

1

骨髓多能性幹細胞

安藤 潔

東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科

成体骨髓に多能性幹細胞が存在することが報告され、multipotent adult progenitor cell (MAPC) と名づけられている。マウスのMAPCは胚盤胞に注入すると三胚葉にわたるほとんどすべての組織細胞に分化し、また経静脈投与すると造血系、肝、肺、腸管など生着した臓器環境に応じて分化した。さらに特筆すべきは、ES細胞にみられるような腫瘍化がMAPCでは認められないこと、またES細胞は経静脈的に投与しても生着しないがMAPCでは生着し骨髓で自己複製しつつ生着環境に応じて分化することである。これらは、倫理的問題を抱えるES細胞に代わって再生医療への応用に期待を抱かせるMAPCの特質である。

Keywords hematopoietic stem cell, mesenchymal stem cell (MSC), mesodermal progenitor cell (MPC), multipotent adult progenitor cell (MAPC), plasticity

骨髓細胞を用いた臓器再生

近年、骨髓由来の細胞が血液以外のさまざまな系譜 (lineage) の細胞に分化することがマウスのみならずヒトでも報告され、注目を集めている (図1)。以下にまずそれらの報告を概説する。これらの現象は骨髓内のどの細胞によりもたらされているのであろうか。これらの細胞の能力を利用すれば、倫理性や同種移植の壁が問題となる胚性幹細胞 (ES細胞) を利用することなく、再生医療が可能となることが期待される。したがって、骨髓に存在する各種組織幹細胞、あるいは多能性の幹細胞を同定することはきわめて重要である。現状ではこれらの現象の解釈として、① 各種組織特異的幹細胞が骨髓に存在する、② 骨髓に多

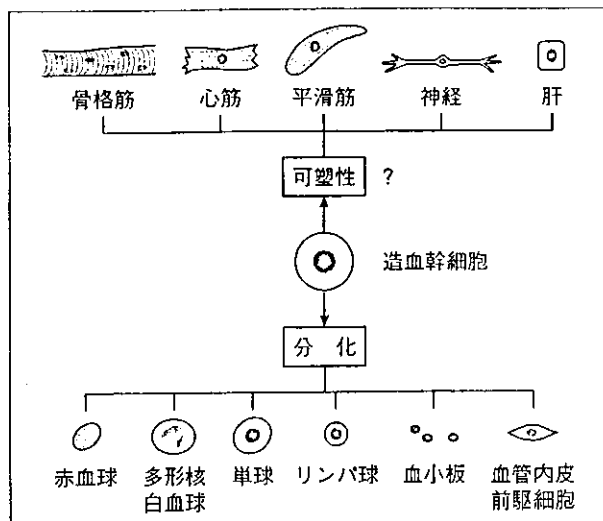


図1 造血幹細胞の分化と形質転換 (可塑性)

数存在する造血幹細胞が可塑性を示して他の組織細胞に分化転換する、③ 多能性幹細胞が骨髓に

Bone marrow multipotent adult progenitor cells

Kiyoshi Ando

Division of Hematology/Oncology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokai University

存在する、という3つの可能性が考えられる。これらの可能性について検討することが本稿の目的である。

1. 各種臓器再生の報告例

1) 骨髄細胞による骨格筋再生

Ferrariらは1998年に、骨髄由来の筋前駆細胞により骨格筋再生が起こることを示した¹⁾。Pittengerらにより報告されている骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell ; MSC) は骨格筋細胞になることが示されているので²⁾、再生現象はMSCによるものである可能性が考えられた。一方、骨髄にはHoechst 33342という蛍光色素を細胞外に排泄する能力の高いsp (side population) 細胞と呼ばれる一群の細胞が存在し、造血幹細胞を高頻度に含むことが報告されていた³⁾。Gussoniらは正常マウス骨髄中のsp細胞を筋ジストロフィーモデルマウス (mdxマウス) に移植すると骨格筋に分化することを報告した⁴⁾。そこで彼らは造血幹細胞が骨格筋細胞に分化 (形質転換) したものと推測し、以後一連の造血幹細胞可塑性ブームを引き起こした。ここで用いられたsp細胞はLin⁻Sca-1⁺c-kit⁺CD43⁺CD45⁺CD34⁻の表面マーカーを示しており、確かにOsawaらの示したマウス造血幹細胞のマーカーと一致する⁵⁾。しかしながら骨格筋の場合、元来細胞融合を起こして多核化する細胞であるので、ドナー造血幹細胞がレシピエント骨格筋細胞と融合する可能性も考慮する必要がある。

2) 骨髄細胞による心筋再生

Dexter培養により樹立したマウス骨髄由来細胞が*in vitro*で心筋細胞になることが、1999年にFukudaらのグループにより報告された⁶⁾。その後TomaらもヒトMSCをマウス心筋内に注入する実験により、*in vivo*でMSCが心筋細胞になる可能性を示している⁷⁾。一方Orlicらは、骨髄Lin⁻c-kit⁺細胞を心筋梗塞部位に直接移植したところドナー由来細胞による心筋再生が起こること⁸⁾、さらに心筋に分化可能な細胞はサイトカインにより動員される可能性を報告した⁹⁾。彼らは造血幹細胞

が心筋細胞に分化したと考えている。また骨髄sp細胞を心筋虚血マウスに経静脈的に投与すると、ごくわずかではあるが心筋に分化することが報告されている¹⁰⁾。

3) 骨髄細胞による血管再生

血管内皮細胞と血液細胞は、胎生期にはともにhemangioblastという共通の細胞から由来することが示されている。1997年にAsaharaらは成人末梢血中に血管内皮細胞の前駆細胞を見出し、これらの細胞により成体においても脈管形成 (vasculogenesis) が起こることを示した¹¹⁾。この細胞を血管前駆細胞 (endothelial progenitor cell ; EPC) と名づけた。その後、EPCは骨髄由来であること¹²⁾、サイトカインやホルモンなどにより末梢に動員されることを示した¹³⁾。2002年にGrantらは単一の造血幹細胞 (Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺細胞) を移植したマウスで造血再構築と同時にドナー由来EPCも再生されることから、EPCが造血幹細胞由来であることを示した¹⁴⁾。今後、造血幹細胞の分化系譜の一員として血管内皮細胞が位置づけられることとなるのであろう。ただし、血管新生モデルにおいて血管新生に参画している細胞が、長期間の恒常的血管維持も担っているか否かは不明である。また、新生血管を構成する内皮細胞にはドナー由来でない細胞も含まれている。したがって、血管内皮細胞になりうる細胞ソースは複数存在する可能性も残されている。実際に、後に述べるように、EPCはMAPCに由来するという報告¹⁵⁾や組織幹細胞から血管内皮細胞が発生するという報告¹⁶⁾もある。

一方、血管内皮細胞のみならず血管平滑筋細胞も骨髄由来であることがマウス骨髄移植モデルを用いて示された¹⁷⁾。さらにSataらはLin⁻Sca-1⁺c-kit⁺の造血幹細胞が*in vitro*および*in vivo*で血管平滑筋細胞に分化すると報告している¹⁸⁾。これで造血幹細胞は骨格筋、心筋、平滑筋と3種類の筋細胞に分化することが報告されたわけである。

4) 骨髄細胞による神経再生

脳のマクログリア細胞が造血細胞由来であるこ

とは以前より知られていたが、2000年にBrazeltonらのグループとMezeyらのグループは、骨髄移植マウスを用いてドナー由来の細胞が脳内に移行してニューロンに分化することを報告した^{19, 20}。この実験では骨髄のどの細胞がニューロンに分化するのかは不明である。

5) 骨髄細胞による肝再生

1999年にPetersenらは骨髄移植ラットの四塩化炭素肝障害モデルで、肝再生の幹細胞と考えられている卵円細胞 (oval cell) がドナー由来であることを示した²¹。その後、Lagasseらは遺伝性チロシン血症1型のモデルマウスで肝不全を発症し死亡するFAH (fumarylacetoacetate hydrolase) 欠損マウスに、純化した骨髄造血幹細胞 ($\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{Thy-1}^{\text{low}}$ 細胞) を移植するとドナー由来の細胞から肝細胞が再生し、肝機能を改善させることができたことを報告した²²。

6) ヒト造血幹細胞移植におけるドナー由来非造血細胞

マウスを用いた実験によって以上のような結果が得られているが、ヒト造血幹細胞移植においても移植細胞がレシピエント内でさまざまな組織細胞に分化していることが報告されている。

1999年にHorwitzらは、3例の骨形成不全症 (osteogenesis imperfecta) 患児への骨髄移植後の解析によりドナー由来の骨芽細胞を証明し、その後の患児の骨成長に貢献していることを報告した²³。これは骨髄中のMSCが移植可能であることを示した最初の報告であった。Theiseらは男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植2例および女性ドナーから男性レシピエントへの肝移植4例で肝のY-FISHを行った。全例でY-FISH陽性の肝および胆管上皮細胞を認め、これらは骨髄細胞由来と考えられた²⁴。また、Korblingらは男性ドナーから女性レシピエントへの末梢血幹細胞移植6例を解析し、末梢に動員された幹細胞でも数パーセントのドナー由来の肝細胞、皮膚表皮細胞、腸管上皮細胞を認め、末梢に動員された幹細胞も多能性を示す可能性を報告した²⁵。また

Okamotoらは同じく男性ドナーから女性レシピエントへの骨髄移植4例を解析し、移植片対宿主疾患 (graft versus host disease ; GVHD) や潰瘍形成などの消化管障害に際してドナー由来の腸管上皮再生が認められることを報告した²⁶。

