

臍帯血生着不全モデルマウスを用いた  
ヒト胎児付属物由来幹細胞の生着促進効果の検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系小児科学専攻

大熊 啓嗣

修了年 2015 年

指導教員 高橋 昌里

【背景】臍帯血移植はドナーの負担が少ないなど利点が多く、日本でも公的バンクの整備に伴い、症例数が急激に増加している。臍帯血移植の利点として、ドナーへの負担がない事、臍帯血がその免疫学的寛容により HLA 2 座不一致までの移植が可能であること<sup>[1]</sup>、迅速なコーディネートが可能で、緊急移植に対応できる事などが挙げられる。治療成績においても非血縁者間骨髄移植と同等の成績が報告されている<sup>[2]</sup>。しかし、臍帯血移植の最大の問題点として、生着不全発生率が 10-20%と骨髄移植と比較して有意に高い<sup>[3]</sup>。臍帯血移植後の生着不全の一因として、骨髄破壊的前処置による骨髄微小環境やストローマ細胞の破壊や臍帯血中の細胞数の問題などが考えられているが、その詳細は不明である。骨髄移植に用いられる骨髄単核細胞中にはストローマ細胞が含まれるので造血能回復の一端を担うが、臍帯血移植に用いられる臍帯血細胞中には、ストローマ細胞がほとんど含まれないことが知られている。これも臍帯血移植における生着不全が多い要因の一つになっている。生着不全を回避する方法として、造血幹細胞とともに間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell:MSC) を同時に移植し成功したとの報告がある<sup>[4-6]</sup>。一方で、胎盤や臍帯、および臍帯血など胎児付属物にも MSC が存在している事が知られている<sup>[7]</sup>。胎盤や臍帯は分娩後、医療廃棄物として扱われる組織であるため、採取に対して倫理的な問題が少ない。胎盤には数種類の幹細胞が存在していると考えられている<sup>[8]</sup>が、なかでも胎盤羊膜は上皮細胞と間質細胞に分けられ、2 種類の MSC 様細胞すなわち、羊膜間質由来幹細胞 (amnion mesenchymal stem cell: AMC) と羊膜上皮由来幹細胞 (amnion epithelial stem cell: AEC) が存在し、様々な作用を示す事が分かっている<sup>[9]</sup>。

臍帯は、表面を羊膜からなる羊膜鞘で覆われ、内部に2本の臍帯動脈と1本の臍帯静脈を有し、間質はWharton's jelly(WJ)と呼ばれる白色のムコ多糖からなる基質で満たされている。このWJにはMSC(WJ-MSC)が豊富に存在し、骨、軟骨、神経などへの多分化能を示す事が知られている<sup>[10]</sup>。これらの細胞は、細胞治療への臨床応用が期待されている<sup>[11]</sup>。

【目的】胎盤や臍帯などの胎児付属物には、MSCが豊富に含まれ、数種類のMSCが単離・増殖できることが報告されている。一方、これら胎児付属物由来MSCの造血幹細胞生着促進作用に違いがあるかについて明確になっていない。

そこで本研究では、胎児付属物に由来する3種類のMSCとして、①AMC、②AEC、③WJ-MSCを調製し、臍帯血生着不全モデルマウスにヒト造血幹細胞と共にこれらの細胞を共移植し、その生着促進作用を比較検討した。これらの検討から、造血幹細胞生着促進を目的として細胞治療のソースとして適切な細胞の同定を試みた。

【方法】免疫不全(nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency: NOD/SCID)マウスに対して、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞と胎児付属物由来MSC(AMC、AECおよびWJ-MSC)を経静脈的に共移植し、CD34<sup>+</sup>細胞の生着促進効果があるか3種類の細胞間で比較を行った。移植するヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞は磁気ビーズ法にて単離し、純度が98~100%である事を確認した。NOD/SCIDマウスに放射線照射(3 Gy)を行った後、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞単独(コントロール群)、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞とAMC(AMC群)、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞とAEC(AEC群)、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup>細胞とWJ-MSC(WJ-MSC群)を尾静脈より投与した。移植12週後に骨髓細胞を採取

