

4-2-8 移植・外科研究部（移植免疫研究室、実験外科研究室）

1. 概要

当部の研究は、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て生まれ変わった。スタッフは部長以下、室長2名、流動研究員3名、共同研究員15名である。

比較的長い研究室の歴史を財産に、STEM細胞を使った研究を中心として、医学の基盤となるような基礎研究とその臨床応用を試みている。

2. 研究内容

2.1 再生医療に関する研究

2.1.1 間葉系STEM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、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。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、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。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制御のメカニズムの解明をすすめると同時に、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、発生分子生物学の用（患者、社会への還元）と美（他の学問との競争、またより純粋なサイエンスのテーマ）を追求していく。

2.1.2 臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究

肝硬変症、代謝性肝疾患、劇症肝炎は移植に替わり、細胞療法で治療できる可能性がある。移植細胞としては肝細胞以外に、胚性幹細胞（ES,EG細胞）、肝幹細胞、造血幹細胞などが候補と考えられている。臍帯血由来の造血幹細胞が血球系以外の臓器に分化する能力があると言われていることからヒト臍帯血から造血幹細胞の分離システムを確立し、造血幹細胞が肝細胞に分化するための生体内環境をNOD/SCIDマウスへの移植により検討した。分離精製した造血幹細胞は99%の高精度のものが得られ、その細胞の性質として核の割合が大きく細胞質が極めて少なく、血球系の分化能を有し、細胞表面にFas抗原を持たないことが確認できた。造血幹細胞の肝細胞への分化誘導実験では放射線障害のみのマウスではヒトアルブミン陽性細胞は切片中にごくわずかに認められるのみであったが、FasL誘導肝障害群はアルブミン陽性細胞の増加を認めた。移植細胞をサブグループに分けた場合、CD34陽性/陰性細胞投与では両群ともにヒトアルブミン陽性細胞が観察され、両者での発現頻度の相違は特になかった。今後さらに肝細胞分化に関わる因子の遺伝子群を検討する予定である。

2.1.3 肝細胞移植用チミジンキナーゼトランスジェニックラットの作製

臓器ドナー不足の解決策として動物臓器をドナーとする異種移植が考えられている。我々は同種移植と異種移植の中間的発想として、ヒト肝をブタ体内で構築させるということを目的とし、モデル動物としてアルブミンプロモーター制御により肝で特異的に単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼを発現し、ガンシクロビル(GCV)の投与により肝障害誘発可能なトランスジェニックラットの作製をした。トランスジェニック個体ではGCV濃度依存的な細胞障害性が認められた。今後、本系とヒト由来肝細胞移植を組み合わせ、ヒト肝細胞のラット肝内生着系を確立したい。

2.1.4 同種・異種肝細胞の生着条件の検討

細胞移植は概念的には臓器移植と同様古くから考えられていた。しかしながら、医療への応用は

さほど普及していない。その理由の一つに外来移植細胞は宿主組織内から速やかに排除されることがある。この排除は免疫拒絶反応によるだけでなく、むしろ異物に対する非特異的な排除機構が大いに関わっていると考えられる。そこで細胞周期停止因子として生理的に発現する p21 を導入し、移植細胞の生着・増殖環境の構築を図った。アデノウイルスベクターにてヒト p21 遺伝子を SCID マウス肝に導入後、正常ヒト肝細胞由来 THLE 細胞を脾内に移植したところ多くの生着細胞が観察された。今後、胎仔への細胞移植と組み合わせることにより、さらに高い置換率が達成できるのではないかと考えている。

2.1.5 ムコ多糖症 VII 型マウスの中樞神経病変に対する神経幹細胞移植療法

リソソーム蓄積病の一つであるムコ多糖症 VII 型の中樞神経病変に対する神経幹細胞移植療法を同症マウスである MPSVII を用いて検討した。非ムコ多糖症マウスの受精後 14 日目胎仔脳から神経幹細胞を選択的に培養、移植したところ神経幹細胞は脳全体に広がった。このように神経幹細胞の移植療法は極めて有用であると推察された。

2.2 移植免疫領域の研究

2.2.1 免疫生理学的因子を利用した免疫寛容導入法の検討

本研究では新規の免疫抑制因子や遺伝子導入を駆使することにより、臨床応用可能な新たな拒絶反応制御技術を開発することを目的としている。本年度は、抗 ICOS 抗体およびアデノウイルスベクターによる CTLA4Ig 強制発現により、ICOS/B7h 経路、CD28-CTLA4/B7 経路を選択的に阻害し、補助シグナル経路の遮断により、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。実験モデルとしてラット同種同所性肝移植、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心移植モデルにおいては効果を認めなかったが、肝移植モデルにおいて有意な生存延長効果が得られた。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。さらに生着日数が 100 日を超えた時の末梢血のリンパ球では CD4CD25 両陽性細胞集団が対照群より有意に増加していることがわかった。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、心移植生着期間の顕著な延長が見られた。これらの結果から抗 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抑制効果は見られたものの寛容誘導はできなかったが、CTLA4Ig 強制発現との併用で CD28-CTLA4/B7 経路を通して抗原提示細胞の活性を抑制し、安定な免疫寛容状態の誘導および維持ができた。

