

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 滋

平成 17 年 (2005) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

東京大学医学部附属病院 千葉 滋 1

II. 分担研究報告

1. 好中球の体外誘導に関する研究

東京大学大学院医学系研究科 小川 誠司 7

東京大学医学部附属病院 黒川 峰夫

2. 造血幹細胞の体外増幅に関する研究

東京大学医学部附属病院 神田 善伸 10

東京大学大学院医学系研究科 鈴木 隆浩

東京大学医学部附属病院 熊野 恵城

3. 培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究

東京大学医学部附属病院 高橋 孝喜 14

4. 臍帯血の供給に関する研究

日本赤十字社中央血液研究所 十字 猛夫 18

東京都赤十字血液センター 高梨 美乃子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 23

I . 総括研究報告

幹細胞を利用した分化誘導培養による人工血液の開発に関する研究

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：

臍帯血造血幹細胞を無血清・無フィーダー条件で約6倍に増幅可能な培養システムを開発した。また、造血幹細胞から1700倍の増幅効率で純度の高い好中球を得る培養系の開発にも成功した。これらの技術は互いに組み合わせることで、極めて効率の良い輸血用人工血液製剤の開発に寄与できると期待される。特に今回開発した造血幹細胞増幅システムは無血清・無フィーダー条件で達成された安全性の高い技術であり、臨床応用は容易である。

また、我々は将来の輸血用人工血小板製剤の開発に備え、簡便な血小板機能評価法を考案すると共に、F-DLC膜が血小板の接着を抑制し、長期保存容器の素材として有望であることを見出した。本知見は、血小板輸血製剤の品質向上に極めて大きな意義を持つと考えられる。

分担研究者

- 小川 誠司
東京大学大学院医学系研究科
造血再生医療講座 助教授
- 黒川 峰夫
東京大学医学部附属病院
血液腫瘍内科 講師
- 神田 善伸
東京大学医学部附属病院
無菌治療部 助手
- 鈴木 隆浩
東京大学大学院医学系研究科
造血再生医療講座 助手
- 熊野 恵城
東京大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科・研究拠点形成特任研究員
- 高橋 孝喜
東京大学医学部附属病院
輸血部 教授
- 十字 猛夫
日本赤十字社
中央血液研究所 所長
- 高梨 美乃子
東京都赤十字血液センター
臍帯血バンク 技術部長

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おり、改善すべき点も多い。本研究ではこうした現状に対し、主に臍帯血や骨髄中に存在する体性造血幹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・血小板などの各血球細胞の分化・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と考えられる。また、本研究では既に供給されている赤血球・血小板製剤の他、様々な理由により現時点では不可能になっている白血球輸血製剤の開発も目指す。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。

一方、これらの研究を進めるにあたっては研究材料となるヒト造血幹細胞の安定した供給が必須である。本研究では、主に日本赤十字社の分担者が中心となり、安定したヒト臍帯血供給システムを確立すべく研究を行い、材料供給から製剤開発

研究に至る「トータル・コーディネート」システムの基盤整備を試みた。

B：研究方法

人工血液産生システムの確立にあたっては、①体性幹細胞の効果的増幅、②幹細胞から各血球への効果的な分化誘導、③誘導された血球の品質担保、の3テーマが最も重要である。本研究では主にこれら3つの研究テーマに分担研究者を配置し、これに④ヒト臍帯血の安定供給システムについての研究を加えた、計4テーマについて研究を行った。

① 造血幹細胞の効果的増幅：「造血幹細胞の体外増幅に関する研究」

本研究では近年中に臨床応用の目処を立てるため、当初から異種動物血清、ストローマ細胞を排除した培養系で研究を進めた。また、細胞を未分化なまま増幅させるために分化抑制シグナルである Notch シグナルを培養系に加えて培養を試みた。

インフォームドコンセントを得て提供された臍帯血から単核球を分離し、その後 CD133 磁気ビーズを用いて CD133 陽性細胞を分離した。得られた CD133 陽性細胞を、stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、flt-3 ligand (FL)、IL-6、IL-6/可溶性 IL-6 受容体キメラ蛋白 (FP6)、IL-3 等を含む無血清培地中で培養した。Notch リガンドによる Notch 受容体の刺激は、ヒト免疫グロブリン Fc 部分とキメラを形成した組換え型 Delta1、Jagged1 蛋白 (Delta1-Fc, Jagged1-Fc) を培養ディッシュ底に固層化し、その上で培養を行うことで行った。そして様々なサイトカイン、Notch リガンドの組み合わせで、1~3 週間培養を行い、その間の混合コロニー形成未分化造血細胞(CFU-Mix)の変化を観察し、最も効果的に CFU-Mix を増幅する培養条件の検討を行った。そして、実際に生体内で造血を再構築できる造血幹細胞の活性を測定するため、増幅した細胞を NOD/SCID マウスに移植し、移植されたヒト細胞の分化能を検定すると共に、含まれる造血幹細胞数 (SCID Repopulating Cell: SRC) の定量的測定を行った。

② 幹細胞から各血球への効果的な分化誘導法の開発：「好中球の体外誘導に関する研究」

今日、化学療法がより広範かつ強力に行なわれるようになり、好中球減少患者に対する好中球輸血の潜在的需要は決して少なくないが、現行の献血体制では好中球の供給は不可能であり、新たな技術開発が必須である。過去に好中球輸血の有効性は一旦否定されたが、これは輸血好中球が数的に不十分であることによるものであり、好中球減少遷延期の感染症に対する救命手段として、好中

球輸血は本来極めて有用な医療手段であり得る。

以上のことから、本年度は血球分化の対象として白血球(好中球)を選択し、造血幹細胞からの効果的な好中球誘導法について研究を行った。

若年マウス骨髄より抗 CD34 磁気ビーズを利用して CD34 陽性細胞を分離し、これを造血幹細胞ソースとして利用し、造血幹細胞から成熟好中球を効果的に得るために必要なサイトカイン添加条件の最適化、及び誘導された好中球の機能解析について検討を行った。

● 成熟好中球を効果的に得るための最適化

本研究では幹細胞増幅を目的に SCF+TPO+IL-6 を基本サイトカインとして利用し、遅れて FL、IL-3、G-CSF を加えて分化を誘導することを試みた。そして、これらの分化サイトカインを培養開始時から添加した場合と比較し、最も幹細胞増幅効果が強く現れる条件を検討した。また同時に、従来報告されている好中球誘導法の内、最も代表的なものとの誘導効率を比較した。

● 誘導された好中球の機能解析

誘導された好中球は生体内好中球と同等以上の機能を持つことが求められる。今回我々は得られた好中球について NBT 還元能、貧食能検査を行い、さらに実際に細胞をマウスに輸注して急性副反応の有無について検討を行った。

