

4-2-7 移植・外科研究部（実験外科研究室、移植免疫研究室）

当部の研究体制としては3つの部門があり、浅原弘嗣部長および田中輝幸室長による移植・外科研究部＝システムズ・バイオメディスン・ユニット、さらに絵野沢伸室長による実験外科研究室および、梨井康室長による移植免疫研究室から成る。

4-2-7-1 移植・外科研究部＝システムズ・バイオメディスン・ユニット

1. 概要

1.1 研究プロジェクト

分子細胞生物学、分子遺伝学的手法にポストゲノミックアプローチを融合した、システムズ・バイオメディスンの研究プラットフォームを確立し、その応用によってヒトの四肢および脳神経の形成を支えるクロマチン制御機構の解明と、それらの器官系統におけるさまざまな病態の分子機構解明、さらに新しい治療法・創薬の理論的根拠の導出を行う事を目指す。

- (1). マウス胚を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によるデータベース作成
- (2). ヒト遺伝子発現ライブラリーを用いた転写誘導遺伝子のハイスループットスクリーニング
- (3). ChIP on Chip 法による転写因子 Sox9 の標的遺伝子のスクリーニング
- (4). 遺伝子改変マウスの作製と解析
- (5). 骨格系におけるノンコーディング RNA の機能解析とその治療への応用
- (6). 哺乳動物の脳形成遺伝子発現制御ネットワークの解析と神経細胞遊走遺伝子の機能解析

1.2 研究体制

部長：浅原弘嗣（平成16年2月就任）

成育社会医学研究部・成育生態学研究室長：田中輝幸（システムズ・バイオメディスン・ユニット責任者として平成18年1月着任）

流動研究員：味八木茂、工藤寛枝

共同研究員：橋本徳（独立行政法人医薬基盤研究所研究員）、横山成俊（JST 研究補助員、早稲田大学大学院）、浅田真紀（大塚製薬株式会社）、安東正貴（日本電気株式会社）、石飛博之（筑波大学大学院）、伊藤禎晃（東京医薬専門学校）、伊藤義晃（東京医科歯科大学大学院）、岩城敬博（東京薬科大学）、内部健太（岡山大学大学院）、大森慎（東京医科歯科大学大学院）、長田忠大（北海道大学大学院）、佐久間健治（東京農業大学大学院）、佐藤天平（北里大学）、鈴木崇将（東京医薬専門学校）、竹本風子（東京薬科大学）、都築さやか（東京薬科大学）、鳥内直哉（北里大学）、内藤広信（東京医学専門学校）、中佐智幸（広島大学大学院）、永井茜（東京農業大学大学院）、埴和めぐみ（日本シエーリング株式会社）、長谷川潤一（東京医薬専門学校）、原田大輔（岡山大学大学院）、東山礼治（千葉大学大学院）、日方智宏（慶応大学大学院）、福田憲嗣（東京薬科大学）、堀内真千子（東京医科歯科大学大学院）、丸山裕美（東京バイオテクノロジー専門学校）、三浦隆雄（東京農業大学）、山下聡（東京医科歯科大学大学院）、渡邊隆司（大塚製薬株式会社）

研究補助員：泉久保樹音（H17/9-）、沢田愛可（H18/4-）、清水浩仁（H18/4-）

2. 研究内容

2.1 マウス胚におけるホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現データベースの構築

脊椎動物の形態形成においては、多くの遺伝子が組織特異的（空間的）あるいは発生段階特異的（時間的）に秩序だって発現し機能しているが、その全容は明らかではない。この遺伝子ネットワーク解明のた

めに、全遺伝子の発現パターンの同定を行う。最終目標を全遺伝子(約2万2千)に置いて、まずマウス胚で遺伝子発現(転写)の主役である1,600個の転写因子・転写コファクターの発現データベース EMBRYsを作成している。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法は空間的解像度が高く、組織発生分化の解明に有用である。知る限りにおいて、全身についてのマウス胚 *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現データベースは、いまだ不十分である。

