

20010474

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究」

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀田 知光

平成 14 (2002) 年 3 月

はじめに

この研究業績報告書は、厚生科学研究費補助金 厚生労働省ミレニアムプロジェクト「造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究」班における平成13年度の研究成果をまとめたものである。本研究班は平成11年度に始まった免疫・アレルギー等研究事業、臓器移植部門の「臍帯血移植に関する基礎的・臨床的研究」班より平成13年度より独立した研究班である。臍帯血は骨髄、動員末梢血につぐ第3の造血幹細胞ソースとして注目を集めているが、成人に利用するためには含まれる造血幹細胞数が限られていることが障害となっている。また、臍帯血移植の造血回復が遅延する原因として前駆細胞数が少ないことが想定されている。本研究班の主任研究者および分担研究者らは造血幹細胞を体外増幅するシステムを開発してきた。従って本研究においては近い将来の臨床応用を想定して安全性、有効性の確立を目指した。また、増幅した幹細胞より分化した細胞が実際に各種機能を保持しているのか否かを特に免疫系再構築に焦点を当てて解析し、T細胞機能、B細胞機能を果たすことを解析できる系を開発した。以上のテーマについて本報告書は各分野研究者の年度末報告をまとめたものであり、関係者の参考になれば幸いである。

堀田知光

目 次

I. 総括研究報告書

造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

堀田 知光 (東海大学医学部 血液・リウマチ内科) ……………1

II. 分担研究報告

1. 造血幹細胞の体外増幅に関する研究

堀田 知光(東海大学医学部 血液・リウマチ内科)……………3

2. 造血幹細胞の体外増幅に関する研究

中畑龍俊(京都大学大学院 医学研究科 発達小児科学)……………5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………7

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………11

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

主任研究者 堀田知光 東海大学医学部・教授

分担研究者

中畑龍俊（京都大学大学院医学研究科教授）

堀田知光（東海大学医学部教授）

A. 研究目的

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。また増幅幹細胞の分化能、特に免疫細胞への分化能を解析可能な系を確立する。このため本年度は以下の研究を行った。1) 臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する、2) 増幅幹細胞の分化能、特に免疫細胞への分化能を解析可能な系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34+細胞を各種条件で培養する。培養後の細胞を NOD/SCID マウスに移植し、SRC の増幅倍率を算出する。

2. NOD/SCID/ $\gamma_c^-/-$ マウスに増幅前および増幅後の CD34+細胞を移植し、経時的に各種組織中のヒト細胞の存在および分化をフローサイトメトリーで解析した。また NOD/SCID マウス、NOD/SCID/ $\beta 2M^-/-$ マウス、NOD/SCID/ $\gamma_c^-/-$ マウスに種々の数の CD34+細胞を移植した。移植後経時的に各種組織中のヒト細胞の存在をフローサイトメトリーで解析した。

C. 研究結果

1. マウス骨髄ストローマ細胞を用いた培養条件では5日間で臍帯血幹細胞を1.3倍に増幅することが可能であった。 α IL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせるにより、ヒト造血幹細胞(SRC)を著明に増幅できることが明らかとなった。

2. NOD/SCID/ $\gamma_c^-/-$ マウスに臍帯血由来ヒト CD34陽性細胞を移植後 6, 8, 13, 16 および 19 週目に採血し、ヒトリンパ球の再構築の経時的変化を解析したところ、移植後 6 週目にはすでに B 細胞は末梢血中で検出されるが T 細胞は検出されなかった。しかし、13 週目に従来の NOD/SCID マウスを用いた解析法では検出されなかったヒト T 細胞の出現を認め、その後、末梢血中に含まれる T 細胞の

割合は増加していった。これらの T 細胞はポリクローナルであり、MLR により活性化されることが確認された。NOD/SCID マウス、NOD/SCID/ $\beta 2M^-/-$ マウス、NOD/SCID/ $\gamma_c^-/-$ マウスの比較ではヒト造血幹細胞の測定には NOD/SCID/ $\gamma_c^-/-$ マウスが最も優れていた。

