

第26回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

4. 再生医療のこれから

中畑 龍俊

【司会・中原】新しい分野を実際の臨床に応用していくうえでは大変なご苦労があるのだらうと思います。こうした中で、中畑先生に今、再生医療ということでいろいろな角度からお話をいただきました。これから実際の臨床に応用していくということで、今、先生がいろいろの点でご努力をされている中で、これからどういう方面から手がけていって、最終的なゴールとして目指しているところはどこかということをもう一度おまとめいただけるとありがたいです。

【中畑】私自身は、血液や小児がんの治療を今までやってきましたので、まずそちらの方面への応用ということで、造血幹細胞を増やして、それを新しい移植としてこれから展開していきたいと考えています。

今までの移植というのは、骨髄や臍帯血を採ってそのまま、あるいは細胞を一部分離して移植をするというかたちで進んできましたが、これから *ex vivo* で造血幹細胞を新しい移植治療に応用できるのではないかと。それもまだわかりませんが、そういう夢を持って進めていきたいと考えています。

再生医療が今のような爆発的なことになることは夢にも考えませんでした。造血幹細胞を体外で増やす研究は1990年頃からやっているわけですが、研究を始める一番のきっかけは、その頃はちょうど輸血を介したC型肝炎が非常に問題になっていましたので、何とか血液製剤をほかの薬と同じように工場で造りたい。そういう夢を何とかリタイアするまでにかなえたいと考えていました。そこまでたどり着けるかどうか多少心もとない現状ですが、そういったところを私自身は考えています。

【司会】ありがとうございます。名古屋会場の高本先生のほうでご質問をいただけるということです。

【名古屋会場・高本】中畑先生、大変興味あるお話をありがとうございました。私から一つ伺いたいと思います。

今日は可塑性ということで、特に我々の血液関係ですとCD34の可塑性ということで、扱いやすいということもあるのですが、一つ、先生はテロメレースの遺伝子投入ということでも触れられたのですが、寿命ということになりますと、先生の実験系で実際にある程度パッセージ（継代）をして寿命が来てしまったというような実験結果はありますでしょうか。

【中畑】非常に難しい問題で、以前から、移植を繰り返すと造血幹細胞としての、特に *self-renewal activity* が下がってってしまうというようなレポートがたくさんあります。

それは移植という手技に伴う問題なのか、造血幹細胞自身の性質なのかということはまだ完全にはわかっていないのです。先ほどの新しいNOGマウスを使ってヒトのCD34陽性細胞を移植して、例えば半年ぐらいたってもう一度取り出して別のネズミに移植をして、何代ぐらいその移植が可能なのか検討し始めています。

最終的には、造血幹細胞としては少なくとも100年ぐらいは生きていなければ困るわけですので、気の遠くなるような実験ということになるわけですが、少なくとも年単位ではヒトの造血幹細胞は移植を繰り返すとちゃんと血液がネズミの中では造り続けられることがわかっています。

その辺についてもなかなか明確な回答はできませんが、現時点では実験的な問題、移植をするためには放射線照射をしたりしますが、そのために骨髄の場は非常に荒廃しているところへ造血幹細胞を移植して、そこで非常に急激な増殖が起こって、それを採ってまたそういうことを繰り返すと造血幹細胞に非常にストレスをかけるような実験ですので、そういった系で造血幹細胞の本当の意味での性質を見るのが正しいかどうかということについても問題があるのではないかと考えています。

【名古屋会場・高本】 もう一つよろしいでしょうか。

先生のNOGの実験で、種を超えてstem cellの移植が可能だというようなお話があったのですが、一般的に言われているのは、マウスではCD34⁻、ヒトではCD34⁺が造血幹細胞として認識されているのですが、この差は、種を超えた場合はどういふふうになるのでしょうか。

