

令和元年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01348

研究課題名(和文)長期保管可能フィーダー細胞層を用いた造血機能の生体外再構築

研究課題名(英文) Ex vivo reconstruction of hematopoietic functions using three-dimensional freeze-thawed feeder cell layer

研究代表者

三好 浩稔 (Hirotohi, Miyoshi)

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：三次元凍結保存したフィーダー細胞上でさい帯血由来の造血系細胞を共培養することで、造血幹細胞を増幅することを試みた。

フィーダー細胞の種類や、培養密度が造血幹細胞の増幅に及ぼす影響について検討したところ、フィーダー細胞にマウスやヒトのストローマ細胞株を用いた際には造血幹細胞を15～30倍程度に増幅できた。この時、ストローマ細胞株とさい帯血細胞のいずれも低密度で培養した方が高い増幅度が得られた。同様の共培養系を用いて、さい帯血から巨核球を産生することも確かめられた。

以上の結果から、本培養法は血液系細胞の増幅に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

さい帯血移植は、細胞の入手が容易でヒト白血球抗原を完全には合わせなくても良いというメリットがある。しかし、含まれる造血幹細胞数が少ないために子供への移植が主である。さい帯血に含まれる造血幹細胞を生体外で増やすことができれば成人への移植にも利用できるため、その適用が大幅に広がることが期待される。

本研究では、さい帯血中の造血幹細胞を15倍程度に増やすことができたことから、成人への移植に利用できる可能性が示された。今後は、本研究で用いたストローマ細胞株の代わりに、さい帯血由来など自己のストローマを用いて同様の結果が得られれば、臨床応用に向けて展望が開けると考えられる。

研究成果の概要(英文)：With the aim of expanding hematopoietic stem cells (HSCs) derived from umbilical cord blood (UCB), we performed three-dimensional (3D) cocultures of UCB cells on 3D freeze-thawed feeder cell layer. Effects of feeder cell types as well as culture densities of feeder and hematopoietic cells on the expansion of HSCs were examined. When we used mouse and human stromal cell lines as feeder cells, sufficient expansion of HSCs (15-30 folds) was achieved. With respect to culture densities, low densities of both stromal and UCB cells were beneficial to efficient expansion of the HSCs. In addition to the HSCs, this culture method was also useful for expanding megakaryocytes from UCB cells. Thus, our results suggest that cocultures using 3D freeze-thawed feeder cells have high potential to expand HSCs and megakaryocytes.

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 さい帯血 凍結保存 分化・増殖 三次元培養 共培養 ティッシュ・エンジニアリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄移植やさい帯血移植などの造血幹細胞移植は、白血病に代表される重篤な造血機能障害を完治できる可能性のある有力な治療法である。しかし、1) ヒト白血球型 (HLA) が一致したドナーの確保が難しいこと、2) 骨髄移植ではドナーの負担が極めて大きいこと、3) さい帯血移植はドナーの負担は軽いものの採取できる造血幹細胞数が少ないこと、などの点が解決すべき課題として残されている。そこで近年では造血幹細胞を生体外で増幅する技術を確立することによって、造血幹細胞移植をより広汎に実施するための研究が活発に行われている。なかでも、提供者が比較的多いさい帯血は、含まれている造血幹細胞数が少ないために移植先の大半が子供であるものの、さい帯血中の造血幹細胞数を2倍以上に増幅できれば成人への移植にも使用できる。さらに、骨髄移植とは異なり、さい帯血は HLA が完全には一致していなくても移植できるという大きな利点があるため、造血幹細胞の増幅技術が確立されれば移植のハードルが大幅に下がるものと期待される。

(2) 造血幹細胞を効率的に培養するためには、造血を支持するフィーダー細胞（ストローマ細胞）と共培養する方法が一般的に用いられる。このとき、放射線照射や薬剤 (DNA 合成阻害剤) 処理によって共培養前にフィーダー細胞の増殖を抑制しておくことで、造血幹細胞の増幅度は向上する。しかしこれらの方法には、1) 特殊な装置 (放射線照射) が必要であったり、安全性 (薬剤処理) の問題がある、2) 処理後の細胞は引き続き培養する必要があるため長期保管には適しておらず、フィーダー細胞を維持するには手間とコストがかかり実用面での制約がある、3) 造血幹細胞を増幅するためには 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) が必須であるものの、シグナル分子は同時に幹細胞の分化も誘導するため、増幅した造血幹細胞の機能が増幅前よりも低下してしまう、などの問題が依然として残されている [1]。

