

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（SBM）、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

分子生物学・遺伝学的手法とポストゲノミックアプローチを融合したシステムズ・バイオメディスン研究プラットフォームを提唱し、四肢・脳神経等の形成を支えるネットワークの解明を進めている。ヒトの成育を時間軸に沿った遺伝子-細胞-器官-個体の多元的システムと捉え、相乗的に増大するデータを解析するデータベースとツールの整備により、Evidence-based medicine (EBM) の確固たる基盤を提供する。

1. マウス胚における Whole mount *in situ* hybridization (WISH) による発現データベースの構築
2. ヒト遺伝子発現ライブラリーを用いた High-through put Transfection Assay システムによる新規治療標的因子の探索
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成と解析
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

1.2 研究体制

部長 浅原弘嗣（平成16年2月～）

室長 田中輝幸（平成18年1月～平成19年9月、移植・外科研究部に所属、成育社会医学研究部・成育生態学研究室長、平成19年10月～共同研究員、東京大学大学院医学系研究科 准教授）

室長 國府 力（平成19年11月～移植・外科研究部に所属、成育社会医学研究部・成育生態学研究室長）

流動研究員 味八木茂（～平成19年6月、平成19年7月～共同研究員、平成19年10月～HS 海外派遣研究員：スクリプス研究所）、工藤寛枝（平成17年6月～平成19年9月、平成19年10月～HS 流動研究員）、横山成俊（共同研究員～平成19年6月、平成19年7月～）、吉鷹輝仁（共同研究員平成19年4月～9月、平成19年10月～）

日本学術振興会特別研究員 井上敦（平成19年4月～）

共同研究員 浅田真紀（東京医科歯科大学大学院、大塚製薬株式会社）、安東正貴（日本電気株式会社）、泉奈都子（早稲田大学）、伊藤禎晃（東京理科大学）、伊藤義晃（東京医科歯科大学大学院）、岩城敬博（東京医科歯科大学大学院）、内部健太（岡山大学大学院）、大久保敦子（広島大学大学院）、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）、工藤卓也（北里大学）、小谷智子（東京バイオテクノロジー専門学校）、佐久間健治（東京農業大学大学院）、佐藤天平（東京医科歯科大学大学院）、竹本風子（東京薬科大学大学院）、土屋恵（ゲノムネットワークプロジェクト研究員）、都築さやか（東京薬科大学）、鳥内直哉（東京医科歯科大学大学院）、中佐智幸（広島大学大学院）、永井茜（東京農業大学大学院）、箱崎敦志（大鵬薬品工業株式会社）、橋本徳（独立行政法人医薬基盤研究所研究員）、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）、平澤英幸（産業医科大学大学院）、福田憲嗣（東京医科歯科大学大学院）、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）、光岡一彦（株式会社 JAPACOCO）、山崎敏正（九州工業大学教授）、山下聡（東京医科歯科大学大学院）、ヨーレル・リンドマン（東京医科歯科大学大学院）、渡邊紀（日本女子大学）、渡邊隆司（東京医科歯科大学大学院、大塚製薬株式会社）

研究補助員 泉久保樹音(平成 17 年 8 月～)、沢田愛可(平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月)、清水浩仁(平成 18 年 4 月～)、鈴木啓子(平成 19 年 9 月～)、木曾美奈子(平成 19 年 11 月～)、依田真由子(平成 19 年 12 月～)、大坂行成(平成 19 年 12 月～)

[共同研究体制]

