

## 第25回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

## 3. 造血幹細胞の動員とその機序

服部 浩一

【司会 (池田)】会場の齋藤先生から質問をお願いします。

【齋藤】大変おもしろい話ですが、例えばG-CSFを打って造血幹細胞を抹消血に動員するというのは、かなり例外的なことで、正常の造血においては、そもそも造血幹細胞の一部が末梢血に行くとは、どういう意味でしょうか。要するに、造血の主な場所は当然骨髄ですから、たまたまはぐれていくにすぎないのか、あるいは何かそういう意味があるのかというのが1点です。

2点目は、今のMMP-9の話ですが、むしろ5-FUとかそういうときに、先程かなりノックアウトマウスでは下がりましたよね。ですから、MMP-9は造血幹細胞のみならず、マチュアな白血球とかいろいろなものが出てくるときに重要な役割という、そういう理解のしかたでいいわけですね。

【服部】最初の質問からですが、骨髄からstem細胞が末梢の方へ出てきている理由について、もちろん推測の域は脱していないのですが、私の実験の中で1つありましたが、骨髄の細胞がいろいろな組織に変わっていくという見方が最近出てきていることがあると思うのです。そういったことから考えますと、例えば骨髄から出ていった、いわゆるstemはまだどういうものかわかりません。けれども、このstemがどこかへ行って、その組織を再構築したり補ったりしていくことから考えますと、こういう現象がリーズナブルなのではないかと考えております。

もう1点はMMP-9について、白血球やマクロファージは、確かに産生して中に入っていくときに活性化が上がることは私も説明しました。ただ、いくつかの報告によりますと、ほかの細胞が血管内に入っていくときに、こうした細胞がいろいろな相互作用を経て、MMPを供給してやる。そういう供給された酵素が、こうした細胞の動員に役をなしているのではないかと、ということはいわれています。

【司会】よろしいでしょうか。神戸会場で質問が1つあります。

(質問) かつて5-FUの投与に従って、ヘモグロビンFが増加するというペーパーを読んだことがありますが、このことと造血幹細胞に働くサイトカインとは何か関係がありますでしょうか。

【服部】ヘモグロビンFということは、つまりimmatureなヘモグロビンが出てくるということです。実は1つ申し上げなければいけないのは、この実験では5-FUを使用して、MMPのアクティビティが上がることは申し上げたのです。では、5-FUを打ち込んだときに、例えばサイトキサンとか、ほかのケア、ケモセラピーで行っているような薬を投与して、末梢血中に細胞が動員できたかということ、マウスでは正直いうとまだそういうデータを得ることができなかったのです。

ですから、今の段階で私がはっきりしたことを言うことはできませんが、ただ1つ言えることは、5-FUを打つことによって、そういったstemやimmatureな細胞が末梢に出てきたり、G-CSFを使ってそういうものが出てきたりする。そういったことの説明として、先程のKit-ligandの系が使えるのではないかと、ということには推測できます。

ただ、ヘモグロビンFが直接それと関係があるかどうかについては、今ははっきり申し上げることはできません。

【司会】それでは東京会場に聞いてみたいと思います。東京の加藤先生、いかがでしょうか。

【東京会場・加藤】私から2つほどお伺いしたいと思います。

抄録にも書いておられますが、今の末梢血への幹細胞の動員の方法、これを改良するために、いろいろなご研究の成果を生かしていくというふうに考えておられると思うのです。具体的に今のG-CSFによる動員のほかに、先生のご研究の中から今後有望な方法としては、どういうものを考えていらっしゃるのか。あるいは、そのようなものが

本当に安全なのかどうかについて、いろいろ多面的な作用を持っていることもみんなわかっているわけです。その点についてのご考察はいかがでしょうか。

**【服部】**まず、今日申し上げた中で、いくつか新しい因子について話をしたかと思えます。Papayannopoulouのグループがやっていると言いました、抗VLF抗体や抗VCAM抗体を使う。これに関して、ちょっと話が前後するのですが、今、G-CSFを用いて非常にアメリカでもたまに問題となるのは、G-CSFはどうしても使いすぎますと、オーバーシュートを起こしたりして、白血球やいろいろなところに浸潤してきたり、そういった副作用を起こしたりすることがある。そういった意味では、移動だけを司るこういった因子は、あまり増えすぎたりすることが少ないことが、今研究している人たちの間での統一した意見なのです。

