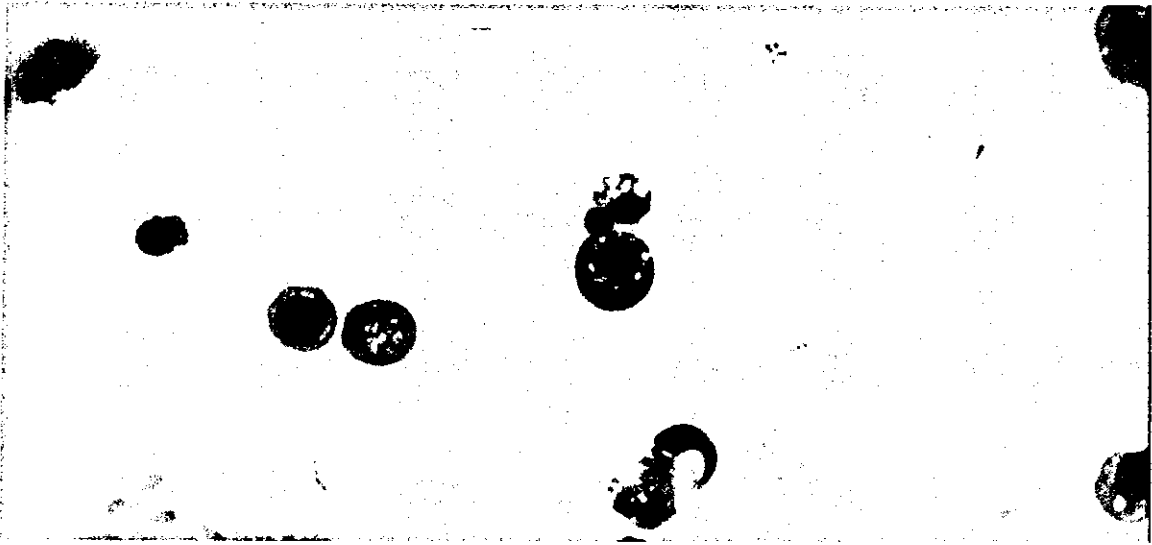


(資料5) ヒトES細胞由来赤血球

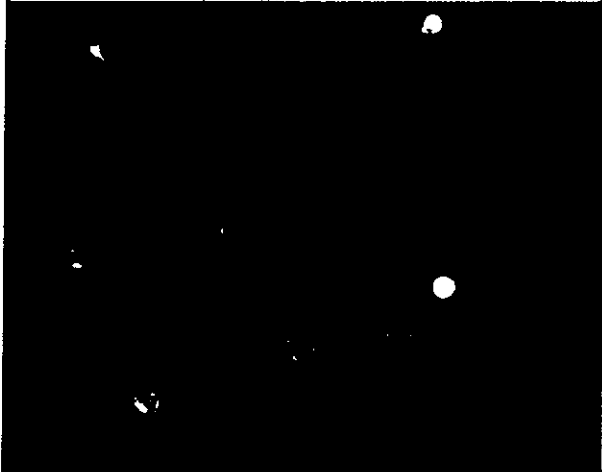


(資料6) ヒト ES 細胞由来赤血球における成人型ヘモグロビン

ヒト ES 細胞由来赤血球



成人型ヘモグロビンを有する
ヒト ES 細胞由来赤血球





II. 分担研究報告

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)
分担研究報告書

ヒト胚性幹細胞の分化の分子生物学的解析

分担研究者 河崎裕英 東京大学医科学研究所
附属病院 小児細胞移植科・助手

研究要旨

マウス胎仔肝由来ストローマ細胞のヒト造血細胞に対する作用を解析するために、ヒト ES 細胞と同じく、胎生期を起源する臍帯血中の未分化造血細胞分画である CD34+細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養した。SCF、IL-7、IL-15 存在下で共培養すると、培養初期には、種々の血液細胞が増殖するが、培養4-6週後には、ほとんどの細胞が肥満細胞とNK (natural killer)細胞となった。また、臍帯血中には、肥満細胞とNK細胞へのみ分化可能な前駆細胞が存在することが明らかとなった。以上の結果は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞から、肥満細胞やNK細胞へも分化誘導できる可能性を示唆するものであり、これらの純化された肥満細胞やNK細胞は、アレルギー研究や創薬、新たな免疫細胞療法に有用であると考えられた。

