

調製法の違いによるヒト臍帯由来間葉系幹細胞の  
形質および機能比較

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学専攻

谷川 俊太郎

修了年 2016年

指導教員 高橋 昌里

調製法の違いによるヒト臍帯由来間葉系幹細胞の  
形質および機能比較

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学専攻

谷川 俊太郎

修了年 2016年

指導教員 高橋 昌里

## 目次

概要	.....	1
緒言	.....	4
1. 背景	.....	4
2. 目的	.....	8
材料と方法	.....	10
結果	.....	20
考察	.....	26
まとめ	.....	29
謝辞	.....	30
図表	.....	31
引用文献	.....	51
研究業績	.....	54

## 【概要】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC)は骨髄間質より単離された、非造血系の未分化細胞であり、免疫制御作用を有し、免疫原性が低く、腫瘍原性もないため、細胞治療用の細胞としてすぐれた特徴をもっている。ステロイド抵抗性急性移植片対宿主病 (Acute graft versus host disease: aGVHD)をはじめ、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、1型糖尿病、多発性硬化症などを対象とした臨床試験が数多く行われている。従来は骨髄 MSC が移植細胞として多く用いられてきたが、近年、母体や胎児に対し外科的侵襲を伴わず、胎盤や臍帯から採取できる胎児付属物由来 MSC が、他家移植用の治療用細胞として注目されている。中でも臍帯 Wharton's Jelly (WJ)に由来する MSC (WJ-MSC)は、すでに種々の疾患に対する前臨床および臨床研究成果が報告されており、安全で有効性の高い他家移植用の細胞源として期待されている。WJ-MSC の調製法として酵素法と Explant 法があるが、これらの調製法の違いにより、作製された MSC の形質や機能にどのような影響が生じるか明らかになっていない。本研究の目的は、酵素法と Explant 法により調製された WJ-MSC の形質、増殖能、多分化能、免疫制御関連遺伝子の発現を解析し、調製法の違いによる WJ-MSC の治療用細胞としての性能を比較評価することである。

ヒト臍帯は日本大学医学部附属板橋病院倫理委員会の承認を得て、妊娠 37~39 週に予定帝王切開を施行した正期産の健康な胎児から採取した。Explant 法で派生、増殖する細胞を同定するため、Explant 法に用いる臍帯組織の組織学的検討を行った。酵素法、Explant 法で調製した WJ-MSC を用いて DNA マイクロアレイ解析、細胞表面抗原プロファイル、Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F)アッセイ、細胞増殖能、In vitro における多分化能、各細胞の免疫制御関連因子の発現解析を行い、両群を比較した。

Explant 法に使用する臍帯組織の蛍光免疫染色では、WJ を構成する細胞は、増殖細胞マーカーKi67、間質細胞マーカーPDGFR- $\beta$  陽性であった。DNA マイクロアレイ解析では、酵素法と Explant 法で調製した WJ-MSC は非常に近似した遺伝子発現プロファイルを示し、階層的クラスタリング解析でも非常に距離が近い群として分類された。細胞表面抗原プロファイルは両者ともに MSC の minimal criteria に一致するプロファイルであり、差を認めなかった。CFU-F アッセイでは第 4 継代において、Explant 法に比べ、酵素法でコロニー形成率が低下する傾向が認められた。細胞増殖能解析では酵素法、Explant 法ともにほぼ同じ増殖曲線を示し、細胞倍加時間も両群で類似した値が得られた。多分化能解析では、どちらの細胞も脂肪細胞、軟骨細胞への分化が認められたが、骨分化誘導では、どちらの細胞もカルシウム沈着を示す成熟した骨芽細胞は認

められなかった。免疫制御関連因子の解析では繊維芽細胞に対し、酵素法、**Explant** 法で調製した **WJ-MSC** で発現が有意に高い免疫制御関連因子を複数認めましたが、酵素法、**Explant** 法間での有意差を認める免疫制御関連因子は認めなかった。

結論として、酵素法と **Explant** 法により調製された **WJ-MSC** 遺伝子発現プロファイルは非常に近似しており、それぞれの細胞の増殖能、自己複製能、多分化能、免疫制御関連遺伝子の発現に大きな違いを認めなかった。以上の結果より **Explant** 法でも酵素法と同様の多能性を有する **WJ-MSC** が調製できることが明らかになった。臨床的に応用する場合、培養までの処理時間が短く、異種動物由来物質を含む試薬を使用せず、調製コストが低いといった利点を有する **Explant** 法を積極的に選択すべきと考えられた。

## 【緒言】

### 1. 背景

#### I. 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC)

ヒト MSC は 1999 年に Pittenger ら<sup>1)</sup>によって骨髄間質より単離された、非造血系の未分化細胞である。プラスチックディッシュへの接着能を有し、高い増殖能を持つ。骨髄ストローマ細胞としての機能を有するのみならず、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの中胚葉系の様々な組織に分化する能力を有する。MSC は組織障害部位に効率よく集積し、組織修復作用や免疫抑制作用を示すことから細胞治療における移植用細胞として有望と考えられている<sup>2-5)</sup>。International Society for Cellular Therapy (ISCT)は、ヒト MSC の minimal criteria として、①プラスチックディッシュに付着能を有する、②骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞に分化する、③細胞表面マーカーとして CD105、CD73、CD90 陽性、CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a、CD19、HLA-DR が陰性であることを定めている<sup>6)</sup>。

MSC を用いた細胞治療の臨床研究はすでに多数行われており、ステロイド抵抗性急性移植片対宿主病 (Acute graft versus host disease: aGVHD)をはじめ、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、1型糖尿病、多発性硬化症などを対象とした臨床試験が行われている<sup>7)</sup>。55例のステロイド抵抗性 aGVHD

に対して Bone Marrow MSC (BM-MS C) を静脈内投与する細胞治療が行なわれ、30 例に完全寛解 (完全寛解率 55%)、9 例に改善 (有効率 71%) が認められたと報告<sup>8)</sup>された。現在、非血縁の BM-MS C 製剤 (Prochymal<sup>TM</sup>, Osiris 社) を用いた臨床試験も行われている<sup>9)</sup>。

MS C は種々の免疫細胞 (T リンパ球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞など) に直接的・間接的に作用し、その活性化や機能を制御することが報告されている<sup>10-13)</sup>。MS C の産生する免疫制御に関連する液性因子として Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1、Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)、Nitric oxide synthase 2 (NOS2)、Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) などがあり、これらの因子は炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  や IFN $\gamma$  などにより発現が促進することが報告されている<sup>14-18)</sup>。また、MS C は定常状態で HLA-DR や DQ などの class II 抗原や共刺激分子である CD80、CD86、CD40、CD154 を発現せず免疫原性が低く、拒絶されにくいという特徴を持つ<sup>19)</sup>。また腫瘍原性もなく、移植安全性が高いことも報告されている<sup>20)</sup>。これらの点においても移植用細胞としてすぐれた特徴をもっている。



## II. 胎児付属物由来 MSC

MSC は骨髄組織のみならず、脂肪組織や歯髄など全身の間葉系組織に存在する。また、臍帯や胎盤などの胎児付属組織にも豊富に存在している。一般的に胎盤や臍帯、羊膜、臍帯血などの組織は胎児の分娩後に医療廃棄物として廃棄される。このような組織を利用することは、受精卵や中絶胎児を利用する方法などに比べ、倫理的問題を伴わない。また、骨髄穿刺を伴う BM-MSC に比べ、母体や胎児に対し外科的侵襲を伴わず、胎盤や臍帯から採取できるため、他家移植用の治療用細胞として有望であると考えられている。

胎児付属物から得られる MSC には羊膜や臍帯、絨毛などから調製することができる。いずれも多分化能、免疫制御作用、抗炎症作用を示すことが知られている<sup>21-23)</sup>。中でも臍帯 MSC は母体由来細胞の混入がなく、無菌的に採取できるため、細胞バンク事業や細胞治療の臨床研究が開始されている<sup>24)</sup>。臍帯は表面を羊膜からなる羊膜鞘で覆われ、内部に 2 本の臍帯動脈と 1 本の臍帯静脈を有し、その間の結合組織は Wharton's Jelly (WJ) と呼ばれる白色のムコ多糖からなる基質で満たされている。この WJ 中には MSC が豊富に存在しており<sup>25)</sup>、容易に単離・増殖が可能である<sup>26-27)</sup>。現在、厚生労働科学研究として難治性疾患等克服研究事業が進行中であり、臍帯および臍帯

血由来細胞の分離・培養・凍結・バンキングシステムの確立など臨床応用に向けて開発がすすめられている。

### III. 臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC)の調製方法

通常、胎児付属物由来 MSC を調製する方法として酵素法が用いられる。酵素法は機械的に細切した組織をコラゲナーゼなどの蛋白分解酵素にて一定時間処理後に単離した細胞をプラスチックディッシュ上で付着培養する方法である。臨床研究における WJ-MSC の調製法も主に酵素法が用いられている。また WJ-MSC は、酵素法の他に Explant 法でも調製できることが報告されている<sup>28)</sup>。Explant 法は細切した組織をプラスチックディッシュに直接貼り付け培養液中で培養する方法である。細胞の組織からの遊走能と増殖能を利用し、WJ-MSC を調製することができる。一方、現在までに酵素法と Explant 法で調製した WJ-MSC が全く同じ形質や多能性を示すのか明確になっていない。

酵素法と Explant 法の違いを表 1 に示す。酵素法で調製した場合、コラゲナーゼなどの酵素液による刺激により、得られる細胞の形質や機能が影響を受ける可能性がある。実際にウマの MSC 調製法に関する研究では、酵素法と Explant 法の間において、初代 MSC の調製にかかる時間や腱マーカー遺伝子発現に差を認めるという報告がある<sup>29)</sup>。Explant 法で調製した場合

には、その調製過程で羊膜上皮細胞や血管内皮細胞といった異種細胞が同時に派生、増殖する可能性が危惧される。したがって Wharton' Jelly 間質細胞に由来する細胞のみが派生・増殖しているか検証が必要である。

WJ-MSC を臨床応用する場合には、手技の簡便さ、調製コスト、移植安全性なども重要視されなければならない。酵素法では Explant 法に比べ、培養を開始するまでの処理時間が約 20 時間と長く、試薬類が多くなるため、調製コストが高くなることが予想される。また、コラゲナーゼなど異種動物由来物質を含む試薬を使用することによる移植安全性の問題などが危惧される。

## 2. 目的

胎児付属物由来 MSC は採取に際し母体や胎児に対し外科的侵襲を伴わず、胎盤や臍帯から採取でき、臨床使用における倫理的問題も少なく、免疫原性が低く、細胞増殖能も高いため、細胞治療用細胞源として有用であると考えられる。WJ-MSC は、すでに種々の疾患に対する前臨床および臨床研究成果が報告されており、安全で有効性の高い他家移植用の細胞源として期待されている<sup>24, 30-31)</sup>。WJ-MSC の調製法として酵素法と Explant 法があるが、これらの調製法の違いにより、作製された MSC の形質や機能に影響が生じるか明らかになっていない。また Explant 法では、WJ-MSC 以外の異

種細胞の混入がないかについても検証が必要である。本研究の目的は、酵素法と **Explant** 法により調製された **WJ-MS**C の形質、増殖能、多分化能、免疫制御関連遺伝子の発現などをそれぞれ解析し、調製法の違いによる **WJ-MS**C の治療用細胞としての性能を比較評価することである。

