

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390327
 研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の造血支持能を利用した放射線造血障害の再生治療法の開発
 研究課題名（英文） Placental/Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stroma cells support the hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34⁺ cells.
 研究代表者
 柏倉 幾郎（KASHIWAKURA IKUO）
 弘前大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号：00177370

研究成果の概要：

放射線非照射及び照射 CD34 陽性細胞（ヒト造血幹・前駆細胞）を、臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞と共培養することにより、サイトカイン単独での培養に比べ有意に高い細胞増殖及び未分化維持といった造血支持能が示された。サイトカインを共培養開始 16 時間後に添加すると、照射細胞はストローマ非存在下培養では著しく造血が低下したが、共培養では同時添加した場合と同等の造血が認められた。この時、共培養上清中のヒアルロン酸は顕著に増加し、一方硫酸化グリコサミノグリカンはストローマ非存在下放射線照射細胞単独培養で有意に増加した。同様に幾つかのサイトカイン産生も放射線照射細胞単独培養で増加した。以上の結果から、間葉系幹細胞様ストローマ細胞は放射線曝露ヒト造血幹・前駆細胞の造血再生に有用であることが明らかとなった。この時、造血幹/前駆細胞とストローマ細胞との接触刺激が重要であると共に、細胞外マトリックス成分産生が大きく関与している可能性が示唆された。また、本研究の関連成果が 2 件の特許出願に繋がった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：間葉系幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞、放射線、臍帯血

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、骨髄や臍帯血中にごくわずかに存在する未分化の細胞で、増殖能と共に骨細胞、軟骨細胞、筋肉細胞、脂肪細胞等への分化能を有している。さらに、造血幹細胞の造血を支持・促進し、造血幹細胞移植時に生着促進・生着不全防止を目的に間葉系幹細胞の同時移植が行われ、効果を上げている。一方、造血・免疫システムは放射線や抗がん剤に対し極

めて感受性が高いため、放射線や抗がん剤によるがん治療における副作用としてしばしば骨髄抑制が生じ、治療上の dose limiting factor となっている。即ち放射線被曝事故においても同様に、造血・免疫システムの維持・再生は生命活動や QOL の向上において最優先課題である。そこで、間葉系幹細胞の造血支持・促進能を利用することは、造血幹細胞を増幅して血球減少症回避を図る治療が可能となり、さらには血小板や好中

球など特定の血球を特異的に増幅させることも可能となる。

2. 研究の目的

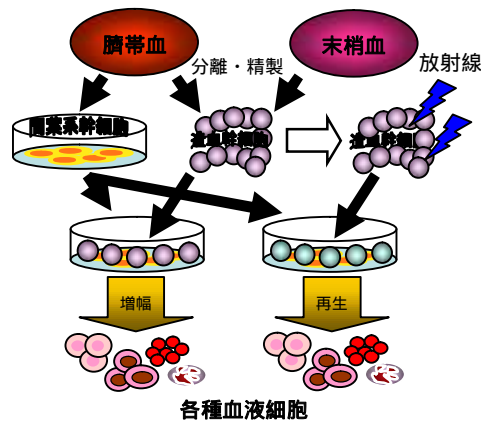
本研究では、放射線曝露が予想される場合や、放射線造血障害状態に陥った個体自身の造血幹細胞から、造血幹・前駆細胞の再生を想定して、間葉系幹細胞を用いた新たな細胞治療方法を開発する事を目的とする。そこで、ヒト臍帯血から安全かつ効率的な間葉系幹細胞の樹立方法の確立を行い、次に間葉系幹細胞を用いた造血幹細胞や前駆細胞及び成熟機能血液細胞を短期間に効率良く生体外で増殖させるシステムを確立し、放射線曝露に伴う血球減少症の治療方法開発を目指す。

3. 研究の方法

本申請研究課題を遂行するためには、

- 1) 臍帯血からの間葉系幹細胞の安全、安定的かつ効率的な樹立方法の確立
- 2) 間葉系幹細胞の造血支持・促進能を利用した造血幹・前駆細胞や各種成熟血液細胞の増幅方法の確立

