

2. 新技術・新産業の創出に関する報告

サブテーマ名：CPC（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究

小テーマ名：増幅ヒト造血幹細胞評価系の確立及び応用

テマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、中畑 龍俊

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、平家 俊男

● 研究の概要

骨髓、末梢血、臍帯血から採取された造血幹細胞の移植は、種々の悪性腫瘍、血液免疫疾患、遺伝性疾患の根本的治療法として確立されているが、その適応拡大に伴い、ドナー不足が深刻な問題となっている。我々は、新規のサイトカインを含む様々なサイトカインの組み合わせを用いて、ヒト造血幹細胞の *ex vivo* expansion を試みている。中でも、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせでヒト未熟造血細胞の expansion を達成した。体外で増幅させたヒト造血幹細胞の安全性および機能評価としては、増幅した細胞の表面抗原を解析する方法、半固形培地を用いて血液コロニーを観察し、前駆細胞の半定量を行う方法、骨髓ストローマ細胞との共培養にて長期に維持できるコロニーを測定する LTC-IC 法などの *in vitro* 試験が行われている。しかし、造血幹細胞は自己複製能と分化能を持ち合わせた細胞であり、これらの機能解析を行う最も適した方法は、現在のところ免疫不全マウスに移植した系で造血再構築能を測定する方法である。

本研究では、*ex vivo* 増幅させた臍帯血造血幹細胞を免疫不全マウスに移植した系で、安全性および効能の評価を行う。また、従来行われてきた造血幹細胞の評価は、重症複合免疫不全マウス (SCID マウス) に糖尿病自然発症マウス (NOD マウス) をかけ合わせた NOD/SCID マウスにて行われてきたが、ヒト細胞の生着は確認できるものの全ての血液細胞系統への分化の方向を見るには適していない問題点があった。特にヒトの T 細胞はこのマウスでは再構築されず、細胞性免疫能の再構築を評価は不可能である。最近、NOD/SCID マウスに IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 など免疫系細胞に発現するサイトカインレセプターの共通鎖である common γ 鎖をノックアウトしたマウスを交配した NOD/SCID/ γ^{null} マウスが開発された。このマウスは NK 細胞活性も完全に消失しており、より少量の造血幹細胞からのヒト血球を生着させ、さらに従来の免疫不全マウスでは観察することができなかった T 細胞系の再構築も観察できるようになってきた。

我々はこのマウスを用いて臍帯血 CD34 陽性細胞を移植し、血系細胞の再構築能を調べるとともに、ヒト免疫能の再構築能の評価を行うことを目標としている。

臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ γ^{null} に移植し、末梢血、骨髓、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒト T 細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。無血清培地で増幅した造血幹細胞にも、NOD/SCID/ γ^{null} の骨髓を再構築する能力のあることが確認された。また、様々な移植条件、障害活性のもと、近年注目されている造血組織を超えて分化する可塑性に関する検討を行った。

1. フェーズ I

(1) 研究の目標

臍帯血中に含まれる CD34 陽性細胞を SCF、TPO、Flt3/Flk2 リガンド、FP6 を組み合わせたサイトカインで増幅し、NOD/SCID マウスに移植し、ヒト血液細胞が再構築されるかどうか検討する。また輸注した細胞が生体に及ぼす炎症、腫瘍化などの影響を病理学的検査により、安全性を評価するとともに、ヒト血液細胞の体内分布や経時的变化を観察し、長期ヒト細胞再構築能を評価する。

(2) 実施内容

1) NOD/SCID マウスによる SRC (SCID-Repopulating Cells) 評価

ヒト造血細胞が生着することができる重症免疫不全モデルの NOD/SCID マウスに増幅細胞または未処理 CD34 陽性細胞 (増幅処理していないヒト臍帯血 CD34 陽性細胞) を移植し、マウスの骨髄に長期生着しているヒト白血球 (SRC) の割合、およびそのヒト白血球が発現している分化マーカーを解析することにより、移植した細胞の長期造血再構築能および多分化能を評価した。

