

2023 年 2 月 23 日

国立大学法人筑波大学

国立大学法人東京大学医科学研究所

慶應義塾大学医学部

生体外でのヒト造血幹細胞増幅技術を開発 ～血液疾患の細胞治療実現に向けて～

造血幹細胞は、赤血球・白血球・血小板といったさまざまな血液細胞へ分化する能力を持っており、難治性血液疾患に対して行われる造血幹細胞移植では、移植後の造血および免疫の再構築において重要な役割を担います。しかし、造血幹細胞は非常に数が少なく、特に臍帯血移植においては、移植のリスクが増したり、ドナー選択が制限される可能性があることから、生体外増幅技術の確立が求められています。

これまで、生体外での造血幹細胞の維持には、血清アルブミンとサイトカインを組み合わせた培地が不可欠とされてきましたが、実際には、短期間の造血幹細胞維持はできるものの、その増幅作用は限定的でした。

2019 年に日米英独共同研究グループは、ポリビニルアルコール培地にサイトカインを加えると、血清アルブミンを用いずに、長期に安定してマウス造血幹細胞を増幅できることを報告しています。これに基づき、今回、アルブミンとサイトカインを、それぞれ高分子ポリマーと特定の化合物に置き換えた培地を用いて、ヒト造血幹細胞の生体外での長期増幅を可能とする新規の培養技術を開発しました。これにより、臍帯血に含まれるヒト造血幹細胞を 1 か月間にわたって増幅することができます。さらに、単一細胞 RNA シークエンス解析により、既存の培養技術と比較しても、造血幹細胞が選択的に増幅されることが示唆されました。

今後、この培養技術をヒト造血幹細胞の基礎研究ツールとして提供するとともに、より安全な造血幹細胞移植の実現とドナー不足の解消に向けた臨床応用を目指します。

研究代表者

筑波大学医学医療系／東京大学医科学研究所 幹細胞生物学分野

山崎 聡 教授／特任准教授

慶應義塾大学医学部 内科学教室（血液）

櫻井 政寿 専任講師

研究の背景

造血幹細胞は、骨髄中に存在し、赤血球・白血球・血小板といったさまざまな血液細胞へ分化する能力を持つ細胞です。血液疾患の治療に広く用いられており、化学療法だけでは治らない白血病や悪性リンパ腫などの難治性血液がん、あるいは再生不良性貧血などの造血不全をきたす疾患に対して、健常人ドナーから採取した造血幹細胞を移植する造血幹細胞移植が広く行われています。

しかしながら、この造血幹細胞は非常に稀な細胞であり、特に国内で広く用いられている臍帯血移植では、含まれる造血幹細胞の数が少ないために、生着^{注1}が遅れて感染症のリスクが増したり、ドナー選択が制限される可能性が示唆されています。そのため、より安全な造血幹細胞移植の実現には、とりわけ臍帯血に含まれる造血幹細胞の生体外増幅を行うことが重要です。また近年は、鎌状赤血球貧血や先天性免疫不全症などの遺伝性血液疾患に対して、患者自身の造血幹細胞を採取・培養し、異常な遺伝子を修復した後再び体内に戻して正常な造血を回復させる遺伝子治療法の開発も進められています。

このようなヒト造血幹細胞の増幅においては、これまで、血清アルブミン^{注2}とサイトカイン^{注3}を組み合わせた培地が、生体外での維持には不可欠であると考えられてきました。しかし実際には、造血幹細胞の短期間の維持は可能ですが、その増幅作用は限定的でした。

日米英独共同の本研究グループ^{注4}は、マウス造血幹細胞について、ポリビニルアルコール (PVA)^{注5}に stem cell factor (SCF) とトロンボポエチン (TPO) の2種類のサイトカインを加えることによって、血清アルブミンを用いずに、長期に安定して増幅できる培養技術を報告しています。そこで今回、これに基づき、血清アルブミンやサイトカインを用いることなく、化合物で構成された培地を用いて、長期に安定したヒト造血幹細胞の増幅技術の開発を目指しました。