A. 研究目的

主任研究者の研究成果より、ヒト ES 細胞は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養により、成熟血液細胞への分化誘導が可能であった。そこで、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞の造血細胞に対する作用をさらに詳細に研究するために、ヒト ES 細胞と同じく、胎生期を起源する臍帯血中の未分化造血細胞分画である CD34+細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、産生される細胞の性状を検討した。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34+細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養
臍帯血単核球から、FACS (蛍光活性化細胞分離装置)を用いて、CD34+細胞を分画し、SCF、IL-7、IL-15 存在下で、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養した。この培養系により、産生される細胞を、形態学的観察、フローサイトメトリー、免疫化学的方法により、経時的に解析した。

2. CD81 を用いた臍帯血 CD34+細胞の亜分画とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養における分化能の検討

CD81 は、赤血球を除く全ての血液細胞に発現されている分子で、細胞接着、遊走、分化、増殖等、様々な生物反応に関与することが知られている。そこで、臍帯血 CD34+細胞を、CD81 の発現により亜分画し、それぞれの亜分画を、SCF、IL-7、IL-15 存在下で、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養し、その分化様式を検討した。

(倫理面への配慮)

臍帯血を採取するにあたっては、母親に、妊娠時より、研究の目的、個人情報厳格に守秘されること、提供を拒否しても、何ら不利益は被らないこと等を十分に説明し、同意を得た。

C. 研究成果

1. 臍帯血 CD34+細胞とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養

培養初期には、種々の造血細胞が一過性に増加したが、それらの細胞は次第に減少し、培養4週間目頃には、培養細胞の多くは、形態学的には、肥満細胞と NK 細胞で占められるようになった(資料1)。肥満細胞は、免疫学的染色により、tryptase 陽性の顆粒を多数有することにより確認された(資料2)。また、NK 細胞は、フローサイトメトリーにおいて、CD56+/CD3-であることにより確認された(資料3)。

2. CD81 を用いた臍帯血 CD34+細胞の分画とマウス胎仔肝由来ストローマ細胞の共培養における分化能

臍帯血 CD34+細胞を CD81 の発現により亜分画すると、CD34+CD81+ (R1: 56.1 ± 6.2%)、CD34+CD81high (R2: 7.5 ± 4.6%)、CD34lowCD81+ (R3: 21.2 ± 5.1%) の3分画に分けられた(資料4)。これらの3分画を、それぞれ、SCF、IL-7、IL-15 存在下で、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、全分画から、肥満細胞と NK 細胞が産生されたが、CD34+CD81high 分画からは肥満細胞と NK 細胞のみが産生された。このことは、臍帯血中には、肥満細胞と NK 細胞にのみ分化するよう運命付けられた前駆細胞が存在することを意味しており、本培養法により、ヒト ES 細胞から、純化された肥満細胞や NK 細胞が作製することができる可能性を示唆するものと考えられた。

D. 考察

臍帯血は、ヒト ES 細胞と同じく、胎生期に起源を有する細胞で、ヒト ES 細胞の分化誘導を研究するうえで、よいモデルになると推測された。

そこで、ヒト臍帯血中の未分化な造血細胞分画である CD34+細胞を、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、SCF、IL-7、IL-15 存在下では、培養4-6週後には、ほとんどの細胞が肥満細胞と NK 細胞となった。特に、CD34+CD81high 分画からは、肥満細胞と NK 細胞のみが産生されたことより、この分画には、肥満細胞と NK 細胞にのみ分化するよう運命付けられた前駆細胞が存在することを意味しており、このことは、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞から、純化された肥満細胞や NK 細胞だけを産生できる

可能性を示唆すると考えられた。もし、ヒト ES 細胞から、純化された肥満細胞を産生することができれば、アレルギー研究や創薬のための有用な細胞ソースと考えられた。また、純化された NK 細胞は、ヒト NK 細胞の免疫能の解析や、新たな免疫細胞療法の開発に有用であると考えられた

E. 結論

ヒト ES 細胞と同じく、胎生期を起源する臍帯血中の未分化造血細胞分画である CD34+細胞を、SCF、IL-7、IL-15 存在下で、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞と共培養すると、培養4-6週後には、ほとんどの細胞が肥満細胞と NK 細胞となった。また、臍帯血中には、肥満細胞と NK 細胞へのみ分化可能な前駆細胞が存在することが明らかとなった。以上の結果は、マウス胎仔肝由来ストローマ細胞との共培養系により、ヒト ES 細胞から、肥満細胞や NK 細胞へも分化誘導できる可能性を示唆するものであり、これらの純化された肥満細胞やNK細胞は、アレルギー研究や創薬、新たな免疫細胞療法に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia.

Hasegawa D, Manabe A, Kubota T,

Kawasaki H, Hirose I, Ohtsuka Y, Tsuruta T, Ebihara Y, Goto Y, Zhao XY, Sakashita K, Koike K, Isomura M, Kojima S, Hoshika A, Tsuji K, Nakahata T:

Br J Haematol, in press.