E. 結論

本年度の研究で T 細胞分化も可能なヒト造血幹細胞活性の測定系が樹立された。ヒト造血幹細胞を増幅を増幅し、それらが免疫担当細胞に分化可能であることが示された。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Stem cells, 18, 183-189, 2000
- 2) J Immunology, 166, 1590-1600, 2001
- 3) J Immunol Methods, 253, 45-55, 2001
- 4) Bone Marrow Transplant 28, 587-595, 2001
- 5) Exp Hematol 29, 1210-1217, 2001
- 6) Cell Transplantation, 10, 0409-412, 2001
- 7) J Immunology in press, 2002
- 8) Int J Hematol. In press, 2002
- 9) J Clin Invest 105: 1013- 1021, 2000
- 10) Int J Hematol, 73(1):6-13, 2001
- 11) Blood 97:419-425, 2001
- 12) Blood 97:2016-2022, 2001
- 13) Blood 97:785-791, 2001
- 14) Blood, 97(12):3755-3762, 2001
- 15) Blood 98:6-12, 2001
- 16) Blood 98:3618-3625, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究課題 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

分担研究者 堀田知光 東海大学医学部・教授

研究要旨：ヒト臍帯血幹細胞をマウス骨髄ストローマ細胞株存在下に増幅培養すると造血幹細胞(SRC)を13倍に増幅できることが確認された。増幅幹細胞は機能を有するTリンパ球、Bリンパ球に分化することを新たに作成されたNOD/SCID/ γ_c^- マウスに移植することにより確認された。

A. 研究目的

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。また増幅幹細胞の分化能、特に免疫細胞への分化能を解析可能な系を確立する。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34+細胞をマウス骨髄ストローマ細胞 HES5-5 上で、TPO, FL, SCF 存在下に培養する。培養後の細胞を NOD/SCID マウスに移植し、SRC の増幅倍率を算出する。

2. NOD/SCID/ γ_c^- マウスに増幅前および増幅後の CD34+細胞を移植し、経時的に各種組織中のヒト細胞の存在および分化をフローサイトメトリーで解析した。

C. 研究結果

1. われわれの培養条件では5日間で臍帯血幹細胞を13倍に増幅することが可能であった。

2. NOD/SCID/ γ_c^- マウスに臍帯血由来ヒト CD34陽性細胞を移植後 6, 8, 13, 16 および 19 週目に採血し、ヒトリンパ球の再構築の経時的变化を解析したところ、移植後 6 週目にはすでに B 細胞は末梢血中で検出されるが T 細胞は検出されなかった。しかし、13 週目に従来の NOD/SCID マウスを用いた解析法では検出されなかったヒト T 細胞の出現を認め、その後、末梢血中に含まれる T 細胞の割合は増加していった。これらの T 細胞はポリクローナルであり、MLR により活性化されることが確認された。

D. 考案

現在臍帯血移植の抱える大きな問題の一つに免疫系の早期再構築がある。しかしながら、臍帯血造血幹細胞の免疫系の再構築については有用なアッセイ法がないことから研究が進まず、有効な情報が得られなかったのが現状である。本研究により新しく開発されたヒト T 細胞分化の生体モデル系を利用することによって、今日まで解明されな

ったヒト T 細胞分化に関する多くの重要な知見が得られるものと期待され、臍帯血造血幹細胞の臨床応用に向けたより安全な新しいシステムの開発を目指すことが可能になると考える。免疫担当細胞やその働きを助ける樹状細胞などの早期再構築法が確立されれば、臍帯血造血幹細胞移植の適応もさらに大きく広がると考えられる。すなわち、体外増幅などによってリンパ球の分化、増殖、機能発現を人為的に制御できれば、移植に伴って生じるウイルス感染症および腫瘍性疾患の再発リスクの軽減のみならず、ドナー特異的免疫寛容の導入や、アロ移植後の移植片対腫瘍反応、樹状細胞を利用した腫瘍免疫応答の惹起、重症自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植、さらに臓器移植、自己免疫疾患などの免疫関連の疾患に対しても臨床応用が期待できる。

E. 結論

ヒト造血幹細胞を増幅を増幅し、それらが免疫担当細胞に分化可能であることが示された。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Stem cells, 18, 183-189, 2000
- 2) J Immunology, 166, 1590-1600, 2001
- 3) J Immunol Methods, 253, 45-55, 2001
- 4) Bone Marrow Transplant 28, 587-595, 2001
- 5) Exp Hematol 29, 1210-1217, 2001
- 6) Cell Transplantation, 10, 0409-412, 2001
- 7) J Immunology in press, 2002
- 8) Int J Hematol, In press, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究課題 Ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用に関する研究

分担研究者 中畑龍俊 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨：ヒト造血幹細胞の定量的測定を実現するために NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスを開発した。SCF、FL、TPO、IL-6/sIL-6R 複合体存在下に 1 週間培養することより臍帯血中の造血幹細胞 (SRC) を約 4.5 倍に増幅できた。増幅造血幹細胞の臨床応用のため、厳格な品質管理体制を確立し、臨床治験を準備中である。

