

第25回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

2. 造血と血管新生の関連

須田 年生

【司会 (池田)】神戸会場からのご質問です。

(質問) 末梢血中のside populationの細胞はFACSを使って解析可能でしょうか。そして、骨髄及び末梢血では何%程度がside population cellといえるのでしょうか。

【須田】まだ、我々は末梢血のside populationを見ていないのですが、通常考えますと、骨髄でも0.1%以下です。G-CSFその他のimmobilizationをかけない末梢血ですと、その100分の1ぐらいですから、side populationが見えるかどうかはわかりません。臍帯血で見ますと、side populationは非常にきれいに見えてきます。

このside populationの研究のやや難しいところは、もしかすると胎生期には細胞のくみ出し蛋白等の質が違うのかもしれませんが、ややside populationが多く染まることです。もう1つ、培養細胞も予測よりは多く染まってきます。それは今後もう少し解析しなければいけないのですが、1つはベラパミールという、くみ出しを止める分子を入れまして、side populationが消えていく。そういうことで、自分たちの見ている集団は本当にside populationだということの一つの証拠にしています。

そういうまだ確立していない段階ですが、試験管の中でもストローマ細胞を使いますと、このside populationをある程度維持することができます。しかしSCF, IL-6等のsolubleなファクターだけでは、1週間ほどするとどんどんside populationを失っていく、c-Kit陽性細胞を失っていくという結果を得ています。

【司会】先程、先生のお話の中で、静止期にあるside populationが、いわゆるhematopoietic stem cellの方に、セルサイクルに入っていく。逆に、アクティブなセルサイクルにある細胞が戻る可能性も十分にあるとおっしゃいましたが、その逆の方の実際的な証明のデータというのは何かございますか。

【須田】それは今やっている最中ですが、実験として

は、main populationの幹細胞をラベルすることはできますので、そういう細胞を多数入れて、1か月、2か月经ったときに、その標識した細胞がSPのフラクションの方にあるということをお願いしたいのです。ただ、MPからSPにどれくらい戻っていくのか。意外とその割合は小さいかもしれないので、検出をどうするかが問題だと思っています。私たちは非常に大事なことだと思っています。マウスにおける骨髄移植実験でも、1か月後にはside populationがなくて、3か月後にはまたside populationが出てくるのですから、どこからかというより、むしろmain populationから補給されたとか考えようがありません。ですから、そこをやっていきたいと思っています。

【司会】東京会場の加藤先生、いかがでしょうか。こちらでご質問はありますか。

【東京会場・加藤】私から質問させていただきます。

今の質問と、ほとんど同じことになってしまいましたが、臨床でCD34+細胞の移植をして、その患者さんたちをずっと追いかけていきますと、CD34-の分画がなかなか出てこないことを実際に観察してきています。main populationだけを移植していったときに、side populationの割合がどれくらい戻るのがかというのは非常に興味があると思うのです。

ですから、今後、SP単独の移植、MP単独の移植、それをしたあとのカイネティクスの研究、それから、それをさらにsecond transplantしたときにどうなるか。そういったことを、ぜひ教えていただければと思います。もし何か一部分でも、すでにおわかりになっておられる点がありましたら、まずそこから教えていただければと思います。

【須田】今、準備的に持っているデータは、side populationの細胞ですと、本当に10個とか40個ぐらいのレベルで十分移植可能なのです。しかし、main populationの部分の幹細胞は、まだ長期に見ていないのでわかりませんが、どうも長く造血を

維持できないのではないかと考えています。ただ、先程の質問にもありましたが、全然できないのではなくて、その一部がまたSPに戻っていくはずですから、厳密に数の検討をしなくては行けないと考えています。

【東京会場・加藤】もう1つよろしいでしょうか。各組織には、それぞれのstem cellがあるということ、先生は冒頭でお話しされました。そして、それぞれのstem cellの違いあるいは共通点を今、説明しておられる最中だと思います。

私たちがこれまでいろいろなことで学んできたものに、例えば放射線感受性が組織ごとに違う。実際に患者さんに全身放射線照射をしますと、造血能が失われるけれども、ほかの多くの細胞、多くの組織は生き続けるわけです。それであれば、各組織にあるstem cellは、radiationの感受性に当然違いがあると思います。今、組織間で筋肉の細胞は、あるときは神経になるとか、そういう相互変換ということがいわれていますが、stem cellレベルでそのような性格が、どのようにスイッチされていくのか。例えばradiationに対する感受性だけでも結構ですが、そのあたりはどのようにわかっているのでしょうか。