CD7/CD13 陽性急性分類不能型白血病.

長谷川大輔、真部淳、鶴田敏久、大塚欣敏、海老原康博、河崎裕英、有瀧健太郎、松浦恵子、星加明德、辻浩一郎：
日小血会誌 18：155-159, 2004.

後天性サイトメガロウイルス感染症小児に合併した免疫学的血小板減少性紫斑病.

河崎裕英、峰研治、野田幸弘、中野崇秀：

日小血会誌 18：561-565, 2004.

2. 学会発表

Bisphosphonate Zoledronic acid (ZOL) inhibits the abnormal proliferation and differentiation of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) cells.

Ohtsuka Y, Manabe A, Kawasaki H, Watanabe S, Zaike Y, Hasegawa D, Miyazaki T, Tanizawa T, Nakahata T, Tsuji K:

46th Annual Meeting, American Society of Hematology,

San Diego, December 4-7, 2004.

The effect of prolactin on the proliferation and differentiation of erythroid progenitors from hematopoietic stem cells in Diamond-Blackfan anemia.

Kawasaki H, Noda Y, Nakano T, Kobayashi Y, Tsuji K:

9th Congress of the European Hematology Association, Geneva, June 10-13, 2004.

小児骨髄異形成症候群 (MDS) 及び若年性骨髄単球性白血病 (JMML) における p15 メチル化の検討

長谷川大輔、真部淳、久保田健夫、河崎裕英、大塚欣敏、磯村万理子、小島勢二、辻浩一郎、中畑龍俊 :

第 46 回日本血液学会
京都、2004 年 9 月

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) におけるビスフォスフォネート製剤の検討

大塚欣敏、真部淳、長谷川大輔、河崎裕英、辻浩一郎 :

第 46 回日本臨床血液学会
京都、2004 年 9 月

非血縁者間同種骨髄移植後の再発に対してドナーリンパ球輸注 (DLI) を行った 3 例

河崎裕英、大塚欣敏、長谷川大輔、鶴田敏久、真部淳、海老原康博、辻浩一

郎 :

第 46 回日本小児血液学会
京都、2004 年 11 月

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病 (Ph+ ALL) の治療 : TCCSG L99-15

真部淳、河崎裕英、矢部普正、小原明、高橋浩之、生田孝一郎、斉藤友博、土田昌 :

第 46 回日本小児血液学会
京都、2004 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

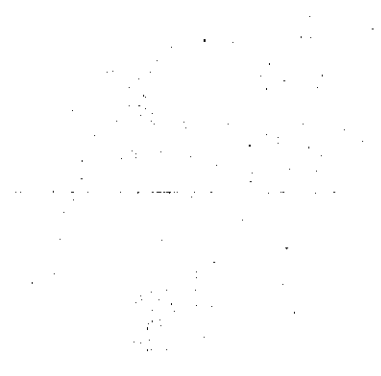
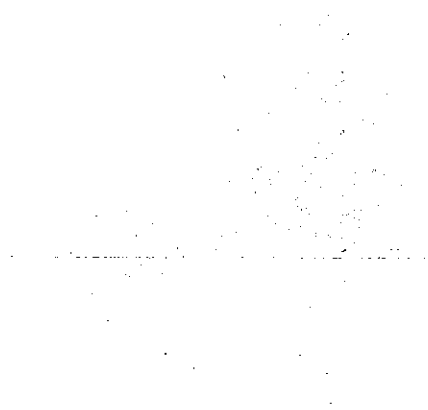
1. 特許取得
該当なし。

