
ヒト臍帯血中に存在する可塑性を有する幹細胞の新たな細胞療法への可能性の検討

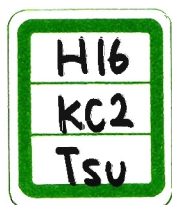
(課題番号 15591088)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書



平成 17 年 3 月

研究代表者 鶴田 敏久
(東京女子医科大学医学部)



は し が き

最近の著しい発生・再生医療の進歩により生体内に存在する種々の組織幹細胞は可塑性を有し、与えられた環境に応じて様々な細胞に分化する可能性が示唆されている。臍帯血は新たな移植細胞の供給源として、造血細胞移植における有用性は確立しつつある。この臍帯血が種々の器官形成過程にある胎生期に出現することにより、臍帯血中には血液細胞の供給源ばかりではなく、より多様な可能性を有する幹細胞が存在すると考えられ、それらの未分化な幹細胞は高い可塑性を有していると考えられる。その可塑性を制御できれば、その幹細胞を移植片として、種々の組織細胞への再生をめざした新たな細胞療法が開発できると考えられる。本研究では、臍帯血細胞の持つポテンシャルを、特に血管内皮細胞と共通の幹細胞であるヘマンジオブラストや臍帯血幹細胞の分化に関係するエストロゲンレセプターなどに着目し、検討を行った。

尚、この研究の遂行にあたり、多大のご協力をいただいた東京大学医科学研究所・細胞療法研究分野、分子療法研究分野、遺伝子検査室のスタッフの方々、また、本研究に多大のご援助をいただいた日本学術振興会の方々に深謝いたします。

研 究 組 織

研究代表者 : 鶴田 敏久 (東京女子医科大学医学部講師)
研究分担者 : 辻 浩一郎 (東京大学医科学研究所助教授)
研究分担者 : 東條 有伸 (東京大学医科学研究所教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成 15 年度	2,300		2,300
平成 16 年度	1,400		1,400
総 計	3,700		3,700

研究発表

(1) 学会誌等

1. Wada M, Ebihara Y, Ma F, Yagasaki H, Ito M, Mugishima H, Takahashi T, Tsuji K: Tunica interna endothelial cell kinase expression and hematopoietic and angiogenic potentials in cord blood CD34+ cells. *Int J Hematol* 77: 245-252, 2003
2. Hasegawa D, Manabe A, Kubota T, Kawasaki H, Hirose I, Ohtsuka Y, Tsuruta T, Ebihara Y, Goto Y, Zhao XY, Sakashita K, Koike K, Isomura M, Kojima S, Hoshika A, Tsuji K, Nakahata T: Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, in press.
3. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K: Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22: 649-648, 2004.
4. Sugiyama D, Ogawa M, Hirose I, Jaffredo T, Arai K, Tsuji K: Erythropoiesis from acetyl LDL-incorporating endothelial cells into circulation at pre-liver stage. *Blood* 101: 4733-4738, 2003.
5. Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, Yoshimatsu T, Ishikawa K, Iseki T, Hayakawa J, Maeda M, Asano S, Tsuji K: Successful treatment of natural killer (NK) cell leukemia following a long standing chronic active Epstein-Barr virus (CAEBV) infection with allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 31: 1169-1171, 2003.
6. Yoshimatsu T, Manabe A, Ebihara Y, Tanaka R, Ooi J, Iseki T, Shirafuji N, Maekawa T, Asano S, Yoshikawa N, Tsuji K: MxA expression in patients with viral infection after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32: 313-316, 2003.
7. Mitsui T, Watanabe S, Taniguchi Y, Hanada S, Ebihara Y, Sato T, Heike T, Mitsuyama M, Nakahata T, Tsuji K: Impaired neutrophil maturation in the truncated mG-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* 101: 2990-2995, 2003.
8. Nosaka T, Morita S, Kitamura H, Nakajima H, Shibata F, Kataoka Y, Morikawa Y, Kawashima T, Ito T, Ebihara Y, Senba E, Tsuji K, Makishita F, Yoshida N, Kitamura T: Mammalian twisted gastrulation is essential for skeleto-lymphogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 2969-2980, 2003.
9. 鶴田敏久、真部淳：代謝拮抗薬・小児の臨床薬理学：小児科診療 suppl. 67, 545-555, 2004

