

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591150

 研究課題名（和文）細胞治療のための臍帯血由来間葉系幹細胞バンク化を目指した基礎的研究
 研究課題名（英文）Quality assessment of cryopreserved-mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood

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（和文）：臍帯血由来間葉系幹細胞(MSC)を5株樹立した。増殖特性、clonological abilityはMSC株ごとに異なり、5株中4株が治療量としての細胞数に到達したが、残り1株の増殖は不良であった。凍結保存MSCの解凍後の増殖は速やかであり、増殖動態は各MSCの凍結保存前と同等であった。しかしながら、凍結保存の1株において染色体異常が検出されたことから、今後は継代期間と凍結保存による染色体異常への影響を検証する必要があると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we isolated 5 clones of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. Four clones yielded MSC with more than 1,000-fold expansion capacity after cryopreservation as well as before cryopreservation. Chromosomal analysis showed an abnormal karyotype in one clone after freezing. Further studies are needed to investigate the risk of prolonged culture periods and cryopreservation for the safety of MSC cell therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：間葉系幹細胞、臍帯血、凍結保存

1. 研究開始当初の背景

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ている。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。その後多数例を

対象とした同治療法の効果を支持する第 II 相臨床試験の結果が報告されている (Lancet 371:1579-1586, 2008)。この臨床試験においては、対象となった 55 例中の 39 例において有効であった (このうちの 30 例で著効) と報告され、客観的なエビデンスが集積されつつある。

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や臍帯血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、間葉系幹細胞源をドナー骨髄に求めることは困難であり、実際的であるとはいえない。臍帯血由来間葉系幹細胞が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確認されれば、上記のような骨髄移植患者や臍帯血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。

非血縁者間臍帯血移植は非血縁者間骨髄移植に肩を並べるまでに発展しつつあるが、骨髄と大きく異なる弱点は生着不全の頻度が 10-20%と高いことである。この問題点の解決策のひとつとして、生着不全が疑われた症例に対する間葉系幹細胞の輸注が考えられており、すでに有効性を支持する骨髄由来間葉系幹細胞輸注症例の報告も認められる (Leukemia 21:1733-1738, 2007)。本邦においては、複数臍帯血移植の臨床試験が現在進行中であるが、この方法において生着不全の課題が解決できない場合には、もうひとつの選択肢として、臍帯血と同時に間葉系幹細胞を移植する方法は十分検討に値する治療手段ではないかと考えられている。

2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植後患者における重症移植片対宿主病の治療や非血縁者間臍帯血移植における生着不全の回避を目的としたこれまでの間葉系幹細胞治療においては、ドナー骨髄由来間葉系幹細胞を体外増幅後に患者に輸注される方法により行われていたが、特に非血縁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。そこで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が確立されれば、すでに医療用として整備された公的臍帯血バンクと同様の品質管理やロジスティクスに倣い、速やかに移植医療機関に間葉系幹細胞を提供することができると考えられる。本研究においては、効率の良い臍帯血由来間葉系幹細胞株の樹立と、増幅後に凍結保存された臍帯血由来間葉系幹細胞の品質を検証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対外増幅

東北大学医学部倫理委員会および特定非営利活動法人宮城さい帯血バンク (現さい帯血バンクサポート宮城) 倫理委員会承認下に、同バンクより移植適応外臍帯血の譲渡を受ける。臍帯血より Hydroxyethylstarch (HES) 法により白血球分離後、Ficoll-Paque 比重遠心法により単核球を分離する。単核球は $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の密度で $40 \text{ cm}^2 / \text{dish}$ に播種し培養を開始する。Complete medium としては、MesenCult™ Basal Medium に Mesenchymal stem cell (MSC) stimulatory supplements を加えたものを用い、また MSC グレードの胎児ウシ血清 (FCS) を 20% 濃度にて添加する。初期培養においては、単核球の dish への付着を抑制するために dexamethasone (10^{-7} M) を添加する。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、 $3,000-4,000 \text{ cells/cm}^2$ の細胞密度で植え替えを行い ($40 \text{ cm}^2 / \text{dish}$)、継代 1 とする。得られた細胞集団はフローサイトメトリー法により、CD166、CD105、CD44、CD29、CD73、CD62L、CD34、CD45 の発現を測定する。また CFU-F コロニーアッセイ法を用い、May-Grunwald-Giemsa 染色後に間葉系幹細胞コロニー数を測定する。脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能実験には Differentiation Media BulletKits (Adipogenic, Chondrogenic, Osteogenic の各 kit, Lonza) を使用する。染色体分析は G バンド法により行う。