VLF抗体やVCAM抗体を使うことに関しては、わりとマウスやサルデータでは、非常にリーズナブルなデータが出ているのです。ただ、抗体を使うということは、それなりに蛋白を人間に打つということがありますので、その点が非常に気になるところです。けれども、今、血液の分野ではCD20の抗体だとか、抗体療法が花盛りなので、わりとアメリカでは、抗体に対する危惧感が薄れており、そういった意味でPapayannopoulouのグループは進めているといえると思えます。

もう一つはケモカイン、SDF-1等、こうした因子のことについていなければいけないのは、SDF-1を使うとどういうことが起きるかということ、確かに白血球等が増えて、移動はするのです。そうすると、そのあとどうなるのかということがあります。

私の経験上でも、SDF-1を、ある程度の投与量では問題ないのですが、ある程度以上のドースを使いますと、90日後とか100日後に骨髄を見ますと、骨髄がすっからかんとまではいかないのですが、myelofibrosis（骨髄繊維化）のような状況を呈していることがあります。これはいってみれば、移動した細胞の補充が利かなかつたのではないかという見方をしている人もいました。ちょっとそ

ういうことがあります。

というのは、SDF-1といったものは、増殖や分化にあまり効果をあげないということがあります。そうしますと、そのあとの補充が骨髄の中で利かないということで、移動だけを司ることは、そういう危険性があるといえると思えます。

**【司会】**よろしいでしょうか。

**【東京会場・加藤】**ありがとうございます。もう一つお伺いしたいと思います。途中の話で、移植モデルの中で癌細胞のendothelial cellが、ドナー由来の骨髄からの細胞で置き換わっているというお話があったかと思うのです。同じことは、ほかのinjuryを受けた組織においても起こっているのかどうか。それから、ヒトにおいて実際の臨床の中で、そういう血管内皮細胞がドナーのもので置き換わっているという証明は、どれぐらいなされているのでしょうか。

**【服部】**それは移植した腫瘍組織の中の、内皮細胞が入れ替わっているという実験の話でしょうか。

**【東京会場・加藤】**はい、そうです。

**【服部】**我々の間では今のところ、ヒトのデータは、この間やっとこのデータを出せたという状況で、これからそういうことはやっていかなければいけないと思っているところなのです。先程、講演の中でもちょっと話をしたのですが、1つ我々が注目しているのは、骨髄移植をすることが、腫瘍の増殖に、ことによるとそれを補助している可能性がある。そこでまた白血球をどんどん増やしたり、増進させることが、いってみれば腫瘍の育成、血管内皮細胞によって血管ができてくるという過程をプロモートしているのではないかということが考えられてくるわけです。

その部分が今一番我々が注目して、今後、骨髄中のstem cellが腫瘍に与える影響を調べていこうと考えているのが今の焦点です。ヒトの組織でそういったことがいえるかどうかについては、まだ調べている段階といえます。

**【司会】**よろしいですか。

**【東京会場・加藤】**ありがとうございました。お尋ねしたことは、今後再生医療というようなことで、ほかの種々の組織についても、同様のことを考え

ていかなければいけないかと思いましたが、その知見がこれから大きく得られていくように、そういう希望を兼ねての質問でした。どうもありがとうございました。

**【服部】**ありがとうございました。

**【司会】**私から、非常にシンプルな質問というか、素人っぽくて恐縮なのですが質問があります。

現在、造血幹細胞の動員の機序ということで、ケモカイン、サイトカイン、あるいはMMP, adhesion molecules (接着分子)というキープレーヤーをお話しになったわけです。造血幹細胞を逆に移植する場合の engraftment という逆のプロセスを考えたとき、それらのキープレーヤーはどれぐらい共通のキープレーヤーであるのか。あるいは、全く別の機序を考えなければいけないのかということですが、何かお考えはございますか。

