

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11日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500422

研究課題名（和文） 三次元固定処理ストローマ細胞を用いた生体外造血システムの開発

研究課題名（英文） Development of ex vivo expansion system of hematopoietic stem/progenitor cells using stromal cells fixed on three-dimensional scaffolds

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

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞移植に応用することを目的として、三次元固定処理したストローマ細胞を用いる造血幹細胞の生体外増幅方法を検討した。三次元培養したストローマ細胞を有機溶媒（アセトン、メタノール、またはエタノール）で固定し、この細胞上で造血系細胞を培養することで、造血系細胞の増幅に適した有機溶媒を調べた。その結果、アセトンが増幅に適していること、毒性の低いエタノールを用いた場合も造血系細胞を増幅できること、などがわかった。

研究成果の概要（英文）：Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using stromal cells that were fixed on three-dimensional scaffolds was investigated to apply this method to hematopoietic stem cell transplantation. In this study, stromal cells were firstly cultured on the three-dimensional porous scaffolds, and then fixed by organic solvent (acetone, methanol or ethanol). Expansion of hematopoietic cells was performed by cultivating them on the fixed stromal cells, and effects of the organic solvents on the hematopoietic cell expansion were examined. From these culture experiments, it was demonstrated that highest expansion of the hematopoietic cells was achieved when the stromal cells were fixed by acetone, and that the stromal cells fixed by ethanol, less toxic solvent, were also effective in expanding the hematopoietic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：再生医工学

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：造血幹細胞、ストローマ細胞、胎仔肝臓細胞、固定、凍結保存、分化・増殖、三次元培養、ティッシュ・エンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄、末梢血や臍帯血を用いた造血幹細胞移植は、白血病や再生不良性貧血などの重篤な血液疾患に対して極めて有効な治療法

である。しかし、患者の白血球型と一致したドナーを見つけることが困難なために、移植数は限られ、広汎に実施されるには至っていない。

(2) 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、1) 移植できる細胞数が増えることから移植成績の向上が期待される、2) 1人のドナーからの細胞を複数の患者に移植できるため、ドナー不足の解消につながる、3) 細胞の入手が容易であるものの採取量が少ないために現状では小児への移植に限られている臍帯血移植を、大人への移植にも適用できるようになる、などの利点がある。

(3) 造血幹細胞を生体外で増幅するためには、ストローマ（間質）細胞との共培養が一般的に行われる。この際、放射線照射や薬剤投与によってストローマ細胞の増殖を予め抑制しておくことで、造血幹細胞が効率的に増幅されることが知られている。ただし、これらの検討は培養ディッシュを用いた二次元培養によるものであり、生体内を模倣した三次元培養系での検討は、研究代表者ら以外にはあまり報告されていない。

(4) 研究代表者らの従来の研究において、三次元培養系でストローマ細胞と共培養することで、二次元培養では必須となる外因性のサイトカイン（stem cell factor など）を用いなくても造血幹細胞を増幅できることがわかった。

(5) 上記の研究において、三次元培養したストローマ細胞を担体ごと凍結保存（三次元凍結保存）したものを造血系細胞の増幅に用いたところ、凍結保存しない場合よりも高い効率で造血系細胞が増幅された。三次元凍結保存したストローマ細胞の生存率は低かったことから、増幅に重要なのはストローマ細胞が分泌する液性因子ではなく、むしろ細胞の表面分子であることが示唆された。

(6) ストローマ細胞の表面分子を利用した、より簡便な造血系細胞の増幅方法を確立することを目的として、三次元培養したストローマ細胞をアルデヒドで架橋固定したものをを用いて造血系細胞を増幅できるかどうかを検討した。その結果、ホルムアルデヒドで固定した場合には増幅率は低値であったが、グルタルアルデヒドで固定することで、造血系細胞を増幅できることが確かめられた。

2. 研究の目的

三次元培養したストローマ細胞を有機溶媒で固定処理（三次元固定処理）したものをを用いて造血系細胞を培養することで、ストローマ細胞の表面分子を利用して、簡便かつ効率的に造血系細胞を増幅できる方法を確立することが本研究の目的である。具体的には、

以下の項目について検討し、造血系細胞の増幅や臨床応用への展開に適した固定条件を選定した。

(1) 細胞の固定法には、有機溶媒を用いた固定と、これまでに検討したアルデヒドによる固定がある。そこで、本研究では有機溶媒（アセトン、メタノール、またはエタノール）を用いてストローマ細胞の固定を行い、固定剤の違いが造血系細胞の増幅率に及ぼす影響について調べた。

(2) ストローマ細胞を三次元固定処理したのち、固定剤である有機溶媒を除去する方法について検討した。この実験では、緩衝液による洗浄と減圧による脱気除去を比較した。