2.2.2 移植免疫寛容の成立に関連する遺伝子の研究

1) 移植免疫寛容の成立に関連する新規遺伝子の探索

移植免疫寛容状態を作り出す一連の遺伝子の発現について、生体部分肝移植後寛容誘導できた臨床症例及び動物実験で得られた寛容ラットからの検体を用い、細胞生物学及び分子生物学的手法により解析し、免疫寛容の成立に関わる細胞集団及び関連遺伝子発現情報の解析並びに新規免疫抑制遺伝子の探索研究を試みた。臨床症例および動物実験から得られる関連遺伝子の発現解析の基礎的データとして極めて重要である。その結果は拒絶反応の診断だけでなく遺伝子導入により積極的に免疫寛容状態を成立させることも可能になると考えられる。本年度の研究では京都大学にて計画的減量を行っている 80 人の患者の内、完全離脱できた 19 名の患者中 11 名からと正常人の末梢血リンパ球より RNA を抽出し、Human1 cDNA Microarray を用いて、寛容患者と正常人の比較解析を行った。実験プロトコルは京都大学及び国立成育医療センターの倫理審査を受け承認を得た。最終的に増加 120 遺伝子、減少 169 遺伝子を抽出、可能なものについて代表的なカテゴリーに分類したところ、アポトーシス 4/3 (増/減、以下同様) 細胞周期 2/2、サイトカイン 2/7、DNA 合成 4/4、熱ショックタンパク 1/0、成長因子 0/3、代謝 23/24、核内レセプター 0/1、腫瘍遺伝子 1/3、レセプター 3/7、

シグナル因子 16/18、ストレス 7/14、転写因子 8/13、トランスポーター 9/14、その他 72/113 であった。現在、これら各遺伝子の発現の再確認作業を行っている。

2) 長期安定腎移植レシピエントの免疫分子機構の解明

腎移植後の免疫制御は主に腎機能を指標にして行われる。すなわち血中クレアチニン値や尿素窒素値の変動で免疫抑制剤の投薬量や種類を変えている。ここで問題になるのは腎機能の異常が拒絶反応によるのかその他の要因、例えば免疫抑制剤の副作用によるのかという点である。本研究では腎機能ではなくレシピエントの免疫動態を直接調べ、分子機構に基づく免疫抑制療法の確立を目的としている。1980年から1986年の間に国立佐倉病院で腎移植を受け15年以上に渡り慢性拒絶反応の徴候なく生着しているレシピエント(生体腎1名、献腎4名)を対象とした。レシピエントの末梢血リンパ球から mRNA を調製し GeneChip (HG-U95Av2) にて発現量を定量した。実験プロトコルは国立佐倉病院及び国立成育医療センターの倫理審査を受け承認を得た。5名のレシピエントは拒絶反応がよく制御され、1年半前と現在の血中クレアチニン値が $1.01 \pm 0.24\text{mg/dl}$ と $1.05 \pm 0.35\text{mg/dl}$ というように安定していた。レシピエント側と対照で有意差の見られた遺伝子は599で、内470が増加、129が減少していた。5名はそれぞれシクロスポリン、アザチオプリン、メドロールなどの服用で必ずしも同一条件ではなかったが遺伝子発現プロファイルはそのサブグループに基づく差異は検出されなかった。抗原提示細胞から T細胞活性化への過程で変動量が2倍以上の遺伝子を調べると、ICAM1、B7/7.2、CD28、CD3 が発現低下、MAP キナーゼを抑制する hVH-5 の発現増加が見られ、レシピエントが免疫抑制状態であることが検証された。腎移植の予後管理ではクレアチニン等の臨床検査データの推移により免疫抑制剤の増減を行ってきた。本研究ではさらに直接的な方法でレシピエント免疫系の分子動態を調べることができた。今回用いた GeneChip は一般仕様であるが、免疫系解析の為に遺伝子数を限定したチップを作成することにより、多くの症例を比較的短時間かつ低コストで解析し、予後と免疫系の状態の詳細な解析が可能になると考えられた。

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

病気の治療法の開発や改良のため、特に創薬や再生医療の領域でヒト組織利用研究の重要性が高まっている。しかしながら本邦では脳死体の臓器・組織の研究利用が法的に禁止されている等の事情により、未だに研究用ヒト組織は輸入に依存している。国の方針としては平成10年の厚生科学審議会答申(黒川答申)で、提供者本人の承諾を前提とした「手術摘出組織」の研究利用が提案されている。手術を含め医療行為は個人の利益の為に行為されるが、研究成果は社会の利益として還元される。そこに医療と研究を一体に考えてはならない理由がある。組織提供のためには「患者さん本位のインフォームド・コンセント」を誠実かつ適切に実施することが不可欠との考えから、高度先進医療の経験者を含む一般市民に「協力者」として研究への参加を請い、随時ディスカッションを行っている。また、模擬患者(SP)に対して現場の外科医が研究利用に関する説明を行うシミュレーションを実施し、現行の問題点の分析を進めている。これまでに患者・家族への説明の方法や内容、さらには遺伝子解析研究等に関連する個人情報保護の問題など、倫理的・制度的な諸問題について検討した。

3.2 異種移植の臨床応用に関わる指針案の検討

移植医療における新しいドナーソースとしての家畜臓器の利用や再生医療における動物細胞を用いたヒト細胞の維持など、異種動物由来の臓器・組織・細胞の医療目的使用はもはや遠い先の問題ではなくなっている。鈴木部長は日本移植学会異種移植のガイドライン検討作業部会の代表として平成11年2月に異種移植における感染症に関するガイドラインを作成した。これを基に平成13年度厚生科学研究異種移植の臨床研究の実施に関する安全性確保についての研究班が組織され、鈴木盛一が班員として参加した。その成果として本年7月に「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針(医政研発第0709001)」が示された。