

平成21年 5月14日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19500402

研究課題名(和文) ストローマ細胞表面分子を利用した造血幹細胞の三次元体外増幅法の開発

研究課題名(英文) Development of in vitro expansion method of hematopoietic progenitor/stem cells using surface molecules of stromal cells on three-dimensional scaffold

研究代表者

三好 浩稔(MIYOSHI HIROTOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号:70292547

研究成果の概要:白血病などの重篤な血液疾患に応用することを目的として、生体外の三次元培養系で造血幹細胞を増幅する方法を検討した。この時、造血幹細胞を増幅を支持する機能を持つストローマ細胞に固定処理を行い、固定した細胞上で造血系細胞を培養することで、これらの処理が造血系細胞の増幅におよぼす影響について検討した。その結果、グルタルアルデヒドや有機溶媒で固定することにより、未分化な造血系細胞を効率的に増幅できることがわかった。

交付額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野:再生医工学

科研費の分科・細目:人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード:造血幹細胞、ストローマ細胞、胎仔肝臓細胞、固定、凍結保存、分化・増殖、三次元培養、ティッシュ・エンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病や再生不良性貧血に代表される重篤な血液疾患の治療法として、骨髄、末梢血や臍帯血を用いた造血幹細胞移植が有効である。しかし、患者と白血球型が一致したドナーを見つけることが困難なために、造血幹細胞移植を広く実施するに至っていない。

(2) 造血幹細胞を生体外の培養系で増幅できる技術が確立されれば、1人のドナーの細胞

を複数の患者に移植できる、あるいは入手は容易だが少量しか採取できない臍帯血を成人の移植にも使えるようになる、等の利点があることから、造血幹細胞を増幅するための方法が活発に研究されている。

(3) 造血幹細胞を生体外で増幅する方法としては、ストローマ(間質)細胞と共培養する方法が一般的である。このとき、ストローマ細胞の増殖を予め放射線照射や薬剤によっ

を抑制しておくことで、造血幹細胞が効率的に増幅されることが知られている。ただし、これらの検討のほとんどは培養ディッシュを用いた二次元培養によるものであり、生体内を模倣した三次元培養での検討はほとんど行われていない。

(4) 研究代表者らの従来の研究から、スポンジ状の多孔質樹脂を担体としてストローマ細胞 (DAS 104-8A 細胞株) をまず三次元培養し、さらに造血系細胞を播種して共培養することで、造血前駆細胞や造血幹細胞のような未分化な造血系細胞を良好に増幅できることがわかった。

(5) 上記の研究における予備的な実験として、三次元培養したストローマ細胞を担体ごと凍結保存 (三次元凍結保存) しておき、解凍後に造血系細胞を播種して三次元共培養を行った。その結果、凍結保存しないストローマ細胞を用いた場合よりも造血系細胞の増幅率は大幅に向上した。

(6) 三次元凍結保存したストローマ細胞は、解凍後にはほとんど増殖しなかったことから、三次元凍結保存によってストローマ細胞の増殖が抑制されたために造血系細胞の増幅効率が向上したと考えられた。さらに、解凍後のストローマ細胞の生存率は極めて低かったにもかかわらず、造血系細胞が良好に増幅したことから、増幅にはストローマ細胞の表面分子が重要であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

三次元培養ストローマ細胞を凍結保存、あるいは固定処理して造血系細胞の培養に用いることで、ストローマ細胞の表面分子を利用した安全、簡便、かつ効率的な造血系細胞の増幅方法を開発することが本研究の目的である。本研究では、以下の項目について検討した。

(1) 造血系細胞の増幅に適したストローマ細胞を選定するために、三次元凍結保存した複数のストローマ細胞株を用いて造血系細胞の増幅実験を行う。

(2) ストローマ細胞を固定処理するための固定・洗浄条件を検討する。

(3) 固定処理した三次元培養ストローマ細胞を用いて造血系細胞の増幅実験を行い、三次元凍結保存したストローマを用いた場合と比較検討する。

(4) 以上の結果に基づき、造血幹細胞の増幅に適したストローマ細胞の処理方法を総合的に判断する。

3. 研究の方法

(1) 造血系細胞として胎生 14 日目のマウス胎仔肝臓細胞、ストローマ細胞として DAS 104-4、DAS 104-8A または DAS 104-8B 細胞株、また三次元培養担体としてポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体 (平均孔径 130 μm) を一辺 2 mm の立方体状に細切したものをを用いた。

