

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2010

課題番号：20591156

研究課題名（和文） 臍帯血移植における生着促進を目的とした細胞治療の開発

研究課題名（英文） Development of cell-based therapy to promote engraftment after cord blood transplantation

研究代表者

麦島 秀雄 (MUGISHIMA HIDEO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80183648

研究成果の概要（和文）：成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)の放射線傷害後の骨髄微小環境の再構築能や、ヒト臍帯血造血幹細胞生着に対する作用を検討した。放射線照射により骨髄を傷害した C57BL/6 マウスに DFAT を静脈内投与したところ、骨髄造血細胞の回復が有意に促進した。また放射線照射を行った免疫不全(NOD-SCID)マウスにヒト臍帯血造血幹細胞と DFAT を同時移植したところ、移植4週、12週後の骨髄および末梢血中のヒト CD45 陽性血液細胞数は有意に増加した。以上の結果より、DFAT 移植は放射線照射後の骨髄造血細胞の回復を促進し、ヒト臍帯血移植における生着率を増加させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We examined that the effect of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation on reconstruction of damaged bone marrow microenvironment and engraftment after human umbilical cord blood transplantation in mice. The results showed that intravenous transplantation of DFAT cells promoted recovery of bone marrow hematopoiesis in C56BL/6 mice after radiation-induced myeloablation. Co-transplantation of DFAT cells with human umbilical cord blood hematopoietic stem cells in irradiated immunodeficient (NOD-SCID) mice resulted in an increase number of human CD45-positive hematopoietic cells in bone marrow and peripheral blood at 4 and 12 weeks after the transplantation. These results indicate that DFAT cell transplantation promotes recovery of hematopoiesis in irradiated mice and promote engraftment of human hematopoietic cells after umbilical cord blood transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：造血幹細胞、臍帯血移植、脱分化脂肪細胞、GVHD、生着不全

1. 研究開始当初の背景
臍帯血移植はドナーへの負担がなく、症例数

が急速に増加している。臍帯血移植の問題点は、移植細胞数が限られており、生着不全率

が全体の 15%と高いことである。いったん生着不全が完成するとその治療は困難であり、予後は不良である。生着率を上げるために臍帯血幹細胞の体外増幅法が試みられているが、安全性、効率性、コスト面での問題点があり、未だ実用化に至っていない。造血幹細胞とともに骨髄造血を支える骨髄間質の機能は、骨髄微小環境とよばれ、間葉系幹細胞に由来するストローマ細胞が重要な役割を担っている。ドナー由来の HLA が一致したストローマ細胞が造血幹細胞の増殖と分化を促進することが知られているが、ヒトにおいてはドナー由来のストローマ細胞は経静脈的な投与方法では骨髄に生着することはなく (Li Y et al. Exp Hematol 28:950-960, 2000)、ホスト由来のストローマ細胞とドナー由来の造血幹細胞との相互作用が生着に決定的な役割を果たしていることが明らかにされている (Trok-Storb B et al. Ann NY Acad Sci 872:164-170, 1999)。実際に、抗がん剤や放射線照射などの先行治療やウイルス感染による骨髄微小環境の障害や、再生不良性貧血、骨髄線維症などの疾患では、骨髄微小環境の障害が元々存在することが、生着不全が高率に起こる原因であると考えられている。このような病態に対して、ホスト由来の細胞から正常な骨髄微小環境を移植前に構築することができれば、生着不全の発生を予防できることが予想される。骨髄微小環境を再構築する細胞としては、ホスト由来の骨髄間葉系幹細胞(MSC)が期待されるが、(1)多くの病態においてホスト骨髄 MSC も障害を受けている。(2)腫瘍細胞混入の危険性がある。といった問題があり、他の細胞ソースが望まれる。

我々は、ヒトの脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより得られる細胞群(脱分化脂肪細胞, Dedifferentiated fat cells, DFAT)が、骨髄 MSC に類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした (Matsumoto T et al. J Cell Physiol 215:210-222, 2008)。DFAT は、少量の脂肪組織より簡便に大量調製ができるため、小児や免疫不全を伴うような重篤な病態の患者からも採取、調製することが可能である。我々は今までに、DFAT から臍帯血 CD34 陽性細胞の生存、増殖を促進するストローマ細胞(骨芽細胞ニッチ)へ分化誘導できること、低酸素条件下で培養することにより、SDF-1, PlGF などの造血幹細胞のホーミングに重要な液性因子を豊富に発現分泌することなどを明らかにしてきた。この結果は、DFAT が骨髄微

小環境を構築し、造血幹細胞の生着促進細胞として機能することを示唆している。

2. 研究の目的

成熟脂肪細胞から調製した DFAT の造血幹細胞生着に対する作用や、骨髄微小環境の再構築能を検討し、造血幹細胞移植における生着促進細胞としての適性を明らかにする。そして臍帯血移植における生着不全や GVHD 予防を目的とした新しい細胞治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 骨髄ストローマ細胞に対する放射線照射の影響についての検討

