

Mini Review

臍帯血造血幹細胞の造血能 —成人骨髓造血幹細胞との比較—

辻浩一郎

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター細胞療法分野

Capability of cord blood hematopoietic stem cells: a comparison with adult bone marrow hematopoietic stem cells

Human hematopoietic stem cells (HSC) in cord blood (CB) are increasingly being used as an alternative to those in adult bone marrow (BM) for treating patients with various hematological disorders. However, the difference in the hematopoietic activity of HSC between CB and adult BM is still unclear. We then compared CD34⁺ cells, a hematopoietic cell population, in CB with those in adult BM, using their phenotypic subpopulations, colony-forming activity and long-term repopulating ability. Although the proportion of CD34⁺ cells was higher in adult BM than CB mononuclear cells in flow cytometry, more immature subpopulations, CD34⁺CD33⁻ and CD34⁺CD38⁻ cells, were present in CB CD34⁺ cells. Clonal culture assay showed that more multipotential progenitors were present in CB CD34⁺ cells. When transplanted into immunodeficient NOD/SCID mice, adult BM CD34⁺ cells could not reconstitute human hematopoiesis in recipient BM, but CB CD34⁺ cells achieved a high level of engraftment, indicating that CB CD34⁺ cells possess greater repopulating ability. Thus, CB CD34⁺ cells contain more primitive hematopoietic cells including HSC, suggesting the usefulness of CB CD34⁺ cells not only as a graft for therapeutic HSC transplantation, but as a target cell population of *ex vivo* expansion of transplantable HSC.

Rec.11/27/2002, Acc.1/20/2003, pp181-185

Kohichiro Tsuji

Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center,
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Key words hematopoietic stem cells, cord blood, bone marrow, NOD/SCID mice

成人骨髓中の造血幹細胞を用いた骨髓移植療法は、種々の血液疾患、悪性腫瘍に対する根治的治療法としてすでに確立したといえる。しかし、そうした骨髓移植療法の進歩に伴い、骨髓移植の適応がありながら、適当なドナーが存在しないために骨髓移植を受けられない患者が増加してきた。そこで近年、新たな造血幹細胞の供給源として、臍帯血中に存在する造血幹細胞を利用した臍帯血移植が行われるようになってきている。しかし、そうした臍帯血移植の臨床的有用性にもかかわらず、胎生期に由来する臍帯血造血幹細胞の性状、特に成人骨髓中の造血幹細胞との差違については必ずしも十分に解明されているわけではない。本稿においては、そうした臍帯血造血幹細胞の性状について、われわれの検討を中心に概説する。

造血幹細胞の分化

血液中には形態と機能を異にする種々の血球が存在するが、それらはいずれも固有の寿命で崩壊している。この膨大な数の血球を一生の間供給し続けるためには、血球の源となる未分化な細胞のプールが必要であり、これらの細胞は造血幹細胞と呼ばれる。この造血幹細胞をレシピエントに移植し、その体内、主には骨髓に新たな造血を再構築し、長期にわたり維持することが造血幹細胞移植の目的といえる。こうした造血幹細胞の能力は「長期造血再構築能」と呼ばれる。この造血幹細胞の長期造血再構築能は、造血幹細胞が細胞分裂により自己と同じ能力を有する細胞を複製する能力（自己複製能）と、全ての成熟血球を産生する能力（多分化能）という2つの能力を併せ持つことにより可能となっていると考えられている。