(2) ストローマ細胞の処理方法として、担体上で三次元培養した細胞を担体ごと凍結保存する三次元凍結保存と、この細胞をアルデヒド、あるいは有機溶媒で固定処理する方法の 2 種類を用いた。

三次元凍結保存では、細胞を 10% ジメチルスルホキシドを添加した培地中で -80°C まで緩速凍結したのち、液体窒素中で保存した。

固定処理では、ホルマリン (FA)、またはグルタルアルデヒド (GA) を用いてストローマ細胞を架橋した。一部の実験では、固定剤として有機溶媒であるアセトンを用いた。

(3) 造血系細胞を増幅するための実験では、まずストローマ細胞を 1×10^7 cells/cm³-PVF の密度で担体に播種して 2 ~ 7 日間三次元培養することにより、担体上にストローマ細胞層を形成した。このストローマ細胞に三次元凍結保存処理、あるいは固定処理を行ったのち一定期間保存した。

保存後の三次元培養ストローマ細胞を解凍、あるいは洗浄したのち、胎仔肝臓細胞 (1×10^8 cells/cm³-PVF) をこれらの処理細胞上に播種して 2 週間培養することで、胎仔肝臓細胞中の造血系細胞を増幅した。

なお、GA で固定したストローマ細胞を用いた造血系細胞の増幅実験では、対照としてディッシュによる二次元層培養実験を実施した。

(4) 培養期間での各血液系細胞数の変化は、全細胞数と各血液系細胞の割合を計測することにより求めた。

三次元培養における全細胞数は、DNA 量測定法や MTT 法で測定した。また、血液系細胞の計測は、フローサイトメーターを用いて Ter 119 (赤芽球)、CD45R/B220 (B 細胞)、c-Kit (造血前駆細胞)、および CD34 (造血前駆・幹細胞) を指標として行った。

4. 研究成果

(1) 造血系細胞の増幅に適したストローマ細胞株を選定するために、2種類のストローマ細胞株を三次元凍結保存したのち、これらを用いて造血系細胞の増幅実験を行った。ストローマ細胞に DAS 104-4 と DAS 104-8A を用いた際の、培養2週間での各造血系細胞の増幅率を表1に示す。

いずれのストローマ細胞を用いた場合も、赤芽球はほとんど増幅されず、むしろ細胞数は低下した。それに対して、造血幹細胞移植で重要となる、造血前駆細胞や造血前駆・幹細胞のような未分化な細胞は10倍以上という高い割合で増幅された。

ストローマ細胞を三次元凍結保存せずに造血系細胞の増幅を行ったところ、これらの未分化な細胞の増幅率は DAS 104-4 細胞株で0.7~0.9倍、DAS 104-8A 細胞株は3~5倍であり、三次元凍結保存した場合よりもはるかに低かった。従って、ストローマ細胞の三次元凍結保存は、未分化な造血系細胞の増幅に有効であることが示された。さらに、両ストローマ細胞株を比較すると、DAS 104-8Aの方が未分化な造血系細胞の増幅には適していると考えられた。

表1. 三次元凍結保存したストローマ細胞を用いた増幅実験におけるストローマ細胞株の影響

| ストローマ細胞株 | 増幅率 [倍] | |
|----------|-----------|------------|
| | DAS 104-4 | DAS 104-8A |
| 赤芽球 | 1.0 | 0.4 |
| B 細胞 | 2.3 | 10.6 |
| 造血前駆細胞 | 25.5 | 16.9 |
| 造血前駆・幹細胞 | 9.9 | 32.4 |

(2) ストローマ細胞の表面分子構造を維持するための、三次元凍結保存とは異なる処理方法として、細胞をアルデヒドで固定することが考えられた。そこで、まず FA と GA の固定・洗浄条件を検討した。その結果、固定では中性緩衝ホルマリンや GA 含有リン酸バッファーを用い、固定後に洗浄液で3回以上すすいだのち、洗浄液中に24時間以上浸漬すればよいことがわかった。