以上のように、ヒトにおいても骨髄由来の細胞が肝、胆管上皮、皮膚、腸管上皮などさまざまな組織細胞に分化することが示されている。

2. 造血幹細胞の可塑性の根拠

以上の報告をまとめると、胎生期に共通の幹細胞 (ヘマンジオブラスト) をもつ血管内皮細胞は別として、骨格筋、心筋、血管平滑筋、肝などの細胞が造血幹細胞の可塑性により分化することになる。これらの解釈は最終的にはクローナルな造血再構築宿主 (1個の造血幹細胞を移植して造血再構築した宿主) において、ドナー由来の各種組織細胞を同定することによりはじめて証明される。このような報告が2001年にKrauseらによりなされた。このグループは以前よりエルトリエーションを利用してあるフラクション (Fr25) に造血幹細胞を濃縮できることを報告してきたが²⁷、今回もそのようにして得た幹細胞が個体内で早期に骨髄にホーミングすることを利用して幹細胞を純化している。

すなわちFr25細胞をPKH26という蛍光色素でラベルしてマウスに移植し、48時間後に骨髄から回収したPKH26陽性細胞を1個ずつ30匹のマウスに2次移植した。このようにして造血再構築した5匹のマウスのドナー由来細胞をY-FISHにより追跡して、肺、食道、胃、小腸、大腸、腎、胆管、皮膚組織にドナー由来細胞を見出した²⁸。これらのドナー由来細胞はそれぞれの組織特異的マーカーを発現していたので、骨髄由来の造血幹細胞が各組織細胞に分化したと結論された。以後、造血幹細胞の可塑性をクローンレベルで証明した論文として引用されている。ただし、この研究では骨髄に早期にホーミングした細胞の表面マーカーなどの詳細な検索が行われていないので、これらの細胞が従来から同定されている $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+$

c-kit⁺ CD45⁺ CD34⁻などの造血幹細胞と同じものか否かは不明である。

3. 造血幹細胞の可塑性に対する疑義

一方、組織幹細胞の可塑性という解釈に対して慎重さを要求するような実験結果も報告されている。Goodellらは1999年に、骨格筋に存在するsp細胞が造血幹細胞としての能力をもつことを示し、骨格筋サテライト細胞が造血幹細胞に形質転換したと報告したが²⁹⁾、その後Kawadaらは移植実験により筋肉組織に存在する造血再構築能は異所性に筋肉にとどまっていた骨髄由来の造血幹細胞により担われていることを示し、可塑性の可能性を否定した³⁰⁾。

Teradaらは、骨髄細胞をES細胞と共培養することによりES細胞と同等の多分化能を獲得させることができたが、染色体分析を行ってみると二倍体になっており、多分化能の獲得が細胞融合の結果であることを報告した³¹⁾。細胞融合したのが造血幹細胞か否かは明らかではないが、元来骨髄細胞に含まれる単球・マクロファージが細胞融合することは知られており、その際にドナー細胞の遺伝子マーカーがレシピエントに移行することは十分ありうる。以後、造血幹細胞の可塑性を示すためには融合を否定するデータが必要とされるようになった。なお、可塑性のようにみえた現象がたとえ細胞融合によるものであったとしても、たとえばOrlicらの報告⁸⁾のように心筋梗塞後の心機能が改善したりするのであれば、それは医療としては意味のある現象である。

さらにWagersらは造血幹細胞の可塑性の生理的意義を検討するために、1個の造血幹細胞(c-kit⁺Thy1.1^{low}Sca-1⁺Lin⁻細胞)を移植して造血再構築したマウスで各組織のドナー由来細胞を調べた³²⁾。脳では1,320万分の1、肝では47万分の7の頻度でドナー由来の各組織細胞が認められたが、腎、腸、骨格筋、心筋、肺ではまったく認められなかった。この頻度は先に報告された細胞融合現象によっても説明可能な頻度である。また、末梢循環している多能性幹細胞の意義を検討する

ために、血管吻合により互いに循環交流可能なパラビオーシスのマウスを作製して各組織のドナー由来細胞を調べた。結果はいずれの組織でもドナー由来の各組織細胞は認められなかった。この実験により少なくとも恒常的な状態の個体においては造血幹細胞の可塑性、末梢循環血中の多能性幹細胞の組織維持への関与はほとんどないことが示された。今後は同様のモデルを用いて組織障害時の組織修復過程への関与が検討される必要がある。

骨髄多能性幹細胞

一方で骨髄移植モデルによるドナー由来の組織細胞の由来として、骨髄に存在する多能性幹細胞の存在が報告されている。

1. ヒト骨髄多能性幹細胞

骨、軟骨、脂肪、骨格筋、靭帯、腱など、発生学的に肢芽中胚葉(limb bud mesoderm)あるいは沿軸中胚葉(paraxial mesoderm)由来の細胞に分化する幹細胞として間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)が骨髄に存在することが報告されている^{2,33)}。2001年にVerfaillieらは、これらの分化能に加えて臓側中胚葉(visceral mesoderm)由来の血管内皮細胞にも分化する能力のある細胞として中胚葉系前駆細胞(mesodermal progenitor cell; MPC)をヒト骨髄より分離したことを報告した³⁴⁾。さらにその後、同グループはこの細胞が外胚葉由来の神経細胞³⁵⁾、内胚葉由来の肝細胞³⁶⁾にも分化することを報告し、multipotent adult progenitor cell (MAPC)と命名している。以下にこれらの報告を概説する。

MPCは、ヒト骨髄のCD45⁻glycophorinA⁻細胞を2%FCS(fetal calf serum, ウシ胎仔血清)、EGF(上皮増殖因子, 10 ng/mL)、PDGF(血小板由来増殖因子)-BB(10 ng/mL)存在下に5~10×10³/cm²の細胞密度で30継代以上培養することによって得られた³⁴⁾。MPCの骨髄単核細胞における頻度は1/10⁶であった。これらの細胞は骨、軟骨、脂肪、骨格筋細胞だけでなく血管内皮

細胞にも分化可能であった。MPCは10% FCS存在下や高細胞密度で培養すると血管内皮細胞への分化能を失った。

このMPCを脳梗塞ラットに移植することにより、アストログリア、オリゴデンドログリア、ニューロンのマーカーをもつそれぞれの神経細胞に分化することが観察された³⁵⁾。したがって、MPCは外胚葉由来の神経細胞に分化可能であり、中胚葉を超える分化能をもつためMAPCと命名された。

またMAPCからEPCが、*in vitro*で分化する過程が詳細に解析されている¹⁵⁾。MAPCをconfluent ($2 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度)の状態VEGF (血管内皮細胞増殖因子, 10 ng/mL)存在化に無血清培地で培養すると、幹細胞マーカーであるAC133は培養3日以後消失し、血管内皮マーカーであるVE-カドヘリン, Flk-1, Flt-1は3日以後発現が増強してくる。CD34は9日以後に発現し、同時にvon Willebrand因子(vWF)の発現とアセチル化LDLの取り込み能を獲得する。これらの誘導されたEPCはさらに20回の細胞分裂を繰り返すことができる。NOD/SCIDマウスを用いた*in vivo*の実験においても、腫瘍増殖および創傷治癒過程における新生血管の30~45%にヒトMAPCより由来したEPCによる血管内皮細胞を認めた。

MAPCから、機能を備えた肝細胞が*in vitro*で分化することも報告されている³⁶⁾。MAPCをconfluent ($3 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度)の状態1%マトリゲル, FGF-4 (線維芽細胞増殖因子-4, 10 ng/mL), HGF (幹細胞増殖因子, 20 ng/mL)存在下に無血清培地で培養すると、種々の肝細胞マーカーが発現し、尿素あるいはアルブミン産生、フェノバルビタールによるシトクロムP-450活性化、アセチル化LDLの取り込み、グリコーゲン顆粒の産生などの機能を有する肝細胞が分化した。

以上より、ヒトMAPCは沿軸中胚葉由来の細胞の幹細胞としてのMSCの多分化能に加えて、臓側中胚葉由来の血管内皮細胞、外胚葉由来の神

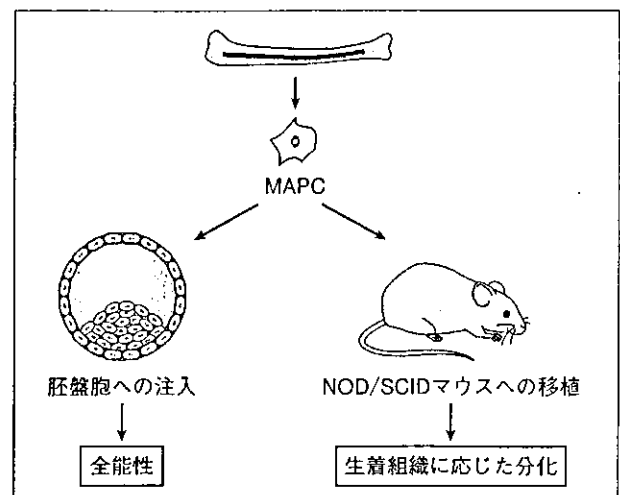


図2 マウス骨髄多能性幹細胞 (MAPC)
MAPCは*in vivo*で全能性を示した。

経細胞、内胚葉由来の肝細胞に分化することがクローンレベルで詳細に解析された。しかしながら、ヒト細胞を用いる限り*in vivo*の実験ができないという制約があり、これ以上の検討は困難であった。