③ 誘導された血球の品質担保：「培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究」

幹細胞から誘導された血球を輸血製剤として利用するためには、得られた血球が実際に使用されるまで正常機能を有し続けることが必須である。本年度は血小板について、新たな機能評価法および機能を長期間保持できる血小板製剤保存用医療材料について開発研究を行った。

* 血小板機能評価法および保存容器に使用できる血小板接着基板の開発

血小板粘着能の評価基準基板として、医用材料に広く用いられている polycarbonate (PC) を使用した。また、血小板保存保管容器の素材としては抗血栓性が期待されている DLC coating Polycarbonate、および新規材料のフッ素添加 DLC (F-DLC) coating PC を用い、各素材への血小板接着状態を比較した。付着血小板の活性化評価には新たに活性化指数(AI)を独自に考案し、従来の機能評価と比較した。

* 効果的な血小板活性化評価法の開発

血小板粘着、活性化の評価には、同意の得られた正常健康人ボランティアから静脈穿刺により採血、調整した濃厚血小板溶液を使用した。規定量

の血小板浮遊血漿に各種基板を 30 分間、37℃、CO₂ 5%下で反応させ、その後試料に付着した血小板を固定・脱水処理し、付着血小板の個数および形態変化について観察、評価した。

④ ヒト臍帯血の安定供給システムの確立：「臍帯血の供給に関する研究」

臍帯血バンクへの臍帯血提供の同意には、移植に至らない場合の研究用使用も含まれているが、これは移植医療に貢献できる研究でなければならない。東京都赤十字血液センター臍帯血バンクでは、研究用譲渡を希望する研究者から提出された研究計画書、当該施設の倫理委員会での研究承認書類等を臍帯血バンク研究審査部会に回覧し、2/3以上の賛成多数をもって承認とした。そしてあらかじめ承認した研究者に対して、臍帯血が研究用と判断された時点で連絡し、臍帯血を供給した。

臍帯血の供給状況は逐一記録され、これらの記録を元に効率的な臍帯血供給システムについて検討を行った。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供に当たり以下の事項を確認、その内容は東京大学医学系研究科倫理委員会の審査・承認を受けた上で研究を開始している(承認番号:351)。

また、動物実験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行われるよう配慮した。

C: 研究結果

① 造血幹細胞の効果的増幅：「造血幹細胞の体外増幅に関する研究」

臍帯血 CD133 陽性細胞を様々なサイトカインの組み合わせで培養し、培養 1~3 週間後の未分化造血コロニー(CFU-Mix)の増幅率を検討したところ、検討した条件においては SCF+TPO+FL+FP6+IL-3+Delta1-Fc で 3 週間培養することで CFU-Mix を最も高率に(約 200 倍)に増幅できることが判明した。

また、培養細胞中の造血幹細胞活性を測定するため、BM+FP6+IL-3+Delta1-Fc で 3 週間培養した後の細胞を NOD/SCID マウスに移植し、移植 10 週以降のマウスに含まれるヒト細胞のキメリズムを調べたところ、培養前、培養後共にマウス骨髄・末梢血内に骨髄球系、リンパ球系に分化したヒト血球を認め、実際に造血幹細胞活性が存在することが確認できた。そして、限界希釈法を利用して造血幹細胞(SRC)存在率を評価したところ、本培養法によって造血幹細胞が約 6 倍に増幅されたことが確認された。

② 幹細胞から各血球への効果的な分化誘導法の開発：「好中球の体外誘導に関する研究」
サイトカイン添加時期を様々に組み合わせ、好中球誘導効率を検討したところ、

Day0~: SCF+TPO+IL6+FL

Day3~: SCF+TPO+IL6+FL+IL3

Day5~: SCF+TPO+IL6+FL+IL3+G-CSF

以上の添加条件で、10 日目に最も効果的に増幅された好中球を得ることができ(約 1700 倍)得られた好中球の純度も 90%以上と極めて良好であった。

また、誘導された好中球は NBT 還元能 50%と良好な活性を示し、これは正常マウス末梢血好中球の 25%と比較しても優れたものであった。

さらに、好中球を蛍光ラテックスビーズと共培養し、好中球のビーズ貧食能を検討したところ、培養好中球では約 40%にビーズの取り込みが認められ、培養前の骨髄好中球(30%)に較べより良好な貧食能を示した。

また、誘導した好中球を実際にヒトに応用する濃度($1 \times 10^8 / \text{kg}$ (= $1 \times 10^6 / \text{mouse}$))でマウスに輸注し、副反応の有無を観察したところ、輸注前後でマウスに変化は認められず、マウスは 48 時間後でも外見上明らかな異常をきたさず生存していた。以上より、本法によって誘導された好中球は副反応を起こしにくく、安全に輸注し得ることが示唆された。

③ 誘導された血球の品質担保：「培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究」

医療材料としての有効性を確認するため、PC 基板、DLC 基板、F-DLC 基板上に血小板を付着させ、1500 μm^2 範囲に付着し、活性化した血小板を走査型電子顕微鏡により観察、分析したところ、PC>DLC>F-DLC の順で付着血小板の数が減少していることが判明した。以上より F-DLC 基板は高度な血小板接着阻害作用を持つことが判明し、血小板吸着の少ない有望な血小板保管用医療材になり得ると考えられた。

血小板の基板への接着は、表面のフィブリノゲン量に正相関、アルブミン量に逆相関することが知られているため、これらの 3 基板について基板上に吸着したアルブミン/フィブリノゲン比を測定したところ、PC<DLC<F-DLC の順でアルブミン/フィブリノゲン比が増加していることが判明した。以上より、F-DLC 基板はアルブミンに親和性を持つことで、血小板接着を阻害していることが示唆された。

また、本実験において、付着血小板の状態は工業用の実体顕微鏡(微分干渉装置付)でも電子顕微鏡と同様に観察できることがわかり、さらに本

法は不透明材料表面上の細胞接着評価にも利用可能であることが判明した。以上より、実態顕微鏡を用いた本血小板観察法は従来の電子顕微鏡利用に代わり得る、非常に有効な評価法であることが示唆された。

さらに、付着血小板の活性化評価をより客観的に行うため、従来の血小板の形態変化を5段階に分類する手法にもとづき、活性化指数 (Activation Index) を考案して血小板活性化状態を定量的に算出したところ、活性化指数は血小板付着数と同様にPC基板>DLC膜>F-DLC膜の順で減少しており、本法は血小板活性能の有効な評価法であることが判明した。

