

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25年4月12日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591066

研究課題名（和文）テネシン-C由来新規ペプチドを用いた造血幹細胞由来の輸血製剤の開発

研究課題名（英文）Development of transfusion products derived from hematopoietic stem cells using TNIII14 peptide

研究代表者

久富木 庸子 (KUBUKI YOHIKO)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00284836

研究成果の概要（和文）：臍帯血由来の造血幹細胞（CD34陽性細胞）から *in vitro* で分化・増幅させた赤芽球系および巨核球系前駆細胞をテネシン-C由来新規ペプチド（TNIII14）と可溶性フィブロネクチンを用いて効率的に最終分化させ、短期間に大量の赤血球および血小板を培養する培養システムを開発した。

研究成果の概要（英文）：We established a novel culture system which produce a large amount of red blood cells and platelets derived from cord blood stem cells (CD34+ cells) using TNIII14 peptide and soluble fibronectin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：輸血学

1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞（HSC）の *in vitro* 増幅は、造血器腫瘍や固形癌に対する大量化学療法の際に行われる骨髄移植や末梢血幹細胞移植におけるドナー負担軽減、あるいは現在は小児患者や体重の軽い成人患者に限られている臍帯血移植の適応拡大に寄与する可能性を秘めている。更に、近年研究が盛んとなっている再生医療の分野でも HSC から各種臓器への分化・再生が可能な事が明らかにされ

てきており、幹細胞バンクという観点からも HSC の *in vitro* 増幅は重要な課題である。諸家の報告では HSC の *in vitro* 増幅の目的で、異種血清（胎児牛血清等）、異種ストローマ細胞（異種 stroma）、初代培養 stroma 等が使用されているが、異種動物の抗原や感染症（微生物）の混入や初代培養 stroma の寿命限界等の問題があり、未だ臨床応用されていない。これらの問題点を解決する目的で、申

請者らは平成 12 年度産業技術研究助成事業 (NEDO) による助成金を受け、ヒト骨髄 stroma に不死化遺伝子であるヒト telomerase catalytic subunit (*hTERT*) を導入してストローマ細胞株 (*hTERT* stroma) を樹立し、それを用いたヒト臍帯血造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) の長期無血清培養システムを確立した (Blood 101, 2003)。即ち、申請者らは *hTERT* stroma が初代培養 stroma よりも長期間にわたり効率的に HSC を増幅する能力を有する事を明らかにした。更に申請者らは、平成 15 年度基盤研究 (C) による助成金を受け、この HSC 増幅システムで増幅させた臍帯血 CD34 陽性細胞を erythropoietin (EPO), interleukin-3 (IL-3), stem cell factor (SCF) の存在下で 14 日間液体培養する事により、総細胞数として培養前の 1.2×10^6 倍 (赤芽球は総細胞の 95.6%) に増幅させた後に、Nagata ら (Science 292, 2001; Nature 417, 2002) と Miharada ら (Nat Biotechnol, 24, 2006) の基礎研究の成果を応用して *in vitro* で完全に脱核させる事に成功し、妊婦 1 人分の臍帯血 (CB) から濃厚赤血球輸血製剤 8.8 単位に含有される赤血球 (RBC) 数に相当する 1.76×10^{13} 個の正常機能を有する RBC を産生可能な事を明らかにした (Int J Hematol 87, 2008)。更に申請者らは、平成 18 年度基盤研究 (C) による助成金を受け、上記の HSC 増幅システムを用いて増幅させた CB CD34 陽性細胞を、SCF, thrombopoietin (TPO), Flt-3/Flk-2 ligand (FL), IL-11 の存在下で *hTERT* stroma と 14 日間共培養する事により、巨核球に分化・増幅させ、更に SCF, TPO, FL, IL-11 の存在下で 5 日間液体培養する事により、血小板 (PLT) を大量に産生させる事に成功した。具体的には、妊婦 1 人分の CB から濃厚 PLT 輸血製剤 10.5 単位に含有される PLT 数に相当する 2.1×10^{11} 個の正常機能を有