研究内容と成果

PVA に SCF と TPO を加えた培地条件では、マウスと異なり、ヒト造血前駆細胞の増幅は限定的でした。そこで、マウスとヒトの造血前駆細胞の違いを調べるために、培養中の主要なシグナル伝達経路のリン酸化状態を分析したところ、ヒトではホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) /AKT の有意な減少が観察されました (図1)。そこで、PI3K-AKT シグナルを活性化させるため、740Y-P (PI3K を活性化させる化合物)を加えたところ、7日目時点ではヒト造血前駆細胞の増幅率が改善しました。さらに、740Y-P を加えると SCF が不要であること、また TPO 受容体作動薬^{注6}であるブチザミドを用いると TPO も不要になることを見出しました。これらの結果から、PVA に 740Y-P とブチザミドを加えた培地 (2a 培地) では、サイトカインを用いずともヒト造血前駆細胞を7日間培養可能であることを確認しました。しかし、この方法では、14日間経過すると巨核球 (血小板をつくる細胞) に分化してしまうことも分かりました。

長期に安定化した培養を実現するため、造血幹細胞の分化を防ぐ化合物を探索し、ピリミドインドール誘導体 UM171 を 2a 培地に加えた 3a 培地^{注7}では、30日間安定してヒト造血前駆細胞が培養可能になることを見いだしました。この培地で培養後の細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植することによって、造血を再構築する能力の維持を確認しました。

また、増殖効率のさらなる向上を目指し、PVA よりも優れたポリマーの探索を行いました。スクリーニングの結果、ポリビニルカプロラクタム-ポリ酢酸ビニル-ポリエチレングリコールグラフトコポリマー (PCL-PVAc-PEG)^{注8}が著しい細胞増殖能を有することを発見しました (図2)。PVA の代わりに PCL-PVAc-PEG を基盤とし、740Y-P、ブチザミド、UM171^{注9}を添加した培地を用いると、ヒト造血前駆細胞の増殖能がさらに改善しました (図3)。この培地中で培養した細胞も、同様に、造血を再構築する能力を維持していました。

次に、PCL-PVAc-PEG を基盤とした 3a 培地で培養した細胞の特性を調べるために、単一細胞 RNA シークエンス解析^{注10}を行ったところ、造血幹細胞に特異的な遺伝子を発現した細胞が多くを占めており、これは近年すでに臨床試験が実施された、UM171 あるいは SR-1^{注9}を用いたヒト造血幹細胞の培養技術と比較しても高い傾向にあることが分かりました（図4）。以上より、PCL-PVAc-PEG を基盤とした 3a 培地は、造血幹細胞を選択的に増幅することが示唆されました。

今後の展開

本研究チームは、今回得られた知見をもとに、ヒト造血幹細胞の培養技術のさらなる改良を続けます。これらの培養技術を、ヒト造血幹細胞の基礎研究ツールとして提供するとともに、より安全な造血幹細胞移植の実現とドナー不足の解消に向けて、臨床応用に取り組んでいく予定です。

参考図

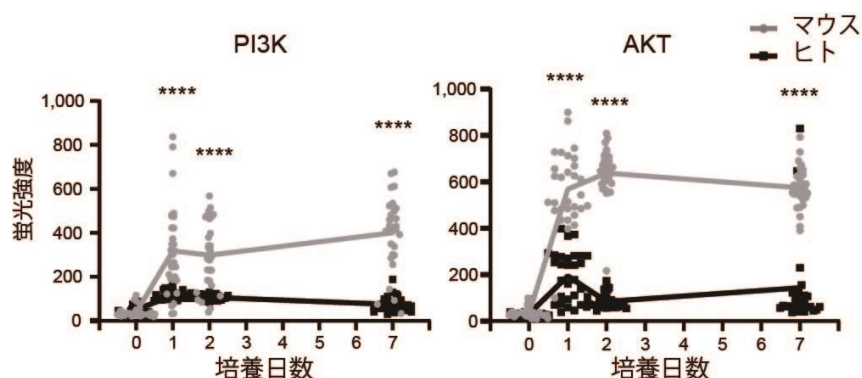


図1 マウスおよびヒトの造血前駆細胞における PI3K/AKT リン酸化

SCF と TPO を含む PVA 培地で培養した場合、ヒト造血前駆細胞における PI3K と AKT のリン酸化状態はマウス造血前駆細胞と比較し、有意に低かった。**** $P < 0.0001$.