④ ヒト臍帯血の安定供給システムの確立：「臍帯血の供給に関する研究」

臍帯血は容量が十分採取された場合に臍帯血バンクへ搬送され、さらに細胞数が十分にあれば移植目的に保存可能と判断して調製を開始した。保存されたのは受入数 641 件の 60.7%、389 件であった。252 件の保存にいたらない理由は細胞数不足、クロット、受入までに 24 時間以上経過、母既往歴、家族歴、調製不良、感染症スクリーニング陽性であった。クロット形成を認める検体は有核細胞回収率が低い可能性があるため、研究用に提供するのには細胞数不足の臍帯血が最も適当であると考えられた。細胞数基準で調製できないものは 252 中 172 件 (68.3%)、全体の 26.8%であった。また、この判定は臍帯血採取後 24 時間以内に行われたため、研究者への譲渡は臍帯血採取後おおよそ 24 時間内外であった。

そして、細胞数不足で調製できない臍帯血 172 件のうち 126 件を研究用に提供することができ、その利用率は 73.3%であった。

D：考察

造血幹細胞増幅に関する研究では、従来の細胞増殖刺激サイトカインに分化抑制 Notch シグナルを加えることで、造血幹細胞を無血清・無フィーダー条件下で約 6 倍に増幅できることが示された。増幅を目的に造血幹細胞を体外で培養した報告は数多く認められるが、多くはウシ胎児血清やマウスストローマ細胞など異種動物成分を培養系に含むものである。また、無血清・無フィーダー条件で行われたものであっても、増幅効率が示されていない、あるいは低効率のものがほとんどであり、結果を臨床応用に結びつけるのは困難であった。今回の我々の結果は、造血幹細胞が無血清・無フィーダー条件下で 6 倍まで増幅されたことを明らかにしており、臨床応用を目指す上で大きな意義を持つものである。

また、好中球の体外誘導に関する研究では、幹細胞増幅と分化誘導を組み合わせた培養系を考案し、これにより純度 90%以上の成熟好中球を増幅率 1700 倍で得ることができた。本法で誘導された好中球は生体内好中球と同等以上の機能を持っており、輸注時の急性副反応が認められないことから、安全に輸血できる細胞製剤として応用可能であると期待される。

培養細胞の輸血製剤化に関する研究では、主に血小板機能に関する研究を行い、簡便に施行可能な血小板機能検査法を考案すると共に、F-DLC 膜が効果的に血小板接着を阻害することを示し、これが血小板保管容器の材質として有望であることを示すことができた。本研究結果は人工血小板開発に寄与するのみならず、現行の血小板製剤の品質向上にも結びつくこと期待される。

さらに、臍帯血供給に関する研究では、臍帯血バンクの保管基準を満たさず、本来ならば廃棄処分となる運命の臍帯血のうち 73.3%が移植研究用として役立っていることが判明した。

E：結論

今回我々は、臍帯血造血幹細胞を無血清・無フィーダー条件下で約 6 倍に増幅可能な培養システムを開発した。また、造血幹細胞から 1700 倍の増幅効率で純度の高い好中球を得る培養系の開発にも成功した。これらの技術は互いに組み合わせることで、極めて効率の良い輸血用人工血液製剤の開発に寄与できると期待される。特に、本造血幹細胞増幅システムは無血清・無フィーダー条件下で達成された安全性の高い技術であり、臨床応用は容易である。

また、我々は将来の輸血用人工血小板製剤の開発に備え、簡便な血小板機能評価法を考案し、F-DLC 膜が血小板の接着を抑制し、長期保存容器の素材として有望であることを見出した。本知見は、血小板輸血製剤の品質向上に極めて大きな意義を持つと考えられる。

さらに、臍帯血の供給に関する研究では、現在臍帯血バンクの保管基準を満たさず、本来なら廃棄処分になっている臍帯血のうち 73.3%が研究用として役立っていることが明らかとなった。臍帯血の提供にに応じていただいた妊産婦の御厚意に応えるためにも、臍帯血処理の技術を向上させ、基準未到達の臍帯血を有効に利用できるよう努力する必要があると考えられる。

F：健康危険情報

特に認められない。

G : 研究発表

1. 論文発表

1. Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films. *Diamond & Related Materials*, in press.
2. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 42:269-279, 2005.
3. Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H. A prospective trial to evaluate the safety and efficacy of pravastatin for the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 79:372-374, 2005.
4. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. *Bone Marrow Transplant* 34(1):29-35, 2004.
5. Morishima Y, Ogura M, Nishimura M, Yazaki F, Bessho M, Mizoguchi H, Chiba S, Hirai H, Tauchi T, Urabe A, Takahashi M, Ohnishi K, Yokozawa T, Emi N, Hirano M, Shimazaki C, Nakao S, Kawai Y, Fujimoto M, Taguchi H, Jinnai I, Ohno R. Efficacy and safety of imatinib mesylate for patients in the first chronic phase of chronic myeloid leukemia: results of a Japanese phase II clinical study. *Int J Hematol* 80(3):261-266, 2004.
6. Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H. Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells. *Am J Hematol* 77(3):223-228, 2004.
7. Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 Is Functionally Regulated through p300-mediated Acetylation on Specific Lysine Residues. *J Biol Chem* 279(15):15630-15638, 2004.
8. Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa 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. Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33(10):1043-1047, 2004.
9. 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* 2004;33(5):549-52.
10. Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* 103(9):3336-3341, 2004.
11. Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 10(9):645-652, 2004.
12. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 42(6):2733-2741, 2004.
13. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Med* 10(3):299-304, 2004.
14. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of Valpha24(+) NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34(7):595-602, 2004.
15. Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* 104(12):3558-3564, 2004.

2. 学会発表

<海外学会>

・ Platelet attachment and activation and protein adsorption on diamond-like carbon (DLC) and Fluorinated DLC coatings for blood-contacting medical devices

T. Hasebe, S. Yohena, T. Saito, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki

8th International Mini-Symposium on Diamond Electrochemistry, 21st Century COE KEIO-LCC International Symposium

・ Fluorinated diamond-like carbon films for blood-contacting medical devices

S. Yohena, T. Hasebe, T. Saito, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki

GRIBO12005: 15th Interdisciplinary Research Conference on Biomaterials

・ Effects of Fluorine Doping of Amorphous Diamond-Like Carbon Films on Platelet Adhesion and Activation

S. Yohena, T. Hasebe, T. Saito, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki

CMCTF2005: International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films (USA)

<国内学会>

・ 「フッ素添加 Diamond-like Carbon 膜表面における血小板付着および活性化抑制効果」 齊藤俊哉, 長谷部光泉, 松岡義明, 饒平名智士, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也