## 【材料と方法】

### I. ヒト臍帯

ヒト臍帯は日本大学医学部附属板橋病院にて、両親からインフォームド  
コンセントを得たうえで、妊娠 37~39 週に予定帝王切開を施行した正期産  
の健康な胎児から採取した。出産後ただちに 1%ペニシリン-ストレプトマイ  
シン (Pen Strep: Life Technologies; Grand Island, NY) 含有  
phosphate-buffer saline (PBS: Nissui, Tokyo, Japan) に浸し、検体採取後 2  
時間以内に細胞調製を開始した。ヒト胎児付属物を用いたすべての実験は、  
日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認を受け実施した  
(承認番号: RK-121214-4)。臍帯を採取した児の母体は、いずれのドナーも  
血縁関係のない日本人で、帝王切開の適応は前回帝王切開であった。前期破  
水および児心音低下などの胎盤機能不全を示唆する所見は認めなかった。外  
観上臍帯の異常も認めなかった。

### II. 細胞調製および培養

#### ① 臍帯由来 MSC

Explant 法は McElreavey らの既報<sup>32)</sup>に従い行った。採取した臍帯を  
PBS で十分に洗浄し、凝血塊を除去した。PBS を入れた滅菌ディッシュ  
の上で滅菌ピンセットを用いて機械的に羊膜・臍帯動静脈を除去し、滅

菌ハサミで 3~5mm 大に細切り、10cm プラスチックディッシュ (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)に張り付けて、10 分間静置した後、10%ウシ胎児血清 (FBS)含有 Minimum essential medium (MEM) Alpha (Life Technologies)を組織が剥がれないように静かに注ぎ 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。初代培養 2 日後に浮遊細胞を除去し、以降は 3~4 日おきに培地交換を行った。約 2~3 週間後に WJ 組織周囲から付着細胞が派生・増殖したのを確認した後、WJ 組織を除去した。

酵素法は Prasanna らの既報<sup>33)</sup>に従い行った。Explant 法と同様に細切した WJ 組織を 500 $\mu$ g/ml Collagenase from Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)含有 PBS に浸し、37°Cで 20 時間、振盪下に酵素処理した。細胞浮遊液を径 100  $\mu$  m のセルストレーナー (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ)に通し、PBS で洗浄後、10%FBS 含有 MEM Alpha を培地として 10 cmプラスチックディッシュにて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。初代培養 2 日後に浮遊細胞を除去し、以降は 3~4 日おきに培地交換を行った。継代は Explant 法も酵素法も 80%コンフルエントに達した時点で 0.05%Trypsin-EDTA (Life Technologies)を用いて細胞を回収し、実験に応じて 10cm プラスチックディッシュには  $2 \times 10^5$  個の細胞を、35mm プラスチックディッシュには  $2 \times 10^4$  個の細胞を再播種

し、継代培養を行った。第4継代までの細胞を実験に使用した。Explant法、酵素法の概略を図1に示す。

## ② ヒト皮膚由来繊維芽細胞

ヒト皮膚由来繊維芽細胞は Clonnetics Human Fibroblast Cell Systems (Lonza, Walkersville, MD, Cat No:CC-2511)から購入した初代培養細胞3株を使用した。10%FBS含有 Dalbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies)を用いて、10 cmプラスチックディッシュにて37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。3~4日おきに培地を交換し、80%コンフルエントに達した時点で0.05% Trypsin-EDTAを用いて細胞を回収し、継代した。

## III. 組織学的検討

ヒト臍帯組織を1 cm厚に横切したサンプルおよびMSC調製に用いる血管・羊膜を除去したWJ組織を3週間 Explant法を用いて培養した。組織片を採取した後、10%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後4μmの厚さの切片にした。サンプルの一部はHE染色を行い、他は蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色用のサンプルは Target retrieval solution concentrate (DAKO)に入れ、圧力鍋で15分加熱し抗原を賦活化した。0.2% TritonX-100 in PBSを用いて10分間膜透過処理を行い、10%ヤギ血清、1%

BSA 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした。1 次抗体としてマウス抗ヒト Ki67 (希釈なし, Thermo Scientific)、ウサギ抗ヒト Ki67 (1:100, Thermo Scientific)、ウサギ抗ヒト Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- $\beta$  (1:100, Epitomics, Burlingame, CA)、マウス抗ヒト CD31 (1:100, DAKO)、マウス抗ヒト Cytokeratin7 (CK7) (1:30, American Resesarch Products.Inc., Waltham, MA)を用い、4°Cで一晩反応させた。2 次抗体としてそれぞれヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen)、ヤギ抗マウス IgG Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen)を室温、1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、5 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen)を室温、30 分間反応させ、核染色した。蒸留水で洗浄後、FluoromountG (Southern Biotech, Birmingham, AL)で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i: Olympus, Tokyo, Japan)で観察・撮影を行った。

#### IV. DNA マイクロアレイ解析

10 cmプラスチックディッシュにて培養した細胞がコンフルエントになった時点で 0.05% Trypsin-EDTA を用いて細胞を回収した。RNeasy Plus Micro Kit を用いて totalRNA を採取し、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて抽出した RNA のクオリティチェックを行った。Total RNA 250 ng から、GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara,



CA)を用いて、キット添付プロトコールに従い、cDNA を合成した。

GeneChip® Hybridization Oven 645、GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix, Inc.)を用いて、キット添付プロトコールに従い、ハイブリダイゼーションを行い、GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, Inc.) を用いて、蛍光イメージの測定を行った。マイクロアレイデータの正規化、主成分分析、階層的クラスタリング、Present/absent call は統計処理ソフト R 上で BioConductor パッケージを用いて解析した。また発現差のある遺伝子の抽出、ヒートマップの作成は TIBCO Spotfire (TIBCO software, Tokyo Japan) を用いて行った。リファレンスとして用いたヒト BM-MSC の遺伝子プロファイルは、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認 (承認番号 : RK-121012-3)を受け、測定・解析を行ったデータを使用した。

## V. フローサイトメトリー解析

培養細胞を 0.05%Trypsin-EDTA を用いて細胞を回収した後、0.2%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、EDTA 添加 PBS (autoMACS Running Buffer, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて懸濁し、 $1 \times 10^6$  個/ $100 \mu\text{l}$  に調製した。非特異的結合を阻害するため、 $10 \mu\text{l}$  正常ウサギ血清 (Sigma-Aldrich, lot 100M8400)を添加し、10 分間室温で静置した。autoMACS Running Buffer を用いて洗浄

を行い、以下の抗体を 10  $\mu$ l 添加し、4°C で 30 分間暗所に静置した。使用した抗体は MSC の陽性・陰性マーカーである Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD73、CD34、CD11b、HLA-DR、Allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD90、CD34、CD105、CD45、CD19 を用いた。陰性コントロールとして FITC または PE 標識抗マウス IgG  $\kappa$ 、IgG2a,  $\kappa$  抗体 (BD Biosciences) を使用した。抗体反応後、autoMACS Running Buffer 500  $\mu$ l に懸濁し、メッシュフィルターを通して 5ml FACS ラウンドチューブ (BD Falcon) に移した。死細胞の検出のため、各チューブに 7-aminoactinomycin D (7AAD, BD Biosciences) を 5  $\mu$ l ずつ添加した。

細胞表面抗原の測定は、FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson, Bedford, MA) を使用し、Forward Scatter (FSC)-Side Scatter (SSC) をゲーティング後、7AAD 陰性分画をゲーティングし、生細胞のみを解析した。解析は FlowJo ソフトウェア (version 9, FLOWJO, LLC, Ashland, OR) を用いて行い、Isotype control の蛍光強度と比較し、ヒストグラムを作成した。

## VI. Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) アッセイ

細胞を 35mm ディッシュに 100 個ずつ播種し、2ml の StemMACS MSC Expansion Media supplement (Miltenyi Biotech) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下

で培養した。3週間後に4%ホルマリンで固定後、0.5%クリスタルバイオレット (Sigma-Aldrich)で5分間染色し、コロニー数を肉眼的に測定した。コロニーは細胞数が100個以上の物をカウントした。実験はn=3でそれぞれ triplicate dish で行った。CFU-F アッセイの概略を図2に示す。

## VII. 細胞増殖能解析

細胞を35mm ディッシュに $2 \times 10^4$ 個ずつ播種し、10%FBS含有MEM Alphaを培地として、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。3~4日おきに培地交換し、day 1, 3, 5, 7, 9にコールターカウンター (Beckman Coulter, Fullerton, CA)を用いて細胞数を測定した。それぞれ第2継代の細胞を使用した。細胞増殖曲線を作成し、細胞倍加時間を算出した。

## VIII. In vitro 多分化能解析

### ① 脂肪分化誘導

細胞を35mm ディッシュに播種し、コンフルエントに到達した時点で1 $\mu$ M Dexamethasone (Sigma-Aldrich)、0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich)、1 $\times$ Insulin-Transferin-Selenium-X (GIBCO)含有10%FBS/DMEMを分化誘導培地として3日間培養した。4日後からは10%FBS DMEMに変更し、3週間後に固定後、Oil-red-O (Sigma-Aldrich)染色を20分間室温で行っ

た。

## ② 骨分化誘導

細胞を 35mm ディッシュに播種し、コンフルエントに到達した時点で 100nM Dexamethasone、0.05mM L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich)、10mM  $\beta$  glycerophosphate (Sigma-Aldrich)含有 10%FBS/DMEM を分化誘導培地として 3 週間培養した。固定後、1% Alizarin red S (Sigma-Aldrich)で 3 分間室温で染色した。

## ③ 軟骨分化誘導

$2 \times 10^6$  個の細胞を 15ml チューブに分注し、300G、室温で 3 分間遠心後、上清を吸引し、NIH chondroDiff Medium<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec) を 2ml 加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。3 週間後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、形成された細胞塊を実体顕微鏡を用いて観察、写真撮影を行った。

## IX. 細胞へのサイトカイン刺激と免疫制御関連因子の解析

細胞を未刺激 (basal)群、Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  刺激群、Interferon (IFN)  $\gamma$  刺激群に分け、それぞれ 10ng/ml TNF  $\alpha$  もしくは 150U/ml IFN  $\gamma$  を 6 時間または 3 日間刺激した。RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて totalRNA を採取し、High Capacity

cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用し、逆転写反応を行い、cDNA を得た。リアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)反応は StepOne and StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)を使用し、95°C/20 秒で加温後、95°C/1 秒と 60°C/20 秒を 40 サイクル行った。すべての cDNA 量は 50ng に統一し、PCR 反応液は TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)を用いた。解析した遺伝子は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) の Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) (Hs00153133\_m1)、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (Hs00366278\_m1)、Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) (Hs00998133\_m1)、Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) (Hs00984148\_m1)、Nitric oxide synthase 2 (NOS2) (Hs01075529\_m1)、Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) (Hs00234140\_m1)である。遺伝子発現の比較解析は内部標準として 18S ribosomal RNA (Hs99999901\_s1)を使用し、相対的定量解析法 (comparative Ct 法)によって行った。実験方法の概略を図 3 に示す。