**【服部】**実は、池田先生のおっしゃったお話は非常に重要な点で、今日はこういうセミナーということでしたので、話をわりと簡単にするためにそちらの話はあえてしなかったのです。というのは、先程の私の話というのは造血幹細胞が遊離するところに焦点を絞ったのですが、骨髄移植の場合は確かに定着しなければいけない、生着しなければいけないわけです。そういった観点で見ますと、遊離ばかりを強調することは、定着を阻害する可能性があるわけです。

ただ、SDF-1等のデータを例に取りますと、今日は講演の中では言いませんでしたが、VLA-4やLFA-1といった接着分子のアップレギュレートをするというデータがあります。冊子の中等では言っているのですが、Weizmann研究所のLapidot等は、むしろ骨髄移植の生着に、SDF-1は重要なのではないかと述べています。

そのことは、造血の場が移るときにSDF-1が重要なのではないかという話もしましたが、このときもやはり造血の場が移った以上は、定着しなければいけないということがあります。そういうことから考えると、SDF-1が細胞動員を誘導することは、ちょっと相反するところがあるのです。

私達が考えている1つの仮説としては、濃度勾配が生じることによって、ときとして細胞がそち

らへ移って造血の場が移ったり、細胞が骨髄の方へ行ってくれる。こういったことが起きてくれば、そのときに応じてその濃度勾配が変わってくれば、ことによると造血細胞の移動がスムーズに行われていくことになるのです。ことによると、そういったものが動員 (mobilization) と定着と生着 (homing) を、うまくレギュレートしているのかもしれない。ですが、ちょっと今の時点では確かに矛盾する部分が残っていることは事実です。

**【司会】**神戸会場で質問があります。

**【質問者】**骨髄の微小環境のときに osteoblastic zone と vascular zone というふうに分けられましたが、もう少し詳しく説明してほしいというのが1つです。

もう1つは、MMPは当然血管のリモデリングにも利いていますよね。そうすると、MMP-9ノックアウトマウスは、こういう5-FU等で処置したあと、先生の組織を例えばPCAM等で染めたときに、骨髄内の血管がおかしいとか、そういうことはないのでしょうか。その2点についてお願いします。

**【服部】**まず、あとの方の質問に答えさせていただきます。一応、MMP-9の骨髄組織を見たかぎりでは、はっきりとした血管構造自体に異常は認められなかったのですが、このマウスは、ちょっとこれは研究を実際進めているわけではないので、実は私は同じ研究室のDr. Rafiiの方に、これはおもしろいのではないかという話をしているのです。どうも出血傾向というか、組織がやられたとき非常に出血して、それがなかなか止まらないというような現象があります。ことによるとそういったことで、損傷された組織の修復が非常に阻害されている可能性はあります。それはもしかすると、リモデリングに関与してきているのかもしれない。まだ、これは推測の段階を出ないのですが。

それから最初のニッチ (niche) という話なのですが、これはあくまで、まだ我々の概念としてとらえているのです。先程の組織を見たとき、骨髄の骨の部分に近い部分から細胞がわっと出てきて、そこで増えた細胞が徐々に血管周囲、先程出した図でいきますと、ちょうど中の方の部分、血管周囲に向かって移っていくことが組織からつかめます。

MMP-9は、どうも移動が阻害されているというか、遅いということをお話しました。ニッチというふうにとらえているのは、どうも骨に近い部分ですね。正直言いますと、先程、僕が須田先生に質問したかったのは骨芽細胞の役割についてですが、骨芽細胞がどうもある種のサイトカイン等を出して、hematopoietic stem cell (造血幹細胞)とか、そういったものを増やしているのではないかという見方があります。

そういう点から考えると、先生が先程おっしゃった、何かに付着しているというのが、こういう細胞に、ことによると付着している可能性がある。その部分を僕らは一応ニッチではないかと、まだそういうことを考えているということです。

