

#### 4-2-7 移植・外科研究部（移植免疫研究室、実験外科研究室）

##### 1. 概要

当研究部は、平成 16 年 2 月に浅原弘嗣が移植・外科研究部長として就任し、移植あるいは外科的再建による疾患において、再生医学的なアプローチを応用、導入することを目標とした研究を開始した。

実験外科研究室長：絵野沢 伸

移植免疫研究室長：梨井 康

成育社会医学研究部・成育生態学研究室長：田中輝幸（平成 18 年 1 月着任）

流動研究員：橋本徳、味八木茂、工藤寛枝

共同研究員：横山成俊（JST 研究補助員）、浅田真紀（大塚製薬株式会社）、大森槇（東京薬科大学）、長田忠大（北海道大学大学院博士課程）、佐久間健治（東京農業大学大学院修士課程）、沢田愛可（東京バイオテクノロジー専門学校）、鈴木崇将（東京医薬専門学校）、内藤広信（東京医薬専門学校）、永井茜（東京農業大学大学院修士課程）、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（岡山大学大学院博士課程）、日方智宏（慶応大学大学院博士課程）、堀内真千子（東京医科歯科大学大学院博士課程）、三浦隆雄（東京農業大学）、山下聡（東京医科歯科大学大学院博士課程）、石飛博之（筑波大学大学院修士課程）

北沢 祐介（東京理科大学大学院）、宮本義孝（ヒューマンサイエンス流動研究員）、張 慧き（医療機器センターリサーチレジデント）

研究補助員：坂口みき（H17/1-5）、藤田佳容（H17/5-7）、泉久保樹音（H17/9-）

発生を制御する新しいパラメーターとして、DNA とヒストンの複合体であるクロマチンとその制御ファクターが注目されている。クロマチンのアセチル化、メチル化、リン酸化修飾は遺伝子発現制御において DNA コドンに勝るともおとらないインパクトをもっていることから、幹細胞の分化制御をモデルとして、新しいクロマチン制御機構の解明と発生・分化に関わるクロマチン修飾ファクターの同定とその意義の研究を行っている。以上の研究を遂行することで、基礎研究分野において、さらにクロマチンを介した発生分化制御のメカニズムの解明を進めると同時に、その臨床応用、特に外科、整形外科領域における移植、再生技術への応用を推進し、患者、社会への還元と科学を追求する。

##### 2. 研究内容

###### 2.1 再生医療に関する研究

###### 2.1.1 幹細胞の分化制御におけるエピジェネティクス

発生学において生物の形作りの巧緻性および多様性は、HOX をはじめとした DNA 結合型の転写因子の存在に加え、それら転写因子活性の細かな調節によって制御されていると考えられる。私たちは発生を制御する新しいパラメーターとして、DNA とヒストンの複合体であるクロマチンとその制御ファクターに注目してきた。遺伝子発現制御におけるクロマチンのアセチル化、メチル化、リン酸化修飾の役割は DNA コドンに勝るともおとらないインパクトをもっていることから、私たちはstem細胞の分化制御をモデルとして、その新しい分子生物学に参入、その研究のなかから、新しいクロマチン制御機構の発見とstem細胞の分化に関わるクロマチン修飾ファクターの同定をおこなっている。

###### 1) 発生・分化に関わるクロマチン修飾因子の網羅的スクリーニングとその機能解析

リウマチなどの炎症性関節疾患では関節軟骨が破壊され、数多くの患者を強く苦しめている。再生しないと言われている関節軟骨がどうすれば再生するのかを追究するために、まず胎児期の四肢の発生における正常な軟骨・骨組織の分化を研究してきた。軟骨細胞の分化においては、特に軟骨特異的マトリックスタンパク質の発現を制御する転写因子と転写コファクターに注目し、転写因子

CREB が内軟骨性骨化に必要であること (Long F., et al., Development 128(4):541-50. 2001) コファクター p300 が転写活性化およびクロマチン組立てという二面性の役割を持つこと (Asahara H., et al., Mol Cell Biol. 22(9):2974-83. 2002) CBP/p300 が軟骨分化における基本的な転写因子である Sox9 と相互作用して、軟骨特異的基質の発現調節を行っていることを見出した (Tsuda M., et al., J Biol Chem. 278(29):27224-9. 2003) これは、発生分化におけるクロマチン修飾因子の重要性を示した最初期の報告である。

