

中畑龍俊先生 説明資料

第29回生命倫理専門調査会 ヒアリング資料

平成16年3月30日

第29回生命倫理専門調査会

体性幹細胞

京都大学大学院医学研究科発達小児科学

中畑龍俊

再生医療とは

障害を受けた細胞、組織、臓器を体内で再生する医療

あるいは

体外で再生させた細胞や組織などを移植したり、臓器としての機能を有するようになった再生組織で置換する医療

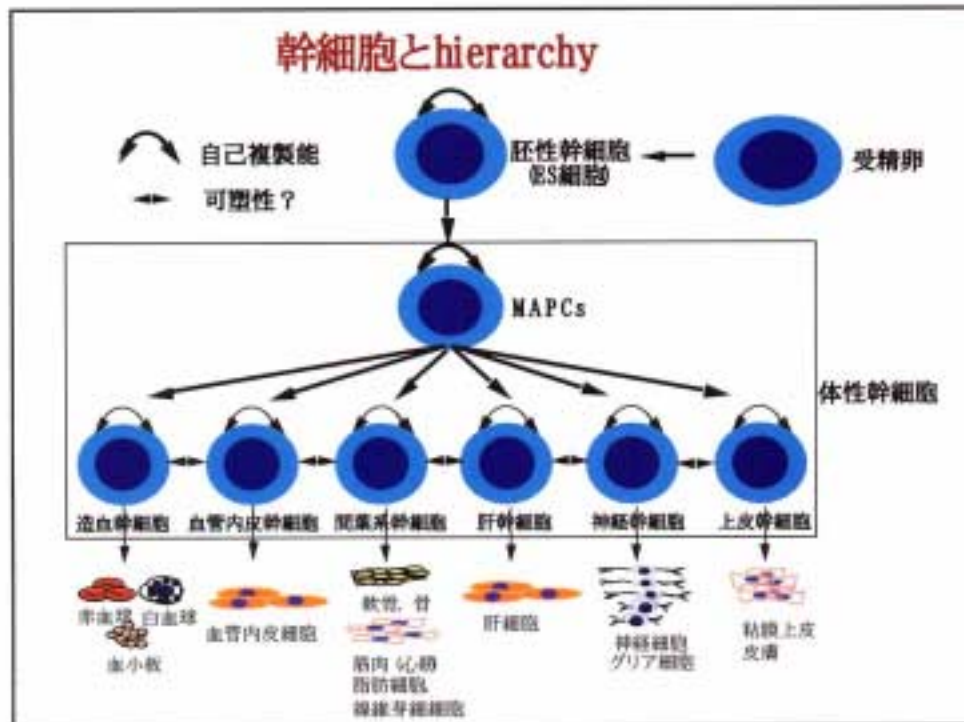
幹細胞(stem cell)とは

☆自己複製能(自分と同じ能力を持った細胞を作る)
多分化能(分化した様々な細胞を作る)

☆幹細胞には体性幹細胞と胚性幹細胞(ES細胞)がある

体性幹細胞:われわれの身体の中にある幹細胞

胚性幹細胞:受精卵から樹立した幹細胞



再生医療の対象となる疾患

血液、腫瘍疾患

白血病、再生不良性貧血、小児がんなどに対する造血幹細胞移植、人工血液

神経疾患

パーキンソン病、アルツハイマー、脳性小児麻痺、PVL、変性疾患、脊髄損傷、末梢神経障害など

循環器疾患

心筋梗塞(川崎病)、拡張型心筋症、慢性閉塞性動脈硬化症(ASO)、パージャ病など

筋疾患

各種筋ジストロフィー

肝疾患

劇症肝炎、肝硬変など

内分泌疾患

I型糖尿病など

骨疾患

骨系統疾患、骨欠損など

皮膚疾患

火傷など

その他

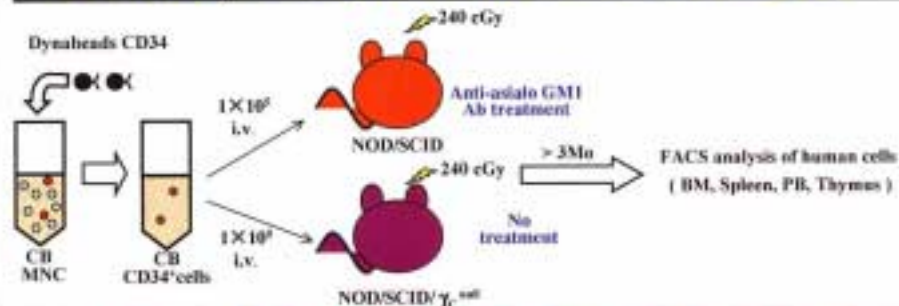
先天性難聴、網膜色素変性症、未熟児網膜症など

再生医療安全に進めるためにはヒト幹細胞を受け入れる免疫不全マウスの開発が必須である

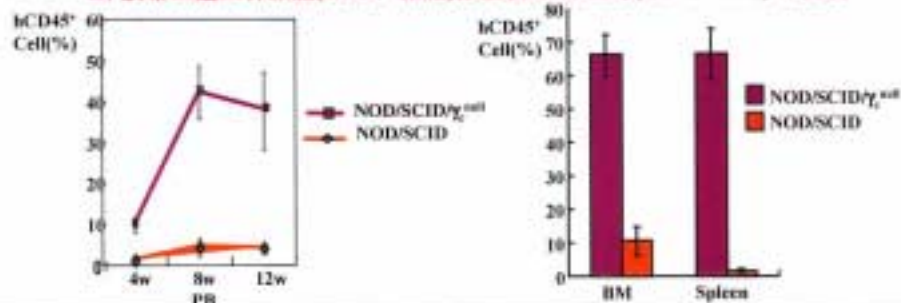
マウス	免疫不全の種類	ヒト造血幹細胞の生着
NUDE	T細胞 ↓	なし
SCID	T細胞 ↓ B細胞 ↓	不良 ヒト胎児組織必要
NOD/LtSz / SCID	T細胞 ↓ B細胞 ↓ 補体活性 ↓	不十分 抗-asialo GM1 抗体 投与でやや改善
★ NOD/Shi / SCID	MΦ機能 ↓ NK活性 ↓	
NOD/SCID/ $\beta 2m^{-/-}$	T細胞 ↓ B細胞 ↓ 補体活性 ↓ MΦ機能 ↓ NK活性 ↓	不十分 T細胞出現無し
★ NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ (NOG)	T細胞 ↓ B細胞 ↓ 補体活性 ↓ MΦ機能 ↓ NK活性 ↓	極めて良好 T細胞出現あり

