

論文内容の要旨

造血細胞による再生医療のためのドナー細胞調製法の研究

長尾 研二

1. はじめに

従来の治療法では根治できない難治性疾患に対する新たな治療法として、近年再生医療に大きな期待が寄せられている。骨髄移植を代表例とする造血幹細胞移植はその中でも最も先行した再生医療の一種であると言える。しかしながら、少子化が進む中、移植の成否を左右する主要組織適合抗原型の一致した骨髄提供者が将来不足することが危惧されている。その不足を回避でき、骨髄提供者に対して負担のかからない移植細胞として近年臍帯血を用いた移植が行われているが、移植成績は骨髄移植や末梢血より採取した造血幹細胞を用いた移植の成績に比べて必ずしも高いとは言えない。その理由の一つとして、一つのドナー臍帯血中に含まれる幹細胞の数が少ないことが挙げられる。日本人は平均体重が軽いため、幹細胞数が少なくても移植適格者がまだ多いものの、欧米においてはレシピエントの体の大きさによって一検体の臍帯血では幹細胞数が足りず、移植を行うことができないことが多い。臍帯血由来造血幹細胞移植の安全性、効果を高めるために、臍帯血中に含まれる造血幹細胞および未熟な造血前駆細胞の効率よい増幅方法の開発が望まれている。

一方、未分化性を維持したまま、半永久的に増殖する細胞として、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) や体細胞から誘導可能である人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) が知られている。ES 細胞や iPS 細胞は、その分化多能性により種々の組織細胞、臓器細胞に分化可能である。血液細胞などから効率よく iPS 細胞を誘導することができれば、細胞医療における移植細胞の確保が容易になると期待される。

また、リプログラミングにより疾病患者由来の体細胞から iPS 細胞を樹立できれば、疾患の発症機構の解析や治療の開発に役立つと考えられる。

2. 造血発生期における造血支持細胞を用いた造血幹細胞増幅因子の探索

本研究では先ずマウスの造血発生期において、造血幹細胞の維持、増幅に関わる分子を探索し、候補分子を用いた造血幹細胞の体外増幅を試みた。大動脈—生殖隆起—中腎領域 (aorta gonad mesonephros :AGM) は成体型造血の発生と維持に重要な役割を果たしており、マウス AGM 領域由来 AGM-S3 細胞は造血幹細胞の発生を支持することがこれまでに示されている。初期造血を制御する分子機構を解明するために、AGM-S3 細胞株から新たにサブクローニングを行い、造血を支持する S3-A9 細胞株と造血支持能のない S3-A7 細胞株を取得した。DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、S3-A9 細胞株で特異的に発現している 79 遺伝子を選抜した。それらの遺伝子を、S3-A7 細胞株で強制発現させ、造血支持能への影響を検討した。その結果、79 遺伝子の中で唯一、ヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーの一つである Glypican-1 (GPC1) 遺伝子を高発現させた S3-A7 細胞株が、共培養によりヒト臍帯血由来造血前駆細胞を増幅させることを見出した。GPC1 は初期造血を支持する微小環境の構築に重要な機能を果たしていることが示唆された。このように造血前駆細胞の増幅能を高める分子を見出したが、造血幹細胞を支持、増幅する因子を見出すことはできなかった。

3. マウス骨髄細胞から多能性幹細胞へのリプログラミング

これまで造血幹細胞の未分化性を維持したまま、10倍以上の幹細胞増幅に成功したグループはなく、造血幹細胞の未分化性を維持した増幅には一定の限界があると考えられる。そこでマウス造血細胞から半永久的に増幅可能な iPS 細胞の誘導を試みた。これまでに、4つの胚性転写因子のマウス線維芽細胞への導入や、多能性幹細胞との融合により、体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングが報告されている。Oct4-GFP トランスジェニックマウスの骨髄単核球細胞 (BM MNCs) と胚性線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) を調製し、ES 細胞との融合あるいはレトロウイルスによる Oct4、Sox2、cMyc、Klf4 の発現を試みた。ES 細胞と融合した BM MNCs は MEF に比べ、Oct4 を発現するより多くの ES 細胞様コロニーを形成したことから、BM MNCs と ES 細胞との融合細胞は MEF より効率よく多能性幹細胞へリプログラミングされることを見いだした。4遺伝子の導入では、BM MNCs に対するウイルス感染効率は MEF に比べ低かったものの、感染した BM MNCs からは MEF に比べて高い効率で iPS 細胞コロニーが出現した。BM 由来 iPS 細胞 (BM iPS) は、ES 細胞マーカー