第 18 回 ダイヤモンドシンポジウム

・ 「フッ素添加 DLC 膜上におけるタンパク質の吸着と血小板の付着及び活性化の評価 (最優秀賞受賞)」

饒平名智士, 長谷部光泉, 齊藤俊哉, 松岡義明, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也

第 18 回 ダイヤモンドシンポジウム

・ 「Diamond-like carbon (DLC) コーティングを用いた医療材料の生体適合性・抗血栓性評価方法確立の重要性」

鈴木哲也, 長谷部光泉, 齊藤俊哉, 饒平名智士, 松岡義明, 上條亜紀, 高橋孝喜

日本学術振興会化学研究費基板研究 C アモルファス炭素系薄膜の化学: 第 2 回企画調査研究会

・ 「フッ素添加 DLC の抗血栓性メカニズム解明の試み」

長谷部光泉, 饒平名智士, 齊藤俊哉, 松岡義明, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也

日本学術振興会化学研究費基板研究 C アモルファス炭素系薄膜の化学: 第 2 回企画調査研究会

・ 「Notch リガンドを用いた臍帯血造血幹細胞増幅の試み」

鈴木隆浩, 小川誠司, 熊野恵城, 黒川峰夫, 西川光郎, 坂野誠治, 平井久丸, 千葉滋

平成 17 年 4 月 第 3 回幹細胞シンポジウム (兵庫、淡路島) にて発表予定

H: 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

分担研究報告書

好中球の体外誘導に関する研究

分担研究者

小川 誠司 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療講座 助教授
黒川 峰夫 東京大学医学部附属病院 血液腫瘍内科 講師

研究要旨：

造血幹細胞増幅と分化誘導を適切に組み合わせることにより、マウス骨髄造血幹細胞分画から効率よく成熟好中球を誘導する培養系を開発した。本培養系では約 1700 倍に増幅された成熟好中球を純度 90%以上で得ることができ、得られた好中球は生体内好中球と同等以上の機能を持つことが確認された。本培養系は将来の輸血用好中球製剤の開発に寄与できるものと期待される。

A：研究目的

輸血は現在日常的な医療手段であり、様々な疾患の治療上必要不可欠であることは言を待たない。しかしながら、その供給は全面的に不特定多数のボランティアからの献血に依存しているため、量的質的な安定供給が困難であり、感染などの危険性が不可避である。また、化学療法がより広範かつ強力に行なわれるようになり、好中球減少患者に対する好中球輸血の潜在的需要も決して少なくないが、現行の献血液制では好中球の供給は不可能であり、新たな技術開発が必須である。過去に好中球輸血の有効性は一旦否定されたが、これは輸血好中球が数的に不十分であることによるものであり、好中球減少遷延期の感染症に対する救命手段として、好中球輸血は本来極めて有用な医療手段であり得る。本分担研究では、造血幹細胞から輸注可能な好中球を大量に誘導できる、効率の良い培養系の開発を目指して研究を行う。

B：研究方法

若年マウス骨髄より抗 CD34 磁気ビーズを利用して CD34 陽性細胞を分離し、これを造血幹細胞ソースとして利用した。そして研究は、①造血幹細胞から成熟好中球を効果的に得るために必要なサイトカイン添加条件の最適化、②誘導された好中球の機能解析の 2 点に分けて行った。

① 成熟好中球を効果的に得るための最適化

造血幹細胞からの好中球誘導研究はこれまで報告が少なく、得られた細胞の純度や誘導効率も低

いものがほとんどであった。今回我々は分化誘導に幹細胞増幅を組み合わせた新たな培養法の可能性を検討した。幹細胞の増幅と分化にはこれまでの我々の研究および文献報告から、stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、IL-6、flt-3 ligand (FL)、IL-3、G-CSF の使用が望ましいと考えられるが、FL、IL-3、G-CSF は分化誘導作用も強いとされるため、培養液に添加するタイミングが重要である。

そこで、本研究では幹細胞増幅を目的に SCF+TPO+IL-6 を基本サイトカインとして利用し、3 日後に初期分化サイトカインである FL、IL-3、5 日後に後期分化サイトカインと考えられる G-CSF を加えることを考案した。そして、これらの分化サイトカインを培養開始時から添加した場合と比較し、最も幹細胞増幅効果が強く現れる条件を検討した。また同時に、従来報告されている好中球誘導法の内、最も代表的なものとして誘導効率を比較することとした。

② 誘導された好中球の機能解析

誘導された好中球は形態が正常、そして生体内好中球と同等以上の機能を持つことが求められる。今回我々は得られた好中球について NBT 還元能、貧食能検査を行い、さらに実際に細胞をマウスに輸注して急性副反応の有無を確認することとした。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究はマウスを扱った動物実験を行う。動物実験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行わ

れるよう配慮した。

C：研究結果

まず、サイトカインの添加時期を最適化するため、いくつかの条件を設定し、マウス骨髄 CD34 陽性細胞を 20%ウシ胎児血清添加 IMDM 培地中で培養し、得られた好中球数を検討した。

その結果、

Day0～: SCF+TPO+IL6+FL

Day3～: SCF+TPO+IL6+FL+IL3

Day5～: SCF+TPO+IL6+FL+IL3+G-CSF

で培養した場合、10 日目で細胞は最も効率的に (1700 倍) に増幅され、得られた好中球の純度も 90%以上と極めて良好であった。

そしてこれらの好中球について機能解析を行った。

① NBT 還元能

培養好中球では約 50%、正常マウス末梢血好中球では約 25%が陽性であり、培養好中球は生体内好中球より優れた NBT 還元能を持つことが確認された。

② 貧食能検査

好中球を蛍光ラテックスビーズと共培養し、好中球のビーズ貧食能を検討したところ、培養好中球では約 40%にビーズの取り込みが認められ、培養前の骨髄好中球 (30%) に比べより良好な貧食能を示した。

そして誘導した好中球を実際にヒトに応用する濃度でマウスに輸注し、副反応の有無を観察した。培養好中球を $1 \times 10^8/\text{kg}$ ($=1 \times 10^6/\text{mouse}$) でマウスに輸注したところ、輸注前後でマウスに変化は認められず、マウスは 48 時間後でも外見上明らかな異常をきたさず生存していた。以上より、本法によって誘導された好中球は十分な機能を持ち、副反応を起こしにくく、安全に輸注し得ることが示唆された。

D：考察

今回我々は、マウス骨髄 CD34 陽性細胞から効率よく成熟好中球を誘導する培養系を考案した。本培養法は従来とは異なり、幹細胞増幅と分化誘導を組み合わせた培養系であり、これにより約 1700 倍に増幅された純度 90%以上の成熟好中球を得ることができた。従来法では最大でも 500 倍程度の増幅であることから、本法の優位性が示唆される。