2006年12月の時点では、E9.5、E10.5、E11.5の3ステージで約1,600因子について終了しており、インターネット上での公開に向けて準備中である。これまでの肢芽に注目した解析では、肢芽軟骨領域に発現している新規遺伝子が3種、筋組織での新規遺伝子が1種、肢芽形成における軸決定に関与していると思われる新規遺伝子5種、などが得られている。その中で、特に四肢発生に関わると思われる発現様式を示すものについては、ニワトリ胚における遺伝子強制発現アッセイ、ヒト間葉系幹細胞における siRNA などを用いた遺伝子ノックダウンアッセイ、ノックアウトマウスなどを用いて解析していく。

また、立体物である胚サンプルの遺伝子発現パターンを3D的に記録する新方法として、ハイロックス社と共同研究で回転式実体顕微鏡の開発を行っている。

2.2 ヒト遺伝子発現ライブラリーを用いたハイスループット遺伝子導入アッセイシステムによる新規治療標的因子の探索

ヒトの疾患、発生、分化にかかわる標的遺伝子の転写を制御する新たな遺伝子をゲノムワイドに探索することは、新たな治療法、治療薬の開発のターゲットの発見に大きく貢献すると考えられる。平成18年度は、1万6千個のヒト cDNA ライブラリーを細胞に導入発現させ、標的遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイによる世界最大級のハイスループット遺伝子スクリーニング系を構築した。

ハイスループット遺伝子導入アッセイの実際を簡単に記すと、まず発現ベクターで整備されたヒト遺伝子 cDNA ライブラリ(東大医科研 FLJ クローン1万個 + 米国 MGC クローン6千個)を大腸菌を用いて増幅、抽出し、自動分注装置を用いて各々のクローンを約50枚の384穴プレートに配置し、アッセイのテンプレートとした。アッセイの方法は様々な応用が考えられるが、これまでに実施したアッセイを記す。注目する重要な疾患関連遺伝子 A の発現調節因子をスクリーニングする場合には、ゲノム上の遺伝子 A の発現調節領域(プロモーター領域)をルシフェラーゼ配列の前方に組み込んだレポータープラスミド pA を作製する。pA と遺伝子導入試薬(Fugene6 等)を混合したものを384穴テンプレートに分注し、さらにアッセイに使用する細胞(ヒト293T細胞等)を分注、2日間培養し、ルシフェラーゼアッセイで各ウェルの発光強度を測定する。コントロールに比して強い転写活性が見られたものについて、スケールを上げながら2次、3次スクリーニングを行い、最終的に数十個にまで絞ることが出来た。

これまでの具体的な研究内容としては、1) グルココルチコイドレセプター結合領域(GRE)レポーターを用いた MGC ライブラリ・スクリーニング(グルココルチコイドは内因性ステロイドであり、アレルギー疾患の病態に関与する)、2) Runx2 結合領域レポーターを用いた MGC ライブラリ・スクリーニング(Runx2 は先天性骨系統疾患の病態に関わる)、3) Runx2 結合領域レポーターを用いた FLJ ライブラリ・スクリーニング、を行って各々数十個の候補遺伝子を得た。

2.3 ChIP-chip 法による転写因子 Sox9 の標的遺伝子のスクリーニング

軟骨分化において重要な転写因子 Sox9 の標的遺伝子の全容を解明するために、ChIP-chip 法を行った。ChIP-chip 法は、クロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)とゲノムタイリングアレイ(microarray chip)を組み合わせ、ゲノムワイドに転写因子結合領域やクロマチン修飾を探索できる方法である。

マウス16.5日胚の肋軟骨より得た軟骨細胞において、抗 Sox9 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、Sox9 結合ゲノム DNA(Sox9 ChIP DNA)を精製、増幅し、Affymetrix 社の Mouse Promoter Array にハイブリダイズした。このアレイは全遺伝子の転写開始点より-6 ~ +2.45kb について25bのプロンプを460万個敷き詰めたタイリングアレイである。得られるデータは膨大なものであり、データ解析法も定まってい