ヒト臍帯血造血幹細胞を増殖維持することができるマウスストローマ細胞 (HESS5) に種々の線量 (0, 1, 10, 20Gy) の放射線照射を行い、発現するサイトカインの変化や、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞との共培養による造血幹細胞増殖維持能を評価した。また HESS5 に種々の線量 (0, 1, 10, 20Gy) の放射線照射を行った後、その培養上清を採取し、マイクロケモタキシスチャンバーを用いて、この培養上清の臍帯血単核球に対する細胞遊走能を検討した。さらに C57BL/6 マウスに対して種々の線量 (0, 1, 10Gy) の放射線照射を行い、48 時間後に骨髄を採取した。そして骨髄中のストローマ細胞の細胞数および SDF-1 の発現を免疫組織学的に、非照射コントロールマウスと比較検討した。

(2) 造血幹細胞の生着を促進させる移植細胞のスクリーニング

造血幹細胞の生着を促進させる移植用細胞をスクリーニングする目的で、ヒト DFAT、ヒト皮膚線維芽細胞およびヒト脂肪組織由来幹細胞 (ASC) を培養し、培養上清中の造血幹細胞増殖維持に関与する液性因子の濃度を ELISA 法にて測定した。また同様に免疫抑制能 (GVHD 予防作用) を評価するため、上記 3 種類の細胞とマウス脾臓リンパ球との共培養を行い、レクチン刺激による T リンパ球増殖に対する効果を検討した。

(3) 放射線照射による骨髄傷害マウスに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

C57BL/6J マウスに放射線照射 (700cGy) を行い骨髄傷害を誘導後、マウス DFAT (DFAT 群、 5×10^5 , n=18) または生理食塩水 (コントロール群, n=12) を 3 日間、尾静脈より投与した。移植後、経時的に末梢血および骨髄中の血液細胞を採取し、造血細胞の回復の程度をフローサイトメーターを用いて比較した。

(4) 脱分化脂肪細胞の臍帯血造血幹細胞生着率に及ぼす効果

免疫不全 (NOD-SCID) マウスに放射線照射

(300cGy)を行った後、マウス DFAT (DFAT 群、 5×10^5 , n=6) または生理食塩水 (コントロール群, n=6) と共にヒト臍帯血造血幹細胞 ($Lin^- CD34^+$, 1×10^4) を経静脈的に移植した。移植後、経時的に末梢血および骨髄中の血液細胞を採取し、FACS 解析を行い、ヒト由来血液細胞の生着率を比較した。

4. 研究成果

(1) 骨髄ストローマ細胞に対する放射線照射の影響についての検討

マウスストローマ細胞 (HESS5) に種々の線量の放射線照射を行い、発現するサイトカインの変化などを評価した。その結果、骨髄破壊的処置に使用する線量である 10-20Gy の線量を照射した場合、造血幹細胞のホーミング因子である SDF-1 の発現・分泌が有意に低下することを mRNA レベルおよび蛋白レベルで明らかにした。次に放射線照射した HESS5 培養上清の臍帯血単核球に対する細胞遊走能を検討した。その結果、10-20Gy の放射線照射を行った HESS5 培養上清では、放射線照射を行わない HESS5 培養上清に比べて有意に臍帯血単核球の遊走能が低下した。つぎに放射線照射したマウスから骨髄を摘出し、ストローマ細胞の解析を行った。その結果、10Gy の放射線照射により、非照射に比べ、ストローマ細胞の細胞数が 1/10 以下に減少し、また SDF-1 の発現が有意に低下することを明らかにした。これらの検討により放射線による骨髄破壊的処置により、造血微小環境からの SDF-1 分泌が低下し、造血幹細胞のホーミングが抑制されることが生着不全の主因であることが示唆された。

(2) 造血幹細胞の生着を促進させる移植細胞のスクリーニング

DFAT, ASC, 皮膚線維芽細胞の培養上清中の各種サイトカインの測定を行った結果、DFAT は他の細胞に比べて明らかに SDF-1 を高分泌していることが明らかになった。また DFAT は皮膚線維芽細胞より有意に高く、ASC とほぼ同程度のリンパ球増殖抑制効果があることが明らかになった。これらの結果より、DFAT が造血細胞維持作用や GVHD 抑制作用を期待できることが明らかとなった。

