

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

造血幹細胞・前駆細胞から輸血用血液製剤を製造する培養システムの開発

受賞者 池淵 研二(埼玉医科大学 輸血・細胞移植部)

1. はじめに

献血時のスクリーニング検査が高感度化され、ウイルス感染症が輸血を介して伝播するリスクは極めて低くなってきた。しかし再興感染症や新興感染症、特に寄生虫や原虫疾患が今後輸血を介した感染症として注目されてくるであろう。また同種ドナー由来の血液製剤が輸血されることにより、同種抗原感作やアレルギー反応が生じる現象を回避することは未だ困難である。

そこで人工血液代替物開発が検討されているが、現状のような期限切れヒト赤血球から抽出したヘモグロビンをリポソームに内包する製剤では、ヘモグロビンのメト化が回避できず酸素運搬能を長く維持することは困難であり、かつ網内系による貪食が進み血管内寿命が短時間である課題をさらに改善するにも限界がある。(Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2006;34:1-10. Life Sci 2001;70:291-300. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:427-37. Life Sci 2001;69:2007-15. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:275-83. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2001;29:191-201.) そのため現在開発中の人工血液代替物は同種血輸血が実施可能になるまでのつなぎの輸液(酸素運搬体)として利用できるとにとどまると推定される。欧米ではヘモグロビン分子を種々化学的に改変し酸素運搬体として開発した製剤が臨床試験されてきたが、いまだ治療薬として認可されたものはなく、種々の副作用も報告されている。別の製剤として有機化合物パーフルオロカーボンが高濃度に酸素を運搬できる化学物質として開発されたが、これも臨床試験段階で種々の合併症が発生し、開発が中断している。

そこで造血幹細胞および前駆細胞を培養系で増幅し、生体の骨髓内で産生されると同じ品質を持つ血球を生産して利用できないだろうか考えた。培養の出発材料になる細胞として、全国規模の臍帯血バンクが細胞数不足のために採用しない、つまり廃棄すること

になるヒト臍帯血が応用でき、ドナーの善意に報いることもできると考えた。スクリーニング検査を確実に実施すれば輸血感染症伝播のリスクをゼロにすることも可能である。出発材料の血液型を調べておけばABO血液型およびABO型以外でもメジャーな血液型を適合させた複数の製剤をあらかじめ造ることが可能であろう。また人工膜のリポソームではなく、生体膜を持つ血球が製造されるため、血管内寿命が長くできる可能性がある。

一方培養系であるため、無血清培地、増殖因子、器具など材料費がかさみ、コスト的には高価な製剤になるであろう。ただし将来的に新規技術が開発されコスト的に解決される可能性もある。またこうした挑戦をする過程で、造血幹細胞、造血前駆細胞あるいは臍帯血やサイトカインに関する科学的な新知見を見出すチャンスがあると期待できる。

2. 造血幹細胞および造血前駆細胞の増幅

造血幹細胞を体外で増幅するために種々のサイトカインの組み合わせが研究されてきた。ただしサイトカインのみでは期間および増幅率には限界があり、常時造血幹細胞を維持し増殖させることは難しい。造血幹細胞を長期間維持するため、ヒト骨髓由来のストロマ細胞を共存させた培養系を考案した(Cytotherapy 2002;4:109-18. Transfusion 2002;42:921-7. Exp Hematol 2001;29:174-82. Bone Marrow Transplant 2000;26:837-44.)。免疫不全モデルマウスNOD/SCIDをレシピエントとし、増幅したヒトCD34陽性細胞を移植することでヒト造血をマウス内でキメラ形成させることができた。このシステムを用いてヒト幹細胞自身が体外で約5倍程度増幅できていることを確認できた。ストロマ細胞を用いて培養する系を将来臨床応用することを念頭に、牛胎児血清を用いずヒト血清に置き換えることもでき、またサイトカインとしてbFGFを添加することで無血清培養が可能であることも示した。またヒト骨髓ストロマ細胞は一定の回数しか分裂できず利用回数が有限であるが、この細胞に

