

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591237

研究課題名（和文）凍結保存臍帯血由来間葉系幹細胞による移植片対宿主病治療に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Establishment of mesenchymal stem cells from cryopreserved-cord blood for treatment of acute graft-versus-host disease

研究代表者

峯岸 正好 (MINEGISHI MASAYOSHI)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：20211592

研究成果の概要：研究当初に目標とした大豆凝集素による濃縮操作後に樹立した臍帯血由来間葉系幹細胞培養を長期に維持することが困難であった。また液体窒素中に凍結保存された臍帯血を解凍後に分離培養した単核球からは間葉系幹細胞は樹立されなかった。以後は採取から培養開始までの時間の短い新鮮な臍帯血を実験に供することとし、間葉系幹細胞培養用にスクリーニングされた胎児牛血清を添加した間葉系幹細胞培養用培地を用いることで増幅可能な2株の間葉系幹細胞を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：臍帯血、間葉系幹細胞、移植片対宿主病

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍は化学療法のみによっても長期寛解の期待できる悪性腫瘍に属するようになってきているが、ハイリスク群に分類される造血器腫瘍患者においては、同種造血幹細胞移植療法に依存するところが大きい。近年においては骨髄バンクおよび臍帯血バンクの整備・充実により、造血幹細胞ソースの選択肢が増し、新しい免疫抑制剤の導入と合わせて、多くの患者が本療法の恩恵を受けられるようになった。同種造血幹細胞移植療法が着実にその成果を発揮している一方で、同療法の合併症である移植片対宿主病が免疫抑制療法によっては十分に制御されているとはいえない。このことは同種造血幹細胞移

植患者の予後を脅かし、Quality of lifeを大きく損なう原因となっている。特に重症の移植片対宿主病患者においては免疫抑制療法の効果には限界があると考えられるため、新しい治療戦略の開発が必要となってくる。

間葉系幹細胞は主要組織適合抗原非拘束性の免疫抑制活性を有していることが知られ、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病の治療への応用が期待され、国外ではすでに骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床試験が開始されている。このような臨床試験を強く後押ししたのが、スウェーデンからの報告である

(Lancet 363:1439-1441, 2004)。同報告によると、非血縁者間同種骨髄移植後に重症急性移植片対宿主病を合併した患者に対し施行

された強力な免疫抑制剤による治療はいずれも無効であった。著者らは主要組織適合抗原不一致の母をドナーとして骨髄を採取し、その中から増幅培養することにより得られた間葉系幹細胞を重症急性移植片対宿主病の患者に投与した。患者は間葉系幹細胞投与に伴う重篤な副作用を発生させることなく、速やかに急性移植片対宿主病の症状から解放されたのである。

臍帯血移植後に免疫抑制剤抵抗性の重症急性移植片対宿主病を発症した症例に対し、同一ドナー由来で予め凍結保存された間葉系幹細胞を必要に応じて速やかに提供されるならば、臍帯血移植療法の成績に効果的な成果をもたらすものと期待される。一方同様の重症急性移植片対宿主病を合併した非血縁者間同種骨髄移植後患者において、速やかに間葉系幹細胞療法が開始されるためには、間葉系幹細胞源を骨髄に求めるのは困難であり、実際的であるとはいえない。間葉系幹細胞は主要組織適合抗原非拘束性の免疫抑制活性を有していることから、上記のような骨髄移植患者に対しても、応用可能な治療法であることが期待される。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞は主要組織適合抗原非拘束性の免疫抑制活性を有していることが知られている。従来の免疫抑制療法では効果不十分な重症の移植片対宿主病患者において、パイロット的ではあるが間葉系幹細胞による移植片対宿主病の治療効果が得られたと報告され、同種造血幹細胞移植患者における重症の移植片対宿主病の治療法として確立されることが期待される。しかしながら、非血縁者間同種骨髄移植や非血縁者間臍帯血移植後に、ドナーに対し間葉系幹細胞のソースである骨髄をあらためて提供依頼することは極めて困難である。本課題においては、この隘路を解決するための手段として、迅速な臨床適用を可能にするための臍帯血由来間葉系幹細胞バンクを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血由来間葉系幹細胞の分離濃縮法の開発