(2) 臍帯血由来間葉系幹細胞の凍結保存

継代培養ごとに細胞凍結保存液セルバンカーを用いて、バイアルにより凍結保存する。バイアルは -85°C 超低温フリーザー内での静置法により凍結する。

(3) 凍結保存間葉系幹細胞の培養

凍結保存間葉系幹細胞の入ったバイアルは 37°C 恒温槽にて急速解凍し、complete medium にて洗滌後、初期培養と同様の方法で培養を再開し、増殖特性、CFU-F コロニーアッセイ、染色体分析を実施する。

4. 研究成果

(1) 臍帯血由来間葉系幹細胞の樹立

採取から培養開始までの時間の短い臍帯血を選択した (5.5-9.0 時間)。持続的な増殖が確認できた 2 件については継代毎に一部を凍結保存し、一部を $1 \times 10^5 / 40 \text{ cm}^2 / \text{dish}$ として培養を継続した (図 1)。2 件の臍帯血から得られた MSC は 5 株であり、フローサイトメトリー解析によるそれらの表現型はいずれも $\text{CD}29^+ \text{CD}44^+ \text{CD}73^+ \text{CD}105^+ \text{CD}166^+ \text{CD}34^+ \text{CD}45^- \text{CD}62\text{L}^-$ であった (図 2)。増殖特性は 5 株のうちの 2 株 (MSC4189-3, MSC4189-4) が継代 6 以上で >25 cumulative population doubling level (PDL) と増殖が良好であったのに対し、残りの 3 株 (MSC4093, MSC4189-1, MSC4189-2) は継代 4 以上で <15 PDL と前 2 株と比較して

増殖は弱かった(図3)。また継代毎のCFU-F assay (1,000 cells/plate で評価)においては、MSC4189-3 と MSC4189-4 の2株は継代3までは>30 コロニー(56コロニー, 37コロニー)と clonological ability は高かったが、後者の3株では、継代3以上では2コロニー以下と colony forming ability(CFA)は低かった(図4、図5)。以上、PDL と CFA とは一致する結果を得た。継代4までの累積細胞数は MSC4189-3 で 1.5×10^{10} , MSC4189-4 では 1.6×10^{10} , MSC4189-1 では 2.8×10^8 , MSC4189-2 では 1.6×10^8 と治療量としては十分量の細胞数に到達したが、MSC4093のみは 5.2×10^6 と治療量としての十分な細胞数には到達しなかった。

(2) 凍結保存間葉系幹細胞の性状

樹立から約1年間 -80°C 超低温冷凍庫に凍結保存した5株を順次解凍し、初代培養株と同等の増殖特性を有するかどうかを検討した。 $1 \times 10^5/40 \text{ cm}^2$ dish にて培養を継続し、Complete medium としてはこれまでどおり MesenCult™ Basal Medium に MSC Stimulatory Supplements を加えたものを使用し、これに MSC グレードの FCS を 20%にて添加した。解凍後の MSC の増殖は速やかであり、凍結保存 MSC4189-3 および MSC4189-4 (以下 MSC4189-3F および MSC4189-4F) の増殖特性は>25 PDL であり、初代培養株と同等であった(図6)。また凍結保存 MSC4189-1、MSC4189-2 および MSC4093 (以下 MSC4189-1F、MSC4189-2F および MSC4093F) の増殖特性は継代4以上で<15 PDL と、それぞれ初代培養株と同等であり、増殖は弱かった(図6)。また継代毎のCFU-F assay においては、MSC4189-3F と MSC4189-4F の2株は初代培養株と同等で、継代3までは>30 コロニー(33コロニー, 41コロニー)と clonological ability は高かったが、MSC4189-1F と MSC4189-2F では、継代3以上では2コロニー以下と初代培養株と同様に CFA は低かった(図7)。MSC4093F では継代1の段階で1コロニーであった。以上、凍結保存の5株においても、初代培養株と同等に PDL と CFA とは一致する結果を得た。解凍後の継代4までの累積細胞数は MSC4189-3F で 1.5×10^6 倍, MSC4189-4F では 0.9×10^6 倍, MSC4189-1F では 3.6×10^4 倍(継代3), MSC4189-2F では 2.2×10^3 倍で治療量としては十分量の細胞数に到達したが、MSC4093F のみは治療量としての十分な細胞数には到達しなかった。凍結保存の5株について、解凍後培養早期の段階(MSC4189-3F/継代1, MSC4189-4F/継代2, MSC4189-1F/継代1, MSC4189-2F/継代2)で G-banding による染色体分析を実施した。核板が得られた4株中3株は正常核型であったが、1株で核型異常 46, XX, add(6)(p21) が認められた。この MSC は初期培養後継代2の段階で凍結保存され