## X. 統計解析

実験データは mean $\pm$ SD で示し、リアルタイム RT-PCR の遺伝子発現レ

ベルの多群間比較は、One-way analysis of variance (ANOVA)にて検定を行った後、Post-hoc 検定として Tukey's multiple comparison test を行い、評価した。2 群間比較は Mann-Whitney U test を用いた。p<0.05 を有意水準とし、統計解析は Prism5 (GraphPad software: La Jolla, CA)を用いて行った。

## 【結果】

### I. 組織学的検討

はじめに **Explant** 法によって異種細胞が混入する可能性を検証するために、臍帯の組織切片を作製し、組織学的検討を行った。臍帯組織の HE 染色像を図 4 A, B に示す。臍帯は 2 本の臍帯動脈 (Umbilical Artery: UA)、1 本の臍帯静脈 (Umbilical Vein: UV)、それを取り囲む WJ、さらに臍帯外周を包む羊膜 (Amniotic Membrane : AM) から構成されている。WJ を構成する細胞を同定するために臍帯組織の免疫組織学的検討を行った。その結果、WJ に存在する細胞はすべて間質細胞マーカーである PDGFR- $\beta$  陽性であり血管内皮細胞マーカーである CD31 や上皮細胞マーカーである CK7 陰性であった (図 4 C, D)。臍帯羊膜細胞は CK7 陽性、PDGFR- $\beta$  陰性であり、臍帯動脈を構成する細胞は血管内皮細胞が CD31 陽性、PDGFR- $\beta$  陰性であり、周囲の血管平滑筋細胞は CD31 陰性、PDGFR- $\beta$  陰性であった (図 4 E, F)。以上の結果より WJ を構成する間質細胞は PDGFR- $\beta$  をマーカーとして同定できることが明らかとなった。

次に **Explant** 法に用いる臍帯組織の組織切片を作製し、組織学的検討を行った。HE 染色では **Explant** 法に用いる臍帯組織は WJ 組織で占められており、臍帯動静脈や羊膜は認められなかった (図 5 A)。免疫組織染色では

Explant 法に用いる臍帯組織は PDGFR- $\beta$  陽性細胞で占められていた (図 5 B)。CD31 陽性の内皮細胞や CK7 陽性の羊膜上皮細胞はほとんど認められなかった。増殖期の細胞を同定する Ki67 染色を行ったところ、Explant 法に用いる臍帯組織の辺縁に Ki67 陽性細胞が多数検出された (図 6 A)。Ki67 の染色性は PDGFR- $\beta$  陽性細胞の核に一致して局在していた (図 6 B)。以上の結果より Explant 法において派生・増殖する細胞は WJ 中の PDGFR- $\beta$  陽性間質細胞であることが明らかになった。

## II. DNA マイクロアレイ解析

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、両者の mRNA 発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法にて解析した。対照としてヒト BM-MSC を同時に解析し、比較した。各細胞のヒートマップと階層的クラスタリング解析の結果を図 7 に示す。WJ-MSC と BM-MSC はヒートマップ上では類似した遺伝子発現プロファイルを示したが、クラスター分類では大きく発現量の異なる 2 群として識別された。これに対し、酵素法と Explant 法で調製した WJ-MSC は P0、P1 とともに酷似した遺伝子発現プロファイルを示し、階層的クラスタリング解析でも非常に距離が近い群として分類された。

酵素法と Explant 法で調製した WJ-MSC 間の遺伝子発現の Scatter plot



を継代数別に図 8 に示す。P0、P1 ともに両者の遺伝子発現プロファイルは非常に近似性が高く、その近似値は P0 では 0.980、P1 では 0.987 であった。

それぞれの調製法において、特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、酵素法にて特徴的に発現する遺伝子として Collagen and calcium-binding EGF domain-containing protein 1 (CCBE1)、Explant 法で特徴的に発現する遺伝子として Collagen type XIV alpha 1 (COL14A1) と Sparc/osteonectin cwcx and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3 (SPOCK3) の 3 遺伝子のみが同定された(図 9)。以上の結果より酵素法と Explant 法で調製された WJ-MSC は P0 より非常に近似した遺伝子発現プロファイルを呈することが示された。

### III. 細胞表面抗原プロファイルの評価

酵素法、Explant 法で調製した WJ-MSC の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで解析し比較した。各マーカーのヒストグラムを図 10 に示す。どちらの細胞も MSC マーカーである CD73、CD90、CD105 がほぼ 100% 陽性であり、血液細胞のマーカーである CD34、CD45、CD19、CD11b や HLA-DR は陰性であった。これらの陽性・陰性マーカーの発現パターンは MSC の minimal criteria に一致するプロファイルであった。以上の結果より、酵素法、Explant 法どちらの調製法で得られた細胞もほぼ同じ MSC 様

の細胞表面抗原発現プロファイルを示すことが明らかになった。

#### IV. CFU-F アッセイ

MSC の自己複製能を反映するとされている CFU-F コロニー形成能を比較検討した。酵素法および Explant 法で調製した WJ-MSC はともに第 2～第 4 継代に至るまで CFU-F コロニー形成を認め、その形成率は 4~5%であった (図 11 A)。酵素法と Explant 法の比較では、第 2 継代でそれぞれ  $4.13 \pm 0.69\%$ 、 $4.66 \pm 1.0\%$ 、第 3 継代でそれぞれ  $5.11 \pm 0.70\%$ 、 $5.00 \pm 0.78\%$  であり、コロニー形成率に統計学的有意差は認められなかった。一方、第 4 継代では酵素法( $2.78 \pm 0.32\%$ )は Explant 法( $5.11 \pm 0.75\%$ )に比べ、コロニー形成率が有意 ( $p < 0.05$ )に低い結果が得られた。各調製法における形成されたコロニーの外観を図 11 B に示す。

#### V. 細胞増殖能解析

酵素法、Explant 法で調製した WJ-MSC の細胞増殖能を測定し、比較した。細胞増殖曲線を図 12 に示す。酵素法、Explant 法ともにほぼ同じ増殖曲線を示した。細胞倍加時間を算出した結果、酵素法では 31.9 時間、Explant 法では 32.2 時間と類似した値が得られた。以上の結果より酵素法、Explant 法どちらの調製法においても同様の増殖能を有することが明らかになった。

#### IV. In vitro 多分化能解析

両調製法を用いて得られた WJ-MSC における多分化能の比較を行った (図 13)。脂肪分化誘導培地にて、3 週間脂肪分化誘導を行った結果、どちらの細胞も Oil-red-O 陽性の脂肪滴を有する脂肪細胞の出現が認められた。骨分化誘導培地にて 3 週間骨分化誘導を行った結果、どちらの細胞も Alizarin red S 陽性のカルシウム沈着を示す細胞の出現は認められなかった。軟骨分化誘導培地で 3 週間軟骨分化誘導を行った結果、どちらの細胞も軟骨様細胞凝集塊の形成を認めた。以上の結果より、酵素法、Explant 法どちらの調製法においてもほぼ同様の脂肪、軟骨への分化能を示すことが明らかとなった。

## VII. 細胞へのサイトカイン刺激と免疫制御関連因子の解析

酵素法、Explant 法で調製した WJ-MSC の免疫制御関連因子の発現をリアルタイム RT-PCR を用いて比較した。プロスタグランジン生合成に重要な役割を担う PTGS2 は、繊維芽細胞に比べ両 WJ-MSC で有意に基礎発現が高く、これらの発現は TNF $\alpha$  刺激により増強した (図 14)。酵素法(basal  $2.23 \pm 0.83 \times 10^{-5}$ )と Explant 法(basal  $3.67 \pm 0.94 \times 10^{-5}$ )の間には統計学的有意差は認められなかった。TRAIL の発現は、繊維芽細胞に比べ両 WJ-MSC で基礎発現および TNF $\alpha$  刺激による発現が有意に高く、酵素法(basal  $5.73 \pm 1.75 \times 10^{-5}$ )と Explant 法(basal  $5.12 \pm 1.0 \times 10^{-5}$ )の間には統計学的有意差は認められなかった (図 15)。TGF- $\beta$  1 の発現は、繊維芽細胞に比べ両

WJ-MSC で基礎発現が有意に高く、酵素法(basal  $6.33 \pm 0.87 \times 10^{-5}$ )と Explant 法(basal  $6.69 \pm 2.84 \times 10^{-5}$ )の間には統計学的有意差は認められなかった (図 16)。IDO1 の発現は、いずれの細胞も基礎発現はほとんど認められず、IFN  $\gamma$  刺激により発現の亢進が認められた。両 WJ-MSC は繊維芽細胞に比べ IFN  $\gamma$  刺激による発現が高い傾向にあった。酵素法(IFN  $\gamma$   $1.42 \pm 0.75 \times 10^{-3}$ )と Explant 法(IFN  $\gamma$   $9.22 \pm 7.72 \times 10^{-4}$ )の間には統計学的有意差は認められなかった (図 17)。NOS2 の発現は、いずれの細胞も IFN  $\gamma$  刺激により亢進し、酵素法(basal  $1.58 \pm 1.44 \times 10^{-9}$ )と Explant 法(basal  $2.12 \pm 0.77 \times 10^{-9}$ )の間に統計学的有意差は認められなかった (図 18)。CCL2 の発現は、いずれの細胞も TNF  $\alpha$  刺激と IFN  $\gamma$  刺激により発現が亢進したが、酵素法(basal  $1.18 \pm 0.44 \times 10^{-5}$ )と Explant 法(basal  $8.78 \pm 3.03 \times 10^{-6}$ )の間に統計学的有意差は認められなかった (図 19)。以上の結果より WJ-MSC は PTGS2、TRAIL、TGF- $\beta$  1 といった免疫制御にかかわる多くの遺伝子発現が認められ、その発現は酵素法と Explant 法の間には有意差がないことが明らかとなった。

## 【考察】

組織学的検討の結果では血管と羊膜を除去したサンプルから派生・増殖する細胞は WJ 由来の PDGFR- $\beta$  陽性細胞であった。このことから Explant 法によって派生・増殖する細胞は WJ 間質細胞であり、羊膜上皮細胞や血管内皮細胞などを含まないことが示唆された。

マイクロアレイ解析では酵素法と Explant 法によって調製された細胞の遺伝子発現プロファイルは継代数に関わらず非常に近似していた。この結果は今まで報告はなく新規性の高いデータである。このことは Explant 法でも初代培養において他の細胞の混入を認めないことを示唆している。これらの所見は Explant 法でも他細胞の混入・派生・増殖がほとんどなかったことを示している。今回、検体処理の際に羊膜と血管の除去を確実に行ったことで、他細胞の混入を防ぎ、その結果、Explant 法でも均質な WJ-MSC が得られたと考えられた。ヒートマップでは BM-MSC と WJ-MSC の遺伝子発現は視覚的に類似しているものの異なる部分も認めた。これは既報<sup>33)</sup>と一致した結果であった。BM-MSC は WJ-MSC に比べ、脂肪分化能や骨分化能が高いことが知られているが、このような mRNA 発現の差異から両者の多分化能の違いを説明できるかもしれない。調製法間で CCBE1、COL14A1、SPOCK3 遺伝子の発現に差が認められた。これらはいずれもコラーゲンに関連するものであり、コラゲナーゼ

