

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した
血液生成技術の開発研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 滋

平成 16 年 (2004) 3 月

目 次

I.	総括研究報告書		
	胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した血液生成技術の開発研究		
	千葉 滋	1	
II.	分担研究報告書		
	造血幹細胞の増幅および血球への分化誘導技術の開発に関する研究		
	寺村 正尚	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	8	

I. 総括研究報告

胚性幹細胞および造血幹細胞を利用した 血液生成技術の開発研究

主任研究者：千葉 滋（東京大学医学部附属病院無菌治療部・助教授）

研究要旨

体性造血幹細胞および胚性幹細胞から血球への分化を誘導する技術を開発することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。(1)造血支持細胞（ヒト間葉系幹細胞；hMSC）を温度応答性培養皿でシート状に培養した後、温度を下げることによりシート状のまま取り出す技術を開発した。別途培養した hMSC 上にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を播種した後、その上からさらにシート状に培養した hMSC を重層して培養した。重層しない培養系に比べ重層した培養系では、LTC-IC が 10 倍に増幅された。(2)Notch リガンドによりシグナルを導入しつつ、無血清条件でヒト臍帯血 CD133 陽性細胞中の造血幹細胞(SCID マウス再構築細胞)を増幅させることを明らかにした。(3)Notch1 及び Notch2 のノックアウトマウスを解析し、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch 1 受容体からのシグナルが必須であることを見出した。(4)ヒト ES 細胞を無血清条件で未分化状態を維持しつつ継代しうることを追認した。また、ヒト ES 細胞から容易に中胚葉系細胞へ分化させうることを見出した。

分担研究者

東京大学大学院医学系研究科
造血再生医療講座助手
鈴木 隆浩
東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科講師
黒川 峰夫
東京大学大学院医学系研究科
造血再生医療講座助教授
小川 誠司
東京女子医科大学
血液内科 1 講師
寺村 正尚

実用化されれば、管理された条件の下に計画的な生産が可能になり、安定供給と安全性の問題が解決するのみならず、大規模な生産系の稼働により、輸血医療のコスト低減につながる。一方、様々な理由により現時点では不可能である白血球の自由な輸血が可能になると、悪性腫瘍や難治性感染症に対する新しい強力な免疫治療法や細胞療法の開発に発展する可能性も見込まれる。さらに本研究では、造血幹細胞そのものや、これに由来する前駆細胞の利用も対象とする。本研究の成果により、造血幹細胞移植療法を実施する上でネックとなっている、ドナー細胞入手の問題も解決されうる。

A. 研究目的

血液製剤の需要は、医療の高度化に伴いますます増大している。現在血液製剤は献血事業に依存しているが、献血による輸血医療は、量的質的な供給の不安定性、感染の危険性などの問題を孕んでいる他、高コストであることから医療経済にも影響を及ぼしている。本研究ではこうした現状に対し、臍帯血や骨髄中に存在する体性造血幹細胞、および、樹立された培養胚性幹細胞（ES 細胞）の自己複製能と多分化能を利用して、体外で赤血球、白血球、血小板など各血球細胞の分化・増殖による人工血液産生法の開発を行い、供血者に依存する輸血医療を抜本的に再構築することを目指すものである。これらの人工血液が

B. 研究方法

体性造血幹細胞は、その供給が有限であるため、幹細胞としての未分化性を維持したまま増幅することが肝要である。これにあたって、次の 2 つの異なるアプローチを用いて、目的とする培養細胞から血球生成の開発研究にあたった。すなわち、(1)Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm)を重合させることにより、温度に反応して細胞の接着性を変化させる培養皿（東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが新たに開発）で造血支持細胞（ヒト骨髄間葉系幹細胞；hMSC）をシート状に培養した。この上にヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を播種し、さらにその上に別途シート状に培養した hMSC を重層した。こうして造血幹細胞を造血支持細胞で挾