【中畑】 我々もすでに報告していますが、確かにマウスでは、胎生期から新生児に相当する時期、生後8週までは造血幹細胞はすべてCD34陽性です。それが8週を境に陽性から陰性に転換する。10週を過ぎるとほとんどの造血幹細胞はCD34陰性分画に入ってきます。

それは何回か移植の実験等を組み合わせて検討していますが、周りの環境がそれを規定しているのではなくて、造血幹細胞の中に仕込まれているタイムクロックがその転換を規定しているということを見つけまして、そのことはすでに報告していますが、マウスでは非常にきれいに陽性から陰性へという転換が起こることがわかっています。

先ほどのネズミを使って、臍帯血中の造血幹細胞と、アダルトの骨髄や末梢血中の造血幹細胞はどうかということで検討しているのですが、ヒトの場合、臍帯血中の造血幹細胞はほとんどがCD34陽性で、陰性の細胞はほとんどそこからは出てこないということで、ほとんどがCD34陽性分画に入っているのではないかと思うのですが、それがアダルトの骨髄や末梢血中で陰性細胞の中にコンバージョンしていくのかどうかということについては確たる証拠がヒトの場合は得られていません。

ヒトの骨髄や末梢血中のCD34陽性細胞は、先ほどのネズミに移植をするとそこから血液が生まれてくるということで、マウスと違ってヒトの場合は、成人になってもCD34陽性分画の中にも恐らく造血幹細胞は存在するだろうということは間違いないと思うのですが、陰性細胞の中にどの程度の造血幹細胞があるのかどうか。今のような系で測定できないようなもっと未分化な幹細胞はCD34陰性なのかもしれないということで、その辺が今非常に興味を持っているところです。

先ほど少しお話をした、新しい抗体が採れたという話に関してですが、それはCD34陽性、CD38陰性分画の一部を染める抗体ですが、その抗体の陽性の細胞を採ってそのまま単純に移植をしてもすぐ血液が出てこないということで、非常に未分化な細胞というのはもしかしたら今のような系では測れないのかもしれないというようなことを考えています。

【名古屋会場・高本】 ありがとうございます。

【司会】 東京会場の米山先生から質問から二つほどあるようです。米山先生、お願いします。

【東京会場・米山】 二つ質問をお願いいたします。

(質問) 造血幹細胞等の幹細胞は、サイトカインに誘導、あるいは依存して分化するのでしょうか。あるいはその細胞自身に運命づけられて造血幹細胞になるのでしょうか。

【中畑】 サイトカインというのは、我々の考え方では、その細胞の運命づけには関係しない。サイトカインというのは、その受容体を発現している細胞に働いて、その細胞の増殖と生存を図る。その造血幹細胞や前駆細胞がその後どういう系統に分化していくかというその運命づけはサイトカインは全く関係していない。そこは全くランダムにストカステックに起こっているということで、いろいろな実験を行っていますが、それは間違いないと思います。

サイトカインというのは、主に受容体を発現している細胞の増殖と生存だけに関係している。分化の運命づけには全く関係していないと考えます。

【東京会場・米山】 ありがとうございます。二つ目の質問です。

(質問) 再生医療のための細胞処理は各医療機関で違うと思いますが、再生医療や幹細胞移植においても、今後どの施設でも同じ基準の作業工程や作業環境を求められる新薬事法のような法律が作られるのでしょうか。

【中畑】 現在、厚生科学審議会で、幹細胞を用いた臨床研究のガイドライン作成の作業が進行中です。今年の12月ぐらいをめどに最終段階の指針を作る予定ですが、それは倫理性、あるいは先ほどの施設面での安全性を含めたような非常に幅広いガイ

ドラインになる予定です。

恐らくそれが出ると、それに遵守したようなかたちでない再生医療はできないということになります。これは今まで日本のいい点でもあったのかもしれませんが、僕自身は非常に悪い点ではないかと思いますが、日本のどんな小さな病院の実験室の片隅で処理した細胞でも患者さんに投与をするということが今まで行われてきたと思うのですが、そういったことは世界的に見てこれからはなかなかできなくなってくる。そういう時代に今入ってきているのではないかと思います。

