

20020463

厚生労働科学研究費補助金
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀田 知光

平成15(2003)年3月

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・腫瘍・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・腫瘍・リウマチ内科)

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) 4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷 11

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

主任研究者 堀田知光 東海大学医学部・教授

研究要旨: マウス骨髄ストローマ細胞株を利用した体外増幅法では13倍、SCF、FL、TPO、IL-6/sIL-6R 複合体存在下の無ストローマ細胞系では4倍の幹細胞増幅を認めた。神戸先端医療センターにCPCを完成させ臍帯血造血幹細胞を用いた臨床研究のための基盤整備を行っている。

分担研究者

中畑龍敏(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。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. 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. 臍帯血 CD34⁺細胞の増幅を支持するマウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 より mRNA を抽出して、幹細胞増幅に関与することが想定される遺伝子について半定量的 RT-PCR 法により発現を比較した。
3. 臍帯血 CD34⁺陽性細胞を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。
4. トランスレーショナルリサーチのための基盤整備について検討した。

C. 研究結果と考察

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13倍に増幅することが可能であった。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。
2. マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 は支持能の低いMS-5と比較して、Delta-1 の遺伝子発現が高かった。

3. 実験動物中央研究所の伊藤らが開発したNOD/Shi-scid, IL-2R \cdot 欠損(NOG)マウスを利用することにより臍帯血 CD34⁺細胞が成熟T細胞まで分化することを確認した。
4. 本年度、神戸先端医療センターにCPCを完成させた。また、その運用方法を含めた細胞療法の標準的培養施設となるべく細胞操作室、培養室、QC室、細胞保管庫、を完備し、セキュリティも充実させた。

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) 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, 409-412, 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
- 17) Int J Hematol. 75, 370-375, 2002
- 18) Exp Hematol 30, 1036-1043, 2002
- 19) J Immunology 169, 204-209, 2002

- 20) Int. J. Hematol. 75(4):350-356, 2002.
- 21) Blood 100(7):2279-2288,2002.
- 22) Leukemia. 16:645-649, 2002.
- 23) Blood 100(9):3175-3182, 2002.
- 24) Bone Marrow Transplant. 30:531-534, 2002.
- 25) Biochim Biophys Acta.1592:313-321, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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。幹細胞増幅に関与すると想定される遺伝子として SCGF および Delta-1(Notch ligand family)遺伝子を単離した。

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。そのために1)骨髄ストローマ細胞を利用しない体外増幅法の開発、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の確立、3)検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法の確立を行う。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34⁺細胞の増幅を支持するマウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 および支持能の低いMS-5よりmRNAを抽出して、幹細胞増幅に関与することが想定される遺伝子について半定量的 RT-PCR 法により発現を比較した。
2. 臍帯血 CD34 陽性細胞を 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。
3. 臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウス骨髄内に移植して定量的 SRC アッセイを行った。

C. 研究結果と考察

1. マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 は支持能の低いMS-5と比較して、Delta-1の遺伝子発現が高かった。
Delta-1はNotchのligandであることが知られている。造血幹細胞はNotch-1, 2を発現しており、可溶性 Jagged-1, Delta-1, Delta-4 は試験管内で造血前駆細胞の増殖を促すことが報告されている。以上の結果より骨髄微小環境の中でNotch-Notch ligand 系も造血幹細胞の増幅に関与しているものと考えられ、HESS-5においてもこれらの遺伝子がヒト造血幹細胞の増幅に関与している可能性がある。

2. 実験動物中央研究所の伊藤らが開発した NOD/Shi-scid, IL-2R⁻欠損 (NOG) マウスを利用することにより臍帯血 CD34⁺細胞が成熟T細胞まで分化することを確認した。さらに脾臓のT細胞はPHA, IL-2 および同種抗原に反応したが、マウス細胞および自己非T細胞には反応を示さなかった。
3. 骨髄内移植法は従来の経静脈的投与と比較して15倍のSRC検出感度があることを見いだした。