(3) 固定処理したストローマ細胞を用いた実験として、まずホルマリン (FA) で架橋した三次元培養ストローマ細胞株を用いて造血系細胞を増幅した。なお、本実験では DAS 104-8A よりも細胞の性質が安定している DAS 104-8B 株をストローマ細胞に用い、対照として三次元凍結保存ストローマ細胞を用いた増幅実験を並行して実施した。

造血系細胞の増幅率を表2に示す。三次元凍結保存した DAS 104-8B 株を用いた場合には、DAS 104-8A 株 (表1) に比べて造血系細胞の増幅率は低かった。しかし、造血前駆・幹細胞の増幅率は10倍以上と比較的高かった。一方、FA で固定したストローマ細胞を用いると造血系細胞は増幅されず、ほとんどの細胞は細胞数が減少した。

以上の結果から、FA 固定処理は造血系細胞の増幅を目的としたストローマ細胞の処理方法として適切ではないことがわかった。

表2. ストローマ細胞 (DAS 104-8B) の FA 固定処理が造血系細胞の増幅率におよぼす影響

| 処理方法 | 増幅率 [倍] | |
|----------|---------|---------|
| | 三次元凍結保存 | FA 固定処理 |
| 赤芽球 | 0.13 | 0.05 |
| B 細胞 | 2.4 | 1.8 |
| 造血前駆細胞 | 1.9 | 0.11 |
| 造血前駆・幹細胞 | 12.5 | 0.34 |

(4) ストローマ細胞の固定剤に GA を用い、造血系細胞の増幅を行った結果を表3に示す。三次元培養系では、造血前駆・幹細胞の増幅率は三次元凍結保存の結果 (表2) よりも低かったものの、造血前駆細胞の増幅率は高かった。これらの未分化な造血系細胞が2~5倍に増幅されたことから、比較的良好な結果が得られたと考えられた。

比較のために行った二次元培養では、B 細胞以外の血液系細胞の増幅率が三次元培養よりも低かったことから、増幅には三次元培養が適していることが示された。

表3. ストローマ細胞 (DAS 104-8B) の GA 固定処理が造血系細胞の増幅率におよぼす影響

| 固定処理方法 | 増幅率 [倍] | |
|----------|-------------|-------------|
| | GA 固定 (三次元) | GA 固定 (二次元) |
| 赤芽球 | 1.1 | 0.82 |
| B 細胞 | 3.4 | 3.7 |
| 造血前駆細胞 | 5.1 | 3.3 |
| 造血前駆・幹細胞 | 2.5 | 1.5 |

(5) 有機溶媒であるアセトンを経た三次元培養ストローマ細胞の固定に用いた際の、血液系細胞の増幅率を表4に示す。各血液系細胞の増幅率は、GA 固定 (三次元) の結果よりもわずかに低かったものの、ほぼ同等の値が得られた。従って、血液系細胞を増幅するための

ストローマ細胞処理方法として、有機溶媒を使用できることが示唆された。

表 4. ストローマ細胞 (DAS 104-8B) のアセトン固定処理が造血系細胞の増幅率におよぼす影響

| 固定処理方法 | 増幅率 [倍] |
|----------|----------|
| | アセトン固定処理 |
| 赤芽球 | 0.84 |
| B 細胞 | 3.2 |
| 造血前駆細胞 | 4.8 |
| 造血前駆・幹細胞 | 2.0 |

(6) 本研究における培養方法は、三次元培養したストローマ細胞の表面分子だけを利用して造血系細胞の増幅を行うという、従来には報告されてないものである。

本研究の結果から、三次元凍結保存に加えて、ストローマ細胞を固定処理した場合にも造血系細胞を増幅できることが明らかになった。固定処理においては、ストローマ細胞の表面分子構造は維持されているものの、細胞は死滅している。この場合にも造血系細胞は良好に増幅されたことから、増幅にはストローマ細胞の表面分子が極めて重要であることが確かめられた。

