

## 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て生まれ変わった。スタッフは、絵野沢伸（実験外科研究室長） 梨井康（移植免疫研究室長） 橋本徳（流動研究員） 味八木茂（流動研究員） 芳賀早苗（流動研究員） 横山成俊（ゲノムネットワークプロジェクト） 王 全興（ヒューマンサイエンス流動研究員、H16/3まで） 宮本義孝（ヒューマンサイエンス流動研究員、H16/8より） 張 慧き（医療機器センターリサーチレジデント）ほか共同研究員で構成された。

四肢発生・分化のメカニズムを解明することは、先天奇形症候群や小児骨軟骨系統疾患や、関節疾患治療、骨粗鬆症、骨軟部腫瘍治療への寄与が期待される。発生・分化に関わるクロマチン修飾因子の同定を通じて、新しいクロマチン制御機構の解明を行い、四肢、神経、各臓器の発生に通ずる公理の発見と成育医療における外科領域の新しい治療法の創生をめざして研究を行っている。比較的長い研究室の歴史を財産に、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 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、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因子に注目してきた。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因子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

生命の形の大枠、すなわち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。我々の目的は、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ような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。英エジンバラ大学のEMAGEはわれわれの知る限りにおいて世界最大の*insitu*遺伝子発現データベースであるが、データ数にして約1,000データ（2004年10月現在）であり、転写因子数および発生ステージから考えるといまだ不十分である。

我々は、約2,000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子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。17年3月現在、約600因子について作業が終了しており、17年度内に2,000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、比較することによって、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。さらに、特異的な発現パターンを示した因子についてノックアウトマウスの作製、ニワトリ胚を用いた遺伝子強制発現、ヒト間葉系幹

細胞を用いた siRNA などによる遺伝子ノックダウンによる解析を行っている。現在解析中であるノックアウトマウスより内軟骨性骨化に重要な役割がある可能性を示唆する結果が出てきており、クロマチン修飾因子による発生・分化制御の新たな機能が明らかになりつつある。

間葉系幹細胞は骨、軟骨、筋肉、脂肪細胞に分化し、体の「かたち」を形成する。それぞれの分化の強力な推進転写因子（マスター遺伝子）としては、骨細胞の分化における Runx2、脂肪細胞における PPAR、筋細胞における MyoD のように、軟骨細胞においては Sox9 が同定されている。Sox9 は軟骨分化マーカーである II 型コラーゲンを誘導するが、他の軟骨基質（X 型、XI 型コラーゲン、Comp など）の誘導に関しては不明な点が残り、また、生殖原器や神経冠においても Sox9 が分化誘導に必須であるが、各組織における誘導機序の区別が不明なことなどから、他のクロマチン因子との協調作用の存在が考えられる。これまで核内クロマチン因子である p300/CBP および PGC-1 との協調作用を明らかにしてきたが、他の因子を網羅的にスクリーニングするために、細胞系における遺伝子導入プロモーターアッセイをハイスループット化した系を準備している。これは米国スクリップス研究所や大手製薬会社などで数件報告があるが、国内ではいまだ知る限り無いもので、遺伝子全長が発現ベクターに入ったプラスミドのコレクションを 384 穴プレートに配列し、II 型コラーゲンのプロモーターをレポーター・プラスミドに組み込んだものとともに、ATDC5 といった軟骨様細胞に共導入し、ルシフェラーゼアッセイによって高速かつ網羅的に発現誘導性をスクリーニングするものである。すでに東大医科研菅野ラボらによって開発された FLJ コレクションを入手しており、遺伝子導入条件の検討を行っている。完成すれば、間葉系細胞の分化だけではなく、関節炎や喘息などのアレルギー疾患や癌疾患などの病態メカニズムの解明にも適用できる。

## 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いる。その標的となる遺伝子は、全遺伝子の 10~20% を制御しているともいわれ、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 の同定を試みている。現在までに、筋細胞への分化にともない発現する miRNA を同定し、また *in situ* ハイブリダイゼーションによりその発現分布を明らかにすることができた。さらに、現在、その miRNA の標的遺伝子の探索とノックダウンによる分化への影響について解析中であり、新たな分化メカニズムの解明に期待が持てる。