(3) 放射線照射による骨髄傷害マウスに対する DFAT 移植の効果

放射線照射によるマウス骨髄傷害モデルに対し、DFAT または生理食塩水を静脈内へ投与し、造血機能の回復を比較検討した。その結果、細胞投与 21 日後の骨髄造血幹細胞 ($Lin^- c-kit^+ Sca-1^+$) 数はコントロール群に比べ DFAT 群で有意に増加した。また DFAT 群では、骨髄中のヒト B 細胞 ($CD45^+ CD19^+$) 数、単球 ($CD45^+ CD11b^+$) 数、骨髄球 ($CD45^+ CD13^+$) 数が有意に増加した。以上の結果より、DFAT 移植

は、放射線照射後の骨髄造血細胞の回復を促進することが明らかになった。

(4) DFAT の臍帯血造血幹細胞生着率に及ぼす効果

NOD-SCID マウスにマウス DFAT または生理食塩水と共にヒト臍帯血造血幹細胞を経静脈的に移植し、臍帯血細胞の生着率を比較した。その結果、移植 4 週、12 週後の末梢血中および骨髄中のヒト $CD45^+$ 細胞は、コントロール群に比べ DFAT 群で有意に増加した。以上の結果より、DFAT 移植は、ヒト臍帯血移植における生着率を増加させることが明らかとなった。これらの検討により、臍帯血と DFAT の同時移植は、臍帯血移植における生着不全を予防する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

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 6 件)

- ① Matsumoto T (11 人中 1 番目), Watanabe H, Mugishima H (11 人中 11 番目) 他: Appropriate doses of granulocyte-colony stimulating factor reduced atherosclerotic plaque formation and increased plaque stability in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 査読有 17(1):84-96, 2010
- ② Hagikura K, Matsumoto T (14 人中 6 番目), Mugishima H (14 人中 14 番目) 他: Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. *International Journal of Cardiology* 査読有 142(1):56-64, 2010
- ③ Sakuma T, Matsumoto T (9 人中 2 番目), Mugishima H (9 人中 9 番目) 他: Mature adipocyte derived dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *Journal of Urology* 査読有 182(1):355-365, 2009
- ④ Matsubara Y, Kano K, Kondo D, Mugishima H, Matsumoto T: Differences in adipocytokines and fatty acid composition between two adipocyte fractions of small and large cells in high-fat diet-induced obese mice. *Annals of Nutrition & Metabolism* 査読有 54(4):258-267, 2009
- ⑤ Jumabay M, Matsumoto T (11 人中 2 番目), Mugishima H (11 人中 10 番目) 他: Dedifferentiated fat cells convert to

cardiomyocytes phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 査読有 47(5):565-575, 2009
⑥ Matsumoto T, Mugishima H: Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. International Journal of Stem Cells 査読有 2(2), 83-89, 2009

[学会発表] (計 7 件)

- ① 手塚里奈, 松本太郎, 石毛美夏, 麦島秀雄他: ヒト臍帯組織における間葉系幹細胞の局在および形質解析. (ワークショップ) 第 33 回日本造血細胞移植療学会総会, 松山, 2011. 3. 10
- ② 小高美奈子, 麦島秀雄, 松本太郎他: 骨髄破壊的処置による骨髄造血微小環境への影響についての検討. 平成 22 年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 日本大学幹細胞研究フォーラム, 東京, 2011. 1. 22
- ③ Kazama T, Matsumoto T, Mugishima H 他: Dedifferentiated fat (DFAT) cells convert into cardiomyocytes phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats with myocardial infarction. The 8th Annual Meeting of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS 2010) (Symposium), Dallas, USA, 2010. 10. 22
- ④ Matsumoto T, Mugishima H 他: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for regenerative medicine in patients with cardiovascular diseases. (シンポジウム) 第 42 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会, 岐阜, 2010. 7. 15
- ⑤ 松本太郎: 幹細胞に関する最近の話題と新規細胞治療法の開発 (ランチョンセミナー) 第 51 回日本小児血液学会・第 25 回日本小児がん学会, 舞浜, 2009. 11. 27
- ⑥ Matsumoto T, Mugishima H, Wada M 他: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for regenerative medicine. (Workshop) The 9th World Congress on Inflammation, Tokyo, Japan, 2009. 7. 8
- ⑦ 松本太郎, 脱分化脂肪細胞 (DFAT) を用いた再生医療への取り組み. (プレナリー). 第 10 回記念循環器再生医療研究会, 東京, 2008. 11. 29

[図書] (計 1 件)

- ① 松本太郎, 福田昇: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) を細胞源とする再生医療, 医学のあゆみ, 230(8) p553-555, 医歯薬出版株

式会社, 東京, 2009. 8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麦島 秀雄 (MUGISHIMA HIDEO)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 80183648

(2) 研究分担者

松本 太郎 (MATSUMOTO TARO)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 50366580

石毛 美夏 (ISHIGE MIKA)
日本大学・医学部・助教
研究者番号: 90420950

(3) 連携研究者

なし