E. 結論

2002年7月9日の厚生労働省医政局研究開発振興課長による通知「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」により異種のストローマ細胞を利用して増幅したヒト造血幹細胞を移植することは異種移植に該当することとなり、今後は HESS-5 細胞を代替できる因子としてDelta-1などの分子の検討を行う必要がある。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Int J Hematol. 75, 370-375, 2002
- 2) Exp Hematol 30, 1036-1043, 2002
- 3) J Immunology 169, 204-209, 2002
- 4) J Cell Biol, 157, 571-577, 2002
- 5) Human Immunol, 63, 164-175, 2002
- 6) Blood, in press, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

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: NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ (NOG)マウスを用いたヒト造血幹細胞の測定系を開発した。造血幹細胞の大量培養法を確立するため造血幹細胞自己複製因子の同定を試みた。SCF、FL、TPO、IL-6/sIL-6R 複合体存在下で増幅した臍帯血造血幹細胞を用いた臨床研究のための基盤整備を行っている。

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. 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。
2. 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。
3. 造血幹細胞の発生する胎生 10.5 日のマウス AGM 領域から樹立したヒト造血幹細胞の増殖活性を持つストローマ細胞株(AGMS3)を用いて、造血幹細胞の自己複製因子の遺伝子クローニングを試みた。
4. トランスレーショナルリサーチのための基盤整備について検討した。

C. 研究結果および考察

1. われわれが開発した NOG マウスは従来のマウスに比べヒト造血幹細胞の生着率が著しく高く、T 細胞を含む全ての血球分化が見られることから、ヒト造血幹細胞の測定系としては画期的なマウスと考えられる。現在、このマウスを用いて ex vivo 増幅造血幹細胞の定量的な測定などを検討中である。
2. 我々はこれまでの基礎研究の集積から、可溶性 IL-6 受容体(sIL-6R)/IL-6 複合体と SCF、TPO、Flt3 リガンド(FL)を組み合わせた新しいヒト造血幹細胞の増幅法を開発した。臍帯血から分離した CD34+細胞をこの条件下で 1 週間培養することにより、造血幹細胞を約 4.2 倍増幅できることが NOD/SCID マウスを用いた測定法で明らかとなった。この技術を基盤に ex vivo で増幅させた臍帯血幹細胞を臍帯血移植に応用する臨床研究まで含めたトランスレーショナルリサーチを計画している。AGMS3 を用いて現在までに多くの新規遺伝子が同定されたが、本年度はその中から 5 つの遺伝子に絞って機能解析が進行中である。
3. 細胞治療の安全性を確保するために、GMP に沿った培養法の確立と品質管理法の開発が必須であり、

具体的には伝染物質の混入を防いだり、細胞の出し入れなどを防ぐため、基準に合致した(CPC Cell processing center)での培養や標準作業手順書(SOP)の作成、厳格な品質管理体制の確立などの整備を行う必要がある。

4. 本年度、神戸先端医療センターにCPCを完成させた。また、その運用方法を含めた細胞療法の標準的培養施設となるべく細胞操作室、培養室、QC 室、細胞保管庫、を完備し、セキュリティーも充実させた。さらに、医薬品グレードの試薬の使用による培養法の整備、細胞療法の安全性確保のため動物血清を用いない培養法の開発(無血清培養法の開発)、新しい培養液の開発、SOP の作成などを行った。さらには、GMP に乗っ取った培養を行うため、培養機器(培養ハック、インキュベーター、ハック細胞洗浄機)の開発を行っている。

D. 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。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Int. J. Hematol. 75(4):350-356, 2002.
 - 2) Blood 100(7):2279-2288, 2002.
 - 3) Leukemia. 16:645-649, 2002.
 - 4) Blood 100(9):3175-3182, 2002.
 - 5) Bone Marrow Transplant. 30:531-534, 2002.
 - 6) Biochim Biophys Acta. 1592:313-321, 2002.
 - 7) Brit. J. Haematol. 119:525-534, 2002.
 - 8) Blood in press
 - 9) Bone Marrow Transplant. In press.
 - 10) Blood in press.

