

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

Health and Labour Sciences Research Grants,
Translational research, Ministry of Health, Labour and Welfare

Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いた
トランスレーショナルリサーチ

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

先端医療センター、再生医療研究部
京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成14年度総括研究報告書	2
中畑 龍俊	
III. 平成14年度分担研究報告書	
1. GMPに準拠した培養法の確立	9
菅谷 真二	
2. GMP培養システムの開発、基盤整備	16
前川 平	
3. 細胞医療 (ex vivo増幅臍帯血幹細胞をモデルケースとした細胞、 組織医薬品の製造、品質管理体制の検証)	23
河合 弘行	
4. 品質管理法・細胞評価系の確立	27
平家 俊男	
5. 新GCPに準拠した臨床プロトコルの作成	36
伊藤 仁也・村上 雅義・永井 謙一	
6. 造血幹細胞の自己複製機構の解明	40
田中 宏和・松村 到・金倉 譲	
IV. 研究合同カンファレンス	49
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	50
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	53

はじめに

本報告書は厚生科学研究費補助金「基礎研究成果の臨床研究推進事業」の1つである「Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ」研究班における平成14年度の研究成果をまとめたものである。トランスレーショナルリサーチとは文字通り基礎研究成果を臨床応用するための架け橋にあたる研究であり、本研究においては、基礎研究で得られた造血幹細胞をサイトカインを用いて ex vivo で増幅する成果を実際の臍帯血移植に応用するまでの基盤整備を行うものである。

本研究は臍帯血を用いた再生医療・細胞治療に分類され、臨床応用にあたっては、整備すべき問題も山積みされているのが現状である。ちょうどこの研究班の発足と同時に薬事法が改正され、細胞治療製剤の定義が明らかになり、細胞を加工した製剤の臨床研究は薬事法に規定されることになった。また幹細胞研究のあり方に関しても厚生科学審議会ガイドライン作りが開始された。我々の研究はこういった社会的ニーズを受け、細胞治療をいかに安全に臨床応用するか具体的に示す先駆的研究に位置づけられると考えられ、再生医療の先導を行うことを目的としている。この目的を達成するため平成14年度は以下のテーマの分担研究を行い、臨床研究のための基盤整備を行った。

- I. GTP に準拠した培養法の確立
- II. 安全な細胞治療製剤の processing のための基盤整備
- III. 品質管理法・細胞評価系の確立
- IV. 新 GCP に準拠した臨床プロトコルの作成
- V. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

以上の計画のもとに平成14年度の中間報告書を作成したものであるが、関係者のご参考になれば幸いである。

平成15年3月 主任研究者 中畑 龍俊

I. 研究組織

平成14年度厚生科学研究「臍帯血造血幹細胞の ex vivo expansion の
トランスレーショナルリサーチ」研究班
研究組織

	氏名	所属
主任研究者	中畑 龍俊	先端医療センター客員主席研究員
分担研究者	金倉 譲	大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	前川 平	京都大学医学部附属病院輸血部
	伊藤 仁也	先端医療センター再生医療研究部
	田中 宏和	先端医療センター再生医療研究部
	村上 雅義	先端医療センター臨床研究支援部
	永井 謙一	先端医療センター診療部
	河合 弘行	キリンビール株式会社
	菅谷 真二	キリンビール株式会社
研究協力者	鈴木 秀文	キリンビール株式会社
	小林 典孝	キリンビール株式会社
	槻木 裕志	ニプロ株式会社
	平松 英文	京都大学発達小児科

Ⅱ. 平成 14 年度 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

総括研究報告書

Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ

総括研究者：中畑 龍俊

（先端医療センター客員研究部長、京都大学医学研究科発達小児科学教授）

研究要旨

基礎研究の成果から臍帯血の造血幹細胞を SCF,FL,TPO,IL-6/sIL-6R を用いて増幅させることに成功した。本研究においては、これらの基礎研究の成果を実際の臍帯血移植に応用するトランスレーショナルリサーチを行なうことを目的とする。このような細胞治療・再生治療を行なうにあたり、Ⅰ GTP に準拠した培養法の確立 Ⅱ 安全な細胞治療製剤の processing のための基盤整備 Ⅲ 品質管理法・細胞評価系の確立 Ⅳ 新 GCP に準拠した臨床プロトコルの作成 Ⅴ 造血幹細胞の自己複製機構の解明などを総合的に研究する必要がある。本年度の成果として、無血清培養法の確立、NOD/SCID/γcnnull マウスの開発とヒト造血幹細胞の活性測定の系を確立、セルプロセッシングセンターの完成、造血幹細胞の自己複製性能制御因子の解明などがあげられる。