2. マウス、ラット骨髄多能性幹細胞の同定

ヒトMAPC (hMAPC)の培養条件を参考にして、最近マウスMAPC (mMAPC)とラットMAPC (rMAPC)が分離された³⁷⁾(図2)。mMAPCはhMAPC培養条件に加えてLIF (leukemia inhibitory factor)が必要であった。すなわち、2% FCS, EGF (10 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL), LIF (10 ng/mL)存在下にマウス骨髄単核球細胞をフィブロネクチンコートした培養プレート上で培養した。3~4週後にCD45⁻Ter119⁻細胞を分離してクローニングを行い、以後細胞密度を $0.5 \sim 1.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ に維持しつつ長期培養しmMAPCを得た。この細胞はHayflic life spanを超えて120継代以上培養可能であった。はじめに*in vitro*での分化誘導培養により多分化能を検討した。VEGF-B存在下に培養すると血管内皮細胞に、βFGF存在下に培養するとアストログリア、オリゴデンドログリア、ニューロンに、FGF-4, HGF存在下に培養すると肝細胞にそれぞれ分化した。

次に、ヒトでは十分に調べることのできない*in vivo*での多分化能について検討した。驚くべきこ

とに、1個のMAPCを注入した胚盤胞に由来するマウスの7/15匹で、MAPC由来の細胞が個体形成に参加していた。さらにそのなかの2匹では40%以上のキメリズムを示しており、生殖細胞を除くすべての組織に分化していた。生殖細胞への分化はこのキメラマウスの子孫を得る実験を行っていないので不明である。

さらに細胞療法への応用を考えて、 10^6 個のMAPCを放射線照射あるいは非照射NOD/SCIDマウスに経静脈的に投与した。その結果、数パーセントのキメリズムであるが、造血系、肝、肺、腸管などMAPCが生着した臓器環境に応じて分化することが示された。骨格筋、心筋、神経など細胞回転のない組織ではドナー由来の細胞は認められなかった。また、皮膚、腎でもドナー由来の細胞は認められなかった。MAPCの自己複製能をみるためにこれらのマウスの骨髄細胞を用いて2次移植を行ったところ、1次移植と同様各種組織に分化することが示された。このようにMAPCはES細胞とほぼ同等の分化能を示していた。特筆すべきは、ES細胞はプラストシストに注入すると奇形腫などに腫瘍化することがあるが、この実験ではMAPCの腫瘍化は認められなかった。またES細胞は経静脈的に投与しても生着することはなく、組織環境に応じて分化することもない。

以上のように、ほぼ全能性の細胞が成体の骨髄より分離された。このことにより、骨髄移植によるドナー由来の各種組織細胞の由来が説明できるのだろうか。新たに多くの疑問も生じる。MAPCの分離が低細胞密度での長期間培養による選択に依存しているため、培養操作による細胞形質の変化がMAPCを生み出す可能性がある。たとえば本来MSCであったものが、長期培養の過程で染色体のリモデリングによる遺伝子発現調節領域の修飾の変化をきたし、多分化能を獲得した可能性も考えられる。表面マーカーやsp形質などを利用して、MAPC分画を濃縮するなどの工夫によりMAPCをプロスペクティブに同定する努力が必要である。次にMAPCが生体内に存在するのであ

れば、その本来の機能は何なのか、由来は何なのか、成体の組織修復に関与しているのだろうか、そのためには末梢へ動員されているのだろうか、成体で造血幹細胞はMAPCから由来しているのだろうか、興味はつきない。

3. 骨髄多能性幹細胞の再生医療への応用

ES細胞と異なり倫理的問題のないこと、造腫瘍性の示されていないこと、生着環境に応じて分化することなど、MAPCの再生医療への応用は期待が大きい。しかし一方で、その前に解決しなければならない問題も多い。まずmMAPCやrMAPCで示されたような多分化能がhMAPCでも示されるのだろうか。特にヒト細胞では*in vivo*の分化能を確認することが困難である。また、加齢によりMAPCの存在頻度がどれくらい低下するのであるか。同種移植は可能なのだろうか。現状ではMAPCを得るためには長期間の培養が必要であるが、短期間に効率良くMAPCを得る技術が必要である。骨髄から末梢への動員は可能なのか。そのメカニズムは？ これらの問題が解決されればMAPCによる再生医療も実現可能となるであろう。

骨髄は特殊な環境なのか？

なぜ骨髄のなかにはこのような未分化な細胞が多種類存在するのであるか。もともと骨髄は造血幹細胞を保持する環境を提供しているわけであり、幹細胞性(stemness)を維持する装置を備えていることが示唆される。それが具体的に何なのかは明らかではないが、造血幹細胞は骨髄ストローマ細胞と細胞間相互作用しながら細胞周期の静止期を維持していることなどが、幹細胞性の維持と密接に相関していることが推測される。一方、MAPCの実験からは組織環境に応じて幹細胞が分化することが示されている。今後、幹細胞性の維持および組織特異的な分化を誘導する環境因子(niche, ニッチ)の分子機序を解明することが、再生医学領域の最大のテーマとなるであろう(図3)。

一方筆者らは骨格筋間質にも筋、脂肪、血管な

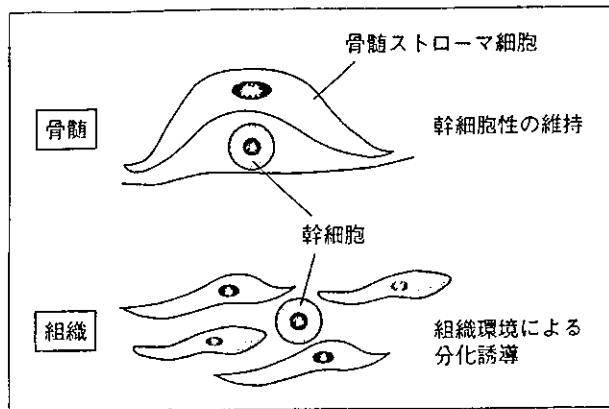


図3 幹細胞を維持する骨髄環境と特異的分化を誘導する組織環境

骨髄には幹細胞性を維持する環境（ニッチ）が存在し、各組織には分化を誘導する環境（ニッチ）が存在する。

どの多能性を有する CD34 陽性の幹細胞が存在し、この細胞を筋障害モデルに移植すると血管新生を伴う筋組織の再生が起こることを示した¹⁶⁾。同様に皮膚結合組織にも CD34 陽性幹細胞が存在することが示されている³⁸⁾。このように、従来注目されてこなかった組織間質や結合織にさまざまな多能性幹細胞が存在している可能性がある。またMAPCも骨髄以外に骨格筋、脳からも分離可

能であることが最近報告された³⁹⁾。したがって、幹細胞性を維持する装置は骨髄以外にも組織間質などに存在していると考えられる。

今後の展望

造血幹細胞のソースと考えられていた骨髄にさまざまな幹細胞が存在することが示されるようになり、骨髄移植療法に新たな光が当たりつつある。すなわち、従来造血疾患や先天性代謝疾患を対象としていた骨髄移植療法の適応が、血管、循環器、肝疾患などさまざまな領域の再生治療法として広がる可能性がある。したがって、今後これらの細胞の形質、存在意義などを基礎づけることが重要な研究分野となっていくであろう。また、骨髄に存在するそれらの幹細胞が成体の維持に役割を果たしているのであれば、当然末梢循環に動員されて組織にたどりつくはずであるから、造血幹細胞だけでなくさまざまな幹細胞が動員される可能性とそのメカニズムについて検討することが、より侵襲の少ない再生医療法開発に結びつくであろう。

文献

- 1) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-30 (1998)
- 2) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7 (1999)
- 3) Goodell M, Rosenzweig M, Kim H et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* **3**, 1337-45 (1997)
- 4) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4 (1999)
- 5) Osawa M, Hanada K, Hamada H & Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-4 (1996)
- 6) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* **103**, 697-705 (1999)
- 7) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ & Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93-8 (2002)
- 8) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5 (2001)
- 9) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10344-9 (2001)

- 10) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402 (2001)
- 11) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7 (1997)
- 12) Asahara T, Chen D, Takahashi T et al. The Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233-40 (1998)
- 13) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **4**, 434-8 (1999)
- 14) Grant MB, May WS, Caballero S et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemoangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* **8**, 607-12 (2002)
- 15) Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* **109**, 337-46 (2002)
- 16) Tamaki T, Akatsuka A, Ando K et al. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* **157**, 571-7 (2002)
- 17) Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med* **7**, 738-41 (2001)
- 18) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* **8**, 403-9 (2002)
- 19) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI & Blau HM. From marrow to brain : Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9 (2000)
- 20) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA & McKercher SR. Turning blood into brain : Cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82 (2000)
- 21) Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-70 (1999)
- 22) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* **6**, 1229-34 (2000)
- 23) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* **5**, 309-13 (1999)
- 24) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-6 (2000)
- 25) Korbling M, Katz RL, Khanna A et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* **346**, 738-46 (2002)
- 26) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* **8**, 1011-7 (2002)
- 27) Lanskrone SM, Collector MI & Sharkis SJ. Hematopoietic stem cell tracking *in vivo* : A comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood* **93**, 1916-21 (1999)
- 28) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-77 (2001)
- 29) Jackson KA, Mi T & Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14482-6 (1999)
- 30) Kawada H & Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* **98**, 2008-13 (2001)
- 31) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-5 (2002)
- 32) Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL & Weissman IL. Little evidence for developmental plas-

- ticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297**, 2256-9 (2002)
- 33) Fridenshtein AIa. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* **44**, 3-11 (1982)
 - 34) Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-25 (2001)
 - 35) Zhao LR, Duan WM, Reyes M et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* **174**, 11-20 (2002)
 - 36) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109**, 1291-302 (2002)
 - 37) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-9 (2002)
 - 38) Young HE, Steele TA, Bray RA et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* **264**, 51-62 (2001)
 - 39) Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* **30**, 896-904 (2002)

Eradication of adult T-cell leukemia cells and maintenance of remission by the graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation

Kaoruko OTA¹, Satoshi HASHINO¹, Ken-ichi SHIMIZU¹, Masakatsu YONEZUMI¹, Koji CHIBA¹, Takeshi KONDO¹, Sachiko SUZUKI², Masahiro IMAMURA³ and Masahiro ASAKA¹

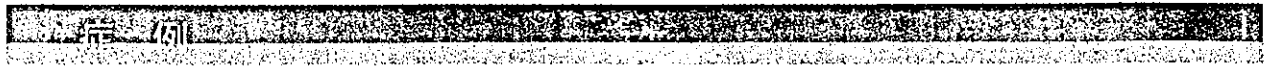
¹ Department of Gastroenterology and Hematology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

² Division of Internal Medicine, Hakodate Chuou Hospital

³ Department of Hematology and Oncology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

Key words : Adult T-cell leukemia, Graft-versus-leukemia effect, Allogeneic bone marrow transplantation

A 44-year-old man was referred to Hakodate Chuo Hospital because of progressive fatigue in April 2001, and was diagnosed as having adult T-cell leukemia (ATL; acute type). Complete remission was not obtained even with the application of multiple anti-leukemic agents including CHOP-V-MMV. The patient received an allogeneic bone marrow transplant from his HLA-identical, HTLV-I antibody-negative sibling donor in June 2002. The conditioning regimen consisted of cyclophosphamide, etoposide and total body irradiation. Cyclosporine A and a short course of methotrexate were given as prophylaxis for graft-versus-host disease (GVHD). Engraftment was achieved on day 16, while ATL cells were detected in the peripheral blood throughout the transplantation. ATL cells were also detected in bone marrow on day 20. Withdrawal of the immunosuppressant induced the eradication of the residual ATL cells in the peripheral blood on day 24 and in the bone marrow on day 40. Grade III of acute GVHD developed in the bowel on day 40, which lasted for over 5 months and was gradually resolved by administration of prednisolone and tacrolimus. The patient remains in complete remission 23 months after the transplantation. The clinical consequence of our case clearly shows that a graft-versus-leukemia (GVL) effect combined with graft-versus-host disease (GVHD) plays a curative role even in an early phase after bone marrow transplantation for patients with adult T-cell leukemia. (Jpn J Clin Hematol 45 (9) : 1044 ~ 1047, 2004)



転移性乳癌に合併した骨髄異形成症候群症例に対し 施行した体外増幅を併用した臍帯血移植

沖 将行¹, 安藤 潔^{1,2}, 中島 光¹, 中野好章¹,
板垣浩之², 中塩屋千絵², 加藤俊一², 堀田知光^{1,2}

臍帯血移植の成人例への適用は移入細胞数不足により限定されている。われわれはマウス骨髄ストローマ細胞株 HESS-5 細胞を利用して臍帯血 CD34 陽性細胞を体外増幅するシステムを開発し、その安全性と有効性を確認するための臨床 I/II 相試験を開始した。転移性乳癌に骨髄異形成症候群を合併した 52 歳女性に対し、骨髄非破壊的前処置後に体外増幅細胞を併用した臍帯血移植を施行した。臍帯血細胞の 75% は未処置のまま第 0 日に輸注した。移植片の 25% は体外で CD34 陽性細胞を純化し、TPO, SCF, Flk2Flt3 ligand (FL) を含む無血清培地を用いて HESS-5 細胞上で 5 日間培養した後、第 5 日に輸注した。患者は移植後 37 日目に肺炎、移植後 48 日目に脳出血を合併し、移植後 50 日目に死亡した。体外増幅細胞輸注に伴う急性の有害事象は認められなかった。染色体検査でドナー造血が認められたが、血液学的生着は確認されなかった。
(臨床血液 45 (9):1048 ~ 1052, 2004)

Key words : *ex vivo* expansion, Cord blood transplantation, Nonmyeloablative transplantation

緒 言

臍帯血は近年造血幹細胞移植のソースとして利用され、小児例のみならず成人例へも適応されるようになってきた^{1~7}。骨髄、末梢血幹細胞移植と比較して移植片対宿主病の頻度が低く HLA2 抗原不一致まで利用可能であり、凍結保存されているので迅速に移植できる利点がある。一方、生着の遅延と成人例には移植細胞数が不足することが欠点である^{1,5,7}。また移植後の免疫能低下、移植片対白血病効果減弱が懸念されている⁸。前者の問題を解決するため、臍帯血前駆細胞・幹細胞を体外で培養し増幅する試みが行われている⁹。われわれはマウス骨髄ストローマ細胞株である HESS-5 細胞を利用して臍帯血 CD34 陽性 (CD34⁺) 細胞を体外増幅するシステムを開発した (Fig. 1)^{9,10}。この系では Thrombopoietin (TPO), Stem cell factor (SCF), Flk2Flt3 ligand (FL) 存在下に無血清培地で培養すると 5 日間に CD34⁺ 細胞で 15 倍, CFC (colony-forming cell) で 30 倍, 定量的 SCID mouse-Repopulating Cells アッセイで 10 倍に増幅された。HESS-5 細胞は CD34⁺ 細胞と膜で隔離され互いに混入すること

はないが、0.45 μ m の小孔を介して接触することは可能になっている。既に海外では培養皮膚細胞移植、遺伝子治療などでマウス細胞と接触したヒト細胞が利用されており、HESS-5 細胞の安全性もこれらと同様に米国 FDA 基準に準拠して確認された。そこで本システムによる培養臍帯血細胞を用いた「体外増幅幹細胞の安全性と有効性に関する臨床試験」を計画し、プロトコルが 2000 年 2 月学内倫理委員会の承認を得た。体外増幅臍帯血移植の概略は Fig. 2 に示す。今回われわれは転移性乳癌を合併した骨髄異形成症候群 (MDS) 症例に対し本プロトコルを施行したので臨床経過を報告する。

症 例

患 者 : 52 歳, 女性。

主 訴 : 血小板減少。

現病歴 : 1986 年右乳癌発症し右乳房切除術および計 44 Gy の放射線療法を右腋窩リンパ節に対し施行され、以後無治療で経過していた。2001 年 8 月血小板減少を認め当院に紹介された。CT にて脾臓、腸骨への転移再発が疑われた。骨髄検査にて乳癌細胞の浸潤と血液細胞の 3 系統の形態異常、骨髄芽球の増加 (7.3%) を認め、乳癌の骨髄転移および MDS と診断された。骨髄細胞の染色体検査で +8 を認めた。2001 年 10 月 31 日当科に入院した。

既往歴 : 37 歳時乳癌。44 歳時糖尿病, 48 歳時よりインスリン導入。

受付 : 2004 年 2 月 18 日

受理 : 2004 年 7 月 15 日

¹ 東海大学医学部血液・腫瘍内科

² 東海大学病院細胞移植・再生医療科

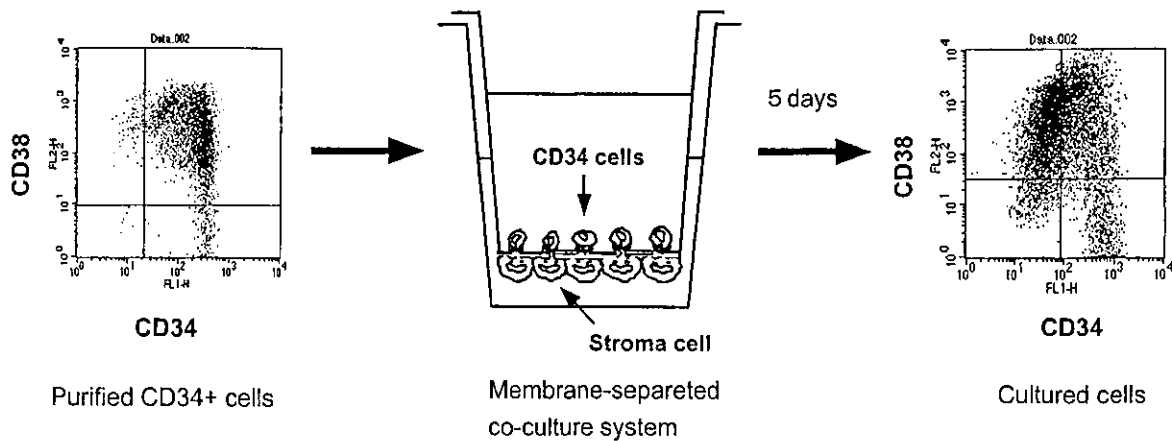
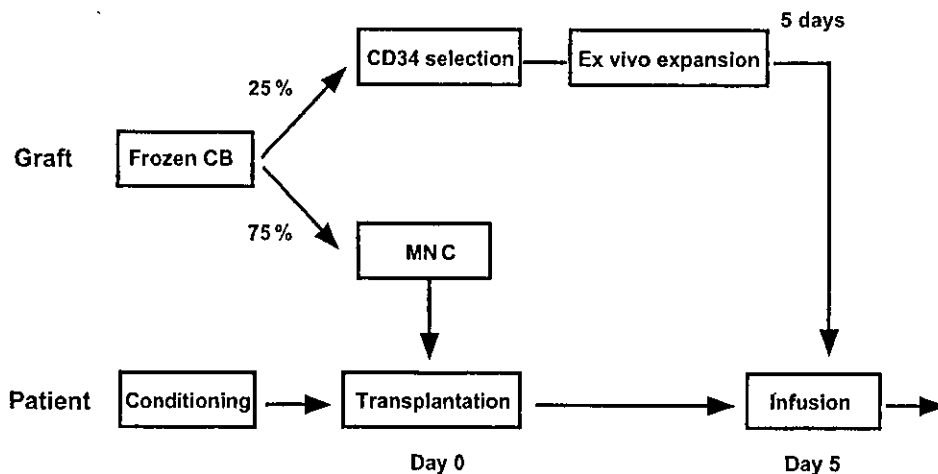
Fig. 1 System for ex-vivo expansion of cord blood CD34⁺ cells