軟骨分化における転写因子・転写コファクターの重要性については、四肢発生で Sox9 と転写コファクター PGC-1 が同ステージ同部位に共発現することの発見から、PGC-1 と Sox9 の軟骨分化における協調作用を報告した (Kawakami Y., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102(7):2414-9. 2005) また、Smad3 が Sox9 および CBP/p300 と相互作用して軟骨分化が行われること (Furumatsu T., et al., J Biol Chem. 280(9):8343-50. 2005) Sox9 と p300 の相互作用はクロマチン上で転写促進作用を示すこと (Furumatsu T., et al., J Biol Chem. 280(42):35203-8. 2005) を報告した。

生命の形態形成は胚発生において決定される。四肢の形態形成は骨軟骨組織の発生・分化によって行われ、そこでは数多くの遺伝子が秩序だって、組織特異的(空間的)あるいは発生段階特異的(時間的)に発現することが必要であるが、その全容は明らかになっていない。われわれの目的は、この複雑な遺伝子の発現量・タイミングの制御を行っている新たなメカニズムの解明であり、そのためにまず、遺伝子発現(転写)をつかさどる重要な因子である転写因子・転写コファクター自身の発現部位・時期を網羅的に確定するデータベースが必要と考えた。現在世界で公開されている遺伝子発現データベースは、ほとんどが DNA マイクロアレイの結果の集積であり、*in situ*のデータベースは少ない。われわれの知る限りにおいてこのような大規模データベースとしては、英エジンバラ大学の EMAGE (データ数にして約 1,700) および、米ハーバード大(約 1,000 個の転写因子について 1 ステージ)があるが、転写因子数および発生ステージのバラエティから考えるとまだ不十分である。

我々は、約 1,600 種類とされている核内の全転写因子・転写コファクターについてマウス胎仔を用いたホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことによって、世界最大にして最終的な転写因子・転写コファクターの全身での発現データベースを構築する。2006 年 3 月の時点で、E9.5、E10.5、E11.5 の 3 ステージで約 1,400 因子について作業が終了しており、今年内に 1,600 因子について完了する予定である。その組織特異的(空間的)また発生段階特異的(時間的)な発現のデータを蓄積して比較することにより、転写因子の機能・相互作用についてのスクリーニングとする。

その中で、特に四肢発生に関わるとさ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。

機能スクリーニングとしては、ハイスループット・トランスフェクション・スクリーニングを構築している。軟骨基質タンパク質の発現に関与する因子を網羅的に検出するために、II 型コラーゲン遺伝子のプロモーターを組み込んだレポータープラスミドと共に、約 16,000 種類のヒト遺伝子発現プラスミドを細胞に共導入し、ルシフェラーゼアッセイによって転写活性化能を検出するスクリーニング系である。世界でも数カ所で行われておらず、日本では初となる本システムによって、液性因子、受容体、シグナル系、転写関連因子など全ての因子で転写活性に影響するものをゲノムワイドに検出することができる。2006 年 3 月の時点で、約 6,000 個のヒト発現プラスミドライブラリ (MGC clone) の 384 穴プレート上への配置が完了しており、スモールスケールで良好な再現性が得られたので、本アッセイへの準備を進めている。また、東大医科研菅野ラボラによって開発された FLJ clone コレクション(約 3 万クローン)を提供され、その中から重複を除いて約 1 万クローンを選抜、プレートへの配列を準備している。

軟骨細胞分化において重要な転写因子 SOX9 は、同じく発生期の生殖原基でも発現しており、性分

化における役割の重要性が言われている。しかし、軟骨分化および生殖原基で SOX9 が発現を調節している標的遺伝子の全貌は明らかではなく、その組織特異性は未解明である。そこで、クロマチン免疫沈降とプロモーターアレイチップを組み合わせた ChIP on Chip 法による転写因子の標的遺伝子のスクリーニングを行う。ヒト初代培養関節軟骨細胞、ヒト間葉系幹細胞、マウス軟骨初代培養細胞、マウス初代培養セルトリ細胞などを材料に、抗 SOX9 抗体によるクロマチン免疫沈降を行い、精製・断片化したゲノム DNA を Affymetrix 社が開発した新型プロモーターアレイチップにハイブリダイズさせ、SOX9 がゲノム上に結合する位置を、網羅的に検出する。また、このアレイの結果の解析法はいまだ確立されておらず、効率的に解析するソフトウェアの開発も行う予定である。