雄性 NOD/SCID マウス (10 週齢) に、X線照射装置 (MBR1520R、日立メディコ社製) にて 200cGy の放射線を照射し、その後抗アシアロ GM1 抗体を 1 匹あたり 20 μ L 相当を静脈内投与し、引き続きマウス 1 匹あたり以下に示す細胞を静脈内投与した。

A 群: 40,000 個の未処理 CD34 陽性細胞

B 群: 40,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞

C 群: 20,000 個の未処理 CD34 陽性細胞と 20,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞

移植約 4 箇月後に、マウス大腿骨より骨髄細胞を採取し、ヒト白血球 (CD45 陽性細胞) の割合、およびそのヒト白血球が発現している各分化マーカーを FACS Calibur により解析した。なお、CD34 陽性細胞の増幅方法は、TPO、SCF、FL 及び FP6 (各 100 ng/mL) を含む QBSF-60 培地に CD34 陽性細胞を 10,000 個/mL の濃度で、50 mL のフラスコ中で 7 日間培養した。

2) 移植マウスの病理組織学的検査

増幅細胞の投与がレシピエントとなる患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性、および移植後のレシピエント体内におけるドナー細胞の分布を確認するため、増幅細胞 (ヒト由来) を移植した NOD/SCID マウスモデルにおける増幅細胞の分布を確認した。同時に、増幅細胞が正常な細胞又は組織に与える影響を検討するため、同一のマウスモデルについて病理組織学的検査を実施した。Hofling らの研究では、臍帯血由来 CD34 陽性細胞を β -glucuronidase 欠損 NOD/SCID マウスに静脈内投与し、6 週後および 12 週後にヒト細胞の解析を行っている。それによると、移植後のヒト細胞はすべて CD45 陽性であり、血液細胞系以外の細胞への分化は認められなかった。従って、今回の検討では、移植したヒト細胞の同定には、汎白血球マーカーである CD45 を用いた。

雄性 NOD/SCID マウス (7~10 週齢) に、X線照射装置 (MBR1520R、日立メディコ社製) にて 200cGy の放射線を照射し、その後抗アシアロ GM1 抗体を 1 匹あたり 20 μ L 静脈内に投与し、引き続き増幅細胞を静脈内投与により移植した (移植細胞数: CD34 陽性細胞数として 50,000 個または 100,000 個/匹)。移植約 3 カ月後に剖検を実施して、病理組織学的検査を実施した。なお検査器官は下表に記載した。また、移植したヒト細胞を同定するため、抗ヒト CD45 抗体 (クローン名: RP2/18) を用いた免疫染色を実施した。なお、ヒト臍帯血由来の CD34 陽性細胞を増幅せずに移植した NOD/SCID マウスを、比較対照とした。また、増幅方法は、TPO、SCF、FL 及び FP6 (100 ng/mL) を

含む QBSF-60 培地に CD34 陽性細胞を 10,000 個/mL の濃度で 50 mL のフラスコにて 1 週間または 2 週間培養した。

(3) 成 果

1) NOD/SCID マウスによる SRC (SCID-Repopulating Cells) 評価 (図1、表1)

増幅細胞を移植したマウスの骨髄におけるヒト CD45 陽性細胞の割合は未処理 CD34 陽性細胞移植群よりも高く、さらに、増幅細胞と未処理 CD34 陽性細胞を同時に移植した場合もヒト CD45 陽性細胞の割合が高いことが判明した。また、増幅細胞を移植されたマウスに生着しているヒト CD45 陽性細胞は、未処理 CD34 陽性細胞を移植されたマウスに生着しているヒト CD45 陽性細胞と同様に、多系統の血球細胞に分化していることが判明した。以上から、CD34 陽性細胞を TPO、SCF、FL 及び FP6 を用いて無血清培養して得られた増幅細胞では SRC が増加していること、さらに増幅細胞は多分化能を有していることが明らかとなった。