処理による細胞への影響を反映した可能性がある。これらが機能的にどのように影響するか、今後の検討が必要と考えられた。

細胞増殖能の結果は、両調製法による WJ-MSC の細胞倍加時間は約 32 時間であり、報告されている BM-MSC や Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) の細胞倍加時間に比べ短く、この所見は、WJ-MSC が BM-MSC、ASC に比べ細胞増殖能が高いという既報<sup>33)</sup>に一致する。多分化能に関しては脂肪細胞や軟骨への分化能は認めたが、石灰沈着を伴う成熟度の高い骨芽細胞への分化能は認められなかった。この結果も既報<sup>33)</sup>に一致している。細胞増殖能や多分化能に両方で明らかな差はなかった。一方 CFU-F コロニー形成能は第 4 継代において Explant 法と比較して酵素法で低下する傾向が認められた。これらのことからコラゲナーゼ処理は継代後期の MSC の自己複製能に影響している可能性がある。一方、継代を繰り返すことにより MSC の細胞増殖能が低下し、これに伴い自己複製能が低下している可能性も否定できない。今後細胞増殖能についても継代数を重ねて検討する必要がある。

免疫制御関連遺伝子の発現は両調製法間で有意差を認めなかった。WJ-MSC は種々の液性因子を産生し、炎症性サイトカイン産生の抑制、抑制性サイトカインの促進、Th1 細胞の抑制や Th2 細胞へのシフト、制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の誘導を促進するなど、様々な免疫制御作用があることが in vitro

の実験で明らかにされている<sup>14-16)</sup>。また、*in vivo*においても GVHD や慢性炎症性腸疾患などの自己免疫疾患に対して、有効性が示されている<sup>7)</sup>。今回の結果から調製法の違いに関わらず、同様の免疫制御効果が期待できると考えられる。

WJ-MSC を臨床応用する場合、酵素法はコラゲナーゼ処理が必要なため、培養までの処理時間が約 20 時間と長く、異種動物由来試薬を使用することによる安全性の問題が危惧される。さらに、酵素法は *Explant* 法に比べ、試薬類が多くなるため、調製コストが高くなることが予想される。さらに *Explant* 法では MSC 以外の細胞の混入の可能性が指摘されていたが、今回の組織学的検討、マイクロアレイ解析により、純度の高い MSC の増殖が可能であると明らかとなった。以上より WJ-MSC を臨床応用する場合、現在は酵素法による調製が主流であるが、今後 *Explant* 法による調製も積極的に考慮されるべきであると思われる。

## 【まとめ】

今回、酵素法と **Explant** 法により調製された **WJ-MSC** の形質、増殖能、多分化能、免疫制御関連遺伝子の発現などをそれぞれ解析し、調製法の違いによる **WJ-MSC** の治療用細胞としての性能を比較評価した。その結果、両調製法により得られた細胞の遺伝子発現プロファイルは非常に近似しており、それぞれの細胞の増殖能、自己複製能、多分化能、免疫制御関連遺伝子の発現に大きな違いを認めなかった。以上の結果より **Explant** 法でも酵素法でも同様の形質と機能を有する **WJ-MSC** が調製できることが明らかとなった。臨床的に応用する場合、培養までの処理時間が短く、異種動物由来物質を含む試薬を使用せず、調製コストが低いといった利点を有する **Explant** 法を積極的に選択すべきと考えられた。



## 【謝辞】

本研究にあたり、研究全般において終始ご指導いただきました日本大学医学部機能形態医学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎教授に心から感謝いたします。そして、研究全般を支えてくださいました指導教員の日本大学小児科学系小児科学分野 高橋昌里教授、また、臍帯と胎盤の採取にご理解、ご援助をくださいました日本大学産婦人科学系産婦人科学分野 山本樹生教授をはじめ産婦人科医局の先生方に厚く御礼申し上げます。

またマイクロアレイ解析を指導していただいた日本大学生物資源科学部 加野浩一郎教授、沖 嘉尚先生に深く感謝の意を表します。

実験計画、手技、解析など、多くのことをご教示くださった日本大学小児科学系小児科学分野 下澤克宜先生、大熊啓嗣先生、日本大学機能形態学系細胞再生・移植医学分野 風間智彦先生、風間美奈子先生、山元智衣先生、萩倉一博先生に心から感謝いたします。また、多くのご援助をいただきました日本大学小児科学系小児科学分野 谷ヶ崎博先生、血液腫瘍班の先生方、他医局員の先生方に深く感謝いたします。

表 1. 酵素法、Explant 法の比較

	酵素法	Explant法
調製法	細切した組織をコラゲナーゼ処理後、付着培養する	細切した組織をプラスチックディッシュに貼り付け、付着培養する
原理	プラスチックに対する接着能と増殖能を利用	組織からの遊走能と増殖能を利用
培養までの処理時間	長い(約20時間)	短い(約2時間)
コラゲナーゼ	必要	不要
調製コスト	比較的高価	比較的安価

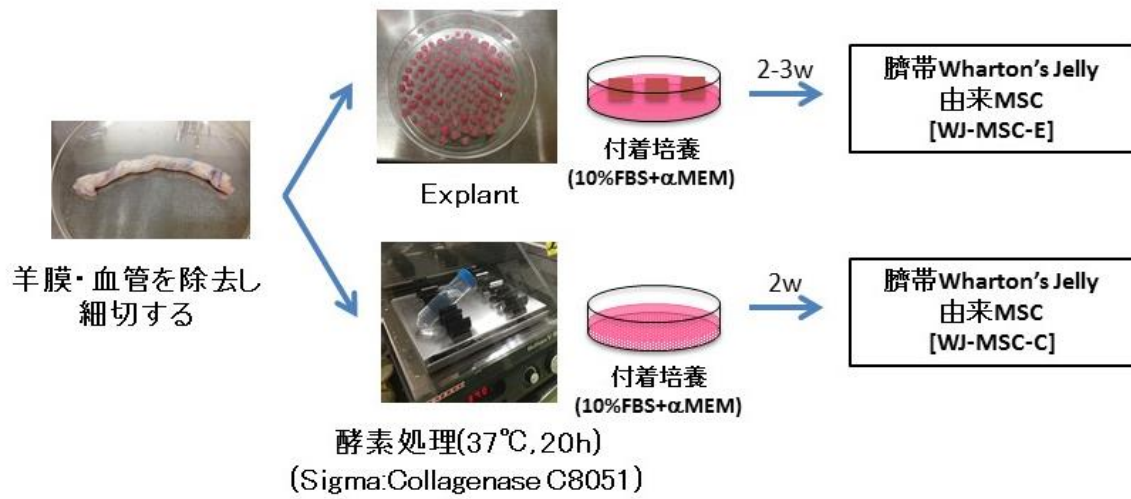


図 1. WJ-MSC の調製方法

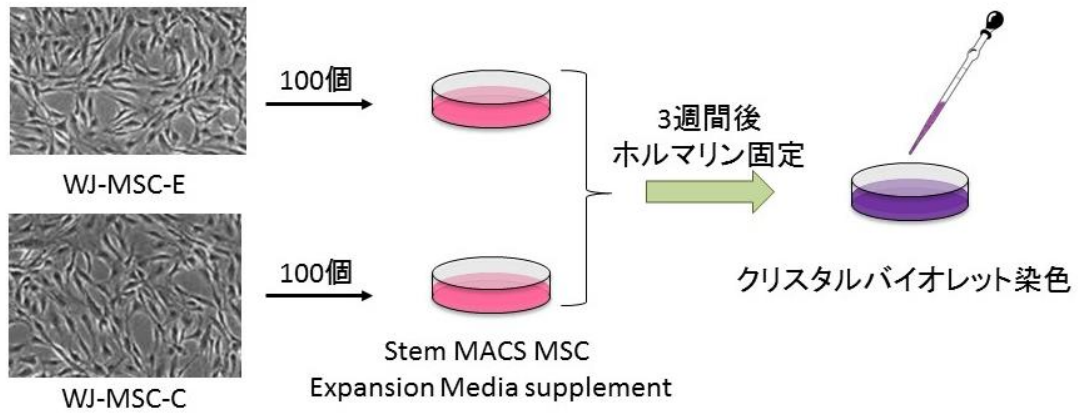
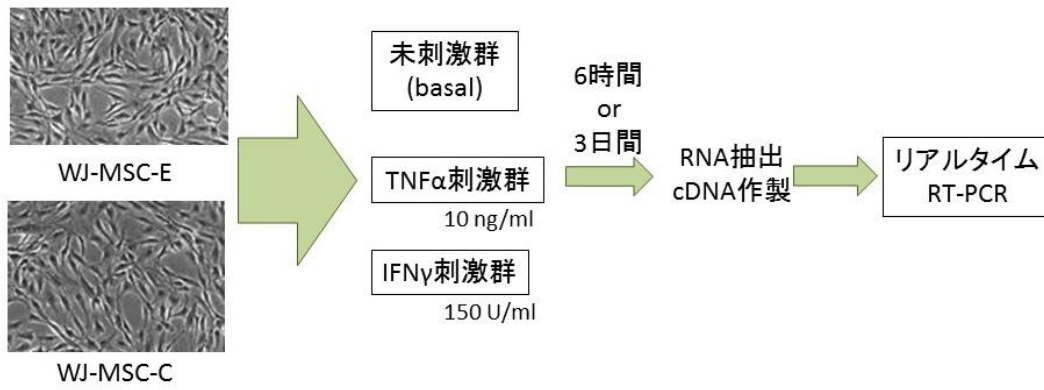


図 2. CFU-F アッセイ法



<解析した免疫制御遺伝子>

PTGS2	TGF- $\beta$ 1	NOS2
TRAIL	IDO1	CCL2

図

### 3. 免疫制御関連遺伝子解析法

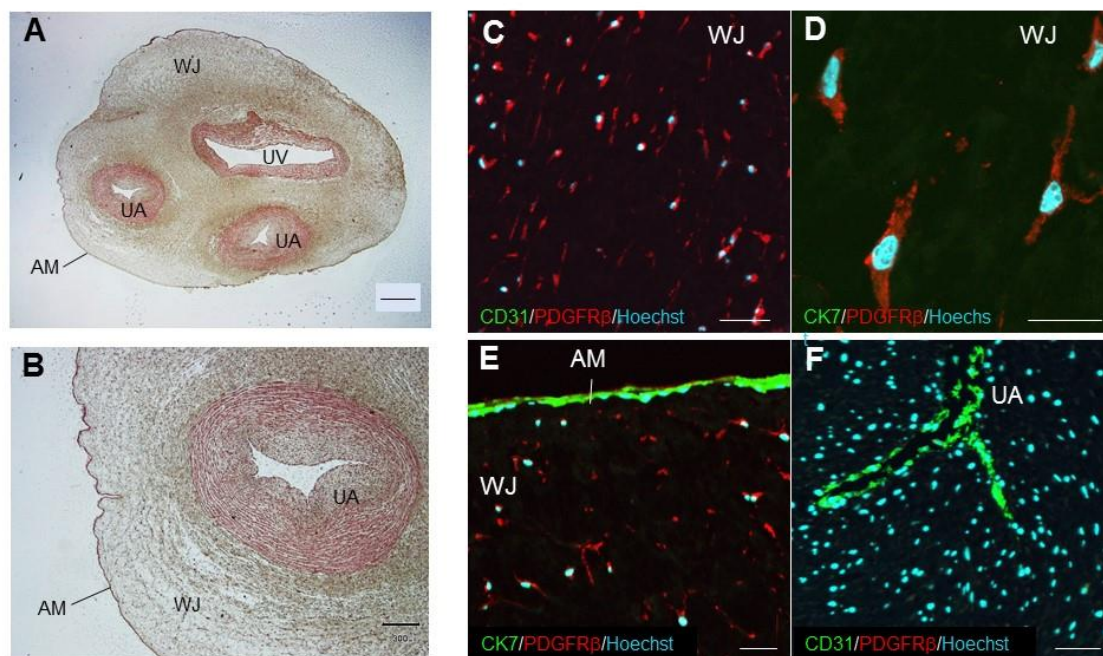


図 4. ヒト臍帯の組織学的検討

ヒト臍帯パラフィン切片標本を作成し組織学的検討を行った。(A, B) HE 染色像 Scale bar: 1 mm (A), 300  $\mu$ m (B)。(C-F) 蛍光免疫染色像。Wharton's Jelly (WJ) の組織像 (C)、強拡大像 (D)、羊膜 (AM) 付近の組織像 (E)、臍帯動脈 (UA) 付近の組織像 (F) Scale bar: 20  $\mu$ m (C, E, F), 10  $\mu$ m (D)。