**【司会】** 東京会場で質問があるようです。

**【質問】** ヒトの造血幹細胞、骨髄はCD34+であると理解しておりますが、CD34-の造血幹細胞は存在するのでしょうか。もし存在するのであれば、陽性と陰性とのキャラクターの違いはどのようなもののでしょうか。また、サイトカインあるいはケモカインの作用の受け方に、両者にどのような差があるのでしょうか。

**【東京会場・加藤】** これは服部先生及び須田先生、辻先生、それぞれお答えがあろうかと思いますが、服部先生へのご質問です。

**【服部】** 2つ目のご質問ですが、先程ちょっと講演の中で申し上げたのですが、要するにhematopoietic、造血幹細胞の定義というか、概念がどういうものかにかかわってくる問題ですので、非常に答えにくいことは事実なのです。

今のところ、臨床等の段階で、ヒトに関してはCD34+細胞を利用して、そこに造血幹細胞があると考えてやっているのです。しかし、おっしゃるとおり、あるグループはCD34-の分画にむしろヒューマンの幹細胞があって、CD34-の細胞がいずれは陽性の細胞に向かっていくのだ、変わっていくのだということが1ついわれています。実際そういうペーパーにもなって出ているデータもあるのです。

先程、須田先生がおっしゃったSP細胞との連関をして、CD34-のSPこそがstemだと言っている

方もいます。その一方で、ネガティブのものがstemだというのは、むしろそれはCD34がcontaminateしているのだとか、そういう言い方をして、それは違うといっているところがある。両者の意見がいまだにある、ということが正直なところではあります。

その意味では、もちろんCD34-に、多くの分化してきた細胞が含まれているのも事実なのですが、今のところCD34+細胞がstemではないかといわれているところまでしか、私の方でも答えることができません。むしろそちらの方をやっていらっしゃる方に……。それぐらいこの問題は非常に微妙で、今もその論争が続いているといった方がいいと思います。そう考えますと、私がやった実験、あるいはほかから報告されている実験も、ヒトに関してはCD34+細胞ということで造血幹細胞と。それに対して実験を進めているケースが多いものですから、これをCD34-の細胞と比較するところまでは、まだケモカイン、サイトカインレベルでの実験は行われていないことが多いと思います。今のところ、そういう段階ではないかと思うのですが、いかがでしょうか。

**【東京会場・加藤】** おそらくCD34-の分画の中に、stem cellがあることはかなりの事実から間違いのないと思うのですが、陰性という、ネガティブマーカーの中で論じているので、やはりその中にポジティブマーカーを今後見つけていかないと、今の議論、研究というのは詰めていけないのではないかと、私自身思います。

**【司会】** G-CSFを投与して末梢血に動員するときに、数日、ピークに時間がかかりますね。4~5日かかって、非常によくエンリッチされる、末梢血に動員される、時間がかかりますね。それから、先生がSCIDでやられたSDFにしるVEGFのアデノウイルスに組み込んだものも、やはり同じぐらいのタイムコースになっています。その辺、時間がかかるというのは、G-CSFの場合と、SDF、VEGFの場合と少し機序が違うので、同じだというのが何となく、なぜ同じぐらいの時間がかかるのかなという気がするのですが、その辺は何か理由があるのでしょうか。

**【服部】**ただ、いちがいにそれを、私がやった実験と比較するのは難しいと思います。1つ言えますのは、多くのマウスでやったものは、アデノウィルス・ベクターでSDFを発現させるという実験です。そういう意味では、静注してそれで到達して発現するという過程と、G-CSFに関しては、私がやった実験でもsubcutaneous（皮下）に注射して、それが徐々に出てくるということで、やはり投与方法によっても多少違いが出てくる可能性もあります。そういう意味では、しっかりした比較をするうえでは、両方ともアデノウィルス、または両方ともリコンビナントでやる必要があります。もう1つ、では、なぜリコンビナントを打つ方が将来的には有用なデータになるのに、しなかったのかといいますと、実はSDF-1は、リコンビナントを打ってみたのですが、なかなか投与した量に応じて、濃度が上がってくれないということがありました。もう1つは経済的な理由で、サイトカインが非常に高いということで、初めにかかりの量を打って、うまくいかなかったのでやめたのです。