2. 実用新案登録
該当なし。

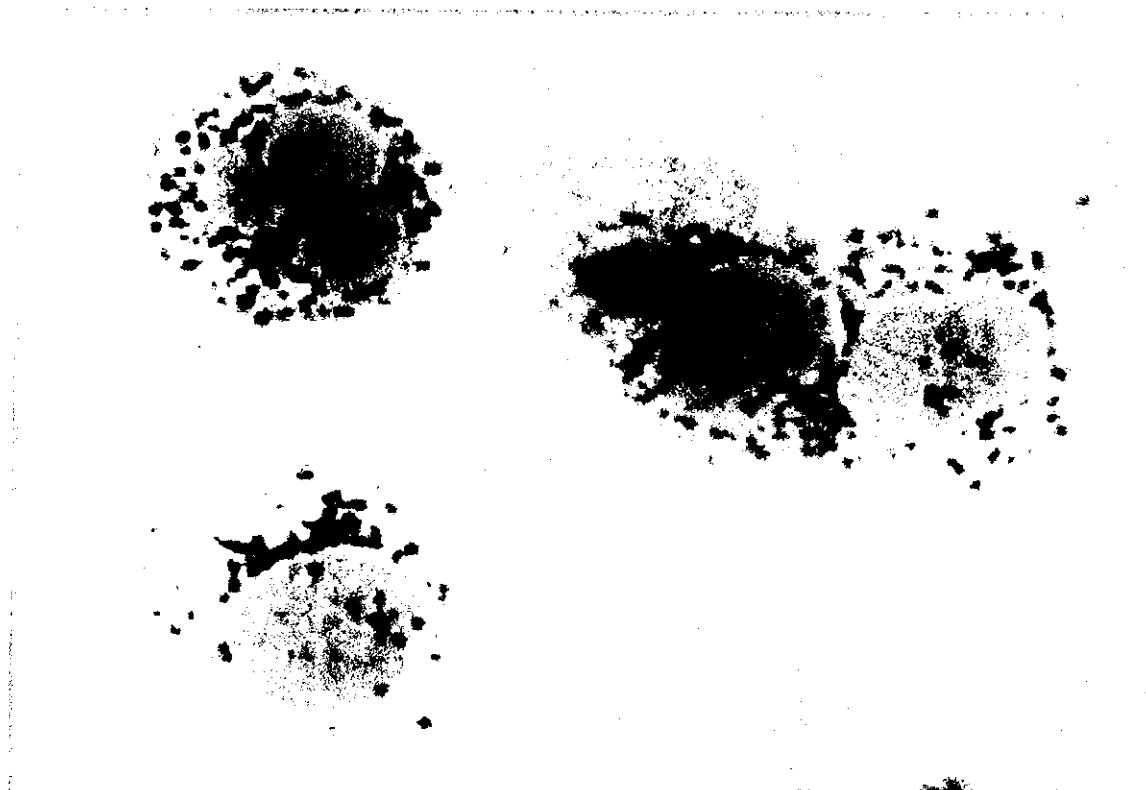
3. その他
該当なし。

(資料1) ヒト臍帯血 CD34+細胞から分化誘導された肥満細胞とNK細胞

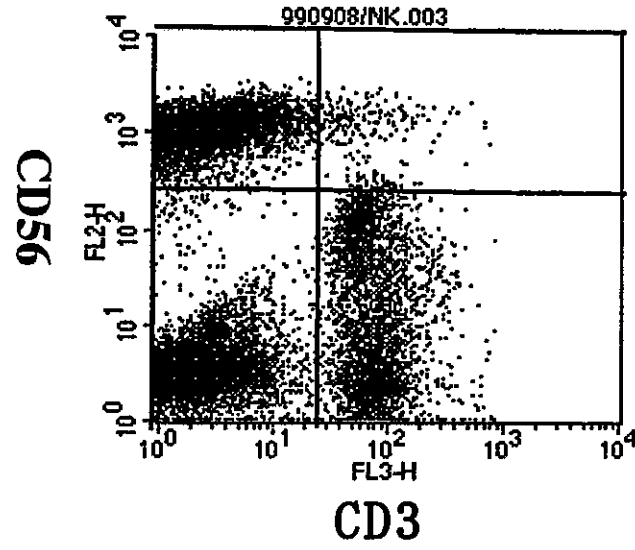




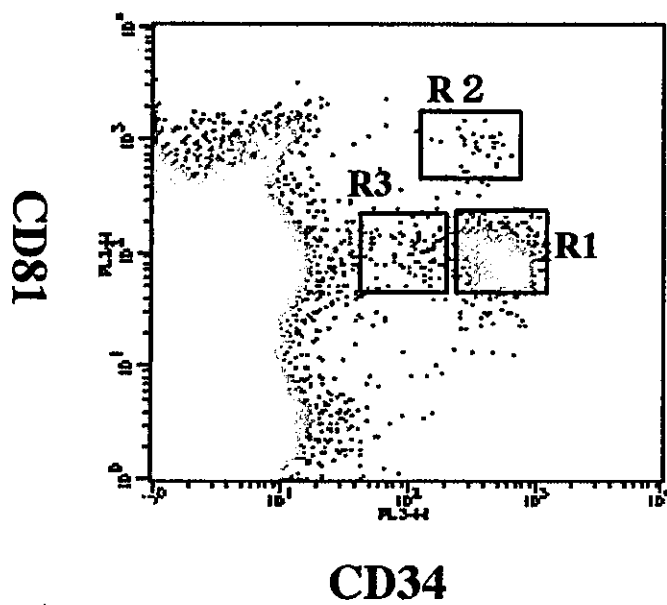
(資料2) tryptase を発現する顆粒を多数有する肥満細胞



(資料3) ヒト臍帯血から産生された CD56+CD3- NK 細胞



(資料4) 臍帯血単核球における CD34 と CD81 の発現



Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