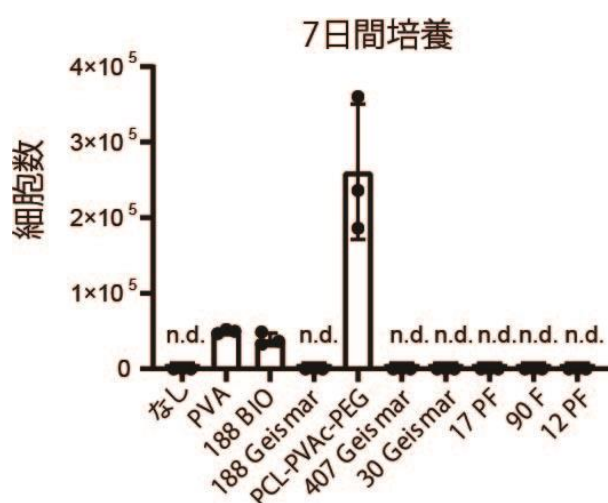


図2 3a 培地における合成ポリマーのスクリーニング

ヒト臍帯血由来造血前駆細胞をさまざまな合成ポリマーを含む 3a 培地で 7 日間培養した後に生じた全細胞数の比較。PCL-PVAc-PEG は著しく高い細胞増殖能を有する。

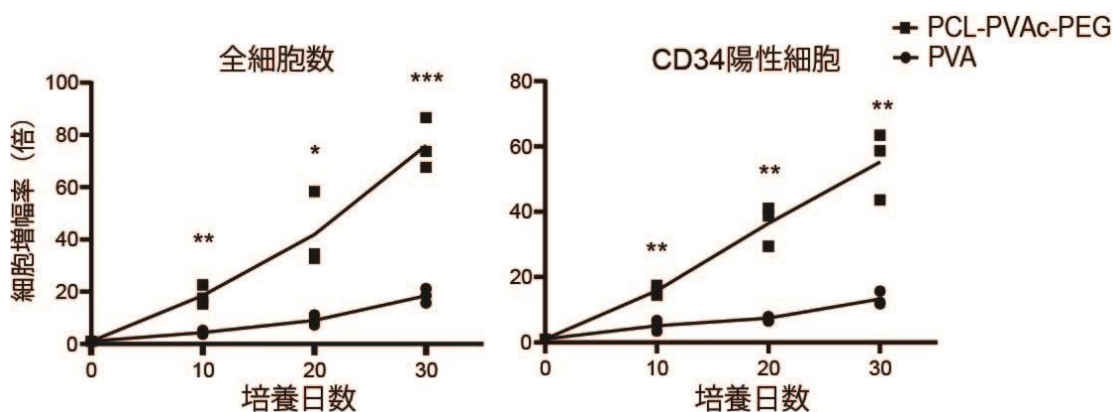


図3 PVA または PCL-PVAc-PEG を含む 3a 培地で 30 日間培養した際の全細胞数と CD34 陽性細胞数 (CD34 は造血前駆細胞のマーカー)

PCL-PVAc-PEG を基盤とした 3a 培地では、PVA を含む培地に比べ、30 日間の培養で全細胞が約 75 倍、CD34 陽性細胞が約 55 倍に増加し、より長期的な細胞増殖の促進が確認された。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

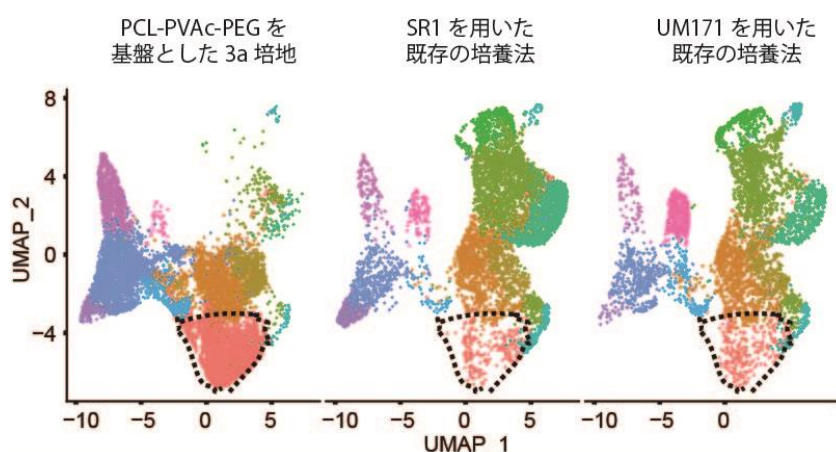


図4 各培養法で 10 日間培養した細胞における単一細胞 RNA シークエンス

PCL-PVAc-PEG を基盤とした 3a 培地では、造血幹細胞に特異的な遺伝子を発現する細胞 (黒点線で囲まれた部分) が既存の培養法よりも、多く含まれていた。