- 1) 米国スクリプス研究所
- 2) 米国アレン研究所
- 3) 米ソーク研究所
- 4) スペイン国立幹細胞研究所
- 5) 大塚製薬株式会社藤井記念研究所 所長 住田卓美
- 6) 大塚製薬株式会社探索第三研究所 所長 石山広信
- 7) 参天製薬株式会社研究開発センター グループマネージャー 青野浩之
- 8) 大鵬薬品工業株式会社創薬研究所 主任研究員 生澤公一
- 9) 日本電気株式会社 NEC バイオ IT 事業推進センター マネージャー 山崎敏正
- 10) 北里大学理学部生物化学科分子発生学講座 教授 花岡和則(癌、炎症・アレルギー、眼科疾患における創薬ターゲット遺伝子の同定)
- 11) 国立遺伝学研究所初期発生研究部 准教授 川上浩一(ゼブラフィッシュを用いたボディープラン遺伝子ネットワークの解析)
- 12) 理化学研究所遺伝子多型センター チームリーダー 池川志郎(骨系統疾患の分子遺伝学的研究)
- 13) 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学小児科学講座 教授 大藺恵一(骨系統疾患の分子レベルでの病態解明)
- 14) 京都大学医学部再生医科学研究所再生誘導研究分野 教授 山中伸弥(間葉系幹細胞よりの多能性幹細胞の樹立)
- 15) 国立成育医療センター第 2 専門診療部 部長 高山真一郎(四肢先天異常疾患の臨床的検討)
- 16) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学人体構成学 准教授 西田圭一郎(四肢の正常発生および先天異常に対する組織学的検討)
- 17) 国立成育医療センター研究所生殖医療研究部生殖技術研究室 室長 阿久津英憲(エピジェネティックスレベルでの骨細胞分化メカニズムの解明)
- 18) ハイロックス社(ロータリーヘッド実体顕微鏡および新規 3D 画像ファイル規格の開発)

2. 研究内容

2.1 マウス胚におけるホ Whole mount *in situ* hybridization (WISH) による発現データベース (EMBRYS) の構築

脊椎動物の体の形づくりにおいては、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、最終目標としては全遺伝子(約 2 万)の発現パターンの同定を行う。これまでに E9.5、E10.5、E11.5 の 3 ステージのマウス胚において、まず遺伝子発現(転写)の主役である 1,700 個の転写因子・転写コファクターについて WISH を行った。WISH 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、本プロジェクトによる全身についてのマウス胚 *in situ* hybridization による発現データ蓄積量は、世界最大規模である。

2007 年 12 月の時点では、約 1,700 因子についての WISH 画像データを、インターネット上で EMBRYS データベースとしての公開に向けて準備中である。これまで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と思われる発現様式を示すものについては、ヒト間葉系幹細胞の分化モデルにおいて強発現や siRNA などを用いたノックダウンアッセイ、さらにノックアウトマウスの作成などを行い解析中である。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(東京)と共同研究でロータリーヘッド実体顕微鏡および新規 3D 画像ファイル規格の開発を行

い、さらにウェブ上での提示法について検討している。

2.2 ヒト遺伝子発現ライブラリーを用いた High-through put Transfection Assay 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、創薬のターゲットの発見に大きく貢献すると考えられる。本年度は前年度に構築したレポーターアッセイによるハイスループット遺伝子スクリーニング系を用いた以下の網羅的探索を試みた。

2.2.1 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ハイスループットスクリーニング

抗炎症薬として使用されているグルココルチコイド (GC) は、全身で多様な作用を示す。GC が結合したグルココルチコイド受容体 (GR) は、核内移行した後にゲノム上の GR 応答領域 (GRE) に結合し糖新生、骨代謝等のステロイドの副作用に関与する遺伝子の転写を調節する。GR はほぼ全身に発現するが、ステロイドの組織特異的な作用発現には組織特異的な協調因子が存在していると考えられる。そこで GRE を介した転写誘導に関与する新規因子を探索するため、GRE レポーターアッセイにより 6,000 クロンのヒト cDNA ライブラリーより網羅的探索を試みた。1st および 2nd スクリーニングより 98 クロンを選択し、さらにリガンド依存的に GR の転写活性を促進する 27 個の遺伝子を見出した。現在糖新生モデル、間葉系幹細胞の脂肪分化系を用い機能解析を行っている。

2.2.2 TGF- β のシグナル伝達における Smad3 の新規 cofactor の探索

TGF- β は癌や肝硬変のような線維化疾患の病態における主要な因子である。TGF- β のシグナルを制御する因子はこれらの疾患の治療薬のターゲットとなりうる。そこで TGF- β のシグナル伝達において中心的な役割を果たす Smad3 の新規 cofactor を探索する目的で TARE (TGF-beta and Activin Response Element) ルシフェラーゼレポーターを用いて、MGC のライブラリー約 6,000 遺伝子のスクリーニングを行った。1 次スクリーニングの結果、Smad3 による転写を up regulate するものは標準化変量 (STD) 3 以上が 26 遺伝子だった。また down regulate するものは STD-2 以下が 26 遺伝子だった。上位の遺伝子には既に Smad3 との結合が報告されているものや、TGF- β 受容体との結合が報告されているものが含まれており、本スクリーニング系の妥当性が示唆された。また、ほとんど解析されていない遺伝子も複数含まれ、今後機能解析を検討する。

