

---

---

共培養法によるヒト造血細胞の増幅と骨髄再構築能に関する研究

---

---

課題番号：11670763

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金 基盤研究（C）（2）研究報告書

平成13年 3月

研究代表者 小林正夫

(広島大学教育学部教授)

## 【はじめに】

ヒト造血前駆細胞は細胞表面抗原やレセプター、細胞周期により純化が進められ、異種間移植の系を用いて造血細胞の長期骨髄再構築能が検討されている。我々はずでにヒト骨髄よりの造血細胞を CD34, CD117 (c-Kit), CD38 の発現からより未熟な造血細胞を純化し、各種造血因子に対する反応性を検討してきた (Kobayashi et al, Blood 88, 1996, Kobayashi et al, Int J Hematol 66, 1997)。さらには純化細胞の短期培養での骨髄再構築能を異種間移植の系より、培養細胞には長期再構築能を有した細胞の同定は不可能であった事実 (Shimizu, Kobayashi et al, Blood, 1998) から、現段階ではヒト造血細胞の培養系での長期生存能、増幅には間質細胞との共培養系が必要と考えられる。本研究ではヒト骨髄より Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) を用いて純化した造血細胞を種々の間質細胞株や骨髄由来間質細胞上での共培養系を確立し、造血細胞の生存と増幅を Non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency (NOD-SCID) マウスへの異種間移植の系を用いて解析した。異種間移植の系の確立はヒト造血細胞の長期骨髄再構築能を有する分画を明らかとすることが可能であり、ヒト造血細胞の純化と増幅についての多くの知見を与えてくれるものである。また、純化骨髄細胞と間質細胞の共培養系は造血細胞の増幅への間質細胞の重要性、異種間移植への間質細胞の必要性を明らかにできるものである。

さらに、骨髄造血細胞の純化は造血障害を呈する先天性骨髄機能障害を有する疾患での病因へのアプローチが可能であり、本研究では一部先天性好中球減少症の骨髄よりの純化造血細胞の造血因子に対する反応性、造血障害の機序の検討も併せて行った。

## 【研究組織】

研究代表者： 小 林 正 夫 (広島大学教育学部幼児保健学)  
研究分担者： 加 藤 修 (広島大学原爆放射能医学研究所環境変異部門)  
研究分担者： 佐 藤 貴 (広島大学医学部小児科学)

## 【研究経費】

平成11年度	1,900千円
平成12年度	1,600千円
計	3,500千円

## 【研究発表】

### (1) 学会誌等

Takashi Sato, Joseph H. Laver, and Makio Ogawa: Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 94: 2548-2554, 1999.

Nakao Konishi, Masao Kobayashi, Shin-ichiro Miyagawa, Takashi Sato, Osamu Katoh, Kazuhiro Ueda: Defective proliferation of primitive myeloid progenitor cells in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 94: 4077-4083, 1999.

Ken Kuramoto, Toshihiro Uesaka, Akiro Kimura, Masao Kobayashi, Hiromitsu Watanabe, and Osamu Katoh: ZK7, a Novel Zinc Finger Gene, Is Induced by Vascular Endothelial Growth Factor and Inhibits Apoptotic Death in Hematopoietic Cells. *Cancer Research* 60: 425-430, 2000

Shin-ichiro Miyagawa, Masao Kobayashi, Nakao Konishi, Takashi Sato, Kazuhiro Ueda: Insulin and Insulin-like Growth Factor-I Support the Proliferation of Erythroid Progenitor Cells in Bone Marrow through The Sharing of Receptors. *British Journal of Haematology* 109: 555-562, 2000

Sawai N, Koike K, Mwamtemi HH, Ito S, Kurokawa Y, Sakashita K, Kinoshita T, Higuchi T, Takeuchi K, Shiohara M, Kamijo T, Higuchi Y, Miyazaki H, Kato T, Kobayashi M, Miyake M, Yasui K, and Komiyama A: Thrombopoietin enhances neutrophil production by bone marrow hematopoietic progenitors with the aid of stem cell factor in congenital neutropenia. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 137-143, 2000.

Fumihito Tajima, Takashi Sato, Joseph H. Laver, and Makio Ogawa: CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 96: 1989-1993, 2000.

