

学位論文題名

In vitro expansion of CD34+/CD41+ cells from human peripheral blood CD34+/CD41- cells : Role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors

(ヒト末梢血幹細胞 (CD34+/CD41-) から巨核球系前駆細胞 (CD34+/CD41+) への in vitro 増幅：巨核球系前駆細胞の分化、増殖における造血因子の役割)

学位論文内容の要旨

1. 緒言

末梢血幹細胞移植において一般に、顆粒球系細胞の再構築は速やかに認められるが、血小板の回復は遅く、血小板輸血依存性が長引くのが現状である。Dercksenらは、巨核球系細胞の表面形質であるCD41を測定し、 $0.34 \times 10^6/\text{kg}$ 以上のCD34+/CD41+細胞を移植された患者は、それ以下のCD34+/CD41+細胞を移植された患者と比較し、有意に血小板数の回復が早くなることを報告した。このことは、CD34+/CD41+細胞が末梢血幹細胞移植において血小板の回復能力を有する巨核球系前駆細胞であることを示している。末梢血から純化したCD34陽性細胞は、その大半がCD41陰性細胞(CD34+/CD41-細胞)である(CD41陽性率： $0.6\% \pm 0.5\%$ )。本研究は、臨床応用を視野に入れ、末梢血から純化したCD34陽性細胞(CD34+/CD41-細胞)を巨核球系前駆細胞(CD34+/CD41+細胞)へと分化、増幅させることを目的とし、その過程をフローサイトメーターおよびコロニーアッセイ法で経時的に観察し、造血因子であるthrombopoietin (TPO)、interleukin-3 (IL-3)およびstem cell factor (SCF)が巨核球系前駆細胞の増幅に果たす役割について検討した。

2. 対象と方法

(CD34陽性細胞の純化)

健常人から得られた末梢血400mlからFicoll-Hypaqueによる赤血球除去、アルブミンによる血小板除去、ナイロンファイバーシリンジによる付着細胞除去を行った後にCD34抗体と免疫磁性ビーズを使用してCD34陽性細胞を純化した。

(CD34陽性細胞の液体培養、培養細胞の検討)

純化CD34陽性細胞をIL-3+SCFおよびTPO+IL-3+SCFの2種類の造血因子の組合せで液体培養し、0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、10日目に細胞を回収し、

①フローサイトメーターによる表面形質(CD34, CD41)の測定

②各分化段階の巨核球系前駆細胞(0, 2, 4, 6, 8, 10日目細胞)の各種造血因子反応性(TPO, TPO+SCF, TPO+IL-3, TPO+IL-3+SCF)をフィブリンクロット半固形培地によるコロニーアッセイ法で検討した。

また TPO+IL-3+SCF の組合せで液体培養した 6 日目に細胞を回収し、CD34+/CD41+細胞および CD34-/CD41+細胞のソーティングを行い、各種造血因子反応性 (TPO, IL-3, SCF, IL-3+SCF, TPO+IL-3, TPO+SCF, TPO+IL-3+SCF) をフィブリンクロット半固形培地によるコロニーアッセイ法で検討した。

#### 〈統計処理〉

すべての結果は mean ± SD で示され、Wilcoxon-Mann-Whitney U test を用いて各検討を行い、 $P < 0.05$  の場合有意差ありと判定した。

### 3. 結果

#### 〈純化 CD34 陽性細胞の性質〉

純化細胞の CD34 陽性率は  $89.8\% \pm 3.5\%$  で、CD34 陽性細胞の表面形質の亜分画は、CD38 が  $98.6\% \pm 0.8\%$ 、HLA-DR が  $95.5\% \pm 3.6\%$ 、CD117(c-kit) が  $8.8\% \pm 2.9\%$ 、CD13 が  $42.3\% \pm 14.8\%$  で、CD41 は  $0.6\% \pm 0.5\%$  と低値であり、その大半が CD34+/CD41-細胞であった。

#### 〈総細胞増幅率〉

総細胞増幅率は TPO+IL-3+SCF で 10 日目で  $47.7 \pm 17.1$  倍で IL-3+SCF の組合せ ( $43.2 \pm 15.0$  倍) と比較し有意差は認められなかった。また培養日数と共に細胞形態は巨核球系細胞への分化が認められた。CD34 陽性率は 6 日目までは変化なかったが 8 日目以後低下した。CD34 陽性細胞増幅率は、6 日目で最高値を示し、TPO+IL-3+SCF で  $12.5 \pm 3.2$  倍で IL-3+SCF の組合せ ( $9.8 \pm 3.3$  倍) と有意差は認められなかった。

