

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591118

研究課題名(和文)

原発性骨髄線維症に対する脂肪由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法

研究課題名(英文)

Cell therapy using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for primary myelofibrosis

研究代表者

中山 享之 (NAKAYAMA TAKAYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00456659

研究成果の概要(和文)：

造血組織支持能力の破綻は、抗腫瘍剤、放射線照射、免疫学的な機序等によって発生しときに致死的となり得る。

破綻した造血微小環境を脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を用いて再生させることを目的としてADSCの造血支持能力を骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)と比較検討した。マウスADSCはマウスBMSCの約2倍の速度で増殖し、造血支持能力は優位に高かった。マウスを使った移植実験でも、ADSCはBMSCよりも速やかに造血を回復させることが判明した。以上の結果は、ヒトADSCとヒトBMSCでも確認された。

研究成果の概要(英文)：

Mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a new therapeutic modality for reconstituting the hematopoietic microenvironment. However, the availability of conventional bone marrow (BM)-derived MSCs (BMSCs) is limited. Recent studies showed that a large number of MSCs could be easily isolated from fat tissue (adipose tissue-derived MSCs [ADSCs]). We extensively evaluated the hematopoiesis-supporting properties of mouse ADSCs. Mouse ADSCs injected into the BM cavity of fatally irradiated mice reconstituted hematopoiesis more promptly than mouse BMSCs and subsequently rescued mice that had received a low number of HSCs. Human ADSCs possessed the higher hematopoiesis-supporting properties than human BMSCs as well.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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・血液内科学

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞、造血微小環境、ケモカイン、再生医学、細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

原発性骨髄線維症は、線維化を伴う骨髄造

血能の低下、脾腫、末梢血中への幼弱細胞の混入を特徴とする、未熟な造血幹細胞を起源

とする難治性血液悪性疾患である。死亡原因の約半数は、造血能の低下による出血や感染によるものである。この疾患に対する化学療法の有効性は低い、緩徐な進行を示すため合併症をコントロールできれば、患者のQOLおよび予後がおおいに改善されると期待される。我々は、これまでに、骨髄造血を支持する骨髄微小環境の破綻がこれら合併症の原因であることを明らかにした。さらにはその分子機構も解明した。

造血組織の破綻は、抗腫瘍剤、放射線照射、免疫学的な機序等によって発生しときに致死的となり得るので臨床的には切実な問題である。

骨髄微小環境は、間葉系幹細胞から構成される。間葉系幹細胞は、以前は骨髄からしか樹立できないものと考えられていた。しかしながら細胞工学の発達により生体の他の部分（胎児肝、臍帯血、脂肪組織）から取り出すことが可能となった。これはすなわち血液疾患を有する患者（骨髄が障害をうけている）から自己の間葉系幹細胞を骨髄以外から樹立し骨髄内に戻すと正常造血を回復しうることを意味する。とくに皮下脂肪組織は、体表からのアクセスが良好であり多量の組織を採取することが可能なため間葉系幹細胞樹立に有用なソースと考えられる。自己の細胞であるため感染等の危険性はなく、安全に施行できると考えられる。また幹細胞移植において、骨髄由来間葉系幹細胞を血液幹細胞とともに輸注する試みは、すでに試験的になされており、一定の効果が報告されている。ゆえに脂肪由来間葉系幹細胞の高い増殖率と造血支持能力についての研究は、今後の移植医療の生着率の向上に役立つものと考えられる。しかしながら脂肪組織由来間葉系幹細胞の造血支持能力に関する知見は非常に少なかった。そのため我々は、骨髄由来間葉系幹細胞と脂肪組織由来間葉系幹細胞の造血支持能力を *in vitro* および *in vivo* で比較検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、原発性骨髄繊維症等の疾病に認められる破綻した造血微小環境を脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) を用いて再生させることである。