Kazuhiro Nakamura, Masao Kobayashi, Nakao Konishi, , Shin-ichiro Miyagawa, Hiroshi Kawaguchi, Takashi Sato, Hidemi Toyota, Yoshihiro Komada, Seiji Kojima, Osamu Katoh, and Kazuhiro Ueda: Abnormalities of Primitive Myeloid Progenitor Cells Expressing Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor in Patients with Severe Congenital Neutropenia *Blood* 96: 4366-4369, 2000.

(2) 口頭発表

T. Sato, M. Kobayashi, N. Konishi, S. Miyagawa, H. Kawaguchi, K. Nakamura, S. Kojima, O. Kato, H. Toyoda, and K. Ueda: Abnormalities of Primitive myeloid progenitor cells expressing G-CSFR in patients with congenital neutropenia. American Society of Hematology, 41st Annual Meeting. New Orleans, LA. *Blood* 94:430a, 1999.

H. Kawaguchi, M. Kobayashi, K. Nakamura, T. Sato, N. Konishi, S. Miyagawa, S. Kojima, H. Toyoda, Y. Komada, O. Katoh, and K. Ueda: Defective up-regulation of granular proteases genes in primitive myeloid progenitors during myeloid differentiation in patients with severe congenital neutropenia. American Society of Hematology, 42nd Annual Meeting. San Francisco, CA. *Blood* 96: 610a, 2000.