★ 我々が開発したマウス

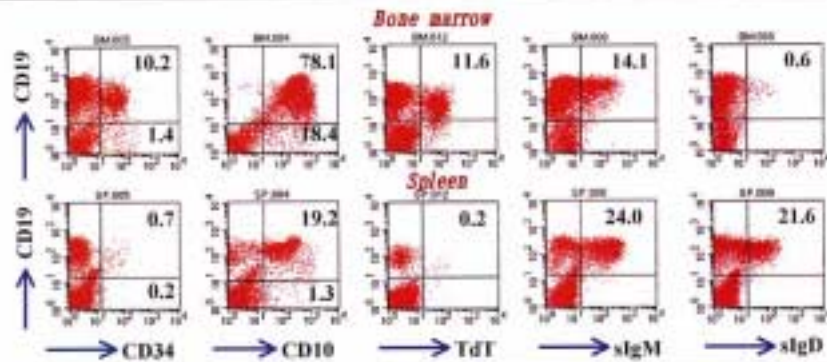
NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウス(NOGマウス) を用いたヒト造血幹細胞の測定



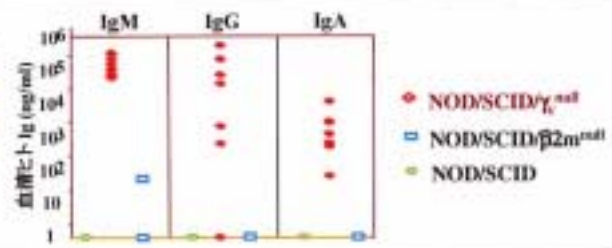
ヒト脾系造血幹細胞(CD34⁺細胞)移植後のヒト血球(CD45⁺ cells)の出現



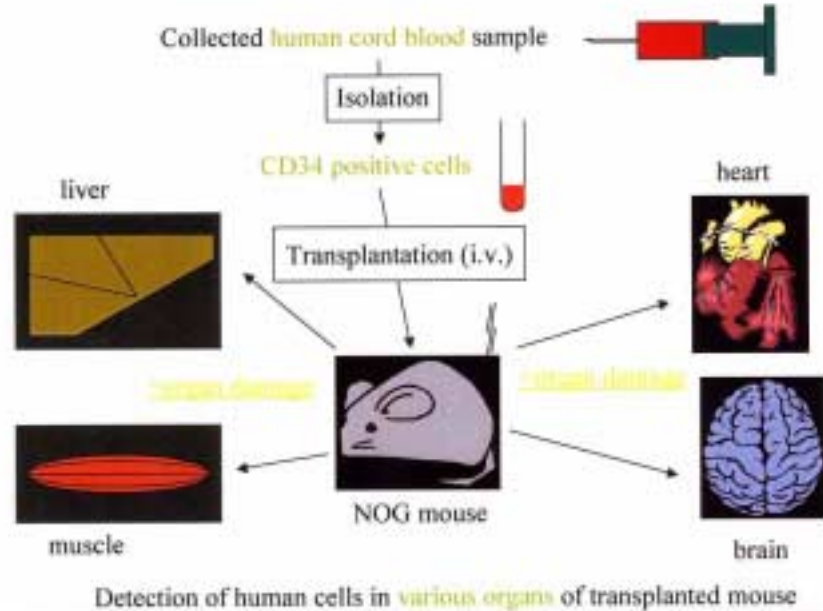
ヒト造血幹細胞からのB細胞への初期分化は NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス骨髄で起こり末梢リンパ組織で成熟する



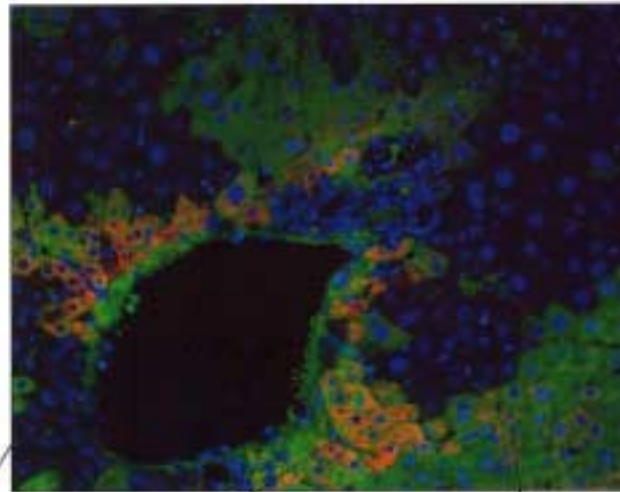
NOD/SCID/ γ_c^{null} マウス血清中にはヒト型Igが測定される