み込むことで三次元的な培養系を構築し、これが造血幹細胞の生存や増殖に与える影響について検討した。(2)ヒト臍帯血から、CD133陽性細胞を純化し、一旦凍結後液体窒素中に保存した。融解後、SCF、TPO、Flt3 リガンドの組み合わせをベースとして、2種類の可溶性 Notch リガンド (Delta1 及び Jagged1) を作用させ、無血清条件で培養した。1 週～4 週後に FACS 解析を行い、また、未熟造血前駆細胞の増加を混合コロニー形成法により、造血幹細胞を放射線照射したマウスにおける移植法により評価した。

一方、米国 WiCell 研究所から提供を受けたヒト ES 細胞株 H9 の培養を開始し、細胞表面抗原の発現を解析することにより、未分化状態のモニターを行った。また、OP-9 細胞との共培養を行い、中胚葉細胞への分化および中胚葉細胞から血管内皮細胞や造血細胞への分化過程を追跡した。

C. 研究結果

(1)温度応答性培養皿上で hMSC をシート状に培養した後、培養温度を 37°C から 20°C に下げるとシート状に剥離した。別途 hMSC 上にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を播種した後、シート状に剥離した hMSC を重層して培養した。この重層培養法では、単層の hMSC 上での培養に比べ、LTC-CI が約 10 倍に増幅された。(2-1)ヒト臍帯血から CD133 陽性細胞を分離し、無血清条件下で Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白をディッシュにコートし、SCF+TPO+Flt3 リガンド+IL-6/IL-6 レセプター融合蛋白のカクテルを加えて 3 週間培養することにより、SCID マウスに長期生着可能な造血幹細胞を、約 5 倍に増幅させ得た。(2-2)Notch1 及び Notch2 ノックアウトマウスの胎生期造血発生について解析した結果、胎生期に血管内皮細胞から造血幹細胞に分化する過程に、Notch 1 受容体からのシグナルが必須であることを突き止めた。(3)ヒト ES 細胞株 H9 細胞を無血清条件で培養し継代した。細胞表面抗原の発現パターンなどから、未分化状態を維持したまま継代できることを追認した。一方、OP-9 細胞との共培養により、条件によりさまざまな中胚葉系細胞に容易に分化させうることを見出した。

D. 考案

(1)生体内の骨髓組織は支持組織の柱帯により形成された三次元空間であり、そこに造血幹細胞が付着して自己再生および分化がおきている。本研究で検討中の三次元培養法は生体により近い生体外培養システムである。今

年度の研究では、ヒト臍帯血造血幹細胞を、がこの培養系で増幅させうることが示唆された。(2)Notch シグナルを用いることにより、ヒト臍帯血由来造血幹細胞が増幅され得ることを証明し、臨床応用を目指す基盤が確立された。(3)ヒト ES 細胞は、容易に中胚葉系細胞に分化させ得ることから、造血細胞への分化誘導法の開発が有望と考えられた。

E. 結論

(1)造血支持細胞と造血幹細胞による生体外 3次元培養法開発の継続し、ヒト臍帯血由来 LTC-CI の増幅を確認した。(2)ストローマ細胞を用いず、また無血清条件下で、既知のサイトカインとともに Notch リガンドの一つ Delta1 の可溶性蛋白を用いることにより、臍帯血中の造血幹細胞の効率よい体外増幅に成功した。(3)ヒト ES 細胞の無血清条件下での継代に成功した。中胚葉系細胞への効率よい分化誘導が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H. Stem cell leukemia (SCL) directs hematopoietic stem cell fate. Blood, in press.
2. Yamaguchi Y, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H, Kurokawa M. AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. J Biol Chem, in press.
3. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara M, Asano Y, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. Bone Marrow Transplant 33:549-552, 2004.
4. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. Nat Med 10:299-304, 2004.
5. Yokoyama H, Aoyama T, Nakajima K, Yamada Y, Sato H, Chiba S, Hirai H, Iga T. [Investigation of the cause of polyurethane catheter cracking