分担研究者

中畑 龍俊	先端医療センター客員 研究部長
金倉 讓	大阪大学分子病態内 教授
平家 俊男	京都大学発達小児科学 助教授
前川 平	京都大学輸血部教授
伊藤 仁也	先端医療センター再生 医療研究部主任研究員
田中 宏和	先端医療センター地域 結集型事業特別研究員
村上 雅義	先端医療センター臨床 研究支援部長
永井 謙一	先端医療センター診療 部長
河合 弘行	キリンビール株式会社 医薬カンパニー企画部 長代理
菅谷 真二	キリンビール株式会社 生産本部セルプロセッ シングセンター長

A. 研究目的

我々は臍帯血中にある造血幹細胞を造血幹細胞に発現するサイトカインのリセプターから SCF, FL, TPO, IL-6/SIL-6R を用いて効率よく増幅する方法を開発してきた。この方法により、増幅される造血幹細胞はこれまでの報告と比較して、より未分化性を保ち、NOD/SCID マウスへの

移植実験から一週間の培養により SCID マウス中で長期にヒト造血細胞を支持できる幹細胞を 4.3 倍も増幅させることを示してきた。

また臍帯血移植は現在有効な移植方法として確立されてきたが、採取できる細胞数に限りがあるために生着不全が多い、対象患者が制限されるなどの問題点も明らかになってきた。これらの問題点を解決するために体外増幅させた臍帯血幹細胞を移植に用いることが期待されている。我々は、基礎研究で得られた造血幹細胞の増幅技術を臨床に応用するために本研究を開始し、まだ始まったばかりの細胞治療・再生医療の基盤を整備しながら総合的に臨床研究を進めることを目的とし、本研究を進める予定である。

B. 研究方法

本研究を進めるにあたり以下の分担研究組織を組み研究にあたる。

I. GMP に準拠した培養法の確立

平成 14 年 7 月に薬事法が改正され、細胞治療製剤が定義されるとともに GTP に準拠した製造を義務づけられた。この研究ではより安全な培養を行うため、無血清培養法の開発、培養原材料の検討、効果的な細胞融解法、分離法の検討、閉鎖系培養システムの構築などを開発する。

II. GMP に準拠した Cell processing の基盤整備

医薬品 GMP においては、「薬局等構造設備規則」により製造を行う設備の規定などが詳細に規格化されている。これに対し、生物製剤においては、安全に細胞を加工するためのセルプロセッシングセンターの規格化はまだ行なわれていないのが現状である。本研究においては、科学的な観点からセルプロセッシングセンターでの培養操作に関する研究を行ない、安全な細胞製剤を作成する基準をつくることを目的にハード、ソフトの規格、検証を行なう。

III. 品質管理法・細胞評価系の確立

体外増幅された臍帯血幹細胞の安全性のための品質管理基準を作成するとともに、増幅された臍帯血幹細胞の造血能力を評価することは重要な課題である。我々は、細胞の表面抗原、コロニー形成能、SCID マウスでの長期造血支持能などを総合的に評価する系を確立し、細菌などの混入を調べる安全性試験とともに効果の評価系システムを構築する。

IV. 新 GCP に準拠した臨床プロトコルの作成

細胞治療はオーダーメイド治療が中心となるため、効果および副作用の個体差が大きく、未だその評価を正確に行なう、臨床プロトコルの構築は研

究途上であるといえる。これまでの海外での造血幹細胞の臨床研究を効果と安全性の観点から検証することに加え、分担研究で得られた品質管理のデータから安全で EBM を証明しうる臨床プロトコルを作成する。

V. 造血幹細胞の自己複製機能の解明

造血幹細胞の性質は自己複製性能と分化能の両方を兼ね備えるという特徴を持つ。これらの決定は造血幹細胞を増幅させることにおいては重要な要素である。我々はこれら内的因子である造血幹細胞の分化遺伝子やシグナル伝達機構を解析することにより、造血幹細胞の自己複製性能、分化能の機序を解明するとともにこれらを効率よく制御する方法を開発する。