10. 辻浩一郎 : ヒト胚性幹細胞からの血液産生と再生医療: 日小血会誌、印刷中
11. 長谷川大輔、真部淳、鶴田敏久、大塚欣敏、海老原康博、河崎裕英、有瀧健太郎、松浦恵子、星加明德、辻浩一郎 : CD7/CD13 陽性急性分類不能型白血病 : 日小血会誌 18 : 155-159, 2004.
12. 江口直宏、辻浩一郎 : 樹状細胞の分化・成熟: 臨床検査 47 : 235-243, 2003
13. Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, Yamada T, Uchimaru K, Tojo A, Shirafuji N, Kodo H, Tani K, Takahashi T, Yamaguchi T, Asano S.: Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Blood*, 104:3813-3820, 2004
14. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Shimohakamada Y, Yamada T, Ishii K, Ohno N, Nagamura F, Uchimaru K, Tojo A, Asano S: Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*, 103: 489-491, 2003
15. Yamada T, Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, Iseki T, Shimohakamada Y, Takasugi K, Ohno N, Nagamura F, Uchimaru K, Tojo A, Asano S: Unrelated cord blood transplantation with reduced-intensity conditioning following autologous transplantation for multiple myeloma. *Int J Hematol*, 80:377-380, 2004
16. Tomonari A, Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Yamada T, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimaru K, Tani K, Tojo A, Asano S: Herpes simplex virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 33: 317-320, 2003
17. Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M, Chen M, Izawa K, Kobayashi S, Takahashi S, Uchimaru K, Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Miyoshi H, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Taira K, and Asano S: A novel maxizyme vector targeting a bcr-abl fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 104:356-363, 2004
18. Bai Y, Soda Y, Izawa K, Tanabe T, Kang X, Tojo A, Hoshino H, Miyoshi H, Asano S, Tani K: Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Therapy*, 10:1446-1457, 2003
19. Harata M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T, Chen M, Bai Y, Izawa K, Kobayashi S, Tomonari A, Nagamura F, Takahashi S, Uchimaru K, Iseki T, Tsuji T, Takahashi TA, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Maruyama K, Asano S: CD19-targeting liposomes containing

- imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, 104:1442-1449, 2004
20. Tomonari A, Iseki T, Takahashi S, Ooi J, Yamada T, Takasugi K, Nagamura F, Uchimaru K, Tojo A, Asano S: Ganciclovir-related neutropenia after pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection: comparison between cord blood and bone marrow transplantation. *Ann Hematol*, 83:573-577, 2004
21. Izawa K, Tani K, Nakazaki Y, Hibino H, Sugiyama H, Kawasaki A, Sasaki E, Nishioka C, Ishii H, Soda Y, Yagita H, Tanioka Y, Tojo A, Asano S: Hematopoietic activity of common marmoset CD34⁺ cells by a novel monoclonal antibody MA24. *Exp Hematol*, 32:843-851, 2004
22. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Tojo A, Asano S: Unrelated cord blood transplantation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18:1905-1907, 2004
23. Tsuchimoto D, Tojo A, Asano S: A mechanism of transcriptional regulation of the CSF-1 gene by interferon-gamma. *Immunol Invest*, 33:397-405, 2004
24. Cho SG, Shuto Y, Soda Y, Nakazaki Y, Izawa K, Uchimaru K, Takahashi S, Tani K, Tojo A, Asano S: Anti-NK cell treatment induces stable mixed chimerism in MHC-mismatched, T-cell depleted, nonmyeloablative bone marrow transplantation. *Exp Hematol*, in press
25. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama Y, Konuma T, Futami T, Nomura A, Nakayama S, Soda Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimaru K, Tojo A, Tani K, Asano S: Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in patients over the age of 45 years. *Brit J Haematol*, 126:711-714, 2004
26. Tomonari A, Tojo A, Takahashi T, Iseki T, Ooi J, Takahashi S, Nagamura F, Uchimaru K, Asano S: Resolution of Bechet's disease after HLA-mismatched unrelated cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*, 83:464-466, 2004
27. Tomonari A, Iseki T, Ooi J, Takahashi S, Tojo A, Tani K, Asano S: Cytomegalovirus infection following unrelated cord blood transplantation for adult patients in a single institution. *Br J Haematol*, 121:304-311, 2003
28. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, Igura K, Nagayama H, Tojo A, Tanosaki r, Takaue Y, Okamoto S, Takahashi T.A: Ex vivo manipulation of umbilical cord-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol*, 31:1237-1246, 2003

29. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Ishii K, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Uchimaru K, Nagamura F, Tojo A, Asano S: Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. Blood, 101:4711-4713, 2003
30. Tomonari A, Iseki T, Takahashi S, Ooi J, Takasugi K, Shimohakamada Y, Ohno N, Nagamura F, Uchimaru K, Tani K, Tojo A, Asano S: Varicella-zoster virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. Br J Haematol, 122:802-805, 2003

(2) 口頭発表

1. 辻浩一郎 ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導. 第 46 回日本小児血液学会シンポジウム「小児血液研究の進歩」 2004 年 11 月 23 日
2. ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導. 第 46 回日本小児血液学会シンポジウム「小児血液研究の進歩」 2004 年 11 月 23 日
3. 長谷川大輔、真部淳、鶴田敏久、大塚欣敏、海老原康博、河崎裕英、有瀧健太郎、松浦恵子、辻浩一郎: CD7/ CD13 陽性急性白血病の 1 例、第 45 回日本小児血液学会、金沢、2003 年 10 月 17, 18 日.
4. 長谷川大輔、真部淳、石川久美子、和田美夏、谷ヶ崎博、吉益哲、大塚欣敏、鶴田敏久、河崎裕英、海老原康博、中畑龍俊、辻浩一郎: JMML における赤芽球系コロニー形成能、第 45 回日本小児血液学会、金沢、2003 年 10 月 17, 18 日.
5. 大塚欣敏、長谷川大輔、鶴田敏久、河崎裕英、海老原康博、広瀬偉美子、真部淳、辻浩一郎、黒田達夫、佐藤雄也、谷澤昭彦、山下直秀: 神経芽腫に対する遺伝子治療 (第 I 相臨床試験) の問題点 第 19 回日本小児がん学会、東京、2003 年 11 月 27, 28 日.
6. 鶴田敏久、真部淳、河崎裕英、大塚欣敏、長谷川大輔、吉益哲、石川久美子、海老原康博、辻浩一郎、阿部結花、尾上和夫、井関徹: ABO 不一致同種末梢血幹細胞移植後の赤芽球瘍に対する DLI の効果 第 26 回日本造血細胞移植学会、横浜、2003 年 12 月 19, 20 日.
7. 長谷川大輔、真部淳、久保田健夫、河崎裕英、大塚欣敏、磯村万理子、小島勢二、辻浩一郎、中畑龍俊: 小児骨髄異形成症候群 (MDS) 及び若年性骨髄単球性白血病 (JMML) における p15 メチル化の検討. 第 46 回日本血液学会、京都、2004 年 9 月.
8. 大塚欣敏、真部淳、長谷川大輔、河崎裕英、辻浩一郎: 若年性骨髄単球性白血病

(JMML)におけるビスフォスフォネート製剤の検討 第46回日本臨床血液学会、京都、2004年9月。

9. 河崎裕英、大塚欣敏、長谷川大輔、鶴田敏久、真部淳、海老原康博、辻浩一郎：
非血縁者間同種骨髄移植後の再発に対してドナーリンパ球輸注 (DLI) を行った3
例 第46回日本小児血液学会、京都、2004年11月。