また、本法で誘導された好中球は、NBT 還元能、異物貧食能において生体内正常好中球と同等以上の機能を持っており、また輸注時の急性副反応が

認められないことから、安全に輸血できる細胞製剤として応用し得ると考えられる。

今後は、利用するサイトカインの種類、添加時期をさらに検討し、より増幅効率の高い培養系の開発を行うと共に、ヒト造血幹細胞を利用した効率の良い培養系の開発を行う方針である。

E：結論

マウス造血幹細胞分画から効率よく成熟好中球を誘導する培養系を開発した。本培養系では約 1700 倍に増幅された成熟好中球を純度 90%以上で得ることができ、得られた好中球は生体内好中球と同等以上の機能を持つことが確認された。本培養系は将来の輸血用好中球製剤の開発に寄与できるものと期待される。

F：研究発表

1. 論文発表

1. Hosoya N, Qiao Y, Hangaishi A, Wang L, Nannya Y, Sanada M, Kurokawa M, Chiba S, Hirai H, Ogawa S. Identification of a SRC-like tyrosine kinase gene, FRK, fused with ETV6 in a patient with acute myelogenous leukemia carrying a t(6;12)(q21;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 42:269-279, 2005.
2. Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H. A Prospective Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Pravastatin for the Treatment of Refractory Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* 79:372-374, 2005.
3. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. *Bone Marrow Transplant* 34(1):29-35, 2004.
4. Morishima Y, Ogura M, Nishimura M, Yazaki F, Bessho M, Mizoguchi H, Chiba S, Hirai H, Tauchi T, Urabe A, Takahashi M, Ohnishi K, Yokozawa T, Emi N, Hirano M, Shimazaki C, Nakao S, Kawai Y, Fujimoto M, Taguchi H, Jinnai I, Ohno R. Efficacy and safety of imatinib mesylate for patients in the first chronic phase of chronic myeloid leukemia: results of a Japanese phase II clinical study. *Int J Hematol* 80(3):261-266, 2004.
5. Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H. Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells. *Am J Hematol*

77(3):223-228, 2004.

T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 Is Functionally Regulated through p300-mediated Acetylation on Specific Lysine Residues. *J Biol Chem* 279(15):15630-15638, 2004.

7. Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa 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. Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33(10):1043-1047, 2004.

8. 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* 2004;33(5):549-52.

9. Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* 103(9):3336-3341, 2004.

10. Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 10(9):645-652, 2004.

6. Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)- β -D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 42(6):2733-2741, 2004.

12. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Med* 10(3):299-304, 2004.

13. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of Valpha24(+) NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34(7):595-602, 2004.

14. Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* 104(12):3558-3564, 2004.

2. 学会発表

なし

G : 知的財産権の出願・登録情報

なし

分担研究報告書

造血幹細胞の体外増幅に関する研究

分担研究者

神田 善伸 東京大学医学部附属病院 無菌治療部 助手
鈴木 隆浩 東京大学大学院医学系研究科 造血再生医療講座 助手
熊野 恵城 東京大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 研究拠点形成特任研究員

研究要旨：

造血幹細胞を高頻度を含むヒト臍帯血 CD133 陽性細胞に stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、flt-3 ligand (FL)、IL-6/可溶性 IL-6 受容体キメラ蛋白 (FP6)、IL-3、Delta1-Fc キメラ蛋白を加えて培養することで、無血清・無フィーダー条件下でも効率よく未熟造血前駆細胞が増幅できることを見出した。そしてこの条件で培養した CD133 陽性細胞を NOD/SCID マウスに移植し、限界希釈法を用いて造血幹細胞の存在率 (SRC 数) を測定したところ、造血幹細胞を 6 倍程度まで増幅できることを確認した。本培養システムは異種動物成分を含まない安全性の高い培養法であり、人工血液の開発において重要な役割を果たすことが期待される。

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おり、改善すべき点も多い。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・血小板などの各血球細胞の分化・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。

骨髄や臍帯血に含まれる体性造血幹細胞を培養して血球を産生することについては、ある程度まで可能になっている。しかし、最大の問題は、これらの体性幹細胞は体外では容易に増幅できないため、限られた材料しか入手できないことである。従って、体性幹細胞を培養して人工血液を得ようとする場合には、よりよい細胞のソースを同定し、いかにして血球への分化能を保ったまま体外で増幅するかが鍵になる。一旦体外増幅法が確立すれば、分化誘導についての障壁はそれほど高くなく、十分実現可能である。

本分担研究は、現在求められている造血幹細胞の体外増幅技術の開発を目的とするものであり、

本研究によって得られる成果は、人工血液産生法の開発に対して大きく役立つものと期待される。

B：研究方法

体性造血幹細胞を安全に体外で増幅可能にする技術が求められている。現在までに、造血幹細胞の体外増幅法については多数の報告があるが、ほとんどは増幅効率が低率あるいは不明であり、さらにウシ胎児血清やマウス由来ストローマ細胞を用いるなど安全性に問題を残しており、臨床応用を目指すには依然不十分なものが多かった。そこで、本研究では近年中に臨床応用の目処を立てるため、当初から異種動物血清、ストローマ細胞を排除した培養系で研究を進めることとした。

従来造血幹細胞の増幅には、その増殖を刺激するために様々な増殖因子（サイトカイン）が加えられてきたが、これらのサイトカインは幹細胞分化を促進する作用も併せ持つため、幹細胞の有効な増幅が困難になっていた。そこで我々はこれらの増殖刺激サイトカインに、分化抑制シグナルを組み合わせて加えることで有効な増幅が可能になるのではないかと考えた。近年、我々は造血支持細胞に発現する Notch リガンド(Delta1, Jagged1, Jagged2)が造血幹細胞に発現する Notch 受容体(Notch1-3)と相互作用することにより、未分化性

を維持することを見出している。そこで本研究では分化抑制因子として Notch リガンドを培養系に加え、造血幹細胞の増幅を試みた。

インフォームドコンセントを得て提供された臍帯血から単核球を分離し、その後 CD133 磁気ビーズを用いて CD133 陽性細胞を分離した。CD133 陽性分画は近年造血幹細胞を最も濃縮する分画として注目されているものである。得られた CD133 陽性細胞を、stem cell factor (SCF)、thrombopoietin (TPO)、flt-3 ligand (FL)、IL-6、IL-6/可溶性 IL-6 受容体キメラ蛋白 (FP6)、IL-3 等を含む無血清培地中で培養した。Notch リガンドによる Notch 受容体の刺激は、ヒト免疫グロブリン Fc 部分とキメラを形成した組換え型 Delta1、Jagged1 蛋白 (Delta1-Fc, Jagged1-Fc) を培養ディッシュ底にヒトフィブロネクチンと共にコート (固層化) し、その上で培養を行うことを行った。そして様々なサイトカイン、Notch リガンドの組み合わせで、1~3 週間培養を行い、その間の混合コロニー形成未分化造血細胞(CFU-Mix)の変化を観察し、最も効率的に CFU-Mix を増幅する培養条件の検討を行った。そして、実際に生体内で造血を再構築できる造血幹細胞の活性を測定するため、増幅した細胞を NOD/SCID マウスに移植し、移植されたヒト細胞の分化能を検定すると共に、含まれる造血幹細胞数 (SCID Repopulating Cell: SRC) の定量的測定を行った。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供に当たり以下の事項を確認、その内容は東京大学医学系研究科倫理委員会の審査・承認を受けた上で研究を開始している (承認番号: 351)。