Fig. 2 Protocol for ex vivo expanded CBT

家族歴：特記事項なし。

入院時現症：身長 155cm, 体重 39kg, 意識清明, 血圧 94/58 mmHg, 脈拍 114 /分整, 体温 36.2°C, 貧血黄疸なし, 心肺雑音なし, 肝脾腫なし, 下腿浮腫なし, 神経学的異常所見なし。

入院時検査所見 (Table 1)：末梢血で軽度の白血球減少, 貧血, および著明な血小板減少を認め, 凝固時間の延長は認めなかった。生化学検査では高血糖, 胆道系酵素の上昇, LDH, CA15-3, CEA 高値を認めた。末梢血スメアでは Howell-Jolly 小体, Pappenheimer 小体, 巨大血小板を認め, 骨髓検査は低形成で外来で認められた芽球の増加はなかったが, 多核赤芽球, 巨赤芽球様変化を認め, MDS (不応性貧血) と診断された。VitB12, 葉酸は正常値で, 鉄染色では環状鉄芽球は認めなかった。

入院後経過：ホルモン受容体陽性の転移性乳癌に対しアロマターゼ阻害薬を開始した。MDS と転移性乳癌をと

もに加療し得る造血幹細胞移植を検討した。血縁およびバンクにドナー候補がいなかったため臍帯血移植を選択した。HLA 抗原が 4/6 以上一致し, 細胞数 8.44×10^8 ($2.16 \times 10^7/\text{kg}$) を含む臍帯血が利用可能であった。本例は「体外増幅幹細胞の安全性と有効性に関する臨床試験」の対象として適格基準を満たすため試験について説明し, 患者および家族の同意を得た。

移植細胞プロセッシングと培養：有核細胞数 8.44×10^8 のうち, 25% に相当する 2.11×10^8 より CD34⁺ 細胞を純化し体外増幅に用いた。すなわち, 抗 CD34 抗体と反応後, 免疫磁気ビーズカラム処理 (MACS system, Miltenyi Biotec) を行い 9.00×10^5 の細胞を得た。CD34⁺ 細胞の純度は 29.75% であり, 回収率は解凍後細胞の 43.9% であった。この細胞をカルチャーインサートを利用して HESS-5 細胞と接触を保ちつつ膜隔離培養した。無血清培地中で TPO50ng/ml, SCF50ng/ml, FL50ng/ml 存在

Table 1 Laboratory findings on admission

Complete blood count		Blood Chemistry		Coagulation	
WBC	2700/ μ l	TP	6.9 g/dl	PT	11.7 sec
Seg	54.0 %	Alb	3.9 g/dl	APTT	34.9 sec
Stab	3.0	AST	36 IU/l	Fib	417 mg/dl
Ly	18.0	ALT	37 IU/l	FDP	6.84 μ g/ml
Mon	20.0	LDH	628 IU/l	Tumor marker	
Eos	1.0	Alp	866 IU/l	CA15-3	255.0 μ g/ml
Bas	1.0	GGT	279 IU/l	CEA	26.5 μ g/ml
Blasts	1.0	T. Bil	0.7 mg/dl	HbA1c 7.0 %	
		Glu	267 mg/dl		
RBC	2.62×10^6 / μ l	BUN	17 mg/dl		
Hb	8.7 g/dl	Cr	0.7 mg/dl		
Ht	26.6 %	Na	135 mEq/l		
Plt	0.4×10^4 / μ l	K	4.6 mEq/l		
MCV	101.5	Cl	97 mEq/l		
MCH	33.2	Ca	9.1 mg/dl		
MCHC	32.7	CRP	1.58 mg/dl		
Howell-Jolly bodies (+), Pappenheimer bodies (+)					
Giant platelets(+)					
Bone marrow					
: hypocellular marrow, polyerythoblasts (+), megaloblastic change(+), M/E=0.15, malignant cells (+), myeloblast 0.8%					
Karyotype					
: 47, XX, +8 (20/20)					

下に5日間培養しCD34⁺細胞で4.6倍、CFCで53.4倍の増幅を得た。(Table 2)

移植後経過(Fig. 3) : Busulfanを4mg/kg/dayで2日間、Fludarabineを30mg/m²/dayで5日間、TBI 2Gyを1日による骨髄非破壊的前処置後2002年1月29日臍帯血有核細胞数の75%に相当する 6.33×10^8 (1.62×10^7 /kg, CD34⁺細胞として 4.60×10^4 /kg, CFCとして 1.25×10^4 /kg)を移植し、培養細胞 1.23×10^7 (CD34⁺細胞として 3.09×10^4 /kg, CFCとして 1.17×10^5 /kg)を2月4日移植した。末梢血による生着は確認されなかったが、骨髄細胞の染色体検査では移植後27日、37日でそれぞれ20/20、1/1でXYのドナー由来細胞を認めた。初診時に認められた47,XX,+8の核型異常は認めなかった。骨髄所見はいずれも線維化と乳癌細胞の存在を認め、造血細胞は低形成であった。移植後37日目に右肺炎、胸水を合併し、移植後48日目に意識障害、右下肢麻痺、左共同偏視が出現し、移植後第50日に永眠された。剖検所見にて肺アスペルギルス症が確認され、乳癌細胞の浸潤は骨髄、骨、肝臓、胃、脾臓、胆嚢、心筋、肺、腎臓、膀胱、副腎、甲状腺、子宮頸部、卵巣に及んだ。骨髄は線維化を認め低形成であった。

考 察

本症例は2つの悪性疾患を合併し他に有効な治療法がない状況の中で、「体外増幅幹細胞の安全性と有効性に関

する臨床試験」を施行した一例である。臍帯血移植では移入細胞数、特にCD34⁺細胞が $1.2 \sim 1.7 \times 10^5$ /kg^{2,7)}あるいはCFCが 5.0×10^4 /kg⁸⁾以上の場合良好な生着が期待されるが、成人の場合この条件を満たすことは困難であり造血前駆・幹細胞の体外増幅が試みられる⁹⁾。われわれのマウス骨髄ストローマ細胞を利用する方法は、既存の方法と比較して効率の良いCD34⁺細胞の増幅が得られる^{9,10)}。一方、安全性に関してはFDA基準に準拠してマウス由来病原微生物の検査済みではあるが、未知の微生物感染の可能性を除くことは不可能である。従来異種移植の定義は「ヒト以外の動物に由来する生きた細胞・組織・臓器を、ヒトに移植、移入または体外灌流に用いること」(第26回厚生科学審議会先端医療技術評価部会議事録、2000年9月22日)とされていたが、本例の移植施行後2002年7月9日に上記に加えて「体外において、ヒト以外の動物に由来する生きた細胞、組織または臓器に接触したヒトの体液、細胞、組織または臓器をヒトに移植、埋め込みまたは注入すること」(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)と変更された。この指針により本臨床試験は中止した。最近ストローマ細胞の重要性を裏付けるような遺伝子mKirreが同定されており¹¹⁾、今後幹細胞増幅環境の分子基盤が明らかにされ無細胞系の造血幹細胞増幅システムが構築されることが期待される。

本例ではCD34⁺細胞の回収率が43.9%で増幅率が4.6

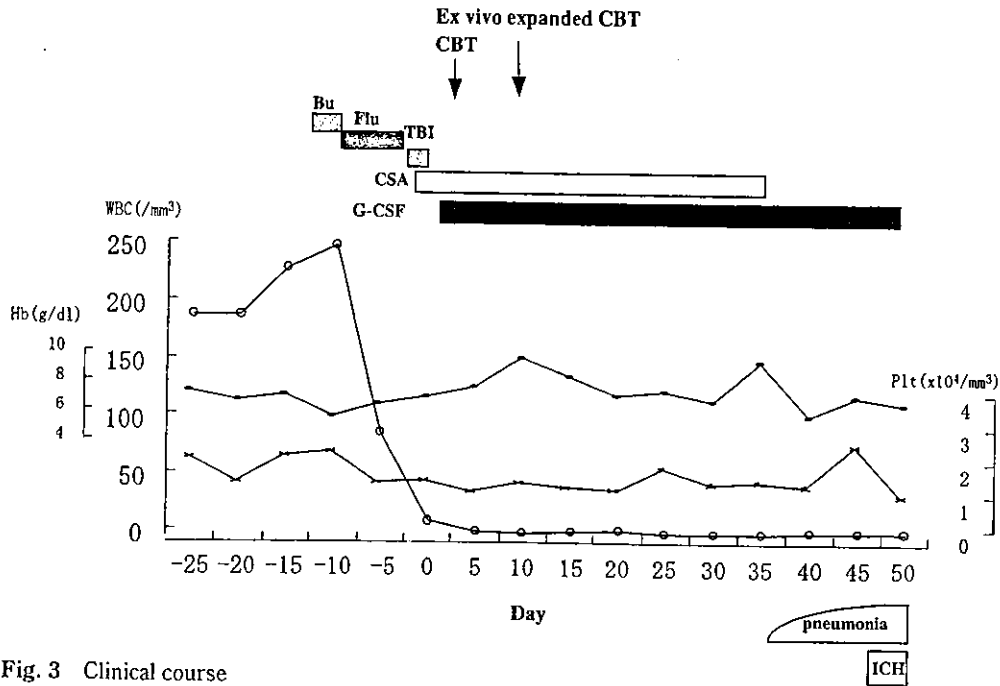


Fig. 3 Clinical course
 CBT: cord blood transplantation,
 Bu: busulfan, Flu: fludarabine, TBI: total body irradiation, CSA: cyclosporine A,
 G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor
 WBC: white blood cell (○), Hb: hemoglobin (●), Plt: platelet (×), ICH: intracerebral hemorrhage

