

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3421741号
(P3421741)

(45) 発行日 平成15年6月30日 (2003. 6. 30)

(24) 登録日 平成15年4月25日 (2003. 4. 25)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

Z

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2000-146102(P2000-146102)
(22) 出願日 平成12年5月18日 (2000. 5. 18)
(65) 公開番号 特開2001-321434(P2001-321434A)
(43) 公開日 平成13年11月20日 (2001. 11. 20)
審査請求日 平成12年5月18日 (2000. 5. 18)

(73) 特許権者 391012361
筑波大学長
茨城県つくば市天王台1丁目1番地の1
(72) 発明者 大島 宣雄
茨城県つくば市小野川8-20
(72) 発明者 三好 浩稔
茨城県つくば市竹園2-808-304
(72) 発明者 テイン トゥン
茨城県つくば市春日4-18-8 コーポ
あらい208
(74) 代理人 100059258
弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

審査官 高原 慎太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工骨髄、血球細胞の増殖方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体、及び前記担体に担持して培養した造血を支持する機能を有する細胞を備える人工骨髄を、ヒトを除く動物に移植をすることにより又はヒトを除く動物の体外において当該人工骨髄中に血液を循環させることによって、前記人工骨髄中において造血幹細胞を増殖させ、更に当該造血幹細胞を血球細胞へ分化させる過程により構成される、血球細胞の増殖方法。

【請求項2】 前記造血を支持する機能を有する細胞が骨髄支持細胞である、請求項1記載の血球細胞の増殖方法。

【請求項3】 前記担体が微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子からなる、請求項1記載の血球細胞の増殖方法。

【請求項4】 前記担体がポリビニルフォルマール樹脂

である、請求項3記載の血球細胞の増殖方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、担体、及び当該担体に担持して培養した造血を支持する機能を有する細胞を備える、新規な人工骨髄に関する。更に本発明は、前記の人工骨髄を、動物に移植をすることにより又は動物の体外においてその人工骨髄中に血液を循環させることによって、人工骨髄中において造血幹細胞を増殖させ、更に造血幹細胞を血球細胞へ分化させる過程により構成される、血球細胞の増殖方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 血液には多種の細胞が存在し、酸素の輸送から抗体の産生まで、多様な機能を営んでいる。血液細胞の寿命には限りがあるので、常に再生産されている

必要がある。この様に血液細胞の機能は多様であるが、全ての血液細胞は正常時には骨髄において産生され、骨髄中に存在する共通の造血幹細胞から生み出されている。造血幹細胞は多機能性であり、そこからいろいろな最終分化をした血液細胞が作り出される。

【0003】よって、再生不良性貧血、白血病やリンパ組織の疾患のために造血機能が障害されている場合には造血幹細胞を移植することにより治療することが可能となる。その際に、骨髄や臍帯血に含まれている造血幹細胞移植、およびこれらの細胞と骨髄支持細胞の同時移植が近年行われ始めている。骨髄支持細胞の機能については、後に詳しく述べる。

【0004】造血幹細胞移植等の従来の方法においては、通常は患者の血管内に直接細胞が移植されている。しかし、造血機能障害などの治療の際には、患者自身の障害された造血機能を抑制するために化学療法や放射線治療が用いられ、これらの処置が患者自身の支持細胞層に障害を与えるために、支持細胞層は再生が困難であり、造血機能の再生も不十分であった。加えて、移植した造血系細胞が他の臓器に捕捉されるために骨髄に生着する細胞が少なく、更に骨髄細胞と一緒に移植できる支持細胞の量に限りがあるため、患者の造血機能を代行するには不十分であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】よって本発明の課題は、骨髄支持細胞層の機能が低下した患者においても機能し、造血機能を代行させることができる、新規の人工骨髄を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】骨髄中には、多機能性の幹細胞、分化途中の血液前駆体細胞、および骨髄支持細胞が存在している。骨髄支持細胞とは、結合組織細胞、コラーゲン繊維や他の細胞外マトリックス成分でできた、精巧な編み目状の支持組織を構成している細胞である。即ち、支持細胞とは造血細胞を支持している構造体の総称であり、血液系の実質細胞以外を示すものである。その様な支持細胞層を構成している細胞としては、内皮細胞、繊維芽細胞、脂肪細胞、骨芽細胞があり、その他にコラーゲン、フィブロネクチンなどが含まれる。