NOGマウスを用いたヒト体性幹細胞の可塑性の検討



ヒト臍帯血CD34+細胞はNOGマウスに移植すると
肝細胞にも分化できる

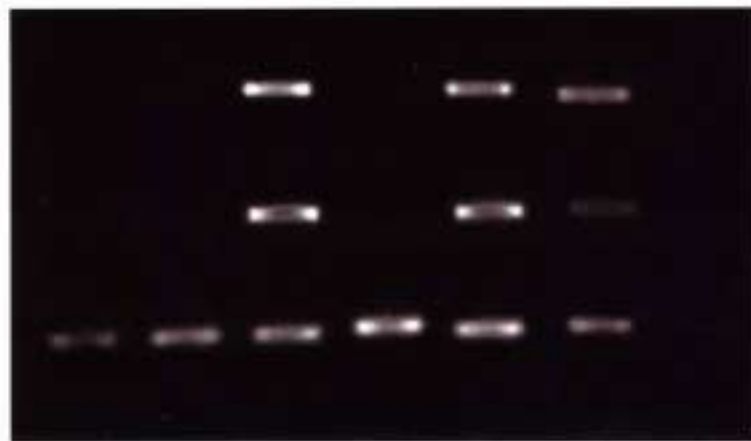


青: nuclei

赤: human hepatocyte

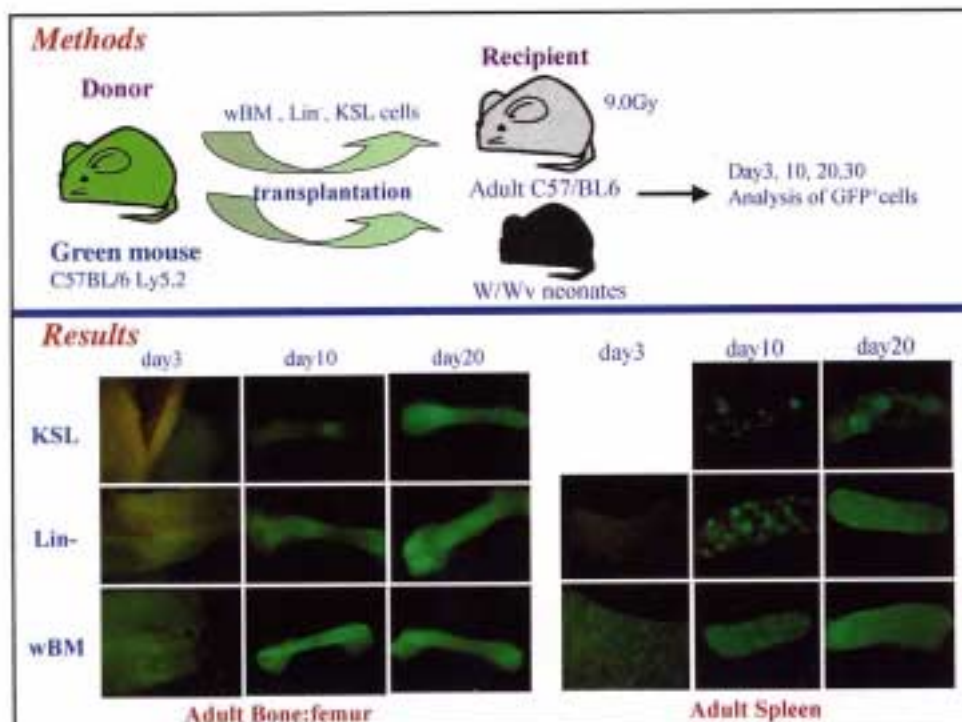
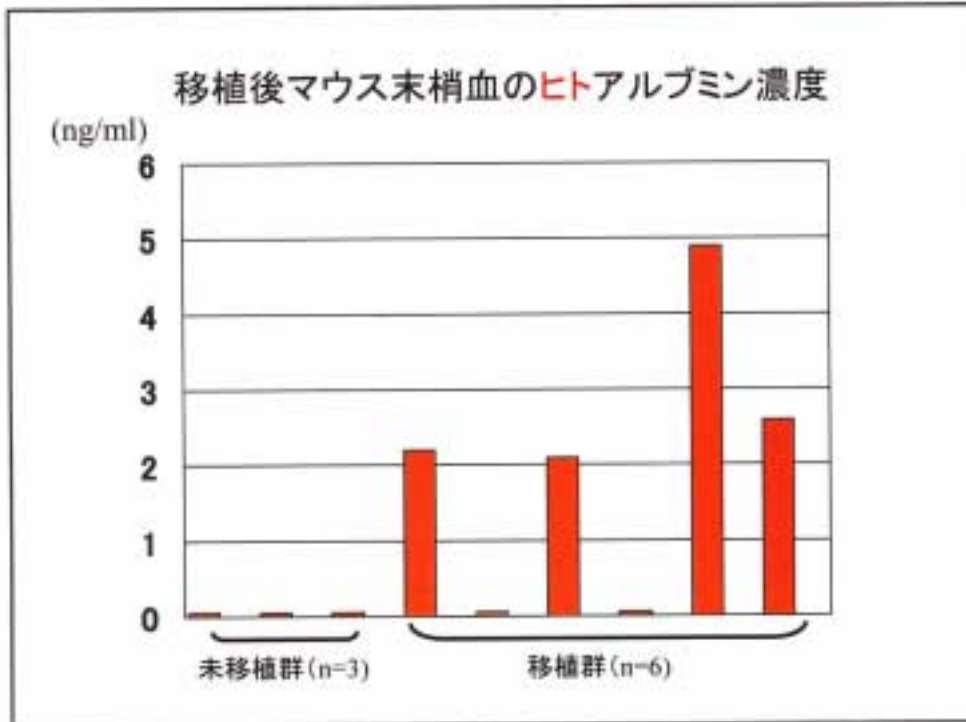
緑: human albumin