- during constant infusion of etoposide (VP-16) injection (2)--Analysis of ethanol eluting materials from catheter]. *Yakugaku Zasshi* 123:799-803, 2003.
6. Komeno Y, Ogawa S, Ishida T, Takeuchi K, Tsujino S, Kurokawa M, Aoki K, Kanda Y, Chiba S, Motokura T, Fukayama M, Hirai H. Ischemic colitis as a manifestation of thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. *Intern Med* 42:1228-1232, 2003.
 7. Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, Shimizu K, Nakamura S, Ruddle Fh, Hirai H. Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15577-15582, 2003.
 8. Hu Qd, Ang Bt, Karsak M, Hu Wp, Cui Xy, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng Yk, Ling Ea, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster Jc, Schachner M, Pallen Cj, Watanabe K, Xiao Zc. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115:163-175, 2003.
 9. Maekawa Y, Tsukumo S, Chiba S, Hirai H, Hayashi Y, Okada H, Kishihara K, Yasutomo K. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* 19:549-559, 2003.
 10. Asano Y, Kanda Y, Ogawa N, Sakata-Yanagimoto M, Nakagawa M, Kawazu M, Goyama S, Kandabashi K, Izutsu K, Imai Y, Hangaishi A, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Male predominance among Japanese adult patients with late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32:1175-1179, 2003.
 11. Takahashi T, Haraguchi K, Chiba S, Yasukawa M, Shibata Y, Hirai H. V α 24+ natural killer T-cell responses against T-acute lymphoblastic leukaemia cells: implications for immunotherapy. *Br J Haematol* 122:231-239, 2003.
 12. Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hirai H. V α 24+ natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients. *Hum Immunol* 64:586-592, 2003.
 13. Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, Juji T, Shibata Y, Hirai H. Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 2003;27:795-802
 14. Suzuki T, Nishida M, Futami S, Fukino K, Amaki T, Aizawa K, Chiba S, Hirai H, Maekawa K, Nagai R. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans. A case report of a Tokaimura nuclear accident victim. *Cardiovasc Res* 58:487-492, 2003.
 15. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H. Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development. *Immunity* 18:675-685, 2003.
 16. Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H. Notch1 but Not Notch2 Is Essential for Generating Hematopoietic Stem Cells from Endothelial Cells. *Immunity* 18:699-711, 2003.
 17. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S, Yamaguchi T, Osawa M, Kageyama R, Nakauchi H, Nishikawa M, Hirai H. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 101:1777-1783, 2003
 18. Komeno Y, Kanda Y, Kandabashi K, Kawazu M, Goyama S, Takeshita M, Nannya Y, Niino M, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Hirai H. Reduced-intensity bone marrow transplantation from an alternative unrelated donor for myelodysplastic syndrome of first-donor origin. *Am J Hematol* 72:220-222, 2003
 19. Kawazu M, Kanda Y, Goyama S, Takeshita M, Nannya Y, Niino M, Komeno Y, Nakamoto T, Kurokawa M, Tsujino S, Ogawa S, Aoki K, Chiba S, Motokura T, Ohishi N, Hirai H. Rapid diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis by quantitative polymerase chain reaction using bronchial lavage fluid. *Am J Hematol* 72:27-30, 2003
 20. Kanda Y, Chiba S, Hirai H, Sakamaki H, Iseki T, Kodera Y, Karasuno T, Okamoto S, Hirabayashi N, Iwato K, Maruta A, Fujimori Y, Furukawa T, Mineishi S, Matsuo K, Hamajima N, Imamura M. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood*, 2003
 21. Hozumi K, Abe N, Chiba S, Hirai H, Habu S. Active form of notch members can enforce T lymphopoiesis on lymphoid progenitors in the

monolayer culture specific for B cell development.
J Immunol 170:4973-4979, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

ヒト造血幹細胞の体外増幅法の開発に関する研究

分担研究者 寺村 正尚 東京女子医科大学血液内科

研究要旨

ヒト造血幹細胞の体外増幅を目的として、造血支持細胞と造血幹細胞による新規3次元体外培養システムの開発を試みた。造血支持細胞の間に造血幹細胞を組み入れ、三次元的に培養するために、まず造血支持細胞を細胞シート化することを試みた。すなわち、温度応答性培養皿を用いて造血支持細胞をシート化し、重層培養できるかを検討した。次に造血支持細胞と造血幹細胞（CD34 陽性細胞）を交互に重ねることで三次元培養系を構築し、その培養系が造血幹細胞を増幅しうるかについて、long-term culture-initiating cell (LTC-IC) アッセイ法を用いて検討した。その結果、本三次元培養法を用いた場合には、単に造血支持細胞の上で CD34 陽性細胞を培養した場合と比較して、LTC-IC は 10 倍以上に増加していた。以上より、本研究で用いた三次元培養法は、造血幹細胞の体外増幅に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