の2点が重要課題となる。



研究方法の概要図

これら課題を解決する為以下の検討を行った。

造血幹細胞の分離とその特徴 - 臍帯血及び末梢血の違いについて、間葉系幹細胞と非曝露造血幹細胞との至適共培養条件、増幅に必要なサイトカインの種類、添加量、培養期間等、臍帯血、末梢血由来造血幹細胞の放射線感受性と線量依存性、放射線曝露造血幹細胞の間葉系幹細胞に与える影響及びその場合の至適共培養条件、増幅された血球の機能評価、血球分画解析及び正常血球との比較、巨核球・血小板造血を促進するために、巨核球前駆細胞、成熟巨核球及び血小板を特異的に増幅するための方法を確立する。

4. 研究成果

1) 放射線曝露ヒト造血幹細胞の造血回復に及ぼす臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞の関与

サイトカイン存在下臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞と2 Gy放射線曝露ヒトCD34⁺造血幹細胞との無血清共培養を行い、その有用性について検討した。その結果、細胞数及び未熟な細胞であるCD34⁺細胞やCD34⁺/CD38⁻細胞数もストローマ細胞非存在下での培養に比べ有意に増加した(Figs. 1, 2)。さらに骨髓系造血前駆細胞(colony forming cell, CFC)数の有意な増加が観察された(Fig. 3)。さらにCFCを構成する白血球系前駆細胞(colony forming unit-granulocyte-macrophage, CFU-GM)、赤血球系前駆細胞(burst forming unit erythroid, BFU-E)及び混合系前駆細胞(colony forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte, CFU-Mix)もそれぞれ有意に増加した。このとき、共培養の培地中には顕著なサイトカインの産生が認められたが、放射線非照射及び照射細胞との共培養との間に差は認められなかった。また照射細胞をストローマ細胞と16時間接触後サイトカインを添加すると、ストローマ非存在下での非照射細胞の培養と同等の造血が観察された。以上の結果から、ヒト臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞の放射線曝露造血幹/前駆細胞の造血回復への効果が示され、特に細胞間接触が大きな役割を果たしていることが示唆された。

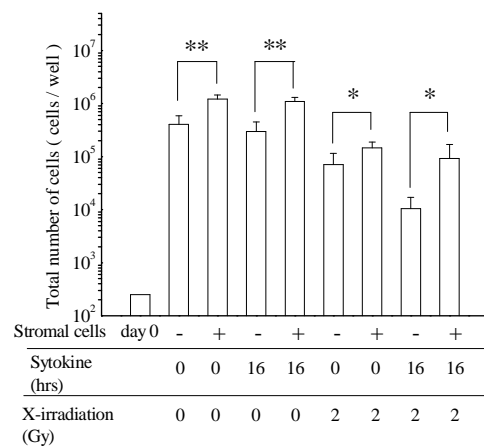


Fig. 1. The total number of cells generated in the liquid culture with or without stromal cells. Freshly prepared CB/CD34⁺ cells were cultured with a combination of TPO + IL-3 + SCF in either stroma-free cultures or with stromal cells for 14 days. Values represent the means ± SD of four to five separate experiments. * P < 0.05. ** P < 0.01.

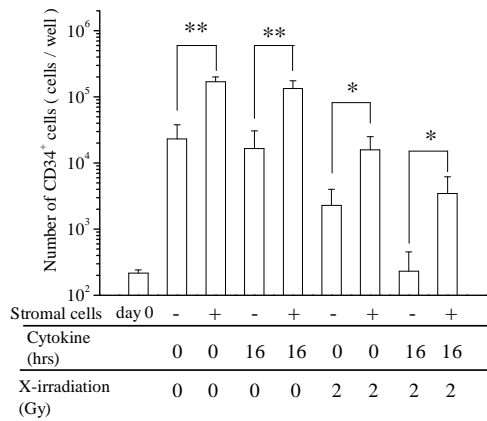


Fig. 2. The number of CD34⁺ cells generated in a liquid culture with or without stromal cells. Values represent the means \pm SD of three to four separate experiments. * P < 0.05. ** P < 0.01.