ないため、NEC との共同研究にて ChIP-chip 法の解析法を検討した。ゲノム上での 500b のプローブをひとまとめとしてシグナル値とし、Wilcoxon 順位検定により p 値を計算し、コントロールより有意なシグナルを Sox9 結合領域とした。抽出した Sox9 結合ゲノム領域と遺伝子の対応を調べ、「Sox9 標的遺伝子候補」リストを作製した。また、生殖系の細胞であるセルトリ細胞も Sox9 を発現しているため、同様に ChIP-chip 法にて Sox9 の標的遺伝子候補を探索し、軟骨と生殖器での標的遺伝子を比較した。我々の結果では、軟骨細胞での標的遺伝子候補の約 9%、セルトリ細胞での 4% がわずかに共通であり、ここから、Sox9 は組織特異的に標的遺伝子を変えていることが示され、そのメカニズム解明のための重要な基礎データが得られた。

さらに ChIP-chip 法で得られた軟骨細胞での Sox9 制御遺伝子候補について、shRNA ベクター導入による Sox9 ノックダウンで変動する遺伝子を DNA マイクロアレイによって網羅的に調べ、軟骨細胞における Sox9 標的遺伝子を決定する。それら新規標的遺伝子の軟骨分化における役割を、ノックアウトマウスの作製による *in vivo* の解析、間葉系幹細胞からの軟骨分化モデルを用いて強制発現、発現抑制などの *in vitro* の解析により明らかにする。

2.4 遺伝子改変マウスの作製と解析

2.4.1 ankyrin repeat domain 15 (*Ankrd15*) ノックインマウスの作製、解析

前年度に軟骨分化に中心的な転写因子 Sox9 に関わる転写コファクター・上下流遺伝子を探索するために、マウス胚におけるホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、軟骨発生領域に発現する *Ankrd15* 遺伝子を抽出した。*Ankrd15* の機能解析を目的としたノックインマウスとして、*Ankrd15* 遺伝子の第一エクソンに Venus 蛍光タンパク遺伝子の cDNA を組み込んだノックインベクターを構築し、TT2F ES 細胞株へ導入、選別した相同組み替え ES 細胞を Tetraploid 期受精卵にインジェクションして、100% TT2F21 ES 細胞由来のキメラマウスを取得、germ line transmission を確認した。今後ノックインホモマウス取得に向けて交配し、表現型からその機能を予測する。独立行政法人産業技術総合研究所、木山 亮一先生より譲り受けた抗 *Ankrd15* 抗体を用いた切片作製による組織学的解析、遺伝子発現解析、タンパク質発現解析、また、免疫沈降法およびクロマチン免疫沈降法を用いた転写制御解析を行う。

2.4.2 ジーントラップ ES 細胞株 (米国 Baygenomics 社) のリクローニング及びキメラマウスの作製

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション・スクリーニングによって抽出された 12 遺伝子に関して、これらの遺伝子領域内にジーントラップベクターが導入された ES 細胞株を Baygenomics 社より購入し、ジーントラップマウスの作製を開始した。購入した ES 細胞株の核型解析を行ったところ、60% 以上の細胞株が異常な染色体を持っていた。そのため、全クローンのリクローニング後にマイクロインジェクション法によりキメラマウスの作製を行った。2006 年度は 12 遺伝子中 4 遺伝子に関してキメラマウスを取得し、現在交配中である。今後は、2007 年中に全ての ES 細胞株においてジーントラップマウスを取得し、それらのホモ化および、LacZ 染色、組織学的解析、免疫染色等を用いて各系統の表現型を解析し、各遺伝子の生体内機能、転写制御ネットワーク解明を目指す。

2.4.3 その他の遺伝子変異マウスの作製

現在ノックインベクターを導入し ES クローン単離中のターゲットが 2006 年 12 月の時点で 8 個あり、2007 年度中に全てマウスの完成を予定している。

2.5 骨格系におけるノンコーディング RNA の機能解析とその治療への応用

遺伝子の転写後発現調節にタンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA/ncRNA) が関与することが新たに示された。特に ncRNA の一種である microRNA (miRNA) は標的 mRNA の翻訳を阻害もしくは直接分解することが知られており、全遺伝子の約 1/3 が miRNA によって制御されていると推測されている。miRNA には組織特異的または発生段階特異的に発現するものもあり、発生・分化への関与が考えられる。また、miRNA の発現異常はがんをはじめとした各種疾患にも関与していることから、その分子機構

