

平成21年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591819

研究課題名 (和文) 「胎児に対する骨髄移植」に対する基盤的研究

研究課題名 (英文) In utero stem cell transplantation for fetal therapy

研究代表者

林 聡 (HAYASHI SATOSHI)

国立成育医療センター (研究所)・生殖医療研究部・共同研究員

研究者番号：60425717

研究成果の概要：マウスを用いた胎児への骨髄由来の幹細胞移植治療モデルを作成し、ドナー細胞の生着率を検討することにより、免疫寛容が成立するメカニズムの解明につながるデータを得た。また、ドナーリンパ球輸注によって移植細胞の生着率がほぼ 100%になることを示したことから、これまで顕著な効果がみられなかった移植治療の成果向上の可能性が示唆された。さらに、臨床応用への早期実現化に期待の待たれるヒト細胞のうち、非侵襲・低侵襲的に細胞の確保が可能である骨髄・月経血・臍帯血・子宮内膜・脂肪を間葉系幹細胞の供給源とし、異種動物成分を排除した間葉系幹細胞の培養法、維持法の標準化を行った。得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析 (Affimetrix 社 Gene Chip による解析) ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	700,000	0	700,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	780,000	4,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：生殖医学・周産期・胎児治療・造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性血液疾患は、生後の造血幹細胞移植による治療が行なわれているが、この造血幹細胞移植は移植前処置に伴う免疫抑制剤あるいは放射線照射による合併症や移植後の移植片対宿主病 (GVHD) などの副作用が問題とされ、安全性の高い治療法とは言い難く、

この副作用を最小限に抑えるためには HLA 適合ドナーを見つけることが必要とされる。しかし HLA 適合ドナーを用意することは困難であることが多く、依然、小児の造血幹細胞移植は克服されるべき問題が残されている。これに対して、胎児期には免疫が未熟であるため自己抗原以外に対する免疫学的ト

トランスを獲得することが可能であることが知られており、移植前治療を行わなくてもドナー細胞の生着と免疫学的トランスの獲得が可能であることから、胎児移植は従来の移植の問題点を克服することが可能である。

また、胎児期にも病状が進行して致死的状态に至ることもある先天性代謝異常症・骨形成不全症・ α サラセミアなどの疾患においては、胎児期からの治療が理想的であり、早急な治療法の開発が期待されている。

(2)子宮内造血幹細胞移植は重症免疫不全症に対して臨床応用されているが、その他の遺伝性疾患に対する明らかな効果は現在のところ否定的である。これは移植細胞の生着数が十分ではないことが原因であり、その生着率の向上が認められれば移植細胞による治療効果が期待できる。特に先天性代謝異常症においては、全身を巡る数多くのドナー由来の血液細胞から必要な酵素がわずかにでも分泌されることにより、治療に必要な十分な酵素が確保されると考えられる。

また、最近では造血幹細胞が造血系以外の種々の細胞（筋、骨、軟骨、脂肪など）にも分化しうることが数多く報告され、さまざまな組織や臓器に対して造血幹細胞を利用する細胞療法・再生医療の可能性が議論されるようになった。さらに造血幹細胞にとどまらず、筋や骨に分化する間葉系幹細胞の生着およびその分化・増殖によって筋ジストロフィーや骨形成不全症の治療につながり、間葉系幹細胞を用いた細胞治療の確立も求められている。

(3)細胞移植が具体的な治療法として確立されつつあるが、実験的な治療が日常的な治療法の選択肢となるためには、治療に用いる細胞に関して再現性を保証するための基準がぜひとも必要である。また、細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を実現化するために必要な技術として、細胞の分離培養技術の確立および細胞品質管理の標準化技術がある。前者は特に造血幹細胞の研究で相当の実績を得てきている。このような状況の中で、臨床研究から医薬品へステップアップを図るためには後者のヒト細胞のバリデーション方法を確立することが重要となる。

2. 研究の目的

(1)骨髄移植は通常、生後の造血幹細胞移植による治療のことを意味するが、この造血幹細胞移植は移植前処置に伴う免疫抑制剤ある

いは放射線照射による合併症や移植後の移植片対宿主病（GVHD）などの副作用が問題とされ、この副作用を最小限に抑えるためには HLA 適合ドナーを見つけることが必要とされる。しかし HLA 適合ドナーを用意することは困難であることが多く、再移植が必要となった場合のドナーの精神的・身体的な負担はあまりにも大きい。これに対して、胎児期には免疫が未熟であるため移植前治療を行わなくてもドナー細胞の生着と免疫学的トランスの獲得が可能であり、移植される細胞数も少数ですむことから、胎児期の移植は従来の移植の問題点を克服することが可能である。