(3) 研究代表者らはこれまでに、三次元培養環境が細胞の増殖や機能におよぼす影響を調べるとともに、多孔質樹脂を担体とする三次元培養法を要素技術として、体外造血システムの開発を行ってきた。これらの研究において、三次元凍結保存処理や三次元固定処理したフィーダー細胞上でマウス胎仔肝臓由来の造血幹・前駆細胞 (以下、造血幹細胞) を三次元共培養する実験を行った。その結果、1) これらの処理は、放射線照射などと同様に造血幹細胞の増幅に非常に有効であること、2) 外因性シグナル分子を全く使用しなくてもマウス造血前駆細胞を15倍以上、造血幹細胞を30倍以上に増幅できること、を明らかにした [2,3]。

(4) 以上の結果から、次の研究段階では得られた知見をヒトさい帯血細胞の培養に応用することで、さい帯血中の造血幹細胞を効率的に増幅する培養法を確立する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 造血幹細胞移植に応用できる基盤技術を確立するために、三次元凍結保存処理によって長期保管を可能にしたフィーダー細胞を用いて、ヒト臍帯血中の造血幹・前駆細胞を簡便かつ効率的に増幅できる三次元培養法を開発することが本研究の目的である。そこで、フィーダー細胞 (ストローマ細胞) の種類や密度、およびさい帯血の播種密度が未分化な造血細胞の増幅におよぼす影響について検討した。また、近年では血小板の供給が不足していることから、血小板を産生する巨核球を増幅するための条件についても、同様の培養系を用いて検討した。

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。また、造血系細胞として使用したヒトさい帯血は、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、「ストローマ細胞株をフィーダー細胞に用いた三次元共培養実験」、「さい帯血由来細胞をフィーダー細胞に用いる再播種実験」、「巨核球の増幅を目的としたさい帯血由来細胞の培養実験」、の3つを検討した。

(2) 「ストローマ細胞株をフィーダー細胞に用いた三次元共培養実験」では、フィーダー細胞にマウス由来の細胞株である C3H10T1/2 と、ヒト細胞株の HS-5 を用いた。C3H10T1/2 細胞は basal medium Eagle (BME) に 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を加えた培地で、また HS-5 の培養には 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を使用した。三次元培養用担体は、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用いた。

培養では、まずストローマ細胞を担体に $5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^3$ の密度で播種したのち、3日、あるいは7日間三次元培養して担体内部にストローマ層を形成した。その後、これらの担体を細胞ごと液体窒素中で凍結保存した。三次元共培養を行うために、解凍した担体にさい帯血細胞を 0.5、1、2、または $5 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$ (それぞれ D(0.5)、D(1)、D(2)、D(5) とする) の密度で播種し、10% FBS と 1% GlutaMAX を含んだ Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) 中で2週間培養した。

(3) 「さい帯血由来細胞をフィーダー細胞に用いる再播種実験」においては、ヒトさい帯血から分離した単核細胞 (MNCs) を使用した。上記のストローマ細胞株、および造血幹細胞源であるさい帯血細胞の代わりにさい帯血由来の MNCs を用いて、MNCs の再播種実験を行った。

培養密度の影響を調べるための実験では、MNCs を 1、または 3×10^7 cells/cm³ (それぞれ MD(1)、MD(3)) の密度で担体に播種して培養した。再播種実験においては、 1×10^7 cells/cm³ の密度で MNCs を播種して1週間培養することによりフィーダー細胞層を形成し、その後、MNCs を同じ密度で再播種してさらに2週間培養を行った。これらの実験においては、培地には先述の IMDM を用いた。

(4) 「巨核球の増幅を目的としたさい帯血由来細胞の培養実験」では、まずフィーダー細胞を用いずにヒトさい帯血細胞だけを培養した。この実験では、平均孔径 250 μm の担体をコーラゲンコートせずに用い、巨核球への分化を誘導するために、先述の IMDM に thrombopoietin (TPO) を添加した培地を使用した。

さい帯血細胞と MNCs の2種類を培養に用い、播種密度の影響を調べるために、さい帯血細胞の場合は 1 または 5×10^7 cells/cm³ で (それぞれ D(1)、D(5))、また MNCs の場合は 1 または 3×10^7 cells/cm³ (それぞれ MD(1)、MD(3)) で播種した。

フィーダー細胞を用いた共培養実験ではストローマ細胞に HS-5 を用い、先述の「ストローマ細胞株をフィーダー細胞に用いた三次元共培養実験」と同様に培養した。

(5) いずれの実験においても、三次元培養における総細胞数は MTT 法を用いて計測した [4]。また、培養細胞中の各血液系細胞の割合は、CD19 (B 細胞)、CD45 (白血球)、CD34 (造血幹・前駆細胞)、あるいは CD41/CD42b (巨核球) に対する抗体を適宜選択して用い、フローサイトメーターで計測した。