移植後マウス肝臓におけるヒト特異的mRNAの検出

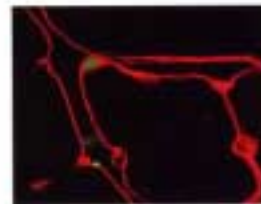
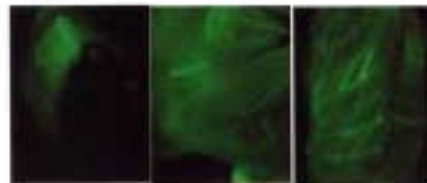
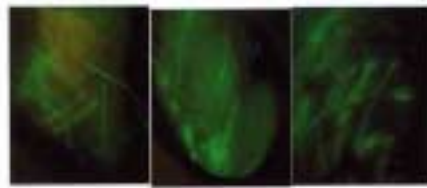


primer 1
Human albumin
primer 2
Mouse HPRT

Non-treated CCl4 Transplant + CCl4 Fas Transplant + Fas Fas + transplant water

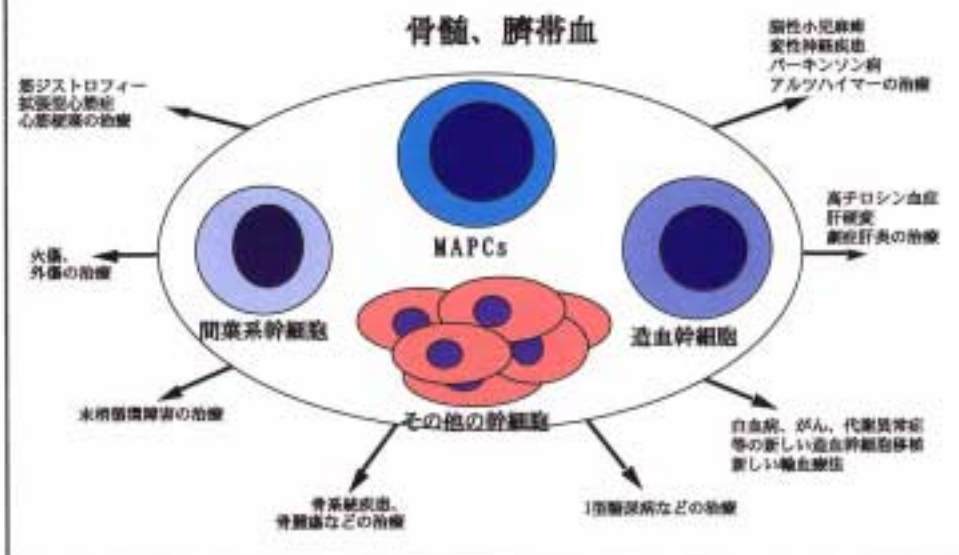


造血幹細胞(KSL cell)は筋肉に分化できる？

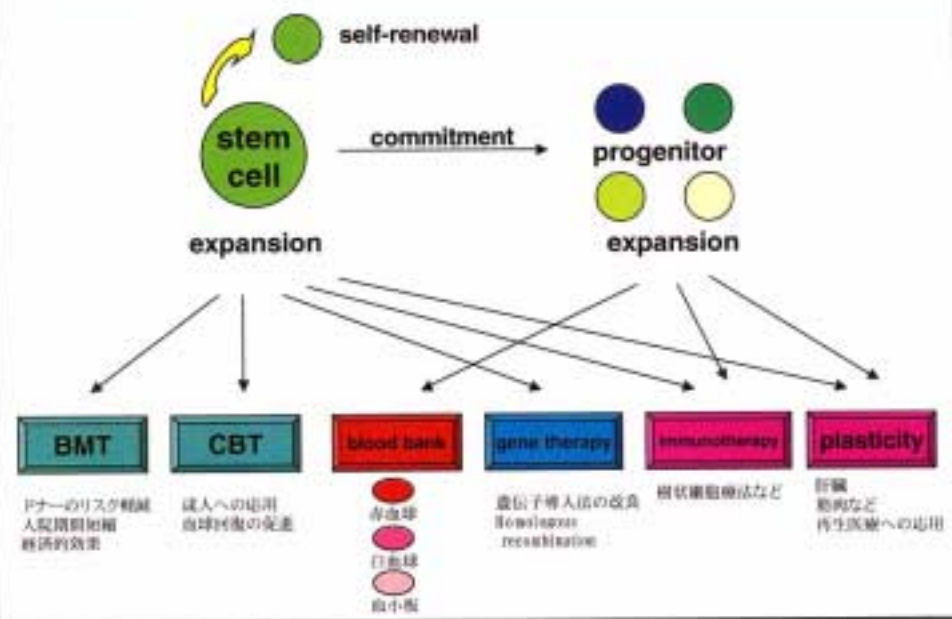


GFP positive cells in muscle

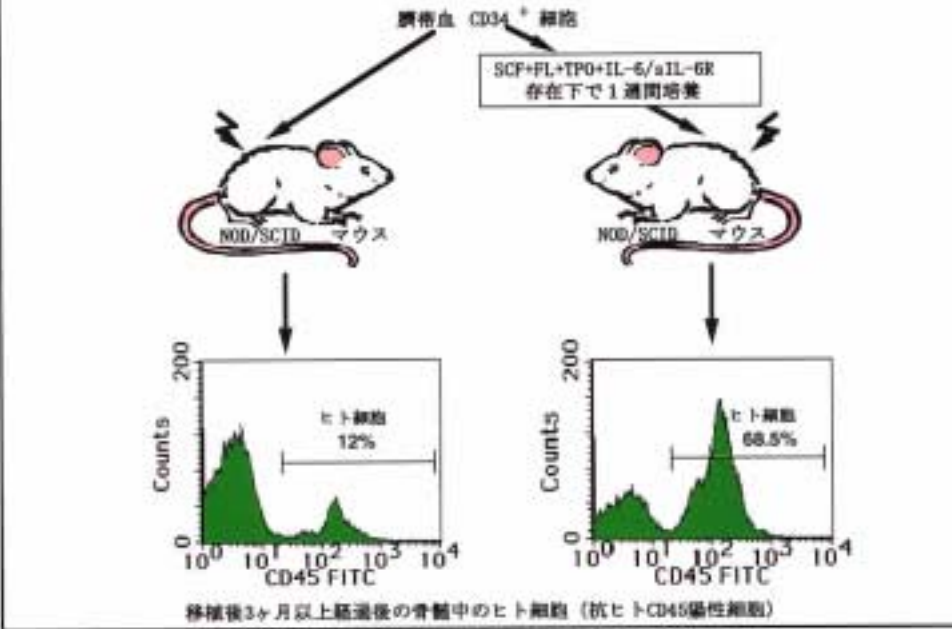
造血幹細胞の可塑性と骨髄、臍帯血を用いた様々な再生医療の可能性



造血幹細胞の *ex vivo* 増幅と様々な医療への応用



脾帯血造血幹細胞の *ex vivo* 増幅が可能となった



再生医療において求められるGTP (Good Tissue Practice)



