



- ・ 医長（医学博士）
- ・ 奥山 美樹
- ・ 共同研究者  
原口 京子

平成元年 山梨医科大学医学部卒業  
平成元年 千葉大学第二内科（血液）  
平成 6 年 大阪大学医学部  
バイオメディカル教育研究センター  
平成 10 年 千葉大学大学院医学研究科修了  
平成 10 年 現職

## 造血幹細胞移植後の移植片対宿主病に対する 骨髄間葉系幹細胞療法の臨床応用

### 概要

造血幹細胞移植において、移植片対宿主病(GVHD)は、時に死に至る重大な合併症であり、有効な薬剤も少なくしばしば治療に難渋する。一方、欧米の臨床試験で間葉系幹細胞(MSC)を用いた細胞療法の、GVHDに対する有効性が報告されている。しかし、従来の細胞調整法ではウシ胎児血清(FCS)を使用している点が、実際にヒトに投与する場合に問題となる可能性が残されている。今回我々は、ヒト血清を用いて培養したMSCが、FCSを用いて培養したMSCと同等の増殖効率を示し、同様の免疫学的形質を持ち、同様の細胞増殖抑制作用を持つことを明らかにし、臨床応用が可能であることを確認した。

### 目的

造血幹細胞移植療法は、難治性の造血器悪性腫瘍に対する有効な治療法のひとつであるが、様々な治療関連合併症を起こすことが知られている。なかでも移植片対宿主病(GVHD)は、重篤な場合には生命に関わる合併症であり、標準的な治療で反応がみられない場合には、適当な治療手段に乏しいのが現状である。このため、現在種々の治療法が研究され、臨床試験がおこなわれているが、この中に間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell (MSC))を用いた治療法がある。

MSCは、骨髄中に存在する非造血系幹細胞で、脂肪細胞・骨細胞・筋細胞など、中胚葉系の様々な組織に分化する能力を持つ細胞として知られている。生体内には少数しか存在しないが、骨髄吸引で得られた少量の検体より体外培養で容易に増幅でき、さらに培養条

件によって様々な組織に分化誘導可能なため、再生医療への応用が注目されている細胞である<sup>1</sup>。また、MSCはT細胞の増殖を抑え、免疫抑制作用を持つことが知られており、これを臨床応用して、対増幅したMSCがステロイド抵抗性GVHDに対し、副作用も認めずに劇的な効果を示したことが2004年に報告された<sup>2</sup>。MSCはHLA class II抗原を持たず、免疫原性がほとんど問題にならないため、第三者由来のMSCでも副作用を起こさずに効果が得られることが確認され、その後も欧州で臨床研究が進行中である<sup>3-5</sup>。米国でもMSCが医薬品としての認可に向けて治験が進められており、アメリカ・カナダ・欧州・オーストラリアで第III相治験の登録が終了した。日本でも第II/III相治験が進行中である。一方、これらの治験薬は、MSCの体外増幅のために異種のウシ胎児血清(FCS)を用いて培養している。しかし、ヒトに投与する上では、たとえ培養添加剤としての使用であり、投与前に洗浄しても異種の原料は好ましくはなく、厚生労働省による指針「ヒト(自己)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について」においても必須でなければ使用しないこととされている。近年では、FCSのかわりにヒト血小板抽出液を用いた培養で、MSC増幅に成功したとの報告もあるが<sup>6,7</sup>、実用化には至っていない。さらに培養等の操作後に細胞を患者に投与する場合には、輸血や造血幹細胞移植などの特別な操作を施さずに使用する細胞とは異なり十分な品質管理システムが必要であり、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(2006年9月、厚生労働省)により、ヒト幹細胞の調整機関は「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(治験薬GMP)に求められる水準に達していることが要求されている。

当科ではGMP基準のセルプロセッシングユニットを新設し、細胞治療を行う基盤を構築している。そこで今回その臨床応用へ向け、ヒト由来血清を用いたMSC増幅を試み、さらにその機能解析をおこなった。