【結果】

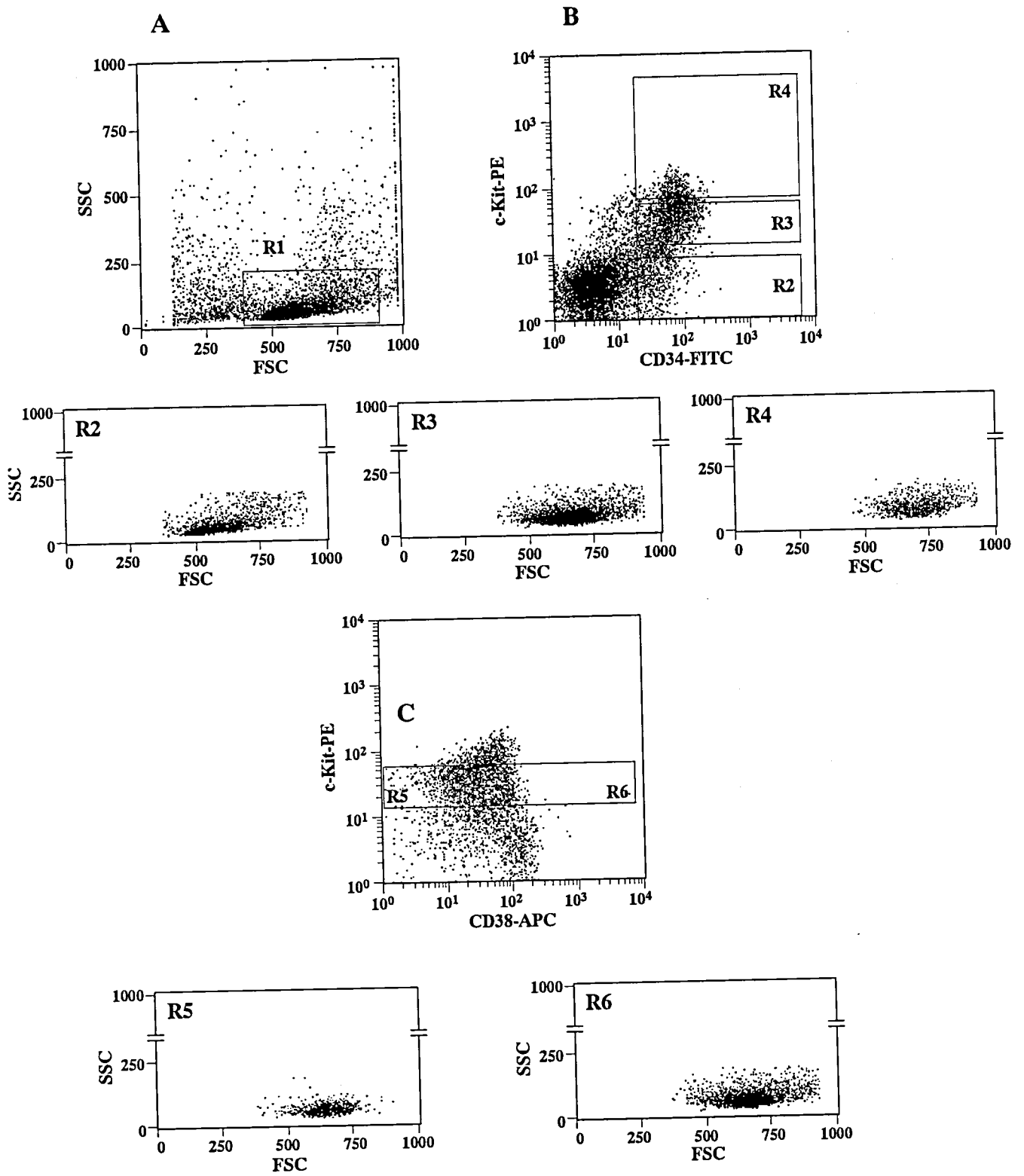


Figure 1 Representative Flow Cytometric Analysis of Bone Marrow Cells

Table 1 Expression of CD34, c-Kit, and CD38 on bone marrow cells

	Frequency (%)
CD34-positive in bone marrow cells	1.8 ± 1.1
c-Kit <sup>neg</sup> /CD38 <sup>neg/low</sup>	11.5 ± 8.0
c-Kit <sup>neg</sup> /CD38 <sup>high</sup>	41.6 ± 12.9
c-Kit <sup>low</sup> /CD38 <sup>neg/low</sup>	4.9 ± 1.5
c-Kit <sup>low</sup> /CD38 <sup>high</sup>	20.7 ± 6.3
c-Kit <sup>high</sup> /CD38 <sup>neg/low</sup>	2.6 ± 1.2
c-Kit <sup>high</sup> /CD38 <sup>high</sup>	18.8 ± 9.1

Frequencies of c-Kit and CD38 expressions were presented within CD34-positive cells.

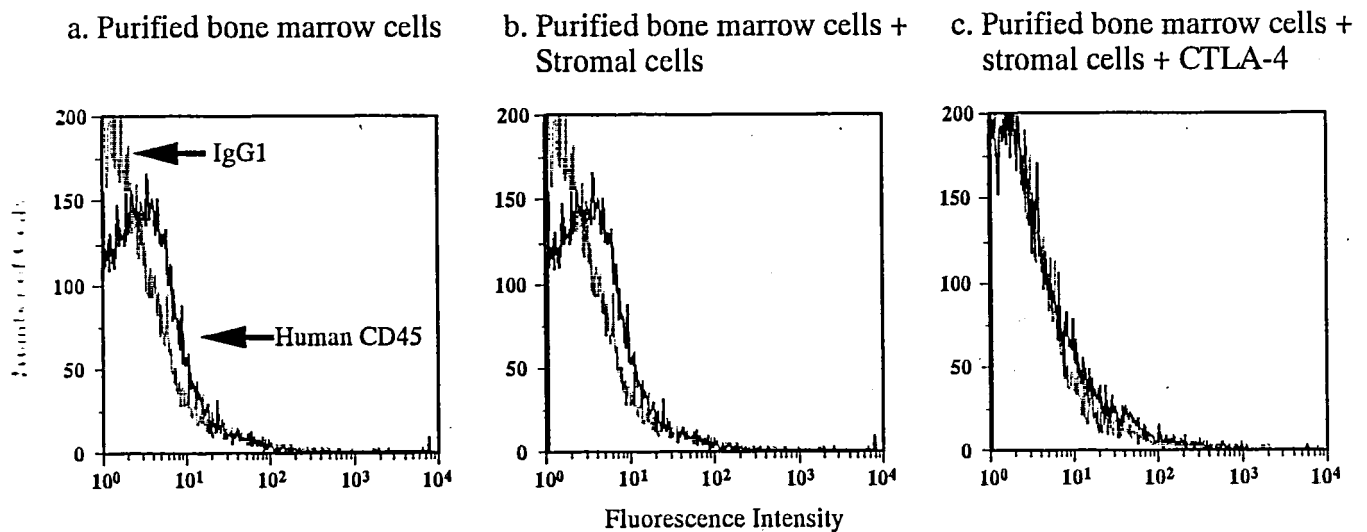


Figure 2 Human CD45-positive cells in mouse bone marrow