## 2) 間葉系細胞の分化に関わる miRNA の研究

18~25 塩基の非翻訳 RNA である microRNA (miRNA) は、現在 200 種類以上あるといわれている。miRNA は、部分的な相補性をもつ標的 mRNA の 3'-UTR に結合して翻訳を抑制することが明らかになってきており、発生・分化制御機構に重要な役割があると考えられる。この機構の解明は、疾患に対する新たなアプローチとなる可能性がある。そこで我々は、幹細胞などの未分化細胞から軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞への各々の分化に関与する miRNA を同定する。miRNA の発現を評価する DNA マイクロアレイを用いてスクリーニングし、現在までに、筋分化特異的、軟骨分化特異的に発現する miRNA を同定した。これら miRNA の発現期における *insitu* ハイブリダイゼーションにより発現パターン解析や標的 mRNA の同定を含めて、現在研究を進めている。

### 2.1.2 新規医療技術・機器開発に関する研究

#### 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

血液透析あるいは濾過と血漿交換を組み合わせた血液浄化法は中空糸カラムの出現により急速に発展し、現在、劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹をなしている。しかしながら、亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上が得られないことや、大量の血漿が必要であることや血漿の感染リスク等、問題点も数多い。さらに、脳死肝移植や近年広く普及している生体部分肝移植後の救援治療としてはまだ不十分である。本研究では血液浄化システムに細胞構成成分を組み込み、生体が有する選択性と能動輸送能力を人工構築し、不要分子のみを排除する効率的な治療機器の開発を試みている。

細胞そのものを利用したバイオ人工臓器（回流式バイオ人工肝、二区画式バイオ血液浄化装置）の作成を試みたが、これらは使用の難度が高く、また品質管理が難しいために汎用医療機器化は困難と考えられた。そこで現行の血液浄化法に対し全く異なった概念による新しい治療法を、ナノテクノロジー技術の一つである人工プロテオリポソームの利用により確立することとした。

リポソームの医療材料化のために、有機溶媒を用いず、連続的に作製することが必要と考え、透析カラムによってリポソームを作成する方法を確立した。サブミクロンアナライザーによる粒径測定ならびに電子顕微鏡観察でも平均値 100nm 径の均一なリポソームが得られることがわかった。ミリグラムスケールのトランスポータータンパク MDR1 を Baculovirus と昆虫細胞 (Sf-9) を用いて大量に得る実験系を導入した。トランスポーターあるいはリポソームの機能と形態の検討には放射性ジゴキシンとの結合アッセイで、MDR プロテオリポソームは ATP 存在下で放射性ジゴキシンを特異的に吸着することがわかった。さらに、最近生物学的化石燃料として注目されているポリリン酸とポリリン酸キナーゼ系を組み合わせることによって ATP の自律的リサイクル系を構築、ADP とポリリン酸、ポリリン酸キナーゼの存在下で本反応が進むことを確認した。

#### 2) 胎児治療デバイスの開発

医療機器の発達により、内視鏡手術の適応範囲がめざましく広がっている。成育医療分野では、その発展形としての胎児治療デバイスの開発が重要なテーマである。そこで、把持・剥離・縫合を

行うためのロボット手術器の開発を開始した。ロボット設計に必要な力学的データを得るため、ロボット胎児皮膚の粘弾性特性(最大ひずみ、残留ひずみ、疲労)と組織学的変化について検討を行った。胎児皮膚の力学的破断点は4kPa(パスカル)であるが、形態的には粘膜固有層の破壊は著明でなく、術後の再生が十分に期待できることがわかった。

一方、胎児手術では迅速な操作が必要なことから、通常の縫合に代わる術式が望まれている。そこで、種々の細胞の培養基材として非常に有効性が認められる硝子化コラーゲン膜に着目した。皮膚切開後コラーゲン膜を貼付すると、線維芽細胞が集まり、膜内へ浸潤する像が見られた。本膜を基質として、胎児患部の封鎖を上皮再生によって行うための検討を行っている。