G. 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
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*
Reconstitution of functional human B lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted with ex vivo expanded CD34+ cord blood cells. Experimental Hematology 30, 1036-1043	2002		Li C, Ando K, Kametani Y, Oki M, Hagihara M, Shimamura K, Habu S, Kato S, <u>Hotta T.</u>
Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in NOD/Shi-scid, IL-2 Receptor γ null mice. J Immunology 169, 204-209.	2002		Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S, <u>Hotta T.</u>
Roy RR, Edgerton VR. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. J Cell Biol 157, 571-577	2002		Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, <u>Hotta T.</u>
Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. Human Immunol 63, 164-175	2002		Gansuvd B, Hagihara M, Yu Y, Inoue H, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Ando K, Nakamura Y, Munkhtuvshin N, Kato S, Thomas JM, <u>Hotta T.</u>
A highly sensitive strategy for scid-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. Blood, in press.	2003		Yahata T, Ando K, Sato T, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, <u>Hotta T.</u>
増幅臍帯血幹細胞の移植-現状と課題-, Annual Review 血液2003、(編 高久史麿他)、26-35	2003	中外医学社	安藤 潔、 <u>堀田知光</u>
幹細胞の可塑性、臨床検査、46, 367-374	2002	医学書院	川田浩志、安藤潔、 <u>堀田知光</u>
クロナリティの検査、臨床検査、46, 1315-1318	2002	医学書院	安藤 潔、 <u>堀田知光</u>
Serum stem cell growth factor (SCGF) for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation (SCT). Bone Marrow Transplant, in press	2003		Ito C, Sato H, Ando K, Hotta T, et al

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*
Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. <i>Leukemia</i> . 16:645-649	2002		Manabe A, Okamura J, Akiyama Y, Sako M, Kojima S, Koike K, Saito T, <u>Nakahata T</u> , et al.
Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia. <i>Brain Develop.</i> 24:109-111	2002		Katamura K, Hattori H, Kunishima T, Miyawaki T, <u>Nakahata T</u> , et al.
Cytokines Regulate Development of Human Mast Cells from Hematopoietic Progenitors. <i>Int. J. Hematol.</i> 75(4):350-356	2002		<u>Nakahata T</u> , Toru H
Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. <i>Int. Arch Allergy Immunol.</i> 127:217-225	2002		Iio J, Katamura K, Takeda H, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, <u>Nakahata T</u>
Somatic cell mutation in pediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. <i>Mutation Research</i> , 517:21-28	2002		Hamahata K, Kubota M, Usami I, Lin Y-W, Shimizu K, Morimoto A, <u>Nakahata T</u>
Possible dual effect of CD14 molecule on atopy. <i>Am. J. Res. Crit. Care Med</i> 165:551-552	2002		Kusunoki T, <u>Nakahata T</u> , Inoue Y
Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. <i>Blood</i> 100(7):2279-2288	2002		Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, Higuchi M, <u>Nakahata T</u> , et al.
Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. <i>Int. Immunol.</i> 14:637-645	2002		Han H, Tanigaki K, <u>Nakahata T</u> , et al
Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. <i>Hum Genet.</i> 111:161-165	2002		Yorifuji T, Kawai M, Muroi J, Hirano S, Yoshida I, Kuhara T, Endo F, <u>Nakahata T</u> , et al.
Subclinical central pontine myelinolysis following liver transplantation. <i>Brain & Development</i> 24:179-182	2002		Kato T, Hattori H, Nagato M, Kiuchi T, Uemoto S, <u>Nakahata T</u> , Tanaka K