2.3 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

ヒト SOX9 は、その遺伝子もしくは近傍の変異や転位により手足が短く屈曲し全く石灰化しないなどの特徴を持ち、遺伝型が雄性 XY の約 2/3 で雌性化が見られるヒト先天性骨奇形症候群 Campomelic dysplasia を引き起こす原因遺伝子であることが示されている。すなわち、SOX9 は軟骨、精巣の組織の形成に重要である。

Sox9 は軟骨組織では、多段階に渡る分化の過程において広範囲に発現し、*Col2a1*、*Col11a2*、*Aggrecan* などの遺伝子の発現を制御することにより初期軟骨形成に促進的に働いている転写因子である。また、性分化の過程においては将来生殖器となる生殖隆起の領域に雄特異的に発現し、*Amh* などの発現を制御して細精管の支持細胞であるセルトリ細胞の分化を促進し、精巣の形成を促進する。しかし、それぞれの組織形成の重要性にも関わらず、その標的遺伝子の多くや、その制御機構など、多くのことが不明のままである。

近年、転写因子の制御遺伝子の新規探索法として ChIP-chip 法が構築された。この解析法はクロマチン免疫沈降法 (Chromatin ImmunoPrecipitation: ChIP) とマイクロアレイ解析を組み合わせた方法であり、ゲノムレベルで Sox9 の結合位置、つまり制御遺伝子を探索することができる。本研究では、この ChIP-chip 法を用いて軟骨、セルトリ細胞内での Sox9 の制御遺伝子を探索した。マウス肋軟骨由来の軟骨細胞、雄マウスのセルトリ細胞を初代培養して試料とした。それぞれの細胞で、全遺伝子のプロモーター領域に対するオリゴを配置させた Promoter Array を用いて ChIP-chip を行い、さらに、shRNA により Sox9 発現抑制を行い、マイクロアレイにて解析し、それぞれの細胞での Sox9 の制御遺伝子候補を同定した。

これらの解析により軟骨細胞での Sox9 制御遺伝子候補の中に軟骨の後期分化に関わり、軟骨分化における発現、機能において Sox9 とは対の機能を持つ転写因子 Runx2 の機能、発現を抑制する遺伝

子が含まれていた。詳細な解析により、これらが Sox9 の直接の標的遺伝子であること、これらを介して Sox9 が軟骨の後期分化を抑制していることを示唆する結果を得た。

これらの結果は軟骨細胞において、Sox9 は Runx2 の発現、機能を、標的遺伝子を介して制御することで、秩序だった軟骨分化を実行していることを示唆した。

2.4 遺伝子改変マウスの作製と解析

2.4.1 遺伝子改変マウス作製のためのシステム構築

遺伝子組み換えマウス作製のためのシステムを設置すると同時に、様々な遺伝子に対応する‘ノックインユニバーサルベクター’を構築し、相同組み替え体 ES 細胞株を取得、マイクロインジェクションによってキメラマウスを取得した。現在、それぞれのノックインマウスラインを取得するため、当該キメラマウスの交配を大規模に行っている。

2.4.2 米国 Baygenomics 社より購入したジーントラップ ES 細胞株のリクローニング及びキメラマウスの作製

Sry-related HMG box9 (*Sox9*) の転写コファクターおよび上下流遺伝子を探索するための *in vivo* スクリーニング(マウス胚における WISH による発現解析)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 細胞株を米国 Baygenomics 社より購入し、当該遺伝子の転写制御ネットワークを構築することを目的とし、ジーントラップマウスの作製および解析を行った。

Baygenomics 社より購入した ES 細胞株の核型解析を行ったところ、ほとんどの細胞株が正常な染色体数 40 本を維持しておらず、60%以上が異常な染色体を持った ES 細胞株であった。そのため、全てのクローンに関してリクローニングを行った後に、マイクロインジェクション法によるキメラマウスの作製を行った。2006 年度から 2007 年度前期にかけて 12 遺伝子全ての ES 細胞株においてキメラマウスを作製した。それらのキメラマウスを交配し、現在までにジーントラップマウス 3 ラインを取得している。これらのジーントラップマウスは順次、LacZ 染色、組織学的解析、免疫染色等を用いて、各遺伝子の生体機能解析を行っている。