## 方法

### 細胞培養

研究材料となる細胞の採取は、採取することで临床上患者の不利益とならないよう配慮し、同種血縁者間骨髄移植の際に骨髄液を通したフィルターや、処理用のバッグに移した後の空バッグをリン酸緩衝生理食塩水20~60 mLでリンスすることで通常であれば廃棄される細胞を回収した。この骨髄細胞浮遊液を、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)を用いた比重遠心法にて単核球分離した。得られた単核球は $1.3\sim 14 \times 10^7$ 個(中央値 $6.2 \times 10^7$ ,  $n=10$ )であった。これを10% FCS含有D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), low glucose (Invitrogen)に懸濁し、 $0.5\sim 1.2 \times 10^7$  (中央値 $0.7 \times 10^7$ )個ずつ25cm<sup>2</sup>フラスコにて37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。3~8日後に培養液を交換して浮遊細胞を除去し、その後は週2回培養液の半交換をおこなった。6~20日後、フラスコ底が付着細胞でconfluentとなったところで、Trypsin-EDTA (Invitrogen)処理してsingle細胞懸濁液とし、Trypan Blueを用いて生細胞をカウント後、1フラスコあたり $1 \times 10^6$ の細胞濃度で継続培養した。その

後同様に2～5回継代し、50日程度培養した。ヒト血清は以下の方法で作成した。AB型健康人2名より研究用血清採取用バッグ( JMS )にて200 mLの全血を血小板活性化ビーズ入り貯血バッグに採血し、メーカーのプロトコールにしたがって血清を分離した。分離した血清は凍結保存し、解凍後非働化(56 30分間)してFCSと同様に使用した。なお、本プロトコールは都立駒込病院倫理委員会の承認を受け、骨髄・末梢血提供者から文書による同意を得ておこなった。

## 表面抗原解析

培養して得られた細胞は、以下の抗体を用いて表面抗原を解析した。anti CD3-FITC (クローン名SK7), anti CD10-FITC (W8E7), anti CD11b-PE (D12), anti CD13-PE (L138), anti CD33-PE (P67.6), anti-CD49e-PE (IIA1), anti-CD56-PE (MY31), anti-CD73-PE (AD2), anti-HLA-ABC-FITC (G46-2.6), anti-HLA-DR-FITC (L243)はBD Bioscience社製を、anti CD14-PE (RM052), anti CD19-PE (J4.119), anti CD44-FITC (J.173), anti-CD45-PC5 (J.33), anti-CD49d-FITC (HP2/1), anti-CD90-FITC (2G5), anti-CD105-PE (1G2), anti-CD166-PE (3A6)はBeckman Coulter社製を、anti-CD117-FITCはニチレイ社製を使用した。メーカーの標準プロトコールにて蛍光標識抗体と反応させ、FACSCan (BD Bioscience)を用いて測定しCellQuest (BD Bioscience)にて解析した。

## リンパ球混合およびリンパ球刺激試験

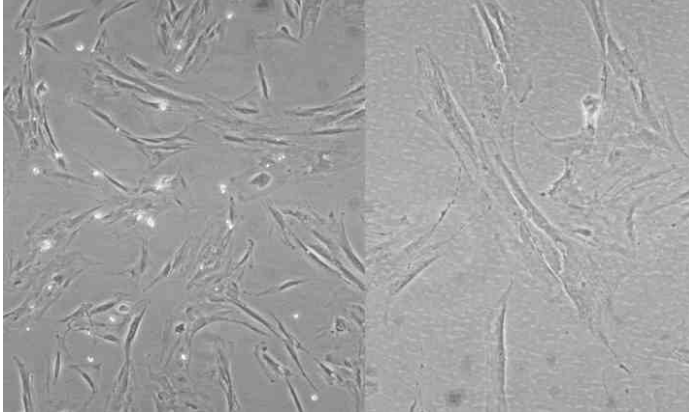
4週以上培養し、表面抗原にて確認したMSCを 線照射装置 (IBL-437C)にて15Gy照射して使用した。比重遠心法にて分離した末梢血単核球を96穴プレートで共培養した。必要時末梢血単核球には30Gy照射した。マイトジェンとしてphytohemagglutinin (PHA) 5 $\mu$ g/mL あるいはconcanavalin A (ConA) 5 $\mu$ g/mLを添加した。4日間培養後、200mLの培養液に対して2mLのAlamar Blueを添加し、6時間後にプレートリーダー( コロナMTP-120, 測定波長570nm, 参照波長610nm)にて測定した。

## 成績

### FCS下で培養増幅させたMSCの肉眼的・免疫学的形態

10% FCS添加D-MEMでヒト骨髄単核球を培養したところ、図1に示すほぼ均一な上皮系の形態を持つ細胞が得られた。MSCは特異的な細胞表面抗原は知られておらず、複数の抗原のパターンで判断することとなるが、今回得られた細胞の表面抗原は過去の報告の通りのMSCの発現パターンを示した(図示せず)。