従って、特に細胞を体外で増やすようなことを伴うような臨床研究は、ある限られた、しっかりしたCPCを持ったような施設でないといけないような時代にこれから入っていくのではないかと考えています。また、私自身はそうあるべきではないかと考えています。

【東京会場・米山】 ありがとうございます。

【司会】 NOGマウスで、先生のところで初めて、ヒトの細胞がTリンパ球まで分化してくるということをお示しいただきましたが、これはマーカー上、きれいなT細胞が分化してくることはよくわかりましたが、ファンクショナルにもやはりT細胞のファンクションを持っているのでしょうか。

【中畑】 増殖とか、CTL活性とか、そういうのを単純な系で見るとちゃんと検出できるのですが、抗原特異的な免疫反応がこの系で起きるかどうかということが一番大きな問題で、もし抗原特異的な免疫反応が起こるとすると、それはマウスのMHCに拘束されるのか、あるいはヒトのMHCに拘束されるのかという非常に重要な問題になってくるわけです。今、抗原特異的な免疫反応を起こそうと非常に努力をしているのですが、一部起きるのですがなかなか一定の結果が出てきません。T細胞の教育を担当する胸腺epithelial cellを見てみると、ネズミのepithelial cellがほとんどですが、ヒトのepithelial cellも少しいる。また、ネズミによって比率もばらつくということで、その辺が明確な結果が出てこない一つの原因かもしれないというようなことで、今悪戦苦闘しているところです。

【司会】 その場合のepithelial cellがヒトの場合も少し

あるというのは、ヒトの細胞を打ったそこから分化してきているということになるのでしょうか。

【中畑】 そうなのでしょうね。そういうレポートがあるかどうかはまだ調べていないのですが、少なくとも臍帯血のCD34陽性細胞からは胸腺のepithelial cellにも分化できる細胞がそこにあるということだと思います。

【司会】 わかりました。既に先生のところで*ex vivo*で細胞を増幅して、少ない細胞をさらに増殖させるとか、体外で処理をして骨髄移植に応用するというのを盛んにされてきていただいているわけですが、やはり*in vivo*と違って*ex vivo*になるといういろいろな難しいところがあると思うのですが、実際にそれを臨床に応用していく場合に最もキーとなるポイント、難しいポイントはどんなところにあるのでしょうか。

【中畑】 以前の仕事は血清を使ってやっていたのです。特にウシ胎児血清を使って非常によく増えるということをやっていたのですが、今はウシの胎児血清を使った細胞を臨床に応用するということはもってのほかですので、そうするとFCSは使えませんので、我々のところでは今、完全に無血清の状態、アルブミンも今は使わないでやっているわけです。ヒトのアルブミンを使ってもいいかどうかということも問題です。今はリコンビナントのヒトのアルブミンも試し始めていますが、完全に安全な、試薬や培地にしても、そこで使うサイトカインやタンパク製剤にしても、すべてGMP基準のものにするということが非常に大変なことになっています。

それから、CPCを厳密に動かすということになると非常にお金がかかります。神戸の先端医療センターのCPCの維持費だけでも数千万円かかってしまう。維持とメンテナンスとバリデーションを定期的に行って、落下菌検査もすべて定期的に行っていくわけですが、そうすると非常にお金がかかるということも一つの大きな問題になっています。

それと、例えば培養器にしてもインキュベータにしても、一つのインキュベータの中に何人も人の細胞を入れることはできませんので、一つの

インキュベータは1人にしか使えないということになります。今のような大型のインキュベータの中に1人だけのものを入れてということになると炭酸ガス等がむだになりますので、もう少し小型のインキュベータを開発しようとしています。