C. 研究結果

平成 14 年度の成果としては I. GMP に準拠した培養法の確立では、各種無血清培地による培養法の検討を行ない、無血清培地でも十分に臍帯血 CD34 陽性細胞を増幅できることを確認した。また、IL-6 と sIL-6R を融合させた FP-6 はそれぞれ単独のサイトカインに比べ、より増幅効率を上げることを証明した。GMP に準拠した Cell processing の基盤整備においては、先端医療センター、京都大学内にセルプロセッシングセンターを完成させたことに加え、安全な細胞を製造するた

めの環境衛生基準書を作成した。

Ⅲ品質管理法、細胞評価系の確立においては、従来、ヒト造血幹細胞の測定は、NOD/SCID マウスを用いて行われてきた。このマウスは多くの免疫不全マウスの中でも、ヒト細胞の生着を効率よく許容できるマウスとして広く用いられてきた。一方で、残存するNK細胞活性を中和抗体で阻害する必要があること、ヒト造血幹細胞よりヒトT細胞の分化が恒常的には確認できないこと等により、ヒト造血幹細胞活性測定の系として改善の余地を残している。このため、NOD/SCIDの残存するNK細胞活性を遺伝的に除去する目的で、NOD/SCIDマウスに common γ chain の変異を導入し、NOD/SCID/ γ cnull マウスを作成した。このマウスを使用し、ヒト造血幹細胞の活性測定の系を確立した。このマウスでは従来評価できなかった T cell 系のヒト細胞の生着が認められ、移植後の免疫能の評価が可能になった。また、より少量の細胞での生着が確認され、増幅 CD34 陽性細胞の機能評価が可能になることが示唆された。Ⅳの臨床プロトコルの作成においては、primary endpoint を移植後 40 日での生着の有無と副作用の発現率で評価すること、輸注 CD34 陽性細胞の目標値を設定することを行なった。Ⅴ. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解

明においては、HoxB4 や Notch など既知の内的因子による造血幹細胞の自己複製は、主として c-Myc、E2F1 などの細胞周期制御因子により制御されていることが明らかとなった。一方で、これら内的因子の操作により増幅させた細胞内には ROS の過剰な蓄積が認められた。

D. 考察と今後の展望

本プロジェクト遂行のためには本分担研究で示したような様々な基盤整備が必要であるが、わが国において、不明瞭である細胞治療の整備すべき、具体的内容について、本研究を通じて見えてきた。今年度の成果を活かし、来年度は培養の標準作業手順書の完成、品質管理基準書の完成、臨床プロトコルの完成を目標に臨床研究の準備を完成させる予定である。

E. 健康危険情報

特記すべきことはない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Ueyama Y., Katamura K., Nakahata T.: Establishment of functional human immune system in NOD/SCID/ γ γ c^{null} mice after transplantation of cord blood CD34⁺ cells. Blood in press.
2. Yoshimoto M., Heike T., 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.
3. Ishida D., Yang H., Hattori M., Kometani K., Iwai K., Suzuki M., Itohara S., Hiramatsu H., Nakano T., Nakahata T., Hiai H., Minato N.: Dysregulated Rap1 activation, T-cell anergy, and myeloproliferative disorders of late onset in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell* in press.
 4. Yagasaki H., Oda T., Adachi D., Nakajima T., Nakahata T., Asano S., Yamashita T.: Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese population. *Human Mutat.* in press.
 5. Mitsui T., Watanabe S., Hanada S., Ebihara Y., Sato T., Nakahata T., Tsuji K.: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. *Blood* in press.
 6. Kusunoki T., Miyanomae T., Inoue Y., Nakahata T.: Lack of correlation between serum levels of soluble CD14 and IgE in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* in press.
 7. Kusunoki T., Sugai M., Katakai T., Omatsu Y., Iyoda T., Inaba K., Nakahata T., Shimizu A., Yokota Y.: Th2 dominance and defective development of CD8⁺ dendritic cell subset in Id2-deficient mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* In press.
 8. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T : NOD/SCID γ_c^{null} mouse : an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100 (9) :3175-3182, 2002.
 9. Umeda K, Adachi S, Watanabe K, Kimura N, Lin Y, Nakahata T : Successful hematopoietic stem cell transplantation for aplastic anemia following living-related liver transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 30:531-534, 2002.
 10. Heike T, Nakahata T : Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1592:313-321, 2002.
 11. Ebihara Y, Wada M, Ueda T, Xu M-J, Manabe A, Tanaka R, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K : 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.
 12. Kato T, Hattori H, Nagato M, Kiuchi T, Uemoto S, Nakahata T, Tanaka K : Subclinical central pontine myelinolysis following liver transplantation. *Brain & Development* 24 : 179-182,