図1. MSCの鏡検像（左図40倍、右図100倍）

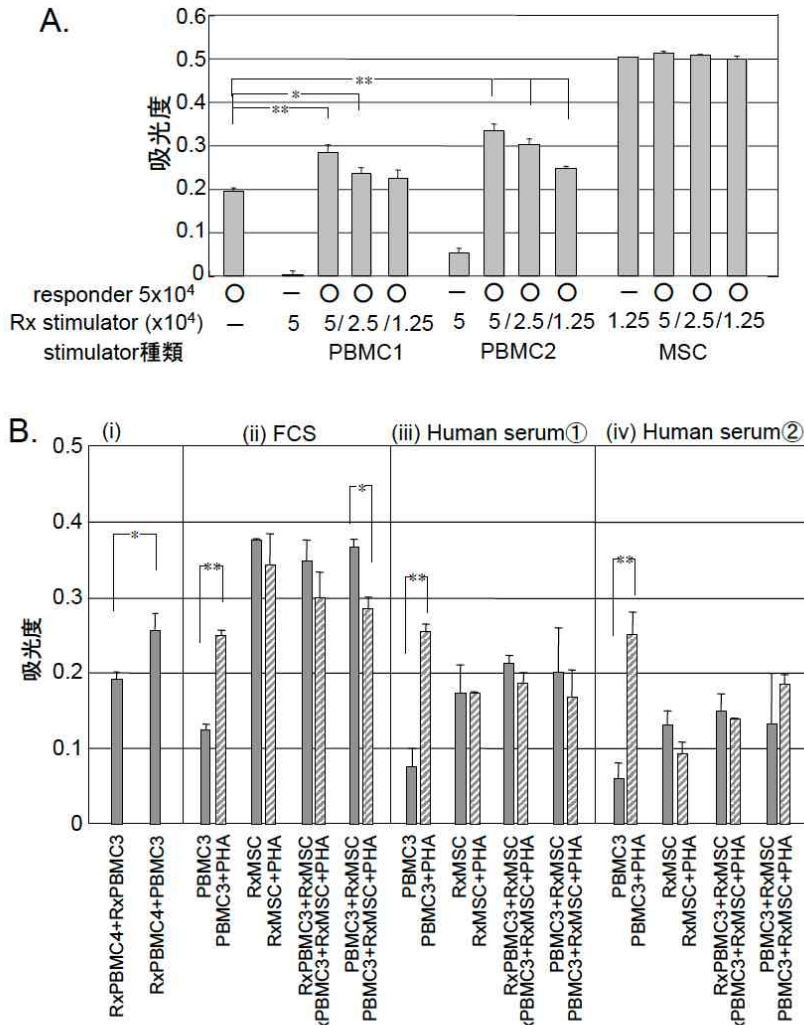


#### FCS下で培養増幅させたMSCの免疫抑制作用

同種末梢血単核球を用いてリンパ球混合試験をおこない、Alamar Blueを用いた色素還元法で細胞増殖能を検討した。図2Aに示すとおり、同種末梢血単核球をstimulatorとした場合には、stimulatorの細胞数依存性に吸光度が上昇した。しかしMSCをstimulatorとすると、線照射後にもかかわらずMSC単独で吸光度が変化し、さらにresponderと共培養しても、それ以上の吸光度の上昇は見られなかった。MSCの存在のみで色素の還元能が飽和することも考え、次の実験はMSCの数を減らし、さらにresponderにも照射して共培養したものをコントロールとして実験をおこなった。stimulatorが末梢血単核球の場合は有意にコントロールより吸光度が上昇するが(図2B(i))、MSCの場合はコントロールと差がなく(図2B(ii))、増殖刺激が入っていないと考えられた。

さらに、単核球にマイトジェンとしてPHAを添加して培養すると増殖刺激が入るが、MSC存在下では添加しても吸光度の上昇はみられなかった(図2B(ii))。マイトジェンをConAにしても同様の結果がみられた(図示せず)。