それから、例えば臍帯血であれば臍帯血バンクでバックの中に保存されているわけですが、そのバックでいただいたものを最終的に製品にできるまでをすべてクロズドシステムでやるということで、bag to bagですべてをやらなければいけないわけです。その辺のノウハウを今作らなければいけないということで、一つずつの過程が、全部自分たちで検証しながら開発をしていく。その辺の作業が非常に大変だということになります。

【司会】 大変なご苦労だということが本当によくわかります。いわゆる細胞の可塑性ということで、一つの細胞から、細胞が分化していろいろな細胞になるということと、それが一つの臓器としてファンクションをするということは、恐らくその間になかなかギャップがあるのではないかとこの気はします。そういうギャップを埋めるためには、どんなことを先生はお考えになっておられるのでしょうか。

【中畑】 確かに将来的に今非常に不足している臓器を体外で作ってそれを移植医療に用いようというのは世界的に非常に大きな関心事なわけですが、今一番欠けているのは、我々自身がまだ細胞社会を十分理解していない。特に臓器は三次元の構造をしっかりと作らなければいけないわけです。

そこには厳密な細胞社会としての一つのおきてとあります。そこに発現しているタンパクにしても非常に厳密にレギュレートされている。その辺のことはまだ我々は十分理解していないのではないかと思います。本当の意味で体外で臓器を作るためにはもっともっと科学の進歩が必要ではな

いかと考えています。

【司会】 ありがとうございました。東京会場から質問があるようです。

【東京会場・米山】 一つ質問をお願いします。

(質問) 完全な閉鎖系で培養が可能になれば、現在行われている培養容器を用いる場合と比べて、ガスコントロール、殊に酸素量の抑制が可能になると思いますが、培養時の酸素については考えなくてもよいのでしょうか。酸素が多いのは具合が悪い因子のように思うのですが。

【中畑】 確かに、血清があると酸素濃度が高くてもその細胞はちゃんと増殖できる。それを無血清にすると酸素濃度を下げないとうまく細胞を増殖できないということがずっと言われています。

実際、我々の骨髄の酸素分圧を見ると、いくら高くても5%ぐらいの酸素しかないわけですので、そういった環境でないと本当の意味での細胞の増殖は得られないのではないかとこのことで、現在、閉鎖型で、あるいはガスだけは透過できるようなバックを使って、最終的に酸素濃度をどこまでインキュベータの中で下げるのが一番適した環境なのかということも検討しています。

最終的な結論はまだ得られていませんが、確かに無血清にすると酸素濃度を下げたほうが細胞としてはより増殖に適した環境になるのではないかと考えています。

【東京会場・米山】 ありがとうございました。

【司会】 それでは、時間が来たようですので、中畑先生のご講演をこれで終わらせていただきます。ありがとうございました。それでは、本日の講演をこれで終わらせていただきます。

【後日ご回答をいただいた質問】

【質問】 遺伝子病などは遺伝子レベルでの治療ができれば一番よいと思います。この方面での詳しい情報がありましたらお教えてください。

【回答】 遺伝子治療の詳しい情報

遺伝子治療が開始されてから10年以上経過し、既に世界各国で4000例以上の患者に対しさまざまなプロトコルを用いた遺伝子治療が行われています。現在の遺伝子治療はまだ実験医療の段階であり、その有用性は十分に確立していませんが、21世紀の中心的な医療の一つになる可能性が期待されています。

遺伝子治療は疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与する診療行為の総称であります。各種疾患の遺伝子異常を修復し、正常の遺伝子に戻すことが究極の遺伝子治療であるが、現在そのための相同組み替え技術は確立されていません。そのため、子孫に影響が残る可能性がない体細胞を標的として、欠陥遺伝子の補充あるいは正常の遺伝子の付加の形で遺伝子治療が行われています。

遺伝子治療が開始された当初は致死性の遺伝性疾患、癌、エイズ等が対象とされてきましたが、最近では血管障害等良性疾患に対しても応用されています。その中でも癌に対する遺伝子治療が最も多く行われ、悪性黒色腫、脳腫瘍、肺癌、肝癌、腎癌、大腸癌や白血病、骨髄腫等が対象となっています。

