

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12592

研究課題名(和文) ヒト臍帯血細胞を用いた三次元再播種培養による造血機能再生

研究課題名(英文) Ex vivo reconstruction of hematopoietic function using 3D culture of umbilical cord blood 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯血移植への応用を目的として、三次元培養系において臍帯血中の造血幹細胞を増幅することを試みた。本研究では、自己臍帯血由来の材料が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響について検討した。

まず、臍帯血中に含まれるストローマ細胞と臍帯血血漿が造血幹細胞の増幅に有効かどうかを調べたところ、ストローマ細胞の利用は困難であったのに対して、臍帯血血漿は増幅に有効であることがわかった。しかし、臍帯血中の血漿量は限られるため、培地に polyvinyl alcohol (PVA) を添加することで臍帯血血漿量を低減できる可能性について検討した。その結果、増幅が難しい条件下では PVA が有効であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植の中で、臍帯血移植は一般的な骨髄移植に比べて細胞の採取が容易であり、ヒト白血球抗原のミスマッチに対して寛容であるという利点がある。しかし、採取できる造血幹細胞数が少ないため、成人への移植に応用するためには培養系において造血幹細胞を増幅する必要がある。この際、できるだけ安全性の高い方法で増幅する必要があることから、本研究では自己臍帯血由来の材料を用いて増幅を試みたところ、臍帯血血漿が有効であることが確かめられた。同成分は臍帯血の調製過程で廃棄される成分であることから、本研究の結果は、低コストかつ安全に造血幹細胞を増幅できる手法の確立に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated ex vivo expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) derived from umbilical cord blood (UCB) in a three-dimensional (3D) culture system for application to UCB transplantation. In this study, the effects of autologous cord blood-derived materials on the expansion of HSCs were examined.

As autologous materials, stromal cells and UCB-plasma both contained in UCB were chosen. We found that addition of UCB-plasma facilitated expansion of HSCs, whereas application of stromal cells was difficult due to scarce proliferation ability of the cells. Since the amount of plasma in UCB is limited, we next investigated the possibility of reducing the amount of cord blood plasma by adding polyvinyl alcohol (PVA) to the culture medium. From the 3D cultures under different cell density and culture medium conditions, PVA was found to be effective under conditions where expansion of HSCs was difficult.

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 共培養 臍帯血 PVA ティッシュ・エンジニアリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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の治療法として造血幹細胞移植は有効な手段であり、造血幹細胞源には骨髄細胞や臍帯血細胞が用いられる[1]。造血幹細胞移植における最大の問題は、患者のヒト白血球抗原 (HLA) と同じ HLA を持つドナーを見つけるのが難しいことである。加えて骨髄移植では、採取時のドナーの負担が大きい。その一方で、臍帯血移植は採取が容易であり、HLA のミスマッチに対して寛容性が高いという利点もあるものの、臍帯血中に含まれる造血幹細胞数が少ないため成人への移植は難しいことが欠点である[2]。また、造血幹細胞移植では、移植する造血幹細胞数が多いほど予後が良いことが知られている。生体外の培養系において造血幹細胞を増幅することができれば上記の課題を解決できることから、近年では、造血幹細胞の体外増幅についての研究が増えている[3]。

(2) 造血幹細胞は生体内では骨髄中に存在し、ストローマ細胞との相互作用によって増幅や分化がコントロールされている。このような生体内の造血微小環境を模倣することで、培養系において造血幹細胞を効率的に増幅できると考えられることから、ストローマ細胞と共培養する方法が一般的に用いられている。また、造血幹細胞の増幅を促進するために、stem cell factor などの外因性シグナル分子 (サイトカインや増殖因子) を添加することも広く検討されている。しかし、これらの分子は造血幹細胞の分化を誘導してしまうことも報告されていることから、使用しなくても増幅できる培養法を確立することも望まれている[4,5]。