A. 研究目的

体外増幅造血幹細胞を用いたより安全な移植医療の開発を目的として、臨床応用可能な、安全かつ有効なヒト造血幹細胞体外増幅法を開発し、その臨床展開をはかることを目的としている。

B. 研究方法

1. ヒト造血幹細胞上のサイトカイン受容体の発現を検討するため、臍帯血 CD34+細胞を受容体の発現の有無でソーティングし、in vitro 培養法、NOD/SCID マウス移植法を用いて測定した。

2. NOD/SCID マウス、NOD/SCID/ $\beta 2M^{-/-}$ マウス、NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスに種々の数の CD34+細胞を移植した。移植後経時的に各種組織中のヒト細胞の存在をフローサイトメトリーで解析した。

3. ヒト臍帯血 CD34+細胞を各種サイトカイン存在下に液体培養し、造血幹細胞の増幅について検討した。

C. 研究結果

1. ヒト造血幹細胞や未分化造血前駆細胞上には gp130, c-Kit, Flk2/Flt3, Mpl が発現していることが明らかとなった。

2. ヒト造血幹細胞の測定には NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスが最も優れていた。

3. sIL-6/RIL-6 複合体と SCF, TPO, FL を組み合わせることにより、ヒト造血幹細胞 (SRC) を著明に増幅できることが明らかとなった。

4. GTP 基準に合致した cell processing center (CPC) の建設、SOP の作成、培養液等について検討した。

D. 考案

造血幹細胞の ex vivo 増幅はその成果が臨床に直結することから大きな期待が寄せられている。NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスを用いたヒト造血幹細胞の評価法が確立したことから、増幅造血幹細胞の定量的な評価が可能となった。

ヒト造血幹細胞や未分化造血細胞上には c-Kit, Flk2/Flt3, Mpl, gp130 が発現していることが示された。従ってそれらに対応する SCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6R を組み合わせて刺激する方法が現時点では理想的と考えられた。

安全性と品質が保証された増幅造血幹細胞の臨床応用を行うため、GTP 基準に合致した CPC 内での培養や SOP の作成、培養液の選定、無血清培養法の確立、ガス透過性バックの開発等を含む厳格な品質管理体制の確立などについて検討を進め、神戸先端医療センターに設置される CPC で SCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6R 存在下で増幅した造血幹細胞を用いた臨床治験を計画中である。

E. 結論

ヒト造血幹細胞を増幅できることが示された。増幅造血幹細胞の臨床応用を準備中である。

F. 健康危害情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J Clin Invest 105: 1013-1021, 2000
- 2) Int J Hematol. 73(1):6-13, 2001
- 3) Blood 97:419-425, 2001
- 4) Blood 97:2016-2022, 2001
- 5) Blood 97:785-791, 2001
- 6) Blood. 97(12):3755-3762, 2001
- 7) Blood 98:6-12, 2001
- 8) Blood 98:3618-3625, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
NOG マウスを用いたヒト造血幹細胞の測定
出願中
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍または雑誌名 (雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名*
Stem cells, 18. Murine stromal cell line HES-5 maintains reconstituting ability of ex vivo-generated hematopoietic stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood	2000		Shimakura Y. Kawada H. Ando K. Sato T. Nakamura Y. Tsuji T. Kato S. <u>Hotta T</u>
J Immunology, 166. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived natural killer cell cytotoxicity by dendritic cells.	2001		Yu Y. Hagihara M. Ando K. Gansuvd B. Matsuzawa H. Tsuchiya T. Ueda Y. Inoue H. <u>Hotta T. Kato S.</u>
J Immunol Methods, 253. Extensive and long-term ex vivo production of dendritic cells from CD34+ umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma.	2001		Hagihara M. Li C. Gansuvd B. Munkhbat B. Inoue H. Shimakura Y. Tsuchiya T. Ueda Y. Ando K. Kato S. <u>Hotta T.</u>
Bone Marrow Transplant 28. Absence of CD34- Hematopoietic Precursor Population in the Recipients of CD34+ Stem Cell Transplantation.	2001		Kato S. Ando K. Nakamura Y. Muguruma Y. Sato T. Yabe H. Yabe M. Hattori K. Yasuda Y. <u>Hotta T.</u>
Exp Hematol 29. Efficient Lentiviral Transduction into Human Cord Blood CD34+ Cells and Differentiation into Dendritic Cells.	2001		Okii M. Ando K. Hagihara M. Miyatake H. Shimizu T. Miyoshi H. Nakamura Y. Matsuzawa H. Sato T. Ueda Y. Kato S. Hotta T.

