

第25回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

1. ヒト造血幹細胞の体外増幅

辻 浩一郎

【司会 (池田)】 今日では造血幹細胞ということで、骨髄中、末梢血中、臍帯血中にもあるということで、このあとにも臍帯血、末梢血の造血幹細胞についてはお話を伺うことになると思いますが、CD34+でソーティングしてきて増幅する。そういうストラテジーでやった場合に、どこのソースがより効率よく増幅されるというデータはありますか。

【辻】 正直言って、末梢血のことは私たちはやっていないのですが、骨髄細胞と臍帯血細胞を比較しますと、少なくとも増幅という点では、臍帯血細胞の方がより高い増幅能力というか、増殖能力を持っていると思います。末梢血中の造血幹細胞についても、これまでに報告されている検討は多くの場合、造血前駆細胞の増幅なのですが、造血前駆細胞の増幅については、末梢血中の細胞も結構いいという報告があります。

こういった分け方が本当に正しいかどうかは別として、単純に造血幹細胞にもある階層性があって、未分化度に違いがあるとすれば、これは本当にきちんと科学的に検証されたことではありませんが、ちょっと考えてみますと、臍帯血は、胎生期の造血幹細胞の増幅が非常に活発に行われている時期の造血幹細胞で、成人骨髄中の造血幹細胞はそうした造血幹細胞の子孫であり、その骨髄中の造血幹細胞から、おそらく末梢血中の造血幹細胞が生み出されてきます。そう考えますと、その分化度から言えば、ひょっとしたら一番未分化なのは臍帯血の造血幹細胞で、骨髄細胞、それから末梢血中の造血幹細胞と分けられるのかもしれませんが。実際、先生等はよくご存じだと思いますが、造血幹細胞移植をそれぞれのソースで移植してみますと、末梢血幹細胞の移植は造血の回復が非常に速いという特徴があります。逆に、臍帯血中の造血幹細胞の移植は、造血の回復が非常に遅れるという特徴があります。おそらく、いろいろな原

因があってそういうことになっているのだろうと思うのですが、もともと臍帯血の造血幹細胞は非常に未分化であるために、成熟するのに時間がかかって、末梢血中の造血幹細胞は多少、分化した細胞であるために、成熟までの時間が短いという推定をすることは可能かもしれません。

【司会】 神戸会場から1つ質問があります。臍帯血のご質問です。

【質問】 臍帯血に通常出現する細胞の種類について、CD34+細胞から分化する細胞以外にどのような細胞がありますか。

【司会】 これは非常に難しい質問かもしれません。

【辻】 それは私よりも、このあとお話しいただきませ高橋先生の方がお詳しいのではないかと思います。リンパ球や造血幹細胞前駆細胞、それから成熟した血球としてはリンパ球やミエロイド系の細胞、赤血球系の細胞もたくさん存在します。もちろん特徴としては、いわゆる大人の末梢血と違い、有核赤血球がかなりの比率で臍帯血中には含まれていることがあると思います。それ以外には、詳しい比率までほかの細胞と比較したことがないのでよくわかりませんが、通常大人の末梢血に存在するような細胞は一応存在するのではないかと思います。

【司会】 もう1つ、同じ先生から質問があります。

【質問】 臍帯血塗抹標本を作った場合、CD34+細胞、Blast様の細胞の確率はどのくらいあるのか。大ざっぱに教えていただけないでしょうか。

【辻】 全体をきちんと数えたことはないのですが、単核球に分けますと、CD34+細胞としてはおよそ0.5%くらいだろうと思います。

【司会】 ありがとうございます。それでは、これから東京を呼んでみたいと思います。東京の加藤先生、東京会場でご質問はありますでしょうか。

【東京会場・加藤】 私の方から質問させていただきませ。辻先生がおっしゃいましたように、4倍程度

では臨床的に用いることを考えますと、もう少し欲しい。つまり、CD34に分離をする操作の過程でだいぶ失われてしまいますので、それが半分に減ったとすると、4倍で最終的に倍になりますので、今後、10倍あるいはそれ以上の増幅効率が期待されると思います。

実際に臨床応用を開始しているいくつかのグループがありますが、その中で、コロラドのデンバーのグループがすでに行っている臨床成績を拝見しますと、期待されたほどの造血の促進はまだ得られていないと思います。一方で、これは私たちが注意して見ていかなければならないと思っているのですが、急性GVHDの頻度が少し高くなっているという結果が出されています。