### 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。このような現行の血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる透析あるいは濾過が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまう点がある。病期の体液には生体障害性物質だけでなく、疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらをあえて透析・濾過によって排除する必要はない。本研究では血液浄化システムに細胞を組み込み、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た。以前より、細胞を組み込んだバイオ人工肝の開発を行ってきたが、これらは製作や使用法の難度が高く、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。すなわち、細胞の有するバイオ機能から必要なものを抽出、再構築した機能性プロテオリポソームを構築し、体外循環技術と融合することにより、現在の血液浄化法の有する限界と問題点の解消をめざしている。

リポソームの医療材料化のためには有機溶媒を用いず、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、上記の従来法と同様に平均値 100nm 径の均一なりポソームが得られることがわかった（特願 2004-033439）。一方、トランスポータータンパクのひとつ、MDR-1 を組み込んだプロテオリポソームを構築し、その活性の特性を検討した。MDR-1 プロテオリポソームは ATP 存在下で基質である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、MDR-1 の配向性は 86% が内向きにあることがわかった。また、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の構築を試みている。

## 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も重要なテーマである。適応としては、二分脊椎症、双胎間輸血症候群などが挙げられる。内視鏡手術一般に共通するが、処置を行うには術部の固定と操作がよく連携して行われなくてはならない。今回開発を計画中の胎児手術ロボットは把持・剥離・縫合を行うためのマニピュレータと胎児の浮遊・胎動を制限するためのスタビライザーから構成される。そこでロボットに必要な力学的データを得るため、ラット胎仔を用い、胎齢毎の皮膚の粘弾性特性（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。この結果、胎仔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。これらの結果から、工学的な安全域が設定できたので、現在、デバイスの設計段階に移行している。一方、臨床的な問題として胎児手術後の羊膜損傷は治癒しにくいことが浮上している。深刻な場合は、羊水の持続的な漏出が見られる。現在、その治療としてはフィブリン製剤が使われるが、まだ十分な効果は得られていない。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を用いたハイブリッド羊膜の開発を検討している。

## 3) 肝傷害時の細胞内シグナル伝達に関する研究

外科手術や臓器移植において虚血再灌流が及ぼす臓器、組織傷害は予後に深刻な影響をもたらす。その傷害機構には細胞内酸化還元シグナルの変動が関与している。STAT-3 は、HGF、IL-6 などの cytokine にて活性化されることが知られており、特に消化器系の成熟細胞の分裂増殖において重要な役割を果たしている。そこで、Fas 刺激により引き起こされる劇症肝炎への Stat3 の効果を検討した。Stat3 の A661 と N663 を cysteine に変更することにより、リン酸化の有無に関わらず活性型の homodimer となる mutant gene を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し (AxCAS3-C) C57/B6 マウスに対しを静脈的に投与した。一週間後、対照群と S3-C 群に対して、Jo-2 を腹腔内投与し Fas 刺激をした。Jo-2 投与により、コントロール群では数時間で広範な肝細胞のアポトーシスが認められた。S3-C 群では、肝細胞のアポトーシスは、ほぼ完全に抑えられ、血液中の GOT/GPT、Bilirubin の上昇が有意に抑えられ、Albumin の低下も認められなかった。このとき Fas 抗原は、S3-C 群ではコントロール群よりも明らかな増加を示しており、その下流の抑制が起きていると考えられた。肝再生の機序の解明では、細胞分裂能の障害された状態で、細胞成長（細胞サイズの増大）により、肝再生が物理的に、かつ機構的に代償されることが判明した。つまり、Jak/STAT 経路の欠損により肝切除後の細胞分裂が十分に起こらない場合には、肝細胞自体の成長が代償的に起こって肝再生を

完成する。その機序としてPI3K・Akt 経路が重要であることが判明した。Jak/STAT 経路、PI3K・Akt 経路がともに障害された場合には、肝再生は有意に抑制された。以上の他、STAT3 は、肝における糖代謝、脂肪代謝にも深く関わっていることが認められた。STAT3 の刺激により、肝における G6Pase、PEP-CK、GK あるいは SREBP-1 の発現は制御され、さらには耐糖能の改善、脂肪肝の改善が得られた。これらは、将来的に二次性糖尿病の治療などへの応用が期待される。