【0007】骨髄支持細胞はそれ自身は造血機能を有さないが、造血細胞、とりわけ造血幹細胞の機能を補助する役割を有しており、造血機能を発揮させるには骨髄支持細胞が存在することが必須である。移植した造血幹細胞を体内で増幅することを目的として、体内での造血幹細胞の増殖に及ぼす、骨髄支持細胞の影響に関する研究も増えつつある。

【0008】本発明者らは、造血に及ぼす骨髄支持細胞層の機能に注目し、骨髄支持細胞を3次元培養担体に固定化させた状態で生体内に移植することを試みた。即ち、従来のように造血幹細胞や骨髄支持細胞を直接血管

内に移植するのではなく、担体に骨髄支持細胞層を形成した「担体 - 細胞複合体」を移植することで十分な機能を有する骨髄支持細胞を供給し、それによってより良好な微小環境を提供することで髄外造血を行い、造血機能障害などの治療に応用するというものである。その様に作製した「担体 - 細胞複合体」を生体内に移植したところ、造血機能を有する血球細胞が附着して増殖していることが確認された。即ち、3次元培養用担体に固定化した骨髄支持細胞を移植することで、移植複体内で造血機能が再生されていると考えられた。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明は、担体に動物の骨髄支持細胞を附着させた複合体を培養することにより作製される、人工骨髄である。上述した様に、骨髄中に存在する細胞として、多機能性の幹細胞、分化途中の血液前駆体細胞、および骨髄支持細胞が挙げられる。その様に、骨髄細胞中には支持細胞が含まれているために、骨髄細胞を採取して前記の担体上で骨髄細胞を培養することにより、担体に骨髄支持細胞を附着させることができる。そして、それを培養することにより、担体に骨髄支持細胞層を形成した、本発明の人工骨髄を調製することができる。本発明の人工骨髄は、結合組織である骨髄支持細胞層が形成されているために、血液幹細胞を含む血球細胞を附着させることができる。骨髄支持細胞は培養を開始した後に比較的早期に担体に附着し、一方培養期間が長過ぎても骨髄支持細胞の生育状態が劣化してしまう。そのために、本発明の人工骨髄において支持細胞層を形成するために、骨髄支持細胞を附着させた複合体を培養する期間は1日から2カ月であり、より好ましくは複合体の培養期間は2週間から4週間である。

【0010】そして、本発明の人工骨髄を動物体内に移植するか、又は血液を体外循環させることにより、前記支持細胞 - 担体複合体に造血幹細胞を附着させ、増殖させることにより造血機能を与えることができる。造血幹細胞は未分化細胞であるために本発明の人工骨髄中で増殖させることができ、増殖した幹細胞は種々の成熟血球細胞へ分化して血球細胞としての機能を果たす。その様に、骨髄支持細胞を附着させた当該複合体は、血球細胞を増殖させるための温床とすることが可能であるために、造血機能を有する人工骨髄として機能させることができる。本発明の人工骨髄を動物に移植を行う場合に、移植の場所は特に限定されないが、好ましくは皮下、腹腔内あるいは血球細胞の産生に關与する脾臓である。また、移植後3週間ないし6週間程度で、上記の造血機能が認められる様になる。

【0011】本発明の人工骨髄に用いる担体は、骨髄支持細胞が前記担体中に保持されて、生体適合性を有し、外部に流出せず、細胞の附着および生育がスムーズに行われる限り、特に限定されるものではない。造血を支持する機能を有する細胞としては、骨髄から得た骨髄支持