テロマラーゼ遺伝子を導入し不死化することが可能となり、造血支持能を保持したままの不死化ストロマ細胞が樹立できた (Blood 2003;101:532-40.)。臍帯血由来のCD34陽性細胞はテロマラーゼ遺伝子導入ストロマ細胞上で7週間以上も増幅を維持できた。総細胞数、CD34陽性細胞数としては約100万倍、コロニー前駆細胞数としては1000倍程度に増幅が可能であった。

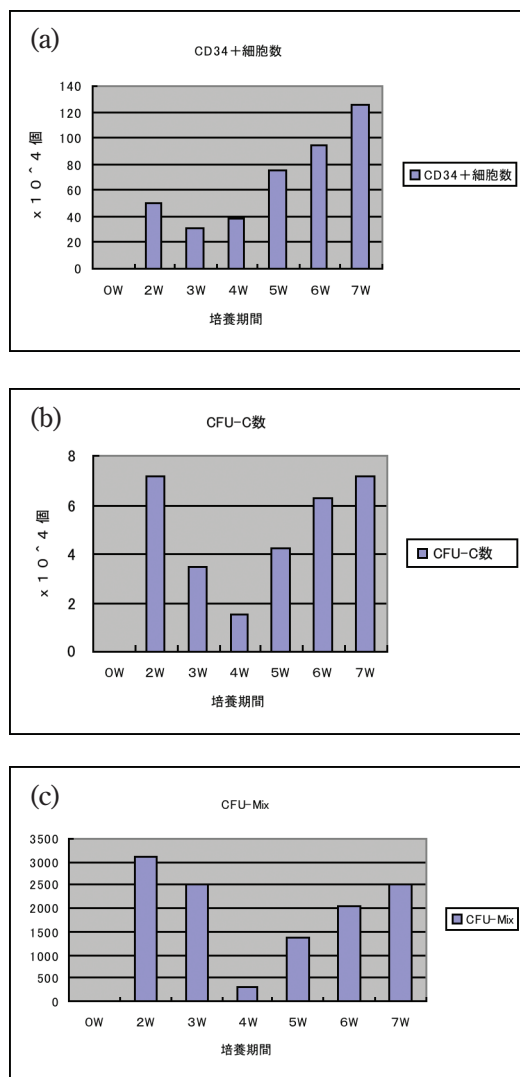


図1.

3. 造血幹細胞・前駆細胞から赤芽球および成熟赤血球の培養

不死化ストロマ細胞上でサイトカイン (SCF, TPO, Flk-2リガンド) 存在下に2週間造血幹細胞および前駆細胞を増幅し、次の2週間はストロマフリーでサイトカイン (SCF, IL-3, EPO) 存在下で培養し、赤芽球段階まで細胞を分化できた。次にマクロファージが共存することで赤芽球にアポトーシスが誘導され、かつ脱核した核をマクロファージが貪食して処理することが報告されているため、マクロファージを培養系で確保

することに着手した。赤芽球と同様に純化したCD34陽性細胞とストロマ細胞を2週間共培養し一定数の造血幹細胞／前駆細胞を増幅させ、ついでマクロファージへの分化を誘導するサイトカイン存在下で培養してマクロファージを得た。次に培養赤芽球と培養マクロファージと一緒にサイトカイン無しの条件で培養することで、ほぼ完全な赤血球を製造することができた。

In vitroで増殖できた赤血球の機能を判定するため、免疫不全マウスNOD / SCIDに培養細胞を輸血し、ヒト赤血球マーカーでマウス末梢血内を循環するヒト細胞を検出した。その結果、正常ヒト末梢血由来赤血球および赤血球保存液MAPに浮遊させた保存血液とほぼ同じパターンで免疫不全マウス末梢血中を循環することが判明した。経時的变化から推定すると血管内半減期は72~96時間であった。

(Stem Cells, submitted)