し、ヒト血液細胞の各分画について解析した。また、投与した MSC が体内でどのような動態を経ているのかを検討するため、NOD/SCID マウスに放射線照射(3 Gy)を行った後、24 時間後に Qtracker® にて蛍光標識した WJ-MSC ( $5 \times 10^5$ ) を尾静脈より投与した。投与 24 時間後にマウスを安楽死させ、肺と大腿骨を摘出し、それぞれの組織における移植細胞の局在解析を行った。蛍光標識した WJ-MSC は投与前に蛍光顕微鏡で 100% の細胞が Qtracker 陽性であることを確認した。さらに、胎児付属物由来 MSC の臍帯血生着促進作用メカニズムを明らかにする目的で、AMC、AEC、WJ-MSC の培養上清を採取し、造血幹細胞生着に関わることが報告されている SDF-1 および HGF のタンパク質濃度を Enzyme Linked Immunosolvent Assay (ELISA) 法にて測定した。

**【結果】** ヒト臍帯血生着不全モデルマウスによる MSC 共移植実験での解析結果を図 1 に示す。白血球共通分画である  $CD45^+$  細胞、造血前駆細胞分画である  $CD34^+$  細胞、B リンパ球分画である  $CD45^+/CD19^+$  細胞では、WJ-MSC 群で有意に生着が促進していた ( $p < 0.05$ )。骨髓球分画である  $CD45^+/CD13^+$  細胞、単球・マクロファージ分画である  $CD45^+/CD11b^+$  細胞、巨核球分画である  $CD45^+/CD41a^+$  細胞では、WJ-MSC 群と AMC 群において、Control 群に比べ高い傾向があったが、統計学的有意差は認められなかった。骨髓中の  $CD45^+$  細胞、 $CD34^+$  細胞、 $CD45^+/CD19^+$  細胞、 $CD45^+/CD13^+$  細胞、 $CD45^+/CD11b^+$  細胞、 $CD45^+/CD41a^+$  細胞は、コントロール群では全例でほとんど検出されなかった。以上の結果より、ヒト臍帯血と WJ-MSC の共移植はヒト臍帯血  $CD34^+$  細胞の生着を促進し、造血機能が早期に回復する事が明らかになった。移植した MSC の体内動態実験では、肺の切片標本で、Qtracker

陽性の WJ-MSC が検出された。一方、骨髓細胞のフローサイトメトリーによる解析では一頭のマウスにつき骨髓細胞 10 万個を解析したが Qtracker 陽性細胞は検出されなかった。合計 8 頭のマウスを用いて検討を行ったが、すべてのマウスで、Qtracker 陽性細胞を検出することはできなかった。以上の結果より、静脈内投与した WJ-MSC は骨髓内には移行せず、一部は肺にトラップされている事が明らかになった。それぞれの MSC の分泌するサイトカインを測定するため、ELISA 法を用いて検討したが、SDF-1 の培養上清中の濃度は、各群間に有意差は認められなかった。HGF の培養上清中の濃度は、WJ-MSC で AMC や AEC に比べて有意に高いことが明らかとなった ( $p < 0.05$ )。以上の結果より、WJ-MSC は AMC や AEC に比べて HGF を高発現することが明らかになった。

【考察】今回、同一ドナーから 3 種類の胎児付属物由来 MSC (AMC、AEC、WJ-MSC) を調製した。フローサイトメーターによる細胞表面抗原解析においても、AMC、AEC、WJ-MSC とともに MSC の minimal criteria <sup>[12]</sup> を満たすプロファイルを呈していた。これらの所見は、以前報告された胎児付属物由来 MSC の形質解析の結果に一致している <sup>[13-15]</sup>。以上の結果より調製した AMC、AEC、WJ-MSC はいずれも MSC の形質を有していることが示唆された。

生着不全モデルマウスでのヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞と胎児付属物由来 MSC 共移植実験を行った結果、WJ-MSC 共移植により、ヒト血液細胞の生着が促進されることが明らかになった。一方 AEC 群と AMC 群では個体差があり明らかな生着促進効果は認められなかった。WJ-MSC により、造血前駆細胞分画や B 細胞分画は、有意な発現増加が認められたが、単球、骨髓球、巨核球分画の増加は、統計学的