臍帯血 expansionにおける作業工程



完全無血清培地の開発

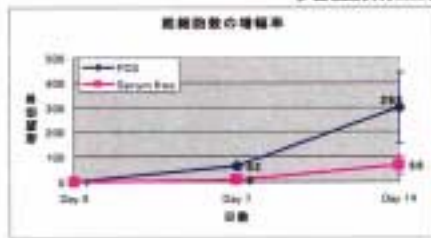


Fig.1-1 細胞数の増幅率 P値=0.00774 Day14

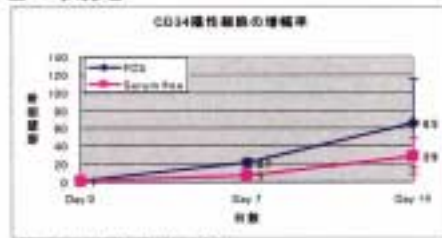


Fig.1-2 CD34陽性細胞の増幅率
FACS解析よりCD34⁺CD45⁻の細胞数を算出、倍率に換算
P値=0.176 Day14

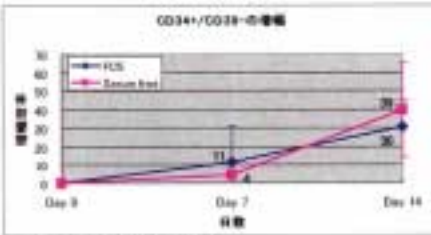


Fig.1-3 CD34⁺/CD38⁻の増幅
FACS解析よりCD34⁺CD38⁻の細胞数を算出、倍率に換算
P値=0.0462 Day14

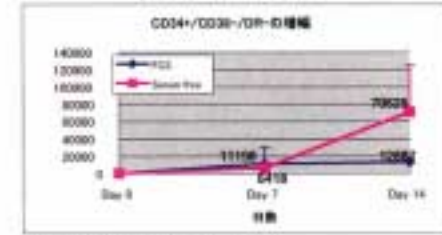
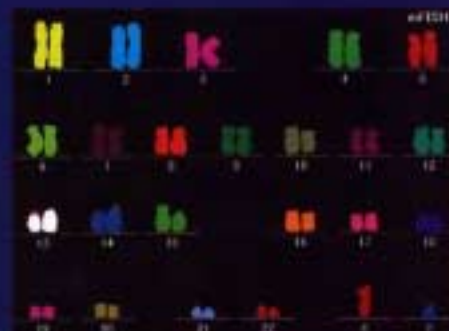
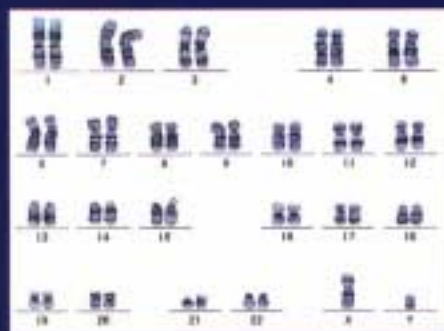
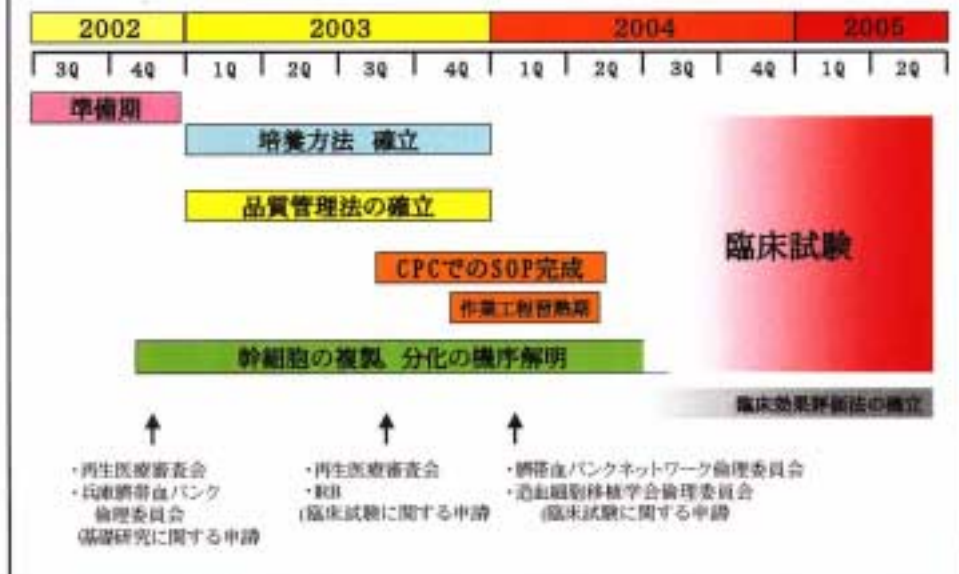


Fig.1-4 Gating CD38⁻/DR⁻の増幅
FACS解析よりGating CD38⁻/DR⁻の細胞数を算出、倍率に換算
P値=0.9484 Day14