今後、複数のジーントラップマウスの個々の解析を詳細に進めていくと同時に、今後、各マウスをにおいて既知遺伝子の発現解析を行い、転写制御ネットワーク構築にむけた足がかりとする予定である。

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

ノンコーディング RNA の一種である microRNA (miRNA) は遺伝子発現をポストトランスクリプションレベルで調節する機能性 RNA 分子であり、発生や細胞分化などの重要な細胞プロセスに関係している。これまでヒトにおいては約 700 種類以上の miRNA が報告されており、それらの異常と疾患との関連性が明らかにされつつある。関節リウマチは関節滑膜組織の慢性的な炎症と関節破壊によって、患者に苦痛と QOL の低下を強いる重篤な病気であるが、自己免疫疾患を含め、miRNA との関連についてはほとんど明らかにされていない。

そこで関節リウマチ滑膜組織において miRNA の発現に変動があるか、総計 470 の miRNA を網羅したマイクロアレイを用いて解析を行った。その結果、対照とした変形性関節症の滑膜組織に比べて、miR-146 をはじめとして、いくつかの miRNA の発現量が上昇していた。詳細な研究により、miR-146 は関節リウマチの発症、炎症の重篤化に大きく関わっていることが考えられ、引き続きモデル動物を使った研究を行っている。炎症による自己破壊の機序をノンコーディング RNA の観点から研究することで、関節リウマチの病態解明と新しい治療法の開発が期待できる。

4-2-7-2 実験外科研究室

1. 概要

1.1 研究プロジェクト

当室は、移植・外科研究部という名称に忠実に応えることを基本に、バイオ人工臓器、胎児治療、手術摘出検体の研究利用に関する研究を行っている。臨床応用を視野に入れたトランスレーショナ

ルリサーチとなることを念頭に置き、病院外科や特殊診療部と連携を保ちながら研究を遂行している。また、社会的に受容される先端医科学研究の在り方を考える研究を行っている。

1. 新規医療技術・機器開発に関する研究

- 1) 肝細胞移植
- 2) 胎児治療用支援基材の開発

2. 医療行政への貢献

- 1) 創薬基盤としてのヒト肝細胞利用システムの構築
- 2) 先端医科学の進め方に関する研究

1.2 研究体制

室長 絵野沢 伸

共同研究員 宮本義孝（ヒューマンサイエンス財団流動研究員）、斎藤 亮（(株) インテリム）、山崎泰介（(財) 河野医学研究所）、道善公美（レッドイオンメディカル（株））、池谷武志（東洋合成工業（株））、中曽根佑一（東京理科大学理学部4年）、建島郁代（研究補助員）

2. 研究内容

2.1 新規医療技術・機器開発に関する研究

2.1.1 肝細胞移植

生体肝移植は、健常人をドナーとすることの倫理性の他、乳児劇症肝不全の予後は不良であるといった医学上の問題も内包している。近年、諸外国において肝移植の代替として肝細胞移植の報告が増加している。動物実験では劇症肝炎モデル動物の救命、延命が見られることから、移植へのつながるいは自己肝回復への橋渡しの治療としての効果が期待できる。国立成育医療センターの生体部分肝移植の特徴は、乳幼児に対する移植があることと肝の先天代謝異常治療がなされることである。前者の一部症例で、ドナー左葉外側区域では過大となり、血行不全による移植片脱落が生じる場合がある。この時は事前に左葉先端と下端を切除し、縮小した部分肝を移植する。このドナー肝余剰部が細胞移植用ソースとなり得る。先天代謝異常のレシピエント肝からは、極めて生存率良好な細胞が採取でき、他疾患に対する移植用細胞となる可能性を有する。また胆道閉鎖症のレシピエント肝は肝硬変が進んでいるが、この中の再生結節中の細胞は幹細胞的な性質を有する。

平成18年10月13日に「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（申請代表者藤本純一郎）」として承認を受け、平成19年12月までに17検体の提供をいただいた。内訳は、ドナー余剰部が3、先天代謝異常症レシピエント肝が6、胆道閉鎖症レシピエント肝検体が8だった。前2者からは常に良好な細胞が得られ、肝固有機能である薬物代謝活性や同活性誘導能が良好に検出できた。胆道閉鎖症レシピエント肝からの細胞では、非実質細胞画分にヘキスト色素排除能を指標とした幹細胞（Side Population (SP) 細胞）が検出される症例があった。この細胞集団で、幹細胞を特徴づけるトランスポーター、ABCG2が強発現していることをRT-PCRで確認した。その他、凍結保存法に関する研究を行っている。また小動物を用いた肝不全モデルに対する細胞移植治療の効果検証とブタを用いた細胞移植手技の安全性試験に着手している。本課題は、細胞治療の早期実現を目指すもので、実験的検証だけでなく、臨床研究としてのデザイン、すなわち対象疾患の選定やGCP対応細胞調製などにも力を注ぎ、近未来的実現を指向している。