図2. リンパ球混合試験および刺激試験



A. responderとして、末梢血単核球、stimulatorとして同種末梢血単核球もしくはMSCを表示の細胞数にてFCS入り培養液で混合培養し、Alamar Blueでアッセイした。  
 B. (i) 同種末梢血単核球を $7.5 \times 10^4$ /wellずつFCS入り培養液で混合培養した。  
 (ii-iv) MSC  $5 \times 10^3$ /well、同種末梢血単核球を $7.5 \times 10^4$ /wellにて混合培養した。それぞれの血清で培養増殖させたMSCで、それぞれの血清を添加した培養液で混合培養を行い、Alamar Blueでアッセイした。斜線はPHA添加下で培養した結果。再現性をFCS入りの培養で4回、さらにヒト血清を加えた培養で4回施行し確認した。  
 Rx: 放射線照射した細胞、PBMC: 末梢血単核球、数字はドナー個体の区別。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

ヒト血清下で増幅させたMSCは形態的にFCSで増幅させたMSCと同様で、増幅効率も劣らない

10%ヒト血清添加D-MEMで同様に培養したところ、ほぼ同様の形態の均一な細胞が得られた。細胞増殖の程度は、骨髄単核球のバッチ間差が大きい、ヒト血清2種類で培養した方がFCSよりも増殖が早い傾向がみられた(図示せず)。細胞表面形質は、FCSでの培養で得

られた細胞と同様であった（図示せず）。以上のことから、我々の方法により作成されたヒト血清を用いて増幅された骨髄MSCは、形態上FCSを用いて増幅させた骨髄MSCと同様で、増幅効率も同等であると考えられた。

### 免疫抑制作用はヒト血清で培養したMSCでも認められる

2種のヒト血清で培養増殖させたMSCは、リンパ球混合培養においても、さらにマイトジェンを添加して培養しても、FCSで培養増殖させたMSCと同様に末梢血単核球を増殖させなかった（図2B(iii)(iv)、ConAは図示せず）。

### 考察

MSCは、難治性GVHDの治療への応用が近年大いに期待されているが、一般の薬剤とは異なり生きた細胞である。培養等のステップを経る細胞を患者に投与する場合は、輸血や造血細胞移植など採取後特別な加工を施さない細胞治療とは異なり、十分な品質管理システムが必要である。特に分化可能な幹細胞は、2006年9月に厚生労働省から出された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」にのっとり、ヒト幹細胞の調整機関は医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（治験薬 GMP）に求められる水準に達している必要がある。

さらに、臨床応用に至るためには、MSCを培養する際に異動物の材料を使用せざるをえない点が大きな問題となる。本研究では、まずその問題を克服するための基礎検討をおこなうこととした。ヒト血清は、一般的にFCSと比べて培養効率が悪いことが知られており、MSC培養にも適さないと考えられている。解決法の1つは多血小板血漿を用いて血清を作成するものである。血小板には種々の増殖因子が含まれていることが知られており<sup>7</sup>、MSC作成にも試みられ、期待できる結果がすでに得られている<sup>6,7</sup>が、採取に成分採血装置等が必要となり煩雑である。今回我々が使用した方法は、末梢血全血を200mL採血するだけで良く、セットアップもドナーの負担も軽微である。その後の調整手順も比較的簡便で、短時間に効率よく血小板中の活性化因子を多く含んだ血清を得ることができる。この血清を用いて、増殖効率はFCSと同等かそれ以上であり、血清間差がある可能性はあるものの、将来臨床使用可能となることが十分期待できる結果が得られた。

### 結論

実際に骨髄細胞からMSCを分離調整し、増殖させることができた。さらに、ヒト血清を用いても、FCS血清に劣らない増殖効率を持ち、同様の形態・同様の細胞増殖抑制作用を持つMSCを分離増殖させることができた。今後更なる検討を加え臨床応用へとつなげたい。

### 謝辞

本研究を助成していただきましたサッポロ生物科学振興財団、ならびに助成候補者

としてご推薦下さいました塚越茂先生に心より感謝申し上げます。

#### 参考文献

1. Giordano, *et al.* Journal of Cellular Physiology. 2007;211:2735
2. Le Blanc, *et al.* The Lancet. 2004;363:1439-41
3. Le Blanc and Ringden. Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2005;11:321-34
4. Nauta and Fibbe. Blood. 2007;110:3499-506
5. Le Blanc, *et al.* The Lancet. 2008;371:1579-86
6. Doucet, *et al.* Journal of Cellular Physiology. 2005;205:22836
7. Bernardo, *et al.* Journal of Cellular Physiology. 2007;211:12430