

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500526

研究課題名(和文) 三次元固定処理フィーダー細胞を用いた未分化細胞培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of ex vivo expansion method of hematopoietic progenitor cells using 3D fixed feeder cells

研究代表者

三好 浩稔 (Miyoshi, Hirotoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70292547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植に応用することを目的として、三次元固定処理フィーダー細胞上で造血系細胞を培養することにより、造血系細胞の増幅を試みた。フィーダー細胞の種類、フィーダー細胞の処理方法(三次元固定、三次元凍結保存)、および造血系細胞の播種密度が造血系細胞の増幅度におよぼす影響を調べた。その結果、3種類のフィーダー細胞の中では C3H/10T1/2 細胞が造血系細胞の増幅に適していることがわかった。また、三次元固定処理と三次元凍結保存処理を比べると、造血系細胞を高密度に培養したときは増幅度に違いはなかったものの、密度が低くなると三次元凍結保存処理の方が高い増幅度が得られることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To establish an efficient method of ex vivo expansion of hematopoietic cells (HCs) that is applicable to hematopoietic stem cell transplantation, three-dimensional (3D) cocultures of HCs with feeder cells were performed. In these cocultures, 3D cultured feeder cells were treated by 3D fixation or 3D cryopreservation prior to the cocultures, and HCs were expanded on these feeder cells. Among 3 types of feeder cells, C3H/10T1/2 cells showed highest ability to facilitate expansion of the HCs. With respect to the treatment of the feeder cells, there was no obvious difference between the 3D fixation and 3D cryopreservation on HC expansion when the HCs were seeded at a high density. On the contrary, higher expansion was achieved in the cocultures with 3D cryopreserved cells compared with those with 3D fixed cells when the HCs were seeded at low densities.

研究分野：再生医工学

キーワード：造血幹細胞 ストローマ細胞 三次元培養 固定 凍結保存 増幅 共培養 ティッシュ・エンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 白血病などの重篤な造血機能障害に対して、骨髄や臍帯血中に含まれる造血幹細胞を用いた造血幹細胞移植は極めて有効な治療法である。しかし、ヒト白血球型が一致したドナーの確保が難しいこと、骨髄移植ではドナーの負担が大きいこと、臍帯血移植はドナーが比較的多く負担も少ないものの、造血幹細胞数が少ないために子供への移植がほとんどであること、などから広範には実施されていない。

(2) これらの問題を解決するために、近年では造血幹細胞を体外の培養系で増幅する技術確立し、造血幹細胞移植に応用することが活発に研究されている^{1,2)}。とりわけ臍帯血については、臍帯血中の造血幹細胞数を2倍以上に増幅できれば成人への移植にも使用できることから、移植数が大幅に増加することが期待される。

(3) 造血幹細胞を効率的に増幅するためには、造血を支持するフィーダー細胞(ストローマ細胞)と共培養する方法が一般に用いられる³⁾。このとき、放射線照射や薬剤(DNA合成阻害剤)処理によって共培養前にフィーダー細胞の増殖を抑制しておくことで、造血幹細胞の増幅率が改善されることが示されている。しかし、「放射線照射には特殊な装置が必要であり、薬剤処理では安全性の問題があるため、簡便で安全なフィーダー細胞の増殖抑制方法がない」、あるいは「造血幹細胞の増幅はほとんどが単層(二次元)培養で検討されており、生体内の三次元的造血微小環境が増幅に及ぼす影響はあまり検討されていない」、などの問題が残されている。

(4) 研究代表者らは、装置工学的な観点から多孔質樹脂を担体とする三次元培養法を要素技術として、これまでに体外造血システムの開発を行ってきた^{4,5)}。三次元培養系においてフィーダー細胞との共培養実験を行った結果、「単層培養では必須であるシグナル分子(サイトカインや増殖因子)を添加しなくても造血幹細胞を十分に増幅できること」や、「フィーダー細胞との共培養系では、フィーダー細胞から分泌される液性因子だけでなくフィーダー細胞の表面分子(フィーダー細胞との接触)が造血幹細胞の増幅に強く関与していること」を見出した。