(3) 研究代表者らはこれまでに、多孔質樹脂を担体とする三次元培養法を用いて造血幹細胞を効率的に増幅するための培養法について研究してきた。これらの研究において、1) ストローマ細胞株をまず三次元培養して担体内部にストローマ層を形成したのち、造血幹細胞を含む細胞を播種して三次元共培養することで、外因性シグナル分子を添加しなくても造血幹細胞を効率的に増幅できること、および、2) 三次元培養したストローマ細胞を共培養前に凍結保存しておくことで、共培養時に造血幹細胞の増幅度が向上すること、を明らかにした[6]。また、培養密度が造血幹細胞の増幅度に及ぼす影響についても検討したところ、ストローマ細胞との三次元共培養時には造血系細胞 (マウス胎仔肝臓細胞、またはヒト臍帯血細胞) の培養密度が低い方が増幅度は高かったのに対して、造血系細胞を単独で培養した場合には培養密度が高い方が増幅度は高かった。これらの結果から、マウス胎仔肝臓細胞やヒト臍帯血細胞にはストローマ細胞が含まれていることが強く示唆された。

(4) ストローマ細胞と共培養することで体外増幅した造血幹細胞を移植する際には、ストローマ細胞を完全に除去することはできない。そのため、共培養にストローマ細胞株を使用すれば移植時に免疫学的な問題を引き起こす可能性がある。そこで、臍帯血中に含まれるストローマ細胞など自己由来の材料のみを用いて増幅できる方法を確立する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 移植時に安全な方法を用いて造血幹細胞を培養系で増幅できる方法を確立するため、ヒト臍帯血中に含まれる材料のみを用いた造血幹細胞の増幅法を検討することが本研究の目的である。そのため、臍帯血中のストローマ細胞を用いて造血幹細胞を増幅できるかどうかについて検討した。また、臍帯血中の血漿が造血幹細胞の増幅に及ぼす効果、ならびに臍帯血血漿の使用量を低減するための polyvinyl alcohol (PVA) の効果についてもあわせて検討した[3]。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、「筑波大学医学医療系 医の倫理委員会」の承認を受けて実施した。造血系細胞源に用いたヒト臍帯血は、理化学研究所バイオリソースセンターと「研究用ヒト臍帯血幹細胞提供同意書」を締結した上で供給された。

本研究では、主に「臍帯血中のストローマ細胞を利用した造血系細胞の増幅」、「臍帯血血漿が造血系細胞の増幅に及ぼす影響」、および「PVA が臍帯血血漿の使用量を低減する効果」の3つについて検討した。

(2) 「臍帯血中のストローマ細胞を利用した造血系細胞の増幅」では、臍帯血から血球遠心分離剤を用いて分離した単核細胞 (MNCs) を使用した。培養実験では Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) に 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を加えた培地を用い、刺激因子の効果を調べるために basic fibroblast growth factor (b-FGF)、epidermal growth factor (EGF)、および dexamethasone (Dex) を単独で、あるいは組合せて使用した。

三次元培養実験では、一辺 2 mm の立方体状に細切した polyvinyl formal 樹脂多孔質体 (平均孔径 130 μm) をコラーゲンコートして担体に用いた。この担体に 1×10^7 cells/cm³ の

MNCs を播種し、刺激因子を単独 (b-FGF, 10 ng/mL; EGF, 10 ng/mL; Dex, 0.1 μM) で加えた培地中で1週間培養した。

刺激因子の組合せを確認するための実験では、MNCs を 1×10^6 cells/cm² の密度で48 well プレートに播種し、200 μL の培地中で2週間培養した。培地に添加した刺激因子の濃度を表1に示す。

表1. 単核細胞の単層培養実験における刺激因子の添加濃度

因子条件	b-FGF [ng/mL]	EGF [ng/mL]	Dex [μM]
FED10	10	10	0.1
FED30	30	30	0.3
FED100	100	100	1.0

(3) 「臍帯血血漿が造血系細胞の増幅に及ぼす影響」に関する実験では、まず造血幹細胞の増幅に適した細胞源を検討するため、分離していない臍帯血細胞と MNCs のそれぞれで三次元培養を行い、両者を比較した。これらの細胞を 1×10^7 cells/cm³ (低密度; L) または 3×10^7 cells/cm³ (高密度; H) で担体に播種して培養を行った。臍帯血血漿の影響を調べる実験では、あらかじめ採取しておいた臍帯血血漿を FBS の代わりに培地に添加した。