WJ に存在する細胞は PDGFR- $\beta$  陽性、CD31 $\cdot$ CK7 陰性 (C, D)。臍帯羊膜細胞は CK7 陽性、PDGFR- $\beta$  陰性 (E)。血管内皮細胞は CD31 陽性、PDGFR- $\beta$  陰性、血管平滑筋細胞は CD31 陰性、PDGFR- $\beta$  陰性 (F) であった。

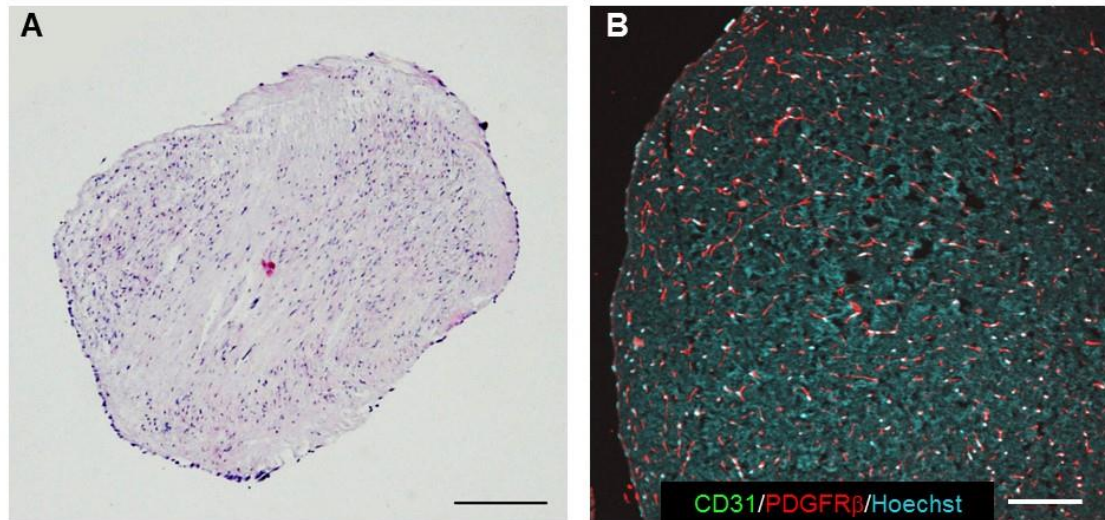


図 5. Explant 法に用いる臍帯組織の組織像

Explant 法に用いる臍帯組織のパラフィン組織切片を作製し、組織学的検討を行った。(A)HE 染色像。Scale bar 300  $\mu\text{m}$ 。(B)蛍光免疫染色像。Scale bar 100  $\mu\text{m}$ 。

HE 染色では、臍帯動静脈や羊膜の混入は認められなかった (A)。免疫組織染色では PDGFR- $\beta$  陽性細胞で占められていた (B)。CD31 陽性細胞や CK7 陽性細胞はほとんど認められなかった。



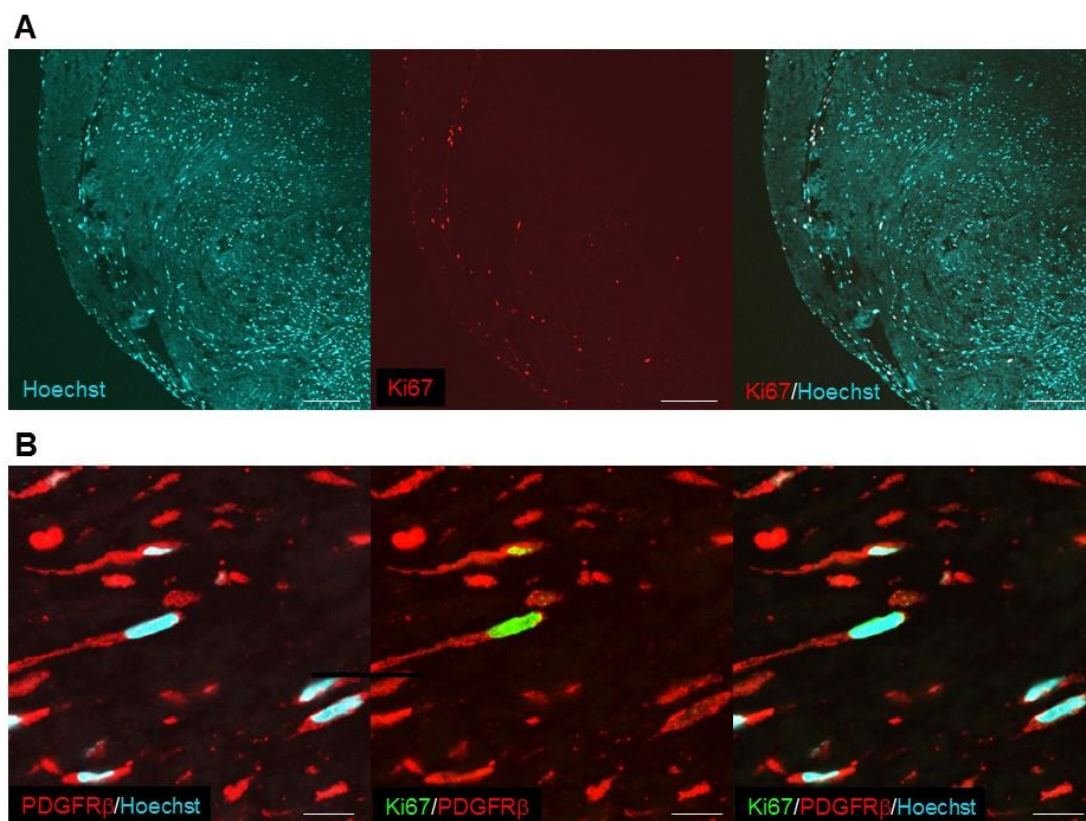


図 6. Explant 法における臍帯組織中の増殖細胞の解析

Explant 法にて 3 週間培養したヒト臍帯組織の蛍光免疫染色像。(A)弱拡大像、Scale bar 100 $\mu$ m。(B)強拡大像、Scale bar 10 $\mu$ m。

Explant 法に用いた臍帯組織の辺縁に Ki67 陽性細胞が多数検出された (A)。Ki67 の染色性は PDGFR- $\beta$  陽性細胞の核に一致して局在していた (B)。



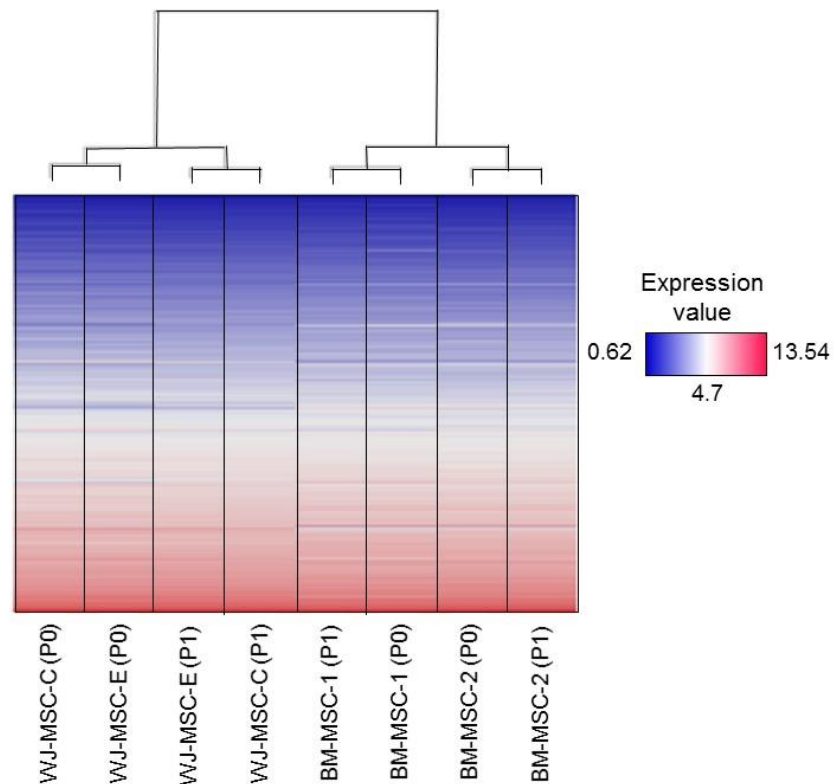


図 7. Wharton's Jerry 由来 MSC (WJ-MSC) の調製法の違いによる

### 網羅的遺伝子解析

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、両者の mRNA 発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法にて解析した。対照として骨髄 MSC を同時に解析し、比較した。各細胞のヒートマップと階層的クラスタリング解析の結果を示す。WJ-MSC-C : 酵素法、WJ-MSC-E : Explant 法、BM-MSC は 2 ドナーを用いた。P は継代数を示す。

両調製法で得られた WJ-MSC は P0、P1 のいずれも遺伝子発現プロファイル、階層的クラスタリングはともに非常に距離が近い群として識別された。

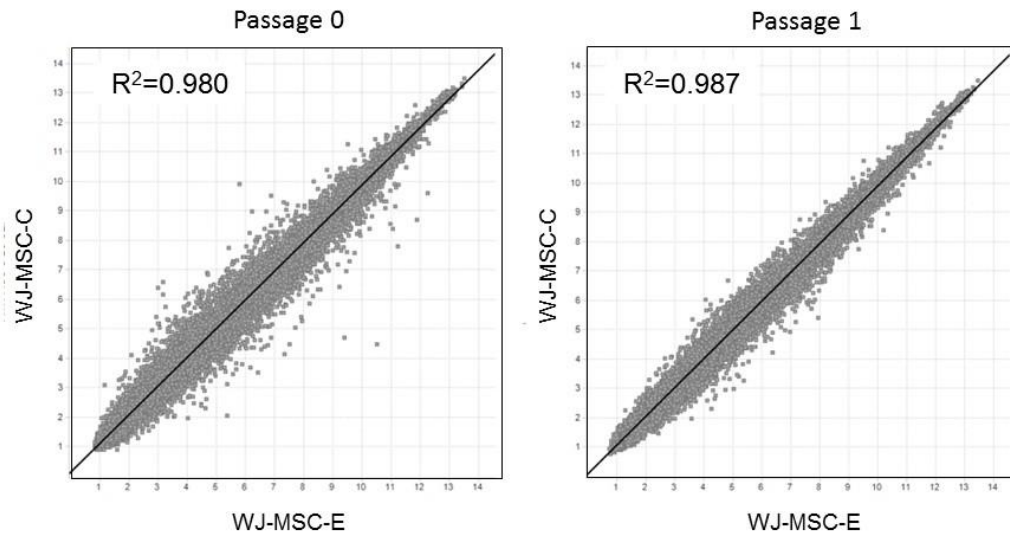


図 8. WJ-MSC の調製法の違いによる網羅的遺伝子解析

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、両者の mRNA 発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法にて解析した。両細胞の Scatter plot を継代数別に示す。WJ-MSC-C : 酵素法、WJ-MSC-E : Explant 法。

