

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659461

研究課題名(和文)薬物刺激間葉系幹細胞を用いたDual Stem Cell Therapyの開発

研究課題名(英文)Dual Stem Cell Therapy with Pharmacologically-Stimulated Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

前川 平(MAEKAWA, TAIRA)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80229286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞の持つ治療特性を薬物で刺激・増強して造血幹細胞移植に応用し、生着不全や治療関連有害事象が低減することを基礎的に検討した。骨髄移植実験において副甲状腺ホルモンは致死量放射線照射されたマウスの生存率を改善し、間葉系幹細胞の造血細胞増幅特性を増強した。また、間葉系幹細胞は臍帯血移植に利用されない小容量さい帯血ユニットからも分離可能であり、分離された間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞と同等あるいはそれ以上の培養増幅能と多分化能を示した。

研究成果の概要(英文)：This study has examined potential of mesenchymal stem cells that are stimulated by pharmacological agents for the application to hematopoietic stem cell transplantation. Parathyroid hormone improved the survival of lethally-irradiated mice in bone marrow transplantation and stimulated mesenchymal stem cells to enhance the expansion of hematopoietic cells. Mesenchymal stem cells can be isolated from an umbilical cord blood unit with small volume that is unavailable for umbilical cord blood transplantation. The isolated umbilical cord blood mesenchymal stem cells showed the proliferation and multi-differentiation capabilities that are equivalent to bone marrow mesenchymal stem cells.

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：間葉系幹細胞 さい帯血 副甲状腺ホルモン

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は難治性血液がんに対して唯一治癒を見込める治療法である。しかしながら移植前処置に使用する大量の抗がん剤や全身放射線照射による臓器障害、およびドナー造血の得られない生着不全などを完全には回避することができない。造血幹細胞移植がより安全で有効な治療法となるにはこれら有害事象の克服が必要不可欠である。

適切な造血幹細胞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。少子高齢化社会では高齢者人口の増加による造血幹細胞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る。わが国では臍帯血移植は骨髄移植とほぼ同数が実施されるようになった。国民に対し造血幹細胞移植医療をサステナブルに提供するために、臍帯血移植をより安全なものとする必要がある。さらに、出産に際して採取されるさい帯血の約90%が移植に使用されておらず、さい帯血の医療廃棄物から医療資源への有効活用も社会的・医学的に解決すべき重要な課題である。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stromal/Stem Cell: MSC) は生体に広く存在する組織幹細胞である。組織修復、免疫調節、造血支持など生体機能の調節に深く関わっていると推察されている。造血幹細胞移植においては、間葉系幹細胞は移植される骨髄液や末梢血幹細胞液、臍帯血といった移植片にも含まれる。しかしながら、その存在頻度は低く十分な治療特性を期待できるものではない。我々は移植片に含まれる間葉系幹細胞の治療特性を増強することで、造血幹細胞移植にみられる有害事象の低減が図ることができるとする仮説を立てた。つまり、間葉系幹細胞を造血幹細胞に応用するダブル幹細胞移植 (Dual Stem Cell Therapy) を着想するに至った。また、さい帯血から間葉系幹細胞を分離することで、さい帯血の有効活用を図ることが可能であると考えた。本研究の目的は、間葉系幹細胞を応用した造血幹細胞移植の有害事象の低減とさい帯血から間葉系幹細胞の分離に関する基礎的な検討を行うことである。

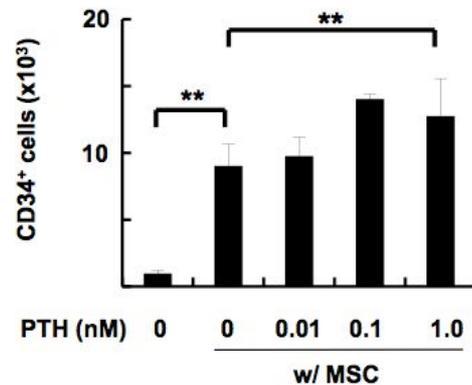
3. 研究の方法

培養増幅した間葉系幹細胞を副甲状腺ホルモンで刺激し、造血支持能力が増強することを *in vitro* の系で検討した。また、副甲状腺ホルモンが骨髄移植に有効であることをマウスモデルを用いて検討した。