(4) 「PVA が臍帯血血漿の使用量を低減する効果」を調べるための実験では、低密度と高密度で担体に播種した臍帯血細胞を 3%、または 10% FBS を含む培地中で培養した。この際、培地に 0.1% PVA を適宜添加し、造血幹細胞数の経時変化を測定した。

(5) いずれの実験でも、三次元培養における全細胞数は MTT 法を用いて計測した[7]。また、培養細胞中の CD34 陽性細胞 (造血幹細胞; HSPCs) の割合はフローサイトメーターで測定した。造血幹細胞数は、MTT 法で求めた全細胞数と CD34 陽性細胞の割合から算出した。

4. 研究成果

(1) 臍帯血中のストローマ細胞を利用して造血系細胞を増幅するためには、まずストローマ細胞を用いてストローマ層を形成させたのちに臍帯血細胞を再播種することで、再播種細胞中の造血幹細胞を増幅する。そこで、臍帯血中の MNCs を細胞源として、ストローマ細胞の増殖に有効であると考えられる刺激因子の影響を調べた。まず、三次元培養系において、3種類の刺激因子が細胞の増殖に及ぼす効果を調べた結果を図1に示す。培養1日目の細胞密度に対する培養7日目の密度の割合 (増殖度) を示しており、いずれの刺激因子を用いた場合にも増殖度はほぼ1以下と細胞は増殖しなかったことから、これらの因子を単独で用いてもストローマ層を形成させることは難しいことがわかった (図1)。さらに、これらのストローマ上に臍帯血細胞を再播種して培養したところ、CD34 陽性細胞数は2週間の共培養後には大幅に減少していた (data not shown)。

刺激因子の組合せの影響は、単層培養条件下にて検討した。3種類の刺激因子を全て用い、濃度を変えて培養実験を行った結果を図2に示す。刺激因子を全て添加した場合でも細胞を増殖することができず、培養日数の経過とともに増殖度は低下した。この時、刺激因子の濃度が高いほど増殖度は低くなる傾向があった。従って、臍帯血中のストローマ細胞を培養系で増殖させるのは刺激因子を用いた場合でも困難であり、この細胞を利用して造血幹細胞を増幅することは極めて難しいと考えられた。

(2) 臍帯血中の細胞成分が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響を調べるために、MNCs と分離していない臍帯血細胞の培養実験を行なった。それぞれの細胞を低密度と高密度で播種して

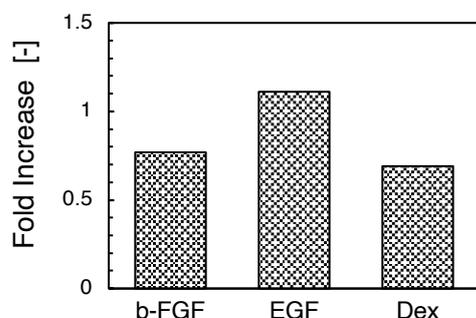


図1. 臍帯血由来単核細胞の増殖に及ぼす刺激因子の効果 (培養7日目)
b-FGF, basic fibroblast growth factor (10 ng/mL); EGF, epidermal growth factor (10 ng/mL); Dex, dexamethasone (0.1 μM).

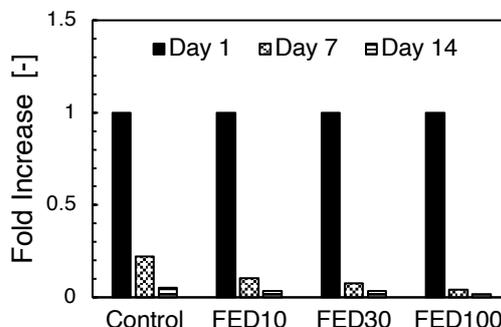


図2. 臍帯血由来単核細胞の増殖に及ぼす刺激因子の組合せの効果
各条件での刺激因子濃度は表1参照。

2週間培養したときの、培養1日目に対する細胞密度の経時変化を図3に示す。

全ての条件において、培養7日目までに造血幹細胞は増幅されたものの、その後も増幅が維持されたのは臍帯血細胞を高密度で播種した場合（UCBCs-H）のみであった。MNCsを培養した場合は、とりわけ高密度で播種した場合（MNCs-H）に7日目以降で造血幹細胞数が急激に低下した。臍帯血細胞とMNCsを比較すると、臍帯血細胞を分離せずにそのまま培養する方が有効であったことから、臍帯血中のMNCs以外の成分が造血幹細胞の増幅を促進する効果を持つことが示唆された。