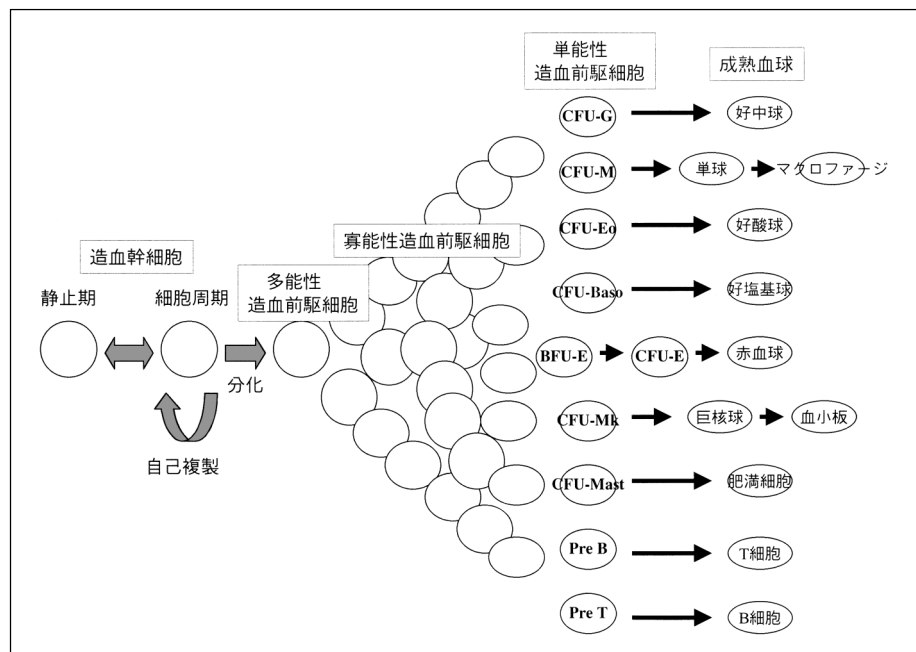


図1 造血幹細胞の自己複製と分化

CFU-G: granulocyte-colony forming unit, CFU-M: macrophage-CFU, CFU-Eo: eosinophil-CFU, CFU-Baso: basophil-CFU, BFU-E: erythroid-burst forming unit, CFU-E: erythroid-CFU, CFU-MK: megakaryocyte-CFU, CFU-Mast: mast cell-CFU, Pre B: B Cell precursor, Pre T: T cell precursor

図1は、造血幹細胞から成熟血球が産生される過程を示している。恒常状態では多くの造血幹細胞は静止期にあり、必要に応じて細胞周期に入り細胞分裂する。造血幹細胞は細胞分裂すると、その娘細胞は自己複製して再び造血幹細胞となるか、あるいは分化して多能性造血前駆細胞となる。多能性造血前駆細胞はすでに分化することが運命づけられた細胞で、多分化能は有しているが自己複製能は持たないことより、造血幹細胞とは区別される。

造血幹細胞由来の多能性造血前駆細胞は、細胞分裂を繰り返しながら次第にその多分化能を失い、数種類の血球系への分化能のみを有する寡能性造血前駆細胞を経て、単一の血球系への分化を運命づけられた単能性造血前駆細胞となり、最終的にはリンパ球を含む全ての成熟血球を産生する。ただし、造血幹細胞移植後の免疫機構の再構築が造血機構のそれよりかなり遅れることから明らかなように、リンパ球の分化成熟過程は他の血液細胞とは異なっており、必ずしも十分に解明されているわけではない。特に多能性造血前駆細胞からリンパ球が産生される初期分化の過程は不明な点が多く、T細胞とB細胞に共通な前駆細胞の存在も想定されている¹⁾(したがって、図1についてもT細胞とB細胞の分化に関してはあえて詳述しなかった)。ただ何れにしても、このリンパ球を含む血液細胞の産生過程は、サイトカインと呼ばれる種々の細胞から産生される

液性因子と、血液細胞を取り囲む造血微小環境により制御されている。

マウスモデルを用いた検討から、造血幹細胞は個体の発達につれて、細胞表面マーカー、増殖能、サイトカインに対する感受性など、その性状が変化することが示されており²⁻⁵⁾、胎生期に由来する臍帯血造血幹細胞の性状は、成人骨髓中の造血幹細胞とは異なることが予想される。したがって、臍帯血中の造血幹細胞の性状を明らかにすることは、より安全で効率的な臍帯血移植法の確立のために極めて重要な課題といえる。

臍帯血中のCD34⁺細胞およびその亜分画

ヒト造血幹細胞/前駆細胞の特異的マーカーであるCD34の発現について、臍帯血および成人骨髓単核球を用いてフローサイトメトリーにより検討してみると⁶⁾、表1に示すように、臍帯血細胞では骨髓細胞と比較してCD34⁺細胞の比率は低い。しかし、CD34⁺細胞中の未分化細胞分画であるCD34⁺CD33⁻細胞、CD34⁺CD38⁻細胞の比率は、何れも臍帯血CD34⁺細胞のほうが高いことより、臍帯血細胞は、骨髓細胞と比較して含まれる造血細胞は必ずしも多くはないが、より未分化な造血細胞が多数含まれていると考えられる。

表1 臍帯血および骨髄単核細胞におけるCD34⁺CD33⁺CD38⁺の発現

	CD34の 発現率(%)	CD34陽性細胞における発現率(%)	
		CD33	CD38
臍帯血 (n=5)	0.69 ± 0.43	28 ± 17	84 ± 8
骨髄血 (n=5)	1.97 ± 0.60	53 ± 18	94 ± 6