する PLT を産生可能な事を明らかにした (Stem Cells 24, 2006)。更に、申請者らは平成 18 年度基盤研究 (C) が終了した後の研究で、赤芽球系前駆細胞株である K562 をフィブロネクチン (FN) の存在下でヘミンを用いて赤芽球へ分化させる実験系に、申請者らが発見したテネシン-C 由来新規ペプチドである TNIIIA2 (J Biol Chem 282, 2007; Biol Pharm Bull 31, 2008) を添加する事により、ヘミン単独に比べて、短期間で赤芽球分化できる事を明らかにした (J Biol Chem 284, 2009)。具体的には、TNIIIA2 が K562 の VLA-4 と VLA-5 の活性化をもたらし、K562 と FN との接着が促進され、p38 MAPK 活性化を介して、3 日間の培養で 100% の細胞が赤芽球に分化する事を見出した (図 1)。更に preliminary な data ではあるが、上記の RBC 培養システムにおいて、*hTERT* stroma で増幅させた CB CD34 陽性細胞を EPO, IL-3, SCF で液体培養して赤芽球分化させる step に可溶性 FN と TNIIIA2 を添加すると、これまで 14 日間要していた赤芽球分化が 7 日間に短縮できる事、その際、細胞増幅率は低下しない事を確認した。更に、申請者らは巨核球系前駆細胞株である CHRF-288 を FN 存在下でフォルボールエステル (PMA) を添加して最終分化させ、血小板前駆体細胞突起を形成 (proplatelet like formation (PPF)) させる実験系に TNIIIA2 を添加すると、PPF の効率が上昇する事を明らかにした (PPF を有する細胞の割合 : TNIIIA2 未添加時 $15 \pm 3\%$, TNIIIA2 添加時 $45 \pm 4\%$) (J Biol Chem 投稿準備中) (図 2)。また、巨核芽球系前駆細胞株である Meg-01 を CHRF-288 と同一条件で培養すると、PPF は認めないが培養上清に血小板が大量に放出される事を明らかにした。更に、上記の巨核球/PLT 培養システムにおいて、*hTERT* stroma で増幅させた CD34 陽

性細胞を可溶性FNとTNIIIA2の存在下でSCF, TPO, FL, IL-11で液体培養すると、これまで19日間要していた巨核球分化とPLT産生が8日間に短縮できる事、その際、巨核球とPLTの産生効率は低下しない事を確認した。

ヘモグロビン溶液 (Stowell et al. Transfusion 41, 2001; Winslow et al. J Intern Med 253, 2003) は人工血液製剤として期待されているが、高血圧や徐脈の副作用があり、臨床の場では使用されていない。HSCからのRBC作製に関しては、Girratanaら (Nat Biotechnol 23, 2005) とMiharadaら (Nat Biotechnol 24, 2006) の報告があるが、何れもRBC作製量が申請者らの培養システム (Int J Hematol 87, 2008) の半分以下であり、Miharadaらは赤芽球を脱核させてRBCを作製する際に非生理的薬剤であるmifepristoneを添加しており、輸血製剤としては使用できない。HSCからのPLTの作製に関しては、Zauliらの報告 (Blood 90, 1997) があるが、PLT輸血製剤1単位に相当する 2×10^{10} 個のPLTを作製するためには1-3リットルの骨髓液が必要な計算となり、現実的でない。ヒトES細胞からRBC (Ma F et al. Proc Natl Acad Sci USA 105, 2008) 及びPLT (Nishikii et al. J Exp Med 205, 2008; Takayama N et al. Blood 111, 2008) 作製の報告もなされており、iPS細胞からのRBCとPLTの作製の報告も早晚なされると予想されるが、ES細胞とiPS細胞は共に臨床応用されるのには、時間がかかると予想される。つまり、今日まで輸血製剤に耐えうる報告は無く、本研究は極めて新奇性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

臍帯血由来の造血幹細胞 (CD34陽性細胞) から *in vitro* で分化・増幅させた赤芽球系および巨核球系前駆細胞をテネシン-C由来

新規ペプチド (TNIIIA2) と可溶性フィブロネクチンを用いて効率的に最終分化させ、短期間に大量の赤血球および血小板を作製する培養システムを開発する。

3. 研究の方法

本研究は、以下の6項目の実験系で構成された。(1)申請者が開発した上記のRBC培養システムにTNIIIA2と可溶性FNを添加する事により、短期間に大量のRBCを作製する、(2)作製したRBCの機能を解析して、輸血製剤として使用可能か否かを検討する、(3)申請者が開発した上記の巨核球培養システムにTNIIIA2と可溶性FNを添加する事により、短期間に大量のPLTを作製する、(4)作製したPLTの機能を解析して、輸血製剤として使用可能か否かを検討する、(5)高密度細胞培養系を用いて妊婦1人分の臍帯血からより高単位のRBC及びPLT輸血製剤を得る、(6) siRNA random libraryを用いて、stromaが有する新規HSC増幅遺伝子を網羅的に探索する。研究体制は、宮崎大学の研究分担者である松永卓也と東京理科大学のグループは5年前から共同研究を継続しており、実際に成果を上げている (研究業績欄を参照) ため、全く問題無いと思われる。

4. 研究成果

(1)ヒト telomerase catalytic subunit (*hTERT*) 遺伝子を導入して樹立した骨髓ストローマ細胞株 (*hTERT* stroma) に臍帯血CD34陽性細胞を重層し、Stem cell factor (SCF), Thrombopoietin (TPO), Flt-3 ligandの存在下で14日間培養して、CD34陽性細胞を増幅させた。次に、増幅させたCD34陽性細胞を bovine serum albumin, differic transferin, SCF, Interleukin-3 (IL-3), Erythropoietin, TNIIIA2の存在下で5~14日間培養して、赤芽球に分化・増幅させた。その結果、7日間の培養期間で総細胞数として 1.4×10^6 倍 (赤芽球は総細胞の97%) に分化・増幅した。一方、TNIIIA2の代わりに陰性コントロールとしてTNIIIA2mutを添加した場合は、同程度の分化・増幅を得るために14日間の培養期間が必要であった。つまり、TNIIIA2を添加して培養することで、赤