#### 〈CD34+/CD41+の発現率と細胞数〉

TPO+IL-3+SCF の組合せでは、CD34+/CD41+陽性率は 2 日目より増加し 4 日目で最高値 ( $19\% \pm 7\%$ ) となり、以後減少した (10 日目で  $2.2\% \pm 0.6\%$ )。これは、IL-3+SCF の組合せでも同じ傾向を示し、有意差は認められなかった。また増幅された CD34+/CD41+細胞が、純化 CD34 陽性細胞中の CD34+/CD41+細胞から由来した可能性を否定するために、純化 CD34 陽性細胞から CD34+/CD41-細胞をソーティングし、TPO+IL-3+SCF の組合せで液体培養を行ったところ、6 日目に 9.9% の CD34+/CD41+陽性細胞の出現を認めた。CD34 陽性細胞  $1 \times 10^5$  個から増幅される CD34+/CD41+細胞数は TPO+IL-3+SCF の組合せの 6 日目が最も多く  $1.7 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$  個で以後減少傾向を示した。また IL-3+SCF の組合せ (CD34+/CD41+細胞数  $0.5 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$  個) と比較し有意に高値を示した。

#### 〈CD34-/CD41+の発現率と細胞数〉

CD34-/CD41+陽性率は培養日数とともに増加傾向を示したが、TPO+IL-3+SCF の組合せでは IL-3+SCF の組合せと比較し、8 日目および 10 日目で有意に高値を示し、それぞれ  $15\% \pm 7\%$  対  $5\% \pm 3\%$ 、 $38\% \pm 18\%$  対  $11\% \pm 8\%$  であった。また CD34 陽性細胞  $1 \times 10^5$  個から増幅される CD34-/CD41+細胞数も TPO+IL-3+SCF の組合せ有意に高く 8 日目および 10 日目で、それぞれ  $5.6 \pm 3.3 \times 10^5$  個対  $1.4 \pm 0.4 \times 10^5$  個、 $19.5 \pm 10.5 \times 10^5$  個対  $5.0 \pm 2.8 \times 10^5$  個であった。

#### 〈各分化段階における造血因子反応性〉

造血因子反応性に関しては、0 日目や 2 日目など未分化な造血幹細胞は TPO 単独ではほとんど巨核球系コロニーを形成しないが、培養日数 (巨核球系前駆細胞へと分化) とともに次第にコロニー形成が認められるようになり、10 日目では TPO+IL-3+SCF のコロニー形成率とほぼ同じとなった。また TPO に SCF を加えても、TPO 単独と同じ反応性であった。

TPO+IL-3 に SCF を加えても、巨核球系コロニー形成率の明らかな増加は認められなかった。また形成される巨核球系コロニーのサイズ (巨核球系コロニーの増殖能力) は、液体培養での培養日数が長くなるほど、減少する傾向を認めた。ソーティングした CD34+/CD41+細胞は IL-3 を含む造血因子の組合せで多くの巨核球系コロニーの形成を認め、CD34+/CD41+細胞の中に巨核球系前駆細胞が存在することが確認された。CD34-/CD41+細胞に関しては 1 個の巨核球を維持するか、非常に小さなコロニー形成を認め、成熟した巨核球系細胞と推測された。

#### 4. 結語

本論文では、ヒト末梢血 CD34 陽性細胞を thrombopoietin (TPO, c-Mpl ligand) を含む各種造血因子を用い *in vitro* で液体培養を行い、CD34 陽性細胞 (CD34+/CD41-) から巨核球系前駆細胞 (CD34+/CD41+) への分化増殖における最適な培養条件および TPO の作用機序を検討した。その結果、TPO、IL-3、SCF 存在下で 6 日間培養が最も効率のよい条件であることを確認し、また TPO は巨核球系前駆細胞 (CD34+/CD41+) から巨核球 (CD34-/CD41+) への分化増殖におもな作用点があることを示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 池 隆 夫

## 学 位 論 文 題 名

### In vitro expansion of CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup> cells from human peripheral blood CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup> cells : Role of cytokines for in vitro proliferation and differentiation of megakaryocytic progenitors

(ヒト末梢血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>) から巨核球系前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>) への in vitro 増幅：巨核球系前駆細胞の分化、増殖における造血因子の役割)