(3) 出版物

1. 鶴田敏久：Ph1 陽性急性リンパ性白血病：小児血液悪性疾患 土田昌宏編、医薬ジャーナル社：231-247、2004
2. 辻浩一郎：小児白血病に対する遺伝子治療：小児白血病ハンドブック、月本一郎編、中外医学社（東京）：251-255、2003.
3. 辻浩一郎：臍帯血造血幹細胞の造血能：成人骨髄造血幹細胞との比較 炎症・再生 23：181-185、2003.
4. 辻浩一郎：造血幹細胞並びにサイトカインの基礎と応用 必携造血幹細胞移植一わが国のエビデンスを中心に、小寺良尚、加藤俊一編、医学書院（東京）：21-34、2004.
5. 辻浩一郎：造血幹細胞 血液の辞典、平井久丸、押味和夫、坂田洋一編、朝倉書店（東京）、印刷中
6. 辻浩一郎：造血幹細胞と血液の分化 血液細胞アトラス、三輪史朗、渡辺陽之輔編、文光堂（東京）：30-32、2004.
7. 辻浩一郎：小児白血病 白血病はこわくない、丸善（東京）：64-75、2004.

研究成果

1. 臍帯血中に存在する CD34 陽性細胞の造血細胞および血管内皮細胞への分化ポテンシャルの検討

ヒト臍帯血中に存在する細胞のポテンシャルを検討するために、最初に臍帯血内に、血液細胞ばかりでなく血管内皮細胞へも分化可能な幹細胞、いわゆるヘマンジオブラストが存在するか否かを検討した。もしヘマンジオブラストを分離することができれば、臍帯血は血液疾患ばかりでなく血管疾患に対する新たな細胞ソースとなると考えられるからである。

臍帯血中のヘマンジオブラストの存在を確認するために我々は、血液細胞と内皮細胞の両者に発現するとされるTunica interna endothelial cell kinase(TEK)とCD34に注目した。TEKは、臍帯血CD34+細胞の27±12%に発現されていたが、CD34+TEK+細胞とCD34+TEK-細胞の間で、造血活性に差違は認められなかった。

さらに両者間で血管内皮細胞への分化能に違いがあるか否かを解析した。血管内皮細胞への分化能は、移植NOD/SCIDマウスの後肢を結紮した虚血マウスモデルを作製し、結紮部位における新生血管でのヒト内皮細胞の有無、およびレシピエントマウスの肝臓類洞細胞から培養した内皮細胞中のヒト内皮細胞の有無により検討した。1x10⁴個のCD34+TEK+細胞とCD34+TEK-細胞を各々7匹の虚血マウスモデルに移植したところ、全例でヒト造血の再構築が認められた。内皮細胞への分化能については、CD34+TEK+細胞を移植されたマウスでは、ヒト造血の再構築の程度にかかわらず、全例で内皮細胞への分化が確認されたが、CD34+TEK-細胞移植マウスでは、高率に再構築された3例において内皮細胞への分化が認められた。

以上の結果は、臨床応用を考えた場合、CD34+TEK+細胞の方がより高い内皮細胞への分化能を有していることを示している。また興味深いことに、内皮細胞前駆細胞はTEKを発現して

いることが報告されているので、CD34+TEK-細胞を移植されたマウスで認められたヒト内皮細胞は、内皮細胞前駆細胞よりも上位の内皮細胞と血液細胞の共通の前駆細胞から産生されたと推測され、臍帯血中にはヘマンジオブラストが存在すると考えられた。以上は International J Hematol; 2003, 77 245-252として発表済みで別刷り参照のこと。