(5) これらの結果から、固定処理することで表面分子構造を維持したフィーダー細胞を用いて造血系細胞の増幅実験を行ったところ、造血幹細胞を増幅できることや、ストローマ細胞の固定剤としてはグルタルアルデヒドが優れていることを明らかにした。しかし、増幅実験には1種類のストローマ細胞(DAS 104-8細胞株)しか用いておらず、また一定の細胞密度で増幅実験をおこなっ

たため、培養密度が造血系細胞の増幅度に及ぼす影響については不明であった。

2. 研究の目的

三次元培養したフィーダー細胞をグルタルアルデヒドで固定処理(三次元固定処理)したものをを用いて造血系細胞を培養することにより、フィーダー細胞の表面分子を利用した造血系細胞の増幅を行う。この際、研究代表者らが以前に開発した方法である、三次元凍結保存したフィーダー細胞を用いた造血系細胞の増幅方法の結果と比較することで、簡便に造血幹細胞を増幅できる方法を確立することが本研究の目的である。具体的には、以下の項目を検討した。

(1) フィーダー細胞として、C3H/10T1/2細胞株とOP9細胞株を用い、マウス胎仔肝臓中の造血系細胞の増幅実験を行った。これらの結果を、従来から用いてきたDAS 104-8ストローマ細胞株の結果と比較することで、造血幹細胞の増幅に適した細胞株を選定した。

(2) 異なる密度で造血系細胞を播種して培養実験を行うことで、造血系細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響について検討した。ストローマ細胞の有無や、ストローマ細胞の処理方法が異なる条件下でも同様の実験を行うことで、各条件下での培養密度依存性について調べた。

(3) マウス造血系細胞の増幅に適した条件を用いて、ヒト臍帯血中の造血系細胞の増幅に関する予備実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 造血系細胞として、胎生14日目のマウス胎仔肝臓細胞を使用した。また、フィーダー細胞には、未分化な造血系細胞の増幅を支持することが報告されているC3H/10T1/2細胞株とOP9細胞株を使用した。三次元培養用担体には、一辺2mmの立方体状に細切したpolyvinyl formal樹脂多孔質体(平均孔径130 μ m)をコーゲンコートして使用した。

(2) フィーダー細胞の処理は、担体内部で三次元培養した細胞を担体ごとグルタルアルデヒドで固定する三次元固定処理と、三次元培養細胞を担体ごと凍結保存した三次元凍結保存の2種類を用いた。これらの処理を行ってから固定液中、あるいは液体窒素中で一定期間保存したのち、共培養直前に洗浄、または解凍して増幅実験に用いた。

(3) 造血系細胞の増幅実験では、まずフィーダー細胞を 1×10^7 cells/cm³の密度で担体に播種し、1週間培養することでフィーダー細胞層を形成した。この細胞を前述のように三次元固定処理、あるいは三次元凍結保存処

理したのち共培養実験に使用した。共培養実験では、これらの担体に胎仔肝臓細胞を 1×10^8 cells/cm³ の密度で播種して2週間共培養した。なお、胎仔肝臓細胞の培養密度が増幅度に及ぼす影響を調べるための実験では、胎仔肝臓細胞を 0.1、0.2、または 1×10^8 cells/cm³ の密度(それぞれ D1、D2、D10)で播種した。培地は、血清は含むもののサイトカインなどの刺激因子は含まない Hava 培地を用いた。

(4) 三次元培養した細胞の総細胞数は、MTT法により計測した⁵⁾。また、培養細胞中の各造血系細胞の割合を、Ter119(赤芽球)、B220(B細胞)、c-kit(造血前駆細胞)、およびCD34(造血幹・前駆細胞)に対する抗体を用いてフローサイトメーターで測定した。

4. 研究成果

(1) まず、造血系細胞の増幅におよぼすストローマ細胞株の影響を調べるために、フィーダー細胞に C3H/10T1/2 細胞株を用いて胎仔肝臓細胞との共培養実験を行った。フィーダー細胞の処理方法を変えて三次元共培養を行ったときの、2週間での各造血系細胞の増幅度を表1に示す。