- 2002.
13. Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamanaka C, Momoi T, Nakahata T : 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.
 14. Katamura K, Hattori H., Kunishima T., Kanagane H., Miyawaki T., Nakahata T. : Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia. *Brain Develop.* 24:109-111, 2002.
 15. Nakahata T., Toru H. : Cytokines Regulate Development of Human Mast Cells from Hematopoietic Progenitors. *Int. J. Hematol.* 75 (4) :350-356, 2002.
 16. Iio J, Katamura K, Takeda H, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int. Arch Allergy Immunol.* 127:217-225, 2002.
 17. Hamahata K, Kubota M, Usami I, Lin Y-W, Shimizu K, Morimoto A, Nakahata T : Somatic cell mutation in pediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Mutation Research*, 517:21-28, 2002.
 18. Kusunoki T., Nakahata T. Miyanomae T., Inoue Y. : Possible dual effect of CD14 molecule on atopy. *Am. J. Res. Crit. Care Med* 165:551-552, 2002.
 19. Suzuki N., Ohneda , Takahashi S., Higuchi M., Mukai HY., Nakahata T., Imagawa S., Yamamoto M. : Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 100 (7) :2279-2288, 2002.
 20. Han H., Tanigaki K., Yamamoto N., Kuroda K., Yamamoto M., Nakahata T., Ikuta K., Honjyo T. : Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int. Immunol.* 14:637-645, 2002.
 21. Yorifuji T., Kawai M., Muroi J., Mamada M., Kurokawa K., Shigematsu Y., Hirano S., Sakura N., Yoshida I., Kuhara T., Endo F., Mitsubushi H., Nakahata T. : Unexpectedly high prevalence of the mild form of propionic acidemia in Japan: presence of a common mutation and possible clinical implications. *Hum Genet.* 111:161-165, 2002.
 22. Manabe A, Okamura J, Yumura-Yagi K, Akiyama Y, Sako M, Uchiyama H, Kojima S, Koike K, Saito T and Nakahata T. for the MDS Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology : Allogeneic

hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia*. 16:645-649, 2002.

1. 伊藤仁也、中畑龍俊：造血幹細胞の ex vivo 増幅. *最新医学* 57(1):23-30、(株)最新医学社(大阪)、2002.
2. 平松英文、中畑龍俊：NOD/SCID/γ_c/γマウスを用いたヒト造血幹細胞の解析. *Annual Review 血液* 2002 (株)中外医学社(編 高久史磨 他、東京)、2001.
3. 吉本桃子、中畑龍俊：Aorta-Gonad-Mesonephros (AGM) 領域における造血幹細胞の発生. *炎症と免疫* 9(2):77-82、2001.
4. 中畑龍俊：胎児から小児期における造血. *血液フロンティア* (株)医薬ジャーナル社 12(2):33-41、2002.
5. 中畑龍俊：造血幹細胞移植. 別冊・医学のあゆみ 疾病疾患 state of arts Ver. 2 医歯薬出版(株)(編 今西二郎 他、東京)、pp410-414、2002.
6. 中畑龍俊：造血幹細胞を用いた再生医療. *再生医学がわかる* (株)羊土社(編 横田崇、東京)、pp66-75、2002.
7. 中畑龍俊：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* (株)中外医学社(編 小澤敬也、東京)、pp226-232、2002.
8. 中畑龍俊：慢性白血病. *骨髓異形成症候群*. *小児科学*(第2版)(株)医学書院(監 白木和夫 他、編 伊藤克己 他)、pp1141-1147、2002.
9. 中畑龍俊：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* (株)東京化学同人(編 室田誠逸)、pp41-42、2002.
10. 平家俊男、中畑龍俊：ヒトES細胞. *血液・腫瘍科*, *科学評論社* 44(6):413-420、2002.
11. 中畑龍俊：再生医療の現状と課題. *Sysmex Journal Web* 3(1)、2002.
12. 中畑龍俊：小児のMDSの治療戦略. *血液フロンティア* (株)医薬ジャーナル社 12(8):131-138、2002.
13. 平家俊男、中畑龍俊：ヒトES細胞. *血液・腫瘍科*, 44(6):413-420、2002.
14. 平家俊男、中畑龍俊：発生・細胞分化におけるアセチル化. *実験医学* 20(15):2212-2218、2002.
15. 中畑龍俊：造血幹細胞の培養増幅とその応用. *臨床病理レビュー* 122:102-109、2002.
16. 飯田みどり、平家俊男、吉本桃子、中畑龍俊：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.