しかし、ことによると、やはりアデノウィルスを使ったということで、濃度が継続的に維持され、しかもある程度の量を長い間維持できる。こういうことが実験のデータを作るうえでは結構大事だったのかもしれない。

**【司会】**東京会場で質問があるようです。

**（質問）**末梢血幹細胞が血管を通過する際に、MMP-9が関与しているということですが、それ以外のメカニズムはありますか。

また、MMP-9で分解したあとの修復機構で、わかっていることがあれば教えてください。

**【服部】**MMP-9以外の血管、1つはそれを考えますと、先程の血管内皮細胞どうしが結び付いている機構がありますね。接着分子というもので、PCAMといったもののこともちょっと考えなければいけなくなってくると思うのです。

MMP-9で破壊して中に入って行く以外のやり方としては、血管内皮細胞同士がここで結び付いている部分に入って行くときに、PCAMといったものを使って、間にあるものを壊して入っていくのではなく、その間を開いて入っていく方法があるのではないかとっている人がいます。

それから、もう1つは修復のメカニズムでしたが、これに関しては今のところ研究中と申し上げるしかありません。

**【司会】**よろしいですか。まだご質問もあろうかと思いますが、時間になりましたのでこの辺で服部先生のご講演ならびに質疑応答を終わらせていただきますと思います。服部先生、どうも長い時間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】**今後の医療社会の中で、治療医学（再生・移植医療を含む）と予防医学の割合はどうなるのでしょうか。

**【回答】**医療の今後と言うべきかなり重要かつ大きな問題です。私見としましては、最近の医学研究の動向や欧米の臨床研究等を考慮しますと、造血幹細胞を応用した医療は悪性腫瘍（癌）に対する化学療法のみならず、心筋梗塞等の動脈硬化性疾患、神経変性疾患等にも大幅に適応拡大される可能性が出てきており、こういった意味では再生、移植医療の担う比重は今後急速に拡大するべきでしょう。

予防医学についても、ヒトの遺伝子解析技術は、現在、猛烈な勢いで進んでおり、近い将来個人々々がある種の疾患の発生を予見し、これに対策を立てることも可能になるとの予見があり、これに加えて新しい予防法も開発されることになるでしょう。いずれは、遺伝子レベルでこうした疾患の発生を制御することも可能となるかもしれません。再生・移植医療の一層の普及は急務とも言えますが、長期的には予防医学の比重が徐々に増えてくることは想像するのに難しくありません。

**【質問】**基底膜の透過性が亢進するというのは程度にもよると思いますが、一般的に、そこにあった接

着因子の立体構造がダイナミックに変化して穴があくのでしょうか。それとも、破壊されてしまうのでしょうか。

**【回答】**講演内でも触れました通り、現象として血管透過性を亢進する因子は、既にいくつも知られております。しかしながら、今回のご質問の主旨としましては、この血管透過性の亢進が分子レベルでどのような機序で起きているかということだと思えます。現在の処、血管透過性の亢進を司るシグナルについて不明な点が多く、血管内皮細胞の特殊な小胞構造による輸送系の問題なのか、あるいは細胞骨格系や細胞間接着装置の一時的な『解離』

の問題なのか結論はまだ出ていません。講演中の質問にもありましたが、メタロプロテナーゼによる『基底膜破壊』の修復のメカニズムと同様、今後の研究成果が待たれる処です。

近年の報告の中には、血管内皮細胞相互の接着分子の一つの「クローディン」という因子が血管透過性を制御しているとする説があり、この因子の発現を調節することで透過性を人為的に操作しようとする試みがありますが、VEGF等他の血管透過性亢進因子との相互作用等については、不明な点が多く我々も研究を進めている状況です。