

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 5 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591169

研究課題名（和文） ヒト人工骨髄の作成と造血幹細胞・白血病幹細胞のニッチの解析研究

研究課題名（英文） Analysis of Human Regenerated Bone Marrow and Hematopoietic Stem Cell/Leukemic Stem Cell Niche

研究代表者

植田 高弘 (UEDA TAKAHIRO)

日本医科大学 医学部 講師

研究者番号：20322505

研究成果の概要（和文）：

ヒト間葉系細胞を用い作成した人工骨髄が、免疫不全マウスである NOD マウスの皮下で、ヒト造血細胞の長期維持が可能であること確認し骨髄ニッチを提供する能力を有することを示した。また、マウスの脂肪細胞より人工骨髄を作成してその機能解析を行い脂肪由来ストローマ細胞から作成した人工骨髄が自己複製能と多分化能を維持できる環境（骨髄ニッチ）を提供する能力を有することを示した。

研究成果の概要（英文）：

Regenerated bone marrow prepared using human mesenchymal cells have the ability to provide a bone marrow niche because long-term maintenance of human hematopoietic cells under the skin of the NOD mouse, an immune-deficient mouse, is possible. On the other hand, a function analysis of regenerated bone marrow prepared from adipose-derived stromal cells of mice revealed that this regenerated bone marrow can provide an environment (bone marrow niche) that is capable of maintaining the ability to self-renew as well as the multilineage potential of hematopoietic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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：小児科学

キーワード：小児血液学

1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞のニッチの研究は多くの報告があり、最近では一部の白血病幹細胞においてもニッチの報告がみられてきている。しかしその多くは免疫不全マウスを用いたマ

ウスの造血微小環境に対するヒトの幹細胞のニッチの研究であった。また人工的に骨髄を再生して検討する研究報告は認めていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト間葉系幹細胞と骨担体であるハイドロキシアパタイトを共培養することにより、人工的にヒト組織での造血微小環境を構築することで、まだ解明が不十分なヒト造血微小環境のニッチと造血幹細胞及び白血球幹細胞の制御機構のさらなる解明を目指す。一方で容易に大量の採取が容易で骨髄由来間葉系幹細胞と同様に、各種細胞に分化することが証明されている。今回脂肪細胞を用いて、脂肪由来ストローマ細胞からの骨髄の再生・ニッチ解析にも取り組む。

3. 研究の方法

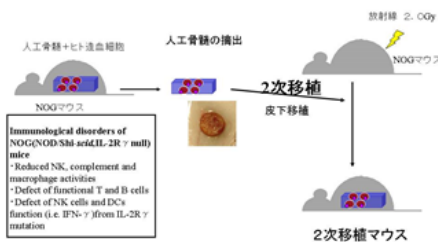
1：ヒト間葉系幹細胞を用いた人工骨髄の作成研究の方法：

1) ヒト間葉系幹細胞を幹細胞専用培地にて増殖後、骨芽細胞分化培地にてハイドロキシアパタイトと共培養を行いハイドロキシアパタイト内で、骨芽細胞を間葉系幹細胞から誘導しALP染色やvon kossa染色を実施し骨芽細胞への誘導細胞数の変化を評価する。

2) 複数のハイドロキシアパタイトとヒト間葉系幹細胞を骨芽細胞誘導培地で3日間共培養し、免疫不全マウスであるNOD/Shi-scid, IL-2R γ KOマウス (NOGマウス) 皮下に移植する。6~8週間経過を観察後に一部のハイドロキシアパタイトを取り出し再び病理組織学的な検討を行う。

3) 上記マウスにヒトCD34陽性細胞を移植しその後2ヵ月後に人工骨髄を2次移植しさらに3ヵ月後のハイドロキシアパタイトの人工骨髄中のヒト造血細胞の維持・増殖を検討する。

(Step3)生体内の人工骨髄に生着したヒト造血細胞は本当に造血能力を有するか？



2次移植後末梢血および骨髄さらに人工骨髄でのヒト造血細胞を解析する。

2：脂肪細胞による人工骨髄作成の研究の方法：

1) 皮下に人工骨髄を持つレシピエントマウスの作製：GFPトランスジェニックマウスから脂肪と骨髄を採取し間葉系細胞を樹立する。この間葉系細胞とハイドロキシアパタイトの担体とを骨芽細胞誘導培地で3日間共培養し10週齢のB6-Ly5.2マウスの皮下に間葉系細胞を含む担体を移植する。2ヵ月後一部の皮下移植マウスから担体を摘出し組織学的に評価する。

2) ルシフェラーゼ遺伝子導入 B6-Ly5.1ドナーマウス細胞の作製：ルシフェラーゼ遺伝子を導入したレンチウイルスベクターを作成し、B6-Ly5.1マウス骨髄細胞から造血前駆・幹細胞集団を磁気標識法で分離する。得られたLin(-)細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入をする。