① 提供者の人権保護

東京大学医学部附属病院で臍帯血の提供を受ける場合は、対象者本人に研究の趣旨を理解してもらい、臍帯血の提供は本人の自由意志によるのみ行われるものとする。提供を拒否した場合も何ら臨床的不利益を蒙らないことを保障する。説明同意文書の内容を本人に極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書 2 部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得る。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の 1 部を本人に提供する。

提供者の個人を特定できる情報は、いかなる場所にも公表されない。学会会議および学術誌上での結果の発表が行われる場合でも、提供者個人を特定し得る情報は完全に守秘される。

東京都赤十字血液センターが提供を受ける臍帯

血についても、同血液センター医学倫理委員会承認済の同様の倫理的配慮に基づいて処理が行われている。

② 対象者に対する不利益・危険性

提供者である産婦・新生児に危険が生じることはない。臍帯血採取に当たり身体的不快は全くなく、娩出後の胎盤に接続している臍帯から血液を採取するが、実際に産婦はこの光景を見ることにはならないため、直接的精神的不快もない。

また、動物実験については「東京大学動物実験実施マニュアル」に従った研究を行い、適切な動物実験が行われるよう配慮した。

C: 研究結果

まず、造血幹細胞増幅に最適のサイトカインの組み合わせを調べるため、臍帯血 CD133 陽性細胞を以下の条件で培養し、培養 1~3 週間後の未分化造血コロニー(CFU-Mix)の増幅率を検討した。

SCF+TPO+FL を基本的サイトカインとして (basal mixture: BM)、1) BM+IL-6, 2) BM+FP6, 3) BM+IL-6+IL-3, 4) BM+FP6+IL-3 の 4 種類のサイトカインミックスを準備し、それぞれについて Notch リガンドとして a) コントロール Fc 蛋白、b) Jagged1-Fc, c) Delta1-Fc を加え、合計 12 種類の条件で培養を行った。その結果、3), 4)の培養系では CFU-Mix は培養 3 週間後まで増加し続け、4)が最も増幅率が高いことが判明した。Notch リガンドの有無では、3), 4)共に Fc 蛋白<Jagged1-Fc<Delta1-Fc の順に増幅率が高く、検討した 12 条件においては BM+FP6+IL-3+Delta1-Fc で 3 週間培養することで CFU-Mix を最も高率に(約 200 倍)に増幅できることが判明した。

次に、培養細胞中の造血幹細胞活性を測定するため、BM+FP6+IL-3+Delta1-Fc で 3 週間培養した後の細胞を NOD/SCID マウスに移植し、移植 10 週以降のマウスに含まれるヒト細胞のキメリズムを調べたところ、培養前、培養後共にマウス骨髄・末梢血内に骨髄球系、リンパ球系に分化したヒト血球を認め、実際に造血幹細胞活性が存在することが確認できた。そして、限界希釈法を利用して造血幹細胞(SRC)存在率を評価したところ、本培養法によって造血幹細胞が約 6 倍に増幅されたことが確認された。

D: 考察

増幅を目的に造血幹細胞を体外で培養した報告は数多く認められるが、多くはウシ胎児血清やマウスストローマ細胞など異種動物成分を培養系に含むものである。また、無血清・無フィーダー条件で行われたものであっても、増幅効率が示され

ていない、あるいは低効率のものがほとんどであり、結果を臨床応用に結びつけるのは困難であった。今回の我々の結果は、造血幹細胞が無血清・無フィーダー条件で6倍まで増幅されたことを明らかにしており、臨床応用を目指す上で極めて大きな意義を持つものと考えられる。

今後は、これまで報告されている他の培養法との直接比較を行い、本法の優位性を確認する方針である。

E : 結論

ヒト臍帯血 CD133 陽性細胞を SCF+TPO+FL+FP6+IL-3+Delta1-Fc 存在下で培養することにより、無血清・無フィーダー条件下でも造血幹細胞を約6倍に増幅できることが示された。本培養システムは異種動物成分を含まない安全性の高い培養法であり、任意血球への分化誘導システムと組み合わせることで、より効率の良い人工血液産生システムの開発に寄与することが期待される。

F : 研究発表

1. 論文発表

1. Horii A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H. A Prospective Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Pravastatin for the Treatment of Refractory Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* 79:372-374, 2005.
2. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. *Bone Marrow Transplant* 34(1):29-35, 2004.
3. Endo-Matsubara M, Ogawa S, Sasaki K, Takahashi T, Chiba S, Hirai H. Immature granulocyte fraction in the peripheral blood is a practical indicator for mobilization of CD34(+) cells. *Am J Hematol* 77(3):223-228, 2004.
4. Yamaguchi Y, Kurokawa M, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H. AML1 Is Functionally Regulated through p300-mediated Acetylation on Specific Lysine Residues. *J Biol Chem* 279(15):15630-15638, 2004.
5. Sakata-Yanagimoto M, Kanda Y, Nakagawa 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. Predictors for severe cardiac complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33(10):1043-1047, 2004.

6. 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* 2004;33(5):549-52.
7. Kunisato A, Chiba S, Saito T, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Hirai H. Stem cell leukemia protein directs hematopoietic stem cell fate. *Blood* 103(9):3336-3341, 2004.
8. Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y. Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 10(9):645-652, 2004.
9. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 42(6):2733-2741, 2004.
10. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Med* 10(3):299-304, 2004.
11. Haraguchi K, Takahashi T, Hiruma K, Kanda Y, Tanaka Y, Ogawa S, Chiba S, Miura O, Sakamaki H, Hirai H. Recovery of Valpha24(+) NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34(7):595-602, 2004.
12. Goyama S, Yamaguchi Y, Imai Y, Kawazu M, Nakagawa M, Asai T, Kumano K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. The transcriptionally active form of AML1 is required for hematopoietic rescue of the AML1-deficient embryonic para-aortic splanchnopleural (P-Sp) region. *Blood* 104(12):3558-3564, 2004.