臍帯血よりHydroxyethylstarch (HES) 法 (Ficoll-Paque法では間葉系幹細胞の回収率が低下する可能性があるため) により白血球を分離した後、Ebellらの報告 (Blood 65:1105-1111, 1985) に従い、大豆凝集素法を用いて、凝集陽性分画中に間葉系幹細胞を濃縮する。この分画中に混入するTおよびBリンパ球、単球、NK細胞、幼若顆粒球、赤芽球を免疫磁気ビーズ法によりAutoMACSを用いて選択的に分離除去し、あるいは市販のRosetteSep™ Me

senchymal Stem Cell Enrichment Cocktailを用いて間葉系幹細胞をさらに濃縮する。得られた細胞集団はフローサイトメトリ法を用いて、CD166, CD105, CD44, CD29, CD73, SH-4, CD34, CD45の発現を測定し、間葉系幹細胞の純度、回収率を確認する。またCFU-Fコロニーアッセイ法を用いて、間葉系幹細胞の純度、回収率を確認する。

(2) 臍帯血由来間葉系幹細胞の体外増幅法の確立

(1)において分離濃縮した間葉系幹細胞を10%胎児ウシ血清存在下に低濃度グルコース加MEM培地またはBasic fibroblast growth factor (bFGF), 20%胎児ウシ血清 (FCS) 存在下にIMDM培地を用いて培養し、あるいは市販のはMesenCult™ Basal MediumにMesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplementsを加えたcomplete mediumにて培養し、増殖を確認する。増殖した細胞が間葉系幹細胞であるかどうかは、フローサイトメトリ法を用いて、CD166, CD105, CD44, CD29, CD73, SH-4が陽性でCD34およびCD45の発現が陰性であることを確認し、また1-methyl-3-isobutylxanthine, dexamethasone, insulin, indomethacin存在下に脂肪細胞への分化能、高濃度グルコース加MEM培地、insulin, transferrin, linolenic acid, ウシアルブミン、pyruvate ascorbate-2-phosphate, dexamethasone, proline, selenous acid存在下に培養し、TGF-β3刺激後の軟骨細胞への分化能、dexamethasone, ascorbic acid, glycerophosphate存在下に骨細胞への分化能を有することを各々形態学的、細胞化学的、分子遺伝学的方法により確認することにより判定する。

増殖した細胞がconfluentになるまえに、0.05% trypsin-EDTA処理により回収し、3,000-4,000 cells/cm²の細胞密度で植え換えを行い(40 cm² dish)、1継代 (passage 1) とする。

(3) 増幅された臍帯血由来間葉系幹細胞の免疫抑制活性を検証する。間葉系幹細胞以外の細胞はHLA不一致正常ヒト末梢血由来細胞を用い、間葉系幹細胞との共培養に供する。

(4) 臍帯血由来間葉系幹細胞の凍結保存法の確立

短期間の継代培養後に凍結保存し、解凍後に再度継代増幅した間葉系幹細胞の免疫抑制活性の検証と、一定数の細胞数に増幅した後に凍結保存し、解凍するのみでも間葉系幹細胞としての機能が十分に保持されているかどうかを検討する。継代数によって凍結保存時の細胞数は異なり、細胞数に応じて容量も異なってくるので、バイアルでの保存とプラスチックバッグでの保存のどちらが適切かを実験結果により判断する。バイアルとプラスチックバッグの両方について凍結温度測定を実施する。バイアルについては-85℃超

低温フリーザー内での静置法またはプログラムフリーザーを使用し、プラスチックバッグについては小型全自動凍結保存装置を使用する。

4. 研究成果

間葉系幹細胞を用いた重症移植片対宿主病の治療法確立を目的として、臍帯血由来間葉系幹細胞の分離および体外増幅を試みた。臍帯血中に含まれる間葉系幹細胞の頻度が極めて低いとの報告があることより、分離に際しては、まず Hydroxyethylstarch (HES) を用いて白血球分画を得、次に大豆凝集素 (SBA) を用いて間葉系幹細胞を濃縮するという手法を用いた。対象とした臍帯血は宮城さい帯血バンクより研究用として提供された 11 件であり、SBA+分画および SBA-分画(細胞数は平均値でそれぞれ $1.34(0.30-1.94) \times 10^8$, $1.97(0.28-4.47) \times 10^8$ 、回収率は平均値でそれぞれ 26.3%, 37.2%であった)を DMEM(low glucose) 培地または MesenCult 培地に浮遊し、細胞培養ディッシュに播種した後、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。しかしながらこの方法ではいずれの臍帯血においても間葉系幹細胞の増生は認められなかった。そこで、大豆凝集素による濃縮操作を用いず、HES 分画および Ficoll-Paque 比重遠心法により得られた単核球を間葉系幹細胞培養用にスクリーニングされた胎児牛血清 10% 添加 MesenCult 培地にて培養した。採取から培養開始までの時間が比較的短い (3 - 11 時間) 10 件の臍帯血について培養を実施することにより 3 株の間葉系幹細胞が得られたが、増殖を維持できているものはそのうちの 2 株であった。細胞の過増殖は pile up をきたし、急速に viability は低下した。2 株のうちの 1 株 (MSC33621) の形態を図 1、図 2 に示す。表面マーカー分析の結果は 2 株とも CD29+CD44+CD73+CD105+CD166+CD34-CD45-CD62L-であった。増幅特性は、MSC33621 が passage 4, day 59 で 6.5 population doublings, MSC33681 が passage 2, day 46 で 1 population doubling と 2 株間で増幅速度は大きく異なっていた。

また HES 法により調製後、液体窒素中に保存された臍帯血 4 件について、解凍後に Ficoll-Paque 比重遠心法により分離した単核球を用いて同様の方法による培養を試みたが、いずれについても培養開始後 4 週までに間葉系幹細胞の増殖は確認されなかった。

図 1 MSC33621 の形態 (replating 7 日後)

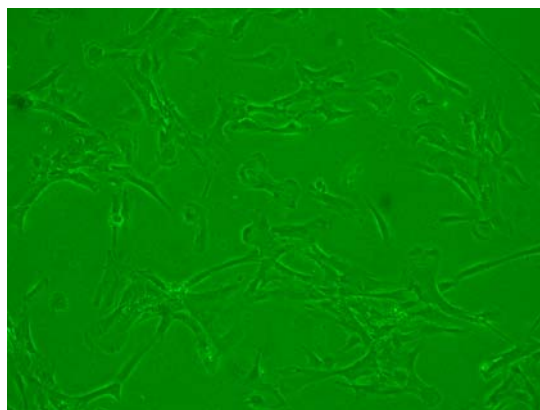
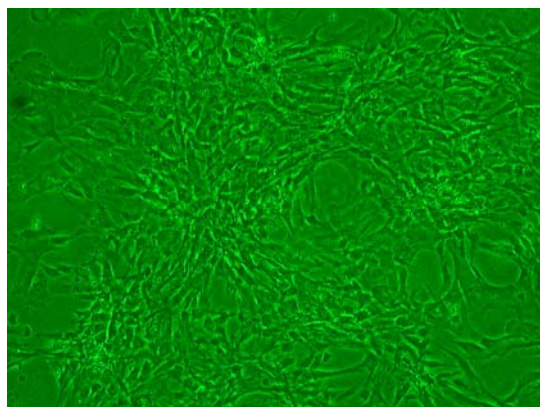


図 2 MSC33621 の形態 (replating 11 日後)



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) Miura J, Minegishi M, Itoh T, Kitaura T, Fukawa N, Takahashi H, Suzuki A, Kudo Y, Narita A, Sato Y, Suzuki M, Wada Y, Takeyama Y, Watanabe T, Tsuchiya S. Quality evaluation of umbilical cord blood progenitor cells cryopreserved with a small-scale automated liquid nitrogen system. *Cryobiology*. 57:178-181, 2008, 査読有

2) Minegishi M, Itoh T, Fukawa N, Kitaura T, Miura J, Takahashi H, Suzuki A, Kudo Y, Narita A, Sato Y, Suzuki M, Watanabe T, Wada Y, Takeyama Y, Tsuchiya S. Quality of umbilical cord blood CD34+ cells in a double-compartment freezing bag cryopreserved without a rate-controlled

programmed freezer. Int J
Hematol. 85:78-84, 2007, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 正好 (MINEGISHI MASAYOSHI)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：20211592

(2) 研究分担者

土屋 滋 (TSUCHIYA SHIGERU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30124605