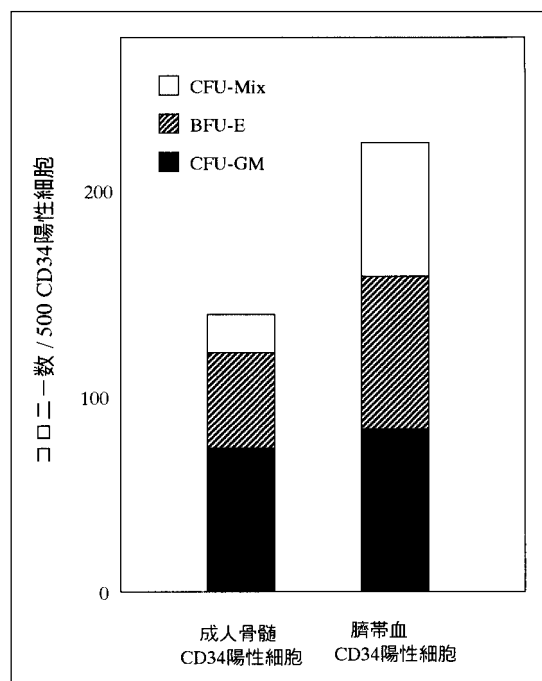
臍帯血中のCD34⁺細胞に含まれる造血前駆細胞

臍帯血および成人骨髄 CD34⁺ 細胞に含まれる造血前駆細胞を、コロニー形成細胞を指標として検討した⁶⁾。臍帯血および成人骨髄 CD34⁺ 細胞を、stem cell factor (SCF), interleukin (IL)-3, IL-6, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), erythropoietin (EPO), thrombopoietin (TPO) 存在下でメチルロース培養し、培養14日目に形成されるコロニーを解析してみると(図2),好中球,単球・マクロファージ,好酸球,好塩基球など,骨髄球系細胞の前駆細胞であるGM (granulocyte-macrophage) コロニー形成細胞 (CFU-GM: GM colony-forming unit) 数は臍帯血 CD34⁺ 細胞と成人骨髄 CD34⁺ 細胞との間に有意の差はないが,赤血球の前駆細胞である赤芽球バースト形成細胞 (BFU-E: erythroid burst-forming unit) 数は臍帯血 CD34⁺ 細胞中に多数含まれている。また,多能性造血前駆細胞に相当する混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix: mixed colony-forming unit) は,臍帯血 CD34⁺ 細胞中に著明に存在しており,この結果は,臍帯血 CD34⁺ 細胞は多数の未分化な造血細胞を含んでいるというフローサイトメトリーの結果とよく一致する。

さらに,臍帯血 CD34⁺ 細胞は,より未分化な造血細胞である LTC-IC (long-term culture initiating cell) 骨髄ストローマ細胞と5~8週間共培養しても,なおコロニー形成細胞を産生する能力を保持している細胞も多数含んでいることが報告されている⁷⁾。

臍帯血CD34⁺細胞の長期造血再構築能

前述のコロニー形成細胞やLTC-ICを測定する *in vitro* 法はあくまで造血前駆細胞を評価しているのであって,造血幹細胞の長期造血再構築能を評価しているわけではない。少なくとも現時点で信頼できる造血幹細胞の長期造血再構築能の評価法としては移植系以外ではなく,ヒトの場合は当然のことながら異種移植によらざるを得ない。そこで異種移植に伴う移植免疫反応を克服するために,ヒツジ胎仔

図2 臍帯血および成人骨髄 CD34⁺ 陽性細胞のコロニー形成能

や免疫不全 SCID (severe combined immuno-deficiency) マウスなどへの移植が試みられてきた^{8,9)}。しかし,これらの方法には,繁雑な処置が必要である,生着率が低いなどの問題があり,実用性という点では満足すべきものではなかった。ところが,最近新たに開発されたNOD (nonobese diabetic) /SCIDマウスは,成熟リンパ球欠損,マクロファージの活性低下,補体活性の低下,NK細胞活性の低下などの特徴を有し,ヒトサイトカインの投与を必要とせず,ヒト造血幹細胞が安定して生着することが明らかとなった¹⁰⁾。こうしたNOD/SCID,あるいはSCIDマウスの骨髄に生着可能なヒト造血細胞は,SRC (SCID mouse-repopulating cell) と呼ばれ,造血幹細胞に相当する細胞と考えられている。