の解明により将来的な医療応用も期待される。

我々は、発生期における軟骨形成部の増殖軟骨細胞や、成体マウスの膝関節軟骨細胞で特異的に発現する miRNA を同定した。この軟骨特異的 miRNA は、四肢で Sox9 をノックアウトマウスすると発現が消失することから、Sox9 によって発現が制御されている可能性が高いと考えられる。変形性関節症モデルにおける関節軟骨では、この miRNA の発現が減少していること、また軟骨基質を破壊するような標的候補遺伝子の発現が変形性関節症の進行に伴って増加してくることから、骨軟骨疾患との関係も示唆される。今後、現在作製中である遺伝子改変マウスの解析によりこの miRNA の機能を明らかにすることで軟骨発生・分化メカニズムの解明や核酸医薬による軟骨再生や疾患治療の応用を目指す。

2.6 哺乳動物の脳形成遺伝子発現制御ネットワークの解析と神経細胞遊走遺伝子の機能解析

近年の研究で、小児てんかんと精神発達遅滞を伴う患者の多くで神経細胞が正常の位置から逸脱した異所性灰白質或いは皮質層構造異常が種々の程度で発見され、脳形成期における神経細胞遊走障害がこれらの基礎病態である事が示唆されている。神経細胞遊走障害の最重症型の一つ「滑脳症」の原因遺伝子 *DCX* は 10 のホモログと共にスーパーファミリーを構成し、各メンバーが作用重複し協調的に神経細胞遊走を制御する。しかしそれらが、どの様に時空間的に発現を調節され、分子機能を割り当てられているのか、ほとんどわかっていない。そこで本研究では、*DCX* スーパーファミリー遺伝子群を中心に神経細胞遊走遺伝子の上位(発現制御機構)と下位(分子機能相互作用)のネットワークを同定し、大脳皮質形成期に神経幹細胞分裂後、神経細胞の遊走を開始させる制御機構を導き出す事を目指す。方法としてまず転写を調節するシスエレメントを特定するため、ゲノム比較解析ツールを用いマウス、ヒト、ラットの *Dcx* 遺伝子のエクソン上流を比較し、保存領域を確認。それを元にマウス *Dcx* エクソン上流を種々の長さに切り出した luciferase レポーター プラスミドを作製し、マウス神経前駆細胞を用いプロモーター解析を行う。こうして得られたプロモーター領域予測部位の *in vivo* での有効性を確認するため、同領域を結合した LacZ リポーター発現トランスジェニックマウスを作製する。プロモーター領域配列に転写因子結合配列解析ツールを応用し転写因子と結合領域の全候補を選び、各因子について、当研究部で構築中の、マウス胚の全転写因子・転写コファクター whole-mount *in situ* hybridization データベースと照らし合わせ、更にマウス胚・脳スライスの *in situ* hybridization を行い、*Dcx* と発現が一致するものを抽出する。抽出した各転写因子について、*in vitro*、*in utero* で神経幹細胞へ強制発現あるいはノックダウンし解析し、さらに制御因子候補を絞る。現在、*Dcx* のプロモーター解析とゲノム比較解析ツールを用いエクソン上流のプロモーター領域候補を特定し、配列解析の結果約 200 の転写因子候補を得、発現パターン未知の因子について、*in situ* hybridization を行いデータを集積中である。

4-2-7-2 実験外科研究室

1. 新規医療技術・機器開発に関する研究

1.1 生物材料の特性を利用したバイオ血液浄化システムの開発

肝・腎機能が損なわれた患者に施される血液浄化法の新しいデバイスとして、非細胞系バイオ血液浄化システムの開発を行っている。現在、血液浄化法として人工透析や持続的血液濾過透析、血漿交換があるが、これらは濾過膜のポアサイズに依存した分子ふるい効果を利用している。従って、取り除くには必要成分も一緒に取り除かなくてはならないなどの問題点がある。そこで我々は MDR1 トランスポータータンパクとリポソームに目をつけ、ナノテクノロジー技術によって人工細胞膜を作製し、特定の不要物質を選択的に除去可能な新たな血液浄化法への第一歩とし、研究を行ってきた。