細胞を用いることが一般的であるが、その他臍帯血、胎児肝臓、OP9等の樹立された株化細胞などの間葉系の細胞を用いることができ、造血機能を支持する役割を有していれば、特にその由来は限定されない。また、前記担体は、水及び培地中で変質せず、高圧滅菌に耐え得る様な性質を有し、さらに弱酸やアルカリ及び多くの有機溶媒に対して耐薬品性を示し、化学的に安定なものが好ましい。しかし、骨髄支持細胞を多く付着させるために、単位面積当たりの表面積が広い、微孔性の立体網状多孔質構造を有する粒子状の担体が好ましい。その様な好適な担体の例として、ポリビニルフォルマール樹脂、高分子材料を発泡又は多孔質化させたもの、ステンレススティール製の焼結金属担体、多孔質のガラスやセラミック、さらに、キトサン、セルロース、デキストランなどの天然由来の高分子物質で多孔質構造を有するものなどが挙げられる。

【0012】

【実施例】(人工骨髄の作製)多孔質のポリビニルフォルマール(PVF)樹脂を高圧蒸気滅菌した後、phosphate buffered saline (PBS) で2回洗浄した。ここで用いたPVF樹脂は、平均孔径130 μ m、10x10x2mmであり、0.06%のI型コラーゲンで被覆されている。6週齢から8週齢の、雄のC57BL/6Nマウスを用いて、その大腿骨、および脛骨から、シリンジと25Gの針を用いて、MEM培地でフラッシュすることにより、支持細胞を含む骨髄細胞を得た。得られた細胞を70 μ mの径をもつメッシュに通すことで、細胞凝集塊や不純物を取り除いた。

【0013】最終的に得られた骨髄細胞2x10⁷個を、内径35mmの培養用ディッシュ内に静置したPVF樹脂の上部から注入することにより担体に播種した。この細胞を、下記の培地を用いて2週間培養することにより骨髄支持細胞層をPVF上に形成させた。ここで培養に用いた培地は、-MEM培地に、10%ウシ胎児血清(FBS)、10%ウマ血清、10⁻⁷Mデキサメタゾン、5x10⁻⁵M 2-メルカプトエタノール及び0.2%抗生物質を添加した組成から成る培地である。このとき、培地交換は週に2回行った。

【0014】(組織化学的解析)培養により得られたPVF-骨髄支持細胞層複合体を、C57BL/6Nマウスの背中の皮下に移植した。移植後6週間複合体を摘出し、PVF内部の細胞をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色により観察した。対照実験は、骨髄細胞を播種していないPVFのみを移植して、HE染色による観察を行った。図1は、PVF樹脂内で増殖した細胞のHE染色の写真である。左の2枚は動物への移植前のものであり(図1a: PVFのみ、図1b: 骨髄細胞を播種したもの)、右の2枚は動物への移植後のものである(図1c: PVFのみ、図1d: 骨髄細胞を播種したもの)。図1から、PVF上にいったん骨髄支持細胞層を形成させたのち移植したものでは、PVF内に血液系細胞が多数存在しており(図1d)、PVF内で造血機能が再生されていたものであることが明らか

になった。一方、PVFのみを移植したものでは、PVF内には繊維芽細胞由来の組織が構築されており、血液系の細胞は全く認められなかった(図1c)。

【0015】(FACSによる血球細胞の解析)人工骨髄に含まれる血球細胞を、FACSにより解析を行った。なお、FACSとは遊離した細胞を蛍光色素で染色した後に細い管を通過させる際、レーザー光線を当てて、その細胞から発生する蛍光の強弱により、細胞の分画を解析する方法である。骨髄細胞を播種したPVF樹脂を6週間培養し、0.2%トリプシン-EDTAとコラゲナーゼを含む溶液を用いて軽くピペッティングすることにより、付着している細胞を担体から剥離した。これらの細胞を70 μ mのナイロンフィルターに通して細胞塊を除去し、得られた細胞を染色培地(PBS+2%FBS+0.5%アジ化ナトリウム)にて2回洗浄した。その後、1-2x10⁵ cells/mlとなるように、細胞を染色用培地中に懸濁した。