そこで,臍帯血および成人骨髄中の CD34⁺ 細胞を,240rad 放射線照射したNOD/SCIDマウスに尾静脈から静注し,移植後10から12週で骨髄中のヒトのCD45⁺細胞の有無とその亜分画を解析することにより,臍帯血および成人骨髄 CD34⁺ 細胞中の造血幹細胞の長期造血再構築能について検討した⁶⁾。

表2に示すように,5 × 10⁴ 個以上の臍帯 CD34⁺ 細胞を8匹のNOD/SCIDマウスに移植すると,移植後10から12週には,全てのレシピエントの骨髄細胞の1/3から2/3がヒトCD45⁺細胞であることが確認された。これらのヒトCD45⁺細胞における各血球系マーカーの発現をみみると(図3),B細胞マーカー(CD19/CD10)を発現する細胞,

表2 臍帯血および成人骨髓 CD34 陽性細胞の長期造血再構築能

移植細胞数	生着マウス数／移植マウス数		骨髓における ヒトCD45陽性細胞の比率 (%)
	臍帯血	成人骨髓	
5 - 7 × 10 ⁴	5 / 5	0 / 3	40.1 ± 16.9
10 - 30 × 10 ⁴	3 / 3	0 / 2	68.9 ± 5.5

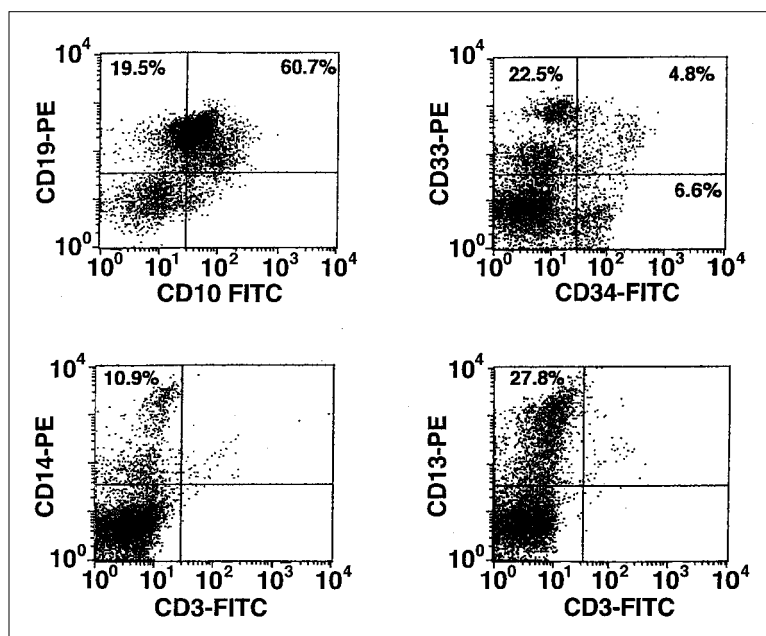


図3 臍帯血CD34陽性細胞を移植されたNOD/SCIDマウス骨髓におけるヒト造血の再構築

骨髓系細胞マーカー (CD13/CD14/CD33) を発現する細胞など種々の血球系の細胞が存在したことにより、これらのレシピエントの骨髓において臍帯血 CD34⁺ 細胞中の造血幹細胞がヒト造血を再構築したと考えられた。一方、成人骨髓細胞では、CD34⁺ 細胞を 3×10^5 個を移植してもヒト血液細胞の生着は認められなかった (表2)。このことより、臍帯血 CD34⁺ 細胞は、成人骨髓 CD34⁺ 細胞と比較して、より高い長期造血再構築能を有すると考えられる。

こうした臍帯血 CD34⁺ 細胞と成人骨髓 CD34⁺ 細胞の間で長期造血再構築能に差が生ずるメカニズムについてはいくつかの可能性が推定される。まず第一に、最も単純に臍帯血 CD34⁺ 細胞にはより多くの造血幹細胞が含まれている可能性が考えられる。次に、臍帯血造血幹細胞はより高い増殖能を有している可能性が考えられる。さらには、臍帯血造血幹細胞における接着分子やケモカインレセプターの発現は骨髓造血幹細胞のそれとは異なることが報告されているので^{11, 12)}、臍帯血造血幹細胞は骨髓造血幹細胞