臍帯血から単核球を分離し、接着法で間葉系幹細胞の分離を行った。その際に浮遊細胞の培養を継続する方法で間葉系幹細胞の分離を行った。

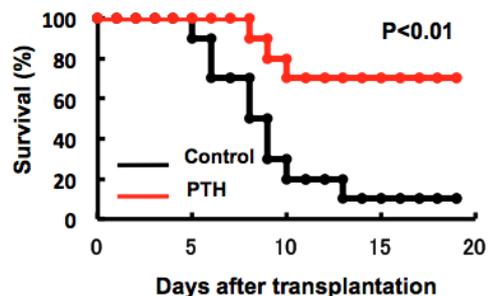
4. 研究成果

間葉系幹細胞非存在下の単培養と比べて、間葉系幹細胞存在下の共培養では CD34 陽性細胞はより培養増幅した。副甲状腺ホルモンで刺激した間葉系幹細胞との共培養では、この培養増幅が増強された (下図)。副甲状腺ホルモンで刺激した際の培養増幅増強効果は間葉系幹細胞と CD34 陽性細胞との接着に依存しており、マイクロアレイを用いた網羅的解析ならびに small interfering RNA を用いた機能的解析の結果、カドヘリン分子ファミリーのひとつである OB-カドヘリンが関与していることが明らかになった。



間葉系幹細胞 (MSC) を0から1.0nMの副甲状腺ホルモン (PTH) で刺激した後、CD34陽性造血幹前駆細胞と共培養を行った。共培養10日後にCD34陽性造血幹前駆細胞の数を計測した。

次に、マウス骨髄移植実験モデルを用いて、副甲状腺ホルモンの効果を検討した。致死量放射線照射したマウスに十分量以下の骨髄細胞を移植し、副甲状腺ホルモンを投与する群、投与しない群で生存率に差があるかを観察した。その結果、副甲状腺ホルモンを投与されたマウスの生存率は副甲状腺ホルモンを投与されなかったマウスと比べて良好であった (下図)。

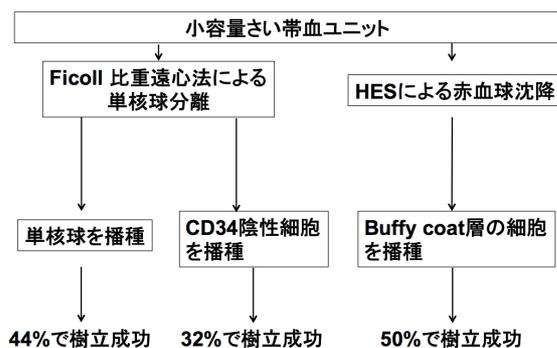


致死量放射線照射 (10Gy) したマウスに 5×10^4 個の骨髄細胞を移植した。その後、副甲状腺ホルモンを移植後0, 1, 3, 5日に投与し (PTH、赤)、生存を観察した。

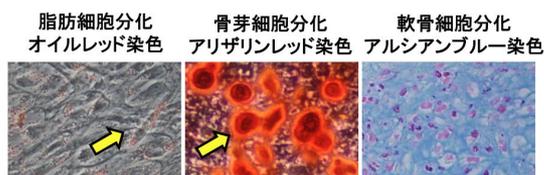
これらの結果は骨髄移植において副甲状腺ホルモンを投与することが生存率の改善をもたらす可能性があること、そのメカニズ

ムとして副甲状腺ホルモンによる間葉系幹細胞の造血支持能力増強が関与することを示唆するものである。

さらに、臍帯血移植に利用されないさい帯血ユニットからの間葉系幹細胞の分離を検討した。臍帯血移植に使用されるさい帯血ユニットは容量 60mL 以上であることが一つの基準である。下図のように、60mL 未満のさい帯血ユニット(平均 40mL)から様々な方法で約 50%の確率で間葉系幹細胞の分離が可能であった(下図)。



