

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 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890090

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の薬物的機能賦活を利用した臍帯血細胞移植技術の改良

研究課題名（英文）Pharmacological Stimulation of Mesenchymal Stromal/Stem Cells for Umbilical Cord Blood Transplantation

研究代表者

三浦 康生 (MIURA YASUO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70605146

研究成果の概要（和文）：少子高齢化社会を迎えた我が国では成人における臍帯血移植の需要は増大の一途を辿っている。一方、臍帯血移植では細胞数が少ないことに起因する生着不全が臨床上の大きな問題であり、その解決は医学的・社会的に喫緊の課題である。間葉系幹細胞は造血を支持する幹細胞であるが、臍帯血の中に含まれる細胞数は少ない。我々は間葉系幹細胞研究の技術的蓄積を生かし、従来の方法より効率的に臍帯血から間葉系幹細胞を分離する方法を見出した。そして、間葉系幹細胞の持つ造血支持能力は「培養増幅」（＝細胞数を増やす）の後に、「薬物刺激」（＝機能を向上する）を加えることで増強されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The demand of umbilical cord blood transplantation has been increased in our country with declining birth rate and aging of the population. However, engraftment failure is one of the clinical issues to be solved in umbilical cord blood transplantation. Mesenchymal stromal/stem cells have an ability to support hematopoiesis, but its frequency in umbilical cord blood is low. In this project, we found a novel and effective method to isolate mesenchymal stromal/stem cells from umbilical cord blood. Moreover, we found that the hematopoiesis-supportive ability of mesenchymal stromal/stem cells is qualitatively enhanced by the pharmacological stimulation in addition to the quantitative expansion by cell culture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：間葉系幹細胞、臍帯血、造血細胞移植、細胞治療

1. 研究開始当初の背景

難治性血液疾患に対して治癒を目的とした造血細胞移植が施行されるが、適切なドナーの存在しない症例に対しては臍帯血移植が選択される。わが国では臍帯血移植の実施

件数は増加の一途を辿っており、骨髄移植とほぼ同数が行われている。少子高齢化社会では高齢者人口の増加による移植適応症例の増加と若年者人口の減少による骨髄ドナー不足が起きることは必然であり、今後もわが

国では成人に対する臍帯血移植の需要は増大するものと予測される。一方、臍帯血移植においては移植される細胞数が少ないことに起因する生着不全が臨床的に大きな問題として存在する。このような状況の中で生着不全の回避を目指した臍帯血移植技術の改良は社会的・医学的に解決すべき重要な課題といえる。

間葉系幹細胞は多彩な治療特性を有する組織幹細胞である。現在までに、間葉系幹細胞を応用した臨床試験が世界中で多くの疾患を対象に検討されている。造血細胞移植においては間葉系幹細胞のもつ造血支持能を応用することで生着や血球回復を促進する可能性が示されている。臍帯血移植において生着不全が起きる要因の一つとして、さい帯血に含まれる間葉系幹細胞が少ないことが考えられる。そこで、さい帯血に含まれる間葉系幹細胞を培養増幅することを着想した。しかしながら、さい帯血からの間葉系幹細胞の分離は骨髓液からの分離と比較して困難であることから、その分離効率を高める方法を検討した。

間葉系幹細胞を応用した細胞治療を検討する場合、培養増幅することでその治療効果を得ようとするのが一般的である。上述した方法で間葉系幹細胞を得た後に培養増幅するが、さらに薬物で刺激することで造血支持能を機能的に増強することを試みた。

上述の検討により、薬物刺激した培養増幅間葉系幹細胞を臍帯血移植における生着不全の克服に応用することの妥当性を示す基礎的データの蓄積を行った。

2. 研究の目的

(1) 薬物刺激によって培養増幅した間葉系幹細胞の機能賦活が得られるかを検討する。

(2) 臍帯血からの間葉系幹細胞の分離効率を高める方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血または骨髓吸引液から単核球を分離する。単核球を適切な条件で培養すると、培養ディッシュ上に接着細胞がコロニーを形成する。コロニー形成細胞の培養を継続すると増幅する。このようにして得られる細胞が間葉系幹細胞である。

(2) 培養増幅した間葉系幹細胞を造血因子エリスロポエチンまたは副甲状腺ホルモン

(以下薬物)で *in vitro* で刺激する。これら薬物により間葉系幹細胞が活性化されることイムノプロットティング法やフローサイトメトリー法を用いてタンパク質のリン酸化や

発現レベルの変化を検討した。

(3) 薬物刺激した間葉系幹細胞をキャリア(ヒドロキシアパタイト/リン酸三カルシウム)と混和し免疫不全マウスの皮下に移植すると、移植局所に異所性に造血組織が誘導される。このシステムを用いて、間葉系幹細胞の持つ造血構築能力を生体内で評価した。

(4) 薬物刺激した間葉系幹細胞を CD34 陽性造血幹/前駆細胞とサイトカイン存在下で共培養した。このシステムを用いて、間葉系幹細胞の持つ造血細胞増幅能力を評価した。