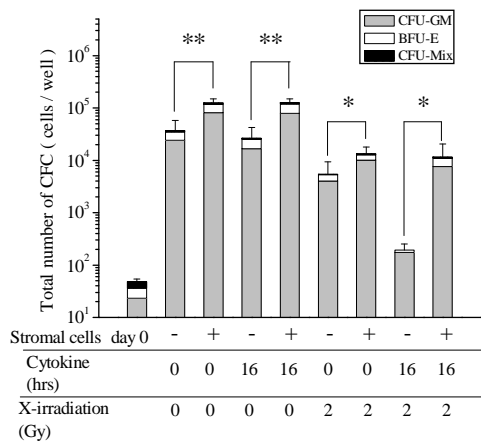


Fig. 3. The number of total CFC generated in a liquid culture with or without stromal cells. The cells harvested from the culture were assayed for the number of CFU-GM, BFU-E and CFU-Mix using a methylcellulose culture. Values represent the means \pm SD of four to five separate experiments. * P < 0.05. ** P < 0.01.

2) 放射線曝露ヒト造血幹細胞と臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマ細胞との共培養に及ぼすグリコサミノグリカンの作用

ヒト CD34 陽性細胞とストローマ細胞との共培養により、培養上清中のヒアルロン酸は顕著に増加した (Fig. 4)。一方、硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) は放射線非照射細胞に比較してストローマ非存在下放射線照射 CD34 陽性細胞単独培養で有意に増加した (Fig. 5)。同様に IL-6, G-CSF 及び GM-CSF 等のサイトカイン産生も放射線照射 CD34 陽性細胞単独培養で検出された。以上の結果から、間葉系幹細胞様ストローマ細胞はヒト放射線曝露 CD34 陽性細胞の造血再生において有用であることが明らかとなった。この培養下では、造血幹/前駆細胞とストローマ細胞との接触刺激が重要であると共に、細胞外

マトリックス成分であるグリコサミノグリカン産生が大きく関与している可能性が示唆された。

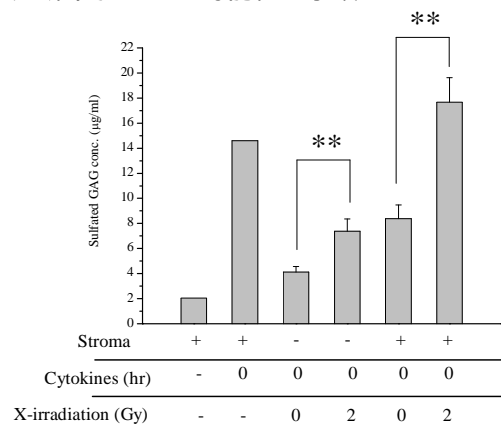


Fig. 4. The sulfated GAG concentration detected in the supernatants released from the cultures with or without stromal cells. ** P < 0.01.

3) ヒト造血幹細胞の生体外増幅に及ぼすプロテオグリカンの作用

ヒト造血幹細胞の効率的な生体外増幅を目的に、細胞外マトリックスの主要構成成分であるプロテオグリカン (PG) の作用を、サケ鼻軟骨 PG 及びクジラ PG を用いて検討した。トロンボエチン (TPO) 及びインターロイキン-3 (IL-3) を含む無血清培地で 14 日間培養した。その結果、細胞数は培養開始時の 80 倍 ~ 300 倍と急激に増加するが、その程度は TPO と IL-3 の濃度に依存した。低濃度の TPO (5, 0.5 ng/ml) + IL-3 (10, 1 ng/ml) において、PG による増殖促進作用 (コントロール比 1.3 倍 ~ 2.4 倍) が観察された。同様な傾向は血小板数でも見られたが、特にクジラ PG で強い促進作用が認められた。クジラ PG は 4 硫酸糖が主であるのに対し、サケ PG は 6 硫酸糖が主である (Table 1)。従って、PG の構造の差がクジラ PG のヒト巨核球・血小板造血促進作用に大きく関与している可能性が推察された。