小腸や脳、腎尿細管に広く存在する MDR1 タンパクは、細胞内に取り込まれた薬剤などの脂溶性低分子異物を、ATP をエネルギーとして細胞外に排出する。そこで、この分子を含むプロテオリ

ポソームはリポソーム内に基質分子を取り込むことで反応系中の毒物基質を除去できると考えられる。ウサギの腎尿細管細胞 PCTL に MDR1 遺伝子を組み込み、強制高発現させた細胞、PCTL-MDR1 をコラーゲンコーティングしたカルチャーインサートに播種し、inner 側又は outer 側に RI 標識した毒物基質を加え、輸送率を見た。細胞無しのコントロールでは時間と共に平衡に達しているのに対し、PCTL を播種した系では、in から out への輸送量は少なく、平衡にも達していないことから、MDR1 により inner 側へ戻されていると考えられる。これに対し out から in への輸送は inner 側への輸送量が outer 側の残量より上回っており、能動的に細胞外へ排出していることがわかった。この結果はまた、MDR1 がメンブレンと接していない面に多く存在し、細胞が極性を有して配列していることを意味するものである。すなわち、腎尿細管構造が in vitro で模倣できたことになる。

プロテオリポソームを透析用カラムの透析液に存在させるという利用形態の問題点として、排除限界がある。吸着カラム同様、リポソーム内に取り込む基質量には限界があり、拡散放出もあるため、効率的ではない。これを解決するため、透析膜表面に脂質膜と MDR1 を構築できればより効率的な透析が行えるのではと考えた。また空孔内に ATP ADP リサイクル経路を確立させる事ができれば、自律的な機能が達成できると考えられる。そこで実用化への第一歩として膜面に対し垂直な微細孔を有する Anodisc を基材として検討を行った。脂質膜の構築をいくつか行ってみたところ、脂質のクロロホルム溶液に disc を浸す簡単な操作がもっとも適すると推察された。この処理前後での撥水性の違いから、目的とした構造に近いであろうと考え、MDR1 を組み込み、これを用いて基質輸送の検討を行った。その結果、吸着と透過を合わせ 1 割程度の ATP 依存的な除去能が認められた。

1.2 胎児治療用デバイス設計に関する基礎的検討

生殖補助技術とともに最近の胎児治療の進歩はめざましい。術式では形態異常に対する外科処置は内視鏡を用いた低侵襲方式が主流となっている。この胎児治療が成人に行われる内視鏡手術と明らかに異なるのは、気相ではなく羊水という液相で施術しなくてはならないことである。一方、胎生期は成長を確保し、出生後に時期をみて根治手術を行うという手法をとることができる。そこで、胎児手術は通常の外科手術とは全く異なる発想で開発する必要がある。本研究で対象とする二分脊椎症は単純形成不全に属し、治療による効果が顕著な疾患といえる。局所処置として細胞シートによる一時的封鎖の効果を調べる。また内視鏡手術時の卵膜に生じた穴を細胞シートを用いて封鎖することを検討した。

実験動物として Wistar ラット新生仔（出生当日または翌日）あるいは胎齢 19-20 日の胎仔を用いた。硝子化コラーゲン膜、ビトリゲルは、農業生物資源研究所の竹澤俊明博士より供与を受けた。レーザーは医用レーザー（Dornier Medilas Fibertom 5100 (Daimler-Benz Aerospace)）を用いた。

新生仔ラット背部皮膚にビトリゲルを固定後、レーザーをパルス照射したところ、ビトリゲルが固定されることが確認できた。さらに、この操作を水中で行った場合、照射部が皮膚と癒合した。しかしながら、気相中よりも大きな照射量を要し、また癒合度も気相中よりも弱かった。ビトリゲルの熱による組織癒合は、コラーゲン間で行われることから、表皮に直接当てるのではなく、真皮を露出させた後に行わせることが必要と考えられた。

