

日本財団補助金による
1999年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2000年3月10日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 娜依拉馬合木提
研究機関 岡山大学医学部第一内科 研究指導者 原田実根 職名 教授
所在地 〒700-8558 電話 (086)223-7151 内線 7227

研究テーマ 造血幹細胞移植後末梢血中に循環している造血前駆細胞の解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

平成9年 第40回日本臨床血液学会総会にて発表

平成10年 第60回日本血液学会総会にて発表

平成10年 The American Society of hematology (40th Annual meeting)にて発表

— 以上の発表内容は本研究の内容です。

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

(1) Analysis of circulating hematopoietic progenitor cells after peripheral blood stem cell transplantation. Int J Hematol 1999;69:36-42

(2) Hematopoietic progenitor cells from allogeneic bone marrow transplant donors circulate in the very early post-transplant period.

Bone Marrow Transplantation, 1999, 23, 659-665

(3) Very late Antigen-5 Leucocyte Function-Associated Antigen-1 are Critical For Early stage Hematopoietic Progenitor Cell Homing. Exp Hematol, (in press)

3. 今後の研究計画

今後は“血中遊離 DNA による癌の高感度遺伝子診断システムに関する基盤研究”とのテーマを目標にして、血液疾患を中心に末梢血遊離 DNA を高感度に検出でき、さらにその遺伝子異常を総合的に検出できる技術を開発し、癌の早期診断を実現するための研究を行う。

4. 研究指導者の意見

“血中遊離 DNA による癌の高感度遺伝子診断システムに関する基盤研究”は血液疾患に限らず他の悪性腫瘍の早期診断に役立つ有力な検査指標となっていく可能性があります。現在、マホモティ博士はがこの研究を熱心に進めているところで、今後の研究成果が期待されます。

研究指導者氏名

原田実穂



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

Analysis of circulating hematopoietic progenitor cells after peripheral blood stem cell transplantation

末梢血幹細胞移植後末梢血中に循環している造血前駆細胞についての検討

Naira Mahmut, Yoshio Katayama, Katsuto Takanori, Takanori Teshima, Yuji Ohno, Kenji Imajyo, Masamichi Hara, Katsuji Shinagawa, Fumihiko Ishimaru, Kazuma Ikeda, Kenji Niiya, Mine Harada

Xinjiang Medical University Urumqi, Xinjiang, 830000, China

原田実根教授 指導

Secend Deparetment of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan;

要 旨

造血幹細胞移植において、末梢血に輸注された造血前駆細胞の動態は明らかにされていない。今回我々は、末梢血幹細胞移植において、移植後骨髄に生着せず、末梢血を循環している造血前駆細胞の動態とその特徴について検討下。[方法] インフォームドコンセントの得られた auto-PBSC7 例、allo-PBSCT5 例につき、コンデイショニング前、移植直前 (day0), 移植後 day 1,2,3,5,7,10,14,17,21,28 まで、allo-PBSCT では同様に day35 までに末梢血 10ml を採血し、これから得られた単核球を用いて、BFU-E, CFU-GM をメチルセルロース法にてアッセイした。また、移植細胞と day1 末梢血について HPP-CFC アッセイを行った。次に、フローサイトメトリーで移植細胞と day1 末梢血の CD34 陽性細胞上の CD38, HLA-DR, VLA-4, VLA-5 の発現について測定した。

KEY WORDS

※自己末梢血幹細胞移植: autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto-PBSCT)

※同種末梢血幹細胞移植: allogeneic - PBSCT (allo- PBSCT)

※移植後末梢血循環造血前駆細胞: posttransplant circulating progenitor cells (PTCPC)

【目的】

造血幹細胞移植において、経静脈的に輸注された造血前駆細胞の動態は明らかにされていない。われわれは、移植された造血幹細胞の骨髓へのホーミング機構解明を目的として、allo- PBSCT および auto- PBSCT 後早期に、骨髓に生着せず末梢血を循環している造血前駆細胞の動態とその特徴について検討した。

【材料と方法】

1. 細胞の準備と前駆細胞アッセイ

インフォームドコンセントの得られた auto-PBSCT 7 例、allo-PBSCT 5 例を検討の対象とした。auto-PBSCT ではコンデイショニング前、移植直前 (day0)、移植後 day 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 28 まで、allo-PBSCT では同様に day35 まで末梢血 10ml をヘパリン加採血した。PBS で 5 倍に薄め、Ficoll/Hypaque による比重遠沈法を用いて末梢血の単核球を分離し、PBS で 2 回洗浄を行った。回収した単核球は day0 から day14 までは細胞数が少ないため、細胞数を調整せず、全ての細胞を用いてアッセイを行った。day17 以降は細胞の最終濃度を $3 \sim 5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整した。培養は 35mm ペトリディッシュを用い、triplicate で 5%CO₂、37°C の湿潤な条件のもとで 14 日間培養した。培養終了後、40 個以上の細胞によって形成される BFU-E と CFU-GM のコロニー数を倒立顕微鏡を用いてカウントし、triplicate の平均値で示した。造血前駆細胞の培養には、IMDM にメチルセルロース 0.88%、ウシ胎児血清 30%、Stem cell factor (SCF) 50ng/ml, interleukin-3 (IL-3) 10ng/ml, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 10ng/ml, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 10ng/ml, erythropoietin (Epo) 3U/ml, 1% bovine serum albumin, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 2-メルカプエタノール, 2mM L-glutamine を含んだものを使用した。

HPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cells) アッセイでは最終細胞濃度を $0.5 - 1 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整して培養した。同じ条件下で 28 日培養後、直径 1mm 以上のコロニーを HPP-CFC としてカウントした。

2. フローサイトメトリー

Allo-PBSCT 5 例において、移植細胞と day 1 末梢血から得られた CD34 陽性細胞の表面マーカーと接着因子の発現を調べた。細胞表面マーカーとしては CD38, HLA-DR の各抗原、接着分子としては VLA-4, VLA-5 分子をそれぞれのモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。ドナ-から採取された末梢血幹細胞と day 1 末梢血を溶血剤を用いてそれぞれ室温で 10 分間のインキュベーションによる混入赤血球の溶血操作を行った後、PBS で細胞濃度を $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整した。次に、1.0% マウス血清 PBS を添加し、4°C にて 10 分間インキュベートして非特異反応のブロッキングを行った後、モノクローナル抗体を添加し、4°C、遮光にて 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、PBS にて 2 回洗浄をし、1% paraformaldehyde を用いて固定操作を行い、フローサイトメトリー (FACScan) で細胞表面マーカーの発現を測定した。

【結果】

1. PTCPC の動態

移植前(day0)の BFU-E と CFU-GM は0であったが、移植後 day1 には上昇が見られた。auto-PBSCT において day 末梢血 10ml あたりの BFU-E は 23-162、CFU-GM は 7-119 であったが、day2~5 には減少し、day7 から白血球の回復とともに再び上昇が見られた。allo-PBSCT においては day1 末梢血 10ml あたりの BFU-E は 18-47、CFU-GM は 15-61 であったが、day2~7 には減少し、day10~14 に白血球の回復とともに再び上昇が見られた。

2. HPP-CFC

allo-PBSCT 5例で移植した末梢血幹細胞と day 1 末梢血単核細胞を用いて HPP-CFC アッセイを行った。その結果、移植細胞中の骨髓球系コロニーのうち、HPP-CFC が占める割合は $17.4 \pm 13.0\%$ (n=5) であったが、day 1 末梢血の場合は $65.6 \pm 12.7\%$ (n=5) と移植細胞より有意(p=0.0013)に高かった。

3. フローサイトメトリー

allo-PBSCT 5例において、移植細胞と day 1 末梢血単核球における CD34 陽性細胞上の表面マーカーの 2 カラー・フローサイトメトリー解析を行った。その結果、CD34⁺CD38⁺細胞が移植した造血前駆細胞の大半を占めたが、移植細胞と比べ day 1 末梢血の方がその占める割合は少なかった一方、CD34⁺CD38⁻細胞の割合は、day 1 末梢血の方が移植細胞より有意に高かった($57.5 \pm 17.6\%$ vs $11.7 \pm 4.9\%$, n=5, p=0.005)。しかし、day 1 末梢血と移植細胞における CD34⁺HLA-DR⁻, CD34⁺VLA-4⁻, CD34⁺VLA-5⁻ 細胞の割合においては、有意差は認められなかった。

【考察】

造血細胞移植後の造血回復は、骨髓に生着した造血幹/前駆細胞の分化・増殖により担われていると考えられている。しかし、移植後に骨髓に生着せず、そのまま末梢血中を循環しながら分化・増殖し、造血回復の一端を担っている造血前駆細胞の有無は明らかにされていない。われわれはその PTCPC の動態を明らかにした。そして、移植前 day0 の日に0であった末梢血循環造血前駆細胞が day1 には増加していることを見出した。さらに、移植細胞と比較し day1 末梢血の方が CD34⁺CD38⁺細胞よりも CD34⁺CD38⁻細胞を多く含んでいること、また、骨髓球系コロニーのうち HPP-CFC の占める割合も day1 末梢血の方が多いことが分かった。PTCPC の再上昇は、auto-PBSCT では day7 に、allo-PBSCT では day10~14 に見られた。

既発表論文によると、allo-PBSCT において CD34⁺細胞の大半は移植後 6 時間以内に速やかに末梢血から消え、わずかの数の CD34⁺細胞が増加し始める day 8 まで末梢血に循環し、白血球の回復は CD34⁺細胞の増加より遅れたと報