Table 2 Ex vivo expansion of CB CD34⁺ cells

	Pre-expansion	Post-expansion
Total MNC	9.00 × 10 ⁵	1.23 × 10 ⁷
CD34 (%)	29.8	10.0
Total CD34 ⁺ cells	2.68 × 10 ⁵	1.23 × 10 ⁶
Total CFU-Mix	9.00 × 10 ³	1.85 × 10 ⁵
Total CFU-GM	4.95 × 10 ⁴	1.73 × 10 ⁶
Total BFU-E	2.70 × 10 ⁴	2.65 × 10 ⁶
Total CFC	8.55 × 10 ⁴	4.57 × 10 ⁶

倍で、最終的に 2.02 倍の増幅にとどまった。回収率および増幅率は保存臍帯血サンプル毎に異なり、前臨床段階で臨床スケールでの成績は回収率が 86.4 ± 26.6% (n = 12) で増幅率が 10.8 ± 4.0 倍 (n = 8) であった。従って増幅細胞の安全性評価を目的とする本試験では 75% の臍帯血を無処置で移植することとした。今後の同様の臨床試験でもこの点は考慮する必要があると考えられた。

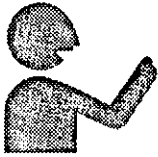
本臨床試験では悪性腫瘍の合併は除外基準ではなく、移植片対腫瘍効果も期待して本症例においては移植前処置を弱めたいわゆるミニ移植を施行した^{12,13)}。50 歳以上の患者では移植関連死亡が多く、前治療を弱めることにより治療関連死を減少させることもできる。以上の試みにも関わらず、剖検にて判明したように乳癌細胞で広範

に骨髓浸潤しており、かつ線維化も著明であったため十分な生着を認めなかったと考えられた。汎血球減少の期間が長く、肺アスペルギルス症を合併し、頻回の血小板輸血で抗血小板抗体陽性となり HLA 一致の血小板を輸血するも出血傾向を来し、臨床的診断ではあるが脳出血を発症し死亡されたと推測された。

謝辞：HESS-5 細胞を樹立し本研究に多くの示唆をいただいた辻孝先生 (東京理科大学)、前臨床研究を含めて協力いただいた東海大学医学部再生医学研究センター、細胞移植再生医療科、血液・腫瘍内科のメンバーに深謝致します。

文 献

- 1) Grewal SS, et al.: Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 101 : 4233 ~ 4244, 2003
- 2) Laughlin MJ, et al.: Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *New Eng J Med* 344 : 1815 ~ 1822, 2001
- 3) Sanz GF, et al.: Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 98 : 2332 ~ 2338, 2001
- 4) Barker JN, et al.: Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 97 : 2957 ~ 2961, 2001
- 5) Thomson BG, et al.: Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 96 : 2703 ~ 2711, 2000
- 6) Migliaccio AR, et al.: Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 96 : 2717 ~ 2722, 2000
- 7) Wagner JE, et al.: Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100 : 1611 ~ 1618, 2002
- 8) Shpall EJ, et al.: Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 8 : 368 ~ 376, 2002
- 9) Kawada H, et al.: Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 27 : 904 ~ 915, 1999
- 10) 安藤潔, 堀田知光: 造血幹細胞の増幅 臨床応用に向けて. *分子細胞治療* 1 : 383 ~ 389, 2000
- 11) Ueno H, et al.: A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 4 : 457 ~ 463, 2003
- 12) Barker JN, et al.: Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 102 : 1915 ~ 1919, 2003
- 13) Rizzieri DA, et al.: Successful allogeneic engraftment of mismatched unrelated cord blood following a nonmyeloablative preparative regimen. *Blood* 98 : 3486 ~ 3488, 2001



話題

造血幹細胞の骨髄内直接移植法*

八幡 崇**** 安藤 潔****

Key Words : SRC assay, intrabone marrow injection, cord blood

はじめに

造血幹細胞の生体内造血再構築能のもっとも信頼できる測定法は、同種同系個体への移植実験であるが、ヒトではこのような生体造血再構築実験を行うことはできないので、代替法として異種移植が行われる。とくに、nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) マウスを用いてヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能を測定する SCID-repopulating cells assay (SRC法) が広く利用されている¹⁾。SRC法ではマウス尾静脈よりヒト幹細胞を移入するのが一般的である。造血幹細胞は骨髄環境の中で支持され、分化・成熟していくが、ヒト/マウス間移植においては血流中から骨髄環境内にたどりつける幹細胞は経静脈移入した細胞の数%以下であるとされており、非常に効率が悪い。すなわち、従来の経静脈移植ではヒト造血幹細胞集団の真の造血再構築能力を測定していない可能性があった。そこでわれわれは、ヒト造血幹細胞の生着を阻害する因子を排除することを目的として、ヒトCD34陽性細胞をNOD/SCIDマウス骨髄内に直接移植することによりSRC法の再評価を試みた²⁾。

経静脈的移植によるSRC法

NOD/SCIDマウスにヒト造血細胞を経静脈的

(intravenous[iv])に移植することにより、マウス体内でヒト造血細胞が生着することが示され、ヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能の研究は飛躍的に進展した¹⁾。このNOD/SCIDマウスに多分化能と自己複製能を維持した状態で生着するヒト造血幹細胞集団は、SCID-repopulating cell (SRC)と定義される。臍帯血の場合、SRCは成熟分化抗原陰性でCD34抗原陽性CD38抗原陰性の細胞集団(Lin⁻CD34⁺CD38⁻)に濃縮され、その細胞集団のおよそ600個に1個の頻度で存在することが示された³⁾。しかし、ヒト造血細胞をマウスにiv移植した場合、造血の場であるマウス骨髄内に到達(homing)することができる細胞は数%以下であることから⁴⁾⁵⁾、SRC頻度の算出結果は実際の頻度より低く見積もっている可能性がある。

ヒト造血細胞のhomingを阻害する因子としては次のような要因が考えられる。すなわち、①iv移植したヒト細胞がマウスの肺や肝臓あるいは脾臓に捕捉されてしまい、骨髄静脈洞までたどり着けない、②静脈洞血管壁にたどり着いたとしてもヒト/マウス間の分子的な不適合により、血管内皮細胞と相互作用ができず、血管壁から血管外の造血微小環境に進入できない、③免疫不全マウスの末梢にわずかに残存する免疫機構によって排除されてしまう、④骨髄内進入後にマウスストローマ細胞などの支持細胞と相互作用ができず生存できない、などの要因が考えら

* Intrabone marrow injection in SRC assay.

** Takashi YAHATA, Ph.D. & Kiyoshi ANDO, M.D.: 東海大学医学部再生医学センター・造血再生部門 (〒259-1193 伊勢原市望星台); Division of Hematopoiesis, Research Center for Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara 259-1193, JAPAN

*** 東海大学医学部血液・腫瘍・リウマチ内科

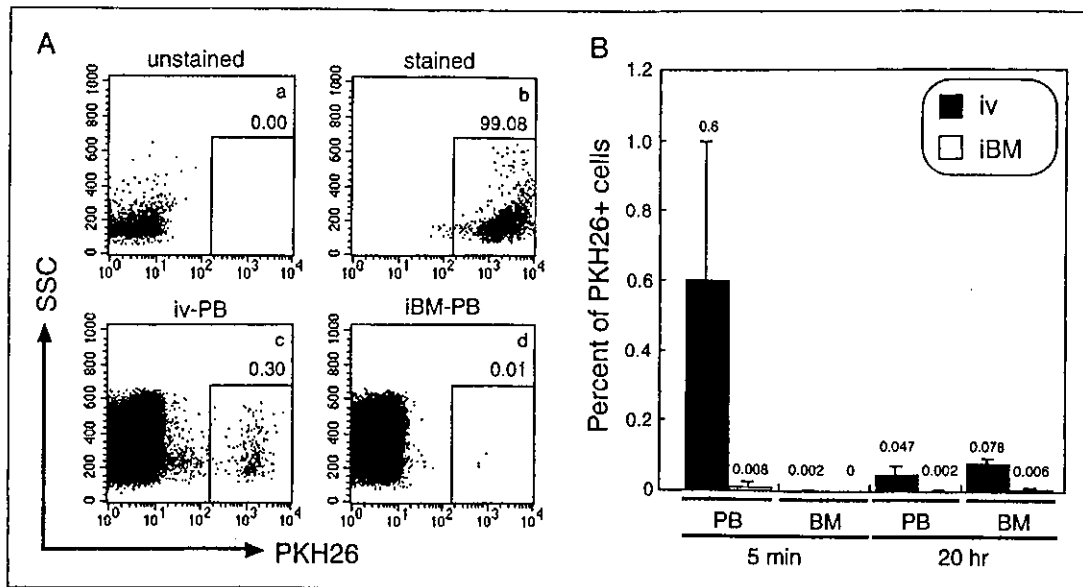


図1 ヒトCD34陽性細胞移植直後の生体内動態

A: CD34陽性細胞をPKH26で染色標識し、 1×10^6 個の細胞をNOD/SCIDマウスにiv移植またはiBM移植した。(a)未標識陰性コントロール、(b)PKH26で染色後のCD34陽性細胞、(c)iv移植群における5分後のマウス末梢血、(d)iBM移植群における5分後のマウス末梢血、それぞれのFACS解析例。B: FACS解析で検出されたPKH26陽性細胞の割合。■: iv移植群、□: iBM移植群。それぞれの平均値をグラフ上に示す。