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍または雑誌名 (雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名*
Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. <i>Int J Hematol.</i> 73(1):6-13	2001		<u>Nakahata T.</u>
CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. <i>Blood</i> 97:419-425	2001		Matsuoka S, Ebihara Y, <u>Nakahata T.</u> , et al
Evidence for the presence of primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. <i>Blood</i> 97:2016-2022	2001		Xu M, Matsuoka S, Yang F-C, <u>Nakahata T.</u> , et al
Prompt and durable hematopoietic reconstitution by an unrelated cord blood transplantation in a child with Fanconi anemia. <i>Bone Marrow Transplant</i> 27: 767-769	2001		Yoshimasu T, Tanaka R, <u>Nakahata T.</u> , et al
Surface protein D and KL-6 as serological indicators of <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia in a child with acute lymphoblastic leukemia. <i>J Med</i> 32: 41-51	2001		Takahashi T, Ebihara Y, <u>Nakahata T.</u> , et al
Dandy-Walker variant in Coffin-Siris syndrome. <i>Amer. J. Med. Genetics.</i> 100:152-155	2001		Imai T, Hattori H, Miyazaki M, <u>Nakahata T.</u> , et al
Vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. <i>Blood</i> 97:785-791	2001		Sawano A., Iwai S., <u>Nakahata T.</u> , et al
Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. <i>Blood.</i> 97(12):3755-3762	2001		Ma F, Wada M, Yoshino H, Ebihara <u>Nakahata T.</u> , et al
Hematopoietic capability of cord blood CD34+ cells: a comparison with that of adult bone marrow CD34+ cells. <i>Int J Hematol</i> 73:457-462	2001		Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, <u>Nakahata T.</u> , et al
Current knowledge on the pathophysiology of fanconi anemia: from genes to phenotypes. <i>Int J Hematol.</i> 74:33-41	2001		Yamashita T, <u>Nakahata T.</u> :
Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. <i>Stem Cells</i> in press.	2002		Nishikawa M., Tahara T., <u>Nakahata T.</u> , et al
Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleura by AGM region-derived stromal cells. <i>Blood</i> 98:6-12	2001		Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H., Xu M, Ebihara Y, Ishii T., Sugiyama D., <u>Nakahata T.</u> :

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍または雑誌名 (雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名*
Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) stimulates primitive and definitive erythropoiesis in mouse embryo expressing hGM-CSF receptors but not erythropoietin receptors. Blood 98:3618-3625	2001		Hisakawa H., Sugiyama D., Nishijima I., Hong Wu, Nakao K., Nakahata T., et al
Repetitious appearance and disappearance of different kinds of clonal cytogenetic abnormalities after allogeneic bone marrow transplantation. Int J Hematol. 74:86-89	2001		Lin YW, Hamahata K, Watanabe K, Adachi S, Akiyama Y, Kubota M, Nakahata T. :
Inhibitory effect of interleukin 3 on the early development of human B-lymphopoiesis. Br J Haematol. 114:690-697	2001		Miyamoto K, Tsuji K, Maekawa T, Asano S, Nakahata T. :
Analysis of the SRY gene in Turner syndrome patients with Y chromosomal material. J. Med. Genet. 38:e41	2001		Yorifuji T, Muroi J, Mamada M, Nakahata T
Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. Leukemia 15:1713-1720	2001		Sasaki H, Manabe Kojima S, Tsuchida Nakahata T
Intracranial aneurysms in Ehlers-Danlos Syndrome type IV in early childhood. Pediatric Neurology 25(4):336-339	2001		Kato T, Hattori H, Yorifuji T, Tashiro Y, Nakahata
Lack of correlation between serum levels of soluble CD14 and IgE in asthmatic children. J Allergy Clin Immunol in press.	2002		Kusunoki T., Miyamoto T., Inoue Y., Nakahata T.
Gene expression profiles of human small airway epithelial cells treated with low doses of 14- and 16- membered macrolides. Biochem. Biophys. Res. Com. 287 :198-203	2001.		Yamanaka Y, Tamari M, Nakahata T, Nakamura Y. :
Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. Int. Arch Allergy Immunol. In press.	2002		Iio J, Katamura K, Takeda H, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Nakahata T. :
Cytokines Regulate Development of Human Mast Cells from Hematopoietic Progenitors. Int. Hematol. In press.	2002		Nakahata T, Toru H.

20010474

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.7-9の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。