これらの共培養では、赤芽球以外の細胞は良好に増幅され、移植には重要である未分化な造血系細胞(造血前駆細胞と造血幹・前駆細胞)も5倍以上に増幅された。

フィーダー細胞の処理方法を比較すると、三次元凍結保存に比べて三次元固定処理した場合の方が増幅度はわずかに高かった。

(2) 次に、フィーダー細胞に OP9 細胞を用いて同様の増幅実験を行った際の、造血系細胞の増幅度を表2に示す。

フィーダー細胞に C3H/10T1/2 を用いた場合と同様に未分化な造血系細胞が良好に増幅されたとともに、フィーダー細胞を三次元固定処理した方がわずかに高い増幅率が得られた。

(3) 本研究で用いた2種類のフィーダー細胞株を比較すると、OP9 細胞株に比べて C3H/10T1/2 細胞株を用いた場合の方が全ての造血系細胞の増幅度がわずかに高かった

表1. フィーダー細胞に C3H/10T1/2 細胞株を用いた三次元共培養における各造血系細胞の増幅度

	増幅度 [倍]	
	三次元固定	三次元凍結保存
赤芽球	1.6	1.1
B 細胞	12.0	8.4
造血前駆細胞	8.0	5.7
造血幹・前駆細胞	8.9	5.8

表2. フィーダー細胞に OP9 細胞株を用いた三次元共培養における各造血系細胞の増幅度

	増幅度 [倍]	
	三次元固定	三次元凍結保存
赤芽球	1.1	0.9
B 細胞	8.2	4.6
造血前駆細胞	6.0	4.1
造血幹・前駆細胞	7.9	4.7

ことから、造血系細胞の増幅には C3H/10T1/2 細胞の方が適していると考えられた。

(4) 一般に、細胞の初期培養密度が低いほど、細胞の増殖に必要なスペースが多く存在していることから増幅度は高くなる傾向がある。そこで、胎仔肝臓細胞の播種密度が造血系細胞の増幅度にどのような影響があるかを調べるために、低密度で胎仔肝臓細胞を播種して共培養実験を行った。

胎仔肝臓細胞を低密度(D1およびD2)で播種して共培養実験を行った際の造血前駆細胞の増幅度を、前述の高密度(D10)での培養実験の結果とあわせて表3と表4に示す。

いずれのフィーダー細胞を用いた場合にも、三次元固定処理では胎仔肝臓細胞を低密度(D1、D2)で播種すると高密度(D10)よりも増幅度は低下したのに対して、三次元凍結保存処理では増加した。なお、造血幹・前駆細胞の増幅度についても同様の傾向が得られた。

フィーダー細胞を用いないコントロール実験における増幅度の結果と比べると、高密度で胎仔肝臓細胞を播種した場合(D10)には共培養系と比べて増幅度に大きな違いはなかった。しかし、コントロール実験において播種密度を下げると、三次元固定処理の場合と同様に増幅度は低下した。以上のことから、造血系細胞の播種密度が低い場合には、三次元凍結保存処理したフィーダー細胞が造血系細胞の増幅を促進していることが確かめられた。

表3. フィーダー細胞に C3H/10T1/2 細胞株を用いた三次元共培養における、胎仔肝臓細胞の播種密度が造血前駆細胞の増幅度に及ぼす影響

	増幅度 [倍]	
	三次元固定	三次元凍結保存
D1	0.9	29.3
D2	1.5	13.4
D10	8.0	5.7

表4. フィーダー細胞に OP9 細胞株を用いた三次元共培養における、胎仔肝臓細胞の播種密度が造血前駆細胞の増幅度に及ぼす影響

	増幅度 [倍]	
	三次元固定	三次元凍結保存
D1	0.9	6.9
D2	4.8	4.1
D10	6.0	4.1

(5) 本研究での三次元培養法を用いてヒトの未分化な造血系細胞を増幅できるかどうかを確認するために、最も良い結果が得られた三次元凍結保存処理した C3H/10T1/2 細胞との共培養により、ヒト臍帯血細胞中の造血系細胞を増幅する実験を行った。その結果、造血幹・前駆細胞などの未分化な造血系細胞を5倍程度に増幅することができた。

(6) 本研究では、三次元固定処理したフィーダー細胞層を用いて、マウス胎仔肝臓細胞中の造血系細胞を増幅することを試みた。これらの実験において、三次元凍結保存処理したフィーダー細胞の結果と比較することで、未分化な造血系細胞を簡単に増幅できる方法を確認することを目指した。これらのフィーダー細胞処理法は処理後の細胞を培養する必要が無く、固定液や液体窒素中で長期間保存できるというメリットがある。

