

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790297

研究課題名（和文） ヒト羊膜由来細胞の造血支持能の解析

研究課題名（英文） analysis of human amniotic membrane-derived cells related to hematopoiesis-supportive functions

研究代表者

須藤 和寛 (SUDO KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員

研究者番号：10392002

研究成果の概要（和文）：

ヒト羊膜に由来する細胞と臍帯血 CD34 陽性細胞を共培養することにより、CD34 陽性細胞の割合は減少するが、CD45 陽性血液細胞が劇的に増加すること、5 週以上に渡ってコロニー形成能を持つ造血前駆細胞を維持できることが明らかとなった。CD34 陽性細胞と共に移植することによって、CD34 陽性細胞を単独で移植するよりも高いキメリズムが得られることが明らかとなった。以上のことから、ヒト羊膜に由来する細胞には造血前駆細胞を維持する能力に加えて、造血幹細胞の生着を支持する能力があることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Co-culture of cord blood CD34⁺ cells with human amniotic membrane (HAM)- or human umbilical cord (HUC)-derived cells caused increase of CD45⁺ hematopoietic cells. however, percentage of CD34⁺ cells was decreased with time of co-culture. Colony-forming cells (CFCs) were maintained in co-culture at least for 5 weeks. The chimerisms of human CD45⁺ cells in NOD/SCID mice were significantly higher when HAM- or HUC-derived cells were co-transplanted with CD34⁺ cells than when CD34⁺ cells were transplanted alone. Those results strongly suggest that HAM- and HUC-derived cells have hematopoiesis-supportive functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：羊膜細胞、臍帯細胞、造血幹細胞、造血支持能、共培養、共移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹／前駆細胞は骨髄や脂肪細胞、

臍帯血、胎盤、皮膚、臍帯、羊膜などの組織中に存在し、骨や軟骨、心筋などへの分化能

を有する細胞であることから、再生医療のための重要な細胞材料であり、すでに心筋や損傷軟骨、歯槽骨などの再生に利用されていた。間葉系幹細胞の供給源として最も普及していたのは成体骨髄であるが、成体骨髄細胞中の間葉系幹細胞の存在頻度は非常に低く、治療に必要な細胞数を取得するためには長期間の体外培養が必要であること、骨髄の採取は侵襲性が高くドナーへの負担が非常に大きいため、患者自身以外のドナーを確保するのが難しいことなどが問題であった。

(2) ヒト羊膜などの新生児付属組織は出産に付随して必ず出現する組織であるが、ほとんどの場合利用されることなく廃棄されていた。そのため、使用にあたって提供者の同意が得やすく倫理的な問題を容易にクリアできるだけでなく、1人のドナーに由来する組織が非常に大きく採取できる間葉系幹細胞数は骨髄に比べて遙かに多い。また、成体に由来する細胞に比べて新生児付属組織に由来する細胞は増殖能が高く分裂可能な回数も多いことが知られていた。研究開始までに我々はヒト羊膜中に骨芽細胞を軟骨細胞への分化能を有する間葉系前駆細胞が存在することを明らかにしていた。

(3) 臍帯血移植は骨髄移植と並び、白血病などの悪性血液疾患に対する有効な治療法であるが、臍帯血中に含まれる造血幹細胞数が非常に限られているため、成人患者への移植に適さないサンプルが多いことや移植後の好中球や血小板の回復が骨髄移植に比べて遅いことなどが問題となっていた。骨髄間葉系幹細胞を用いた研究より、造血幹細胞の移植の際に、間葉系幹細胞を同時に移植することにより、ヒト造血細胞の生着率が上がることや GvHD を抑制すること、好中球や血小板の回復が早くなること、体外において造血幹細胞と共培養することによって長期間に渡って造血前駆細胞を維持することが可能であることなどが報告されていた。

(4) 細胞の形態や分化能、細胞表面抗原の発現、遺伝子発現パターンの解析などから、骨髄以外の組織に由来する間葉系幹細胞は骨髄に由来する間葉系幹細胞とほぼ同等の性質を持っていることが明らかにされていた。また、脂肪組織や臍帯、胎盤に由来する間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞と同様に *in vitro* および *in vivo* において造血支持能を持つことが明らかにされていたが、羊膜由来間葉系幹細胞については詳細な解析が行われていなかった。

2. 研究の目的

新生児に由来する組織である羊膜はドナーに苦痛を与えること無く安全に採取でき、間葉系幹細胞を含む体細胞を大量に調製することが可能である。ヒト羊膜より分離できる

間葉系幹細胞は骨髄間葉系幹細胞とほぼ同等の性質を持つことが明らかにされているが、造血を支持するための能力に関しては解析が遅れており、未だ不明な点が多く残されている。当研究においては、ヒト羊膜に由来する間葉系細胞の造血支持能を *in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における造血支持能の検討