遺伝子の投与法は遺伝子を直接患者に投与する *in vivo* 法と標的となる細胞を一旦体外に取り出し、遺伝子導入を行った後、患者に戻す *ex vivo* 法に分けられます。前者は治療法としては簡便ではあるが、目的とする標的細胞へ選択的に遺伝子を導入することが難しく、安全性のチェックも容易ではありません。後者は特定の細胞だけに遺伝子を導入できることからより安全な方法といえますが、対象が体外に取り出せる細胞に限られ、遺伝子導入のための特別の設備が必要です。最近では *ex vivo* 法から *in vivo* 法に変わりつつあります。

目的とする遺伝子を効率よく、安全に細胞内に

導入するために種々のベクター（遺伝子の運び屋）が開発されています。そのうちウイルスの感染力を利用した方法が主に用いられています。病原性を取り除き、複製能をなくしたウイルス（ウイルスベクター）に目的とする遺伝子を組み込み、これを細胞に感染させることにより遺伝子を導入する方法です。レトロウイルスベクターは簡単に大量生産でき、安全性が確認されていることから最もよく用いられ、一部の疾患ではアデノウイルスベクター、AAV（adeno-associated virus）ベクターも用いられています。ウイルスベクター以外の方法として、リポソーム法などがあります。目的とする遺伝子を一過性に発現させるか、染色体に組み込ませ永続的に発現させるか、*in vivo* 法か *ex vivo* 法か等を考慮し、ベクターが選ばれます。

2000年、フランスのグループは先天性の免疫不全症の1つのタイプにレトロウイルスベクターを用いて患者さんの造血幹細胞に正常遺伝子を導入後移植し、免疫不全が完全に修復されたという画期的な報告をしました。これは遺伝子治療が始まって初めての本当の意味での遺伝子治療の成功例ということができ、世界中が注目しました。しかし、その後11名行ったこの遺伝子治療の患者さんの中から2名の白血病が発症してしまいました。現在、その科学的背景について検討が進んでおりますが、遺伝子治療を安全で有効な治療法として確立していくためには、まだまだ乗り越えなければならない問題点が存在することを示しています。現在、遺伝子治療は癌に対して最も多く行われていますが、そのうちの代表的なものを列挙してみました。

1) 免疫遺伝子療法

癌に対する遺伝子治療としてもっとも多く行われている方法です。腫瘍免疫に関与する種々の機能分子の遺伝子を *ex vivo* で癌細胞等に導入し、腫瘍の免疫原性を高めて患者に戻すことにより癌細胞特異的障害性リンパ球（CTL）やNK細胞を活性化しようとする治療です。遺伝子導入に用いる

標的細胞としては、患者自身の癌細胞を用いることが多いが、他人の癌細胞、自己リンパ球や樹状細胞を用いることもあります。遺伝子導入する機能分子としては、IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, TNF, インターフェロン, GM-CSF等のサイトカイン, B7等の co-stimulatory molecules, 癌細胞由来の抗原となりうると考えられるペプチド, MHCクラスI抗原等極めて広範な試みがなされています。最近の傾向としては、自己癌細胞自身に遺伝子を導入し、放射線照射により増殖力を喪失させた後、皮下等に注射する方法（腫瘍ワクチネーション法）が多くなってきています。このような癌免疫遺伝子治療の対象には当然免疫原性の高い腫瘍が選ばれ、中でも悪性黒色腫や腎癌に対していくつかのプロトコールが進んでいます。我が国においても、東京大学医科学研究所で腎癌に対するGM-CSF遺伝子導入腎癌細胞を用いた遺伝子治療が行われました。免疫遺伝子療法は低下している患者の腫瘍免疫能を高め、外科的切除、化学療法等の他の治療法と併用することにより治療に結び付けようとするものであります。問題は、癌細胞が必ずしも細胞表面に標的となる抗原を表出していないことがあげられます。