P0、P1 とともに両者の遺伝子発現プロファイルは非常に近似性が高く、その近似値は P0 では 0.980、P1 では 0.987 であった。

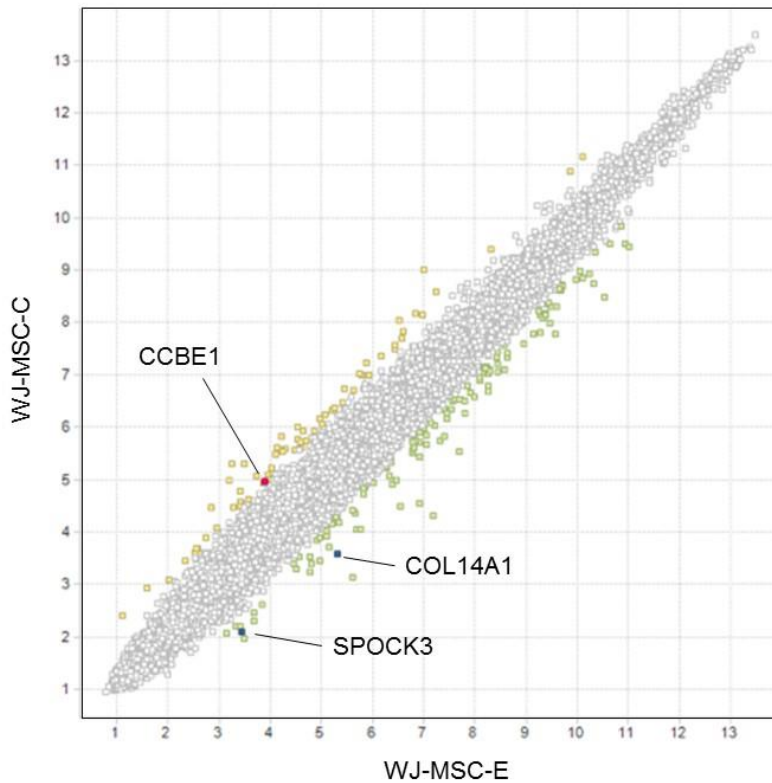


図 9. WJ-MS-C の調製法の違いによる網羅的遺伝子解析

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、両者の mRNA 発現プロファイルを DNA マイクロアレイ法にて解析した。両細胞の Passage 0-1 を平均した Scatter plot を示す。WJ-MS-C : 酵素法、WJ-MS-E : Explant 法。黄色は酵素法で Explant 法の 2 倍以上発現している遺伝子、赤は黄色の中で Explant 法で発現していない遺伝子、緑は Explant 法で酵素法の 2 倍以上発現している遺伝子、青は緑の中で酵素法で発現していない遺伝子を示す。

酵素法にて特徴的に発現する遺伝子として CCBE1、Explant 法で特徴的に発現する遺伝子として COL14A1 と SPOCK3 の 3 遺伝子が同定された。

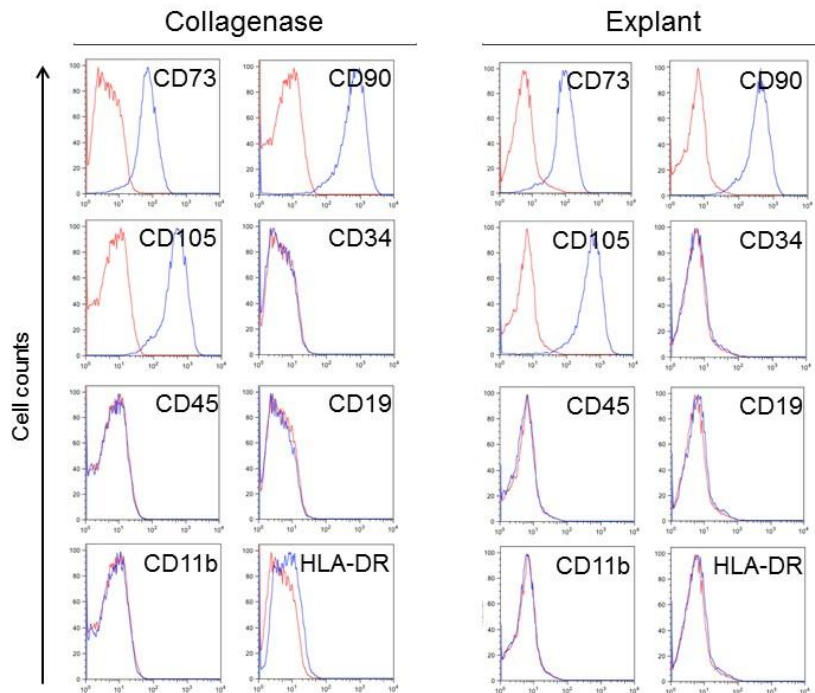


図 10. WJ-MSC の調製法の違いによる細胞表面抗原の解析

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。青のヒストグラムはサンプルを示し、赤のヒストグラムは isotype control を示す。

酵素法、Explant 法どちらの調製法で得られた細胞も MSC の minimal criteria に合致する表面抗原発現プロファイルを示した。

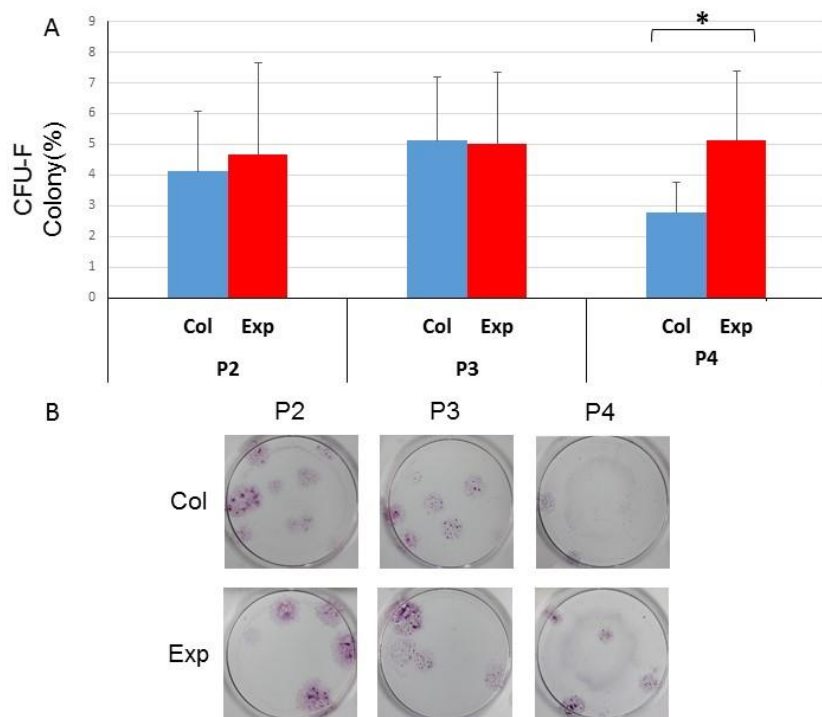


図 11. Colony-forming unit-fibroblast (CFU-F)形成能の比較

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、それぞれ 100 個 /35mm ディッシュで播種し、3 週間後にクリスタルバイオレット染色を行い、形成されたコロニーを測定した。P2-P4 の細胞を解析した。(A)コロニー形成率 (%)の定量グラフを示す。Bar: Mean±SD、triplicate dish (n=3)。(B)代表的なコロニーの外観を示す。\*p<0.05 (Mann Whitney U test)

両調製法で得られた WJ-MSc は P2~4 に至るまで CFU-F コロニー形成を認め、その形成率は 4~5%であった。P4 では酵素法で Explant 法に比べ、コロニー形成率が有意に低かった。

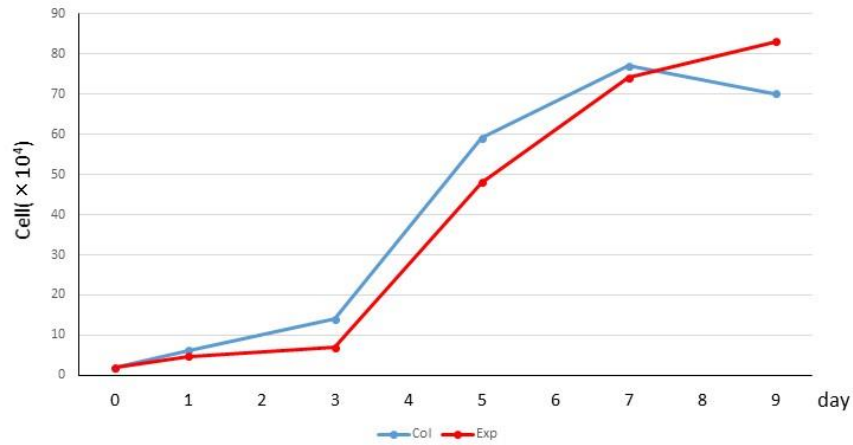


図 12. 細胞増殖能の比較

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、それぞれ  $2 \times 10^4$  個/10cm ディッシュで播種し、継時的に細胞数を計測した。各細胞の細胞増殖曲線を示す。

酵素法、Explant 法ともにほぼ同じ増殖曲線を示した。細胞倍加時間は、酵素法では 31.9 時間、Explant 法では 32.2 時間であった。

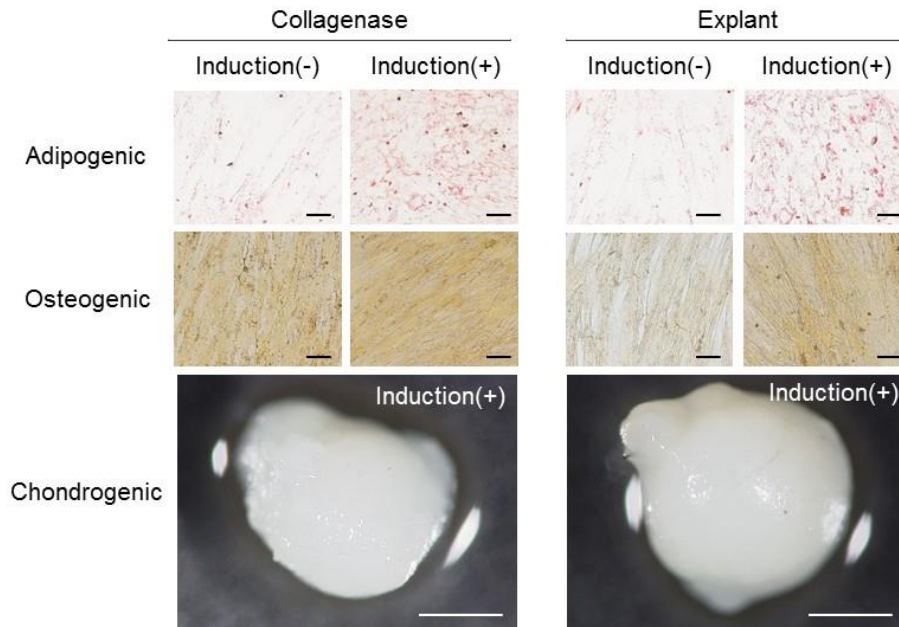


図 13. *in vitro* における多分化能の比較

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、それぞれ  $1 \times 10^5$  個 / 35mm ディッシュで播種し、脂肪分化誘導培地、骨分化誘導培地で 3 週間培養し、それぞれ、Oil-red-O 染色、Alizarin red S 染色を行った。光学顕微鏡像を示す。Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ 。また、それぞれの細胞を  $2 \times 10^6$  個 / 15ml チューブ内にて軟骨分化誘導培地で 3 週間ペレット培養した。誘導された細胞凝集塊の実態顕微鏡像を示す。Scale bar: 500  $\mu\text{m}$