Table 1 The composition GAG of PG extracted from the nasal cartilage of salmon heads and the nasal septum cartilage of a whale

Molecular kind of GAG	Contents of PG (%)	
	Salmon	Whale
6-sulfated UDU	59.4	22.9
4-sulfated UDU	25.1	71.2
Non-sulfated UDU	15.1	5.1
Di-sulfated UDU	0.4	0.8

Each value was analyzed by Chondroitinase ABC digestion and HPLC. UDU (unsaturated disaccharide units).

4) ヒト末梢血造血前駆細胞の放射線感受性の個体差

各種血球は造血幹細胞から造血前駆細胞を経て産生される。本研究では、ヒト末梢血に含まれる造血前駆細胞である白血球系前駆細胞 (CFU-GM)、赤血球系前駆細胞 (BFU-E) 及び混合系前駆細胞 (CFU-Mix) の個体差とその放射線感受性の関係を検討し、その感受性に関与する因子について検討した。その結果、ヒト末梢血有核細胞に含まれる 1×10^5 cells あたりの造血前駆細胞数には約 10 倍の個体差を認めた。さらに、ヒト末梢血中の造血前駆細胞数の放射線感受性にも大きな個体差が認められた。この時、造血前駆細胞の放射線感受性と抗酸化・ラジカル消去作用を示す生体成分である尿酸、ビリルビン及び細胞内グルタチオン濃度との間に関連性は見られず、各個体の造血前駆細胞の放射線感受性にこれら生体成分の関与は小さい可能性が示唆された。一方、各造血前駆細胞の D_0 値と各照射線量における各前駆細胞の生存率との相関を検討すると、ヒト末梢血中の造血前駆細胞の放射線感受性は、4 Gy 照射で推定出来る可能性が示唆された。

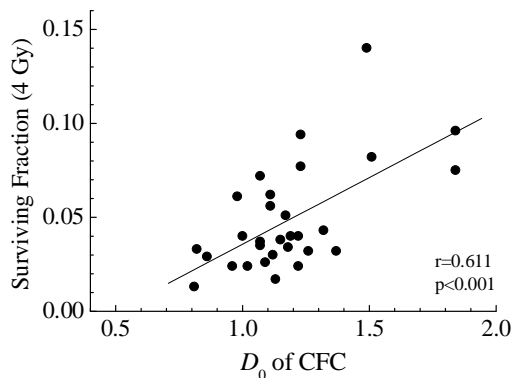


Fig. 5. The relationship between the surviving fraction of each progenitor cell and the D_0 of each progenitor cell. D_0 of CFC and the surviving fraction at 4 Gy (n=30).

5) ヒト巨核球・血小板造血におよぼす重粒子線の作用とその再生

放射線災害や宇宙空間での粒子線の被ばくなどの避けることができないリスクが存在するが、粒子線に対する造血システムへの影響はほとんど検討されていない。本研究では、X 線に比べ高 LET 放射線である重粒子線を用い、造血系の中でも放射線感受性が高いヒト巨核球・血小板造血に対する作用とその再生について検討した。その結果、造血前駆細胞による巨核球分化誘導および血小板産生において、重粒子線は非常に高い感受性を示し、X 線からの放射線防護に有効なサイトカイン処理では十分な防護効果が得られないため、新たな対処方法を検討する必要がある。重粒子線に対する新たな対処方法は、わずかな防護効果が得られた「TPO +

SCF + IL-3」と「TPO + SCF + FL」の組み合わせをさらに発展させることから生み出される可能性が示された。「TPO + SCF + IL-3」あるいは「TPO + SCF + FL」のサイトカインの組み合わせでは、十分な血小板が得られない可能性があることから、誘導効率の高い「TPO + IL-3」の組み合わせを併用することで、重粒子線に曝露された造血前駆細胞から巨核球・血小板産生を回復する可能性が考えられた。サイトカインによって DNA 損傷に対する応答が異なることから、損傷修復においてもサイトカインが促進作用を及ぼす可能性が示唆された。