サイトカインで増幅した細胞の 染色体変異の有無



体外増幅臍帯血移植研究スケジュール



神経疾患に対する再生医療

対象疾患

パーキンソン病、アルツハイマー、脳性小児麻痺、PVL、
脊髄損傷、末梢神経障害、各種変性疾患

In vivo法

神経幹細胞(NSC)を体内で増殖; 理想的方法
NSCの自己複製因子の同定

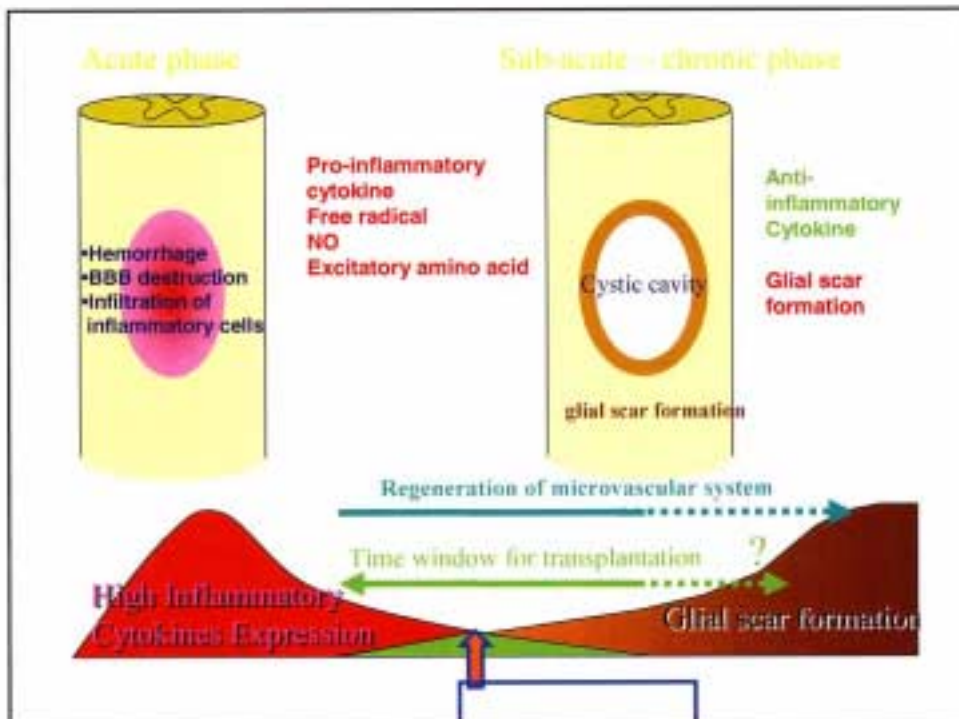
Ex vivo法

1. 神経幹細胞(NSC)を用いる方法
死亡胎児の脳組織の利用: 倫理的な問題、ドーパミン産生神経細胞 (-)
2. 体性幹細胞の可塑性を利用する方法
 - 1) 自家骨髄を用いる方法; 数が少なく増幅する必要
 - 2) 臍帯血を用いる方法; 数が少なく増幅する必要
3. 胚性幹細胞(ES)細胞を用いる方法
倫理的な問題
神経細胞を無限に作れるが、他の組織も出来てしまう欠点の克服必須

spinal cord injury



•A Challenge toward regenerating the injured spinal cord by stem cell technology



MR16-treatment reduced the invasion of Microglia and scar tissue formation in the injured spinal cord.



Immunostaining of Brd-U GFAP



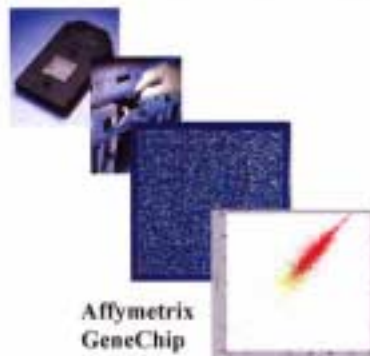
神経幹細胞(NSC)の存在する領域から幹細胞自己複製因子の同定を試みた

生体内に多種存在する幹細胞のなかで、NSCは局在する部位が明らかとなっている。



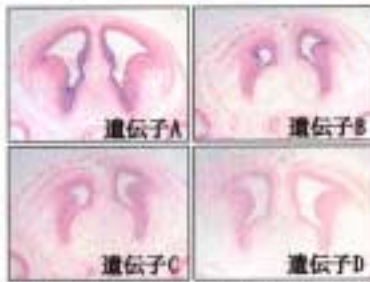
14dpc mouse brain

ゲノムワイドの網羅的遺伝子発現解析が可能である。



Affymetrix GeneChip

神経幹細胞に高発現する新規遺伝子群を同定した

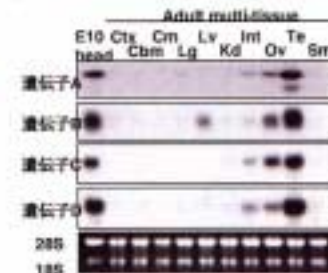
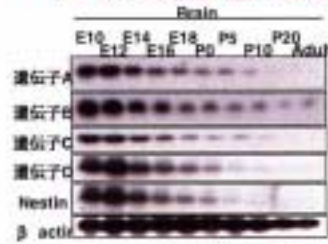


in situ hybridization 14dpc mouse brain

新規遺伝子群は神経幹細胞に強く発現し、分化とともに低下



新規遺伝子群は胎生後期で発現量が減少し、成体では脳葉と結果に強く発現

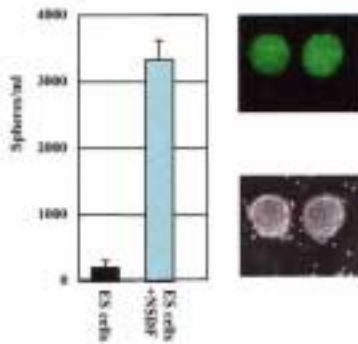


Ctx, Cortex; Cbm, Cerebellum; Crn, Cardiac muscle; Lg, Lung; Lv, Liver; Km, Kidney; Int, small intestine; Ov, Ovary; Te, testis; Sm, skeletal muscle