各血液系細胞の数は、総細胞数と各血液系細胞の割合から算出した。また増幅度の結果は、培養1日目と14日目(巨核球の増幅実験では1日目と10日目)の血液系細胞数の比を用いた。

4. 研究成果

(1) 「ストローマ細胞株をフィーダー細胞に用いた三次元共培養実験」において、コントロール実験としてフィーダー細胞を用いずにさい帯血細胞のみを播種して培養したときの、培養2週間での各造血系細胞の増幅度を表1に示す。未分化な造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) は、高密度播種条件下 (D(5C)) では約8倍に増幅された。また、各造血系細胞の増幅度は、高密度で播種したときの方が低密度 (D(1C)) よりも高かった。

表1. コントロール実験における造血系細胞の増幅度

増幅度 [倍]	培養条件	
	D(1C)	D(5C)
全細胞	1.15	3.07
B 細胞	0.94	3.74
白血球	0.19	1.34
造血幹細胞	2.48	8.11

播種密度: D(1C), 1×10^7 cells/cm³
D(5C), 5×10^7 cells/cm³

(2) 次に、フィーダー細胞としてマウス胎仔肝臓細胞由来の造血系細胞を増幅する際に有効であった C3H10T1/2 細胞株を用いて三次元共培養を行った際の、各造血系細胞の増幅度を表2に示す。全細胞数と B 細胞 (CD19 陽性細胞) については、播種密度が低い方が増幅度はわずかに高かった。それに対して造血幹細胞は、最も低い密度条件下 (D(0.5)) において増幅度が 20 倍以上に大幅に増加した。この値は、コントロール実験 (表1) と比較してもかなり高かったことから、共培養を行うことで未分化な造血系細胞の増幅度を向上できることが確かめられた。

表2. フィーダー細胞にマウス C3H10T1/2 細胞株を用いた三次元共培養における造血系細胞の増幅度

増幅度 [倍]	培養条件		
	D(0.5)	D(1)	D(5)
全細胞	4.63	4.33	3.96
B 細胞	5.40	4.83	3.60
白血球	2.29	2.22	3.60
造血幹細胞	23.38	9.10	8.18

播種密度: D(0.5), 0.5×10^7 cells/cm³
D(1), 1×10^7 cells/cm³
D(5), 5×10^7 cells/cm³

(3) ヒト由来の細胞株をフィーダー細胞に用いて造血系細胞を増幅することを目的として、HS-5 を用いた共培養実験を行った。この実験では、共培養前のフィーダー細胞の培養期間を変えることで、フィーダー細胞密度が造血系細胞の増幅度に及ぼす影響についても併せて検討した。培養期間が7日でフィーダー細胞密度が低いときの結果を表3、培養期間を3日間に短縮してフィーダー細胞密度を下げたときの結果を表4に示す。

まず、フィーダー細胞の密度が高い場合、全細胞数は4~6倍に増殖し、造血幹細胞はさい帯血を低密度で播種したときには約9倍に増幅された (表3)。ただし、各血液系細胞の増幅度は、C3H10T1/2 細胞をフィーダーに用いた場合と比較して低値であった (表2)。一方、フィーダー細

表 3. フィーダー細胞にヒト HS-5 細胞株 (高密度: 培養期間 7 日) を用いた三次元共培養における造血系細胞の増幅度

増幅度 [倍]	培養条件		
	D(0.5)	D(1)	D(5)
全細胞	5.64	4.64	4.11
B 細胞	2.85	3.01	1.62
白血球	1.31	1.04	0.88
造血幹細胞	9.11	3.32	3.47

播種密度: D(0.5), 0.5×10^7 cells/cm³
D(1), 1×10^7 cells/cm³
D(5), 5×10^7 cells/cm³

表 4. フィーダー細胞にヒト HS-5 細胞株 (低密度: 培養期間 3 日) を用いた三次元共培養における造血系細胞の増幅度

増幅度 [倍]	培養条件		
	D(0.5)	D(1)	D(5)
全細胞	22.80	18.99	10.24
B 細胞	20.26	19.97	8.86
白血球	3.86	2.90	2.10
造血幹細胞	15.32	14.08	3.67