2) 自殺遺伝子療法

免疫遺伝子療法に次いで多くの症例に行われている遺伝子治療であります。そのままでは活性のないある種の薬剤（プロドラッグ）を細胞障害活性のある物質に変換させる酵素の遺伝子を癌細胞に直接導入し、後でその薬剤を投与することによって遺伝子導入された細胞だけを特異的に破壊する治療です。現時点で臨床研究が実際に進められているのは、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ（HSV-TK）と抗ウイルス剤であるganciclovir（GCV）の組み合わせです。HSV-TK遺伝子が導入された癌細胞にGCVが取り込まれると、GCVはその細胞の中で細胞毒性をもつ代謝産物に変化し、癌細胞は破壊されます。この際、興味深いことはHSV-TK遺伝子の導入された細胞だけでなくその周辺にある遺伝子が導入されていない癌細胞もバイスタンダー効果により破壊されること

です。この効果の詳細なメカニズムは不明ですが本治療法のセールスポイントになっています。この方法では導入遺伝子は必ずしも染色体に組み込まれる必要はないのでアデノウイルスベクター等も用いられています。導入遺伝子を目標の癌細胞にだけ到達させるために、癌局所への直接注入、癌細胞に特異的に発現する蛋白遺伝子のプロモーター領域に酵素遺伝子を結合させ、それを癌の存在する特定の器官動脈等にカテーテルで繰り返し、注入するという方法等が提唱されています。脳腫瘍の治療では一過性の腫瘍の縮小が見られています。

3) 遺伝子治療の造血幹細胞移植療法への応用

レトロウイルスベクター等の染色体遺伝子への組み込みが可能なベクターを用いて種々の薬剤耐性遺伝子を自己造血幹細胞に導入後移植すれば、それに相応する抗癌剤を多量に投与することが可能になり、治療率を高めることが期待されます。そのような発想で多薬剤耐性遺伝子（MDR 1）を用いた遺伝子治療が開始されています。この場合、染色体へMDR遺伝子を組み込ませるためには、細胞周期上静止期にある造血幹細胞を分裂周期に入れていなくてはなりません。そのために様々なサイトカインの組み合わせによる刺激が試みられています。我々は、造血幹細胞へのMDR 1遺伝子導入に可溶性IL-6受容体（sIL-6R）、IL-6、SCF等のサイトカインを用いた新しい遺伝子導入法を開発しています。

また、造血幹細胞移植後の重症GVHD（移植片対宿主病）予防のため、あらかじめドナーリンパ球にHSV-TK遺伝子を組み込んでおき、GVHDが重症化したらGCVを投与し、ドナーリンパ球を排除するという臨床試験が行われ、一部有効例が報告されています。

4) 癌抑制遺伝子療法

癌化は癌遺伝子や癌制御遺伝子の異常が多段階に起こることで説明されていますが、それでも最も重要な遺伝子の一つを正常化させれば癌細胞の悪性度を規定する生物学的特性は通常は失われま

す。このような遺伝子異常については多くのものが知られていますが、現時点ではヒト癌で最も高頻度（50%程度）に見られ、欠失や突然変異によって不活化されているp53癌抑制遺伝子が最も関心を呼んでいます。正常なp53遺伝子を癌組織に導入し発現させれば、癌が縮小することが期待されるからです。実際、p53遺伝子をレトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターを介して

肺癌患者に経気管支的あるいは経皮的に癌局所に繰り返し注入したところ、1/3の例において癌縮小が認められたということです。目的遺伝子が多くの癌細胞に導入されたとは考えにくいので、前述したバイスタンダー効果がここでも重要な役割を果たしている可能性があります。

このように遺伝子治療はまだ開発途上の治療法ですが、今後の発展が期待されています。