各調製法で得られた細胞はどちらも脂肪、軟骨への分化誘導を認めたが、骨分化誘導ではカルシウム沈着を示す骨芽細胞の出現は認めなかった。

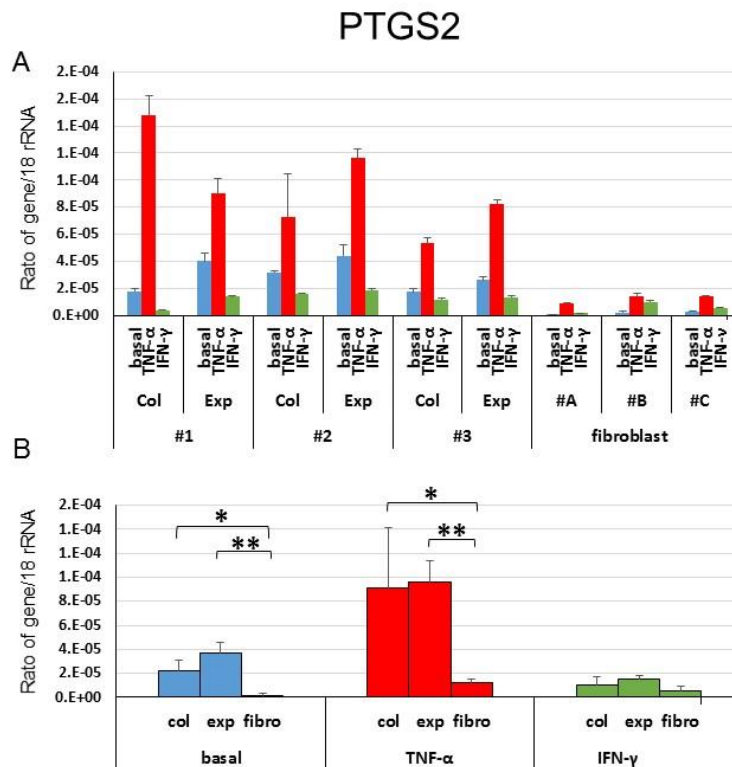


図 14. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (PTGS2)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNF $\alpha$  (10ng/ml)、IFN $\gamma$  (150U/ml)で 6 時間刺激し、total RNA を抽出した。PTGS2 の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。(A)ドナーごとの比較、(B)刺激方法別の比較。\*:p<0.05、\*\*:p<0.01(One way ANOVA, Turkey's multiple comparison analysis)、Bar: mean $\pm$ SD

繊維芽細胞に比べ両 WJ-MSC で有意に基礎発現が高く、これらの発現は TNF $\alpha$  刺激により増強した。両調製法間では有意差は認められなかった。



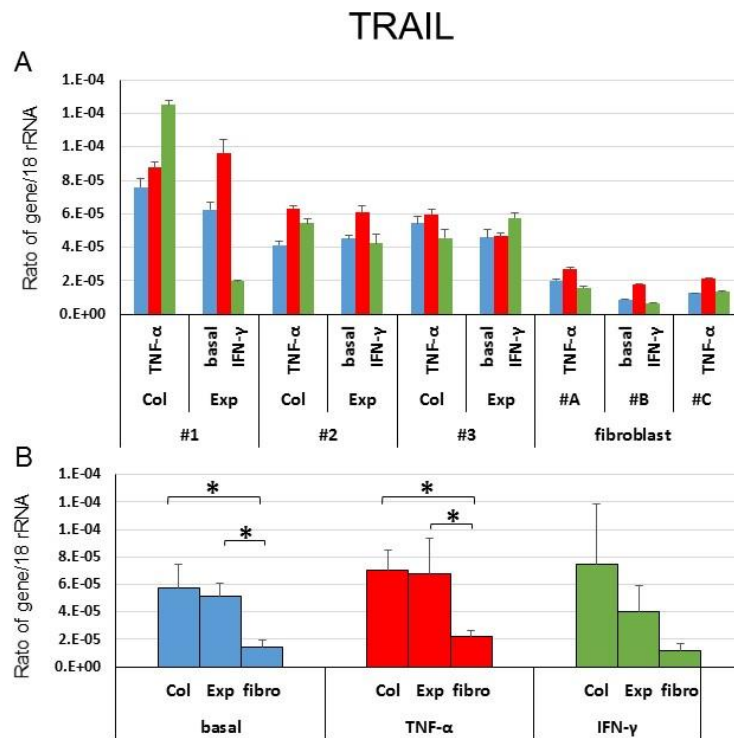


図 15. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (TRAIL)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNF $\alpha$  (10ng/ml)、IFN $\gamma$  (150U/ml) で 3 日間刺激し、total RNA を抽出した。TRAIL の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。(A)ドナーごとの比較、(B)刺激方法別の比較。\*:p<0.05 (One way ANOVA, Turkey's multiple comparison analysis)、Bar: mean $\pm$ SD

繊維芽細胞に比べ両 WJ-MSC で基礎発現および TNF $\alpha$  刺激による発現が有意に高く、酵素法と Explant 法の間には有意差は認められなかった。

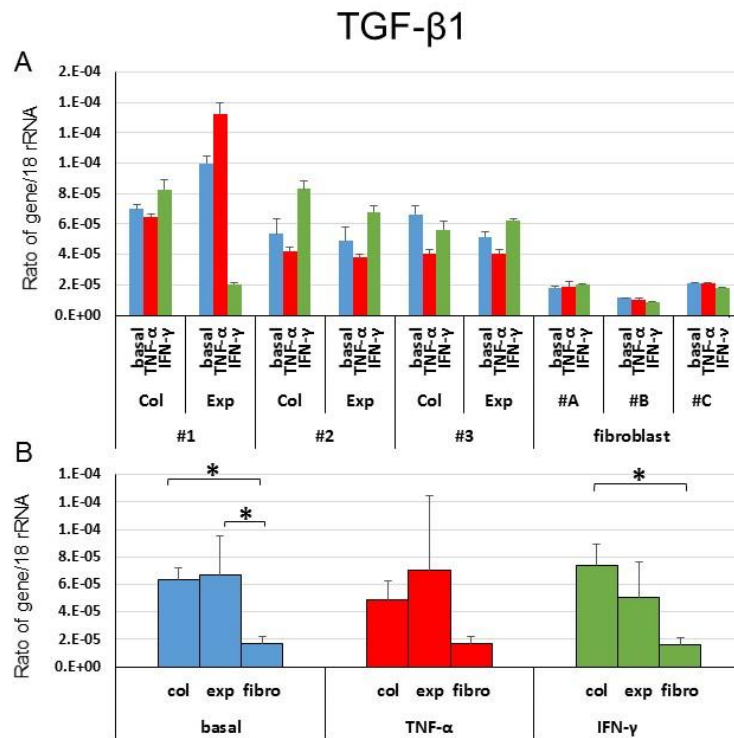


図 16. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (TGF-β1)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNFα (10ng/ml)、IFNγ (150U/ml)で 3 日間刺激し、total RNA を抽出した。TGF-β1 の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。(A)ドナーごとの比較、(B)刺激方法別の比較。\*:p<0.05 (One way ANOVA, Turkey's multiple comparison analysis)、Bar: mean±SD

繊維芽細胞に比べ両 WJ-MSC で基礎発現が有意に高く、酵素法と Explant 法の間には有意差は認められなかった。

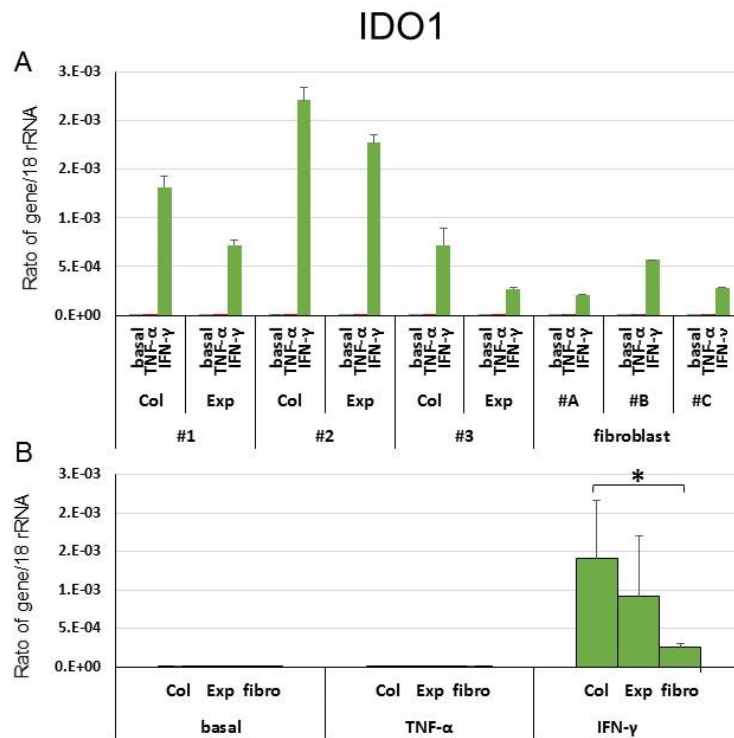


図 17. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (IDO1)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNF $\alpha$  (10ng/ml)、IFN $\gamma$  (150U/ml) で 3 日間刺激し、total RNA を抽出した。IDO1 の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。(A)ドナーごとの比較、(B)刺激方法別の比較。\*:p<0.05 (One way ANOVA, Turkey's multiple comparison analysis)、Bar: mean $\pm$ SD

いずれの細胞も基礎発現はほとんど認められず、IFN $\gamma$  刺激により発現の亢進が認められた。酵素法と Explant 法の間には有意差は認められなかった。