【須田】確かにstem cellレベルで、幹細胞の放射線感受性は大きく違うと思います。例えば骨髄移植におきましても、マウスの系等ですと、通常の9グレイぐらいの放射線照射で、骨髄系及びB細胞は完全に消えてしましますが、T細胞は非常にレジスタントな細胞がある。そういうことから、先生がおっしゃったように、やはりセル・サイクリングしている細胞は比較的、感受性が高く、dormantな幹細胞を持つ組織は何とか生き残れるのではないかと考えています。

幹細胞はこういうSP等で検出できるようになって、共通ではないかといわれますが、例えば神経幹細胞と造血幹細胞に、同じようにいろいろな条件を与えると、神経幹細胞からも血液細胞ができるし、血液幹細胞からも神経ができるという点では、両方とも多分化能を持つという点で同じことになるのですが、その割合が違う。主には、神経幹細胞は神経になるし、血液幹細胞は血液になる。

スライドで示しましたが、丸の重なり合いは、やはり幹細胞によってそれぞれ違うのではないかと考えています。

では、それが何によって違うのかは、たぶん内的プログラムの違いで、それをまた外からの因子によって分化・転換させていくことが本当に可能なかどうかは、次のおもしろい課題だと思っています。

【司会】神戸会場で1つ質問があります。須田先生のお話でも、造血幹細胞を考えたときには特別な環境、ニッチという一番いい場所が大事で、これは幹細胞一般にいえることだと伺ったわけですが、それに関連したご質問だと思います。

（質問）発生学的にみて、造血の場が血島といわれているところから肝臓、脾臓に移って、最終的に骨髄になってまいります。造血幹細胞が造血の場を移して、それぞれ移っていく。その移動していくことについて、環境を考えるとどう考えたらいいでしょうか。

【須田】造血の場が、例えば一番最初にyolk sac（卵黄嚢）で始まって、二次造血がAGMで始まりまして、それが胎児の肝臓、骨髄と移っていくわけです。その移るときに、インテグリンあるいはSDFのようなケモカインを使うことがわかってきました。

けれども、例えば肝臓から骨髄へ造血が移っていくのは、ヒトだと胎生7か月ぐらい、マウスでも13～14日目のあたりです。その様を見てみると、そういう接着分子の発現なのか?それとも、肝臓でどんどん肝細胞が増えていって、しっかりとした組織構築をするようになると、そこから物理的に押し出されるように血液細胞が移民となって出されてしまうという感じもします。その逆が、例えば骨髄が大理石病のように、あるいはがんの転移等によって物理的にoccupyされると、今度はまたそこにいた造血幹細胞は移民となって、肝臓や、もと造血していた腎臓、脾臓の方に逃げていきますので、意外とこうした物理的スペースというのは大きいのではないかと考えています。

それをどう解析するかというのはなかなか難しいのですが、やはり肝臓における肝細胞のコード

がしっかり出来上がっていく中で、だんだんシヌソイドが圧迫されて出ていくというものが、大きく効いているのではないかと考えています。

【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。では質問をさせていただきますので、よろしくお願いします。

【質問者】 血管内皮細胞から分泌される接着因子として、von Willebrand 因子が有名ですが、先生の発表されたアンジオポエチン-1とは、性格上どのような差異があるのでしょうか。また、関連は何かありますでしょうか。

【須田】 造血細胞と血管因子ですが、造血細胞でも、特に巨核球・血小板系の表面抗原と、血管内皮細胞の表面抗原の類似性は非常に高く、von Willebrand もそうでしょうし、他にも VCAM-1 等の接着分子もあるのですが、それはたぶん、池田先生がご専門ですが、血管内皮細胞と血小板のインタラクションというところで、十分に機能する分子ではないかと考えています。アンジオポエチン-1というのは、造血細胞においては、最も未分化な幹細胞だけに発現していて、分化が進むとむしろ発現は落ちてきますので、我々はこのアンジオポエチン-1が幹細胞レベルにおいて、自己複製に貢献しているのではないかと仮説を出しています。

【司会】 ニッチのことにこだわるわけではないのですが、ほかの幹細胞、脳の幹細胞なら脳室の近辺にあるということ、その部位がある程度わかってきていると。造血幹細胞は骨髄の中なのですが、どういう環境にあるというふうに存在部位を考えていったらいいのか。それから、ストローマ細胞の重要さは皆さんおっしゃるわけですが、ストローマ細胞でも、幹細胞の維持をする細胞と、そうではない細胞がいくつかあります。そういうことを考えたときに、何かそれに関係するような分子は比較的取りやすいかなという気がしないでもないのですが、いかがなものでしょうか。

【須田】 本当に大事な質問だと思います。骨髄の中は今までやぶの中だったような気がします。最近ようやく固い骨も薄切できるようになってきて、まさにこういう免疫染色、あるいは in situ

hybridizationができるようになると、幹細胞が実際にどこにあるのかがわかってくると思います。シヌソイドという言葉を使っておられましたが、むしろ、小動脈側に近いところに幹細胞があるのではないかとデータもあります。