本研究は、末梢血から純化した CD34 陽性細胞 (CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>細胞) から巨核球系前駆細胞 (CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>細胞) への分化増幅における最適な培養条件を検討するとともに、thrombopoietin (TPO, c-Mpl ligand)、interleukin-3 (IL-3) および stem cell factor (SCF) が巨核球系前駆細胞の増殖に果たす役割について検討したものである。

#### I 対象と方法

- 1) 健康人末梢血から CD34 抗体と免疫磁性ビーズを使用して CD34 陽性細胞を純化した。
- 2) 純化 CD34 陽性細胞を TPO+IL-3+SCF (TPO 存在下) および IL-3+SCF (TPO 非存在下) の造血因子の組合せで液体培養し、0、2、4、6、8、10 日目に細胞を回収し細胞数の測定、表面形質 (CD34, CD41) の測定および細胞形態の観察を行った。
- 3) 純化 CD34 陽性細胞を TPO 存在下で巨核球系細胞へと分化誘導し、0、2、4、6、8、10 日目の細胞を回収し、造血因子反応性を巨核球系コロニー形成法で検討した。
- 4) 純化 CD34 陽性細胞を TPO 存在下で 6 日間液体培養し、CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>細胞および CD34<sup>-</sup>/CD41<sup>+</sup>細胞をソーティングし、巨核球系コロニー形成能を検討した。

#### II 結果

- 1) 純化 CD34 陽性細胞の大半が CD34<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>細胞であった。
- 2) 細胞形態および表面形質上、成熟巨核球へと分化していく様が観察された。成熟巨核球系細胞と考えられる CD34<sup>-</sup>/CD41<sup>+</sup>陽性率は、TPO 存在下では TPO 非存在下と比

較し6日目以後、有意に高値を示した。CD34+/CD41+細胞数はTPO存在下の6日目  
が最も増幅率が高く、これはTPO非存在下と比較し有意に高値であった。また  
CD34-/CD41+細胞数もTPO存在下で、8日目および10日目にTPO非存在下と比  
較し有意に高値であった。

- 3) 0日目や2日目など未分化な造血幹細胞はTPO単独では、ほとんど巨核球系コロニーを形成しないが、培養日数(巨核球系前駆細胞へと分化)とともに次第にコロニー形成が認められた。TPO+IL-3+SCFで形成される巨核球系コロニーのサイズ(巨核球系細胞の増殖能力)は、培養日数の経過とともに小さくなる傾向を認めた。
- 4) CD34+/CD41+細胞は多くの巨核球系コロニーの形成を認め、巨核球系前駆細胞であることを確認した。CD34-/CD41+細胞は1個の巨核球を維持するか、非常に小さなコロニー形成を認め、成熟巨核球系細胞と確認した。

### Ⅲ 考案

巨核球系前駆細胞への分化増幅にはTPO、IL-3、SCF存在下で6日間培養が最も効率のよい条件であることを確認した。またIL-3およびSCFは純化CD34陽性細胞から巨核球系前駆細胞への分化誘導に主に作用し、TPOの主な作用点は巨核球系前駆細胞から成熟巨核球(CD34-/CD41+細胞)への分化増殖であることを示した。

### Ⅳ 審査の概要

口頭発表に際し、吉木教授より、巨核球系細胞の分化段階におけるc-kitやc-mplなどの造血因子レセプターやTPOのmRNAの発現、分化誘導された巨核球に血小板放出像が認められない理由、臨床応用する際の移植する巨核球系細胞の分化段階について、小池教授から、現在進行しているTPOの巨核球系細胞における細胞内情報伝達の内容、およびTPOを臨床使用する際の対象疾患について、上出教授より、ストローマ細胞が無い状態で分化誘導された巨核球の機能や性状、in vitroで増幅された巨核球系前駆細胞(CD34+/CD41+細胞)と骨髄中に存在する巨核球系前駆細胞(CD34+/CD41+細胞)とのCD34発現強度の比較(移植した際の骨髄へのホーミングの問題)について質疑および指摘があった。これらに対して、学位申請者は、概ね適切な回答をした。本研究は、ヒトの造血幹細胞から巨核球系細胞への分化増殖におけるTPO、IL-3、SCFの作用機序を明らかにするとともに、将来の治療であるin vitro増幅された造血幹細胞による移植の一環として、巨核球系前駆細胞(CD34+/CD41+細胞)を最も効率良く増幅させる条件を示したものであり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。