辻先生たちの方法にも共通するのですが、「FL (FLk2/FLt3リガンド)を加えることが、リンパ球の機能に何らかの影響を与えている可能性があるかどうか。辻先生たちの研究の中で、造血能のほかにリンパ球の機能に対する影響をご検討しておられたら教えていただきたいと思います。また、先程ご紹介のあったNOD/SCIDマウスのほかに、最近のモデルマウスの進歩があるかと思っておりますので、それをご紹介いただければと思います。

【辻】 私たち自身は、増幅された造血幹細胞から出てくるリンパ球の機能については検討しておりませんが、NOD/SCIDマウスにおけるヒト造血再構築の特徴というか、欠点の1つなのですが、成熟したTリンパ球がなかなか出現してこないことがあります。preTぐらいまでは出てくるのですが、成熟T細胞は出現してこないことに問題があります。そういうわけで、増幅された造血幹細胞を実際に移植するときに、Tリンパ球がいったいどうなっているかについては、今までは十分に解析されてこなかったのが事実です。加藤先生のご指摘のとおり、FL (FLk2/FLt3リガンド)、あるいはSCFもそうかもしれませんが、そういったサイトカインを使うことが、リンパ球の再構築に何らかの影響を与えている可能性はあるだろうと思います。そのことは十分に検討されなければいけないだろうと思います。

従来のNOD/SCIDマウスの特徴として、先程、

NK活性が低いとお話ししましたが、実際、私もこのNOD/SCIDマウスにasialo GM 1抗体を投与して、より確実にNK活性をつぶして移植しております。実際、asialo GM 1抗体を打ってNK活性をより下げてやることによって、ヒト造血幹細胞の生着率は上がってくるわけですが、京都大学の先生たちは、NK活性を完全になくすためにIL2レセプターのcommon gammaをノックアウトしたNOD/SCIDマウスを開発されました。機序はまだよくわかっていませんが、そのNOD/SCIDマウスに、ヒトの造血幹細胞を移植しますと、CD3陽性の成熟T細胞も出現してくることがわかってまいりました。

加藤先生が今ご指摘の点をこれから検討していくためには、そういった新しく開発されたNOD/SCIDマウスを使って、マウスで再構築されてくるT細胞の機能はどうかということ、詳細に検討していく必要があるだろうと思います。

【司会】 仙台会場で質問があるようです。仙台会場、どうぞ。

【仙台会場】 仙台会場です。1つ質問があります。

【質問者】 愚問かもしれませんが、例えばエリスロポエチン、あるいはM-CSF、GM-CSF、G-CSF等の製剤がすでに登場していますが、それらの実用されているものと、先生の発表されました体外増殖との守備範囲を、どのように考えたらいいのでしょうか。

【辻】 最初にお示しましたように、造血幹細胞から成熟血球までの分化増殖過程は、少なくともその一部は、サイトカインと呼ばれる液性因子で制御されています。サイトカインには、もちろんそれぞれ標的細胞となる細胞があるわけですが、それほど単純に分類することはできないのですが、今お話しいただきましたエリスロポエチンやG-CSFといったサイトカインは、成熟血球にかなり特定された標的細胞を持ったサイトカインです。それから、IL-3やGM-CSFは、造血幹細胞よりは少し分化している細胞以降に働くサイトカインであるというように、それぞれの標的細胞があります。

そういった細胞が造血幹細胞に影響を与えるか与えないかについては議論があるのですが、少な

くともエリスロポエチンやG-CSF等のようなサイトカインは、ほとんど影響がないだろうと考えられています。そのことがおそらく、エリスロポエチンやG-CSFが、実際の臨床の場では非常に使いやすいサイトカインであることを保証しているのだらうと思います。エリスロポエチンを使って造血幹細胞にまで作用してしまうようだと、かえって臨床的には使いにくい問題も出てくるかもしれません。エリスロポエチンは赤血球系の細胞に非常に特異的に働いてくれて、そのためにほかの細胞系には影響を与えることなく、赤血球造血を活性化することができるサイトカインであらうと思います。

実際、そういったエリスロポエチン等を加えた増幅法を用いて増幅された細胞が、臨床的にすでに応用されていることがあります。先程、加藤先生からご紹介いただきましたいくつかのグループは、たしかSCFとG-CSFとエリスロポエチンとトロンボポエチンの組み合わせで増幅した細胞を移植しています。加藤先生がご指摘のように、現在、そのような組み合わせで増幅された細胞移植において、造血の回復を速くするような効果は必ずしも認められませんので、そういったサイトカインを用いることが造血幹細胞の増幅においては、そういったサイトカインが分化を促進してしまっ、造血幹細胞の未分化性を維持するという点に関しては、いい方向に働いていないのではないかとということも推測されています。