(3) 比較的良好な結果が得られた条件下において長期培養実験を行うことで、本培養法の長期的な効果を確認した。

(4) 本研究での有機溶媒固定の結果を、従来のアルデヒドによる架橋固定の結果と比較することで、造血系細胞の増幅や臨床応用に適した固定条件を選定した。

3. 研究の方法

(1) 造血系細胞として胎生 14 日目のマウス胎仔肝臓細胞、ストローマ細胞として DAS 104-8B 細胞株、また、三次元培養担体としてポリビニルホルマール (PVF) 樹脂多孔質体（平均孔径 130 μm ）を一辺 2 mm の立方体状に細切したものをを用いた。

(2) ストローマ細胞の処理方法として、担体上で三次元培養した細胞を担体ごと有機溶媒で固定処理する方法（三次元固定処理）と、対照実験である凍結保存法（三次元凍結保存）の2種類を用いた。

固定処理では、三次元培養した細胞を固定剤（アセトン、メタノール、またはエタノール）に浸漬して固定した。固定後に、PBS (phosphate buffered saline) で洗浄して固定剤を除去し、造血系細胞の培養に用いた。一部の実験では、固定後の細胞が付着した担体を真空デシケーター内に入れ、減圧することで固定剤を脱気除去した。

三次元凍結保存では、10% ジメチルスルホキシドを添加した培地中で細胞を -80°C まで緩速凍結したのち、液体窒素中で保存した。培養開始時には、 37°C で急速解凍して実験に用いた。

(3) 造血系細胞の増幅実験では、まずストローマ細胞を $1 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$ -PVF の密度で担体に播種し、2日間三次元培養して担体上

にストローマ細胞層を形成した。このストローマ細胞を三次元固定処理、あるいは三次元凍結保存したのち、一定期間保存した。

保存後のストローマ細胞を洗浄、あるいは解凍したのち、胎仔肝臓細胞 (1×10^8 cells/cm³-PVF) をストローマ細胞上に播種して2または4週間培養することで、胎仔肝臓細胞中の造血系細胞を増幅した。

(4) 培養期間での各血液系細胞数の変化は、生細胞数と各血液系細胞の割合を計測することにより求めた。

三次元培養における生細胞数は、MTT 法で測定した。各血液系細胞の割合は、フローサイトメーターを用いて Ter119 (赤芽球)、CD45R/B220 (B 細胞)、c-Kit (造血前駆細胞)、および CD34 (造血前駆・幹細胞) を指標として行った。

4. 研究成果

(1) 造血系細胞の増幅に適した固定方法を検討するために、まずアセトンで三次元固定処理したストローマ細胞を用いて造血系細胞の増幅実験を行った。なお、対照として、三次元凍結保存したストローマ細胞を用いた増幅実験を行った。培養2週間での各造血系細胞の増幅率を表1に示す。

三次元凍結保存したストローマ細胞を用いた場合には、造血前駆・幹細胞以外の細胞はあまり増幅されなかった。これに対してアセトン固定では、赤芽球以外の細胞が高い割合で増幅されたとともに、造血幹細胞移植で重要となる未分化な造血系細胞 (造血前駆細胞、造血前駆・幹細胞) も 10 倍以上に増幅されることがわかった。三次元凍結保存の結果と比較すれば、アセトン固定では全ての血液系細胞の増幅率が高かった。

これらの結果から、従来から検討してきたアルデヒドによる固定に加えて、有機溶媒で固定したストローマ細胞も造血系細胞の増幅に応用できることが示された。

表1. アセトンでの三次元固定処理が造血系細胞の増幅率に及ぼす影響

処理方法	増幅率 [倍]	
	アセトン固定	三次元凍結保存
赤芽球	1.6	0.2
B 細胞	33.3	2.5
造血前駆細胞	12.8	1.6
造血前駆・幹細胞	17.5	14.4

(2) アセトンで固定した三次元培養ストローマ細胞を造血系細胞の増幅に使用できるこ

とが確かめられたことから、次に、有機溶媒の種類の影響を検討するため、メタノールを固定剤に用いた実験を行った。この実験では、固定後に有機溶媒を除去する方法についても調べるために、PBS での洗浄に加えて脱気による除去も実施した。培養2週間での各造血系細胞の増幅率を表2に示す。

各造血系細胞の増幅率はアセトン固定の場合 (表1) に比べれば低かったものの、未分化な造血系細胞は5倍以上に増幅され、比較的良好な結果が得られた。固定剤の除去方法については、洗浄除去と脱気除去の間で明確な違いは認められなかった。

表2. メタノールでの三次元固定処理と固定剤除去方法が造血系細胞の増幅率に及ぼす影響

処理方法	増幅率 [倍]	
	洗浄除去	脱気除去
赤芽球	0.7	1.0
B 細胞	15.4	16.3
造血前駆細胞	5.1	7.0
造血前駆・幹細胞	8.2	6.5

(3) 毒性の低い有機溶媒を固定剤として使用できるかどうかを確かめるために、エタノールで固定処理したストローマ細胞を用いて造血系細胞を増幅した結果を表3に示す。

培養2週間での造血系細胞の増幅率はメタノール固定の結果 (表2) よりもわずかに低い値であり、以前報告したグルタルアルデヒドで固定した場合と同等のレベルであった。