①臍帯血 CD34 陽性細胞との接触共培養

羊膜および臍帯から分離した間葉系細胞を数回継代して増殖させた後、大量放射線照射して増殖を停止させ、ゼラチンコートした6穴プレートに $1-3 \times 10^5$ 個/ウェルになるよう播種し、24時間後に浮遊細胞を完全に除去し、共培養用培地によって懸濁した臍帯血 CD34 陽性細胞を 1×10^4 個/ウェルの濃度で播種し、週に1度半量の培地を交換しながら5週まで共培養した。培地交換の際に回収した浮遊細胞の細胞数を計測すると同時に FACS を用いて細胞表面抗原の発現パターンを解析した。共培養5週目において浮遊細胞を全て回収し、細胞数の計測および FACS による解析に加えて、 1×10^4 個/ウェルになるよう細胞をメチルセルロース含有培地に播種しコロニーアッセイを行った。

幾つかの実験については、HAMCs との共培養系に G-CSF (25ng/ml)、GRO- α (12ng/ml) を添加して、細胞数の計測およびコロニーアッセイを行った。

②サイトカイン産生能の検討

大量放射線照射した HAMCs および HUCCs をゼラチンコートした6穴プレートに播種し、24時間後に浮遊細胞を完全に除去した。共培養用培地を細胞に加え、培養上清を48時間後に回収した(共培養前培養上清)。また、臍帯血 CD34 陽性細胞と HAMCs および HUCCs の共培養において行う培地交換の際の培養上清も回収した。回収した培養上清に含まれるサイトカインの種類および濃度を定量するために Bio-Rad 社の Bio-Plex200 システムを使用した。

(2) *in vivo* における造血支持能の検討

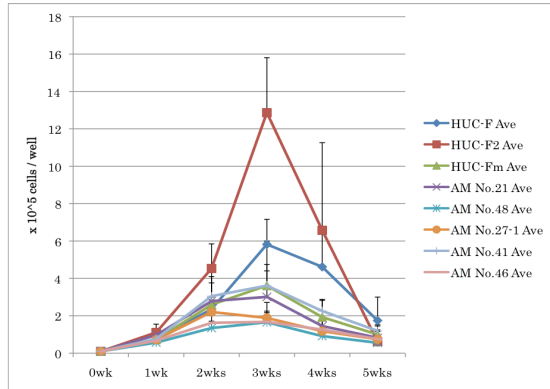
HAMCs および HUCCs を臍帯血 CD34 陽性細胞と共に半致死量放射線照射した免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) に移植し、16週後に末梢血および骨髄中におけるヒト血液細胞のキメリズムを解析し、同じドナーに由来する臍帯血 CD34 陽性細胞を単独で移植した場合のヒト血液細胞のキメリズムと比較することによって、その効果を検討した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における造血支持能の検討

①HAMSCs および HUCCs と臍帯血 CD34 陽性細胞

胞の共培養臍帯血 CD34 陽性細胞を大量放射線照射して増殖を完全に抑制した HAMCs および HUCCs 上に播種し、1 週間毎に浮遊血液細胞の数を計測したところ、HAMCs および HUCCs との共培養によって浮遊血液細胞は顕著に増加することが明らかとなった。浮遊血液細胞の増加は HUCCs との共培養においてより顕



著であった (図 1)。

図 1 浮遊性血液細胞数の変化

共培養中に回収した浮遊性血液細胞の細胞表面抗原を解析したところ、どちらの細胞との共培養においても、CD34 陽性細胞の割合は時間と共に急激に低下し、共培養開始後 1 週間で 20-30%、2 週間で 2-7%、3 週以降は 1% 程度であった (図 2)。

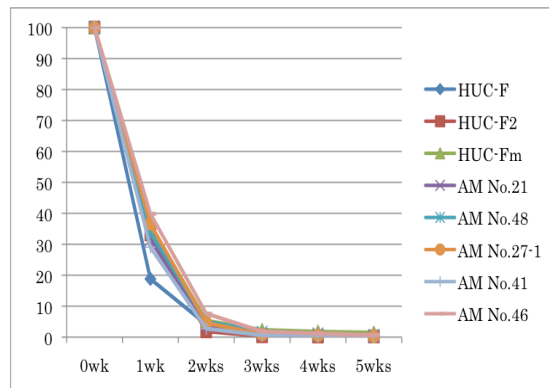


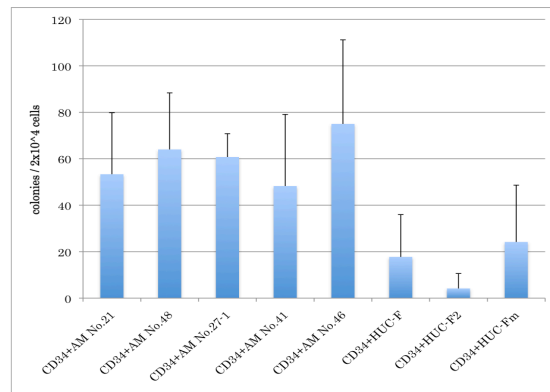
図 2 共培養中の CD34 陽性細胞の割合の変化

また、HUCCs との共培養においてのみ、CD45 陽性 CD33 弱陽性 CD14 弱陽性の細胞集団が確認され、この細胞集団は成熟好中球によって構成されていた。