(3) 臍帯血に含まれる細胞以外の成分として、臍帯血血漿が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響についても検討した。培地に添加する10% FBSの代わりに臍帯血血漿を添加し、さらに細胞播種密度を変えて培養した時の造血幹細胞数の経時変化を図4に示す。

通常のFBSを添加した培地中で培養した場合には、どちらの密度条件下でも7日目以降に造血幹細胞数は減少したのに対して、臍帯血血漿を添加した場合は14日目まで造血幹細胞数は増加し、FBSを添加した場合に比べてはるかに良好な結果が得られた。以上の結果から、臍帯血血漿を用いることによって造血幹細胞を効率よく増幅できることが明らかになった。

(4) 臍帯血血漿が臍帯血由来造血幹細胞の増幅に有効であることが確かめられたものの、その含有量は限られている。そこで、近年、造血幹細胞の増幅に有効であることが報告されたPVAを培地に加えることで、臍帯血血漿の量を低減できるかどうかを調べた。培地のFBS含有量を10%と3%の場合において、PVAを培地に添加した際の造血幹細胞の増幅度を測定した結果を図5と6に示す。

培地中のFBS濃度を通常の10%としたとき（図5）、高密度播種時には造血幹細胞は増幅されたのに対して（H(-)）、低密度培養では逆に細胞数が低下した（L(-)）。これらにPVAを添加すると、高密度培養ではあまり効果がなかったものの（H(+)）、低密度培養では増幅度が大幅に改善された（L(+)）。血清濃度を3%に低下させた場合は（図6）、培養14日目の造血幹細胞数は1日目よりも大幅に減少しており、幹細胞を増幅することはできなかった（L(-), H(-)）。しかし、PVAを培地に添加すると高密度、低密度ともに造血幹細胞数の減少が抑制され、高密度培養においては1日目と同等の幹細胞数が得られた（H(+)）。

以上の結果から、PVAは造血幹細胞を増幅することが難しい条件下において有効であり、増幅を促進する効果を示すことがわかった。しかしながら、その効果は限られていたことから、臍帯血血漿の使用量を大幅に減らすことは難しいと考えられた。

(5) 本研究では、造血幹細胞移植に応用するため、臍帯血由来の造血幹細胞を生体外の培養系で増幅できるような培養法を確立することを目的とした。移植時に免疫学的な問題が生じないように、臍帯血由来の材料を用いて増幅することを試みた。その結果、以下のことがわかった。

- 1) 臍帯血由来のストローマ細胞は刺激因子を用いても培養系で増殖させることが困難であるため、この細胞を用いた造血幹細胞の増幅方法を確立するのは難しいことがわかった。
- 2) 造血幹細胞源として臍帯血細胞とMNCsを用いたところ、臍帯血細胞を用いた場合の方が造血幹細胞の増幅度は高かったことから、MNCs以外の臍帯血成分中に造血幹細胞の増幅を促す効果をもつものが存在することが示唆された。
- 3) 臍帯血血漿が造血幹細胞に及ぼす影響を調べたところ、FBSに比べて幹細胞が良好に増幅されることがわかった。この効果をPVAで代替できるかどうかを調べたところ、増幅に適さない条件下では有効であったものの、臍帯血血漿の使用量を大幅に低減できるほどの効果はなかった。