Table 2 Effect of cytokines on the in vitro radiation response of $CD34^+$ CFU-Meg

Cytokines	D_0	
	X rays	Carbon ions
TPO	0.79 ± 0.07	0.41 ± 0.02
TPO + G-CSF	0.99 ± 0.09	0.40 ± 0.05
TPO + IL6	0.90 ± 0.11	0.39 ± 0.05
IL3 + SCF	1.13 ± 0.11 ^c	0.38 ± 0.04
TPO + IL3	1.14 ± 0.08 ^a	0.40 ± 0.33
TPO + SCF	1.18 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.05
TPO + SCF + IL3	1.12 ± 0.07 ^a	0.71 ± 0.16 ^a
TPO + SCF + FL	1.08 ± 0.32	0.71 ± 0.18 ^a

^a $P < 0.005$ compared to TPO alone by *t* test.

^b $P < 0.01$ compared to TPO alone by *t* test.

^c $P < 0.05$ compared to TPO alone by *t* test.

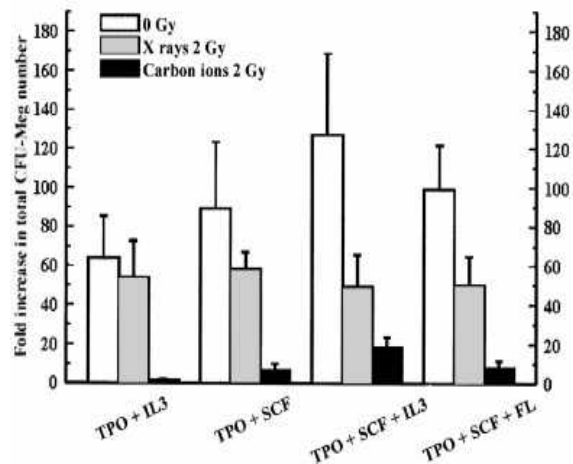


Fig. 6. Total numbers of CFU-Meg generated in liquid culture. $CD34^+$ cells were exposed to carbon ions or X rays and cultured in serum-free medium supplemented with the cytokine combinations. On day 14, the harvested cells were assayed for the numbers of CFU-Meg using a plasma clot technique. The values are the means ± SD of three or four separate experiments.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
〔 雑誌論文 〕 (計 13 件)