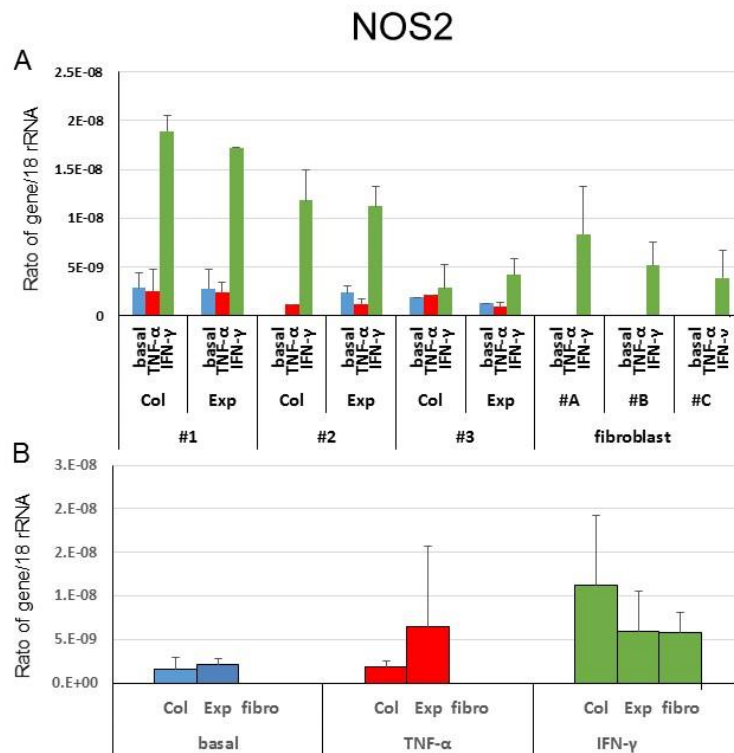


図 18. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (NOS2)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNF $\alpha$  (10ng/ml)、IFN $\gamma$  (150U/ml) で 3 日間刺激し、total RNA を抽出した。NOS2 の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。 (A) ドナーごとの比較、 (B) 刺激方法別の比較。 Bar: mean $\pm$ SD

いずれの細胞も IFN $\gamma$  刺激により亢進し、細胞間に有意差は認められなかった。

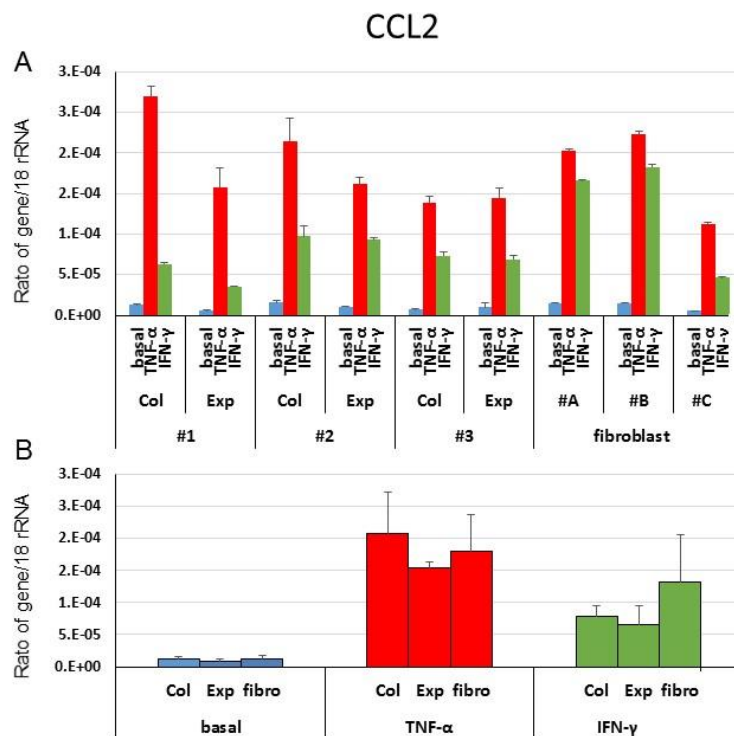


図 19. 免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現の比較 (CCL2)

ヒト臍帯より酵素法および Explant 法にて MSC を調製し、未刺激 (basal)、TNF $\alpha$  (10ng/ml)、IFN $\gamma$  (150U/ml)で 6 時間刺激し、total RNA を抽出した。CCL2 の発現を TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で解析した。各サンプルは triplicate で解析した (n=3)。(A)ドナーごとの比較、(B)刺激方法別の比較。Bar: mean $\pm$ SD

いずれの細胞も TNF $\alpha$  刺激と IFN $\gamma$  刺激により発現が亢進したが、細胞間に有意差は認められなかった。

## 【引用文献】

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**:143-147.
- 2) Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K *et al.* Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**:413-419.
- 3) Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H *et al.* A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**:503-508.
- 4) Matsubara T, Suardita K, Ishii M *et al.* Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2005; **20**:399-409.
- 5) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N *et al.* Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004; **75**:1281-1287.
- 6) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**:315-317.
- 7) Ren G, Chen X, Dong F *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 2012; **1**:51-58.
- 8) Le Blanc K, Frassoni F, Ball L *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; **371**:1579-1586.
- 9) Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI *et al.* Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; **17**:534-541.
- 10) Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; **305**:33-41.
- 11) Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2003; **5**:485-489.
- 12) Fasslrunner F, Wobus M, Duryagina R *et al.* Differential effects of mixed lymphocyte reaction supernatant on human mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 2012; **40**:934-944.

- 13) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; **105**:1815-1822.
- 14) Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2012; **8**:375-392.
- 15) Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007; **262**:509-525.
- 16) Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2011; **10**:410-415.
- 17) Choi H, Lee RH, Bazhanov N *et al.* Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* 2011; **118**:330-338.
- 18) Stagg J, Galipeau J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Curr Mol Med* 2013; **13**:856-867.
- 19) Najjar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H *et al.* Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 2012; **8**:1188-1198.
- 20) Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2008; **47**:126-131.
- 21) Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009; **30**:2-10.
- 22) Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T *et al.* Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* 2011; **81**:162-171.
- 23) Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T *et al.* Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem* 2010; **111**:846-857.
- 24) Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells* 2014; **6**:195-202.
- 25) Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; **44 Suppl 1**:60-69.
- 26) Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int* 2008; **32**:724-732.

- 27) Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A *et al.* Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int* 2013; **2013**:916136.
- 28) Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol* 2009; **90**:261-269.
- 29) Gittel C, Brehm W, Burk J *et al.* Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet Res* 2013; **9**:221.
- 30) McGuirk JP, Smith JR, Divine CL *et al.* Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Promising Cellular Therapeutic Strategy for the Management of Graft-versus-Host Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 2015; **8**:196-220.
- 31) Gao LR, Chen Y, Zhang NK *et al.* Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Med* 2015; **13**:162.
- 32) McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT *et al.* Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans* 1991; **19**:29S.
- 33) Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR *et al.* Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010; **5**:e9016.



【研究業績】

谷川 俊太郎

I. 発表

一般発表 13

II. 論文

症例報告 1

III. 著書 なし

## I. 発表

### 一般発表

1. 谷川俊太郎, 谷ヶ崎博, 西川英里, 加藤麻衣子, 七野浩之: ITP として治療されていた MYH9 異常症の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日
2. 谷川俊太郎, 谷ヶ崎博, 西川英里, 加藤麻衣子, 七野浩之: ITP として治療されていた MYH9 異常症の 1 例, 第 53 回日本小児血液・がん学会学術総会, 前橋, 2011 年 11 月 27 日
3. 大熊啓嗣, 七野浩之, 金丸浩, 谷川俊太郎, 西川英里, 平井麻衣子, 加藤麻衣子, 谷ヶ崎博, 唐澤賢祐, 能登信孝, 陳基明, 麦島秀雄: 遅発性心毒性の評価に心筋シンチグラフィと 2-D speckle tracking 法心エコー検査が有用であった骨肉腫の 1 例, 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011 年 11 月 27 日
4. 大熊啓嗣, 七野浩之, 谷川俊太郎, 西川英里, 平井麻衣子, 下澤克宣, 加藤麻衣子, 谷ヶ崎博, 神山浩, 唐澤賢祐, 鮎沢衛, 能登信孝, 住友直方, 陳基明, 麦島秀雄: 小児がん経験者の心臓血管系合併症に対する検査法の検討, 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 横浜, 2012 年 11 月 30 日
5. 谷川俊太郎, 村松秀城, 高橋義行, 濱麻人, 坂口大俊, 成田敦, 小島勢二: 乳幼児期に同種造血幹細胞移植を行った先天性好中球減少症の 3 例, 第 35 回日本造血細胞移植学会総会, 金沢, 2013 年 3 月 8 日

6. 谷川俊太郎, 今泉隆行, 野口哲平, 川口忠恭, 香山一憲, 村林督夫, 伴由布子, 田中靖彦: ジアゾキシド内服中に、動脈管の再開通を認めた低出生体重児の一例, 日本小児科学会静岡地方会, 静岡市, 2013年11月3日
7. 下澤克宜, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 大熊啓嗣, 西川英里, 石毛美夏, 谷ヶ崎博, 河野正太, 風間智彦, 松本太郎: ヒト臍帯、胎盤組織由来間葉系幹細胞と脱分化脂肪細胞の免疫調節能の検討、および急性移植片対宿主病 (GVHD) に対する細胞治療の開発, 日大バイオフォーラム, 東京, 2013年11月27日
8. 下澤克宜, 西川英里, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 大熊啓嗣, 風間智彦, 松本太郎: 胎児付属物由来幹細胞による造血幹細胞維持能と免疫制御能の比較解析, 厚労科研 難治性疾患克服研究事業 平成25年度第二回班会議, 2014年2月1日
9. 下澤克宜, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 大熊啓嗣, 石毛美夏, 風間智彦, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異とそのメカニズムに関する検討, 第3回 日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2015年1月13日
10. 下澤克宜, 松本太郎, 大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 西川英里, 平井麻衣子, 風間智彦, 谷ヶ崎博, 陳基明, 麦島秀雄, 高橋昌里: 胎児付属物由来幹細胞の免疫原性および免疫制御能の同一ドナーでの比較解析, 第37回 日本造血細胞移植学会, 神戸, 2015年3月6日

11. 下澤克宜, 松本太郎, 大熊啓嗣, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 西川英里, 風間智彦, 谷ヶ崎博, 麦島秀雄: ヒト胎児付属物由来幹細胞の免疫制御能の差異とそのメカニズムに関する検討, 第 14 回 日本再生医療学会, 横浜, 2015 年 3 月 20 日

12. 谷川俊太郎, 大熊啓嗣, 金澤剛二, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 高橋昌里, 風間智彦, 松本太郎: 臍帯血生着不全モデルマウスに対する胎児付属物由来幹細胞移植の生着促進効果, 第 36 回日本炎症・再生医学会, 六本木, 2015 年 7 月 22 日

13. 小田嶋仁美, 下澤克宜, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 大熊啓嗣, 平井麻衣子, 谷ヶ崎博, 陳基明, 高橋昌里: 移植後早期にサイトメガロウイルス性網膜炎をきたした 17 歳男児, SCT 研究会, 東京, 2015 年 10 月 2 日

## II. 論文

### 症例報告

1. 大熊啓嗣, 七野浩之, 神山浩, 谷川俊太郎, 西川英里, 下澤克宜, 平井麻衣子, 加藤麻衣子, 谷ヶ崎博, 唐澤賢祐, 能登信孝, 陳基明, 麦島秀雄: 心臓血管系晩期合併症の評価に心臓交換神経イメージング検査と Speckle Tracking 法心エコー検査が有用であった骨肉腫の 1 例, 日本小児血液・がん学会雑誌 51 巻 1 号 57-61, 2014