さい帯血ユニットから分離された間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と同等ならびにそれ以上に培養増幅が可能であった。また、多分化能や造血細胞増幅能を有していた(下図)。



さい帯血から得られた間葉系幹細胞を脂肪分化誘導(左図)、骨分化誘導(中央図)、軟骨分化誘導(右図)を行い、染色を行った。

これらの結果は医療廃棄物として処理されている小容量のさい帯血ユニットが間葉系幹細胞の供給源として有効活用が可能であることを示唆するものである。

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 29 件)

- Yao H, Miura Y, Yoshioka S, Miura M, Hayashi Y, Tamura A, Iwasa M, Sato A, Hishita T, Higashi Y, Kaneko H, Ashihara E, Ichinohe T, Hirai H, Maekawa T Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. Stem Cells, in press 2014. doi: 10.1002/stem.1701 (査読有)
 - Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. CCAAT/Enhancer-Binding Protein Expressed by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulates Early B-Cell Lymphopoiesis. Stem Cells 32: 730-740, 2014. doi: 10.1002/stem.1555 (査読有)
 - Miura Y, Yoshioka S, Yao H, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Ichinohe T. Chimerism of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: is it clinically relevant? Chimerism 4(3):78-83, 2013. doi:10.4161/chim.25609 (査読有)
- [学会発表](計 37 件)
- 三浦康生 (発表者)、平位秀世 (9番目)、前川平 (10番目) (他7名). 間葉系幹細胞と副甲状腺ホルモンを応用した造血細胞の増幅. 第36回日本造血細胞移植学会総会、沖縄、平成26年3月8日.
 - Yao H (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (10番目), Maekawa T (11番目) (他6名). Direct Interaction with Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells Is Required for Hematopoietic Expansion by Parathyroid Hormone. American Society of Hematology, 55th Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, December 9, 2013.
 - Yoshioka S (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (10番目), Maekawa T (11番目) (他7名). C/EBP expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells is indispensable for precursor B-cell lymphopoiesis. American Society of Hematology, 55th Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, December 7, 2013.
 - Yao H (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (11番目), Maekawa T (12番目) (他7名). Proliferation and differentiation of hematopoietic cells by osteogenic-induced bone marrow MSCs. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Sapporo, Oct 12, 2013.
 - 吉岡聡(発表者), 三浦康生 (2番目), 平位秀世 (4番目), 前川平 (7番目) (他3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. 第61回日本輸血・細胞治療学会総会、横浜、平成25年5月17日.
 - Yao H (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (8番目), Maekawa T (9番目) (他5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, 2013.
7. Yoshioka S (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (8番目), Maekawa T (10番目) (他6名). C/EBP 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, 2013.
 8. Yao H (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (6番目), Maekawa T (7番目) (他3名). Mesenchymal stem cells skewed their phenotype toward the osteogenic lineage support the hematopoietic cell differentiation. American Society of Hematology, 54th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012.
 9. Yoshioka S (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (7番目), Maekawa T (9番目) (他5名). Expression of C/EBP in bone marrow mesenchymal stem cells is mandatory for early-stage B cell lymphopoiesis. American Society of Hematology, 54th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012.
 10. Yao H (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (6番目), Maekawa T (7番目) (他3名). Parathyroid hormone stimulates mesenchymal stem cells to enhance expansion of hematopoietic cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, Oct 19-21, 2012.
 11. Yoshioka S (発表者), Miura Y (2番目), Hirai H (5番目), Maekawa T (9番目) (他5名). Defective mesenchymal stem cells contribute to impaired B cell lymphopoiesis in C/EBP deficient mice. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, Oct 19-21, 2012.

〔その他〕

ホームページ

<http://dtm.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 平 (TAIRA MAEKAWA)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80229286

(2)研究分担者

三浦 康生 (YASUO MIURA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70605146

平位 秀世 (HIDEYO HIRAI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50315933

(3)連携研究者

なし