2. 学会発表

鈴木 隆浩、小川 誠司、熊野 恵城、黒川 峰夫、
西川 光郎、坂野 誠治、平井 久丸、千葉 滋
「Notch リガンドを用いた臍帯血造血幹細胞増幅の
試み」

平成 17 年 4 月 第3回幹細胞シンポジウム（兵
庫、淡路島）にて発表予定

G：知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

培養細胞の輸血製剤化の検討に関する研究

分担研究者

高橋孝喜 東京大学医学部附属病院 輸血部 教授

研究要旨：

幹細胞分化によって産生された各種血球細胞が、輸血用製剤として可能であるか否かを検証するための基礎的検討、及び輸血用製剤として使用する際に必要となる付帯条件について検討した。1) 血小板機能をより生体に近い条件下で簡便に定量的に評価する手法（Platelet activation index）を確立した。2) 血小板長期保存に必須な、抗血栓性に優れた医療材料として、diamond-like carbon にフッ素添加を加えた F-DLC 膜が有用であり、そのメカニズムは plasma protein absorption と関連することを示した。

A：研究目的

本研究では幹細胞分化によって得られた血球細胞が、輸血用製剤として可能であるか否かを検証するための基礎的検討、及び得られた血球細胞を輸血用製剤として使用する際に必要となる付帯条件を検討することを主な目的とした。今年度の主な研究は、臨床での需要が非常に高い血小板に着目して行った。

① 血小板粘着能および活性化の簡易定量的評価方法の確立

生体内における血小板の最も重要な役割は血栓形成および止血能であり、破綻血管・組織の細胞外基質—血小板粘着という過程がもっとも重要となる。幹細胞の分化誘導によって得られた血小板の凝集能および粘着機能を簡便かつ定量的に評価・測定するシステムを確立することを目的とする。

臨床検査分野において血小板機能の評価は主に 1) 凝集能評価 2) 粘着能評価が用いられている。凝集能の評価には濃厚血小板溶液に凝集惹起物質を加えて攪拌させた後にレーザー散乱光や、光透過性を用いて血小板凝集塊の形成程度をみる方法がある。粘着能評価のためには、血小板液を規定ガラスビーズカラム内に通過させ、その前後で血小板濃度差をもって、カラム内に粘着した血小板数の程度を評価する。

これらの方法も簡便ではあるが、in vivo での血小板動態を予測するには不十分であり、実際に異物や、細胞外基質と接着した際、個々の血小板機

能を評価しなければならない。

血小板は異物と接触し、粘着、接着という過程を経て血栓を形成し、その中で大きな形態変化を遂げる。Resting では球形であるが、粘着後は偽足を形成し、活性化に伴いさらに伸展、アメーバ一状の形態を取る。細胞外基質との接着より引き起こされるこの一連の反応を、簡便に観察し、定量的に評価するための方法について検討した。

② 血小板長期保存を目的とした医療材料開発および保管条件の検討

輸血用血液製剤として血小板を使用する場合、生体内とは異なる観点からの機能評価が必要となる。個々の血小板の分子生物学的な解析のみならず、濃厚血小板【溶液】としての挙動状態を評価しなければならない。現在、我が国では輸血用血液製剤による細菌感染症予防の目的で、献血者からの採血後の血小板有効期限は 72 時間と、欧米の 120 時間と比較して短くなっている。また、輸血用血液製剤の安全性向上のために HIV, HBV, HCV を対象とした核酸増幅検査導入以降、血小板製剤の実質有効期限は医療現場において 48 時間未満と極めて短く、血小板需給調整を困難にさせる一因となっている。

幹細胞分化から得られた血小板製剤は、外来微生物の contamination による製剤汚染の可能性が極めて低いと考えられ、より長時間の製剤保存が期待される。幹細胞誘導により得られた血小板液を輸送・保管する際には、保存期間延長を念頭に置き、現在よりも抗血栓性に優れた医療用素材

(biomaterial)の開発も必須事項となる。保管用材料には1. 接触により血小板を活性化させないこと 2. 素材から有害成分の溶出を認めないこと 3. 軽量かつ安価であること、等が要求される。

炭素(カーボン)は、生体適合性に優れ加工も容易であることから、医療材料として広く使用されている。1970年代に開発された diamond-like carbon (以下 DLC と略)は、医療材料表面のコーティング剤として注目され、臨床応用が期待されつつある。DLC とは、ダイヤモンドとグラファイトの中間の性質をもつ炭素-水素を基本とする非結晶(アモルファス)の総称で、これは薄い膜状の構造をとり得ることから材料表面へのコーティングが可能である。文字通りダイヤモンドの優れた性質を保持し、安定的構造、耐磨耗性、耐腐食性を有する。金属基板材料上を覆うことにより新しい性能を獲得し、既に数々の工業製品に使用されている。

DLC 膜にはガスの透過を阻止するガスバリア性があることが知られており、食品業界でも注目されている。例えば、PET ボトルの内面に DLC コーティングを施し緻密な炭素膜を蒸着させることにより、内容物の品質の劣化を防ぐことができる。DLC の上記の応用に関しては、その安全性が既に確認され、平成 14 年 1 月に FDA(米国連邦食品医薬品局)が認可している。コーティング法としては、化学真空蒸着法(CVD 法)が用いられる。真空状態のチャンパー内にメタンやアセチレンなどの炭化水素ガスが導入され、RF プラズマを発生させる結果生成される炭化水素イオンや励起されたラジカルが、基板(コーティングされる製品)に衝突し、固体化、膜が生成される。材料が一般的な気体のために非常に安価でコーティングが可能なる点も注目される。また、DLC 製膜の際に他の気体成分を混入することにより、新たな性質を獲得させることも可能である。

生体医用材料の分野では、表面に DLC 加工を施した金属ステント、歯科口腔領域材料、人工臓器などに用いられる高分子素材へのコーティングとしての利用が検討されている。今回我々は DLC 膜に着目し、血小板-DLC の相互関係および臨床応用への検討を行うことを目的とした。

B: 研究方法

* 血小板接着基板

血小板の粘着能の評価基準基板として、医用材料に広く用いられている polycarbonate (PC) を使用した。血小板保存保管容器の素材としては、抗血栓性が期待されている DLC coating Polycarbonate、および新規材料のフッ素添加 DLC (F-DLC) coating PC を用いた。なお、DLC

加工基板類は慶應義塾大学理工学部機械工学科、鈴木哲也助教授より供与いただいた。

* 血小板活性化評価

血小板粘着、活性化の評価には、同意の得られた正常健康人ボランティアから静脈穿刺により採血、調整した濃厚血小板溶液を使用した。規定量の PRP に各種基板を 30 分間、37℃、CO₂ 5% 下で incubation した。その後試料に付着した血小板を固定・脱水処理し、付着血小板の個数および形態変化について観察、評価した。