そういったことで、今回、我々は造血幹細胞にかなり特異的に働くであろうサイトカインを選んで増幅してみました。ただ、今もお話ししましたように、TPO等は造血幹細胞から巨核球、あるいは血小板の活性化にまで作用するという、非常にブロードな作用を持っていますので、そういった作用を持ったサイトカインを使っていくことも、今後はきちんと検証されていかなければいけないのかもしれない。

【司会】神戸会場で、また1つ質問があります。コロラド大学の試み等は辻先生もご講演の中で触れられましたが、質問は海外での造血幹細胞増幅研究の現状です。

（質問）先生方のグループが世界のトップランナーとしてご活躍されているのは、皆さんもおそらく理解されていると思いますが、どんな研究の現状になっているのかを、もう少しいくつかのグループも含めてお教えいただけますでしょうか。

【辻】今もお話ししましたように、コロラド大学はSCFとTPOとG-CSFとエリスロポエチンを使った組み合わせで、造血幹細胞の増幅を行って、実際、臍帯血を使いました。ただ、今の時点で安全性が一番心配なのは、本当は造血幹細胞が全く増幅していないことです。すべての造血幹細胞を培養して移植したら造血幹細胞は全くなくて、患者さんが亡くなってしまった等ということは、まちがってもあってはいけないことです。ですので、彼らのグループは臍帯血の60%はそのまま移植して、残りの40%を、今お話ししたサイトカインの組み合わせで増幅した後に移植しています。そのことによって、少なくとも安全性には問題なかったとは言えるのですが、そういった増幅された細胞が移植されることによって、造血幹細胞の造血の回復が早まったかということに関しては、今のところ、必ずしも芳しい報告はされていません。

私の話でもありましたし、加藤先生もご指摘のとおり、増幅細胞の5倍あるいは数倍の増幅は可能ですが、100倍、1,000倍という増幅をするときには、今の我々が持っているような戦略では実現されず、例えば、胎生期造血のような*in vivo*の造血幹細胞の増殖系をもっと確実に再現してやる必要があるのではないかと。そういうことで、おそらくストローマを使った増幅法等を、かなりの先生方が研究されていると思います。

ただ、ヒトのいいストローマがなかなかないことが一番の問題点で、中には異種のストローマを用いた増幅法等も検討されています。異種のストローマを使うことに関しては、おそらく議論のあるところだらうと思います。より高い安全性を求めていくなれば、できることなら、そういったストローマから造血幹細胞の増幅を担っている分子を同定して、そのヒトのホモロークを取って、ヒトの造血幹細胞増幅因子を見つける。それが、少し遠回りかもしれませんが、一番確実な戦略ではな

いかと思いますし、おそらくそういった戦略を、多くの先生方が考えているのではないかと思います。

【司会】ありがとうございました。名古屋会場で質問があるようです。名古屋会場どうぞ。

【名古屋会場】名古屋会場です。匿名でお一人質問がございます。私が代わりに質問させていただきます。

(質問) ヒト及びラットの骨髓ストローマ細胞のCDカルチャーでの増幅実験を行ったことはありますか。

【辻】 ラットについては私は全くわかりません。ヒトについては、いわゆる造血幹細胞の増幅についてはきちんと検討したことはありませんが、LTC-ICアッセイは、ある意味ではコロニー形成細胞の増幅を、8週間目まで追いかけていると考えることができるかもしれません。そうしますと、ヒトのストローマ細胞を使った、共培養系でも、8週間培養し続けると、コロニー形成細胞は実際残っているのですが、その数が少なくなってきましたし、一個一個のコロニーの大きさが小さくなってきます。

もっといろいろなストローマを作って、いろいろな細胞株を樹立して検討してみれば、また違った結果になるのかもしれませんが、しかし少なくとも、通常のヒトの骨髓細胞からプライマリーにストローマを通常の方法で作って、造血幹細胞と共培養をしても、8週間しますとコロニー形成細胞では、その能力はずいぶん減衰しているように思います。もちろん、これはきちんとNOD/SCIDマウスを使って検証されなければいけないことですが、少なくとも今我々が手にしているような単純なストローマの形成法では、我々が目的とするヒトのストローマ細胞を培養することは、なかなか困難なのかもしれないと思います。