Ⅲ. 平成 14 年度 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用研究事業）

分担研究報告書

GMP に準拠した培養法の確立

分担研究者：菅谷 真二

（キリンビール（株）医薬カンパニー生産本部セルプロセッシングセンター
センター長）

研究協力者：鈴木秀文

（キリンビール医薬生産本部セルプロセッシングセンター 研究員
兼 先端医療センター再生医療研究部 特別研究員）

研究要旨

複数のサイトカインを組み合わせることによりヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を体外で増幅することが可能である。このような細胞をヒトの治療に用いるためには、細胞の調製、培養等を GMP に則って行うことが必要となる。本分担研究では、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を SCF（Stem Cell Factor）、TPO(Thrombopoietin)、Flt3/Flk2 リガンド、IL-6/IL-6 受容体複合体蛋白質 (FP6) を含んだ無血清培養により増幅培養し、最終的に臨床応用可能な細胞を GMP 製造することを目指している。

本報告では、GMP 製造を行う為の基礎検討として、①無血清培地の選択、②サイトカインの組み合わせ、③サイトカイン添加量の検討、④他の培養方法との比較、⑤細胞純度の影響について検討を行った。その結果、①SCF、TPO、Flt3/Flk2 リガンド、FP6 を添加した無血清培地（QBSF-60）を用いることにより造血幹細胞の体外増幅が可能であること、②サイトカインの組み合わせとして SCF、TPO、Flt3/Flk2 リガンド、FP6 が最適であること、③Flt3/Flk2 リガンド、FP6 は濃度依存的に増幅効率を高め本培養系で重要な役割を果たすこと、④本培養系は他のグループが実施している培養方法に比較して *in vitro* のコロニー形成法で比較したとき優れた成績を示すこと、⑤培養開始時の CD34 陽性細胞の純度が 50%程度まで低くても、体外増幅が可能であることが判明した。

以上の結果より、無血清培地を用いたヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の体外増幅が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

サイトカインを用いたヒト造血幹細胞/造血前駆細胞の体外増幅が世界的に試みられている。本研究グループはこれまでの研究により、gp130の活性化がヒト造血幹細胞/造血前駆細胞の体外増幅に極めて有用であることを見出している。実際に SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、IL-6/IL-6 受容体複合体蛋白質 (FP6) を組み合わせることによりヒト造血幹細胞の増幅が可能であることも NOD/SCID マウス移植系を用いて示している。本研究では、このような体外増幅した造血幹細胞/造血前駆細胞を臨床応用することを最終目標とし、その為に GMP に準拠したヒト造血幹細胞体外増幅法の確立とその品質管理手法確立を技術的な解決課題とする。

本報では、臍帯血由来 CD34 陽性細胞を材料として、実際の製造工程管理や品質管理に必要な検討を行なった結果について示す。

B. 研究方法

ヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法にて分離後、SCF (100ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、FP6 (100ng/ml、一部実験では IL-6 と IL-6 受容体蛋白質を 100ng/ml、400ng/ml それぞれ添加) を添加した培地にて培養した。培養した細胞につい

て、細胞数、FACS 解析、コロニー形成能の増幅率等を検討した。

本年度は、GMP に則ったヒト造血幹細胞体外増幅法を確立する為に以下の項目について検討を行った。

1. 無血清培地の選択

臨床応用を考えた細胞培養においては、未知のウイルス等への感染症や BSE 感染に対する危険性から動物由来蛋白質を含有しない無血清培地を用いて培養を行うことが望ましい。また、使用する無血清培地は GMP に則って製造されていることが望ましい。そこで、現時点で使用可能と考えられる無血清培地 4 種の中から本培養系に最適な培養液の選択を行った。

2. サイトカインの組み合わせ

無血清培養では、血清培養時と培養条件が大きく異なる為、SCF、Flt3/Flk2 リガンド、FP6 のサイトカインの組み合わせが無血清培養系においても最適であるか、確認する必要がある。そこで、これらのサイトカインの組み合わせを変え、無血清培養系におけるサイトカインの必要性について検討した。

3. サイトカイン添加量の検討

無血清培養では、血清培養時と培養条件が大きく異なる為、SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6 のサイトカインの濃度、特に Flt3/Flk2 リガ