れる。もし、ヒト造血細胞をマウス骨髓内に直接移植することが可能であれば、少なくとも上記①～③の障害は考慮に入れない条件下で、ヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能をより効果的に測定できるのではないかと考えた。

骨髓内直接移植法の確立

一体、マウスの骨髓内に細胞を直接移植することなど可能なことなのであろうか？移植することができたとしても、移植した細胞浮遊液のほとんどは移植直後に骨髓の中から漏れ出て、体循環に入り、結局iv移植したことと変わりのない結果にはならないのか？われわれは、PKH26色素で標識した臍帯血由来CD34陽性細胞を骨髓内移植法(intra-bone marrow [iBM])あるいはiv移植法でNOD/SCIDマウスに移植を行い、その後の動態の追跡を試みた。移植直後(5分後)と20時間後に末梢血とiBM移植していない方の脛骨から骨髓液を吸引採取し、FACSでPKH26陽性細胞の存在頻度を解析することにより、iv移植群とiBM移植群とを比較した。iv移植群では移植直後に末梢血中にPKH26陽性細胞が検出され、20時間後には移植した細胞が末梢血からhomingして骨髓中に存在することが確認された。一方、iBM移植

群では移植後のいずれの時点においても、PKH26陽性細胞の存在頻度はiv移植群と比べて非常に低い割合でのみ検出された($p < 0.01$) (図1)。したがって、iBM移植したヒトCD34陽性細胞のほとんどは移植初期には移植した骨髓内にとどまっておき、たとえ漏れ出たとしてもごくわずかな細胞数であることが示唆された。

iBM移植法によるSRC存在頻度の検定

Kushidaらは自己免疫疾患モデルマウスにallogeneicマウスの骨髓を移植する際に、iBM法で移植すると従来の経路で移植するよりもはるかに効果的であることを示した⁶⁾。マウス骨髓内に移植したヒト造血細胞がほとんど漏れ出ることなくとどまるのであれば、ヒト/マウス間のxenogeneic CD34移植においてもより高率な生着率が期待できるのではないか。すなわち、homing効率が10%未満でのiv移植法で算出されたSRC存在頻度は、iBM移植法で検討した場合、ほぼ100%骨髓内に入ると仮定すると、およそ10倍から20倍程度高くなるのではないかとわれわれは考えた。そこで、臍帯血よりLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞集団を分離し、限界希釈法によってiv移植とiBM移植を行い、生着結果から得られるそれぞれの

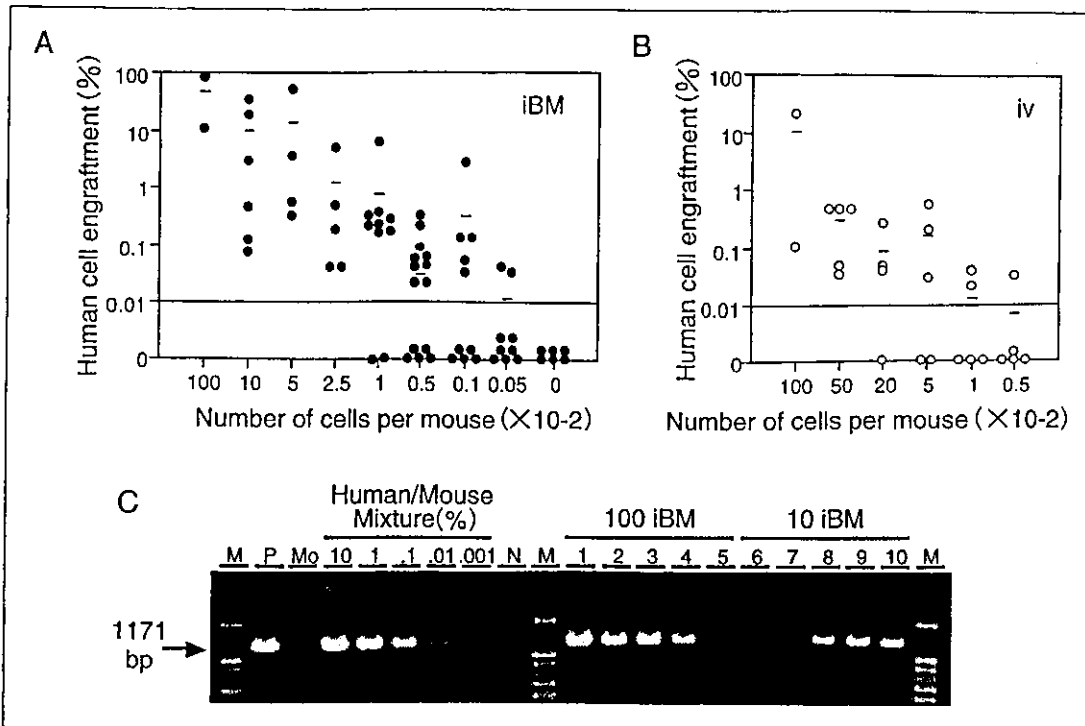


図2 限界希釈法によるSRC頻度の算出

臍帯血由来CD34陽性細胞からLin⁻CD34⁺CD38⁻画分をセルソーターで分離し、限界希釈法によりNOD/SCIDマウスにiBM移植(A)あるいは、iv移植(B)した。移植後8週間でマウス骨髄を採取し、抗ヒトCD45抗体で染色、FACS解析することによりヒト造血細胞の生着を検討した。FACS解析で検出値の低い個体については、ヒト第17番染色体上のα-satellite特異的なprimerで定量的なPCRを行い、FACSとPCR両方の手法でヒト造血細胞が検出されたものを、ヒト細胞が生着した個体とした。PCRの検出限界は0.001%であり、その10倍の0.01%以上のものを陽性個体とした。(C)は代表的なPCRの結果。P:100%ヒトDNA, Mo:100%マウスDNA, N:蒸留水, Lane 1~5:100個のLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞をiBM移植した群, Lane 6~10:10個のLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞をiBM移植した群

SRC頻度を算定した。その結果、iv移植した場合のSRC存在頻度はBhatiaらの報告³⁾と一致してLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞集団中のおよそ660個に1個の頻度で検出された。一方、予想と一致してiBM移植群では、iv移植で得られた結果の15倍高い、44個に1個という非常に高い頻度で検出された(図2)。また、同数を移植した群でのヒト造血細胞の生着率、いわゆるchimerismを総骨髄細胞と比較すると、iBM移植した方がiv移植法よりも優位に高かった(図2)。このことから、iBM移植法は従来のiv移植法に比べて非常に高い感度でヒト造血幹細胞の生体内造血再構築能を測定することを可能にする手法であることが示された。

IBM移植法による多分化能と自己複製能の解析

NOD/SCIDマウスにiv移植されたヒトCD34陽性細胞は、マウス体内でT細胞を除くすべての

分化抗原陽性の細胞に分化することができる。IBM移植法で生着したSRCはiv移植法の場合と同様にlymphoid系, myeloid系, およびerythroid系のすべての分化系列細胞を産生することが可能であった。また、CD34陽性細胞もマウス骨髄内で維持されていた(図3-A)。

ヒトに比べてNOD/SCIDマウスの寿命が極端に短いことなどから、SRCの長期間にわたる造血維持能力の検討には何代かの継代移植を行い、その造血再構築能が維持される事実をもって自己複製能を評価している。しかしながら、従来のiv法で2次移植を行った場合、2代目移植マウス骨髄中に検出されるヒト造血細胞は、初代移植マウス中に存在するヒト造血細胞のchimerismのおよそ10分の1以下に減少してしまうことが知られており、SRCの長期造血維持能力の解析を困難にしていた。

Peledらは初代移植マウス骨髄中に生着・維持

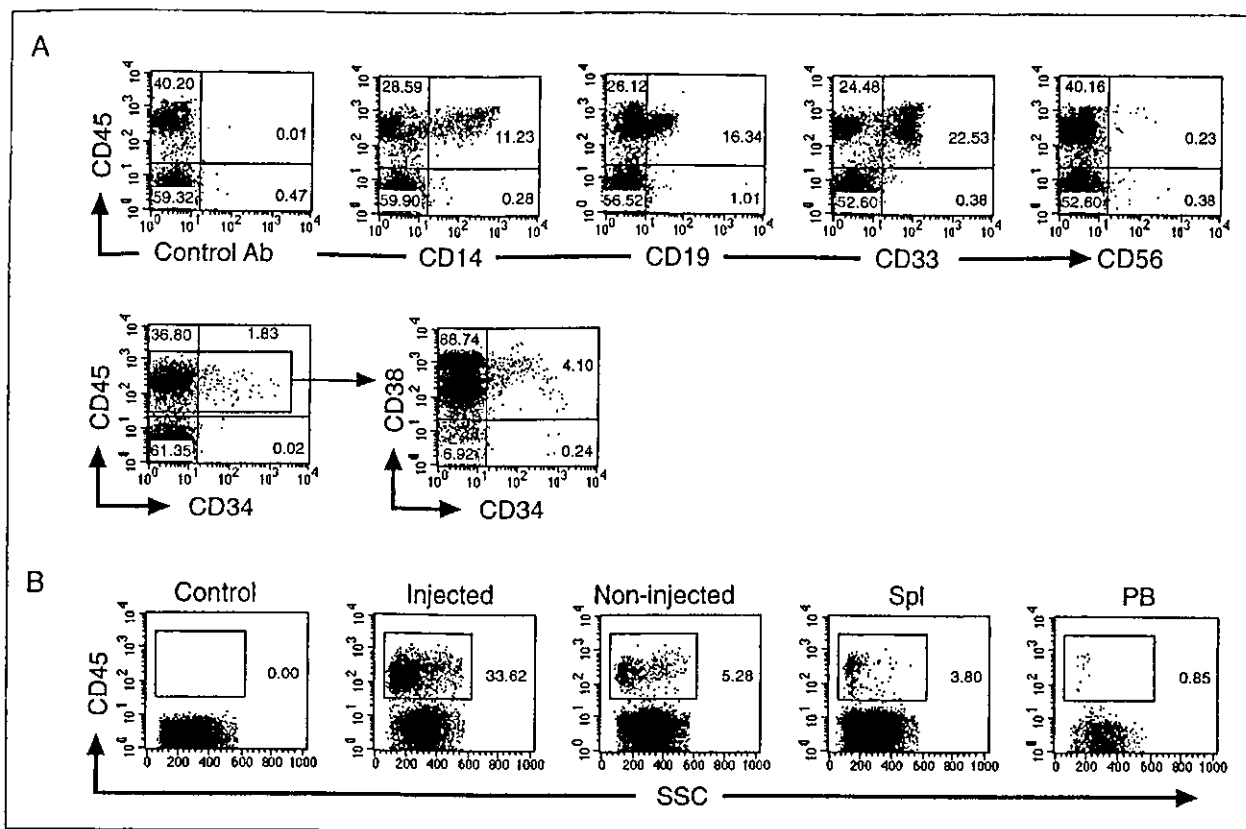


図3 IBM移植法によりNOD/SCIDマウスに生着したヒト造血細胞の多分化能解析例(A), IBM移植後のヒト造血細胞生体内分布(B)

