

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年～ 2008 年
 課題番号：19790672
 研究課題名 (和文)
 ヒト hTERT ストローマ細胞を用いた末梢血造血幹細胞の分裂制御機構の解析
 研究課題名 (英文)
 Analysis of peripheral blood hematopoietic stemness using human hTERT-stromal cells
 研究代表者
 河野 豊 (Kawano Yutaka)
 札幌医科大学医学部 助教
 研究者番号：80398320

研究成果の概要：

ヒトテロメラーゼ遺伝子を導入したストローマ(以下 HTS)との共培養により末梢血 CD133 陽性細胞は臍帯血 CD34 陽性細胞と同等に血液細胞の増幅が可能であった。末梢血 CD133 陽性細胞を HTS 接触下あるいは非接触下で共培養を行い血液細胞の増幅に差を認めなかった。液性因子である SCF、angiopoietin、および Wnt 抑制因子を添加しながら HTS と共培養をおこなった。その結果、上記因子の添加有無で血液細胞の増幅や細胞周期への entry は同等であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：①末梢血、②造血幹細胞、③CD133、④骨髓間質細胞、⑤hTERT

1. 研究開始当初の背景

これまで造血幹細胞を刺激し増幅させようとする数々の試みから、造血幹細胞の自己複製能を維持したまま長期培養するためには、骨髓ストローマ細胞との接触が必須であることが明らかとされている。しかしながら、初代ヒトストローマ細胞は長期継代が困難で、約 20 継代で増殖が停止し、老化してしまうといった問題点がありヒトストローマ細胞の機能解析は充分進んでいないのが現

状である。申請者らはヒト骨髓ストローマ細胞に対して、ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) を導入するのみで簡便に不死化 (hTERT ストローマ細胞以下 HTS 細胞) でき約 100 継代・500 日以上にわたって長期培養可能であることを明らかにした。さらに HTS 細胞とヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を共培養することで、造血前駆細胞が 2 週間で約 500 倍に増幅可能であり、その後も同共培養系から毎週約 500 倍の造血前駆細胞が産生できる

ことを明らかにした (Kawano-Y et al. 1st, Blood, 101, 2003 ; 特許出願番号 . PCT/JP02/11389)。また、HTS 細胞のクローンを樹立し、その細胞形質を検討したところ、樹立された 9 クローンのうち 5 クローンがアルカリフォスファターゼ陽性の骨芽細胞であり、臍帯血由来 CD34 陽性細胞に対して強い増殖誘導活性があることを見出した (Kawano-Y et al. 4th, Experimental hematology, 33, 2005)。一方、造血幹細胞のソースとしては、臍帯血の他、骨髄および末梢血幹細胞が知られている。最近、末梢血幹細胞が末梢血中に動員されるメカニズムの概略がほぼ解明され、G-CSF により活性化されたプロテアーゼによるケモカイン SDF-1 (骨芽細胞に発現) およびケモカインレセプター CXCR4 の分解 (造血幹細胞に発現) あるいは G-CSF が交感神経を介して骨芽細胞機能を低下させることによるケモカイン SDF-1 の発現低下により、結果的に niche 細胞である骨芽細胞から造血幹細胞が動員されることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、増幅された末梢血造血細胞 (CD34+CD133+細胞) が幹細胞機能を維持しているか否かを *in vitro* での総細胞数・CD34 陽性細胞数・コロニーアッセイで検討する。次にストローマ由来の造血幹細胞分裂誘導因子を同定することを行う。トランスウェルを用いた接着および非接着培養で、共培養した後の細胞分裂の頻度を検討し、ストローマ由来の細胞分裂誘導因子が、液性因子か接着分子か解析する。マウスの骨芽細胞 Niche と造血幹細胞では、SCF を初めとしたサイトカイン、angiopoietin などの血管新生因子、Wnt シグナルや Notch などの接着因子が造血幹細胞の分裂制御に重要な役割を演ずることが報告されている。本研究ではまずこれらマウスで明らかにされた物質がヒト末梢血幹細胞の分裂制御に関与しているか比較解析する。

3. 研究の方法

(1) HTS 細胞と末梢血造血幹細胞との共培養 :

末梢血造血幹細胞は G-CSF で動員された末

梢血 CD133/CD34 陽性細胞は宝酒造から購入したものを使用した (G-CSF 動員の安全性と risk を考慮し、ドナーからの分離は避ける)。

HTS 細胞と末梢血造血幹細胞 (CD133 陽性細胞) の共培養は既報のごとく行った (Kawano-Y et al. 1st, Experimental hematology, 34, 150-108, 2006)。以下にその概略を示すが 25cm² flask に播きなおし、サブコンフルエントになった時点で 21~22Gy 放射線照射をして、細胞の成長を停止させストローマ細胞の培地 (Dexter-type medium: MEM- α modification, 12.5% horse serum, 12.5% fetal calf serum, 1×10^{-6} M hydrocortisone, 1×10^{-4} M β -mercaptoethanol) を除いた後に、無血清培地 X-VIVO 10 により洗浄し、ストローマ培地に含まれていた血清を取り除く。そして X-VIVO10 に、TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) を添加し、あらかじめ X-VIVO 10 中に調整した CD133 陽性細胞 5000 個を加える。このようにして、造血細胞とヒトストローマ細胞を 2、4 および 6 週間共培養する。培養上清中の造血細胞を回収し、総細胞数、CD34 陽性細胞数をカウントすると共に、増幅された血球細胞を用いてコロニーアッセイを行い BFU-E、CFU-GM、CFU-Mix をカウントした。さらに 2 週間の共培養後に cobblestone areas (CA) と呼ばれる HTS 細胞層の下に潜り込んだ細胞集団のコロニー数もカウントした。