## 3. 研究の方法

(1) げっ歯類の骨髄組織、脂肪組織より間葉系幹細胞を樹立した。取り出した脂肪組織はコラゲナーゼ処理し、線維芽細胞様の細胞を集めシャーレ上で培養する。

(2) 脂肪由来間葉系幹細胞が、骨髄由来間葉系幹細胞よりも増殖、血液幹細胞の支持能力の点で優位性があるかどうか *in vitro* で確

認した。増殖の確認には、MTT assay や 3H incorporation assay を用いる。血液幹細胞の支持能力の確認には、ヒト CD34 陽性細胞を用いた coculture assay および progenitor assay を使用した。

(3) 上記の優位性は、SDF-1 の多寡によるものでは無いかと仮定した。そのため抑制実験等を行った。

(4) 脂肪由来間葉系幹細胞における造血支持能力を *in vivo* で確認するため骨髄移植実験を行った。致死量の放射線を照射したマウスの脛骨に間葉系細胞を骨髄内移植し骨髄単核球を尾静脈より投与した。

(5) 脂肪由来間葉系幹細胞における造血支持能力が骨髄由来のものよりも優位であることを *in vivo* で確認したため、複数の健常ボランティアより脂肪由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を樹立した。

(6) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞が、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞よりも増殖、血液幹細胞の支持能力の点で優位性があるかどうか *in vitro* で確認した。増殖の確認には MTT を用いた。血液幹細胞の支持能力の確認には、ヒト CD34 陽性細胞を用いた coculture assay および progenitor assay を使用した。

(7) ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の安全性確認のため NOD/SCID マウスの頸骨に骨髄内移植を施行した。急性毒性や腫瘍化の有無を検討した。

## 4. 研究成果

脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) は、C57/BL6 マウスの inguinal fat から単離し、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) は骨髄有核細胞から樹立した。増殖能を比較したところ、ADSC は BMSC の約 2 倍の速度で増殖することが確認された。次にメチルセルロース法により progenitor に対する影響を調べたところ、ADSC は BMSC よりも有意に CFU 数が増加させた (Fig. 1A)。分化誘導能を共培養により検討したところ ADSC は、BMSC と同じく CD34+PBSC を顆粒球に分化させたが、その細胞数は著増していた (Fig. 1B)。分子学的な機序を解明するために造血に必須なケモカインである stromal derived factor (SDF)-1 に注目し、その分泌量を測定したところ ADSC は、BMSC の約 2.5 倍量を産生していることが判明した (Fig. 1C)。そこで SDF-1-CXCR4 (SDF-1 の特異的レセプター) の阻害薬を加えて共培養を行ったところ分化誘導能は有意に抑制されその重要性が確認された (Fig. 1D)。

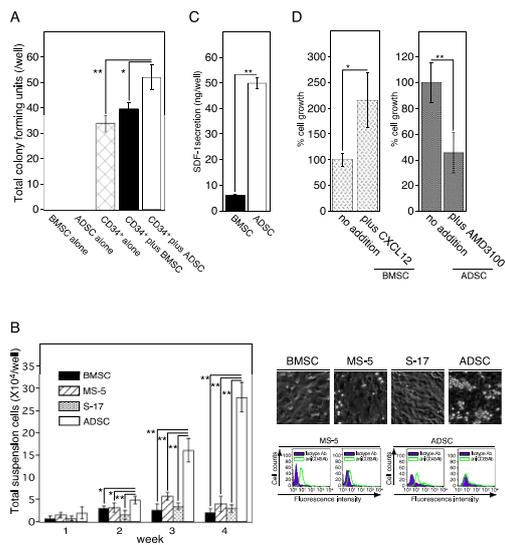


Figure 1

マウスを使った移植実験では、ADSC は BMSC よりも速やかに造血を回復させることが判明した (Fig. 2A & 2B)。long-term hematopoietic stem cell への影響を検討した 2 次移植実験では、有害事象は認められなかった (Fig. 2C)。生着に必要な血液幹細胞よりも少ない量を投与した場合でもレスキューすることが確認された。これは BMSC を投与した場合には認められなかった (Fig. 2D)。