表3. エタノールでの三次元固定処理が造血系細胞の増幅率に及ぼす影響

増幅率 [倍]	
赤芽球	0.4
B 細胞	7.2
造血前駆細胞	7.2
造血前駆・幹細胞	2.6

(4) 造血系細胞の長期的な増幅傾向を調べるため、有機溶媒による固定実験のうち比較的良好な結果が得られたアセトン固定とメタノール固定 (脱気除去) について、4週間の培養実験を行った。その結果、未分化な造血系細胞は培養2週間の時点に比べて更に増幅されたことから、本培養法を用いることで、長期間にわたって未分化な造血系細胞を増幅できることが確かめられた。

(5) 本研究における培養方法は、担体ごと固定処理した三次元培養ストローマ細胞を用いることで、ストローマ細胞の表面分子だけを利用して造血系細胞を増幅するという、研究代表者ら以外には報告されていないものである。

本研究で用いたストローマ細胞は、固定処理によって表面分子構造は保たれているものの死滅しており、この細胞を用いて造血系細胞を増幅できたことから、増幅にはストローマ細胞の表面分子が極めて重要であることが確かめられた。

(6) ストローマ細胞の固定方法として、以前に検討したアルデヒド架橋（グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド）に加えて、有機溶媒（アセトン、メタノール、エタノール）による固定を本研究で新たに検討した。

造血系細胞の増幅率が最も高かったのはアセトン固定であり、次いでメタノール固定であったことから、増幅にはこれらの有機溶媒による固定が適していることがわかった。ただし、これらは毒性が強いことから、臨床応用には適さない。一方、比較的毒性が低いエタノール固定やグルタルアルデヒド固定を行った場合でも造血系細胞は増幅され、両者の増幅率は同等であった。従って、エタノールやグルタルアルデヒドで固定処理したストローマ細胞を、臨床応用に使用できると考えられた。

(7) 造血幹細胞を生体外で増幅するために一般的に用いられる方法である、放射線照射や薬剤投与によって増殖を抑制したストローマ細胞との共培養と比較して、本研究で用いた三次元固定処理法は特別な装置や設備が不要であり、手技も簡便で、処理後の細胞の保存も容易であるという利点を持つ。加えて、ストローマ細胞は死滅しており、固定処理によって滅菌することも可能なことから、安全性の高い方法であると考えられた。

(8) 本研究では、ストローマ細胞として DAS 104-8B 細胞を使用した。造血幹細胞や ES (embryonic stem) 細胞のような未分化な細胞との共培養に有効なストローマ細胞がいくつか知られていることから、今後はストローマ細胞の違いが造血系細胞の増幅率に及ぼす影響についても検討する必要がある。

予備的な検討において、造血幹細胞の増幅に使用される C3H マウス 10T1/2 細胞を用いて本研究と同様の検討を行ったところ、DAS 104-8B と同等以上の増幅率が得られた。従って、種類の異なるストローマ細胞を用いて造血系細胞の増幅実験を行うことで、造血幹細胞、あるいは特定の造血系細胞を増幅する培養系を確立できる可能性が示唆さ

れた。

(9) 本研究で用いた培養方法は造血幹細胞移植に応用することが目的であり、生体外で増幅した造血幹細胞を移植することによる治療成績の向上や、取得できる細胞数が少ないという問題がある臍帯血移植の適応範囲の拡大に貢献できる可能性が十分にある。

一方、共培養することで初めて高い機能を発現する細胞が造血系細胞以外にも多く存在することから、本実験で用いた三次元固定処理による共培養法を他の細胞の培養にも展開することで、新たなバイオ人工臓器や薬剤の開発につながるものと期待される。

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4件)

- ① Miyoshi H, Ohshima N, Sato C. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. J Tissue Eng Regen Med DOI: 10.1002/term.493 (in press)2012. (査読有)
- ② Miyoshi H, Murao M, Ohshima N, Tun T. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells within a porous polymer scaffold: effects of oxygen concentration and stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. J Tissue Eng Regen Med 5, 112-118, 2011. (査読有)
- ③ Miyoshi H, Ehashi T, Kawai H, Ohshima N, Suzuki S. Three-dimensional perfusion cultures of mouse and pig fetal liver cells in a packed-bed reactor: effect of medium flow rate on cell numbers and hepatic functions. J Biotechnol 148, 226-232, 2010. (査読有)
- ④ Miyoshi H, Ehashi T, Ohshima N, Jagawa A. Cryopreservation of fibroblasts immobilized within a porous scaffold: effects of preculture and collagen coating of scaffold on performance of three-dimensional cryopreservation. Artif Organs 34, 609-614, 2010. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

- ① 三好浩稔、小山寿恵、大根田修、皆川和

則、血管内皮細胞株との三次元共培養がマウス胎仔肝臓細胞の増殖・分化に及ぼす影響。第47回日本人工臓器学会大会。平成21年11月13日。新潟

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

大根田 修 (OHNEDA OSAMU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：30311872

大川 敬子 (OOKAWA KEIKO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30251052

(3) 連携研究者

なし