【0016】細胞に、以下の様な100倍希釈した各種の血球系細胞に特異的な抗体を加え、15分間氷温中で保持した。ここで、血球系細胞のマーカーである抗Ly5.2抗体に加えて、特異的な血球細胞を認識する抗体である抗MAC1抗体、抗Gr1抗体、抗Ter119抗体、抗B220抗体、又は抗CD4/CD8抗体のいずれかを用いて、どの様な血球細胞が存在しているか後にFACSで検出を行うための標識とした。なお、抗MAC1抗体はマクロファージマーカー、抗Gr1抗体は顆粒球マーカー、抗Ter119抗体は赤血球マーカー、抗B220抗体はBリンパ球マーカー、CD4/CD8抗体はTリンパ球マーカーである。抗Ly5.2抗体はFITC標識し、その他の抗体はビオチン標識して使用した。

【0017】その後、細胞を染色用培地で2回洗浄し、二次抗体として200倍希釈したstreptavidin-phycoerythrin染色液を加えて、再度15分間氷温中で保持した。細胞を染色用培地で洗浄し、500倍希釈したpropidium iodide (PI) 溶液を加え、FACSによる解析を行うまで氷温中に保存した。FACS (FACS Vantage, Becton-Dickinson, CA, USA) を用いた解析では、まずPI (死細胞を特異的に染色する) により死細胞を除去した。そして、Ly5.2陽性細胞10000個について、前記の各種血球系細胞に特異的なマーカーを指標としてFACSにより解析した。その結果、6週間培養した担体における血球細胞の組成は、マクロファージが70.05% (上段真ん中)、顆粒球が28.83% (上段右側)、赤血球が0.34% (下段左側)、Bリンパ球が0.27% (下段真ん中)、Tリンパ球が0.51% (下段右側) であり、大部分がマクロファージと顆粒球であった(図2)。

【0018】上述した様に、図2の結果はPVF-支持細胞複合体を動物の皮下に移植をしないで6週間培養を行って得た結果であるが、支持細胞の他にマクロファージ、顆粒球等の分化した血球細胞が認められた。基本的には骨髄支持細胞層が存在しないと血液幹細胞や血球前駆細胞は増殖ができないが、支持細胞と共に担体に付着した

幹細胞や前駆細胞が増殖し、1回播種を行った場合でも分化した血球細胞が認められたものと思われる。

【0019】また、PVF上で骨髄細胞を2週間培養することによってPVF上にいったん骨髄支持細胞層を形成させた後に、当該PVF-支持細胞複合体をマウス皮下に移植し、その6週間後に同様にFACS解析を行った。結果を図3に示す。その結果、血液細胞の組成はマクロファージ+顆粒球が70%（上段右側）、Bリンパ球が10%（下段左側）、Tリンパ球が20%（下段右側）であり、やはり大部分はマクロファージや顆粒球であった。しかし、図2の結果と異なり、マウス皮下に移植した場合には、Bリンパ球やTリンパ球もかなり認められたことから、造血機能が再生されていることが判った。

【0020】（コロニーアッセイによる解析）マウス皮下に移植したPVF-支持細胞複合体を取り出し、PVF内部の細胞をFACS解析と同様の方法によりPVFから剥離した。これらの細胞を70 μ mのナイロンフィルターを通して細胞塊を除去し、得られた細胞をPBSで洗浄したのち、サンプルあたり3x10⁴個となるように細胞数を調製した。

【0021】コロニーアッセイは、この細胞を35mmディッシュ中で、1mlのコロニーアッセイ用培地を用いて1週間培養することにより行った。コロニーアッセイ用培地は、Stem Cell Technology社製（Vancouver, Canada）M3334（1%メチルセルロースを添加したIscove's MEM培地に、15% FBS、1%ウシ血清アルブミン（BSA）200 μ g/mlトランスフェリン、10 μ g/mlインシュリン、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、3U/ml エリスロポエチン、を加えたもの）に500ng/ml幹細胞因子を添加したものをを用いた。1週間培養を行ったのち、それぞれのコロニー形成ユニット（colony forming unit：CFU）は、顕微鏡下でコロニーの形態を観察することにより判別した。