出生直後のラット新生仔背部の表皮を除去し、真皮に直接ビトリゲルを当て、周囲を縫合した。24 時間後の組織像は、ビトリゲル-真皮間に細胞性の癒合が確認された。ラットの背部皮膚を細切の後、ビトリゲル上で培養を行った。真皮の線維芽細胞と、表皮の角化細胞がビトリゲル上にそれぞれが伸展して、複合化した培養像が見られた。図中、D 部分は紡錘形をした線維芽細胞が伸展し、E 部分は敷石状の表皮細胞が増殖している。現段階では確認できなかったが、これらの細胞群は相互に積層し、被布構造をとることも可能と考えられる。また、ビトリゲルには細胞が進入・増殖することも出来るので、ゲルを基質として、細胞が密に組合わさることによって、力学的に強い再生皮膚が形成されると期待している。

この他、胎児治療機器開発プロジェクトは収束超音波による深部臓器手術などを病院特殊診療部、

早稲田大学理工学部、東京大学大学院工学研究科と連携して進めている。

2. 医療行政への貢献

2.1 公共的ヒト組織バンクシステム構築に関する検討

公共的ヒト組織バンクを中心とし、創薬に向けた肝組織・細胞の研究利用システムの構築を、以下のサブテーマを融合させながら遂行した。手術摘出肝のバンク提供システム構築では、病院内スタッフの協力体制の構築を、インフォームド・コンセントの在り方から、検体保存や処理法について検討した。ラットおよびヒト肝臓を用いた基礎的検討では、Celsior 液が保存に優れることと、凍結保存における CAS 凍結の有効性が確認された。従来より我々が提唱しているインフォームド・コンセントの二段階プロトコールは、医療・研究者側の視点では順調に機能しているように見える。しかしながら、説明者が医師である以上、患者の従属関係が必ずしも改善できない可能性が指摘された。改善案として治験コーディネーターのような立場の者が必要とされた。肝細胞・肝組織の長期保存法の確立では、凍結保存液における糖質の添加効果を詳細に調べた。13 種類の単糖、オリゴ糖、環状糖と多糖（デキストラン）を、ジメチルスルフォキシドを凍結保護剤とする従来の細胞凍結溶液に添加して調べた。トレハロースだけでなく、長鎖オリゴ糖のマルトヘプタオースで著名な生細胞率および解凍後細胞の生存率の上昇が見られた。解凍細胞の培養時に細胞マトリックスを組み合わせることによって、細胞生存率の上昇が見られた。肝細胞の凍結保存技術は、総合的体系化によって、さらに改良可能と考えられた。肝細胞の新規培養環境の開発では、各種細胞外マトリックス成分のゲル薄膜基材を作製してラット初代肝実質細胞の機能維持を検討し、I 型コラーゲンゲル薄膜を用いたサンドイッチ培養が肝細胞機能維持に良好な結果を示すことがわかった。細胞アレイ培養では、基板と修飾分子の改良によって、スフェロイド形態がさらに良好に保たれるようになった。さらに細胞アレイを用いた凍結ヒト肝細胞の初代培養実験では、多くの CYP 分子種において、単層培養より高い活性が長期間維持されることがわかった。ステム（幹）細胞から分化誘導した肝細胞の利用に関する研究では、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞が HIFC 分化誘導システムによって肝細胞へ分化誘導されることがわかった。ヒト肝の研究利用に関する社会調査は、臓器を研究目的で提供するか否かの市民の意識調査を行ったところ、多くの人が、移植不適合臓器の研究転用に関して賛成の考えを持っていた。また、米国のヒト肝細胞研究利用状況の調査を行った。

2.2 再生医療における研究者の意識調査

再生医療臨床研究を進める際の専門家集団の自律性のあり方について考察した。法や指針が整備され、研究者は規則に則った形で研究をできるようになった。規則は研究の自由度を低下させ、進歩を阻害するという見方もあるが、規則に従う限り、研究は公的に認められ、研究者は保護されるという考えもある。ただし、後者は、研究者の規則依存という弊害を生む危険性がある。つまり、規則に従っていさえすればよいと考え、規則の理念の理解がないままに臨床研究を遂行してしまうということである。患者に対し臨床研究参加の協力を求める説明の適格さは、現状では説明文書の文言を以て審査しているだけである。実施時は研究者の倫理観に任せられており、ここに専門家としての自律性の重要性がある。本年度は、再生医療臨床研究機関の調査結果から自律性の現状を抽出するとともに、医学教育における自律性の高め方について考察した。

