

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19591252

研究課題名 (和文) 新たな末梢血幹細胞動員法の開発に関する研究

研究課題名 (英文) The new approach of peripheral blood stem cell mobilization

研究代表者

渡辺 浩良 (WATANABE HIROYOSHI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：50423413

研究成果の概要：

既報に従って、末梢血単核球から破骨細胞を誘導し (Blood 2004 104: 2484-)、RANKL と M-CSF を添加して培養した。この破骨細胞に、G-CSF (10、100ng/ml)、RANKL (50 ng/ml)、G-CSF (10、100ng/ml) + RANKL (50 ng/ml) を添加培養し、培養上清を採取した (1、3、5 日)。培養上清を用いて各種サイトカインを測定した。測定したサイトカインは、IL-8、MMP-9、cathepsin K である。その結果、破骨細胞は *in vitro* で IL-8、MMP-9 を産生していることが証明出来たが、G-CSF や RANKL の添加による産生の変化 (増加) は証明できなかった。cathepsin K の産生は証明できなかった。末梢血幹細胞動員における破骨細胞の関与が、IL-8 や MMP-9、cathepsin K を介したものである可能性が示唆されているが、G-CSF の破骨細胞に対する直接作用ではなく、その他の細胞など介した作用であると考えられた。また、RANKL による末梢血幹細胞動員促進の可能性を示すことができなかった。

G-CSF で動員・採取した末梢血幹細胞から CD34 陽性細胞分画を分離した。CD34 陽性細胞に発現している CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 をフローサイトメーターで測定した。CD34 陽性細胞を無血清培地 (STEMPRO-34[®]) で培養し、培養細胞に G-CSF (100ng/ml)、IL-8 (500pg/ml)、G-CSF (100ng/ml) + IL-8 (500pg/ml) を添加した。培養細胞に発現している CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 をフローサイトメーターで測定した。

CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 は、CD34 陽性細胞分離直後には発現が無かったが、無血清培地のみで発現の増強がみられた。しかし、G-CSF や IL-8 の添加による発現の変化は認めず、末梢血幹細胞動員促進の可能性を示すことができなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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：末梢血幹細胞、破骨細胞、IL-8、MMP-9、CD26、CXCR4

1. 研究開始当初の背景

血液疾患やがんに対し、同種及び自家末梢血幹細胞移植が行われているが、成否はいかに造血幹細胞を効率よく採取出来るかに依存している。定常状態では末梢血中に造血幹細胞は非常に少なく、効率よく採取するには造血幹細胞を骨髄から末梢血中に動員する必要がある。動員法として自家移植（患者ドナー）では、化学療法、化学療法と granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の併用、及び G-CSF 単独があり、同種移植（健常人ドナー）では G-CSF 単独で行われている。患者ドナーでは、化学療法歴の長い場合、動員効果が悪く (poor mobilizer)、幹細胞が十分採取出来ない場合が多い。また、健常人ドナーにおいては、高容量 G-CSF を投与するため、その短期的及び長期的な副作用が懸念されている。高容量 G-CSF 投与開始後 4-5 日で末梢血中に造血幹細胞が動員されてくるが、その分子生物学的機序は明らかでない。機序を明らかにすることは、新たな効率的で安全な末梢血幹細胞の採取が可能となる。我々は interleukin-8 (IL-8) が末梢血幹細胞の動員される時期に一致して著明に増加してい

ること、幹細胞の採取が悪いドナーでは IL-8 の増加がないことが判明し、IL-8 のサージが末梢血幹細胞の動員に重要であることを発見した。また、G-CSF 投与により骨形成マーカーの血中骨性 alkaline phosphatase が上昇、血清 osteocalcin が低下、骨吸収マーカーの尿 deoxypyridinoline が上昇していることから、骨芽細胞の成熟が抑制され、破骨細胞の成熟が促進されていると推測し、これが動員機序に関与している可能性を示した。CD26 分子はプロテアーゼで活性化されると SDF-1 を、N-terminal domain で分解することにより、造血幹細胞の動員を容易にすることも報告されている。造血幹細胞の末梢血への動員機序を明らかにすることが、効率的で安全な造血幹細胞動員法の開発に繋がると考えた。

2. 研究の目的

末梢血幹細胞の動員に、IL-8 のサージや破骨細胞の成熟が関与している可能性が示されている。これを端緒として、末梢血幹細胞動員の分子生物学的機序、とくに破骨細胞の役割（破骨細胞が IL-8 を産生している）、the

receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand の役割、stromal derived factor-1 (SDF-1) /CXCR4 axis と CD26 分子との関連について検討する。また、造血幹細胞移植後の各種サイトカインの動向を検討することで、造血幹細胞の骨髄への生着機序の一端を明らかに出来ないかも検討した。

3. 研究の方法

既報に従って、末梢血単核球から破骨細胞を誘導し(Blood 2004 104: 2484-)、RANKL と M-CSF を加えて培養した。この破骨細胞に、G-CSF (10, 100ng/ml)、RANKL (50 ng/ml)、G-CSF (10, 100ng/ml) +RANKL (50 ng/ml) を添加培養し、培養上清を採取した(1, 3, 5 日)。培養上清を用いて各種サイトカインを測定した。測定したサイトカインは、IL-8、MMP-9、cathepsin K である。

G-CSF で動員・採取した末梢血幹細胞から CD34 陽性細胞分画を分離した。CD34 陽性細胞に発現している CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 をフローサイトメーターを用いて測定した。CD34 陽性細胞を無血清培地 (STEMPRO-34[®]) で培養し、培養細胞に G-CSF (100ng/ml)、IL-8 (500pg/ml)、G-CSF (100ng/ml) +IL-8 (500pg/ml) を添加培養した。培養細胞に発現している CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 をフローサイトメーターを用いて測定した。

造血幹細胞移植後の各種サイトカインの動向に関しては、既報を参考に、IL-3、IL-6、IL-11、SCF、Flt-3 Ligand、SDF-1 について測定した。初回骨髄移植が、一旦は生着傾向となったものの、拒絶され生着不全に至ったが、緊急的な再移植の施行で、生着が得られた患者の保存検体(血漿)を利用した。

4. 研究成果

破骨細胞は *in vitro* で IL-8、MMP-9 を産生

していることが証明出来たが、G-CSF や RANKL による産生の変化(増加)は証明できなかった。cathepsin K の産生は証明できなかった。末梢血幹細胞動員における破骨細胞の関与が、IL-8 や MMP-9、cathepsin K を介したものである可能性が示唆されているが、G-CSF の破骨細胞に対する直接作用ではなく、その他の細胞など介した作用であると考えられた。また、RANKL による末梢血幹細胞動員促進の可能性を示すことができなかった。

CD26、CXCR1、CXCR2、CXCR4 は、CD34 陽性細胞分離直後には発現が無かったが、無血清培地のみで発現の増強がみられた。しかし、G-CSF や IL-8 の添加による発現の変化は認めず、IL-8 による末梢血幹細胞動員促進の可能性を示すことができなかった。

造血幹細胞移植後の各種サイトカインの動向に関しては、IL-3 と IL-11 は測定感度以下であった。IL-6、SCF、SDF-1 に関しては、白血球回復との関連は見いだせなかった Flt-3 Ligand に関しては白血球数の増減と相反する動向を示し、造血幹細胞の生着との関連が示唆された。今後は、多数例での測定を検討している。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 浩良 (WATANABE HIROYOSHI)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
5 0 4 2 3 4 1 3

(2) 研究分担者

大西 敏弘 (OHNISHI TOSHIHIRO)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
4 0 4 2 3 4 1 2

(3) 連携研究者