### 3)再生医療における死亡胎児の利用に関する調査研究

文献及び実地調査により、国内外における死亡胎児由来組織・細胞の医学研究における使用状況と科学的倫理的妥当性の考察を行った。この結果をもとに、幹細胞の種類を軸に再生医療を分類して、市民へのアンケートを企画、実行した。(NPO)HAB 研究機構の市民公開シンポジウム参加者 450 名に配布し、回収率は 49.8%だったが、設問の回答率は 87%から 100%と高かった。再生医療と ES 細胞の言葉の認知度は 80%、76%と高かったが、間葉系幹細胞、体性幹細胞、胎児由来幹細胞は 24%~38%であった。再生医療研究に関しては、ES 細胞、胎児由来幹細胞利用に 22, 24%が積極推進と答えたのに対し、間葉系幹細胞、体性幹細胞利用には 50%、41%が積極推進と回答。これは本人の細胞を用いることができることが理由と考えられた。ES 細胞や胎児由来幹細胞利用再生医療に消極的の回答を寄せた理由としては、受精卵の滅失や中絶胎児由来であること、医学的效果が未確認という理由が挙げられた。中絶胎児の研究利用については、否定的意見が多数を占めたが、脊髄損傷やパーキンソン病の治療が試みられていることについては肯定的意見が多数あり、具体的に病んでいる人が見えると研究に共感する傾向が見られた。調査対象が健康や医療に関心の高い方々であり、今回の結果が一般市民全体を代表するものではないと思われるが、一方で、このような意識の高い方々であるからこそ、一般市民を代表して専門家集団へ適格な提言ができたものと考えられた。

## 2.2 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

### 2.2.1 制御性リンパ球(Treg)免疫制御機能のPD-1/PD-L1経路の関与について

我々はTregを用い、臓器移植拒絶反応を緩和させ、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、新たな抑制に関する分子およびメカニズムの解析を試みた。これらの実験結果を基に移植免疫寛容における制御メカニズムの解明および新たな治療法の確立に役立てたいと考えている。Treg免疫制御機能のPD-1/PD-L1経路の関与について、抗CD3抗体およびアローAPC細胞存在下でのTreg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。マウスGvHD、皮膚移植モデルを用い、In vivoでのTreg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。GvHDモデルでは、Total B6脾臓由来リンパ球を投与した群よりCD25+細胞除いた群(CD25-群)において早期に宿主であるNOD/ScidマウスのGvHD発症が確認できたことからCD25+細胞がTreg細胞の抑制機能に関与し、結果としてGvHDの発症を抑制した。そこで、Total細胞群に抗PD-L1抗体を投与したところ、CD25-群と同様に早期にGvHDの発症が確認できたことから抗PD-L1抗体によるCD25+細胞の抑制機能が解除されたのではないかと考えられた。一方、皮膚移植モデルにおいては、Balb/cマウス皮膚がB6マウス由来CD4+CD25-細胞養子移植したRag2KO/B6マウスに拒絶されたが、CD4+CD25+細胞群および等量のCD4+CD25-、CD4+CD25+混合細胞養子移植群においては長期の生着が確認できた。これはTregが拒絶反応を抑制していると考えられた。そこで、CD4+CD25-、CD4+CD25+混合細胞養子移植群において抗PD-L1抗体したところ、CD4+CD25-群と同様に皮膚の拒絶が確認できた。以上、抗PD-L1抗体の投与によるTreg細胞の免疫抑制効果が解除された結果から、PD-1/PD-L1経路がTreg

