

平成22年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790765

研究課題名 (和文) "fetus as a patient" - 胎児に対する骨髄移植の治療戦略 -

研究課題名 (英文) Stem cell transplantation for fetal therapy

研究代表者

井原 規公 (IHARA NORIMASA)

国立成育医療センター (研究所)・生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：50425716

研究成果の概要 (和文)：

GFP 発現 c57BL/6 マウスの骨髄から採取した造血幹細胞を、BALB/c マウスの胎齢 14 日目の胎仔卵黄囊静脈内に、 $20 \times 10^6$  細胞/胎児に調製して投与した。生後 4 週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、フローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行った結果、20%に至るドナー細胞の生着が確認された。1～10%程度の生着率で先天性代謝異常症の治療となることから、胎児期に進行する脳神経症状や骨形成異常などの症状に対する有効な治療法となる可能性が示唆された。さらに、臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織から造血幹細胞以外の間葉系幹細胞を誘導し、その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみ、あるいは無血清培地を用いた培養法を確立した。また、得られたヒト幹細胞に対して網羅的遺伝子発現解析、ならびに SSEA 分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1 等の間葉系幹細胞候補を用いて分子発現解析を行い、規格設定を行った。

研究成果の概要 (英文)：

We performed allogeneic in utero hematopoietic cell transplantation (IUHCT) at E14 from MHC-H2Kb+GFP+ C57BL/6TgN(act-EGFP) mouse donors into MHC-H2Kd+ BALB/c recipient fetuses. Donor mononuclear cells were injected intravenously into each fetus. At 4 weeks of age, peripheral blood hematopoietic chimerism was determined by flow cytometry, and we achieved about 20% of donor chimerism. In hereditary disorders, donor cells can supply the missing enzyme continuously and restoration of enzyme levels to 1～10%. This indicates that IUHCT would be effective therapy for diseases especially in which brain damage and bone aplasia progress. Furthermore, we induced mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, placenta, endothelial cells of uterus, menstrual blood, adipose tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009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：内科系臨床医学 ・ 胎児・新生児医学

キーワード：幹細胞移植・免疫学的寛容・キメリズム・胎児治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児期は免疫系の発達が未熟であり、外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、また免疫系発達の過程において、胎児がその抗原にさらされると免疫学的寛容（免疫トレランス）が獲得される。これは、自然発生した多胎の動物において証明されており、また動物モデルにおいても胎児に移植された細胞に対する免疫トレランスが獲得されることが証明されている。これらから、胎児期に放射線、化学療法などの前処置を行わずに HLA が適合していないドナー細胞を移植しても免疫学的寛容が獲得されることが理論上可能であり、従来の骨髄移植に伴う危険性を少なくすることが可能であるだけでなく、HLA 適合に関わらず多くのドナー細胞が移植に利用することが可能となることが期待される。

(2) 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、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・ $\alpha$ 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。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、治療に必要な十分量の酵素が確保されると考えられる。

(3) 近年、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。これ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パリテ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) 胎児期の移植免疫学および発生・分化の基礎的研究

胎児期では外界からの抗原に対して拒絶反応が起こらず、免疫トレランスが獲得される。これまでの研究ではドナー細胞のキメリズムの成立とドナー細胞特異的な免疫トレランスの獲得については示されたが、その機序についての基礎的な研究は十分とはいえない。移植治療に結びつく免疫トレランス獲得のメカニズムの解明を目指す。

### (2) 胎児期の移植治療の開発と再生医療への応用

欧米では、遺伝性血液疾患と診断された罹患胎児に対して造血幹細胞の移植が行われ、1995年に初めてX連鎖SCIDにおいて行われた移植では有効な成績が得られている（*N Engl J Med* 335:1806-10, 1996）。ところが、それ以外の疾患に関しては、動物モデルにおいても有効な治療結果を得るのに十分な高いレベルのキメリズムの維持は困難な結果であり、臨床に応用できる段階ではなかった。

最近では、骨髄や脂肪組織中に筋、神経、骨、軟骨、脂肪などに分化する間葉系幹細胞が存在することが知られ、これらの細胞治療が注目されている。これらの細胞を胎児期の移植治療に応用することが可能であれば、胎児治療は遺伝性血液疾患だけでなく、先天性代謝性疾患、骨・軟骨系疾患、筋・神経疾患に対しても治療が可能な新しい治療法として期待される。日本ではこの分野に関する研究はほとんどなく、また外国における研究では