- 1) N. Hayashi, K. Takahashi, Y. Abe and I. Kashiwakura. Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stroma cells support the hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34⁺ cells. *Life Sciences*, 84(17-18):598-605 (2009). (査読有)
- 2) D.Y. Yu, Q.L. Zhao, Z.L. Wei, T. Nomura, I. Kashiwakura, T.V. Kagiya, T. Kondo. Enhancement of radiation-induced apoptosis of human lymphoma U937 cells by sanazole. *Apoptosis*, 2009 Mar 4. [Epub ahead of print]. (査読有)
- 3) K. Takahashi, S. Monzen, H. Yoshino, Y. Abe, K. Eguchi-Kasai and I. Kashiwakura. Effects of a 2-step culture with cytokine combinations on megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis from carbon-ion beam-irradiated human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiat Res*, 49(4): 417-424 (2008). (査読有)
- 4) H. Yoshino, K. Takahashi, S. Monzen, I. Kashiwakura. Differential induction from X-irradiated human peripheral blood monocytes to dendritic cells. *J Radiat Res*, (Tokyo), 49(3): 293-303 (2008). (査読有)
- 5) H. Yasui, A. Ogura, T. Asanuma, A. Matsuda, I. Kashiwakura, M. Kuwabara, and O. Inanami. Inhibition of HIF-1 α by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Brit J Cancer*, 99(9):1442-52 (2008). (査読有)
- 6) I. Kashiwakura, K. Takahashi, S. Monzen, T. Nakamura and K. Takagaki. Ex vivo expansions of megakaryocytopoiesis from placental and umbilical cord blood CD34⁺ cells in serum-free culture supplemented with proteoglycans extracted from the nasal cartilage of salmon heads and the nasal septum cartilage of whale. *Life Sciences*, 82(19-20):1023-1031 (2008) (査読有)
- 7) A. Oriya, K. Takahashi, O. Inanami, T. Miura, Y. Abe, M. Kuwabara, I. Kashiwakura. Individual differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *J Radiat Res* (Tokyo), 49(2):113-121 (2008). (査読有)
- 8) K. Takahashi, S. Monzen, K. Eguchi-Kasai, Y. Abe and I. Kashiwakura. Severe damage by heavy ion beam-irradiation on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. *Radiat Res*, 168(5):545-551 (2007). (査読有)
- 9) I. Kashiwakura, K. Takahashi and K. Takagaki. Application of proteoglycan extracted from the nasal cartilage of salmon heads for ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells derived from human placental/umbilical cord blood. *Glycoconj J*, 24(4-5):251-258 (2007). (査読有)
- 10) D. Iizuka, O. Inanami, I. Kashiwakura and M. Kuwabara. Purvalanol A enhances cell killing by inhibiting up-regulation of CDC2 kinase activity in tumor cells irradiated with high doses of X rays. *Radiat Res*, 167(5), 563-571 (2007). (査読有)
- 11) S. Monzen, T. Mori, K. Takahashi, Y. Abe, O. Inanami, M. Kuwabara and I. Kashiwakura. The effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the proliferation and differentiation of human megakaryocytic progenitor cells. *J Radiat Res*, (Tokyo), 47 (2): 213-220 (2006). (査読有)
- 12) I. Kashiwakura, O. Inanami, Y. Abe, K. Satoh, T. A. Takahashi, M. Kuwabara. Regenerative induction of megakaryopoiesis and thrombopoiesis in vitro from X-irradiated CD34⁺ cells prepared from human placental and umbilical cord blood. *Radiat Res*, 166(2): 345-351 (2006). (査読有)
- 13) I. Kashiwakura, T. Teramachi, I. Kakizaki, Y. Takagi, T.A. Takahashi and K. Takagaki. The effects of glycosaminoglycans on thrombopoietin-induced megakaryocytopoiesis. *Haematologica*, 91(4):445-451 (2006). (査読有)

〔 学会発表 〕 (計 14 件)

- 1) K. Takahashi, I. Kashiwakura, S. Monzen, H. Yoshino, Y. Abe, K. Eguchi-Kasai. Effects of high LET-radiation on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. (ISEH 37th Annual Scientific Meeting, Boston, MA, USA, July 9 - 12, 2008).
- 2) K. Takahashi, S. Monzen, I. Kashiwakura. Tie-2-expression controls the radiosensitivity of hematopoietic stem/progenitor cells. 49th Annual Meeting and Exposition of American Society of Hematology (Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2007).
- 3) H. Yoshino, K. Takahashi I. Kashiwakura. Differential Induction from X-irradiated Human Peripheral Blood Monocytes to Dendritic Cells. 13th International Congress of Radiation Research (San Francisco, CA, USA, July 8-12, 2007).
- 4) I. Kashiwakura, K. Takahashi, S. Monzen, K.