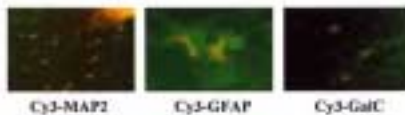
ES細胞から神経幹細胞を特異的に誘導する方法を開発した

ES細胞は無血清で神経幹細胞由来因子 NSDF 存在下でneurosphere様のコロニーを効率よく形成した

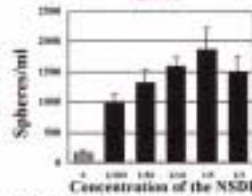
NSCはES細胞をNSCへ誘導する分子を分泌する可能性を示唆



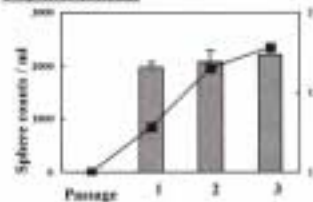
In vitro differentiation



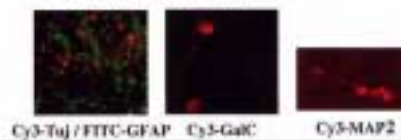
NSDFはES細胞のNSCへの増殖・分化を促進した



2-2) Self-renewal

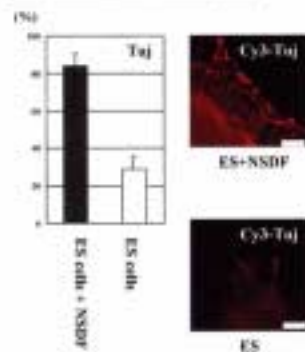


2-3) *In vitro* differentiation



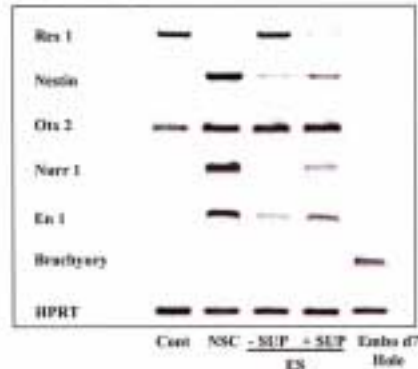
NSCが放出したFactors (NSC derived factor: NSDF) は ES細胞から神経系への分化誘導を特異的に支持した

3-1) Differentiation day14



ES細胞は処理NSDFで処理することによって神経系分化誘導される

3-2) RT-PCR



NSDF処理したES細胞は未分化マーカー (Rex1) の発現は減弱し、神経系マーカー (Nestin, En1, Nurr1 et al) の発現が認められた

重症心不全 (心筋梗塞、心筋症) の治療

- 1) 現在行われている治療法
 - 薬物療法
 - 外科療法 左室縮小術
 - 心臓移植
 - 2) 新しい療法として期待されるもの
 - 再生医療 胎仔心筋細胞
 - 骨格筋、平滑筋細胞
 - 骨髄間葉系細胞
 - ES細胞
- サイトカイン療法
遺伝子導入療法

現在検討されている心筋細胞の再生医療

	利点	欠点
胎仔心筋細胞	生着し、心筋細胞と gap junctionも形成する	倫理的問題、拒絶反応 ヒトでは入手、使用困難
骨格筋芽細胞 平滑筋細胞	自己細胞で拒絶反応がない、入手容易	収縮様式が心筋と異なる 不整脈
骨髄間葉系細胞	自己細胞で拒絶反応がない、入手容易	骨髄からの単離技術が 確立されていない 増幅きわめて困難
ES細胞	心筋細胞の増幅容易	倫理的問題、拒絶反応 心筋になる細胞の単離 技術の確立

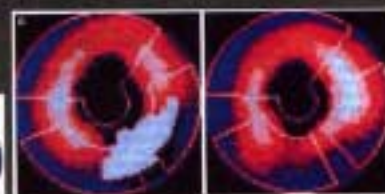
自己骨髄単核球細胞を重症慢性心不全患者へ経カテーテル的に心筋内に注入したところ、心機能の有意な改善が見られた



NOGA Myoster injection catheter

(*Circulation* 107, 2294-2302, 2003)

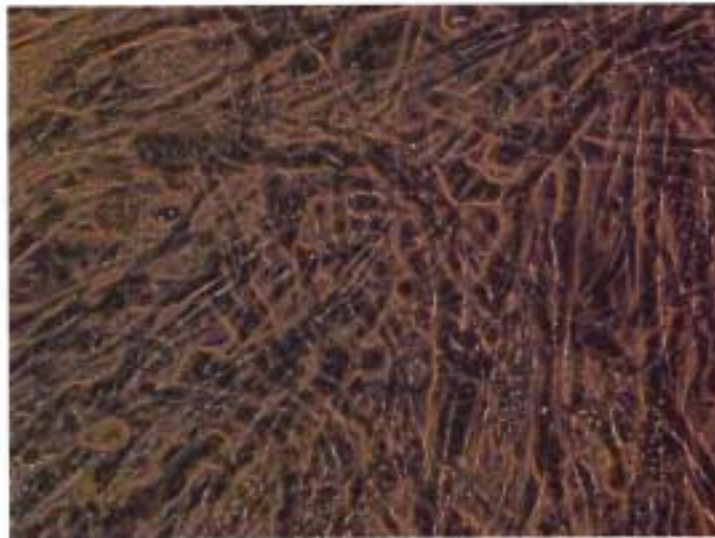
SPECT画像



細胞移植
(-)

細胞移植
(+)

骨髄より形成された心筋細胞



胎仔心筋細胞を心筋障害モデルマウスに移植したところ、心機能の改善がみられた

LV end-diastolic dimensions (mm)