ンド、FP6 の濃度は細胞の増幅に影響を与える。そこでこれら2つのサイトカインについて、体外増幅に与える影響について検討した。

4. 他の培養方法との比較

これまで、世界の複数のグループがサイトカインを用いた造血幹細胞/造血前駆細胞の増幅法を報告している。McNiece らのグループは SCF (100ng/ml)、TPO (100ng/ml)、G-CSF (100ng/ml) の3つのサイトカインを用いた培養法、Astrom社のグループは PIXY321 (GM-CSF と IL-3 の融合蛋白質、本実験系では GM-CSF (50ng/ml) と IL-3 (50ng/ml) で代用)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、EPO (0.1U/ml) の3つのサイトカインを組み合わせた方法により臍帯血の体外増幅を試みている。そこで、無血清培養における、これら培養法の比較検討を行った。

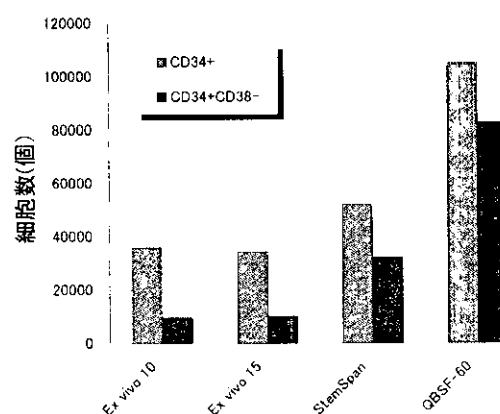
5. 細胞純度の影響について

サイトカインを用いた造血幹細胞/造血前駆細胞の増幅では、ヒト臍帯血より分離した CD34 陽性細胞の純度が、培養効率に影響を与えることが予想される。実際の臨床応用では、高純度の CD34 陽性細胞の分離が難しい場面が想定される為、純度の下限値を見極める為の検討を行った。

C. 研究結果

1. 無血清培地の選択

各サイトカインを添加した4種の無血清培地 Ex vivo10、Ex vivo15 (共に米国 BioWhittaker 社製)、StemSpan2000(米国 StemCells 社製)、QBSF-60 (米国 Quality Biological 社製) を用いて純化した CD34 陽性細胞を7日間、10日間、14日間培養し、培養後の細胞について、細胞増幅効率、コロニー形成能の増幅効率を算出した。その結果、QBSF-60 は、全細胞数の増幅効率、CD34 陽性細胞の増幅効率 (図1)、コロニー形成能の増幅効率を比較した場合、全ての指標並びに培養期間で他の無血清培地よりも同等、又は優れていることが判明した。



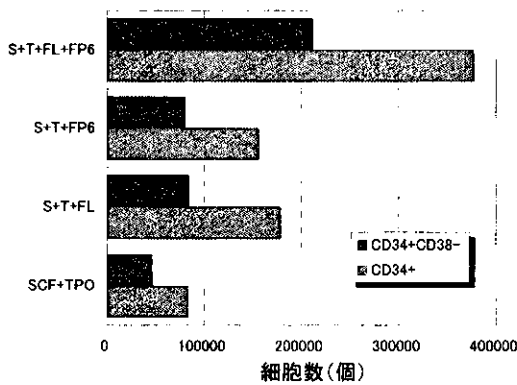
(図1) 無血清培地の比較

10000 個の CD34 陽性細胞を SCF (100ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、IL-6 及び IL-6 受容体蛋白質 (それぞれ 100ng/ml 及び 400ng/ml) を含有した各無血清培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて7日間培養した後、CD34⁺細胞数並びに CD34⁺CD38⁻細胞数を FACS にて解析した。

2. サイトカインの組み合わせ

純化した CD34 陽性細胞を、各サイトカインを添加した QBSF-60 で7日間

培養し、培養後の細胞について、細胞増幅効率、コロニー形成能の増幅効率を算出した。その結果、全細胞数の増幅効率、CD34 陽性細胞の増幅効率、コロニー形成能の増幅効率を比較した場合、SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6 の4つのサイトカイン全てを添加した場合に最も効率的な増幅が可能であることが判明した (図2)。