* 吸着タンパク量測定

医療材料表面のタンパク質の吸着の実験には、牛由来のアルブミンとフィブリノーゲンを用い、生理濃度のそれぞれの溶液内でサンプルを培養した(CO₂ 5%, 37℃, 60min)。その後、サンプル表面に吸着したタンパク質を溶離し、micro-BCA assay を用いて吸着タンパク量を測定した。

C: 研究結果

1. 各種基板と血小板接着および活性化について検討を行った。

各基板上、単位面積 1500 μm² 当たり表面に付着、活性化した血小板を走査型電子顕微鏡により観察、分析した。その結果、PC 基板>DLC 膜>F-DLC 膜の順で付着血小板の数が減少した (Fig.1) 本図表は、SEM を用いた画像を提示したが、工業用の実体顕微鏡(微分干渉装置付)にて同様の結果を得た。これは非常に簡便な方法であり、不透明材料表面上の細胞接着評価にも利用可能であった。

付着血小板の活性化評価には血小板の形態変化を 5 段階に分類する手法 (Goodman SL, et al., J. Biomed. Mater. Res. 23 (1989) 105) にもとづき、独自の式(活性化指数 (Activation Index))を考案し、定量的に算出した。

活性化指数(AI)

$$AI = \frac{1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4 + 5 \times N_5}{N_{all}}$$

式中の N_{all} は付着血小板すべての個数を表し、N_i は 1 から 5 までのグレードの活性化血小板それぞれの数を表す。その結果、活性化指数は血小板付着数と同様に PC 基板>DLC 膜>F-DLC 膜の順で減少した (Fig.2)。

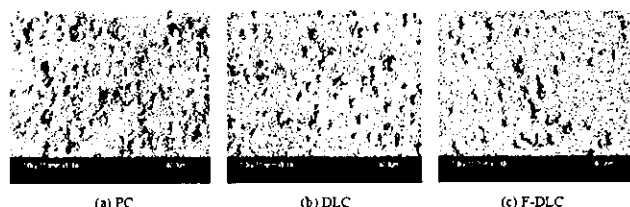


図3 サンプル表面に付着した血小板の様子

<Fig2>
各種基板接着血小板数および活性化度

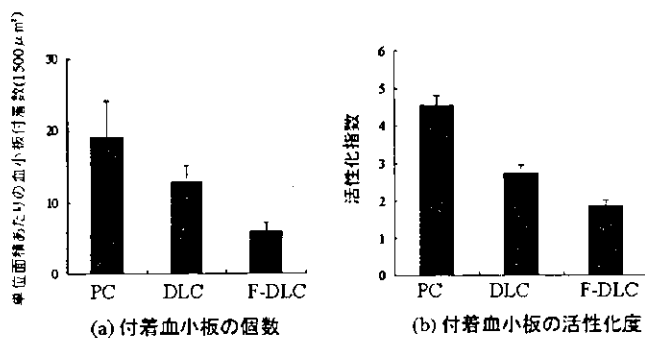
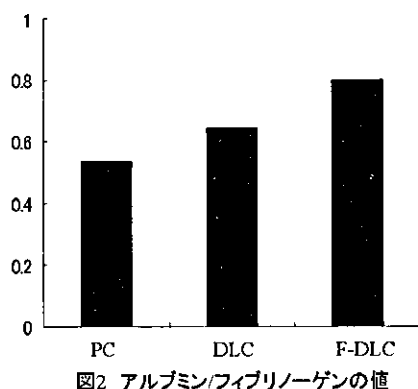


図4 サンプルに付着した血小板の個数と活性化度

次に、サンプル表面に吸着したタンパク質量の比、アルブミン/フィブリノーゲンの値を示す。一般的にアルブミンは血小板の付着および活性化を抑制し、一方、フィブリノーゲンは促進するといわれている。従って、フィブリノーゲンに対するアルブミンの比を取ることで、サンプル表面における血小板の付着および活性化と吸着タンパク質量の関連性が明らかとなる。PC<DLC<F-DLCの順でアルブミン/フィブリノーゲン比が増加していることが示された(Fig3)

<Fig3>
各種基板表面におけるアルブミン・フィブリノーゲン吸着量比



D : 考察

幹細胞分化によって得られた血小板の機能を評価するためには、従来臨床検査で用いられている手法のみでは不十分であり、実際の粘着過程を評価する必要がある。今回われわれの用いた方法、および活性化指数を導入することで、血小板の分子細胞生物学的評価だけでなく、生体内で十分に機能できるかどうか、という評価を行うことが可能となる。

血小板は非常に小型であるために、汎用されている生物用光学顕微鏡では微細形態を観察することが困難であったが、今回の研究により走査型電子顕微鏡を用いずに簡便に観察を行うことが可能となった(投稿準備中)。これは血小板保存のみならず、生体内埋め込み用デバイスをはじめとした、すべての医療用素材評価にも応用可能である。今後、活性化指数のパラメータを変更改良することで、血栓系性能等の評価をも可能にする算出式の検討を行う必要があると考える。

Diamond like carbon にフッ素を加えた F-DLC の医療応用への試みは本研究が初の報告であり、血小板付着数の減少、ならびにその活性化をも抑制することを示した。この抗血栓性のメカニズムのひとつに、material 表面へのアルブミン・フィブリノーゲン吸着比の変化が関与することを明らかにした。DLC のみならず、F-DLC 膜は血液接触性の医療用治療具、カテーテル、その他インプラントの抗血栓性改善策として非常に有望なコーティング材料と考えられた。

E : 結論

幹細胞誘導血小板機能をより生理的条件下で簡便に、定量的に評価する系を確立した。また、製剤の長期保存を見据えた新規医療用材料の開発検討に関与し Diamond like carbon や、フッ素添加の diamond like carbon の有用性を示した。

F : 研究発表

1. 論文発表

Saito T, Hasebe T, Yohena S, Matsuoka Y, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films. *Diamond & Related Materials*, in press

2. 学会発表

<国際学会>

• Platelet attachment and activation and protein adsorption on diamond-like carbon (DLC) and Fluorinated DLC coatings for blood-contacting medical devices

T. Hasebe, S. Yohena, T. Saito, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki
8th International Mini-Symposium on Diamond Electrochemistry, 21st Century COE KEIO-LCC International Symposium

• Fluorinated diamond-like carbon films for blood-contacting medical devices

S. Yohena, T. Hasebe, T. Saito, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki
GRIBOI2005: 15th Interdisciplinary Research