マウス、ラット、ヒツジ、サルなどを用いた研究が行われているが報告された論文は少数である。

今後はトランス獲得のメカニズムの基礎的研究とこれらの基礎研究をもとにして、治療効果が期待される高いレベルのキメリズムの獲得が可能な新しい胎児移植法の開発が課題とされる。本研究では、これまで課題とされた新しい胎児移植治療法の確立に取り組むことが特徴とされ、さらにこの方法による治療効果に関する検討を疾患マウスで行う。さらに、本研究では間葉系幹細胞を用いた胎児移植治療への応用についても行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫寛容の獲得メカニズムの解明

GFP発現c57BL/6マウス由来の細胞を胎齢14日目のBALB/cマウス胎児の卵黄嚢静脈内に、 $20 \times 10^6$ 細胞/胎児に調製して投与後、移植細胞の胎児への生着率を検討する。胎齢20日に分娩となった新生児マウスを飼育して、生後4週間目となる時期にマウス末梢血を採取し、単核細胞を抽出したのちドナー特異的な抗体を結合させ、フローサイトメトリーを用いてドナー細胞の生着率について分析を行う。

さらに、キメラマウスに対してドナーリンパ球輸注を行い、その後4週目・8週目・48週目にドナー由来のCD4およびCD8の発現をフローサイトメトリーで分析する。また、回収したCD4陽性細胞から分泌されたIL-2・IL-10・INF- $\gamma$ に関してELISA法で分析する。

(2) 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（完全ヒト型培養システムの開発）

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誘導し、その際、ヒト血清ならびにヒト液性因子のみ、あるいは無血清培地を用いた培養法を試みる。

#### (3) 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 GeneChip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う。使用するモノクローナル抗体は、ヒトES細胞のマーカーとして知られているSSEA分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1等の間葉系幹細胞候補マーカーも含んでいる。

(4) 筋ジストロフィーのモデルマウスに対する治療実験

骨格筋に分化する幹細胞（子宮内膜由来前

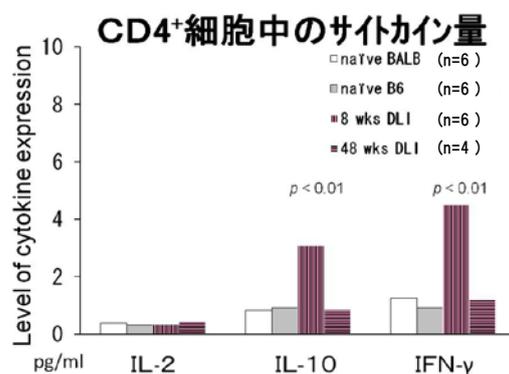
駆細胞、臍帯血由来間葉系幹細胞）を筋ジストロフィーのモデルマウスへ子宮内移植することによってキメラマウスを作成し、骨格筋の再生および症状の改善の有無と程度について、免疫染色もしくはGFPの発現の有無による検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 免疫寛容の獲得メカニズムの解明

卵黄嚢静脈投与による子宮内胎児移植によって、ドナー細胞の生着率が20%前後になるキメラマウスを作成することが可能になった。

さらに、リンパ球輸注後8週目のキメラマウスにおいて、CD4陽性細胞から分泌されたIL-10・INF- $\gamma$ が有意に増加しており、ドナー細胞の生着に関与していることが示唆された。



(2) 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（完全ヒト型培養システムの開発）

臍帯血・子宮内膜・月経血・胎盤・脂肪などのヒト組織から、無血清培地を用いて異種動物成分を排除し、間葉系幹細胞を誘導する培養法を確立した。

#### (3) 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Affimetrix社 GeneChipによる網羅的遺伝子発現解析、ならびにSSEA分子群、TRA1、Oct-3/4、STRO-1等の間葉系幹細胞候補であるモノクローナル抗体を用いて分子発現解析を行い、規格設定を行った。

(4) 筋ジストロフィーのモデルマウスに対する治療実験

骨格筋に分化する間葉系細胞を、筋ジストロフィーのモデルマウスの大腿筋へ投与したところ、筋線維に分化したことが既に報告されている。

また、同様の細胞を子宮内移植することによってキメラマウスを作成し、骨格筋の再生および症状の改善の有無と程度について、研

究を継続している。免疫染色ではジストロフィン蛋白の発現が確認されている。

(3)連携研究者  
なし

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(会議録)

- ① 井原規公、林聡、高橋宏典、左合治彦、北川道弘、名取道也、子宮内造血幹細胞移植後のドナーリンパ球輸注で 100%キメラとなるメカニズムの検討、日本産科婦人科学会、2009
- ② 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、日本産科婦人科学会、2007

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井原 規公 (IHARA NORIMASA)

国立成育医療センター (研究所)

研究者番号 : 5 0 4 2 5 7 1 6

##### (2) 研究分担者

なし