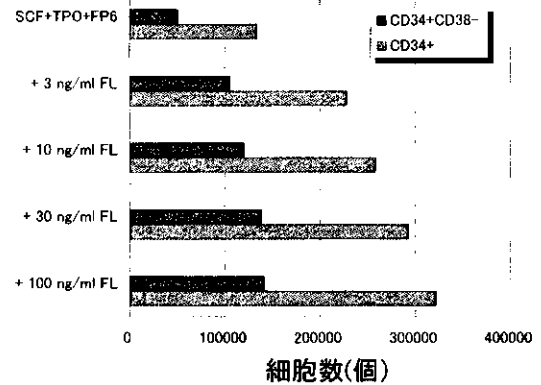
(図2) サイトカインの組み合わせ

10000 個の CD34 陽性細胞を SCF (100ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、FP6 (それぞれ 100ng/ml 及び 400ng/ml) を含有した QBSF-60 培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて 7 日間培養した後、CD34⁺細胞数並びに CD34⁺CD38⁻細胞数を FACS にて解析した。

3. サイトカインの添加量の検討

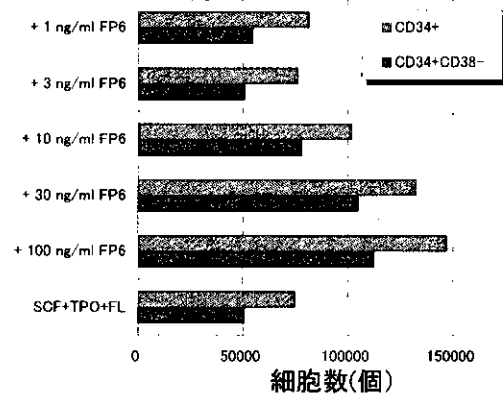
SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (3~100ng/ml)、FP6 (3~100ng/ml) の各サイトカインを添加した QBSF-60 培地中で、純化した CD34 陽性細胞を 7 日間培養し、培養後の細胞について、細胞増幅効率を算出した。その結果、Flt3/Flk2 リガンド (図3A) 及び FP6 (図3B) は濃度依存的に全細胞数の増幅効率、CD34

陽性細胞の増幅効率を上昇させることが判明した。



(図3A) Flt3/Flk2 リガンドによる濃度依存的細胞増幅

10000 個の CD34 陽性細胞を SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、FP6 (100ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (0~100ng/ml)、を含有した QBSF-60 培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて 7 日間培養した後、CD34⁺細胞数並びに CD34⁺CD38⁻細胞数を FACS にて解析した。



(図3B) FP6 による濃度依存的細胞増幅

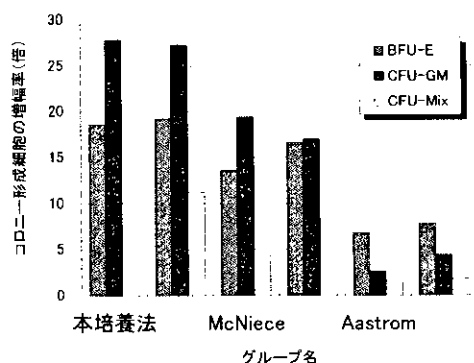
10000 個の CD34 陽性細胞を SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、FP6 (0~100ng/ml)、を含有した QBSF-60 培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて 7 日間培養した後、CD34⁺細胞数並びに CD34⁺CD38⁻細胞数を FACS にて解析した。

4. 他の培養方法との比較

これまでに報告のある米国 McNiece らのグループ (SCF (100ng/ml)、TPO (100ng/ml)、G-CSF (100ng/ml))、並びに米国 Astrom 社のグループ

(GM-CSF (50ng/ml)、IL-3 (50ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、EPO (0.1U/ml)) と同等の組み合わせのサイトカインを添加した QBSF-60 無血清培地中で CD34 陽性細胞を 7 日間、並びに 14 日間培養し、全細胞数の増幅効率、コロニー形成細胞の増幅効率等の比較検討を行った。

その結果、全細胞数の増幅効率では、本培養法と McNiece らの方法は同等であり、コロニー形成細胞の増幅効率 (図 4) で本培養法が最も優れていることが判明した。