この細胞移植を胎児期に病状が進行して致死的状态にいたる先天性代謝異常症・骨形成不全症・ α サラセミアなどの疾患において応用し、胎児期からの治療を開発することを目的とする。

(2)現在、子宮内造血幹細胞移植が重症免疫不全症に対して臨床応用されているが、その他の遺伝性疾患に対する明らかな効果は現在のところ否定的である。これは移植細胞の生着数が十分ではないことが原因であり、その生着率の向上が認められれば移植細胞による治療効果が期待できる。また、免疫トランスが誘導されるメカニズムも不明であり、その解明は移植細胞の生着率の向上に有用となる。

免疫トランスのメカニズムの解明および、効果が十分得られるレベルのキメリズムの獲得が可能な治療法の開発を目指す。

(3)異種動物成分を排除したヒト間葉系幹細胞培養法・維持法の標準化

間葉系幹細胞はさまざまな細胞に分化する能力から細胞療法・再生医療にとって欠かせない存在であるが、その分化能以外に造血幹細胞の自己複製および分化調節作用があることが知られ、また詳細な機序は解明されていないにもかかわらず免疫調整作用のために GVHD 予防・治療、クローン病や多発性硬化症などの疾患に対する臨床試験が現在行われている。そのほか骨形成不全症や心筋梗塞の治療効果についての報告もあり、今後は細胞治療においてますます重要な位置を占めると考えられている。

実際の臨床応用に際して、狂牛病やプリオン病などの疾患リスクを回避するため、異種動物成分を排除した供給が必要である。そのバリデーションのためには培養法・維持法を標準化することが不可欠であり、安定供給のためにも比較的侵襲なく採取可能である臍

帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などを供給源にして間葉系幹細胞を樹立する。

(4)ヒト間葉系幹細胞の規格化

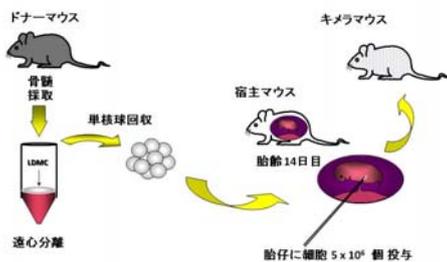
細胞移植が具体的な治療法として確立されつつあるが、実験的な治療が日常的な治療法の選択肢となるためには、治療に用いる細胞に関して再現性を保証するための基準がぜひとも必要である。そのため、Affimetrix社 Gene Chip による網羅的発現遺伝子解析ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析によって、種々のヒト幹細胞集団を分別し、「再生医療」に関する細胞のバリデーションを確立する。

3. 研究の方法

(1)胎児移植治療モデルの作成

マウスを用いた胎児幹細胞移植治療モデルにより、キメラマウスを作成した。このモデルは既に諸研究報告により確立されたものである。すなわち、ドナーマウス(C57BL/6)の骨髄細胞を採取し、Ficoll を用いた遠心分離により造血幹細胞を含む単核球層を回収して、 5×10^6 個/胎児の細胞を胎令 14 日目のマウス胎仔(Balb/c)に移植し、生後 4 週目に末梢血中のドナー由来の血液細胞の生着率をフローサイトメトリーで解析した。

キメラマウス作成方法



(2)治療効果が十分得られるレベルのキメリズムの獲得が可能な治療法の開発

マウス胎児への細胞移植によってキメラマウスを作成した後、生後 4 週目のドナーマウス(B6-LY5.2Cr)のリンパ球を静脈投与(ドナーリンパ球輸注: DLI)した。その後の移植細胞の生着率をフローサイトメトリーで分析して、さらに、ドナー細胞が生着した疾患キメラマウスを用いて、出現する症状の改善の有無と程度について検討を行った。

(3)免疫トレランスのメカニズムの解明

DLI 後 24 週間のドナーCD4 陽性細胞とドナーCD8 陽性細胞の変動を調べ、さらに DLI

後 4 週目・8 週目・48 週目にドナー由来の T 細胞のうち $CD4^+CD25^+CD45RB^{low+}$ の発現をフローサイトメトリーで分析した。

(4)異種動物成分を排除したヒト間葉系幹細胞培養法・維持法の標準化

臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織を間葉系幹細胞の供給源として、異種動物成分を排除した培地で樹立・維持を行った。

(5)ヒト間葉系幹細胞の規格化

得られたヒト幹細胞に対して、網羅的発現遺伝子解析(Affimetrix社 Gene Chipによる解析)ならびにモノクローナル抗体を用いた既知の分子発現解析を行った。このプロファイリングにより明らかになった結果を用いて、各々の細胞で異なる系列に分化することを確認し、治療用の細胞の規格化および選別を試みた。