に有意ではなかった。これは臍帯血移植後に、Bリンパ球の出現に遅れて、骨髄球や巨核球が増加する所見に一致する。免疫不全マウスを用いて WJ-MSC が臍帯血生着促進作用を示すことはすでに報告がある<sup>[16,17]</sup>。一方、同一ドナーから調製した3種類の胎児付属物由来 MSC の生着促進効果を直接比較した報告は今までにない。今回、WJ-MSC 以外の MSC とくに AEC では生着促進効果が弱いことが明らかになった。今後、多くの臨床研究が行われている骨髄 MSC との比較や、同一ドナーに由来する WJ-MSC と異なるドナーに由来する WJ-MSC の効果比較などの検討が必要と思われる。

蛍光標識した WJ-MSC 移植実験の結果、肺には WJ-MSC の局在が認められたが、骨髄内には検出されなかった。同様の結果は Carrancio ら<sup>[18]</sup>によっても報告されている。造血幹細胞移植では、通常 48 時間以内に造血幹細胞が骨髄にホーミングすることが知られている。今回、移植 24 時間後に WJ-MSC が骨髄内に検出できなかったという結果は、共移植した WJ-MSC は造血幹細胞ニッチとして機能していない可能性を示唆している。MSC を経静脈投与した場合、その多くが肺にトラップされ、ここで免疫細胞との相互作用により様々な液性因子が全身性に分泌され、抗炎症作用や免疫抑制作用を発揮することが報告されている<sup>[19,20]</sup>。今回 WJ-MSC の経静脈移植により、生着が促進された理由として、肺にトラップされた WJ-MS から生着を促進する因子が全身性に分泌された可能性がある。今回培養上清の SDF-1 濃度を検討した結果、3 細胞間に明らかな差はなかった。一方、HGF は WJ-MSC で AEC や AMC より有意に高値を示した。HGF は、造血微小環境を修復・再生する機能が知られており、造血幹細胞のホーミングを促進する

可能性が指摘されている<sup>[21]</sup>。今回の検討にて、WJ-MSC 移植による生着促進効果が認められたメカニズムの一つとして HGF の関与が示唆された。今後、同様の共移植実験系を用いて、造血幹細胞のホーミングに対する HGF シグナルの関与を明らかにしていく必要がある。また WJ-MSC からは HGF 以外にも HLA-G、IDO、PGE2、VEGF などの免疫制御因子や血管新生因子を分泌しているため、HGF 以外の因子に関しても今後検討する余地があると考えられる。

(引用文献)

- [1] Tomonari A, Iseki T, Ooi J et al. Cytomegalovirus infection following unrelated cord blood transplantation for adult patients: a single institute experience in Japan. *Br J Haematol*. 2003; **121**: 304-11.
- [2] Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 1998; **339**: 1565-77.
- [3] Locatelli F, Rocha V, Chastang C et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*. 1999; **93**: 3662-71.
- [4] Ikehara S. A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2008; **30**: 108-15.
- [5] Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007; **21**: 1733-8.
- [6] Koc ON, Gerson SL, Cooper BW et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; **18**: 307-16.
- [7] Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007; **110**: 2764-7.
- [8] Weiss ML, Anderson C, Medicetty S et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008; **26**: 2865-74.
- [9] Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*. 2009; **30**: 2-10.

- [10] Zeddou M, Briquet A, Relic B et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2010; **34**: 693-701.
- [11] Mihiu CM, Mihiu D, Costin N, Rus Ciuca D, Susman S, Ciortea R. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom J Morphol Embryol.* 2008; **49**: 441-6.
- [12] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; **8**: 315-7.
- [13] Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation.* 2011; **81**: 162-71.
- [14] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 2008; **26**: 591-9.
- [15] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells.* 2003; **21**: 105-10.
- [16] Wu KH, Tsai C, Wu HP, Sieber M, Peng CT, Chao YH. Human application of ex vivo expanded umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: enhance hematopoiesis after cord blood transplantation. *Cell Transplant.* 2013; **22**: 2041-51.
- [17] Liu Y, Yi L, Zhang X et al. Cotransplantation of human umbilical cord blood-derived stromal cells enhances hematopoietic reconstitution and engraftment in irradiated BABL/c mice. *Cancer biology & therapy.* 2011; **11**: 84-94.
- [18] Carrancio S, Romo C, Ramos T et al. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant.* 2013; **22**: 1171-83.
- [19] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ et al. Intravenous hMSCs improve myocardial

infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 2009; **5**: 54-63.

[20] Oh JY, Lee RH, Yu JM et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012; **20**: 2143-52.

[20] Michalopoulos GK, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology*. 1992; **15**: 149-55.