②コロニーアッセイ

5 週間の共培養の後、浮遊血液細胞を回収し SCF、G-CSF、GM-CSF、IL-3、IL-6 および EPO が添加されたメチルセルロース培地に 1×10^4 個/ウェルの密度で播種した。14 日後に、コロニーの数を計測した結果、HUCCs と比べて HAMCs との共培養によって産生された浮遊性

血液細胞に高いコロニー形成能を認めた (図 3)。このことから、コロニー形成能を持つ造血前駆細胞は HAMCs との共培養によって、よ



り効率的に維持されることが示された。

図 3 コロニーアッセイの結果

③サイトカイン濃度の測定

共培養前および共培養中の培養上清中に含まれるサイトカインの濃度を定量的に計測した。共培養前の HAMCs の培養上清中において、IL-6、GRO-alpha および SCGF-beta が低濃度 (5ng/ml 未満) で検出され、IL-8、MCP-1 および VEGF が高濃度 (5ng/ml 以上) で検出された。一方、HUCCs の共培養前培養上清中において HAMCs と同様に SCGF-beta は低濃度で、IL-8 および MCP-1 は高濃度で検出されたが、VEGF は低濃度でしか検出されなかった。しかしながら、IL-6、G-CSF および GRO-alpha は非常に高濃度 (10ng/ml 以上) で検出された。

IL-6、IL-8、MCP-1、MIP-1 beta、VEGF、SCGF-beta は HAMCs および HUCCs との共培養培養上清中に共通して高濃度で検出されたのに対して、G-CSF および GRO-alpha は HUCCs との共培養培養上清中においてのみ高濃度で検出された。

④HAMCs との共培養系への G-CSF および GRO-alpha の添加

CD34 陽性細胞と HAMCs の共培養に G-CSF および GRO-alpha を単独あるいは同時に添加し、産生される浮遊性血液細胞数と造血前駆細胞数の変化を解析した。その結果、G-CSF を単独あるいは GRO-alpha と同時に添加した場合にのみ、浮遊性血液細胞数が増加し造血前駆細胞数が減少することが示された。また、浮遊性血液細胞中の CD34 陽性細胞の割合は G-CSF を添加した場合により顕著に現象することが明らかとなった。GRO-alpha 単独での添加では添加無しの場合と比べて浮遊血液細胞数および造血前駆細胞数、CD34 陽性細胞の減少率に変化は確認されなかった。

(2) in vivo における造血支持能の解析

臍帯血 CD34 陽性細胞を 1×10^6 個の HAMCs または HUCCs と共に半致死量放射線照射した NOD/SCID マウスへ移植し、16 週後に末梢血および骨髓細胞中におけるヒト血液細胞のキメリズムを解析した。 1×10^4 個の CD34 陽性細胞を HAMCs と共に移植した場合、CD34 陽性細胞を単独で移植した場合に比べて、骨髓中でのヒト血液細胞のキメリズムは有意に上昇していた ($21.55 \pm 22.23\%$ vs. $4.56 \pm 8.42\%$; $p=0.025$) が、末梢血中でのキメリズムには有意差を認めなかった ($2.95 \pm 4.03\%$ vs. $0.88 \pm 0.86\%$; $p=0.11$)。HUCCs と CD34 陽性細胞と共に移植した場合も同様に、骨髓中でのヒト血液細胞のキメリズムは CD34 陽性細胞を単独で移植した場合に比べて有意に上昇しており ($27.11 \pm 28.44\%$ vs. $4.14 \pm 8.42\%$; $p=0.0089$)、末梢血のキメリズムは上昇する傾向にあった ($4.06 \pm 5.97\%$ vs. $0.67 \pm 1.35\%$; $p=0.055$)。CD34 陽性細胞を 5×10^4 個移植した場合には、HAMCs または HUCCs を共に移植しても骨髓中、末梢血中でのヒト血液細胞のキメリズムが上昇する現象は観察されなかった。これらのことから、HAMCs および HUCCs は、移植する造血幹細胞の数が非常に少ない場合に、ヒト血液細胞の生着および産生を増幅する能力があることが強く示唆された。

以上の結果から、ヒト羊膜由来する間葉系細胞は、フィーダー細胞として使用することによって *in vitro* において造血前駆細胞を長期に渡って維持する能力を有し、*in vivo* において血液細胞の産生を増幅する能力があることが示された。また、非常に少数の造血幹細胞であってもヒト羊膜間葉系細胞と同時に移植することによってレシピエント体内において長期に造血系を構築できることが示されたことから、臍帯血移植の際にヒト羊膜間葉系細胞を同時に移植することによってこれまで問題とされていた造血幹細胞数の不足を補うことが可能であることが示唆された。

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 1 件)

① 須藤和寛、高森靖、菅野恵、金指幹元、中村幸夫 ヒト臍帯および羊膜由来細胞の造血支持能の比較 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸

[図書] (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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 和寛 (SUDO KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員

研究者番号：10392002