## 2.2 移植免疫領域の研究

### 2.2.1 免疫寛容導入及び免疫抑制細胞療法確立に関する検討

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。

上記のように CTLA4Ig 及び抗 ICOS 抗体を用いて、T 細胞増殖に必要不可欠な副刺激シグナルを遮断する事により、ラットの臓器移植の系で安定かつ強固な免疫寛容が誘導でき、さらにその寛容ラットの末梢リンパ球を養子移植すると別の個体に免疫寛容を誘導出来、これに制御性 T 細胞が関わっている可能性がある事を我々は明らかにした。今年生体外で免疫制御性リンパ球を作成、臓器移植に応用することを目的として、CTLA4Ig、抗 ICOS 抗体存在下で免疫制御リンパ球の調製を行いその免疫抑制効果について *in vitro* 及びラット心移植モデルを用いて検討した。DA ラットの脾細胞 (20Gy 放射線照射) と、Lewis ラットの脾細胞を CTLA4Ig 及び抗 ICOS 抗体存在下で 5 日間混合培養 (MLR) を行い得られたリンパ球を、DA 脾細胞を stimulator、Lewis 脾細胞を Responder としたリンパ球混合培養 (2nd MLR) に加えリンパ球増殖抑制効果を検討した、また得られたリンパ球自身のアロ抗原、及び各種抗体刺激に対する増殖能についても検討を行った。さらにこのリンパ球の各種 mRNA 発現について RT-PCR を用いて検討を行った。In vivo での検討のため GVH assay モデル及びラット臓器移植モデルを用いた。GVH assay については DA-LewisF1 をホストとした politeal lymphnode assay を行った。また臓器移植モデルとして 7.5Gy 放射線照射を行った Lewis ラットに naive Lewis リンパ球とこの免疫制御リンパ球を移入し、DA ラットをドナーとした心移植を行いグラフト生着延長効果を検討した。結果として、CTLA4Ig、抗 ICOS 抗体存在下で得られた免疫制御リンパ球は 2nd MLR において細胞数に依存した強いリンパ球増殖抑制効果を示した。またアロ抗原及び抗 CD3 抗体、CD28 抗体、IL2 による刺激に対する免疫制御リンパ球の反応は、コントロールと比較して著明な増殖反応の低下を認めた。RT-PCR を用いた検討では、抑制性サイトカインのうち IL-10

の発現が顕著に認められた。IL-4, については差が認められなかった。IL-2, IFN- はいずれも免疫制御リンパ球で発現が低下していた。popliteal lymph node assay では F1 ラット足底に naïve Lewis リンパ球のみを投与した群において popliteal lymph node の顕著な増大 (平均 101.5mg) を認めたのに対し、免疫制御リンパ球のみを投与した群では全く増大を認めなかった (平均 6.9mg)。放射線照射を併用した心移植モデルでの検討では naïve リンパ球のみを移入した群 (平均 11.0 日) と比較して、naïve リンパ球に加え免疫制御リンパ球を移入した群 (平均 17.5 日) ではグラフトの有意な生着延長効果が認められた。さらに免疫制御リンパ球のみを移入した群ではグラフトが生着したラットも認めた。本研究では *in vitro* で CTLA4Ig 及び抗 ICOS 抗体を用いてリンパ球混合培養を行うことで免疫抑制能を有した細胞を生体外にて作成することを試みた。共刺激シグナルを阻害することで T 細胞は抗原刺激に対して不応答の状態になることが知られているが、さらにアロ抗原に対する T 細胞の活性化を抑制する作用も有することが一部報告されている。本研究で CTLA4Ig、抗 ICOS 抗体存在下で得られた免疫制御リンパ球はアロ抗原に対する不応答のみならず、強いリンパ球増殖抑制能を有していることが *in vitro* 及び臓器移植モデルにて示された。この細胞は抑制性サイトカインの一つである IL-10 を高発現しており、抑制能との関連性が示唆された。現段階ではこの免疫制御細胞と制御性 T 細胞の関連性については明らかでないが、さらなる検討を行う予定である。

### 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

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われるが、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。故鈴木盛一氏 (当時; 実験外科生体工学部長) 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、当時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。