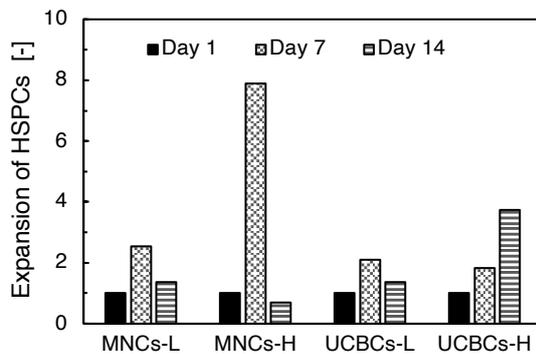


図3. 造血系細胞源の種類と培養密度が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響

MNCs, 単核細胞; UCBCs, 臍帯血細胞; HSPCs, 造血幹細胞; L, 低密度培養; H, 高密度培養。

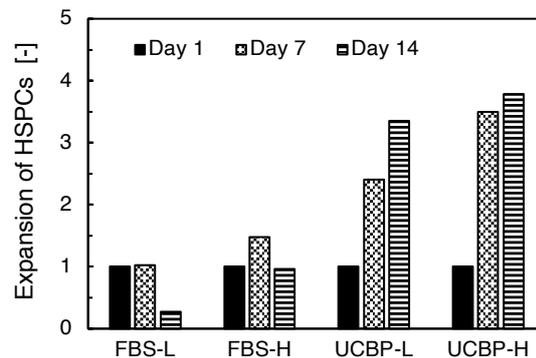


図4. 臍帯血血漿が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響

FBS, ウシ胎仔血清; UCBP, 臍帯血血漿; HSPCs, 造血幹細胞; L, 低密度培養; H, 高密度培養。

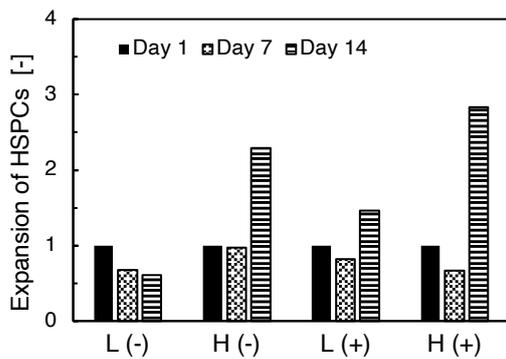


図5. 血清添加培地中 (10%) での PVA の効果

L, 低密度培養; H, 高密度培養; (-), polyvinyl alcohol (PVA) 無添加; (+), 0.1% PVA 添加; HSPCs, 造血幹細胞.

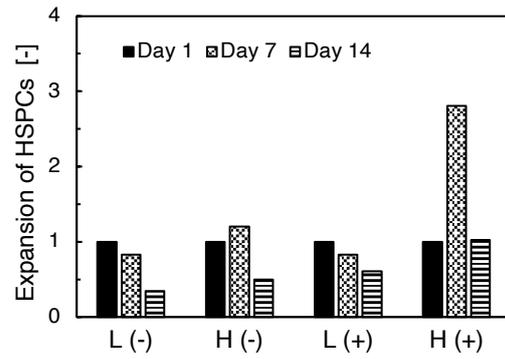


図6. 血清添加培地中 (3%) での PVA の効果

L, 低密度培養; H, 高密度培養; (-), PVA 無添加; (+), 0.1% PVA 添加; HSPCs, 造血幹細胞.

以上の結果から、臍帯血由来の材料のみを用いて造血幹細胞を効率的に増幅できる方法を確立できる可能性が示されたとともに、臍帯血血漿は有力な候補であると考えられた。ただし、本研究で用いた臍帯血血漿には凍結保存時の凍害保護剤が含まれていたことから、保護剤を含まない血漿を用いることで、その効果をより正確に評価する必要がある。

<引用文献>

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 354, 1813-1826, 2006.
2. Oran B, Shpall E. Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 215-222, 2012.
3. Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, Sudo K, Morita M, Crisostomo RV, Yamamoto R, Loh KM, Nakamura Y, Watanabe M, Nakauchi H, Yamazaki S. Long-term ex vivo haematopoietic-stem cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature* 571, 117-121, 2019.
4. Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltsis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* 32, 9263-9270, 2011.
5. Ema H, Sudo K, Seita J, Matsubara A, Morita Y, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, Nakauchi H. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell* 8, 907-914, 2005.
6. 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.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63, 1983.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyoshi Hirotooshi, Shimizu Yuichiro, Yasui Yutaka, Sugiyama Satoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Expansion of mouse primitive hematopoietic cells in three-dimensional cultures on chemically fixed stromal cell layers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 741 ~ 750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-020-00417-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi Hirotooshi, Abo Kenji, Hosoya Daiki, Matsuo Kazuyuki, Utsumi Yoshio	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of mouse fetal liver cell culture density on hematopoietic cell expansion in three-dimensional cocultures with stromal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The International Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0391398821996377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------