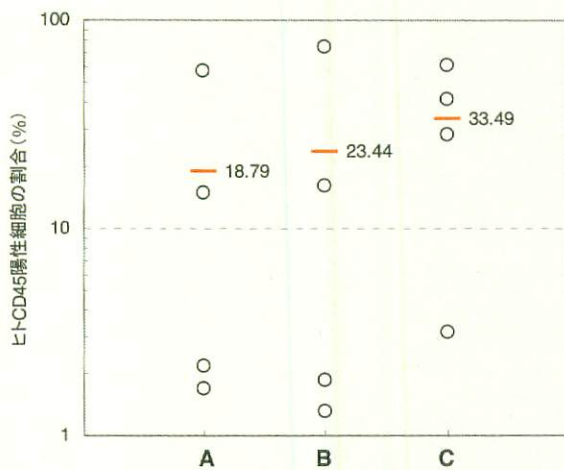


図1 NOD/SCID 移植モデルにおける増幅細胞の評価

A: マウス 1 匹あたり 40,000 個の未処理 CD34 陽性細胞を移植した群

B: マウス 1 匹あたり 40,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞を移植した群

C: マウス 1 匹あたり 20,000 個の未処理 CD34 陽性細胞と 20,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞

図中のシンボルはそれぞれ個体別の値を示し、図中の横線および数値は群の平均値を示す。

表1 NOD/SCID 移植モデルにおける移植細胞の多分化能の評価

	A	B	C
CD34 (造血幹細胞)	18.92 ± 5.54	23.48 ± 3.97	12.01 ± 3.56
CD36 (赤芽球、巨核球)	22.09 ± 2.56	34.57 ± 4.62	15.96 ± 4.39
CD19 (Bリンパ球)	65.95 ± 4.00	62.13 ± 5.60	76.25 ± 2.48
CD33 (骨髄球系細胞)	28.36 ± 6.52	29.48 ± 3.52	18.26 ± 4.97
CD41 (巨核球系)	12.73 ± 5.91	7.85 ± 3.06	4.83 ± 2.49

A: マウス 1 匹あたり 40,000 個の未処理 CD34 陽性細胞を移植した群

B: マウス 1 匹あたり 40,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞を移植した群

C: マウス 1 匹あたり 20,000 個の未処理 CD34 陽性細胞と 20,000 個の CD34 陽性細胞から増幅培養された細胞を移植した群

表中の数値は CD45 陽性細胞における割合 (%) を示す (平均値 ± 標準誤差、n=4)

2) 移植マウスの病理組織学的検査

増幅細胞を移植した NOD/SCID マウスにおいて、抗ヒト CD45 抗体に対する陽性反応が骨髄、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に認められた (写真 1)。特に、脾臓では白脾髄に、肝臓では類洞に局在が認められた。また、レシピエントのマウスでは、肉眼的及び病理組織学的にも細胞浸潤や壊死等の異常を示唆する所見は認められなかった。なお、上述した所見は未処理 CD34 陽性細胞を移植したマウスについても同様の結果を示し、明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、NOD/SCID マウスモデルにおいて、移植した増幅ヒト細胞が骨髄、脾臓、肝臓、腎臓及び腸間膜リンパ節に分布することが確認できた。また、増幅操作は、レシピエント体内における移植細胞の分布や正常組織に影響を及ぼさないと考えられた。

<NOD/SCID マウスモデルにおける検査臓器について>

下記の臓器について剖検時に肉眼的観察を行い、下線で示した臓器については病理組織学的検査も実施した。

外観、皮下織 (皮膚)、胸腔、腹腔、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、副腎、胃、小腸、大腸、膵臓、リンパ節 (腸管膜リンパ節)、唾液腺、甲状腺・上皮小体、気管、食道、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、膀胱、脳、下垂体、舌、動脈、脊髄、眼球、骨格筋、胸骨、大腿骨