両処理法の違いは、三次元凍結保存処理では、解凍後のフィーダー細胞はほとんど増殖しないものの、ある程度の細胞は生存している。一方、三次元固定処理では細胞は死滅しているため、フィーダー細胞の表面分子が造血系細胞に作用する可能性はあるがフィーダー細胞から分泌される液性因子の効果はない。

本研究において高密度に胎仔肝臓細胞を播種した場合には、フィーダー細胞の処理方法が造血系細胞の増幅度におよぼす影響の違いは顕著ではなく、むしろ三次元固定処理したフィーダー細胞を用いた方が増幅度は高かった。この原因として、播種した胎仔肝臓細胞中に含まれるストローマ細胞が造血系細胞の増幅に作用したため、あらかじめ処理したフィーダー細胞層の効果が小さかった可能性が考えられた。

(7) 低密度で胎仔肝臓細胞を播種して培養した際には、三次元凍結保存処理では高密度に比べて増幅度が増加したのに対して、三次元固定処理では予想に反して増幅度が低下した。

低密度で播種した場合には、胎仔肝臓細胞中に含まれるストローマ細胞の密度も当然低下する。三次元凍結保存処理では、フィーダー細胞が生存しているため、播種細胞中の

ストローマ細胞数が低下してもフィーダー細胞が造血を支持し、培養密度が低下したことによって増幅できる空間が増大したことで増幅が促進される効果の方が大きかったと考えられた。その一方で、三次元固定処理では播種細胞中のストローマ細胞密度が低下したために、フィーダー細胞の表面分子による増幅支持能力だけでは不十分となり、造血系細胞の増幅度が低下したと考えられた。これらの結果は、造血系細胞の増幅にはフィーダー細胞の表面分子だけでなく、分泌される液性因子も重要であることを強く示唆している。

(8) 本研究で得られた増幅度の結果を、従来からフィーダー細胞として用いてきた DAS 104-8 細胞株の結果と比較すると、各造血系細胞の増幅度は本研究で用いた2種類のフィーダー細胞の方が高い傾向にあった。従って、現時点ではフィーダー細胞としては C3H/10T1/2 細胞株が最適であり、造血系細胞を低密度で播種して共培養することで、最も効率的に造血幹細胞を増幅することができると考えられた。

(9) ヒト臍帯血中の造血系細胞の増幅実験では、マウスのフィーダー細胞を用いることで、造血刺激因子を加えることなく未分化な造血系細胞をある程度まで増幅できることが示された。

臨床応用に向けてはヒトのフィーダー細胞を使用する必要があり、培地条件や培養密度を検討することで、最適な増幅条件を決定する必要がある。

(10) 結論として、造血系細胞を効率的に増幅するためには、三次元凍結保存した C3H/10T1/2 フィーダー細胞上に低密度で造血系細胞を播種して共培養する方法が適していることがわかった。同様の方法でヒト臍帯血中の未分化な造血系細胞も増幅できたことから、造血幹細胞移植への応用を目的として生体外で造血系細胞を増幅できるシステムの開発につながることを期待できる。

<引用文献>

- 1) Hofmeister CC et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transpl* 39, 11-23, 2007
- 2) Csaszar E et al. Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. *Cell Stem Cell* 10, 218-229, 2012
- 3) da Silva CL et al. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord

- blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 33, 828-835, 2005
- 4) Miyoshi H et al. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells within a porous polymer scaffold: effects of oxygen concentration and stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med* 5, 112-118, 2011
 - 5) Miyoshi H et al. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med* 7, 32-38, 2013

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyoshi H, Morita M, Ohshima N, Sato C. Expansion of mouse hematopoietic progenitor cells in three-dimensional cocultures on frozen-thawed stromal cell layers formed within porous scaffolds. *Exp Hematol* 43, 115-124, 2015、査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/bm-engng/bme/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三好 浩稔 (MIYOSHI, Hirotoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号： 70292547

(2)研究分担者

大川 敬子 (OOKAWA, Keiko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号： 30251052