たものであり、解凍後培養継代2で染色体分析が行われた。以上の結果より、初期培養で増殖能が高い株は凍結保存、解凍後においても同等の増殖能を保持することが明らかとなった。しかしながら、一部の凍結保存株において染色体異常が検出されたことから、今後は継代期間と凍結保存による染色体異常への影響を検証する必要があると思われる。

図1 MSC4189-3の形態(replating 8日後)

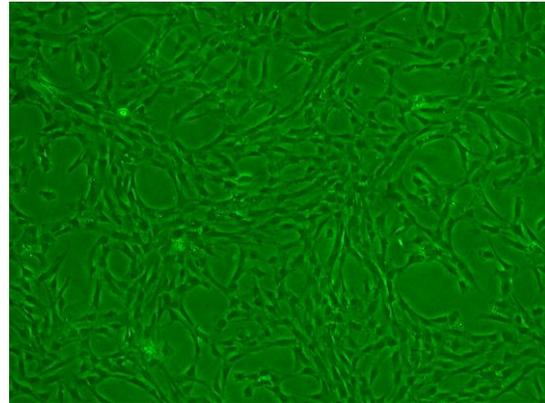


図2 表面マーカー分析(MSC4189-3)

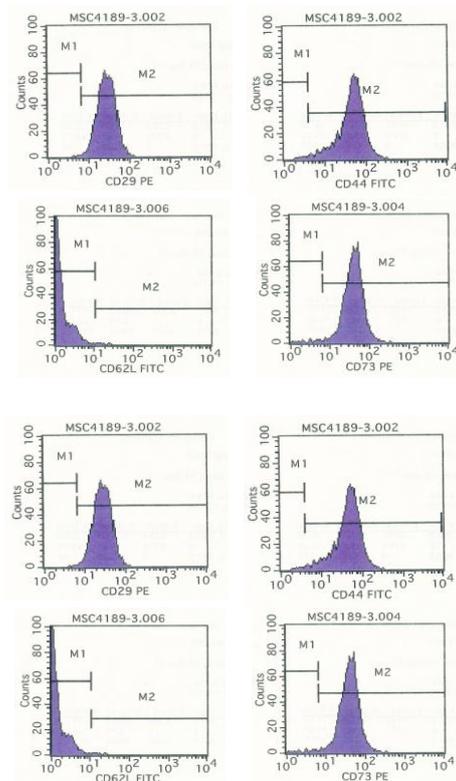


図3 増殖特性（凍結前）

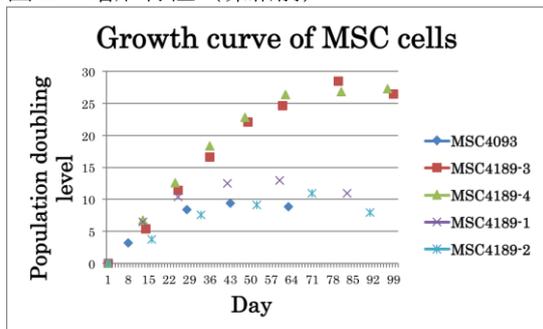


図4 MSC コロニー（May-Grunwald-Giemsa 染色、20X）

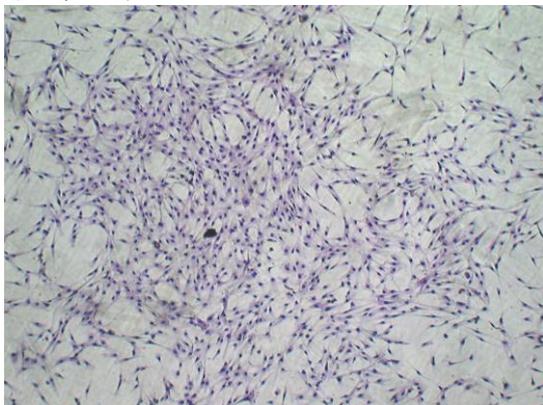


図5 コロニー形成能（凍結前）

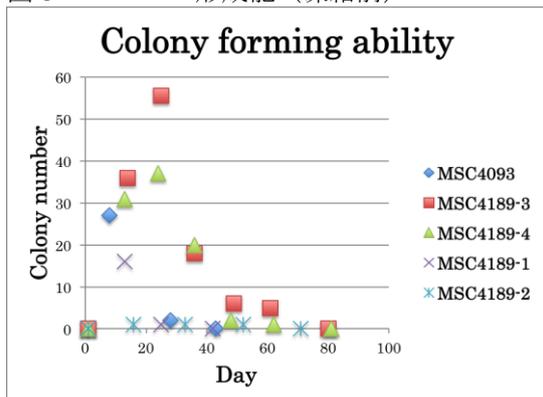


図6 増殖特性（凍結後）

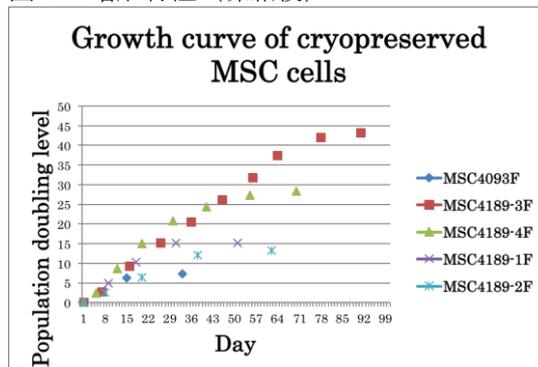
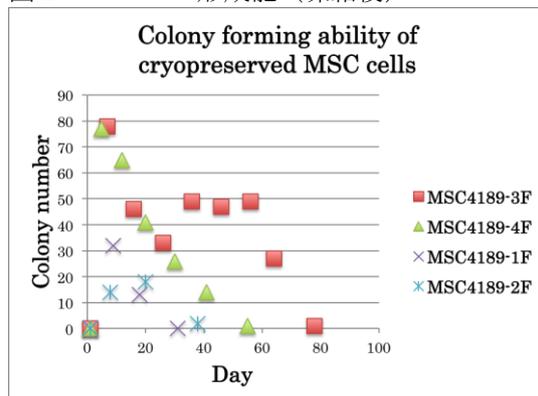


図7 コロニー形成能（凍結後）



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3件）

- 1) Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, and Ishii N.: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. PLoS ONE, 7(6): e37892, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0037892. Epub 2012 Jun 20.
- 2) Niizuma H, Uematsu M, Sakamoto O, Uchiyama T, Horino S, Onuma M, Matsuhashi T, Rikiishi T, Sasahara Y, Minegishi M, Tsuchiya S. Successful cord blood transplantation with reduced-intensity conditioning for childhood cerebral X-linked adrenoleukodystrophy at advanced and early stages. Pediatr Transplant. 2012 Aug 11. Mar; 16(2): E63-70.

doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01539.x.
Epub 2011 Aug 11.

- 3) Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Abe M, Ishioka N, Harigae H, Tsuchiya S. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. Int J Hematol. 2011 May;93(5):645-51. Epub 2011 Apr 21. doi: 10.1007/s12185-011-0830-y. Epub 2011 Apr 21.

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 SIGERU)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30124605

小沼 正栄 (ONUMA MASAEI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：70436111

(3) 連携研究者