2. 診療活動、研究活動など

2.1 倫理審査

1. 藤本純一郎、笠原群生、田上昭人、絵野沢 伸他、細胞治療をめざしたヒト肝細胞の培養法および保存法の確立に関する研究、平成 18 年 10 月 13 日承認（受付 No.210）
2. 黒田達夫、絵野沢 伸、炎症性サイトカイン Transforming Growth Factor-beta (TGFB) の遺伝子検査による移植腎機能評価、平成 18 年 11 月 13 日承認（受付 No.211）

3. 研修、評価

3.1 セミナーの企画、進行

・ 2006 (平成 18) 年 9 月 8 日、絵野沢 伸、第 42 回日本移植学会総会、ランチョンセミナー 4 (共催(NPO)エイチ・エー・ビー研究機構)、ロブ・リンダラー (ミッドウェスト移植ネットワーク CEO)、ブレイクスルー 米国の移植臓器提供に向けた活動「コラボラティブ」の挑戦と問題点、千葉県幕張市

4. 社会的活動

4.1 所外委員会活動、学会活動

ヒューマンサイエンス振興財団資源供給審査委員

次世代医療機器評価指標検討会体内埋め込み型材料審査ワーキンググループ委員

日本再生医療学会評議員

日本移植学会評議員

日本組織培養学会倫理問題検討委員

日本臓器保存生物医学会評議員、編集幹事

(NPO) H A B 研究機構生命倫理委員

4.2 パブリックコメントへの参加

ヒト幹細胞を用いた臨床研究指針案に対するパブリックコメント (平成 18 年 4 月)

ヒト E S 細胞の樹立及び使用に関する指針改正へのパブリックコメント (平成 18 年 8 月)

人クローン胚研究利用作業部会中間取りまとめへのパブリックコメント (平成 18 年 8 月)

(日本組織培養学会倫理問題検討委員として)

4-2-7-3 移植免疫研究室

1. 研究体制

移植免疫研究室長：梨井 康

北沢 祐介 (東京理科大学大学院)

2. 研究内容

移植免疫寛容の誘導・維持機序の解明および免疫制御細胞療法の確立に関する研究

現在用いられている免疫抑制剤による移植医療は、移植を医療としての段階へ導きはしたが、半永久的な投与による副作用、精神的および経済的な負担が大きい為、新たな拒絶反応抑制方法の確立が切望されている。一方、胚性幹細胞または自己の体性幹細胞を用いた再生医療がまだ研究段階であり、臨床への応用には長期的時間を要する。そこで、患者自身の生態系と免疫系を利用して拒絶反応を制御する方法が最も効率よく且つ安全と考えられる。近年、制御性 T (Treg) 細胞が発見され、生態系から取り除くと自己免疫疾患を引き起こすことから、自己免疫疾患の原因の究明に大きな役割をもたらしている。また、この細胞集団は生体の免疫反応を抑制することから、将来的に自己免疫疾患を始め、アレルギー、臓器移植といった分野における免疫制御機序の解明および免疫制御を目的とした細胞療法の新たな細胞候補として注目を浴びている。

移植免疫研究室は、長年わたって移植後免疫寛容の誘導・維持機序の解明について研究を取り込んできた。その中、生体肝移植後免疫抑制剤完全離脱患者、移植後免疫寛容ラットおよび養子移植モデルを用いて解析した結果、寛容患者又は動物末梢血中 Treg 細胞の割合の増加を確認できた。また、末梢血リンパ球の DNA チップ解析から、リンパ球の活性化に関与する副刺激シグナル分子群に属する遺伝子および転写制御因子が、今まで考えられていた以上に移植後免疫寛容状態に深く関わっていること、Treg の抑制作用機序に関連する多数の遺伝子の変化を明らかにした (Liver Transpl 10(3): 379-91, 2004;