と比較して、造血微小環境に生着しやすい性状を有しているのかもしれない。

臍帯血造血幹細胞の体外増幅の可能性

臍帯血中の造血幹細胞を用いた臍帯血移植の有用性は、多くの臨床報告からも明らかであるが、その一方でいくつかの問題点も指摘されている。なかでも最も大きな問題は、当然のことながら臍帯血の採取量には限界があるために、十分量の移植造血幹細胞の確保が困難な場合があることが挙げられる。そのため、ドナーが体重の大きな成人であるような場合、移植片としては適当な臍帯血があっても、移植成立に必要な量 (現在臍帯血移植には最低 2×10^7 個/kg の臍帯血が必要とされている) がいないため造血幹細胞移植に使用できないことがある。

こうした問題を克服するために、臍帯血中の造血幹細胞を体外増幅して移植することが試みられている。この点に関しては、これまでに述べてきたように、臍帯血中には高

い増殖能力を有する造血幹細胞が多数含まれていることを考えると、臍帯血は造血幹細胞の体外増幅に適した材料と言えるかもしれない。実際われわれは、SCF、Flk2/Flt3 リガンド、TPO、IL-6/可溶性 IL-6 受容体複合体を用いた培養系で、臍帯血 CD34⁺ 細胞中に含まれる SRC を 4.2 倍に増幅することに成功している¹³⁾。この増幅率により、計算上では、これまでならば 25kg までの小児にしか使用できなかった臍帯血が、体重 100kg の成人にも使用できることになる。

おわりに

臍帯血を新たな造血幹細胞の供給源とする臍帯血移植は、従来の骨髓移植に匹敵する治療法として定着しつつある。しかし、胎生期に起源に有する臍帯血造血幹細胞は、成人骨髓中の造血幹細胞とは異なる性質を有しており、臍帯血移植は骨髓移植とは全く同じではないことが明らかとなってきた。今後臍帯血造血幹細胞の性状を詳細に検討することにより、より安全で効率的な臍帯血移植が実現されることが考えられる。また、たとえば造血幹細胞の体外増幅法の開発のように、臍帯血造血幹細胞の特殊性をうまく利用することにより、臍帯血移植の問題点も克服されていくものと期待される。

文 献

- 1) Kondo M, Weissman IL, Akashi K: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in murine bone marrow. *Cell*, 91(5): 661-672, 1997.
- 2) Zeigler FC, Bennertt BD, Jordan CT, Spencer SD, Baumhueter S, Carroll KJ, Hooley J, Matthews W: Cellular and molecular characterization of the role of flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood*, 84: 2422-2430, 1994.
- 3) Sanchez MJ, Holmes A, Miles C, Dzierzak E: Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity*, 5: 513-525, 1996.
- 4) Yoder MC, Hiatt K, Dutt P, Mukherejee P, Bodine DM, Orlic D: Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity*, 7: 335-344, 1997.
- 5) Matsuoka S, Ebihara Y, Xu MJ, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H, Ueda T, Manabe A, Tanaka R, Ikeda Y, Nakahata T, Tsuji K: Cd34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood*, 97: 419-425, 2001.
- 6) Ueda T, Yoshida M, Yoshino H, Kobayashi K, Kawahata M, Ebihara Y, Ito M, Asano S, Nakahata T, Tsuji K: Hematopoietic capability of CD34⁺ cord blood cells: a comparison with CD34⁺ adult bone marrow cells. *Int J Hematol*, 73: 457-462, 2001.
- 7) Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM: a functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, 86: 3745-3753, 1995.
- 8) Zanjani ED, Pallavicini MG, Ascensao JL, Flake AW, Langlois RG, Reitsma M, MacKintosh FR, Stutes D, Harrison MR, Tavassoli M: Engraftment and long-term expression of human fetal hematopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J Clin Invest*, 89: 1178-1188, 1992.
- 9) Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, William DA, Dick JE: Identification of primitive hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nature Med*, 2: 1392-1396, 1996.
- 10) Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL, et al: Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*, 154: 180-191, 1995.
- 11) Timeus F, Crescenzo N, Marranca D, Dall Aglio M, Fazio L, Di Marco M, Saracco P, Ricotti M, Gabutti V: Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant*, 22(suppl.1): S61-S62, 1998.
- 12) Peled AI, Petit O, Kollet M, Magid T, Ponomarev T, Byk A, Nagler H, Ben-Hur A, Many L, Shultz O, Lider R, Alon D, Zipori D, Lapidot T: Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 283: 845-848, 1999.
- 13) Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, Mitsui T, Manabe A, Tanaka R, Kobayashi K, Ito M, Yasukawa K, Nakahata T: Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt-3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*, 105: 1013-1021, 2000.