、AECとAMCがcontrolとWJに比べて有意に高かった。

<免疫調節能>IFN $\gamma$ 刺激によるHLA-DRとそのinducerであるCIITAの発現誘導は、FBに比べAMCで有意に低かった。TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ 刺激によるCD40発現誘導は、AMCとFBで認められたがWJ-MSC、AECではごく軽微であった。WJ-MSC、AMC、AECはいずれもIFN $\gamma$ 刺激によりIDO-1、HGF、TRAILの発現が増加し、TNF $\alpha$ 刺激によりPTGS2の発現増加が認められた。リンパ球増殖抑制作用は、WJ>AEC>AMC>FBの順に強く、用量依存性を認め、特にIFN $\gamma$

刺激した WJ と AEC で顕著な抑制作用を示した。Transwell を介した共培養ではこの抑制作用は認めず、免疫抑制機構における cell-cell contact の重要性が示唆された。

【考察】検討したヒト臍帯・胎盤組織由来幹細胞のうち、自己複製能は AMC が、ニッチ機能は AMC と AEC が優れていた。免疫原性はいずれも FB に比べ低く、特に AMC は IFN $\gamma$  刺激でも HLA-DR が誘導されなかった。免疫制御能については、リンパ球増殖抑制能はいずれも FB より高く、特に WJ-MSc は他細胞に比べ高い傾向をみた。このように細胞間で特徴に差異を認めたが、中でも AEC は in vitro では効果的なニッチ機能と免疫制御能を合わせ持ち、移植関連合併症（生着不全や急性 GVHD）に対する有用な細胞治療ソースとなり得ると考えられた。

## 臍帯・胎盤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

東京医科歯科大学医歯学総合研究科

生殖機能協関学・発生発達病態学・分子細胞機能学

本多泉、森丘千夏子、滝敦子、小牧基浩、森尾友宏、森田育男

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。根本的な治療法は確立されておらず、新規治療法が求められている。我々は、実験的脳室周囲白質軟化症モデルを用い、胎盤・臍帯由来間葉系幹細胞による新たな治療法の開発を目的として本研究を継続している。

胎盤・臍帯由来間葉系幹細胞は、非侵襲的かつ大量に得られ、倫理的問題が少ないことから臨床応用への期待が高い間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞はその免疫原性の低さから他家移植も可能と考えられているが、新生児では出生時に臍帯を採取、培養することにより非侵襲的に自己間葉系幹細胞を得られるため、自家移植により免疫拒絶の問題も限りなく小さくできる可能性がある。

本研究の対象疾患である脳室周囲白質軟化症は出生前に子宮内炎症に曝露されていた早産児に多くみられる。子宮内炎症状態にあった児の臍帯・胎盤由来間葉系幹細胞は、炎症により変化している可能性がある。脳室周囲白質軟化症の治療として臍帯間葉系幹細胞移植を想定した場合、炎症に曝された自己細胞と曝されていない他家細胞のどちらが治療に適しているのか検討すべきと考えた。

今回、子宮内ラット感染モデルより採取した臍帯間葉系幹細胞と正常妊娠ラットより採取した臍帯間葉系幹細胞を表面マーカー、分化能の違いについて比較検討した。また、total RNAを抽出し、DNA arrayにて遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。

今後は、検体数を増やしての検討、ヒト臍帯由来幹細胞での検討、実際の治療効果の違いについての検討が必要と考えられる。

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

縣 秀樹、住田 吉慶

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 顎・口腔再生外科学  
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、近年の再生医学研究、幹細胞研究の発展により、骨格形成に重要な役割を果たす幹細胞(間葉系幹細胞：MSC) の採取・培養が可能になったため、骨系統疾患治療の新たな切り札として幹細胞移植(正常な遺伝子を有する MSC の移植) 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他家の骨髄由来間葉系幹細胞(hBMSC)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 MSC 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、骨系統疾患の幹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(hUCMSC)に着目した。臍帯は出産時にドナーの肉体的負担なく採取可能で、通常、そのほとんどが廃棄物として処理される組織のため、MSC の優れた細胞源と言える。しかし、hBMSC に比し hUCMSC の特性研究は極端に遅れており、特に骨分化能については不明な点が多い。そこで、本研究では骨系統疾患治療への応用を目指して hUCMSC の骨分化能解析を行ったため、その結果について報告する。



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

東京大学医科学研究所附属病院・小児細胞移植科

海老原康博

<はじめに>間葉系幹細胞は、再生能のみならず炎症・組織障害部位への集積性、抗炎症・抗免疫抑制、組織修復能があると報告され、骨形成不全症や難病疾患への応用が検討されている。本研究では希少・難治性疾患であ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を目指している。今回、希少・難治性疾患に対して臨床応用するために必要な臍帯由来間葉系幹細胞のマウスへの移植を行い、軟骨形成効果を検討している。

<方法>Wharton's jelly から explant culture 法にて樹立された3クローンの臍帯由来間葉系幹細胞 (CD00035) を用いて、継代培養を継続している。塩酸を関節内注射したマウスの関節腔に臍帯由来間葉系幹細胞を移植して軟骨形成を検討した。