(5) (1) の方法では、間葉系幹細胞は培養ディッシュへの接着により分離される(接着法)。標準的には非接着細胞(浮遊細胞)は培養後1週間程度で使用しないが、これらの細胞の培養を継続することで間葉系幹細胞が分離できないかを検討した。

4. 研究成果

(1) 培養増幅したヒト間葉系幹細胞をエリスロポエチンで刺激すると、エリスロポエチンレセプターシグナルの下流に存在する STAT5 分子のリン酸化および間葉系幹細胞マーカーの発現の増強が認められる。そして、エリスロポエチンで刺激した間葉系幹細胞を免疫不全マウスの皮下へ移植すると、間葉系幹細胞により誘導される造血が亢進する。また、ヒト CD34 陽性造血幹/前駆細胞をエリスロポエチンで刺激した間葉系幹細胞と共培養すると、造血細胞の培養増幅効率が増強した(下図)。

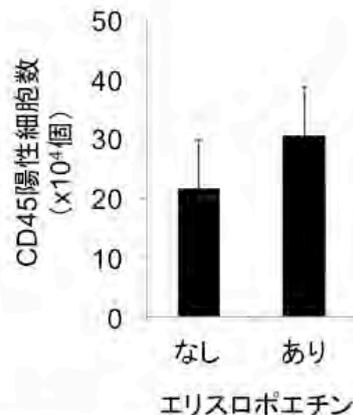
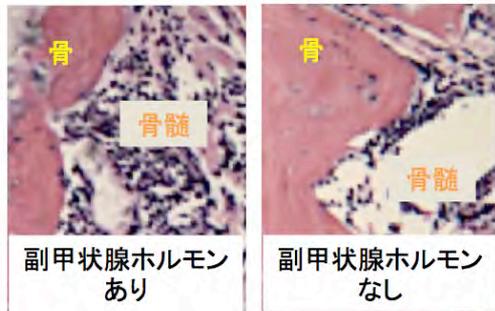


図 間葉系幹細胞による造血細胞増幅に対するエリスロポエチンの効果

培養増幅したヒト間葉系幹細胞を副甲状腺ホルモンで刺激し、免疫不全マウスの皮下へ移植した。その結果、副甲状腺ホルモンで刺激しないヒト間葉系幹細胞を皮下移植した場合と比較して、誘導される造血が亢進し

ていた。つまり、副甲状腺ホルモンは間葉系幹細胞の造血支持能を増強する事が確認された(次図)。

以上、培養増幅した間葉系幹細胞を薬物的に刺激することで造血支持能が増強する結果を得た。



培養増幅した間葉系幹細胞を免疫不全マウス皮下に移植すると、間葉系幹細胞により骨髓組織が誘導される。副甲状腺ホルモンで刺激した間葉系幹細胞(左)は、副甲状腺ホルモンで刺激しない間葉系幹細胞(右)と比べてより多くの骨髓組織を誘導する。

図 間葉系幹細胞による骨髓組織誘導に対する副甲状腺ホルモンの効果

(2) CFU-F (colony forming unit-fibroblast) は間葉系幹細胞の数を示す指標である(次図)。臍帯血から単核球を分離し、単核球から間葉系幹細胞を分離するために通常用いられる接着法では臍帯血1ユニットあたりのCFU-F(コロニー数)は約1個(平均値、以下同じ)であった(図、Culture 1)。一方、浮遊細胞の培養を継続していくと2週目の培養からは約10個(図、Culture 2)、3週目の培養からは約20個(図1、Culture 3)のCFU-Fが得られた。つまりCulture1のみから分離する標準的方法と比較して、より多くのコロニー

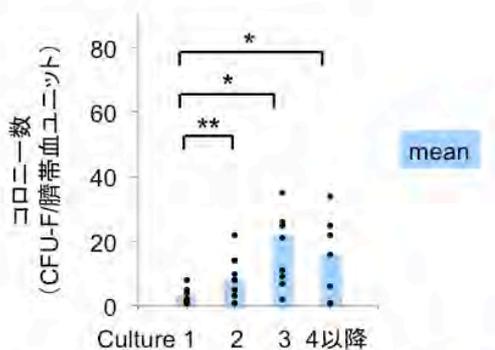


図 臍帯血より得られる間葉系幹細胞コロニー数

一数が得られた。これらの方法で得られた間葉系幹細胞は標準的な方法で得られる細胞と同様の多分化能を示した。また、間葉系幹細胞に特徴的とされる表面マーカーの発現も同等であった。