用語解説

注1) 生着

移植した造血幹細胞が骨髄で分化増殖し、白血球数が増えてくること。

注2) アルブミン

血清中の 60% を占めているタンパク質で、細胞培養に広く用いられている。精製アルブミンとは主にウシ血清から分離されたアルブミン分画で、組み換えアルブミンとは人為的にアミノ酸配列を変更し酵母や稲などの細胞で人工的に作られたアルブミンである。

注3) サイトカイン

細胞から分泌されるさまざまな細胞刺激因子。

注4) 日米英独国際研究グループ

筑波大学 (日)、東京大学医科学研究所 (日)、慶應義塾大学 (日)、理化学研究所 (日)、ヨーク大学 (英)、

オックスフォード大学（英）、スタンフォード大学（米）、塩野義製薬（日）、BASF（日、独）で構成された研究グループ。

注5) PVA（ポリビニルアルコール）

機能性樹脂の一種。液体のりなどの日用品にも用いられる一方で、医療用としての GMP グレード（治験に用いることのできる品質保証）もあり、社会生活には欠かせない化学物質。

注6) TPO（トロンボポエチン）受容体作動薬

血小板産生を調節する血液中のサイトカインであるトロンボポエチンに代わって巨核球を刺激し、血小板を増やす薬。実臨床でも特発性血小板減少性紫斑病や再生不良性貧血の治療に用いられている。

注7) 2a 培地と 3a 培地

2a 培地は PI3K 活性化剤と Mpl(トロンボポエチン受容体)作動薬を示し、3a 培地は 2a 培地に UM171 を加えた培地を表す。

注8) PCL-PVAc-PEG（ポリビニルカプロラクタム-ポリ酢酸ビニル-ポリエチレングリコールグラフトコポリマー）

独 BASF が医薬品添加剤として開発した高分子ポリマー。医薬品は体内で溶けないものが多いが、それを溶かして吸収を助けるために開発された。

注9) UM171 と SR-1

ヒト造血幹細胞の未分化性を維持するために同定された低分子化合物

注10) 単一細胞 RNA シークエンス解析

1 細胞ごとに転写産物（mRNA）の種類と量を網羅的に検出し、各細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを元に細胞集団を分類することで各細胞の特徴的な発現情報を取得する解析技術

研究資金

本研究は、JSPS 科研費 JP20H03707; JP20H05025; JP20K17407; JSPS 20181706)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業「機能予測と安全性を担保したゲノム編集造血幹細胞による遺伝子治療技術の開発（22bm0404077h0002）」および「造血幹細胞の医学への最新技術強化（22bm0704055h0003）」、the Leukemia and Lymphoma Society（3385-19）、National Institutes of Health（K99HL150218）、the California Institute for Regenerative Medicine（grantsLA1_C12-06917）、the US National Institutes of Health（grants R01DK116944, R01HL147124 and R21AG061487）、the Virginia and D.K. Ludwig Fund for Cancer Research、他の研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題 名】 Chemically-defined cytokine-free human hematopoietic stem cell expansion.

（化合物で構成された培地によるヒト造血幹細胞増幅）

【著者名】 Masatoshi Sakurai*, Kantaro Ishitsuka*, Ryoji Ito, Adam C Wilkinson, Takaharu Kimura, Eiji Mizutani, Hidekazu Nishikii, Kazuhiro Sudo, Hans Jiro Becker, Hiroshi Takemoto, Tsubasa Sano, Keisuke Kataoka, Satoshi Takahashi, Yukio Nakamura, David G Kent, Atsushi Iwama, Shigeru Chiba, Shinichiro Okamoto, Hiromitsu Nakauchi**, and Satoshi Yamazaki**

*共同筆頭著者

**共同責任著者

【掲載誌】 *Nature*

【掲載日】 2023 年 2 月 22 日

【DOI】 10.1038/s41586-023-05739-9

問合わせ先

【研究に関すること】

（基礎研究の概要について）

山崎 聡（やまざき さとし）

筑波大学医学医療系 幹細胞治療研究室 教授

<https://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/sct/index.html>

（臨床応用への可能性について）

櫻井 政寿（さくらい まさとし）

慶應義塾大学医学部 内科学教室（血液）

https://k-ris.keio.ac.jp/html/100003333_ja.html

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

<https://www.tsukuba.ac.jp/>

東京大学医科学研究所 国際学術連携室（広報）

<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/>

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課

<https://www.keio.ac.jp/ja/>