播種密度: D(0.5), 0.5×10^7 cells/cm³
D(1), 1×10^7 cells/cm³
D(5), 5×10^7 cells/cm³

胞の密度を下げると、全細胞数の増殖が 10~23 倍にまで大幅に増加した (表 4)。この増加に伴い、B 細胞の増幅度が最大で 20 倍程度にまで向上し、造血幹細胞もさい帯血を低密度で播種した条件下では約 15 倍に増幅された。

(4) 以上の結果から、フィーダー細胞上での三次元共培養においては、ストローマ細胞の密度をあまり高くせず、さい帯血も低密度で播種した方が造血幹細胞を効率的に増幅できることが確かめられた。

(5) 「さい帯血由来細胞をフィーダー細胞に用いる再播種実験」では、さい帯血から分離した MNCs を用いて培養を行った。まず、異なる密度で MNCs を播種し、培養密度と造血系細胞の増幅の関係を調べた。その結果、MNCs の密度が $2.5 \sim 3.0 \times 10^7$ cells/cm³ 以上になると白血球や造血幹細胞が増幅することがわかった。

そこで、MNCs を 2 回に分けて播種し、1 回目に播種した MNCs の密度を刺激因子によって高めたあとで MNCs を再播種することで、再播種した MNCs 中の造血幹細胞を効率的に増幅することを試みた。しかし、1 回目に播種した MNCs を十分には増殖させられなかったことから、造血幹細胞を十分に増幅することはできなかった。今後は、最初に播種した MNCs を増殖させるための条件を再検討し、良好な結果が得られれば再播種して造血幹細胞を増幅することを検討する予定である。

(6) 「巨核球の増幅を目的としたさい帯血由来細胞の培養実験」では、ヒトさい帯血由来細胞のみを用いて培養条件を検討したのち、フィーダー細胞上での三次元共培養実験を行った。

まず、単層培養系においてさい帯血細胞の培養を行い、巨核球への分化に適した TPO 濃度を検討したところ、100 ng/ml が至適濃度であることが確かめられた。次に、三次元培養系においてさい帯血細胞、ならびに同細胞由来の MNCs を用いて 10 日間の培養を行い、培養密度が増幅度におよぼす影響を調べた結果を表 5 にまとめて示す。いずれの細胞を用いた三次元培養でも、高い密度で培養したとき (D5, MD3) の方が低い密度 (D1, MD1) よりも増幅度が高かった。この時の増幅度は単層培養 (C, MC) と同等以上であったことから、三次元培養系においても効率的に巨核球を産生できることがわかった。また、さい帯血細胞と MNCs を比較すると増幅度に顕著な違いは無かったことから、巨核球の産生についてはさい帯血から MNCs を分離して培養する必要はあまり無いと考えられた。

これらの結果を基に、フィーダー細胞上 (HS-5) でさい帯血細胞を三次元共培養し、巨核球を産生するための実験を開始した。現時点では予備的な実験を行ったところであるものの、1 週間目の時点では、共培養したときの方が巨核球の増幅度が高まることがわかった。ただし、その後

表 5. 三次元共培養における巨核球の増幅度

増幅度 [倍]	さい帯血細胞			単核細胞 (MNCs)		
	C	D(1)	D(5)	MC	MD(1)	MD(3)
全細胞	0.86	0.93	2.88	0.38	0.84	1.37
巨核球	1.78	1.24	7.95	9.83	1.68	10.61

播種密度: C, MC, 3×10^5 cells/cm²; D(1), MD(1), 1×10^7 cells/cm³;
MD(3), 3×10^7 cells/cm³; D(5), 5×10^7 cells/cm³

は巨核球数が減少したことから、その原因を確かめることで、長期に渡って巨核球を産生できる方法を確立できると期待される。

(7)結論として、三次元凍結保存により長期保管を可能としたフィーダー細胞を用いることで、さい帯血中の造血幹細胞を効率的に増幅したり巨核球を産生することが可能となった。よって、本三次元共培養法は体外で造血機能を再現した培養法として、造血系細胞の増幅に有効であることが示された。

<引用文献>

1. Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* 32, 9263-9270, 2011.
2. 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.
3. 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* 7, 32-38, 2013.
4. 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 1 件)

1. Miyoshi H, Sato C, Shimizu Y, Morita M. Expansion of mouse hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional cocultures on growth-suppressed stromal cell layer. *Int J Artif Organs* (in press). DOI:10.1177/0391398819827596

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/bm-engng/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：二宮 治彦

ローマ字氏名：Haruhiko Ninomiya

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号：10198533

研究分担者氏名：上妻 行則

ローマ字氏名：Yukinori Kozuma

所属研究機関名：熊本保健科学大学

部局名：保健科学部

職名：准教授

研究者番号：90550145

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。