

研究成果

サブテーマ名：CPC（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究 小テーマ名：造血幹細胞の増幅と造血幹細胞の特性についての解析
テマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、金倉 譲 研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、松村 到 (財)先端医療振興財団、主任研究員、田中 宏和
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要 造血幹細胞は全ての血液細胞を産生しうる最も未分化な造血細胞であり、血液悪性腫瘍などに対する移植療法に利用されているだけでなく、近年ではその可塑性を利用した再生医療への応用が期待されている。臍帯血中には末梢血や骨髄中と比較してより多くの造血幹細胞が含まれることが知られているが、成人を対象とした移植療法に用いる十分な量を得ることは困難である。本研究は、マウス及びヒト造血幹細胞の自己複製機構を解析することにより、分子基盤に基づいた造血幹細胞の効率の良いかつ安全な増幅技術の開発を目的とし、体外増幅した臍帯血造血幹/前駆細胞を用いた臨床研究への応用を目指すものである。
②研究の独自性・新規性 造血幹細胞の体外増幅方法として外的及び内的因子操作法が挙げられる。外的因子操作法においては、造血幹細胞上に発現している受容体の解析から、体外増幅に有用な種々サイトカインの組み合わせが検討され、ある程度一定の見解が得られている。一方、造血幹細胞の自己複製に関与する様々な内的因子すなわち転写因子、細胞内シグナル伝達分子が同定され、外的因子操作と併用することによる応用が期待されているが、それら因子の作用機構に関しては未だ不明な点が多い。またこれまでの造血幹細胞の体外増幅における内的因子操作は、レトロウイルスやアデノウイルスを用いた遺伝子導入法が中心であり、造血幹細胞への導入効率が低いことや白血病の発症など染色体レベルでの影響が不可避である。また、遺伝子産物であるタンパク質を直接導入する方法が試みられているが、活性を有する立体構造の解析を要するなど、現在の内的因子操作法では効能、安全性の面で解決すべき問題も多い。
③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ I：造血幹細胞の自己複製に関与する種々転写因子群の下流において機能する分子の同定を目指す。 ・フェーズ II：合成ペプチド導入による新たな内的因子操作法を開発し、より効率の良いかつ安全な造血幹細胞の体外増幅法への応用を目指す。
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して） <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ I：マウス骨髄由来の造血幹/前駆細胞に既知の自己複製因子を導入、その増幅機構についての解析を行った。また内的因子操作前後における活性酸素種の細胞内蓄積の観点から、増幅造血幹/前駆細胞の特性について解析を行った。 ・フェーズ II：造血細胞の増殖、分化に重要な HOX 転写因子群の活性を操作しうる HOX タンパクの decoy ペプチドを設計、合成し、ヒト臍帯血由来の造血幹/前駆細胞に導入することにより、自己複製能、多分化能に及ぼす影響について解析を行った。
主な成果 具体的な成果内容： <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ I;造血幹細胞における HOXB4 や Notch など既知の因子による自己複製は、主として c-Myc、

E2F1などの細胞周期制御因子により制御されており、これら細胞周期制御因子を誘導的に発現させることで、骨髄再構築能を有する幹細胞クローンの増幅が得られた。また c-Myc、E2F1 を誘導的に発現させることにより増幅させた細胞には、細胞内活性酸素種の蓄積が認められアポトーシスの感受性が亢進していることが明らかとなった。

・フェーズⅡ：HOX タンパクの decoy ペプチドが HOX/PBX1 複合体の活性を変化させることにより、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の自己複製を亢進させ、一週間の培養により約2倍骨髄再構築能を有する細胞を増幅し得ることを明らかにした。

特許件数：出願1

論文数：6

口頭発表件数：6

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

これまで外的及び内的因子操作によるマウス、ヒト造血幹細胞の ex vivo 増幅が試みられてきたが、自己複製の分子機構は未だ不明な点が多い、今回細胞増殖において普遍的な機構である細胞周期制御を操作することによって、幹細胞クローンの増幅が得られたことは、造血幹細胞の増幅においても c-Myc、E2F1 などの細胞周期制御因子が強く関与していることを示唆していると考えられる。さらに合成ペプチド導入による内的因子操作法は、合成ペプチドが速やかに分解され、染色体へ影響を与えないことから遺伝子導入法など他の操作法と比較し安全かつ有効な方法と考えられる。

2 実用化に向けた波及効果

造血幹細胞の自己複製の制御を、分子基盤に基づいた方法を用いて行うことで、より安全な造血幹/前駆細胞の体外増幅法の確立に応用できると考えられる。

残された課題と対応方針について

今後、臨床研究への応用に向け、合成ペプチド導入により増幅させた造血幹/前駆細胞の安全性を中心とした品質の評価を行う必要がある。また他の内的因子を標的とした合成ペプチドを用いることにより、造血幹/前駆細胞の自己複製あるいは分化を効率的に誘導する技術開発を行う必要がある。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	6,000	6,000	0	0	0	12,000	0	0	0	0	0	0	0	12,000
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	8,000	10,420	4,200	4,200	8,200	8,000	43,020	0	0	0	0	0	0	0	43,020
旅費	0	0	0	20	20	20	60	0	0	0	0	0	0	0	60
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計	8,000	16,420	10,200	4,220	8,220	8,020	55,080	0	0	0	0	0	0	0	55,080

代表的な設備名と仕様〔既存(事業開始前)の設備含む〕

JST負担による設備：バイオクリーンベンチ、低CO2濃度用CO2インキュベーター、顕微鏡
地域負担による設備：大腸菌培養インキュベーター