- Eguchi-Kasai, T. Toki, Y. Abe. The effects of heavy ion particles on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis. 48th Annual Meeting and Exposition of American Society of Hematology. (Orland, FL, USA, December 9-12, 2006).
- 5) K. Takahashi, I. Kashiwakura, T. Toki, K. Takagaki. The effects of glycosaminoglycans on thrombopoietin-induced megakaryocytopoiesis. 48th Annual Meeting and Exposition of American Society of Hematology. (Orland, FL, USA, December 9-12, 2006).
- 6) 吉野浩教, 高橋賢次, 柏倉幾郎. ヒト末梢血単球由来樹状細胞の分化誘導における放射線の影響. 日本放射線影響学会第 51 回大会(北九州国際会議場, 北九州市, 2008 年 11 月 19 日~21 日).
- 7) 林直樹, 高橋賢次, 柏倉幾郎. 放射線曝露ヒト CD34⁺細胞の造血回復に対する臍帯血由来間葉系幹細胞の関与. 日本放射線影響学会第 51 回大会(北九州国際会議場, 北九州市, 2008 年 11 月 19 日~21 日).
- 8) 勝盛健雄, 林雅子, 高橋賢次, 柏倉幾郎. ヒト末梢血造血前駆細胞の増殖及び誘導好中球の機能に対する放射線の影響と rhG-CSF の作用. 日本放射線影響学会第 51 回大会(北九州国際会議場, 北九州市, 2008 年 11 月 19 日~21 日).
- 9) 加藤健吾, 高橋賢次, 門前暁, 丸山淳史, 伊東健, 柏倉幾郎. ヒト末梢血造血前駆細胞の放射線感受性における Nrf2 の応答. 日本放射線影響学会第 51 回大会(北九州国際会議場, 北九州市, 2008 年 11 月 19 日~21 日).
- 10) 林直樹, 門前暁, 吉野浩教, 高橋賢次, 中村敏也, 阿部由直, 柏倉幾郎. 放射線曝露ヒト造血幹細胞の造血回復に及ぼす臍帯血由来間葉系幹細胞様ストローマの関与. 第 2 回東北糖鎖研究会(弘前大学医学部コミュニケーションセンター, 2008 年 9 月 26 日~27 日).
- 11) 門前暁, 高橋賢次, 土岐力, 伊藤悦朗, 櫻井智徳, 宮越順二, 柏倉幾郎. ヒト CD34 陽性細胞の分化および遺伝子発現に強定常磁場が及ぼす作用. 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会.(ホテル日航高知旭ロイヤル, 高知市, 2008 年 6 月 21 日).
- 12) 林直樹, 高橋賢次, 柏倉幾郎. 間葉系幹細胞の造血支持能を利用した放射線曝露造血幹細胞からの造血再生(千葉市幕張メッセ, 2007 年 11 月 16 日).
- 13) 高橋賢次, 柏倉幾郎. サイトカイン複合培養による重粒子線曝露造血幹/前駆細胞からの巨核球・血小板産生の回復. 日本放射線影響学会第 50 回大会(千葉市幕張メッセ, 2007 年 11 月 16 日).

- 14) 門前暁, 高橋賢次, 阿部由直, 柏倉幾郎. ヒト CD34 陽性細胞における Tie2 の発現と放射線感受性. 第 46 回日本医学放射線学会生物部会学術大会(つくば国際会議場, 2007 年 7 月 21 日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

- (1) 名称: 遺伝子発現の制御方法および造血幹細胞の分化・増幅方法
 発明者: 柏倉幾郎、宮越順二、高橋賢次、櫻井智徳、門前 暁
 権利者: 弘前大学
 種類: 特許権
 番号: 特願 2007-238584
 出願年月日: 2007 年 9 月 13 日
 国内外の別: 国内
- (2) 名称: ヒト細胞の培養地および培養方法
 発明者: 柏倉幾郎、高橋賢次
 権利者: 弘前大学
 種類: 特許権
 番号: 特願 2007-089829
 出願年月日: 2007 年 3 月 29 日
 国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

研究者ホームページ

<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏倉 幾郎

弘前大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号: 00177370

(2) 研究分担者

・高橋 賢次(2006~2008 年度)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教
 研究者番号: 00400143

・阿部 由直(2006~2008 年度)

(「辞退」2009 年 3 月 9 日)

弘前大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号: 10167950

・稲波 修(2006~2007 年度)

北海道大学・獣医学研究科・教授
 研究者番号: 10193559

(3) 連携研究者

・稲波 修(2008 年度)

北海道大学・獣医学研究科・教授
 研究者番号: 10193559