しているSRCは遊走因子受容体であるCXCR4などのhomingに関連する分子の発現が低下しており、その発現を試験管内でサイトカイン刺激を行うことによって回復させた状態で2次移植を行うことにより、初代移植マウスと同等の生着を可能にすることを示した⁷⁾。すなわち、2次移植での生着の低下はSRCのhoming能の低下が主たる要因のひとつであるという。造血幹細胞のhomingを考慮に入れない移植法であるiBM移植法で2次移植を行った場合、chimerismの低下は少なくなることが予想される。そこで、2次移植をiv移植とiBM移植で行った場合のchimerismの低下率を比較検討した。その結果、従来の報告と一致してiv移植群では初代移植のおよそ3%のchimerismという低い値であったのに対して、iBM移植群では初代移植のおよそ55%という高いchimerismを維持していた ($p < 0.01$) (図4-A)。iBM移植によって2次移植されたSRCもやはりlymphoid系、myeloid系への分化能を示した(図4-B)。したがって、iBM移植されたSRCも、iv移植した場合と同様に、マウス体内で多分化能と自己複製能を維持しながら生着しており、し

かもその能力を従来のiv法より高感度に測定できる移植法であることが明らかとなった。

IBM移植後の生体内分布

興味深いことに、ヒトCD34陽性細胞をiBM移植し、その数週間後にヒト造血細胞の生着を解析すると、移植した足側の骨髄のみならず、移植していない反対側の骨髄、脾臓および末梢血といった全身の造血組織で、全系列に正常に分化したヒト造血細胞が検出された(図3-B)。これは、iBM移植をする際に打ち込み時の圧力によって骨髄外に漏れ出たものが、新たに別の骨髄に生着した結果なのであろうか? PKH26標識による追跡実験の結果から移植直後での漏出はほとんどないことを確認しているが、われわれはレンチウイルスベクターを用いてヒトCD34陽性細胞を遺伝子標識後に移植することによって、iBM移植後の体内分布のより詳細な解析を試みた。

レンチウイルスでは宿主細胞に感染後、ウイルスゲノムが宿主細胞のゲノム中の不特定な位置に安定して組み込まれる。したがって、ウイルス由来のゲノムが2つの細胞の同じゲノムの

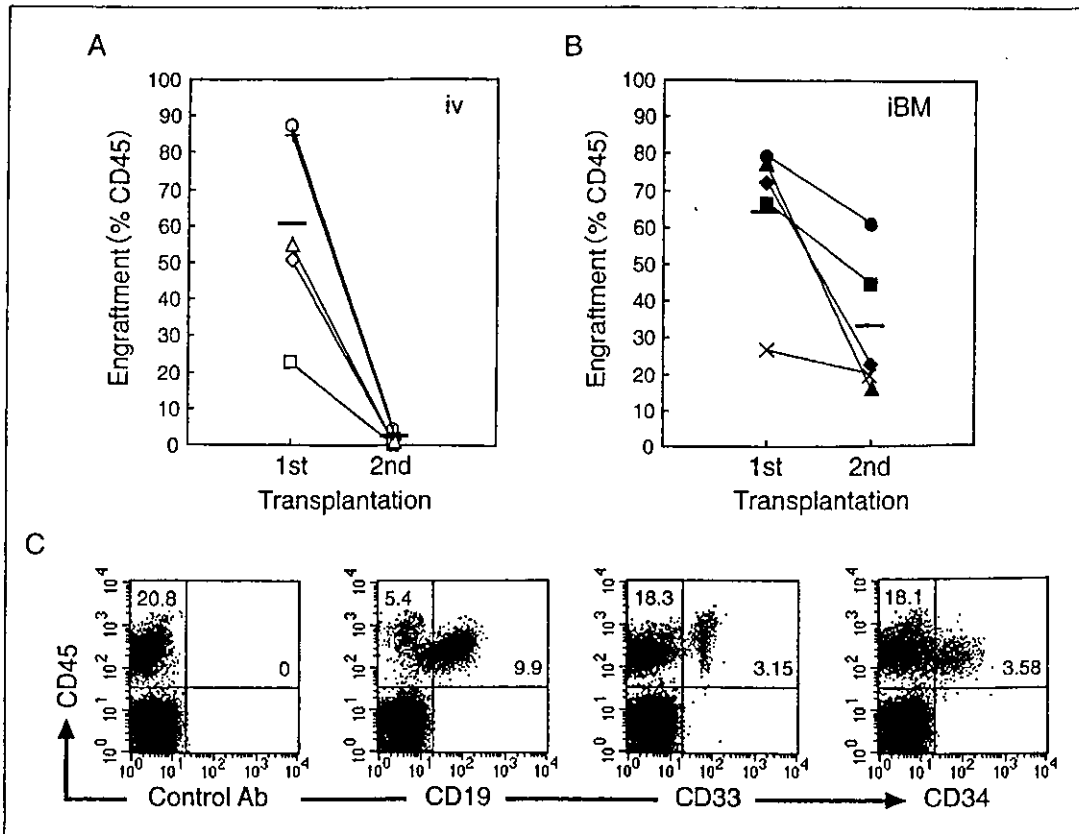


図4 iBM移植法によりNOD/SCIDマウスに生着したヒト造血細胞の自己複製能
初代移植マウス骨髄をiv移植法(A)またはiBM移植法(B)により2次移植を行った。移植後6週間でヒト造血細胞の生着を解析し、初代移植マウスにおける生着の割合と比較した。(C)は2次移植で生着したヒト造血細胞の分化抗原解析。

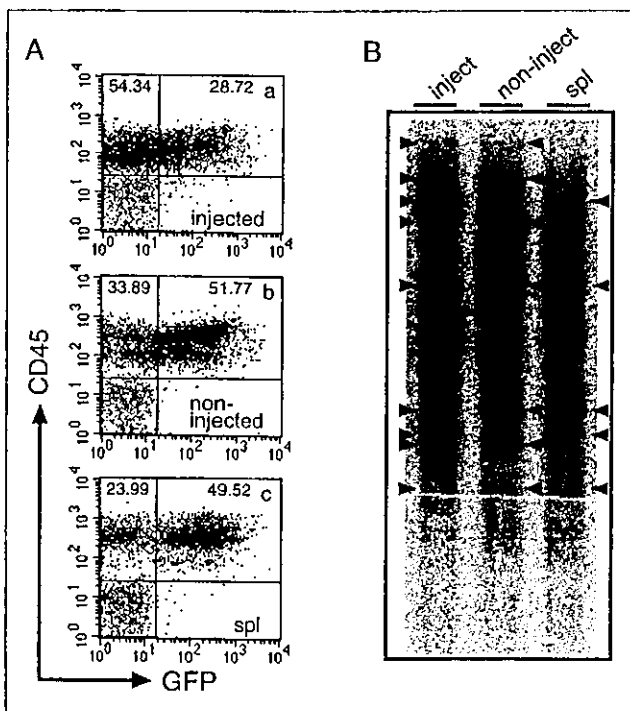


図5 iBM移植におけるクローナリティー解析
A: ヒトCD34陽性細胞にレンチウイルスでEGFP遺伝子を導入し、iBM移植を行った。移植後8週間でマウスの移植側の骨髄(a)、移植していない反対側の骨髄

位置に検出されるならば、それら2つの細胞はもともと同じ1つのクローン細胞から派生した娘細胞であることがわかる。そこで、レンチウイルスを用いてヒトCD34陽性細胞をEGFP遺伝子で標識後、NOD/SCIDマウスにiBM移植した。移植後8週間で移植側の骨髄、反対側の骨髄および脾臓から血液細胞を採取しそれぞれからDNAを抽出、EGFP probeを用いてそれぞれのウイルスの組み込み位置を解析した。その結果、ヒトCD34陽性細胞由来の多数のクローンが検出され、その多くは移植側の骨髄、反対側の骨髄および脾臓のそれぞれに同じクローンが存在することが明らかとなった(図5)。すなわち、iBM移植されたヒトCD34陽性細胞は移植した骨髄環境内に生着し、その後骨髄外に出て体循環により別の

(b)、脾臓(c)のそれぞれから細胞を回収した。B: DNAを回収し、EGFP probeでhybridizationすることによってクローナリティー解析を行った。矢印は共通のクローンであることを示す。