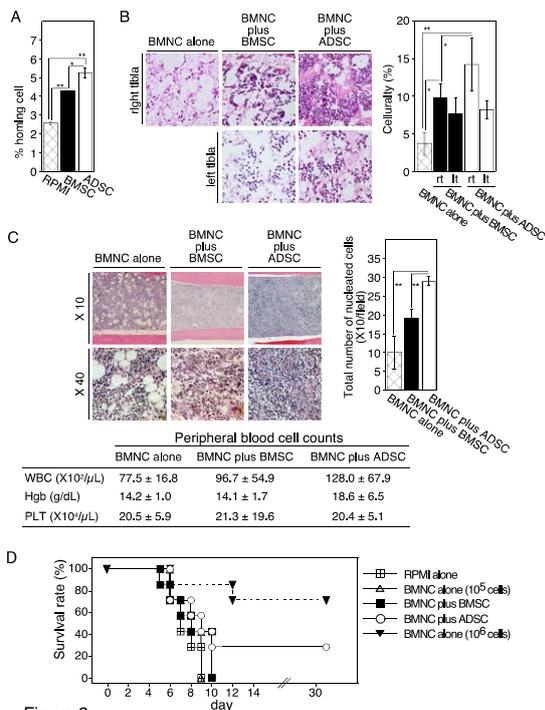
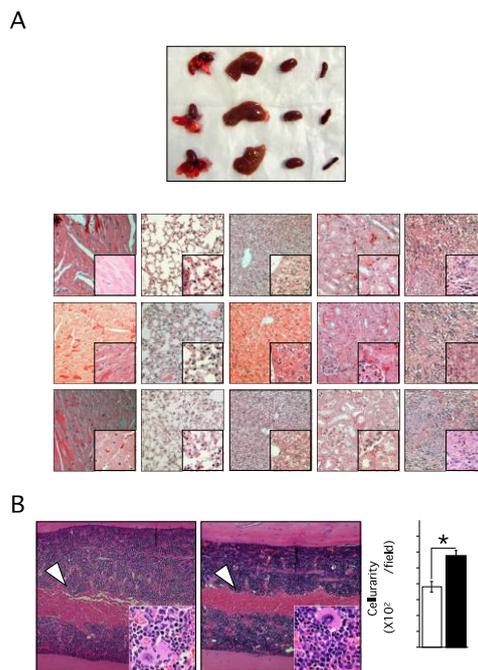


Figure 2

次にヒト ADSC とヒト BMSC を複数のボランティアから樹立し血液幹細胞支持能力を比較した。In vitro coculture assay では、ヒト ADSC は、ヒト BMSC よりも有意に CD33 および CD13 の表面抗原形質をもつ顆粒球を増加させることが確認された。また semisolid メチルセルロースを用いた progenitor assay でも、ヒト ADSC は、ヒト BMSC よりも有意にコロニー数を増加させた。NOD/SCID マウスの脛骨にヒト ADSC およびヒト BMSC を注入し安全性を確認したが、臓器障害は生じず腫瘍形成も認められなかった (Fig. 3A)。造血支持能力も優位にヒト ADSC は、ヒト BMSC より高いことを確認した (Fig. 3B)。



ヒト ADSC は、ヒト BMSC よりも増殖能が高いことも確認した。以上よりヒト ADSC は、ヒト BMSC と代替となるばかりでなく造血支持という観点からは優れた細胞ソースであると考えられた。

## 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 1 件)

① 中尾典彦、中山享之、八幡崇、六車ゆかり、齋藤繁紀、宮田泰彦、山本晃士、直江知樹  
Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Facilitate Hematopoiesis In Vitro and In Vivo.

The American Journal of Pathology 2010,

177(2):547-554 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

① 中山享之

脂肪組織由来間葉系幹細胞は、造血支持機能において骨髄由来のものより優れている。

第71回日本血液学会総会 2009年10月23日 京都市

② Nakao N

Adipocyte-derived stromal cells facilitate hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*: advantages over bone marrow-derived stromal cells

50th Annual Meeting of American society of Hematology 2008年12月7日

San Francisco, CA, USA

③ 中尾典彦

脂肪由来間葉系幹細胞における造血支持能力の検討

第70回日本血液学会総会2008年10月11日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 享之 (NAKAYAMA TAKAYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00456659

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

山本 晃士 (YAMAMOTO KOUJI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90362251