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*
Parental Origin of Normal X Chromosomes in Turner Syndrome Patients With Various Karyotypes . Implications for the Mechanism Leading to Generation of a 45, X Karyotype. American Journal of Medical Genetics 111:134-139	2002		Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Yamanaka C, Momoi T, <u>Nakahata T</u> , et al.
NOD/SCID γ_c^{null} mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 100(9):3175-3182	2002		Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Tsuji K, Heike I, <u>Nakahata T</u> , et al.
Successful hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia following living-related liver transplantation. Bone Marrow Transplant. 30:531-534	2002		Umeda K, Adachi S, Watanabe K, Kimura N, Lin Y, <u>Nakahata T</u>
Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. Biochim Biophys Acta.1592:313-321	2002		Heike T, <u>Nakahata T</u>
Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34 ⁺ CD38 ⁻ cells expressing Flk2/Flt3. Brit. J. Haematol. 119:525-534	2002		Ebihara Y, Wada M, Ueda T, Xu M-J, Manabe A, Tanaka R, Ito M, Mugishima H, Asano S, <u>Nakahata T</u> , Tsuji K
Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. Blood in press.	2003		Mitsui T, Tnguchi T, <u>Nakahata T</u> , et al.
Th2 dominance and defective development of CD8 ⁺ dendritic cell subset in Id2-deficient mice. J. Allergy Clin. Immunol. In press.	2003		Kusunoki T, Sugai <u>Nakahata T</u> , et al.
Lack of correlation between serum levels of soluble CD14 and IgE in asthmatic children. J Allergy Clin Immunol in press.	2003		Iio J, Katamura K, Takeda H, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, <u>Nakahata T</u>
Successful T-cell-replete peripheral blood stem cell transplantation from HLA-haploidentical microchimeric mother to daughter with refractory acute lymphoblastic leukemia using reduced-intensity conditioning. Bone Marrow Transplant. In press.	2003		Umeda K, Adachi S, Ishihara H, Higashi Y, Shiota M, Watanabe K, Hishizawa M, Ichinohe T, Kitoh T, Maruya E, Saji H, Uchiyama T, <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*
Establishment of functional human immune system in NOD/SCID/ γ_c^{null} mice after transplantation of cord blood CD34 ⁺ cells. Blood in press.	2003		Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Ueyama Y, Katamura K, Nakahata T
Direct visualization of reconstitution process of Transplanted hematopoietic cells in intact mouse organs: Indicative of the presence of a Niche. Exp. Hematol. In press.	2003		Yoshimoto M, Heike T, Nakahata T
Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese population. Human Mutat. in press.	2003		Yagasaki H, Oda T, Adachi D, Nakajima T, Nakahata T, Asano S, Yamashita T
造血幹細胞の ex vivo 増幅. 最新医学 57(1):23-30	2002	最新医学社	伊藤仁也、 <u>中畑龍俊</u>
NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ マウスを用いたヒト造血幹細胞の解析. Annual Review 血液 2002:7-13	2002	中外医学社	平松英文、 <u>中畑龍俊</u>
胎児から小児期における造血. 血液フロンティア:12(1):33-41	2002	(株)医薬ジャーナル社	<u>中畑龍俊</u>
造血幹細胞移植. 別冊・医学のあゆみ 疾病疾患 state of arts Ver.2 (編 今西二郎 他), pp410-414	2002	医歯薬出版(株)	<u>中畑龍俊</u>
造血幹細胞を用いた再生医療. 再生医学がわかる(編 横田崇、東京)、pp66-75	2002	羊土社	<u>中畑龍俊</u>
造血幹細胞の体外増幅-サイトカイン刺激によるアプローチ. 造血幹細胞-基礎から遺伝子治療・再生医療へ(編 小澤敬也、東京)、pp226-232	2002	中外医薬社	<u>中畑龍俊</u>
慢性白血病. 骨髄異形成症候群. 小児科学(第2版)(監 白木和夫 他、編 伊藤克己 他)、pp1141-1147	2002	(株)医学書院	<u>中畑龍俊</u>
幹細胞の分化制御-オーバービュー. (現代化学 増刊 41)再生医学 再生医療(編 室田誠逸)、pp41-42	2002	(株)東京化学同人	<u>中畑龍俊</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*
ヒト ES 細胞. 血液・腫瘍科, 44(6):413-420	2002	科学評論社	平家俊男、 <u>中畑龍俊</u>
再生医療の現状と課題. Sysmex Journal Web 3(1):1-9	2002		<u>中畑龍俊</u>
小児の MDS の治療戦略. 血液フロンティア 12(8):131-138	2002	(株)医薬ジャーナル社	<u>中畑龍俊</u>
発生・細胞分化におけるアセチル化. 実験医学 20(15):2212-2218	2002	(株)羊土社	平家俊男、 <u>中畑龍俊</u>
造血幹細胞の培養増幅とその応用. (臨床病理レビュー特集 122)造血幹細胞移植とその実際手技・ミニ移植、ターゲット療法も含めて. (編 原宏) 102-109	2002		<u>中畑龍俊</u>
マウス胚性幹細胞を用いた心筋細胞分化機構解明の試み. 炎症・再生 22(2):145-151	2002		飯田みどり、平家俊男、吉本桃子、 <u>中畑龍俊</u>

20020463

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.5-P.9の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。