芽球の増幅効率を低下させずに短期間で大量の赤芽球が得られることを明らかにした。また、*hTERT* stroma への重層培養で増幅させた CD34 陽性細胞を Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, Macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF, IL-3, SCF の存在下で 10 日間液体培養してマクロファージを得ることに成功した。上記の培養赤芽球とマクロファージを 5 日間共培養して、赤芽球を脱核させ、赤血球を得ることに成功した。以上の行程で作製した赤血球におけるヘモグロビン A/F 比とヘモグロビン含有量が輸血用赤血球濃厚液と同等であることを確認した。

(2) 臍帯血 CD34 陽性細胞 (CB-CD34+細胞) から作製した赤血球 (RBC) の O2 解離曲線パターンが、健常人由来新鮮 RBC と同様であることを確認した。

(3) CB-CD34+細胞から作製した RBC を C12MDP liposome と全身放射線照射 (3Gy) で処置した NOD/SCID マウスに輸血した際の体内動態が、健常人由来新鮮 RBC と同様であることを確認した。

(4) CB-CD34+細胞から短期間で大量の血小板 (PLT) を作製する事に成功した。ヒト telomerase catalytic subunit (*hTERT*) 遺伝子を導入して樹立した骨髓ストローマ細胞株 (*hTERT* stroma) に CB-CD34+細胞を重層し、Stem cell factor (SCF), Thrombopoietin (TPO), Flt-3 ligand (FL) の存在下で 14 日間培養し CD34+細胞を増幅した。増幅した CD34+細胞を *hTERT* stroma に重層し、SCF, TPO, FL, Interleukin-11 (IL-11), TNIIIA2 の存在下で培養し巨核球に分化・増幅した。TNIIIA2 を添加した場合は 7 日間の培養期間で約 500 倍の巨核球に分化・増幅した。TNIIIA2 の代わりに TNIIIA2mut を添加した場合は、同程度の分化・増幅を得るために 14 日間の培養期間が必要であった。つまり、TNIIIA2 を添加して培養する事で、増幅効率を低下させずに短期間で大量の巨核球が得られた。得られた巨核球を更に SCF, TPO, FL, IL-11 の存在下で 5 日間液体培養する事で PLT を大量に産生可能な事を明らかにした。具体的には、妊婦 1 人分の CB から濃厚 PLT 輸血製剤 11 単位に含有される PLT 数に相当する 2.2×10^{11} 個の正常機能を有する PLT を産生可能であった。

(5) CB-CD34+細胞から作製した PLT の活性化能および凝集能が、健常人由来新鮮 PLT と同様であることを確認した。(i) 活性化能は、ADP 添加による P-selectin/活性化 GPIIb-IIIa 抗原の発現増強で判定した。即ち、上記の遠心分離

法で得た PLT を 1% paraform aldehyde で固定し、40mmol/l の ADP を添加して 10 分間室温で静置した。その後、PE 標識抗 P-selectin 抗体あるいは FITC 標識抗活性化 GPIIb-IIIa (PAC-1) 抗体で染色し、更に上記の 2 抗体で染色した血小板を各々 FITC 標識抗 CD41 抗体及び PE 標識抗 CD41 抗体で染色し、FACS 解析した。(ii) 凝集能は、Terasaki plate を用いて、ADP (2 mmol/l) と fibrinogen (600 µg/ml) を添加した際の凝集塊を倒立顕微鏡下で観察する方法で検討した。更に、この血小板凝集反応が、50 µg/ml の抗 GPIIb-IIIa 抗体で阻害されることを確認した。

(6) siRNA random library を用いて、骨髓ストローマ細胞が有する新規造血幹細胞増幅遺伝子を網羅的に探索した。

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 1 件)

Potentiated activation of VLA-4 and VLA-5 accelerates proplatelet-like formation. Matsunaga T, Fukai F, Kameda T, Shide K, Shimoda H, Torii E, Kamiunten A, Sekine M, Yamamoto S, Hidaka T, Kubuki Y, Yokokura S, Uemura M, Matsuoka A, Waki F, Matsumoto K, Kanaji N, Ishii T, Imataki O, Dobashi H, Bandoh S, Shimoda K. Ann Hematol 91 (10): 1633-1643, 2012

[学会発表] (計 0 件)

VLA4 と VLA5 を介したフィブロネクチンへの接着は巨核球の proplatelet 形成を促進する。松永卓也, 深井文雄, 久富木庸子, 下田和哉, 他. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24 日, 横浜

[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

久富木 庸子 (KUBUKI YOHKO)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：00284836

(2) 研究分担者

松永 卓也 (MATSUNAGA TAKUYA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：70260768
下田 和哉 (SHIMODA KAZUYA)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：90311844
深井 文雄 (FUKAI FUMIO)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90124487

(3) 連携研究者

()

研究者番号：