<結果>塩酸を関節内注射したマウスの関節腔に臍帯から誘導された間葉系幹細胞を移植したところ、今回の検討では軟骨形成がほとんど認められなかった。

<結語>臍帯由来間葉系幹細胞の関節内投与実験をもう少し条件を整理して行う必要があると考えられた。

## 低フォスファターゼ症に対する臍帯由来間葉系幹細胞の臨床応用に向けた研究

島根大学医学部附属病院輸血部 竹谷健

低フォスファターゼ症は、ALP 遺伝子変異により骨の石灰化障害をきたす常染色体劣性遺伝形式を示す骨系統疾患である。酵素補充療法の治験が始まっているが、我々は骨再生に必須の間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells ; MSC)移植に注目した。しかし、この疾患の MSC は ALP が低く骨形成能も著明に低下し、自己 MSC を治療に使用できない。さらに、ラットの実験において同種 MSC だけでは拒絶されてしまう。したがって、骨髄移植を行った後、同じドナーの骨髄から *ex vivo* に増殖した MSC を経静脈的に複数回移植して、全身骨の石灰化の再生を試みる臨床研究を行っている。結果として、骨の石灰化は改善し、骨が消失した部位の石灰化も認められている。また、MSC により GVHD が劇的に改善した症例も経験した。キメリズム解析でドナー由来 MSC が骨髄および骨で生存しているため、この臨床的効果が MSC に起因すると思われる。なお、ドナー由来 MSC は有害事象なく投与できており腫瘍化も認めず、同種 MSC は乳児において安全に行える治療であることが明らかとなった。課題として、ドナーが ALP の発現が低い保因者であったこと、MSC の骨への遊走能が低いこと、生着しているドナー由来 MSC が少ないことなどから、健康な子どもと同じレベルまで石灰化が改善していない。この課題を克服するため、臍帯由来 MSC が骨髄由来 MSC の問題点を克服できるか調べた。臍帯由来 MSC の ALP 発現および ALP 活性は、陽性コントロールである ALP 強発現骨肉腫細胞株と同程度に ALP 発現および ALP 活性が認められた。骨芽細胞の ALP 発現および石灰化能について、基礎培地でも臍帯由来 MSC が骨芽細胞に分化して、石灰化能および ALP 活性を認めた。さらに、骨分化促進剤(RA, CyA, FK506, VD3, SB+LiCl, SB, BMP-2)、骨分化阻害剤(LiCl)で検討したところ、石灰化能は FK506, VD3, BMP-2 で認められ、ALP 活性化はすべての薬剤で認められた。しかし、MSC のロット間の差がかなり大きいことが明らかとなったため、臍帯由来 MSC の骨分化の個体差を決定する biomarker を同定する必要があると思われた。遊走能は、骨髄由来 MSC と同程度であった。ALP の発現、骨分化および遊走能に関して、臍帯由来 MSC が骨髄由来 MSC よりも優位ではないが、ALP が正常な臍帯血移植を行った後同じドナーの臍帯由来 MSC を経静脈的投与および骨髄内投与を行うことで臨床効果が高まることが予想されるため、同一ドナーの臍帯血および臍帯のバンク化が必要である。また、iPS 細胞を含めた遺伝子改変細胞治療の検討も行う必要がある。

## 臍帯血・臍帯セミパブリックバンクと臨床研究に向けて

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 長村登紀子

本研究では臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSC)の基礎的研究を行うとともに、臨床応用を目指し、その細胞製剤化と系統的資源化(バンキング)に必要な技術基盤を確立し、難治性疾患治療に応用することを目的とする。

我々は臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞の製剤化に当たり、臍帯血・臍帯採取、調製・培養・凍結保存の効率化、検査、情報の管理体制の確立ならびに各手順書の作成に取り組んだ。すなわち、臍帯血と臍帯のバンキングに向けた2次元コードラベルを用いた検体管理システムを導入し、PMDAとの事前相談等をもとに治験薬GMPレベルを目指して臍帯由来MSCsの分離培養・凍結方法の再検討と手順書の整備を行った。

培養に関して、我々は臍帯から Explant 法で MSCs を培養分離する上で、組織片が浮遊するのを防ぐため、浮遊防止のメッシュを企業と共同開発した。このメッシュにより、1 g 当たりの臍帯から得られる MSCs 数は 9-12 日間の培養にて、 $0.87 \pm 0.54 \times 10^6$  から  $3.1 \pm 1.4 \times 10^6$  (n=4) と有意に増加し、培養期間も既報 3 週間から約半分の日数で同等以上の細胞数を回収することが可能となった。この細胞をマスター細胞として凍結した。このマスター細胞をさらに増幅し、P3 細胞を Working cell として、1g の臍帯組織から  $1.8 \times 10^9$  個の MSCs 程度の細胞数が得られた。これは 60kg 成人に  $1 \times 10^6$ /kg の MSCs を輸注する場合、1g から約 30 回分の MSCs が得られることになる。臍帯は約 20 g 以上あるが、全臍帯から培養を始めるとコスト的にも非常に高く、効率が悪い。また骨形成能のロット格差等を考慮し、必要最小限の臍帯由来 MSCs を培養し、残りは臍帯組織ごと凍結する方法を検討した。その結果、新鮮な臍帯と同等またはそれ以上の細胞数が得られた。得られた細胞は、新鮮臍帯から得られた MSCs と同等の表面形質を示し、免疫抑制効果も同等に得られたことより、臨床的にも有用と思われた。現在、マイコプラズマ等を含めた感染症検査や残存試薬測定、予定培養液量およびそれに伴う経費の算定を行っている。

次年度以降の体制に関して、国産の細胞製剤として製剤化を目指すとともに、難病疾患に対する造血幹細胞移植後の GVHD、骨形成不全症に対する臍帯由来 MSC 療法の臨床試験に向けて準備を始める。前者は HLA 非拘束性であり、少数の臍帯由来 MSC のストックで実施可能と考えられるが、後者については MSC の長期作用を期待する場合には HLA のバラエティーが必要である。

## 国際会議と代表的文献等