(2) ストローマ細胞由来の細胞分裂誘導因子の同定 :

(1) と同様に 5000 個の PB CD133+細胞を、SCF、TPO および FL の存在下で HTS 細胞と 2 週間共培養を行った。HTS 細胞と接触して共培養を行うのと、トランスウェルを用いて PB CD133+細胞と HTS 細胞を非接触下で共培養を行った。両者とも共培養終了後に上清の血球細胞を回収して、総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニーアッセイを行い、血液細胞の増幅の比較を検討した。

また共培養を行う前に、PB CD133+細胞を PKH26 Red (Sigma-Aldrich) で標識しておく。前述の通り HTS 細胞と PB CD133+細胞を共培養あるいは boyden chamber 法を用いたトラン

スウェルを隔てて共培養を行い、増幅された造血細胞をフローサイトメトリーにて細胞分裂の頻度を検討する。上記検討において液性因子もしくは接着因子をスクリーニングするため SCF、angiopoietin, および Wnt 抑制因子である Frizzled-related protein-1 (sFRP-1)、Dickkopf-1 (DKK-1) を培養中に添加して HTS 細胞と共培養して総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニーアッセイ、細胞周期への entry を検討した。

4. 研究成果

(1) HTS 細胞と末梢血造血幹細胞との共培養 : HTS と共培養した末梢血造血幹細胞の比較対照として臍帯血 (CB) CD34 陽性細胞を用いた。その結果、HTS 細胞無しの培養ではほとんど増幅効果を認めなかったのに比較して、HTS 細胞を用いて PB CD133 陽性細胞を共培養した際には、その増幅効率は約 100 倍以上と劇的に増加した (CFU-C、 2 ± 0 vs. 111 ± 15 倍、 $p < 0.01$)。さらに、2 週間の共培養の後の、PB CD133 陽性前駆細胞の増幅率は CB 造血前駆細胞と比しほぼ同等の増幅率を示していた (BFU-E、 54 ± 3 vs. 56 ± 4 倍; CFU-GM、 156 ± 26 vs. 83 ± 9 倍; CFU-Mix、 30 ± 11 vs. 80 ± 36 倍)。以上の結果より、ヒト骨髄間質細胞は CB CD34 細胞と同等に、PB CD133 細胞を効率的に増幅可能であることが明らかとなった。なお、2 週間の共培養後に HTS 細胞層の下に潜り込んで cobblestone areas (CA) を形成する細胞が PB CD133 および CB CD34 でほぼ同数見られた。

(2) 既知のストローマ細胞由来の細胞分裂誘導因子の同定 :

PB CD133+細胞を HTS 接触下あるいは非接触下で共培養を行った結果、総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニーアッセイに明らかな差は認めなかった。また PB CD133+細胞を共培養前に予め PKH26 Red で標識して細胞周期への entry を検討したが、接触下、非接触下での細胞分裂しにくい分画に明らかな差を認めなかった (接触下 35.7%, 非接触下 33.8%)。以上の結果から PB CD133+細胞においては HTS との共培養において液性因子が血液幹細胞の維持もしくは増幅に関与しているものと考えられた。次

に血液幹細胞増幅因子と思われる液性因子を同定するため SCF、angiopoietin, および Wnt 抑制因子である Frizzled-related protein-1 (sFRP-1), Dickkopf-1 (DKK-1) を培養中に添加して HTS 細胞と共培養して総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニーアッセイ、細胞周期への entry を検討した。しかし上記因子の添加有無で総細胞数、CD34 陽性細胞数、コロニーアッセイ、細胞周期への entry に大きな差を認めなかった。

(3) 今後の展望 :

今回検索した液性因子もしくは接着因子の有無では血液幹細胞の増幅に差を認めなかった。その他既知の液性因子での添加有無で差を認めなかった場合は、microarray での網羅的検索も検討予定である。

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 3 件)

- ① Kobune M, Kato J, Kawano Y, Sasaki K, Uchida H, Takada K, Takahashi S, Takimoto R, Niitsu Y. Adenoviral vector-mediated transfer of the Indian hedgehog gene modulates lymphomyelopoiesis in vivo. *Stem Cells*. 6(2):534-42. 2008 査読有
- ② Kobune M, Chiba H, Kato J, Kato K, Nakamura K, Kawano Y, Takada K, Takimoto R, Takayama T, Hamada H, Niitsu Y. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther*. 6(6):1774-84, 2007, 査読有
- ③ Kawano Y, Kobune M, Chiba H, Nakamura K, Takimoto R, Takada K, Ito Y, Kato J, Hamada H, Niitsu Y. Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133+ progenitor cells on coculture with human stromal cells. *Exp Hematol*, 34(2):150-8. 2006, 査読有

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 豊 (Kawano Yutaka)

札幌医科大学医学部 助教

研究者番号：80398320