

研究成果

| |
|---|
| 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 |
| <p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>① 研究の概要</p> <p>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、一つに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、骨髄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 <i>in vitro</i> 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と測定する方法である。</p> <p>本研究では <i>ex vivo</i> 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のには適していないという問題点があった。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。</p> <p>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。</p> <p>② 研究の独自性・新規性</p> <p>サイトカインで増幅した造血幹細胞の安全性、有効性を評価する系を確立することは、重要な課題である。特に我々が開発した NOD/SCID/γ^{null} マウスは NK 細胞活性も完全に消失しており、T 細胞を含む全ての血球の再構築が確認されており、これまで困難であった、T 細胞系の免疫能の評価を行える。さらには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も行える点から独自性・新規性があると考えられる。</p> <p>③ 研究の目標 (フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ I : NOD/SCID マウスを用いた <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植の安全性、有効性の検証を行う。 ・フェーズ II : NOD/SCID/γ^{null} マウスへの臍帯血移植を通じて T 細胞系の免疫能の評価さらには造血幹細胞の分化の可塑性を検討する。 <p>研究の進め方及び進捗状況 (目標と対比して)</p> <p>フェーズ I では従来の NOD/SCID マウスを用いて我々の研究グループが開発した臍帯血 CD34 陽性細胞の <i>ex vivo</i> 増幅の安全性、造血再構築能を評価した。4-6 ヶ月の長期観察が可能であり、この間に癌化や炎症等の影響を与えないことが証明された。また臨床研究で行う予定である、臍帯血移植にサイトカインで <i>ex vivo</i> 増幅させた臍帯血移植を付加させるプロトコルで行った移植実</p> |

験においては、通常の臍帯血移植より高いヒト細胞キメリズムが得られることがわかり、有効性が期待される。フェーズⅡにおいては、従来の NOD/SCID マウスによる移植実験では得られない細胞性免疫能の再構築能の評価や血液幹細胞からの組織を超えた可塑性の確認を行うことができた。また生着に必要な細胞量、移植前処置方法などの諸条件を開発した。

今後はこのマウスでの ex vivo 増幅臍帯血の安全性、有効性の詳細な評価を行う予定である。

主な成果

具体的な成果内容：ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/γcnull 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。

特許件数：0

論文数：22

口頭発表件数：20

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

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。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 鎖をロックアウトしたマウスを交配した NOD/SCID/γ^{null} マウスを開発した。このマウスは NK 細胞活性も完全に消失しており、NOD/SCID マウスの 1/10-1/100 の CD34 陽性細胞からヒト血球の再構築が確認された。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され、造血幹細胞の評価としては全く新しいものである。

2 実用化に向けた波及効果

ヒト血球の in vivo 試験が可能となり、血球の生体内での動態や血液細胞を用いた細胞治療製剤の安全性試験に用いることができることがわかった。今後、造血細胞移植のみならず安全な輸血製剤の開発、評価、また加工した細胞治療製剤の安全性試験などに用いることが可能である。

残された課題と対応方針について

ex vivo 増幅臍帯血移植の前臨床試験について、NOD/SCID/γcnull マウスを用いてより詳細な解析を行い、有効性、安全性の評価を行う。

| | JST負担分 (千円) | | | | | | | 地域負担分 (千円) | | | | | | | 合計 | |
|--------------------------|-------------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|--------|
| | H12 | H13 | H14 | H15 | H16 | H17 | 小計 | H12 | H13 | H14 | H15 | H16 | H17 | 小計 | | |
| 人件費 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 設備費 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| その他経費 (消耗品費、 材料費等) | 11,000 | 12,050 | 1,000 | 2,071 | 2,700 | 3,500 | 32,321 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32,321 |
| 旅費 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 20 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 |
| その他 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 小計 | 11,000 | 12,050 | 1,000 | 2,091 | 2,720 | 3,520 | 32,381 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32,381 |

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST負担による設備：低 CO2 インキュベーター、培養顕微鏡

地域負担による設備：大腸菌培養インキュベーター