4. 培養顆粒球生成

造血幹細胞移植では往々にして移植初期から重症感染症を併発し、移植ドナーの造血幹細胞が生着し造血回復が認められる以前に死の転帰をたどる症例が存在する。一部の診療機関では、家族・親族あるいは同僚からドナーを募り、院内採血にて顆粒球を大量に採取し、これを患者に輸注することで一時的に顆粒球がゼロである危険な時期をしのぎ、ドナー由来の造血が回復するまでの期間を乗り越えることが実施されている。ただしドナーには顆粒球採血の効率を高めるため、顆粒球コロニー刺激因子とデキサメサゾンを投与すること、大量 (5~10 L) の循環血液を体外循環させ顆粒球分画を採取すること、体外循環を可能にするため抗凝固剤を持続点滴し一過性の低カルシウム血症を惹起する可能性があること、など慎重に実施されることが望まれる。

またドナーは患者の容態に合わせて病院に来て採取に応じてもらう必要があり、ドナーには無理を強いる場合がある。

そこで培養系でヒト顆粒球を生成することができれば、組織適合抗原が既知で、いつでも利用できる治療細胞を確保できることになる。ドナーへの負担もない。生成した顆粒球を長期保存する (凍結、冷蔵液状など) ことが可能となれば、治療材料としていつでも有効に応用できることになる。(ただし従来成績では顆粒球は凍結に脆弱な細胞であり、新規技術開発が必要とされる。)

臍帯血CD34陽性細胞をストロマフリーの条件でIL-3, SCFとG-CSFの組み合わせで14日間培養すると、骨髓球~桿状核白血球~分葉核白血球が増殖してくる。その増幅率は約1000倍である。顆粒球であることは塗沫標本のギムザ染色、アルカリフォスファターゼ染色、エラスターゼ染色などで確認できた。また蛍

光標識したビーズを貪食させ、これをフローサイトメトリー法で確認することで細胞の貪食能を確認できた。また顆粒球刺激剤 f MLP 存在下に顆粒球を処理すると活性酸素を産生する能力がある。

生成した顆粒球が実際に生体内で循環できるか確認する目的で、免疫不全モデルマウス SCID に培養顆粒球および新鮮ヒト末梢血から純化した顆粒球の2群を経尾静脈ルートで輸注して、一定時間ごとにマウス末梢血を少量採血し、中に含まれているヒト CD45 陽性ヒト由来白血球を追跡した。培養顆粒球の輸注量が少量であったため、輸注直後のピークは低かったものの半減期は両者とも約1時間であることが分かった。レシピエントを変更し、ヒト細胞の最適な投与対象動物を選択して更に今回の実験を再確認する必要があるものの、血管内半減期には新鮮ヒト顆粒球とは遜色ない成績がえられた。

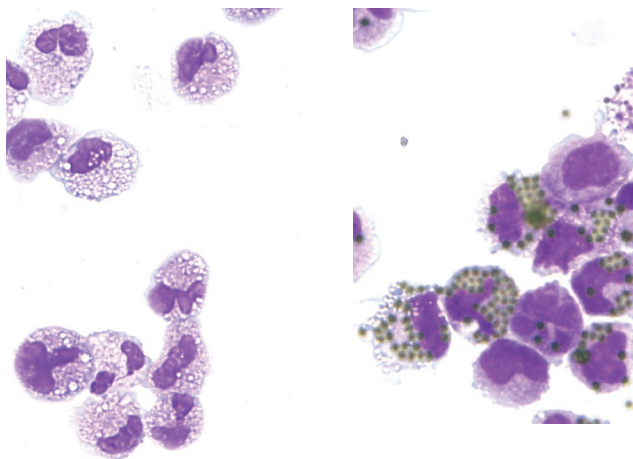


図2. 培養好中球. CD34 陽性細胞を IL-3/SCF/G-CSF の組み合わせで14日間無血清培養して得られた。

(in preparation)