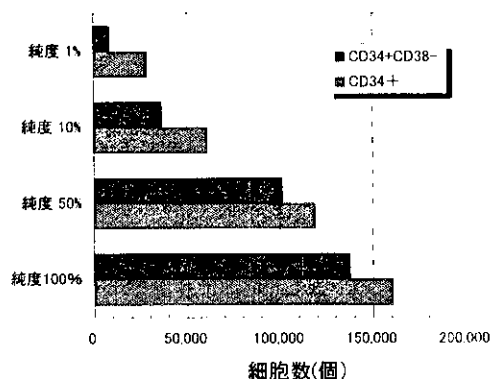
(図 4) 他のグループの培養法との比較

10000 個の CD34 陽性細胞を本培養法 (SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、FP6 (100ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml))、McNiece (SCF (100ng/ml)、TPO (100ng/ml)、G-CSF (100ng/ml))、Aastrom (GM-CSF (50ng/ml)、IL-3 (50ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、EPO (0.1U/ml)) を含有した QBSF-60 培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて 7 日間培養した後、各細胞を用いてコロニー試験を実施した。コロニー試験は 14 日後に観察し、各コロニー数を算出した。

5. 細胞純度の影響についての検討

磁気ビーズにより分離した CD34 陽性細胞に CD34 陰性の単核球を混合し、擬似的に純度 50%、10%、1% の細胞

を調製し、SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、FP6 (100ng/ml) の各サイトカインを添加した QBSF-60 培地で 7 日間培養し、培養後の細胞について、細胞増幅効率、コロニー形成能の増幅効率を算出した。その結果、CD34 陽性細胞の純度依存的に細胞増幅率、コロニー形成能の増幅効率の低下が観察されたが、50% の純度においても十分な増幅が観察された (図 5)。



(図 5) CD34 陽性細胞の純度

10000 個の CD34 陽性細胞に CD34 陰性の単核細胞を混合し、図中の細胞純度を擬似的に調製した。この混合細胞を SCF (100ng/ml)、TPO (10ng/ml)、Flt3/Flk2 リガンド (100ng/ml)、FP6 (100ng/ml) を含有した QBSF-60 培地に伝播後、5% CO₂、5% O₂ インキュベーターにて 7 日間培養した後、CD34⁺細胞数並びに CD34⁺CD38⁻細胞数を FACS にて解析した。

D. 考察

1. 無血清培地の選択

無血清培養では、血清成分に含まれる増殖因子等が存在しない為、造血幹細胞のような未熟な細胞を増幅させることが困難なことが多い。また、GMP

に則って製造された無血清培養液は世界的にも限られており、培養液の選択が臨床応用への障壁となることが予測された。しかし、本年度の検討により、米国企業が製造する QBSF-60 培地が本研究の細胞培養に使用できる可能性が示唆され、一つの壁を乗り越えられた意義は大きい。今後、本無血清培養液を用いて、培養された造血幹細胞/造血前駆細胞が NOD/SCID マウスを用いた移植実験で期待される効果を示すか否かについて確認する必要がある。また、これらの無血清培地は日本以外の国が製造するものが主であり、日本製の無血清培地の開発が望まれる。

2. サイトカインの組み合わせ

無血清培養では、血清入りの培養条件とことなる為、必ずしも SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6 のサイトカインの組み合わせが最適とは限らないことが考えられた。しかしながら、本年度の研究により、これら4つのサイトカインの組み合わせが無血清培養時にも最適であることが確認された。特に Flt3/Flk2 リガンドと FP6 の2つのサイトカインが添加された場合には培養効率が顕著に高まることが認められ、本培養系の特徴が示された。

3. サイトカイン添加量の検討

前述の通り、本培養法では、Flt3/Flk2 リガンドと FP6 の2つのサイトカインが重要な役割を果たしている。それを裏付けるように、これらのサイトカインは濃度依存的に細胞増幅を高める効果があることが示された。今後、バック等を用いた閉鎖系大量培養系にて最適なサイトカイン濃度を決定していく必要がある。

4. 他の培養方法との比較

これまで、世界の複数のグループがサイトカインを用いた造血幹細胞/造血前駆細胞の増幅法を報告している。しかし、本培養法は、NOD/SCID マウスを用いた移植実験の成績から他のグループの培養法に比較して、未熟な造血幹細胞の増幅効率が高いことが示されており、本培養法により増幅された造血幹細胞/造血前駆細胞が優れた臨床効果を示すことが期待される。実際に McNiece らの方法は CD34 陽性細胞の増幅効率では、本培養法よりも優れた効果を示したが、コロニー試験の結果から、McNiece らの方法によって増幅された細胞は比較的分化の進んだ細胞であることが示されており、このことは本培養法が、より未熟な造血幹細胞を増幅できる能力が高いことを示唆する。これらの結果から、SCF、Flt3/Flk2 リガンド、TPO、FP6 のサイトカインを組み合わせた無血清培養法により体外増幅培養された細胞が、