遺伝子を発現し、奇形腫を形成し、生殖系列への分化を伴ったキメラマウスの作出に寄与した。クローナルな解析の結果、同一のクローン由来の iPS 細胞であっても、培養過程の違いにより異なる形質を持つことが明らかになるとともに、一度のウィルス感染で複数の BM iPS クローンを取得可能であることが示された。造血組織である骨髓に由来する MNCs が高い効率で iPS 細胞へとリプログラミングされたことより、BM MNCs 中に多く含まれる血液細胞についても効率よくリプログラミング可能であることが示唆された。組織採取に際して、よりドナーの負担が軽い末梢血の細胞から多能性幹細胞を誘導することが可能であれば、細胞バンクの樹立、移植用自家細胞の調製、患者由来 iPS 細胞の樹立等において、臨床応用上の大きな利点を有している。

4. ヒト末梢血細胞からのリプログラミング

マウス造血組織である BM MNCs が容易にリプログラミングされることが示されたが、ヒトにおいて骨髓液採取の過程はドナーへの負担が大きい。また、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与により末梢血に動員されたヒト CD34 抗原陽性造血幹細胞から iPS 細胞を誘導できることが報告されているが、検体採取のためだけに細胞増殖因子である G-CSF を大量に投与する操作は、ドナーに対して健康リスクを高める結果となり避けるべきである。ドナーのリスク軽減のためには、表皮や骨髓よりも負担の軽い組織から検体を採取できることが望ましい。G-CSF の投与を伴わない単なる末梢血は、ドナーの負担の軽さ、採取のし易さから、ドナー細胞として最も期待されているものの、少量のヒト末梢血細胞からの iPS 細胞誘導法はまだ確立されていない。本研究で、可溶化型 IL-6 受容体と IL-6 との融合蛋白である FP6 を含むサイトカインの組合せを用いることで、ヒト骨髓由来単核球細胞および G-CSF の投与を伴わないヒト末梢血由来単核球細胞から iPS 細胞を誘導することに成功した。末梢血および骨髓由来 iPS 細胞は、細胞形態、表面抗原の発現、多能性に関連した転写因子の発現、細胞全体の遺伝子発現プロファイル、*in vivo*、*in vitro* における分化特性などの点について ES 細胞と極めて類似していた。OCT3/4、SOX2、KLF4 および c-MYC の4因子をレトロウィルスで感染した末梢血および骨髓由来単核球細胞は、感染効率は高くないもののいくつかのサイトカイン存在下で iPS 細胞を生み出した。著者らは1ml 以下の末梢血に相当する 5×10^5 個の単核球細胞から複数の iPS 細胞コロニーを取得した。G-CSF の投与を伴わない末梢血由来単核球細胞からの iPS 細胞誘導は、その効率とドナー負担の軽さから移植細胞ソースとして拡大し、患者由来 iPS 細胞の研究応用の機会を拡大するものと考えられる。

5. 結語

以上のように、骨髄中にはリプログラミングされやすい細胞が含まれることを見出した。さらに、複数のサイトカインの組み合わせで細胞を予め刺激することにより健康診断レベルの採血による少量のヒト末梢血細胞からも iPS 細胞を誘導できることを見出した。今後は血液中に存在するリプログラミングされやすい細胞群を特定し、濃縮することにより、さらに iPS 細胞の誘導効率が上がるものと考えられる。