ストローマ細胞の固定方法としては、アルデヒド (GA) による架橋と、有機溶媒 (アセトン) による固定の両方が適していた。

(7) 造血幹細胞を生体外で増幅するために一般的に行われている方法である、放射線照射や薬剤投与などで増殖を抑制したストローマ細胞との共培養に比べると、本研究で用いた三次元凍結保存や固定処理は、特別な装置や設備を必要とせず、安全性も高い簡便な方法であるという利点がある。

次に、三次元凍結保存と固定処理を比較すると、固定処理したストローマ細胞は死滅しており、さらにアルデヒド架橋によって滅菌されている。従って、この方法では異種のストローマ細胞をヒト造血幹細胞の増幅に使用することも原理的に可能となる。これらのことから、固定処理の方が処理済細胞の保存が容易であり、より安全性の高い方法であると考えられる。

本研究では、GA でストローマ細胞を固定した場合の血液系細胞の増幅率は、三次元凍結保存の結果と比較して造血前駆細胞では高かったものの造血前駆・幹細胞では低く (表 2 と 3)、明確な傾向は認められなかった。今後は、固定処理法をさらに検討することによって、三次元凍結保存法以上に高い効率で安全に造血幹細胞を増幅できる条件を

決定する必要がある。さらに、増幅に適したストローマ細胞を探索することで、増幅率をより向上できると期待される。

(8) 本研究での固定処理方法について、固定剤にアセトンを用いた場合にも、GA 固定とほぼ同じ効率で造血系細胞を増幅できた。これは、アルデヒドだけでなく、固定剤として有機溶媒も適応できることを示唆する結果であった。ただしアセトンは毒性が高いため、安全性の高いエタノールなどを用いて検討する必要がある。

(9) 本研究で用いた培養方法は造血幹細胞移植に応用することが目的であり、生体外で簡便かつ高効率に造血幹細胞を増幅することによって、造血幹細胞移植の治療成績が向上することや、臍帯血移植の適応範囲が大幅に広がることを期待される。

その一方で、本培養法は血液系の細胞だけでなく、他の細胞の共培養系にも応用することができる。従って、血液系以外の共培養についても本方法を応用することによって、その有効性を確認することが望まれる。

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 2 件)

- ① Koyama T, Ehashi T, Ohshima N, Miyoshi H. Efficient proliferation and maturation of fetal liver cells in three-dimensional cultures by stimulation of oncostatin M, epidermal growth factor and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng Part A* 15, 1099-1107, 2009. (査読有)
- ② Minagawa K, Koyama T, Miyoshi H. Stimulating effects of fibroblast growth factors on hepatic function of fetal liver cells synergistically with oncostatin M in three-dimensional culture. *J Biosci Bioeng* 107, 307-311, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 杉山智史、大根田修、三好浩稔。固定処理した三次元培養ストローマ細胞を用いた造血系細胞の生体外増幅。平成 20 年度つくば学生研究交流会。平成 21 年 3 月 3 日。つくば
- ② 小山寿恵、長峯幸子、三好浩稔。胆汁酸成分が三次元培養マウス胎仔肝臓細胞の分化・増殖に及ぼす影響。第 46 回日本人工臓器学会大会。平成 20 年 11 月 29 日。東京
- ③ Koyama T, Iwamoto A, Miyoshi H. Cryopreservation of mouse fetal liver cells

utilizing porous polymer scaffold. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs & the 2nd Meeting of International Federation for Artificial Organs.
平成19年10月30日. 大阪

- ④ 三好浩稔、岩本彩子、小山寿恵. 多孔質樹脂を用いたマウス胎仔肝臓細胞の三次元凍結保存. 第39回化学工学会秋季大会.
平成19年9月14日. 札幌

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：細胞培養支持体、その製造方法及び該支持体を用いた細胞培養方法

発明者：三好浩稔、小山寿恵、清水雄一郎

権利者：同上

種類：日本国特許

番号：特願2008-130547

出願年月日：平成20年5月19日

国内外の別：国内

[その他]

- ① 雑誌報道、愛と幹細胞が人類を救う！？、
VOGUE NIPPON 107 (7月号), 118 頁,
2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三好 浩稔 (MIYOSHI HIROTOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号：70292547

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号：30311872

大川 敬子 (OOKAWA KEIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号：30251052