【0022】コロニーアッセイを行った結果を表1に示す。表1における数字は、得られたコロニーの数を示す。なお、BFU-EはBurst-forming unit-erythroid、CFU-GMはColony-forming unit-granulocyte-macrophage、CFU-GEM/GEMMはColony-forming unit-granulocyte-macrophage-erythroid/granulocyte-macrophage-erythroid-megakaryocyte、CFU-BはColony-forming unit-B lymphocyteの、それぞれ略称である。なお、BFU-Eは赤血球前駆細胞、CFU-GMは顆粒球とマクロファージを産生する前駆細胞、CFU-GEM/GEMMは巨核球、顆粒球、マクロファージ、赤血球を産生する前駆細胞、CFU-BはBリンパ球

を産生する前駆細胞である。

【0023】

【表1】

BFU-E	0
CFU-GM	16 \pm 1
CFU-GEM/GEMM	1 \pm 2
CFU-B	7 \pm 1

【0024】移植したPVFと支持細胞層複合体には造血機能はないことから、これらの前駆細胞は、移植されたレシピエントのマウス由来の造血因子が移植PVF内で造血機能を再構築した結果であると考えられる。移植したPVFがレシピエントマウスにより免疫拒絶された場合には、レシピエント由来のTリンパ球が多量に存在することになる。このTリンパ球は成熟細胞であり、コロニー形成能をもたない。従って、コロニーアッセイの結果CFUは全く観察されないことになる。しかし、本実験では以上のようにかなりの数のCFUが得られたことから、移植したPVFと支持細胞層複合体内においてレシピエントマウスの造血機能が再生され、いわゆる髄外造血が達成されたことが示された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、担体、及び当該担体に担持して培養した造血を支持する機能を有する細胞を備える、新規な人工骨髄が与えられた。更に本発明により、前記の人工骨髄を、動物に移植をすることにより又は動物の体外においてその人工骨髄中に血液を循環させることによって、人工骨髄中において造血幹細胞を増殖させ、更に造血幹細胞を血球細胞へ分化させる過程により構成される、血球細胞の増殖方法が与えられた。本発明の人工骨髄は、骨髄支持細胞の機能が低下した患者においても、造血機能を代行することができる。

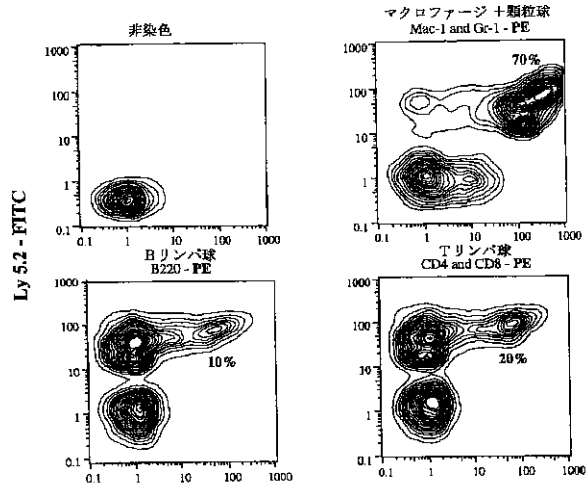
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、骨髄細胞を播種した又は播種しなかったPVF樹脂内で増殖した血球細胞を、皮下移植前後で検出した写真である。

【図2】図2は、骨髄細胞をPVF樹脂に播種した後に、6週間培養を行った後に存在する血球細胞を、FACSにより解析を行った結果の図である。

【図3】図3は、支持細胞層を形成したPVF樹脂をマウス皮下に移植し、6週間経過した後に存在する血球細胞を、FACSにより解析を行った結果の図である。

【図3】



フロントページの続き

特許法第30条第1項適用申請有り 2000年3月1日 American Society for Artificial Internal Organs 発行の「A Peer Reviewed Journal of the American Society 2000 Abstracts & Information for the Artificial Internal Organs 46th Annual Conference at the Hilton New York - June 28 - July 1, 2000」をもって発表

(56)参考文献 特開 平8 - 336584 (JP, A)
特表 平4 - 501657 (JP, A)
国際公開99/25391 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61L 24/00 - 33/18
CA (STN)
MEDLINE (STN)
WPI (DIALOG)