Liver Transpl 10(6):743-7, 2004; Int Surg In press)。我々の研究で、これらの免疫抑制に関与する分子を発現する免疫担当細胞の機能解析および、免疫制御機能を持つ細胞への分化誘導機構の解明が、現在望まれている新たな免疫制御療法確立への次の一手であることを確信している。以上の研究成果を踏まえて、我々は移植における Treg 細胞集団の起源および活性化の機序を探り、免疫寛容との繋がり解明および免疫制御細胞療法の確立を研究目標とした。

昨年度は、我々は Treg 細胞を用い、新たな拒絶反応抑制方法の確立するための基礎実験として、この細胞の分離システムを構築し、報告された抑制機能を再確認した上、新たな抑制に関与する分子およびメカニズムの解析を試みした。Treg 細胞免疫制御機能の PD-1/PD-L1 経路の関与について、抗 CD3 抗体およびアロ APC 細胞存在下での Treg 細胞による細胞増殖抑制機能が抗 PD-L1 抗体によって解除されたことが確認できた。また、マウス GvHD モデルにて、In vivo での Treg 細胞免疫制御機能における PD-1/PD-L1 経路の関与について検討したところ、Total 細胞群に抗 PD-L1 抗体を投与した群では、CD25-群と同様に早期に GvHD の発症が確認でき、抗 PD-L1 抗体による Treg 細胞の抑制機能が解除された事を明らかにした。さらに、皮膚移植モデルにおいては、CD4+CD25-、Treg 細胞混合細胞養子移植群において抗 PD-L1 抗体投与し、CD4+CD25-群と同様に皮膚の拒絶が確認できた。これらの結果から、PD-1/PD-L1 経路が Treg 細胞の免疫制御機能および免疫寛容の誘導・維持に関与していることを明らかにした (Transplantation, 83(6):774-782; 2007.)。

今年度は、生体内の数少ない Treg 細胞の持つ免疫反応抑制能および免疫寛容誘導能の臨床応用に向けて、Treg 細胞の増殖作用を有する抗 CD28superagonist 抗体 (SupCD28 抗体) を用い、(1) Treg 細胞の増殖システムの構築; (2) 増殖した Treg 細胞の細胞増殖反応抑制およびその起源の検証; (3) GvHD、心臓移植モデルの免疫抑制効果について検討を行った。まず、我々は 4-6 週齢の Lewis ラットに SupCD28 抗体 1mg を投与し、3 日後各末梢リンパ組織の CD4、CD25 陽性細胞の割合が通常 2-3% から 14% にまで上昇し、IL-2、IL-4、IL-10 発現の増強が確認できた。また、SupCD28 抗体処置群由来リンパ球集団が抗体またはアロ抗原刺激による T 細胞の増殖反応を抑制し、GvHD の発症を抑制したことを明らかにした。次に、我々は natural occurring Treg (自然発生型 Treg, nTreg) 細胞のマスター遺伝子である FoxP3 を指標に、この抗体で増殖した CD4、CD25 陽性細胞の nTreg との比較およびその起源について検討を行った。MACS にて分離した増殖した CD4、CD25 陽性細胞が FoxP3、CTLA-4、IL-10 等分子を高発現し、nTreg 細胞と同様の細胞増殖抑制を有していた。また、SupCD28 抗体は nTreg 細胞を優位に増殖させ、増殖した Treg 細胞の起源は nTreg 細胞であることを明らかにした。最後に、我々は同系ラット心臓移植モデルを用い、SupCD28 抗体の投与による心臓移植片の顕著な生着延長効果を確認した。その移植片生着延長効果は、末梢血中のみならず、移植片中浸潤細胞の FoxP3 陽性 Treg 細胞数が増加していることを明らかにした。SupCD28 抗体により増殖した Treg 細胞による免疫抑制機序の関与が示唆された。これらの研究結果から、Treg 細胞のもつ免疫寛容誘導・維持機構の一端が明らかとなり、また、人為的に増殖させた Treg 細胞の動物モデルにおける有用性が示されたことから、Treg 細胞を用いた免疫制御細胞療法の確立および移植医療への応用に、さらなる展望が開けたものと期待する。