また、我々はストローマ細胞と言いますが、病理や組織学の方は adventitial reticular cell 等別の呼び方をされて、どの細胞がストローマ細胞にあたるのか、今まで対応がついてきませんでした。しかしやはり幹細胞というのは、おそらくストローマ細胞にかなり強く接着する。培養でも cobble stone というかたちで見られますが、ストローマ細胞の下に潜り込んで、そこであまりサイトカイン等にさらされないでいるのではないかと。

私は幹細胞が潜んでいる場所の共通点としては、神経幹細胞は少し違うのですが、皮膚の場合でも、basement membrane に接着している。あるいは生殖腺でも、精子を作る大本の細胞、精原細胞は精細管の一番外側にあって基底膜にぴたっとついて、中空にあるような細胞は死んでいき、最終的には壁につかないといけない。やはり細胞接着していることが細胞回転をゆっくり回すのにも大事だし、生存することにも大事なのではないかと考えています。

池田先生がご質問になった、本当に骨髄の中のどこに幹細胞があるのか。骨髄は今まで難しかったとしても、fetal liver の肝臓の中でもなかなかはっきりしないのです。形態学者が、ものすごく精密に血球とシヌソイドの関係を研究されているのですが、血球全体を扱っていただいても具合が悪くて、その中の幹細胞、一番未分化の細胞はシヌソイドとどういう関係にあるかというのが非常に大事だと思います。

また、ちょっとよけいなことですが、不思議なことに骨髄や肝臓といった造血する臓器というのはシヌソイド組織を持っていて、穴の開いた血管内皮で、当然それは大動脈や脳動脈の血管内皮と違うわけです。以前、CD34 等の発現をみても、造血組織の血管内皮は意外と CD34 の発現は低くて、大動脈では強いということが分かり、内皮細胞といってもそれぞれの組織によって、全然違うのではないかと今思っています。もちろん、

動脈と静脈でも違いますが、同じ動脈内皮あるいは静脈内皮といっても、造血組織のそういう細胞と管の中の細胞とはまた違うと考えて、実験を進めているところです。

【司会】ということは、具体的に言うと、内皮細胞も内皮細胞のheterogeneityがありますね。研究のしやすさからいって、いつも、例えば臍帯静脈の内皮細胞を使ったり、あるいは取りやすいところの内皮細胞を使って研究するわけですが、スペシフィックなその場所の内皮細胞の性質を、もう少し研究しなければいけないことになるのでしょうか。

【須田】そうです。長澤先生等は、SDF-1というケモカインをノックアウトすると、腸間膜の動脈だけができないというフェノタイプを出されました。それは非常に驚くべきことで、どうしてその血管だけSDFを使っているのか、ケモカインを使っているのかという話になり、まだその機序はわからないと思います。血管のでき方も、それぞれの組織によって違いますね。ですから、先生がおっしゃるように、血管内皮細胞のheterogeneityを十分考えていく必要があると考えています。

【司会】会場の浅野先生から質問がございます。

【浅野】なかなかチャンスがないので、1つだけ聞いておきたいのですが、ニッチとSPとの関係、SPとトランスポーター遺伝子との関係というのは、どのように説明されるでしょうか。

【須田】答えやすい方からで、SPとトランスポーター遺伝子ですが、それは中内先生たちのグループが、BRCP-1も1つのキャンディデートではないかといわれていますが、それだけではないと思うのです。BRCP-1ノックアウトマウスでは、たぶん幹細胞がなくなってしまうことはないと思います。しかもABCトランスポーターというのは幹細胞だけではなくて、NKや赤芽球にも発現していて、どこまで幹細胞特異的かわからないのです。しかし、逆はいえるのです。SPの集団というのはBRCP-1の発現が非常に高いということで、SPがなぜあるかということは、今のところ細胞内に入った分子のくみ出しということで説明できると思います。くみ出す機構というのは、これはこじつけかもしれませんが、幹細胞にいろいろな分子

が入ってきたときに幹細胞を守るため、幹細胞がなくなってしまうと具合が悪いですから、できるだけいらぬものというか、外からきたものをくみ出していくのだと説明する人がいます。

SPとニッチの関係も大事な問題だと思うのですが、先程も言いましたようにSPとMPが移行しうるとすると、MPにもある環境を与えてやるとSPになりやすいのではないかと考えています。あまり言いませんでしたが、今、SPとMPのサブトラクションをやっているのも、SPの方ではインテグリン等の接着因子がいっぱい出ていけば、MPの違いがはっきりしてきます。逆にMPに一生懸命インテグリンを発現させるような環境を与えてやれば、SPになってくれるのではないかと、想像ですが、思っております。