の免疫制御機能に関与していることを明らかにした。

我々は、ICOS に対する抗体および CTLA4Ig アデノウイルスベクターを用い、ICOS/B7h 経路、CD28-CTLA4/B7 経路を選択的に阻害することにより、補助シグナル経路の臓器特性を解析し、移植臓器に対する拒絶反応阻止効果、免疫寛容導入・維持とその作用機序について検討した。臓器移植急性拒絶モデルとしてラット同種 (DA to Lewis) 同所性肝移植、異所性心移植モデルを用いた。移植後移植片の生着延長効果を抗ラット ICOS 抗体単独投与および CTLA4Ig アデノウイルスベクターとの併用について検討を行った。レシピエントの生着日数については抗ラット ICOS 抗体単独投与することにより同種ラット肝移植モデルにおいては、有意な生存延長効果が得られた。しかし、心移植モデルにおいては効果を認めなかった。その生存延長効果は T 細胞活性化と増殖の抑制に関係することがわかった。また、CTLA4Ig アデノウイルスベクターとの併用によって何れのモデルとも安定した免疫寛容の誘導ができた。一方、免疫寛容ラットの移植片が 100 日を超えた後、末梢血のリンパ球を分離した。その後 FACS にて細胞表面の分子について解析を行い、CD4+、CD25+ 細胞集団が Naive のラットより有意に増加していることを明らかにした。さらに、免疫寛容動物から得られたリンパ球の養子移植実験を行い、control 群に対して、免疫寛容ラットから分離したリンパ球を養子移植した群の心移植片の生着期間が顕著な延長が見られた。これらの研究結果により抗 ICOS 抗体による T 細胞の活性化を ICOS/B7h 経路を阻害するだけでは、免疫反応を抑制効果があったもので、寛容誘導することができなかった。しかし、CTLA4Ig アデノウイルスベクターの併用で CD28-CTLA4/B7 経路を通して抗原提示細胞の活性を抑制することで、安定な免疫寛容状態の誘導および維持ができた。

## 2.2.2 幹細胞システムを用いた移植医療への応用に関する研究

間葉系幹細胞は細胞表面の特殊な性質によって非免疫原性という特性を持ち、特定の環境において免疫細胞の活性を抑制する作用を示すことから、移植時免疫寛容の誘導等の可能性が期待されている。ラットの骨髓およびヒト臍帯血内の幹細胞の機能解析を現在精力的に行っている。特に間葉系幹細胞の同定に力をいれており、臍帯血の有核細胞を用いて、間葉系幹細胞の分離・培養方法を開発した。分離出来た間葉系幹細胞の表面マーカーについて検討を行い、ヒト骨髓由来の間葉系幹細胞との比較したところ、同じであることを確認した。また、間葉系幹細胞の骨芽、脂肪細胞への分化誘導のための培養条件についても検討を行い、これら細胞への分化を染色にて確認した。さらに、間葉系幹細胞への遺伝子導入について GFP 遺伝子を組み込んだアデノ、レンチ二種類のウイルスベクターを用いて比較検討を行い、遺伝子導入後の発現効率、発現期間および細胞の毒性等において、レンチウイルスベクターが間葉系幹細胞への遺伝子導入には有用であることを明らかにした(Lu, et.al, J Lab Clin Med 146:271-278; 2005, Terai, et.al, Mol. Cell. Biol. 16(3):1491-9; 2005. )。現在本細胞の免疫制御機能の解析を進めている。このような幹細胞の移植免疫抑制への利用が可能になれば、拒絶反応抑制に用いる細胞の採取に関しても選択の幅が大きく広がる。また、本研究は幹細胞を利用した新たな移植免疫抑制の方法を開発する医療の面に留まらず、免疫系および幹細胞系それぞれの細胞系統間の相互作用、幹細胞の免疫系への関与、分化機序およびその生理学的な意味の解明といった基礎医学に寄与する事ができると期待される。

## 3. 医療行政への貢献

### 3.1 公共的ヒト組織バンクシステム構築に関する検討

創薬や再生医学研究の基盤としてヒト組織の研究利用システムの構築は本邦において急務である。欧米では移植医療ネットワークから派生して、移植不適合臓器の研究利用システムがすでに構築されているが、日本では脳死体からの移植不適合臓器の研究利用は法的に不可能なため、手術摘出組織が研究用ヒト組織のソースと考えられている。

組織提供の入り口である、インフォームドコンセントの成立の合理性について検討した。インフ

フォームドコンセントは十分な説明の上の同意と訳されるが、同意を強制するものであってはならない。そこで説明を受ける者(患者)が拒否する権利をできるだけ無理なく行使できるよう配慮した、問合せと説明の2段階法について検討した。この方式に則り、東京医科大学外科第三講座と共同で、手術摘出肝組織の公共バンクへの提供システムを作り、国立成育医療センターならびに東京医科大学倫理委員会に申請し、許可を得た。一方、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより検体分譲を受け、10名の肝組織から、日本人由来としては初のプールドミクロソームを調製し、その薬物代謝能などの情報を加え、即戦力創薬資源として同バンクに再提供した。