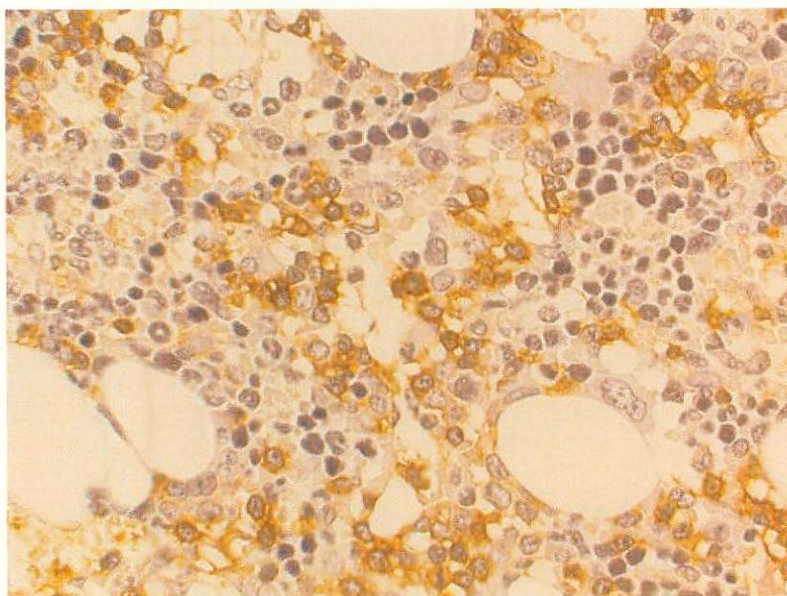


写真 1 NOD/SCID マウスの骨髄におけるヒト CD45 陽性細胞の局在
抗ヒト CD45 抗体に対する陽性反応 (茶褐色) が骨髄中の多数の細胞で認められている。

2. フェーズ II

(1) 研究の目標

骨髓、末梢血、臍帯血から採取された造血幹細胞の移植は、種々の悪性腫瘍、血液免疫疾患、遺伝性疾患の根本的治療法として確立されているが、その適応拡大に伴い、ドナー不足が深刻な問題となっている。我々は、新規のサイトカインを含む様々なサイトカインの組み合わせを用いて、ヒト造血幹細胞の *ex vivo* expansion を試みている。中でも、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせでヒト未熟造血細胞の expansion を達成し、その多分化能を *in vitro* で確認した。しかし、正確な造血幹細胞活性は、生体を用いて測定する必要がある。ヒト造血幹細胞活性をヒトを用いて行うことは不可能であり、それに代わるマウスなどの小動物を用いて測定する系の確立が必須である。従来、NOD/SCID マウスがヒト造血幹細胞の生着を許容するヒト型モデルマウスとして使用されてきた、しかし、ヒト T 細胞の出現が確認できないなど、改善すべき点が多い。我々は、NOD/SCID マウスに残存する NK 細胞活性を遺伝的に排除するため、NOD/SCID/ γ^{null} マウスを作成した。このマウスを用いて、ヒト T 細胞をも含むヒト造血細胞の分化、機能が測定できる系を開発するとともに、sIL-6R/IL-6 を含むサイトカインの組み合わせで expansion したヒト造血幹細胞活性の評価を行う。さらに、臨床応用には不可欠である無血清培地にて expansion したヒト造血幹細胞活性測定を併せて行い、増幅ヒト造血幹細胞の臨床応用システムの確立を試みる。

(2) 実施内容

従来、ヒト造血幹細胞の測定は、NOD/SCID マウスを用いて行われてきた。このマウスは多くの免疫不全マウスの中でも、ヒト細胞の生着を効率よく許容できるマウスとして広く用いられてきた。一方で、残存する NK 細胞活性を中和抗体で阻害する必要性があること、ヒト造血幹細胞よりヒト T 細胞の分化が恒常的には確認できないこと等により、ヒト造血幹細胞活性測定の系として改善の余地を残している。このため、NOD/SCID の残存する NK 細胞活性を遺伝的に除去する目的で、NOD/SCID マウスに common γ chain の変異を導入し、NOD/SCID/ γ^{null} マウスを作成した。このマウスを使用し、ヒト造血幹細胞の活性測定の系を確立することを試みる。

1) NOD/SCID/ γ^{null} マウスの免疫能の検索

common γ chain の障害により、NK 細胞の欠損が生じることが指摘されている。NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいて、NK 細胞活性を測定するとともに、種々の免疫機能についての検索を行う。