【司会】 神戸会場から、もう1つだけお伺いしたいと思います。これは本日講師の服部先生の方からのご質問です。

【服部】 皆様ご存じのとおり、実際の臨床では、G-CSFというのは造血幹細胞の動員に使われてい

ることになるのですが、先生のお話ですと、stem cell factorというのがIL-6その他のキーファクターで、そういったものが実際にはstemで作用していて、私の考えでは、おそらくG-CSFは、前駆細胞等の分化増殖にかかわっている因子だととらえたいと思うのです。ただ、やはり造血幹細胞自体の動員に、G-CSFはかなり使われているもので、そのあたりの役割とか位置づけを説明していただければと思います。

【辻】 それは私よりも服部先生がよくご存じなのかもしれないませんが、例えばG-CSFのレセプターの発現をヒト造血前駆細胞レベルで検討してみますと、私たちのデータではまちがいでなく、ミエロイド系の前駆細胞が、特異的にといていいと思いますが、発現しています。逆に、赤血球系の前駆細胞や混合コロニー、多能性の造血前駆細胞等にはほとんど発現されていません。それにもかかわらず、G-CSFを投与することによって末梢血中には、赤血球系の前駆細胞も出てまいりますし、多能性の前駆細胞も出てきますし、もちろんヒト造血幹細胞も動員されてくるわけです。

そういうことを考えますと、服部先生の前でこの考えを述べることは、なかなか恐縮なのですが、むしろG-CSFは造血幹細胞といった細胞をターゲットとして、ダイレクトにmobilizationを起こしているのではなくて、むしろストローマ側に働いて、そういった接着分子の発現とかいろいろな分子の発現をモジュレートする。それによって、造血幹細胞を含めたいろいろな造血細胞が、骨髓から末梢血にリリースされやすいような状況を作っているのではないかと私は考えていますが、あとの服部先生のご講演で否定されるかもしれません。

【司会】 ありがとうございました。まだまだご質問はあるかと思いますが、時間になりましたので、このあたりで質疑応答を締めさせていただきますと思います。辻先生には長いお時間、質疑応答、またすばらしい講演をいただきましてありがとうございました。(拍手)

【後日ご回答をいただいた質問】

【質問】 造血幹細胞移植方法としては、自己複製能を有するより未分化な幹細胞を増殖させて移植、あるいはそこから目的とする前駆細胞まで分化させた後に移植を行うことができれば、より合目的性のある移植が行えると考えますが、こういった考え方は問題があるのでしょうか。また、この方向性に対する戦略は研究されているのでしょうか。

【回答】 ご質問の意味を取り違えておりましたら、お許し下さい。

造血幹細胞移植におきましては、自己複製能を有する造血幹細胞を移植しないかぎり、最終的に造血の再構築をすることはできません。この造血幹細胞をその自己複製能を維持しつつ増殖させることが、私達が目指している造血幹細胞の体外増幅に他なりません。ご指摘のように、実際の移植におきましては、移植後から移植された造血幹細胞が造血に貢献し始めるまでの期間の造血は、造血前駆細胞が担っていると考えられますが、私達の方法も含めまして、これまでに報告されている造血幹細胞の体外増幅法のほとんどで、造血幹細胞ばかりでなく、造血前駆細胞も増幅されております。

【質問】 (AGM-S3のmitomycinC処理)+(3 cytokines)によってAGM-S3の幹細胞支持能は置き換えられるのでしょうか。

【回答】 残念ながら、そういった実験はやっておりません。ただ、非常に興味深い実験ですので、今後検討させていただきたいと思います。

【質問】 ヒトゲノムがすべてOPENになったことにより、新しい増殖因子候補がでてきているのでしょうか。

【回答】 まだそういったことではっきりした報告はないと思いますが、新規の増殖因子が見つかる可能性はあるのではないかと、個人的には考えています。

【質問】 臍帯血に通常出現する細胞の種類について、CD34 + 細胞より分化する細胞以外に他にあるのでしょうか。

【回答】 CD34 + 細胞分画に含まれる細胞は、造血系への分化能を有する細胞のみから成るのではないと考えられます。実際私達の研究結果からも、臍帯血CD34 + 細胞から血管内皮細胞ができてきますし、間質系幹細胞も培養することができます。従って、CD34 + 細胞に由来するか否かはまだ問題がありますが、臍帯血中には、造血系の細胞ばかりでなく、血管内皮細胞や骨細胞、軟骨細胞、筋肉細胞等間質系の細胞の幹細胞/前駆細胞が存在することは間違いなだらうと思います。さらには、おそらく臍帯血中には、CD34 + 細胞よりも未分化な、より広範な多分化能を有する細胞も存在するだらうと推測されます。