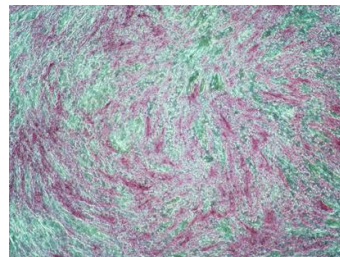
3) 皮下人工骨髄マウスへの1次骨髄移植：
1)の皮下ニッチBL6-Ly5.2に放射線を照射し、2)のLuc(+)/Lin(-)BL6-Ly5.1細胞を骨髄移植する。移植直後より移植細胞の皮下人工骨髄への生着の様子をin vivoリアルタイムイメージングシステム (IVIS) を用いて評価する。また定期的にFACSを使い末梢血でドナー細胞の生着率を評価する。

4) 皮下人工骨髄を用いた2次骨髄移植
1次移植2ヵ月後に皮下のニッチを摘出し、半致死量の放射線を照射したオスBL6-Ly5.2に再度皮下に人工骨髄を2次移植する。IVISによる取り込みの解析と移植2ヵ月後に一部の人工骨髄を摘出し血球を分離して、FACSでc-kitの発現について評価する。

4. 研究成果

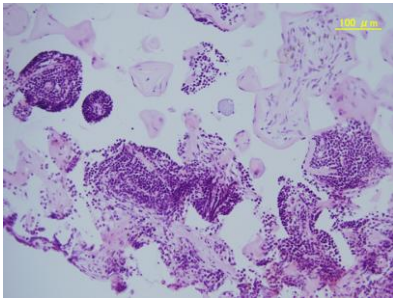
1-1)

ハイドロキシアパタイトとヒト間葉系幹細胞を骨芽細胞誘導培地で共培養し2週間培養後にハイドロキシアパタイト内の組織に対してVon Kossa染色を試行したところ下記のように陽性に染色される骨芽細胞を確認できた。



1-2)

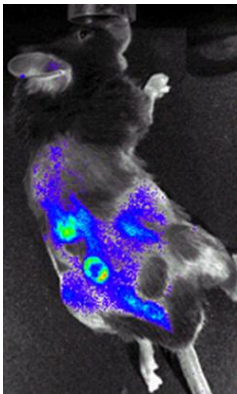
免疫不全マウスであるNOGマウスに上記ハイドロキシアパタイトを皮下に移植し6~8週間後にハイドロキシアパタイトを取り出し再び病理組織学的な検討したところBMLikeな骨髄の再現が確認できた。



1-3)

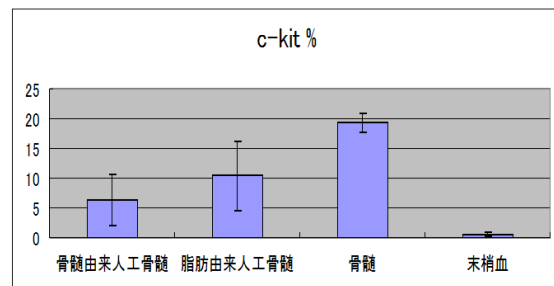
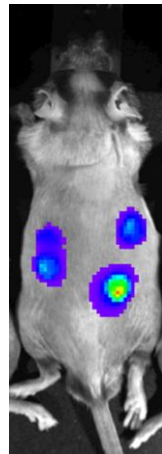
ヒト造血幹細胞を移植されたマウス皮下に移植されていた人工骨髄を、その後他の NOD マウスの皮下に 2 次移植し 3 か月後に人工骨髄中のヒト造血細胞を検討したところ CD45 陽性造血細胞と CD34 陽性造血幹細胞の両方が免疫染色で確認され人工骨髄にて長期にヒト造血細胞が増殖・維持されていることが確認できた。

2-1) マウスの脂肪細胞からもハイドロキシアパタイト内に人工骨髄を作成することに成功しシフエラーゼ遺伝子導入された造血細胞が IVIS によって人工骨髄中に集積していることを確認した、



2-2)

Luc(+)
Lin(-) BL6-Ly5.1 細胞が生着している人工骨髄を BL6-Ly5.2 マウスの皮下に 2 次移植し 2 か月後の人工骨髄への IVIS での集積検討したところ下記のように人工骨髄部分に IVIS の集積を認め人工骨髄中に造血細胞の長期維持が確認できた。人工骨髄中の FACS での解析では c-kit 陽性細胞の存在が確認でき未分化な細胞の維持も確認された。



以上から非骨髄細胞である脂肪由来ストローマ細胞から作成した人工骨髄は、造血細胞の長期維持・増殖が可能であり骨髄由来ストローマ細胞による人工骨髄同様に骨髄ニッチの構築が考えられた。

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) T. Ueda, A. Fujita, M. Migita, et al. Hematopoiesis in regenerated bone marrow from adipose-derived stromal cells on the hydroxyapatite scaffold 2010 日本血液学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 高弘 (UEDA TAKAHIRO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20322505

(2)研究分担者

右田 真 (MIGITA MAKOTO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50256963

(3)連携研究者

()

研究者番号：