告されている。本実験においても同じ結果が得られた。

HPP-CFC が未熟な前駆細胞であることはすでに知られているが、CD34⁺CD38⁻細胞もしばしば未熟な前駆細胞を含んでいる。allo-PBSCT において、day1 末梢血中の骨髓球系コロニーのうち HPP-CFC の占める割合は、移植細胞と比較し有意に高かった。さらに、CD34⁺CD38⁻細胞は allo-PBSCT 後 12-15 時間たっても測定できた。CD34⁺CD38⁺細胞は分化した前駆細胞を含んでいる細胞分画であるが、day 1 末梢血にはわずかしか測定出来なかった。しかし、CD34⁺CD38⁻細胞は測定可能だった。これらのことから、未分化な細胞の方が移植後末梢血を循環しやすい傾向にあるのではないかと考えられた。しかし、その移植後早期に末梢血を循環している未分化な造血前駆細胞は最終的に骨髓に生着するのか、それとも、生着せずに肺などの臓器にトラップされるのかは不明であった。Osogoe らや他の研究者らは、ラットとマウスの移植において、移植した細胞は主に肺、脾、肝臓等の臓器に定着すると報告している。我々の実験における、CD34⁺CD38⁺細胞が day 1 末梢血にわずかしかいなかったことは、ほかの臓器に定着してしまった可能性があることを示唆している。

接着分子 VLA-4, VLA-5 は造血組織の微小環境と造血前駆細胞の接着において非常に重要な役割を果たしていることは既に報告されている。今回の検討では、day 1 末梢血中の CD34 陽性細胞上の VLA-4, VLA-5 の発現率は移植細胞と比較し有意差が認められなかった。したがって、末梢血幹細胞移植において、VLA-4, VLA-5 の幹細胞や前駆細胞のホーミング機構における役割については明かではないと考えられた。

【結論】

末梢血幹細胞移植後早期に、未分化なものも含んだ造血前駆細胞が、末梢血を循環していることが明かとなった。

【参考論文】

1. Harada M, Akashi K, Hayashi S et al. G-CSF-combined marrow-ablative chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation for the treatment of patients with acute myelogenous leukemia in first remission. *Int J Hematol* 1997; 66: 297-301.
2. Legros M, Dauplat J, Fleury J et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue in patients with stage to ovarian cancer: long-term results. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1302-1308.
3. Pattengell R & Testa NG. Biology of blood progenitor cells used in transplantation.

Int J Hematol. 1995; 61: 1-15.

4 . Korbling M, Przepiora D, Huh YO et al. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 1995; 85: 1659-1665.

5 . Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1995; 85: 1655-1658.

6 . Schmitz N, Dreger P, Suttorp M et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony stimulating factor). *Blood* 1995; 85: 1666-1672.

7. Dreger P. Allogeneic transplantation on mobilized peripheral blood progenitor cells: Towards tailored cell therapy. *Int J Hematol* 1997; 66: 1-11.

8. Yano T, Katayama Y, Sunami K et al. G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells for allografting: comparative study of daily single versus divided dose of G-CSF. *Int J Hematol* 1997; 66: 169-178.

9 . Casado LF, Steegmann JL, Pico M et al. Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 405-409.

10 . Katayama Y, Yano T, Bessho A et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 283-287.

11 . McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM et al. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989; 74: 609-612.

12 . McNiece IK, Bertoncello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *Int J Cell Cloning* 1996; 8: 146.

13 . J.S. Haug. Circulation of donor progenitor cells following allogeneic peripheral

blood stem cell transplantation. *Blood* 1997; 90: 99a [436]

14 . Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77: 1218-1227.

15 . To LB, Haylock DN, Dows T et al. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1994; 84: 2930-2939 .

16 . Osogoe B, Omura K. Transplantation of hematopoietic tissues into the circulating blood. *Anat Rec* 1950; 108: 663-685.

17 . Kretchmer AL, Conover WR. Colony-forming cells in the spleen: Determination of the fraction transplanted. *Transplantation* 1969; 8: 576-581.

18 . Lahiri SK, van Putten LM. Distribution and multiplication of colony-forming units from bone marrow and spleen after injection in irradiated mice. *Cell Tissue Kinet* 1969; 2: 21-28.

19 . Testa NG, Lord BI, Shore NA. The in vivo seeding of hemopoietic colony forming cell in irradiated mice. *Blood* 1972; 40: 654-661.

20 . Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 1991; 352: 438-441.

21 . Kerst M, Sanders JB, Slaper-Cortenbach ICM et al. $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* 1993; 81: 344-351.

22 . Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW, Berndt MC, Haylock DN, Simmons PJ. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1994; 153: 4673-4683.

23. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9374-9378.
24. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 9647-9651.
25. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA-4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. Blood 1997; 90: 4779-4788.