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 三浦康生、間葉系幹細胞による造血制御と臨床応用、血液内科、査読無、印刷中。
<http://www.kahyo.com/category/A1-KS>
- ② 三浦康生、間葉系幹細胞による造血制御、臨床血液、査読有、5巻、431-435、2013。
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/rinketsu/-char/ja>
- ③ 三浦康生、間葉系幹細胞と造血、血液フロンティア、査読無、23巻、21-27、2013。
https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=26437
- ④ Hayashi Y, Hirai H, Kamio N, Yao H, Yoshioka S, Miura Y, Ashihara E, Fujiyama Y, Tenen DG and Maekawa T. C/EBP β promotes BCR-ABL-mediated myeloid expansion and leukemic stem cell exhaustion. *Leukemia* 27:619-628, 2013. doi: 10.1038/leu.2012.258. (査読有)
- ⑤ Satake S, Hirai H, Hayashi Y, Shime N, Tamura A, Yao H, Yoshioka S, Miura Y, Inaba T, Fujita N, Ashihara E, Imanish J, Sawa T and Maekawa T. C/EBP β is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced 'emergency' granulopoiesis. *Journal of Immunology*. 189:4546-4555, 2012. doi: 10.4049/jimmunol.1103007. (査読有)
- ⑥ 三浦康生、間葉系幹細胞 ~no longer second class marrow citizens~, 京都がん研究会メールマガジン、査読無、87巻、7、2011。
http://ganpro.med.kyoto-u.ac.jp/publicity/kyoto_cancer/kyoto_cancer.htm

[学会発表](計12件)

- ① Miura Y. Pharmacological Targeting of Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem cells for Regulation of Hematopoiesis. AsiaCORD 2013, Scientific Symposium I-2 "New Insights into Stem Cell Biology-Interactions between Stromal Cells & Solid tumor/Leukemic Stem Cells", Kobe, April 19-20, 2013.
- ② Yao H, Miura Y (2番目), et al (他7名).

- Parathyroid hormone enhances expansion through CDH11 in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. AsiaCORD 2013, Scientific Symposium I-1 "New Insights into Stem Cell Biology-Stem Cell Development & Differentiation" Kobe, Japan, April 19-20, 2013.
- ③ Yoshioka S, Miura Y (2 番目), et al (他 8 名) . C/EBP β in mesenchymal stromal/stem cells regulates early B cell lymphopoiesis. AsiaCORD 2013, Scientific Symposium I-1 "New Insights into Stem Cell Biology- Stem Cell Development & Differentiation" Kobe, Japan, April 19-20, 2013.
- ④ 吉岡聡、三浦康生 (2 番目), et al (他 5 名) . 接着法による効率的なさい帯血からの間葉系幹細胞分離に関する検討 (抄録番号 OS-16-2) . 第 61 回日本輸血・細胞治療学会総会、横浜、平成 25 年 5 月 16 日-18 日.
- ⑤ Yao H, Miura Y (2 番目), et al (他 5 名) . Pharmacological mesenchymal stem cell-based intervention as a novel approach to expand hematopoietic cells. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat 2012, Hyogo, Oct 5-6, 2012.
- ⑥ Yoshioka S, Miura Y (2 番目), et al (他 7 名) . Expression of C/EBP β in bone marrow mesenchymal stem cells is mandatory for early-stage B cell lymphopoiesis [Abstract #3457]. American Society of Hematology, 54th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012.
- ⑦ Yao H, Miura Y (2 番目), et al (他 5 名) . Mesenchymal stem cells skewed their phenotype toward the osteogenic lineage support the hematopoietic cell differentiation [Abstract #3458]. American Society of Hematology, 54th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012.
- ⑧ Miura Y: Regulation of hematopoiesis by mesenchymal stem cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Symposium 4 "Mesenchymal stem cells: Progress Toward Clinical Application for Hematopoietic Stem Cell Transplantation", Kyoto, October 20, 2012
- ⑨ Yoshioka S, Miura Y (2 番目), et al (他 7 名) . Defective mesenchymal stem cells contribute to impaired B cell lymphopoiesis in C/EBP β deficient mice [Abstract # OS-2-25]. The 74th Annual Meeting of the

Japanese Society of Hematology, Kyoto, October 19-21, 2012.

- ⑩ Yao H, Miura Y (2 番目), et al (他 5 名) . Parathyroid hormone stimulates mesenchymal stem cells to enhance expansion of hematopoietic cells [Abstract # OS-1-119]. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, October 19-21, 2012.
- ⑪ 三浦康生. 間葉系幹細胞による造血制御と臨床応用に向けた基礎的検討. 特定非営利活動法人 HLA 研究所京滋免疫血液研究会、京都、平成 24 年 2 月 16 日.
- ⑫ Yao H, Miura Y (2 番目), et al (他 4 名) . Parathyroid Hormone Stimulates Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance the Expansion of Hematopoietic Stem Cells [Abstract #3407]. American Society of Hematology, 53rd Annual Meeting, San Diego, California, USA, December 10-13, 2011.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 康生 (MIURA YASUO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70605146

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

八尾 尚幸 (YAO HISAYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・研修員

研究者番号：なし

吉岡 聡 (YOSHIOKA SATOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・研修員

研究者番号：なし