2) NOD/SCID/ γ^{null} マウスへのヒト造血幹細胞移植

ヒト造血幹細胞として、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ γ^{null} マウスに移植し、骨髓、末梢血、脾臓などの造血組織において移植ヒト細胞の再構築能を検討する。移植後、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月といった長期にわたり、FACS を用いて、ヒト血球各系統を特異的に認識する抗体存在下で、その出現を観察する。特に、従来用いられてきた NOD/SCID マウスにおいては十分には確認されていないヒト T 細胞の出現に留意し検討する。また、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいてヒト血液細胞の出現を確認するのに必要な移植ヒト造血幹細胞数の検討を行い、この測定系の感受性についても評価する。

3) 出現するヒト造血細胞の機能的評価

移植ヒト造血幹細胞より派出する各種ヒト血液細胞の機能的評価を行う。ヒト造血細胞移植は、造血組織の再構築に加えて、リンパ球などの免疫細胞の再構築を含む包括的な血液組織の再構築を目的

とする。したがって、造血幹細胞活性には、免疫担当細胞の機能的評価が必須である。我々は、リンパ系細胞に属する B 細胞、T 細胞、NK 細胞の出現の有無を検討するとともに、その機能的評価を行う。B 細胞評価としてヒト抗体の産生、T 細胞評価として TCR のレパトア解析、サイトカイン産生能、細胞障害活性測定、NK 細胞評価としては各種 NK 細胞特異的受容体発現、細胞障害活性測定などを行い、NOD/SCID/ γ^{null} マウスのヒト造血幹細胞活性測定の系としての確立をはかる。

4) 組織学的検索

機能を有する B リンパ球、T リンパ球の出現のためには、脾臓、胸腺において、秩序だった組織の構築が必要とされる。ヒト血液細胞を特異的に認識する抗体を用いて、脾臓、胸腺において、ヒト免疫細胞の秩序だった再構築が再構築されているか否かについて検討する。

5) 無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性測定

ヒトへの臨床応用を考慮した場合、ウシ血清を用いる培養系にはプリオン感染等の危険性を除外できないため、無血清培地を用いた培養系の開発が必須である。このためには、この新しいシステムにおいて増幅されたヒト造血幹細胞が臨床レベルでの使用に合致した細胞であるか否かについては、生体内でのヒト造血細胞の再構築をもとに、増幅システムの改善を試みる必要がある。NOD/SCID/ γ^{null} マウスがヒト免疫能をも含む再構築が達成できることが確かめられた場合、このシステムを用いて無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性の測定を行う。

6) 移植ヒト造血幹細胞の分化における可塑性についての検討

近年造血組織には、造血組織に加えて、筋肉、心臓、肝臓、脳組織など、様々な組織に分化し得る幹細胞が存在することが知られるようになった。しかし、ヒト造血細胞の持つ可塑性に関する研究は、その種特異性のため、生体内での機能的評価システムの確立には困難を極める。NOD/SCID/ γ^{null} マウスが効率よくヒト造血細胞の生着を許容する場合、ヒト造血細胞の可塑性について生体内での機能評価を行うことが可能となり、筋肉、心臓、肝臓、脳組織などに分化する細胞の同定、効率よい生着などの評価を網羅的に行う。

(3) 成 果

1) NOD/SCID/ γ^{null} マウスの免疫能の検索

2) NOD/SCID/ γ^{null} マウスへのヒト造血幹細胞移植

NOD/SCID マウスにヒト造血幹細胞の移植を行う場合、残存する NK 細胞活性を除去するために asialo GM1 抗体を投与する必要がある。一方、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいては NK 細胞活性は同定できず、asialo GM1 抗体の非存在下でもヒト造血幹細胞生着が確認された。さらに、NOD/SCID マウスにおける移植に比し、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおける移植において、ヒト血液細胞の効率よい生着を認めた。このことは、当初予期した NK 細胞欠損に加えて、ヒト血液細胞生着に有利なさらなる免疫機構の障害が存在することを示唆した。我々は、さらに種々の免疫細胞の機能評価を行った。その結果、NOD/SCID/ γ^{null} マウスの樹状細胞において、刺激に対するサイトカイン産生障害を認めるなどの機能異常を有することを明らかにした。