2.1.2 胎児治療支援基材の開発

内視鏡下手術は従来の外科手術とは異なる点が多く、新しい支援基材が必要である。近年症例数が増加している双胎間輸血症候群（TTTS）のレーザー焼灼治療で、胎盤内部の血流をリアルタイムに可視化することを目的として、インドシアニンググリーン（ICG）を利用する蛍光特殊内視鏡の開発を行っている。

蛍光内視鏡は新興光器製作所、浜松ホトニクスと開発が進め、ほぼ臨床実機に近いものができた。

用いる ICG は肝機能検査承認薬だが、胎児に投与した場合の安全性は不明である。また、血中投与後は速やかに肝に集積、胆汁中に排泄され、半減期は5分以内であった。蛍光内視鏡で検出できる時間もほぼ同様で、胎児への投与は危険対効果の比較衡量で、あまり望ましくないと判断された。一方、ICG は組織中には30分以上の長時間に渡り存在する。そこで母体に投与し、胎盤全体を光らせると、胎児血管は陰影としてよく浮き出ることが確認できた。この時 ICG の胎盤から胎児への移行はなかった。よって TTTS 治療時の内視鏡下レーザー血管焼灼治療において、母体への ICG 投与は有効な補助術式になると予想された。

3. 医療行政への貢献

3.1 創薬基盤としてのヒト肝細胞利用システムの構築

創薬研究に必要なヒト肝細胞は、欧米から輸入されているが、十分量が確保されていない。我が国の創薬を真に推進するには、国内における供給体制の整備が必要である。また貴重なヒト由来資源を、最大限に有効利用する必要がある。

(株) アビー開発の改良型 CAS 凍結器を導入し、肝細胞凍結保存時の磁界強度の効果を調べ、最適値の存在がわかった。また凍結用溶媒の種類を検討している。細胞アレイ (PCT/JP2002/007539) で肝細胞を三次元培養する際に必要なフィーダー細胞を、事前に播種、凍結保存する技術を開発し (特願 2007-2730995)、同基板の利便性が著しく向上した。ヒト皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞から分化した肝細胞様細胞に十分量の薬物代謝活性が出現することを確認した。HAB 研究機構の人試料委員会 (委員長; 町野朔上智大学法学部教授) 委員として、心停止ドナーからの研究用検体提供の法的考察に参画した。

3.2 先端医療の進め方に関する検討

医学研究に関して指針などが整備されたが、基盤となるのは専門家自身の自律的統制である。

専門家の自律性のスタートには若い医師、医療関係者への倫理教育が必要との見地から、シカゴ大学の生命倫理学者、Charles L Bosk 氏の著書、Forgive and Remember を題材に、教育向けの資料を作った。

4. 診療活動、研究活動など

4.1 倫理審査

新規申請なし。

5. 研修、評価

5.1 セミナーの企画、進行

6. 社会的活動

6.1 所外委員会活動、学会活動

ヒトゲノムテラメード研究推進委員

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、編集幹事長

4-2-7-3 移植免疫研究室

1. 研究体制

室長：梨井 康（李 小康）

共同研究員：北沢 祐介（東京理科大学大学院生）、

共同研究体制：木村廣光（研究所・共同研究管理室長）、藤（舟島）直子（研究所・共同研究管理室流動研究員）、謝琳（研究所・共同研究管理室共同研究員）、藤野真之、（国立感染症研究所・エイズ研究センター研究員）、安部良（東京理科大学生命科学研究所教授）、高原史郎（大阪大学大学院先端移植基盤医療学教授）