【司会】東京の加藤先生、ご質問はありますでしょうか。

【東京会場・加藤】今日、お話をお伺いしまして、おそらく多くの方々が考えておられることではないかと思って質問させていただきます。

実際にこれから臨床応用に入っていくときに、造血の方はすでに骨髄移植あるいは臍帯血移植として、臨床は確立している方向に行っているわけですが、ほかの臓器、ほかの組織の再生医療を考えると、血管の再生が一番先行するとおっしゃいました。今後、先生のこのご研究は臨床の場にどのような方向で生かされていくのか。あるいは先生の夢で結構なのですが、何かお聞かせいただけますか。

【須田】今、再生医療、再生医学は非常に脚光を浴びていますが、組織によっていろいろなスパンがあると思います。先生がおっしゃったように、もう造血細胞は骨髄移植で再生医療をやっているわけですが、血管や筋肉はたぶんここ4~5年で進んでしまうのではないかと思います。さらに、肝臓の組織を作るということになってくるとだいぶ先で、一番大変なのは腎臓だろうと、腎臓病をやっている人がよくいっています。考えてみたら、腎臓というのは、糸球体と尿管という非常に精緻な組織の組み合わせりですから、そんなものがそう簡単に組織工学的に作れるとも思えません。ですから、やはりいろいろな段階があると思うのです。一番

簡単なのは、血液細胞や膵細胞のように細胞レベルで機能してくれる器官です。造血というのは1個の細胞で機能してくれるから、再生医療も早かったのだと思うのですが、いくつかの組織がきちんと整列してオーガナイズされないと機能しないような肝臓や腎臓になってくると時間がかかると思います。

ですから今、あまりにも再生医学研究が加熱して、明日にもできるような感じでやっていると思いが切れそうなので、やはり10年、20年のスパンで考えるべき課題もあると思っています。

【司会】今の問題に多少関連していると思うのですが、我が国では、これは海外でもそうですが、造血幹細胞を取ってきて、いわゆる血管新生療法、血管新生を促すことが、末梢動脈閉塞の患者さん等にぜひ応用されていると思います。基礎的なデータをいろいろお示ししていただくと、なぜそこだけに行くかということ、なかなか難しい問題もあって、その治療に対して考えておかなければいけないことも、まだあるのではないかと。治療する側はそこだけ見て、そこがよくなればいいと考えるわけですが、先生のお話を伺っていると、もう少したくさんの方のことを考えておかなければいけな

いのではないかと思います。その辺のところを最後にメッセージとして、先生のデータからお願いできますか。

【須田】誘導尋問のようなところがあるのですが、今の再生医療は、体の組織をパーツパーツで見すぎているところがあって、例えばこの具合が悪いから、これに入れ替えましょうという、自動車の部品を替えるような考え方というのは、少し危ないかなと思っています。今日お話ししましたように、造血と血管新生と骨はみんな関連してきますので、ここを入れ替えたなら、次にまたここがおかしくなるということも十分ありえます。組織工学、発生工学の方は、意外とそういうかたちで進んでいます。医学というか生物学は、やはり個体レベルでしっかり見ていきたいと思っています。

【司会】ありがとうございました。締めくくりとして、造血幹細胞が血管内皮細胞を通じて、血管新生、そして臓器形成という、血液学でいえば骨髄という組織がどうしてできるかという、分子基盤も含めて非常に重要な、かつ難しいお話を非常に易しくお話しいただきました。須田先生、本当に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】血管内皮細胞に存在する幹細胞が様々な働きを行っていることは、いい勉強になりました。しかし、一方ではコレステロール等を取り込んだ白血球が血管内皮細胞に入り込み、血管の肥厚化を起し、動脈硬化を起すと言われていました。

このような病的な変化に対して、幹細胞による血管内皮細胞の新生が治療効果をもたらすような可能性はあるのでしょうか。

【回答】内因性の幹細胞だけで血管新生が促進できるか否かは不明ですが、虚血部に造血幹細胞(骨髄細胞)を移植すると血管新生が促進されるという臨床治験があります。

【質問】骨欠損部における骨形成をより促進させるためには、血管新生の点からVEGFやAng-1の他にど

のような成長因子をどのように局所に用いたらよいのでしょうか。

【回答】BMP、FGFなどが考えられますが、欠損部が大きい場合は足場(Scaffold)、骨芽細胞、増殖因子の組み合わせが必要と思われます。

【質問】今後の造血研究に免疫組織化学が果たす役割は残されているのでしょうか。また、注目すべき文献がありましたら併せてご教授ください。

【回答】発表でも述べましたように、これからは、造血の場合あるいは骨髄における造血幹細胞・骨芽細胞・血管内皮細胞の関係が重要になると考えられます。その意味でそれらを同定する免疫組織化学の進歩は今以上に必要となると思います。