HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	伊藤, 沙和
Description	配架番号：2195
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12091号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61557
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sawa_Ito_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏 名　伊藤　沙和

学 位 論 文 題 名

ヒト間葉細胞を用いた白血病幹細胞の長期培養法の樹立
(Development of an in vitro long-term maintenance system of myeloid leukemia stem cells using human mesenchymal stromal cells)

【背景と目的】急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia; AML)は、癌幹細胞研究の中でも最も研究が進んでいる疾患であり、癌幹細胞モデルの解明に大きく寄与してきた。いまや、白血病幹細胞（leukemia stem cells; LSC）の概念は、白血病細胞の多様性、再発、化学療法への耐性などの現象を説明する上で必要不可欠である。今日の白血病幹細胞の研究では、severe combined immunodeficient (SCID)マウスを使った移植モデルがもっとも標準的な実験方法とされている。試験管内で癌幹細胞を長期培養継続するのは難しく、多くの場合、本来の癌幹細胞の特性を失わせてしまう可能性がある。癌幹細胞研究のさらなる発展のためにも、簡単で、実行可能な、信頼のおける、生体外での癌幹細胞の培養法が必要である。骨髄微小環境における、白血病幹細胞と骨髄間様細胞との間の相互作用は、白血病幹細胞の増殖にとってとても重要であることが解明されるにつれ、白血病治療の標的として非常に有望な研究対象であることは明らかである。しかし、マウス移植モデルがヒト白血病幹細胞とヒト骨髄間葉細胞との相互作用を研究するモデルとして十分でない可能性が指摘されている。特に、ヒト白血病幹細胞とヒト免疫細胞との相互作用を研究することは非常に難しいと言わざるを得ない。なぜなら、SCID マウスはヒト免疫細胞を完全に欠如しているからである。以上の点からもヒト白血病幹細胞とヒト骨髄間葉細胞の培養モデルの構築は非常に重要である。本研究はヒト骨髄間葉細胞と白血病幹細胞の共培養により、白血病幹細胞の生体外培養モデルを確立しようと試みた。

【対象と方法】８人の急性骨髄性白血病（平均年齢５３歳、２３～７４歳）の患者より末梢血検体を採取して実験に使用した。健常者ボランティアより骨髄液を採取し、骨髄間葉細胞をプロトコールに沿って作成した。実験には、第 4 継代の骨髄間葉細胞を使用し、５０Gy の放射線を照射後、造血細胞分化マーカー（Lineage）陰性かつ CD34 陽性細胞（Lin-CD34+ cells）として分離した白血病細胞と共培養した。サイトカインを使用した条件では、FLT3-ligand, Stem cell factor (SCF), Interleukin-3 (IL-3)を混合した培養液を用いた。週一度、細胞表面マーカーと Annexin V-APC と Propidium iodide 染色、また Hoechst 33342 と Pyronin Y による細胞周期の評価も同時に行った。６～８週齢 Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency IL-2Rγnull (NSG)マウスは非致死線量(300cGy)を照射後、１８－２４時間後に経静脈的に白血病細胞の移植が行われた。移植８週後マウスを安楽死させ、大腿骨と脛骨

より骨髄細胞を採取した。ヒト白血病細胞の生着は、総骨髄細胞中のヒト CD45 および CD34 陽性細胞が０．１％確認されることを基準とした。Cytarabine を用いて化学療法感受性試験を行った。

【結果】白血病細胞の表現型は多様であるため、CD34 と CD38 の表現型をもとに、白血病検体を二つのグループ、$CD34^{+}$ $CD38^{-}$ 優位白血病（n=4）、$CD34^{+}CD38^{+}$ 優位白血病(n=4)に分類した。培養液のみの培養条件に比較して、骨髄間葉細胞のみ培養条件(MSC only)、サイトカインと骨髄間葉細胞培養条件（MSCs+cytokines)、サイトカインのみの培養条件（cytokines）が優位に生存細胞の絶対数を維持することに成功した。この現象はただひとつの例外（UPN1)を除いてすべての白血病細胞において確認された。培養開始６週後において骨髄間葉細胞のみの培養条件が他の条件に比べて統計学的有意に元来の $CD34^{+}CD38^{-}$あるいは $CD34^{+}$ $CD38^{+}$表現型を維持していた。トランスウェルを使用した実験では、共培養にとって白血病細胞と骨髄間葉細胞の直接的接着が重要であることを示唆した。また、骨髄間葉細胞が白血病細胞の細胞周期を静止期に維持させることを示した。マウス移植モデルにより、体外長期培養にもかかわらず、骨髄間葉細胞は白血病幹細胞を染色体のクローン性を維持し、また化学療法に耐性獲得に寄与することも証明した。

【考察】本研究は、ヒト骨髄間葉細胞との共培養により、白血病細胞の表現型を維持し、主に静止期（非分裂期）の細胞のまま長期間体外で培養することが可能であり、さらにマウス移植モデルにおいて培養後の細胞が白血病幹細胞の性質を維持し続けていることも証明した。また白血病細胞の維持には、骨髄間葉細胞との細胞間接触が必要であることが、トランスウェル培養の実験により証明された。骨髄間葉細胞と白血病幹細胞の細胞表面接着因子やレセプターの相互関係についてさらなる研究が進めば、その機序を利用した新たな白血病の治療法が開発されるかもしれない。また本研究で示したように、骨髄間葉細胞により白血病細胞が Cytarabine への耐性を獲得する現象を考慮すると、本研究の培養法が化学療法後に残存した白血病細胞のモデルとして、新しい化学療法やその他の治療法のスクリーニングに使用できる可能性がある。同種造血幹細胞移植が現在のところ唯一白血病に治癒をもたらす治療法であり、それは移植片対白血病効果（graft-versus-leukemia effect, GVL effect）によって残存した白血病が駆逐されるためと考えられている。マウスモデルでは、ヒト白血病におけるヒト免疫システムの役割について検討することができない。本研究の体外培養法を用いることで、白血病幹細胞、ヒト骨髄間葉細胞、さらにはヒト免疫細胞の共培養が可能となり、GVL 効果のさらなる解明、さらには新たな免疫療法の開発の手がかりになるかもしれない。この培養法は将来的に、様々な白血病幹細胞および骨髄微小環境を対象とした研究に応用できる可能性に満ちた培養法であると期待している。

【結論】白血病細胞と骨髄間葉細胞の共培養は、白血病幹細胞を長期間生体外で維持する簡易な培養法である。この培養法は骨髄微小環境における白血病幹細胞の維持機構の機序を解明し、新たな治療法を開発するために有用な技術となる可能性がある。