2. 研究内容

移植免疫寛容の誘導・維持機序の解明および制御性 T 細胞を用いる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。本研究プロジェクトは制御性 T（Treg）細胞の移植医療の臨床応用を目指して、今までの免疫寛容動物および患者由来の制御リンパ球を用いた解析から得られた遺伝子発現情報の成果を踏まえて、動物モデルによる検証・評価のうえ、*in vitro* において免疫抑制細胞を調製し、再度動物移植モデルにてその効果を評価するという研究手法を取っている。この研究経過は、基礎研究から臨床への流れが非常にわかりやすくなっており、トランスレーションリサーチにおいて非常に重要な事である。本研究の研究対象は免疫寛容の機序の解明から新しい治療法の開発に繋がっていく事は学術的に大きな特色である。さらには、現在行われている免疫抑制とは異なり、実際に生体で起きている免疫調節機能を最大限に応用した免疫抑制方法を行うところにも大きな特色がある。*In vitro* にて免疫制御リンパ球が得られ、動物移植モデルにおいて有用性が半明すれば、臓器移植医療、特に生体肝・腎移植において、免疫抑制剤に代わる新たな免疫抑制方法として免疫制御細胞を用いることが可能になると考えられる。本細胞を用いる免疫抑制方法は養子移植した細胞が宿主体内で生存するため、既存の免疫抑制剤の様に長期に渡る頻回の投与などは必要なくなる。また、この細胞集団への各種刺激を加えた際の反応解析により、より詳しい免疫制御リンパ球の性状を理解する事ができる。この事は、移植免疫寛容の機構における更なる解明につながると考えられる。さらに本細胞は移植免疫寛容の誘導・維持と共に、自己免疫疾患への関与が知られており、自己免疫疾患の治療への応用も十分に期待できる。

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、(1) 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 83:774; 2007）。(2) 生体内数少ない 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むけて、Treg 細胞の増殖作用を有する抗 CD28 superagonist 抗体（SupCD28 抗体）を用い、Treg 細胞の増殖システムを構築した。また、SupCD28 抗体は natural occurring Treg（自然発生型 Treg、nTreg）細胞を優位に増殖させ、増殖した Treg 細胞の起源は nTreg 細胞であり、nTreg 細胞と同様の細胞増殖抑制を有していることを明らかにした。さらに、心臓移植モデルを用いて、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（Journal of Heart and Lung Transplantation 27:362;2008）。

今年度は、Treg 細胞の増殖作用を有する SupCD28 抗体を用い、GvHD モデルにて、(1) 増殖した Treg 細胞の GvH 反応抑制効果およびその特異性；(2) 宿主へ抗体投与時期の違いによる Treg 細胞の GvH 反応の免疫抑制効果、について検討を行った。SupCD28 抗体を投与 3 日後の 6 週齢 Lewis ラットおよび Naïve Lewis ラットの脾臓・リンパ節から T 細胞を精製分離し、F1（Lewis x DA）ラットにそれぞれ移植した。抗体投与ラット由来のリンパ球による宿主の局所・全身の GvH 反応が顕著

に軽減した。上記二種類リンパ球の等量混合後の移入では GvH 反応を有意に抑制された。宿主ラット末梢血中の Foxp3 陽性 Treg 細胞を経時的に測定したところ、その全血球細胞を占める割合が宿主の GvH 反応の重篤度に逆比例であった。つまり、予後良好な宿主においては末梢血中の Foxp3 陽性 Treg 細胞が高水準に維持されることが明らかになった。また、抗体投与で増殖した DA ラット由来の Treg 細胞と Naïve Lewis ラットの由来の T 細胞 (Effector) の二種類のリンパ球等量混合後の移入でも GvH 反応を抑制された (Cell Transplantation, Submitted)。さらに、SupCD28 抗体を Naïve リンパ球移入前 (-3 日)、および移入後 (0 日、3 日、7 日、10 日) に F1 (Lewis x DA) ラットに投与し、GvH 反応の抑制効果、Foxp3 陽性 Treg 細胞の割合について同様に検討し、Treg 細胞の抑制効果は GvH 反応発症の早期に有効であることを明らかにした。これらの研究結果から、SupCD28 抗体より *in vivo* で優位的に増殖した Treg 細胞が GvH 反応に対して非特異的な抑制効果があり、その機序は末梢血中 FoxP3 陽性 Treg 細胞の割合が高水準維持されていたことによると示唆された。また、末梢血中 FoxP3 陽性 Treg 細胞の動態が GvHD の発症および治療効果の評価において有効であり、移植後宿主免疫状態を評価するための新しいマーカーとして活用されたい (Cell Transplantation, in press)。