5. 代替ストロマの開発

体外で培養した細胞を臨床に応用するためには、製造された細胞の品質を保証する必要がある。ヒトストロマ細胞を利用する系では、ストロマ細胞にテロメラーゼ遺伝子が導入されており、この細胞が最終製造物に混入しては困る。増殖しないようにするにはヒトへの投与前に十分量の放射線照射を行うことで一応は大丈夫であるが、ストロマ細胞の組織適合抗原は使用する際にレシピエントに暴露される。そこでストロマ細胞が混入しないよう、ストロマ細胞を固定化する、あるいは人工物でストロマ細胞機能を代替えさせる系を考えた。

不死化ストロマ細胞をパラフォルムアルデヒドで固定する。この上に臍帯血 CD34 陽性細胞を共培養する。増幅過程をフローサイトメトリー解析、コロニー解析で検討する。生きたストロマ細胞に比して増殖支持活性は減少するものの、サイトカイン単独群に比べてストロマ細胞の機能を保持していた。

またストロマ細胞機能をストロマ細胞が産生するサイトカインおよび発現する接着因子で代替えさせるシステムを構築する。モデルとして EPO をプラスチック面へ固定し EPO 依存性細胞株を継代維持できるか否か検討する。EPO は光反応性ゼラチンに含有させプラスチック面に塗布し、紫外線照射にてプラスチック面に固定化できた。EPO 依存性細胞株は塗布した EPO 量の約 100 分の1レベルではあるが EPO 反応性を示した。(Biomaterials. 2004;25(12):2293-8.)

おわりに

臍帯血バンクが全国的に整備され、保存臍帯血細胞数基準が高く設定されたため、妊婦の善意でドネーションされた臍帯血の一部が廃棄される事態を起こしている。大変残念な現象であるが、造血幹細胞移植を受ける患者にとっては、細胞数の多い臍帯血は貴重であり、治療が安全に行えるためには必要な措置である。そこで廃棄予定となった臍帯血を他の目的に応用することは重要である。

現状では試験管内で実施可能な段階と臨床的に利用できることの間には大きなギャップがある。しかし近い将来にはこのギャップを埋める新しい技術開発が当然生まれるチャンスがある。そのため、現時点では試験内でどこまで生体内を流れている血球に近いものが製造できるかを極めておくことは重要であろう。

赤血球、血小板、顆粒球のうち今回は2つの血球について挑戦した。血小板についても血小板代替物の開発は進められているが、血小板機能の極く一部、つまり血管内皮細胞傷害部位への粘着機能だけでも代替できそうな製剤が目指されている。できるだけフルの機能を持った製剤を造りたいため、あえて造血幹細胞から生体膜を持ち機能を十分保持した培養血球を造ることを更に目指したい。

謝 辞

本研究は平成16年度丸木記念特別奨学研究費Aにより行われた。

文 献

- 1) Tanaka R, Ichioka S, Sekiya N, Ohura N, Uchino S, Ojima A, Itoh Y, Ishihara O, Nakatsuka T, Ikebuchi K. Elastic plasma protein film blended with platelet releasate accelerates healing of diabetic mouse skin wounds. Vox Sang 2007;93(1):49-56.

- 2) Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T, Miyazaki T, Sato S, Ikeda H, Ikebuchi K, Koike K. A possible role for the production of multiple HLA antibodies in fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion* 2007;47(2):326-34.
- 3) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, Komiyama N, Kawai N, Bessho M, Sato H, Asakura T, Nishimura M, Ikebuchi K. Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg* 2007;83(2):661-2.
- 4) Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, Huqun, Udagawa K, Murayama Y, Nagata M, Shimizu Y, Ikebuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K, Hagiwara K. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007; 98(2):246-52.
- 5) Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006;34(1):1-10.
- 6) Owada T, Matsubayashi K, Sakata H, Ihara H, Sato S, Ikebuchi K, Kato T, Azuma H, Ikeda H: Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat* 2006;13(1):11-8.
- 7) Ito Y, Hasuda H, Yamaguchi T, Komatsu N, Ikebuchi K. Immobilization of erythropoietin to culture erythropoietin-dependent human leukemia cell line. *Biomaterials* 2004;25(12):2293-8.