また、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいては、NOD/SCID マウスにおいてはその出現が確認できなかったヒト T 細胞の出現を確認した。このことにより、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいては、ヒト臍帯

血よりすべての系列の細胞への分化を確認した。さらに、NOD/SCID マウスにおいては、少なくとも 10,000 個のヒト臍帯血 CD34 陽性細胞がヒト造血組織の再構築に必要であったが、NOD/SCID/ γ^{null} マウスにおいては、わずか 1,000 個の細胞でも再構築が可能であることが明らかにされた。この結果は、NOD/SCID/ γ^{null} マウスが、ヒト造血幹細胞の生着に適したモデルマウスであることを証明した。

3) 出現するヒト造血細胞の機能的評価

出現するヒト B 細胞、T 細胞、NK 細胞を中心に、その機能評価を行った。マウス血清中に、ヒト IgG, IgM, IgA などの抗体の存在を確認した。さらに、T 細胞の TCR のレパトア解析を行ったところ、ブロードな TCR 出現パターンを示した。この結果、出現するヒト T 細胞は、限られたクローンの腫瘍性増殖ではなく、多様な抗原に対して対応できる生理的な TCR を持つ細胞であることが示唆された。また、T 細胞の刺激に対する増殖性、CTL 活性を測定したところ、両者ともその存在が確認された。併せて、NK 細胞活に由来する細胞障害活性や、NK 細胞特異的受容体の発現、サイトカインの産生も確認した。これらの結果により、機能的なヒトリンパ球が、NOD/SCID/ γ^{null} マウス体内で確認された。

また、胸腺組織に含まれるヒト細胞を検討したところ、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞に加えて、CD4+D8+T 細胞の存在が確認された。CD4+D8+T 細胞は胸腺でのリンパ球発生において、初期の未熟な段階で出現することが知られている。ヒト CD4+CD8+T 細胞が胸腺で確認されたことは、マウス胸腺を使ってヒト T リンパ球が成熟していることを示唆した。

4) 組織学的検索

脾臓、胸腺において、その組織学的検索を免疫組織染色を用いて行った。NOD/SCID/ γ^{null} マウスの脾臓は、本来リンパ球が存在しないため、PALS 構造は存在しない。しかし、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を移植した NOD/SCID/ γ^{null} マウスの脾臓においては、ヒト T 細胞、B 細胞による領域化がなされた PALS 構造が生成されていることが示された。また、胸腺においても、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、CD4+D8+T 細胞の存在が確認され、ヒト T 細胞成熟がマウス胸腺にて行われていることが示唆された。

5) 無血清培地で増幅したヒト造血幹細胞活性測定

現在、臨床応用可能で、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞増幅に有効な無血清培地の選択を行っている。今後、増幅した細胞の造血幹細胞活性測定を NOD/SCID/ γ^{null} マウスを用いて行う予定である。

6) 移植ヒト造血幹細胞の分化における可塑性について

骨格筋、心筋、肝臓、中枢神経系につき、移植したヒト造血細胞よりの分化について検討する予定である。さらに、種々の組織障害を惹起し、その可塑性について、併せて検討する。

3. 今後の展望

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ γ^{null} マウスに移植し、ヒト血液細胞の分化を評価できる系

を確立した。この系は、細胞表面形質の獲得に加えて、生成細胞の機能をも評価できるシステムであることが明らかにされた。この結果により、臨床応用を目指して無血清培地を用いて生体外で増幅されたヒト臍帯血 CD34 陽性細胞について、その幹細胞活性を測定することが可能となった。また、ヒト造血細胞を用いた可塑性の研究にも、生体内での動態を評価できるシステムとして、その利用が期待される。

本研究の成果により、造血幹細胞を用いた臨床研究のトランスレーショナルリサーチにおける前臨床試験にこのマウスを用いた安全性、効能の評価が用いられると考えられる。これまで不可能であったヒト血液細胞から再構築されるすべての系統の血液細胞機能を詳細に解析することができることが示唆され、今後、個々の細胞機能の評価法の開発を行う予定である。また、*ex vivo* 増幅臍帯血移植の前臨床試験もこのマウスにより詳細な解析を行い、有効性、安全性の評価を行う予定である。