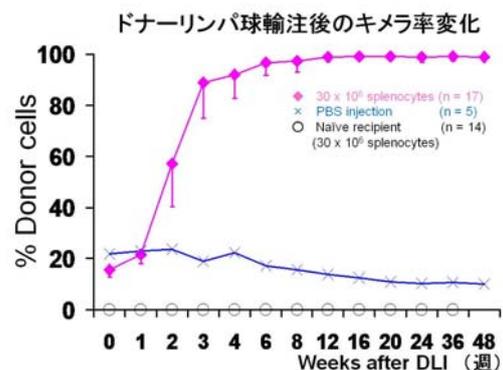
4. 研究成果

(1)胎児移植治療モデルの作成

胎児幹細胞移植治療モデルにより、キメラマウスを作成した。生着状況は移植細胞数に依存するが数%~20%であった。

(2)治療効果が十分得られるレベルのキメリズムの獲得が可能な治療法の開発

ドナーリンパ球輸注後 2~4 週目の間に急激にドナー由来のリンパ球が増加し、12 週目くらいまでにほぼ 100%に到達した。プロトコルを用いた細胞移植によりドナーキメリズムの増幅が可能であることを証明した。



(3)免疫トレランスのメカニズムの解明

DLI 後の T 細胞分画を経時的に追ったところ CD4 分画には大きな増減はなかったが、ドナー由来の CD8 分画は DLI 2 週後では増加して、4 週目ころには正常化していた。また、DLI 後 4 週目では $CD4^+CD25^+CD45RB^{low+}$ は著

明に増加していたが、8週目には減少傾向となり48週目においては正常化していた。移植後1~2週後は拒絶反応や急性のGVHDが発症する時期であり、上記の結果からCD8陽性細胞が生着率を左右する細胞であることが確認された。さらに、CD4CD25陽性細胞がGVHDを抑制する機能を持つことを確認し、これにより移植治療後の副作用軽減につながる実験系開発の可能性が示唆された。

(4)異種動物成分を排除したヒト間葉系幹細胞培養法・維持法の標準化

異種動物成分を排除した完全ヒト型培地を用いて、臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織から間葉系幹細胞を樹立した。

(5)ヒト間葉系幹細胞の規格化

ヒト間葉系幹細胞を培養する過程で得られる種々の幹細胞に関して、Affimetrix社 Gene Chipによる網羅的遺伝子発現解析やフローサイトメトリーによる細胞表面解析を行い、規格設定を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 林聡. 胎児に対する細胞治療. 医学のあゆみ, 229:881-886, 2009.
- ② Nagao Y, Abe T, Hasegawa H, Tanaka Y, Sasaki K, Kitano Y, Hayashi S, Hanazono Y. Improved efficacy and safety of in utero cell transplantation in sheep using an ultrasound-guided method. Cloning Stem Cells. 11:281-285, 2009.
- ③ Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, Ikeda T, Masuda S, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y. Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. Stem Cells Dev. 17:367-81, 2008.
- ④ Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting. Stem Cells. 24:1450-1457, 2006.
- ⑤ Ashizuka S, Peranteau WH, Hayashi S, Flake AW. Busulfan-conditioned bone marrow transplantation results in high-level allogeneic chimerism in mice made tolerant by in utero hematopoietic cell transplantation.

Exp Hematol. 34:359-368, 2006.

[学会発表] (計2件)

- ① 井原規公, 林聡, 左合治彦, 北川道弘, 名取道也: 子宮内造血幹細胞移植により作成した100%ドナーキメラマウスにおけるGVHD抑制に関するT細胞の役割. 第59回日本産科婦人科学会, 4月14-17日, 2007, 京都
- ② 井原規公, 林聡, 左合治彦, 北川道弘, 名取道也: 子宮内幹細胞移植治療における生着率向上の試み. 第58回日本産科婦人科学会雑誌, 4月22-25日, 2006, 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 聡 (HAYASHI SATOSHI)

国立成育医療センター (研究所)・生殖医療研究部・共同研究員
研究者番号: 60425717

(2)研究分担者

梅澤明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

国立成育医療センター (研究所)・生殖医療研究部・部長
研究者番号: 70213486

秦 順一 (HATA JUNICHI)

国立成育医療センター・名誉総長
研究者番号: 90051614

(3)研究協力者

井原 規公 (IHARA NORIMASA)

国立成育医療センター (研究所)・生殖医療研究部・共同研究員
研究者番号: 50425716