造血幹細胞は移植医療や再生医療に幅広く利用されており、これまでも数多くの培養研究が行われてきたが、造血幹細胞の培養増幅は臨床応用に十分なものではない。近年、造血幹細胞は骨髄周辺の niche に接着して存在することが明らかにされつつある。そこで、in vitro で本来の骨髄内造血巣に近い環境を再現することができれば、従来法より効率的に造血幹細胞を増幅できるのではないかと考えた。本研究は、造血支持細胞と造血幹細胞による新規3次元体外培養システムを開発し、より効率的にヒト造血幹細胞の体外増幅することを目的とした。

B. 研究方法

Poly (N-isopropyl acrylamide) (PIPAAm) を重合させることにより温度に応答して細胞の接着性を変化させる培養皿（東京女子医大先端生命科学研究所の岡野光男教授らが開発）を用いて、造血幹細胞と造血支持組織の三次元培養系の開発を試みた。具体的には造血支持細胞の間に造血幹細胞を組み入れ、三次元的に培養するために、まず造血支持細胞を細胞シート化することを試みた。すなわち、温度応答性培養皿を用いて造血支持細胞をシート化し、重層培養できるかを検討した。次に造血支持細胞（ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた）と造血幹細胞（臍帯血由来 CD34 陽性細胞）を交互に重ねることで三次元培養系を構築し、その培養系が造血幹細胞を増幅しうるかについて、long-term culture-initiating cell (LTC-IC) アッセイ法を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

臍帯血の提供はあらかじめ文書を用いて説明を行い、同意を得た上で受けた。胎盤娩出後、臍帯静脈血を採取した。

C. 研究結果

造血支持細胞を温度応答性培養皿で培養し、培養温度を 37°C から 20°C へ変化させることにより、細胞をシート状に取り出すことが可能であった。シートとして取り出した造血支持細胞は別の培養皿に移してもさらに、継代培養が可能であった。次に、96 well plate で造血支持細胞を confluent に培養した上に CD34 陽性細胞を播種し、数日後にその上に造血支持細胞シートを重ねた。この状態で 5-6 週間の LTC を行ったのち、メチルセルロース培地に移して、LTC-IC を検討した。その結果、LTC-IC は、単に造血支持細胞の上で培養した場合と比較して、10 倍以上に増加していた。以上より、本研究で用いた三次元培養法は、造血幹細胞の体外増幅を高める可能性が示唆された。現在、種々の造血支持細胞を用いて、そのシート化を試みると共に、その造血幹細胞に対する体外増幅能の検討を進めている。

D. 考察

本研究で用いた三次元培養法は、LTC-IC を増幅できることから、造血幹細胞の体外増幅に有用な培養系であると考えられる。本培養法は従来行われてきた共培養方法に比べ、本来の骨髄内造血巣により近い環境を再現していると考えられ、造血幹細胞を効率よく増幅できるのではないかと推測する。今後は NOD/SCID マウスに移植して SRC assay (SCID mouse repopulating cell assay) を行い、SRC のレベルでも確実に増幅が可能であることを検討する予定である。また、本三次元培養法において、どの造血支持細胞が最も適しているのかについて検討し、最終的には、auto の造血支持細胞を用いた三次元培養法を構築することにより、臨床応用が可能なものとしていきたいと考えている。

E. 結論

本研究で開発中の三次元培養法は、ヒト造血幹細胞の体外増幅に有用である可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, Shimizu K, Nakamura S, Ruddle Fh, Hirai H.	Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells.	Proc Natl Acad Sci U S A	100	15577-15582	2003
Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H.	Notch1 but Not Notch2 Is Essential for Generating Hematopoietic Stem Cells from Endothelial Cells.	Immunity	18	699-711	2003
Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H. 18:	Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development.	Immunity	18	675-685	2003
Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M.	AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis.	Nat Med	10	299-304	2004

20030870

以降 P8-P43までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P7「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください