

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22700

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞新規サブポピュレーションを用いた造血幹細胞増幅培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a proliferation culture method for hematopoietic stem cells utilizing a novel subpopulation of mesenchymal stem cells

研究代表者

星 和人 (Hoshi, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30344451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス間葉系幹細胞の複数のサブポピュレーションを分取し、それぞれの幹細胞特性解析を行った。また、マウス骨髄間葉系幹細胞と造血幹細胞との共存培養条件を検討し、単独培養では増加しない血球系細胞の増加が見られる培養方法を見出した。さらに、造血幹細胞維持との関連が報告されている、c-Mpl欠損マウス由来細胞において、遺伝子欠損が幹細胞特性に与える影響について検討した。加えて、東京大学医学部附属病院口腔顎顔面外科で手術を受けた患者から廃棄される骨髄液を、患者同意を取得した上で採取し、細胞を抽出し、共存培養を行って、CD34+Lin-で示される造血幹細胞数が増加する条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家造血幹細胞移植は主に末梢血造血幹細胞移植の形で行われるが、採取細胞数不足が一定の割合で発生する。また、G-CSFの連日投与による肉体的負担や、その長期安全性が未確立といった問題もある。造血幹細胞の存在確率は非常に低い(骨髄液中では約10万分の1)、造血幹細胞を増幅培養する試みは広く行われてきた。本研究で得られた結果は、造血幹細胞の増殖培養法の確立の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Subpopulations of mouse mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated, and analyzed for their stemness. Co-culture conditions for mouse MSCs and hematopoietic stem cells (HSCs) were examined, and a culture condition in which hematopoietic cells increased was found. In addition, the effect of deficiency in c-Mpl, which has been reported for its relationship with stemness of HSC, was examined. Finally, bone marrow fluid was collected under the informed consent with the patient who received surgery in the University of Tokyo Hospital. By coculture of MSCs and HSCs harvested from the bone marrow fluid, a culture condition in which HSCs indicated by CD34+Lin-increase was found.

研究分野：再生医療

キーワード：造血幹細胞 間葉系幹細胞 共培養

1. 研究開始当初の背景

造血器悪性腫瘍に対しては同種造血幹細胞移植が一般的に行われるが、移植片対宿主病 (Graft Versus Host Disease: GVHD) が様々な口腔合併症を引き起こす。口腔がんの発生頻度上昇がその一つであり、慢性 GVHD はその危険因子とされている (熱田ら移植 2015, Y Tanaka et al. Bone Marrow Transplantation 2017)。また、口腔粘膜障害は抗がん剤や放射線治療によりしばしば生じるが、移植後にも GVHD による口腔粘膜障害が生じる。

一方、自家造血幹細胞移植は主に多発性骨髄腫などに対して行われている。しかし、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病などにおいては、移植片対白血病効果がないため再発率が高いとされ、あまり行われていない。しかし、GVHD が生じず、再発と関連しない死亡率は同種移植より低く、移植後の生活の質は高いため、適応症例を選んで自家移植を選択すべきという意見もある (N-C Gorin et al. Bone Marrow Transplantation 2015)。自家造血幹細胞移植は主に末梢血造血幹細胞移植の形で行われるが、採取細胞数不足が一定の割合で発生する (15.3% : P Wuchter et al. Biol. Blood Marrow Transplant 2010)。また、G-CSF の連日投与による肉体的負担や、その長期安全性が未確立といった問題もある。造血幹細胞の存在確率は非常に低いため (骨髄液中では約 10 万分の 1) 造血幹細胞を増幅培養する試みは広く行われてきた。少量の造血幹細胞を採取して増殖可能となれば、末梢血造血幹細胞移植における上述の問題が解決される。その結果として自家造血幹細胞移植が一般的となれば、GVHD に付随する口腔がんの発生や口腔粘膜障害といった口腔合併症は大きく改善する。しかし、これまでに化合物やサイトカイン、成長因子の添加、niche を再構築する試みなどが報告されているが、まだプロトコールは確立されていない。

近年、骨髄においては、造血幹細胞に対して間葉系細胞が niche と呼ばれる微小環境を提供し、必要なサイトカインや細胞外基質 (CXCL12 やヒアルロン酸など) を供給することで、造血幹細胞のステムネスが維持されることが明らかとなってきた。本研究において、申請者らは造血幹細胞支持能を持つ間葉系幹細胞を同定し、造血幹細胞と共培養することで、造血幹細胞のステムネスの維持と増幅とを同時に実現するプロトコールの確立を目指す。

2. 研究の目的

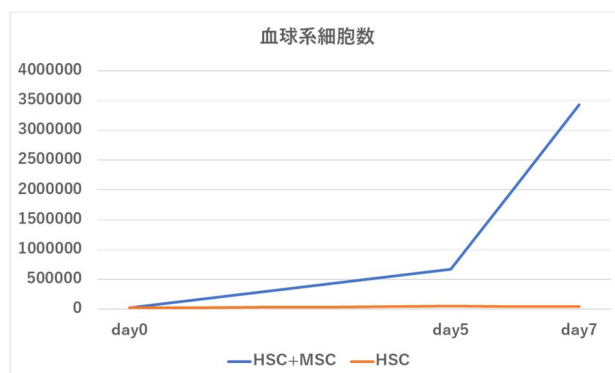
本研究の目的は、同種造血幹細胞移植に伴う口腔がん、口腔粘膜障害などの合併症を低減可能な自家造血幹細胞移植を推進するため、造血幹細胞の維持に関与する間葉系幹細胞サブポピュレーションを同定し、造血幹細胞の増幅培養法を確立することである。

3. 研究の方法

マウス骨髄間葉系幹細胞の single cell RNAsequencing にて同定したサブポピュレーションを分取し、増殖させる。この細胞とマウス骨髄造血幹細胞との共存培養を行い、造血幹細胞自己複製促進能を持つサブポピュレーションを同定する。さらに共存培養プロトコールの最適化を行い、増幅した造血幹細胞の移植による血球系細胞再構成を確認する。マウス細胞で得られた知見を基に、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いたヒト造血幹細胞の増幅培養法を確立する。

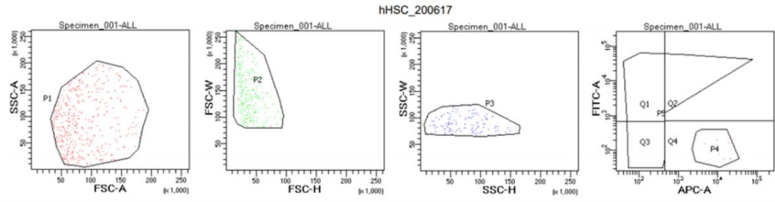
4. 研究成果

令和元年度は、マウス骨髄細胞のうち、Lineage⁻, Sca-1⁺, PDGFR⁺ で分画される、間葉系幹細胞濃度が高い細胞集団 (P-S) に対してこれまでに行った、single cell RNA sequencing において同定された、遺伝子発現パターンの異なる複数のサブポピュレーションを、それぞれに特異的に発現上昇している表面抗原を用いてセルソーターにより分取し、それぞれの幹細胞特性解析を行った。また、マウス骨髄間葉系幹細胞と造血幹細胞との共存培養において、細胞播種濃度、2 種の細胞数の比率、培地組成、間葉系幹細胞と造血幹細胞の播種のタイミングなどについて



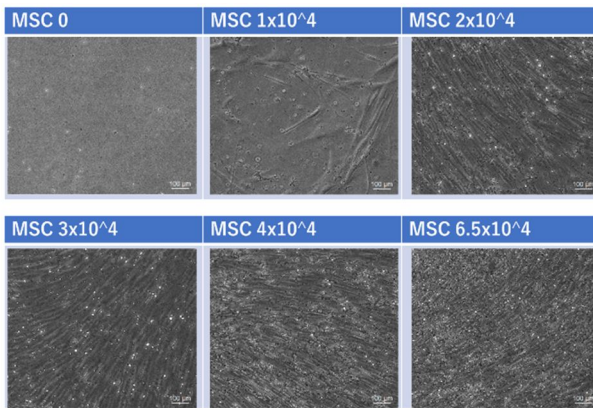
マウス間葉系幹細胞 (MSC) とマウス造血幹細胞 (HSC) の共培養における血球系細胞数の変化。共培養では7日目まで増加がみられた。

検討し、血球系細胞数が効率よく増加するプロトコルの確立を試みた。結果、単独培養では増加しない血球系細胞の増加が見られる培養方法を見出した。さらに、造血幹細胞維持との関連が報告されている、c-Mpl 欠損マウス由来細胞において、遺伝子欠損が幹細胞特性に与える影響について検討した。加えて、東京大学医学部附属病院口腔顎顔面外科で手術を受けた患者から廃棄される骨髓液を、患者同意を取得した上で採取し、細胞を抽出し、培養を開始した。令和2年度は、最適化した共存培養で得られた細胞について、CFU アッセイを行い、サブポピュレーションごとの幹細胞性を確認した。



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	403	4.0	4.0
P2	273	67.7	2.7
P3	127	46.5	1.3
P4	6	4.7	0.1
Q1	3	2.4	0.0
Q2	0	0.0	0.0
Q3	3	100.0	0.0
Q4	0	0.0	0.0

ヒト骨髓細胞中の造血幹細胞 (HSC : CD34+Lin-) の Flow cytometry解析



サブポピュレーションごとの幹細胞性を確認した。また、ヒト骨髓液からヒト間葉系幹細胞とヒト造血幹細胞をそれぞれ分離、培養し、共存培養を行った。間葉系幹細胞の播種密度、培地、ヒト造血幹細胞との共存培養開始までの単独培養期間などの最適化を行った。その結果、CD34 + Lin- で示される造血幹細胞数が増加する条件を見出した。

本研究で得られた結果は、造血幹細胞の増殖培養法の確立の一助となる可能性がある。

造血幹細胞と種々の播種密度のヒト間葉系幹細胞との共存培養6日目の顕微鏡画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kokubu Saeko, Inaki Ryoko, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Adipose-derived stem cells improve tendon repair and prevent ectopic ossification in tendinopathy by inhibiting inflammation and inducing neovascularization in the early stage of tendon healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 103 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國分 冴子、稲木 涼子、星 和人、疋田 温彦
2. 発表標題 コラゲナーゼ誘導マウスアキレス腱炎モデルで生じる異所性骨化に対する脂肪幹細胞移植の効果についての解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田 温彦、山脇 孝徳、梅山 遼、星 和人
2. 発表標題 3次元プリンタを用いた再生骨足場の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 憲吾、浅輪 幸世、疋田 温彦、星 和人
2. 発表標題 In vivo での軟骨成熟に関わる細胞因子についての検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星 和人
2. 発表標題 再生医療が拓く新しい口腔顎顔面外科
3. 学会等名 北海道大学大学院歯学研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	疋田 温彦 (Hikita Atsuhiko) (60443397)	東京大学・医学部附属病院・特任研究員 (12601)	
研究分担者	西條 英人 (Saijo Hideto) (80372390)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------