	Baseline	2 weeks	1 month
Sham	2.96 ± 0.43	2.71 ± 0.8	3.41 ± 0.68
Control	3.11 ± 0.58	2.77 ± 0.65	2.85 ± 0.57
Treated	2.61 ± 0.42	3.59 ± 0.43 ^{**}	3.42 ± 0.62

LV Fractional Shortening (%)

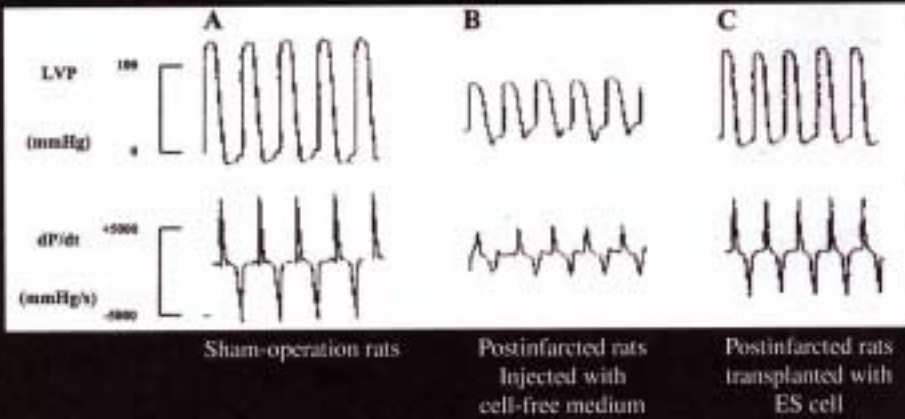
Sham	39.3 ± 7.1	48.0 ± 6.8	40.3 ± 8.7
Control	40.2 ± 6.0	43.8 ± 4.9	39.4 ± 9.2
Treated	38.3 ± 2.9	44.6 ± 4.9 [*]	45.8 ± 9.4 [*]

^{*} P<0.002 vs baseline values

^{**} P<0.03 vs baseline values

(*Circulation* 98(Supl), 151-155, 1998)

心筋分化させたES細胞を移植した心筋
梗塞モデルラットの心機能が改善した



(*J Appl Physiol* 92, 288-296, 2002)

これからの再生医療を健全に進めるために

厚生科学審議会

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のあり方に関する

専門委員会

委員長: 中畑龍俊

ヒト幹細胞を用いる臨床研究のあり方に関する指針

わが国における体性幹細胞を用いた臨床応用の実態調査（平成14年2月25日）

調査対象：大学医学部臨床部門、基礎部門で該当すると推測される教室、研究所、病院、企業は未調査
調査方法：アンケート郵送の後、該当する場合のみFAXにて回答
発送数：131名、回答数：204、該当する回答数：101

臨床研究機関：10施設	
施設名	臨床研究内容
1大学第2外科	1次腎性糖尿病用鼠に、骨髄移植（患者適応期）
2大学第3外科	重症末梢性血管疾患（バージャー病）に自家骨髄移植 3人/0例に施行済
3大学皮膚科	皮膚病態に対して自家皮膚移植 2例施行 2例有効
3大学第1内科	糖尿病性動脈硬化症候（バージャー病）に対して自家骨髄血管形成細胞移植 虚血性心疾患に対して自家骨髄血管形成細胞移植予定（倫理委員会申請中） 糖尿病に対してヒト胎児の幹細胞移植予定（倫理委員会申請準備中） バージャー病に対して自家骨髄血管形成細胞移植 2例
4大学血液腫瘍学分野	造血幹細胞移植に際し、自家骨髄移植術を併用または単独で施行
5大学第2内科	ヒト末梢神経障害移植 1例（大動脈、白濁）自家移植 2名0例、同種移植1名0例
6大学形成外科	人工関節と骨との接合部に自家骨髄由来幹細胞を培養して移植 2例
6大学整形外科	手足指骨移植による骨欠損部に人工骨上で自家骨髄細胞を培養し移植予定 バージャー病に対して自家骨髄細胞移植 例数記載なし
1大学血管内科	ヒト骨髄間葉系細胞移植 詳細記載なし
1大学整形外科	自家内臓上皮、同種内臓上皮を直接あるいは培養後移植
1大学眼科	糖尿病性動脈硬化症（AGE）に対して末梢血CD34 ⁺ 細胞移植 4例0例にたいし1例有効
1大学循環器内科学	虚血性心疾患への幹細胞移植委員会での承認済
8大学第2内科	先天性骨髄腫に対して自家移植
8大学循環器病態薬理外科学	培養末梢および培養細胞上皮移植を1名0例施行 ほとんどが自家移植であり0%に生着 自家骨髄由来間葉系幹細胞を培養し人工骨として移植 例数記載なし
5大学血液学部門	糖尿病性動脈硬化症候（バージャー病）に対して自家骨髄細胞移植法実施 例数記載なし 虚血性心疾患に対して自家骨髄細胞移植予定
5大学循環器内科	腎臓移植患者に自己骨髄移植術による血管再生療法 12例に施行
6大学形成外科	骨髄細胞を使った手指骨の再生 2例に施行
7大学第1内科	糖尿病性動脈硬化症（AGE）、バージャー病、心筋梗塞に対して自家骨髄移植（倫理委員会承認済） 骨髄細胞を用いた肝臓再生
8大学血液リウマチ科	幹細胞CD34 ⁺ 細胞をマウス骨髄ストローマ細胞上で培養し移植 1例施行
基礎研究機関：3施設	
4大学基礎再生医学	骨髄細胞を使った肝臓形、腎臓形作製、骨髄幹細胞を使った腎臓形造形
5大学外科	骨髄細胞を使った肝臓形、腎臓形作製、骨髄幹細胞を使った腎臓形造形
7大学形成科	幹細胞CD34 ⁺ 細胞をサイトカインで培養し移植 体性幹細胞を用いた先天性心疾患、肝疾患、心臓発生の再生治療
研究機関：20施設	

再生医療の5大原則

科学性
安全性
倫理性
社会性
公開性