2. 臍帯血幹細胞分化とエストロゲンレセプター-1の発現の検討

【目的】

臍帯血移植後の造血機構の再構築パターンは骨髓異移植後と異なることが、種々の臨床研究より明らかになりつつある。臍帯血幹細胞が持つポテンシャルが骨髓幹細胞と異なるためであると考えられるが、我々はそれらを生体内活性物質とも関係が深いエストロゲンレセプター(ER)の発現に着目して検討した。ERには α と β が存在するが、マウスの実験から胎児幹細胞にはERは存在せず、生後CD34陽性細胞に $\alpha \rightarrow \beta$ の順に発現することが知られている。また、ERはマウスでは主に顆粒球、リンパ球などの分化、増殖に対して負の制御をされると考えられている。ヒトでもERの発現に関して、同様のパターンが考えられているが、臍帯血移植後の造血機構の再構築との関係は不明である。これらを明らかにすることは臍帯血幹細胞の臨床応用においても重要と考えられる。本研究ではERを介した臍帯血の分化・増殖制御機構を知ることを目的としている。

【方法】

1) エストロゲンレセプター(ER) α 、 β 定量用のコントロール cDNA の作成

ヒト Burkitt リンパ腫の細胞株である Daudi 細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。得られた 1 μ g の全 RNA、Oligo(dT)12-18 プライマー、Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を用いて ER 遺伝子を特異的に増幅する primer を用いて polymerase chain reaction (PCR)

反応を行い、得られた産物より ER α 、 β cDNA に相当する DNA を EASYTRAP™ ver.2 (TAKARA) で精製した。ER α 、 β cDNA とも PCR 反応の条件は 95°C 15 秒-57°C 15 秒-72°C 30 秒、30 サイクルで行った。さらに pCR[®]II-TOPO[®](3.9kb)ベクターを用いた TA cloning を kit(Invitrogen)を用いて行い、核酸配列を確かめた後、得られたプラスミドを real-time RCR の検量線作成のためのコントロールとした。尚、ER α 、 β 遺伝子を特異的に増幅するプライマーとして、ER α : 5'-GGACCATGACCATGACCCTCCAC-3' と 5'-CCTCTAGAATGTGCCTGGC-3'、ER β : 5'-AAGACATGGATATAAAAACTCA-3' と 5'-CCGACTTCGGAAGTGTTACG-3'を用いた。得られた ER α および β cDNA を 10、102、104、106 copy/2 μ l に希釈し 2 μ l を用いてコントロールとした。

2) ER α 、 β 遺伝子発現量定量のための primer および probe の決定

Real-time PCR 用の ER α 、 β のプライマーおよびプローブとしてそれぞれ、下記のものを作成し検量線の検討を行ったが、最終的に増幅率の良い下腺のものを定量に用いた。

ER α Forward

1. 5'-GGACCATGACCATGACCCTCCAC-3'
2. 5'-AGACATGAGAGCTGCCAACCC-3'
3. 5'-TGCTGAGCCCCCATACTC-3'

ER α Reverse

1. 5'-GAGGGTTTCCCTGCCACAGTCTGA-3'
2. 5'-CCTTCTAGAATGTGCCTGGC-3'
3. 5'-GAAGCTTCGATGATGGGCTTA-3'

ER α Probe

1. 5'-TCCGAGTATGATCCTACCGAGACC
CTTCAGT-3'

ER β Forward

1. 5'-GGAACATGGATATAAAAACTCA-3'
2. 5'-TCACATCTGTATGCGGAACC-3'
3. 5'-CGATTACGCATCGGGATATCA-3'
4. 5'-GCTCAGCCTGTTTCGACCAA-3'

ER β Reverse

1. 5'-TCCCAGAACCCACAGTCTCAGTGA-3'

2. 5'-CCGACTTCGGAAGTGTTACG-3'
3. 5'-ACAATCGATAAAAAACCGGCG-3'
4. 5'-GGAGGTGTTAATGATGGGGCT-3'

ER β Probe

1. 5'-ATGGAGTCTGGTCGTGTGAAG
GATGTAAGG-3'
2. 5'-TGCGGCTCTTGGAGAGCTGTTGGA-3'

3) 臍帯血および細胞株での ER α 、 β 遺伝子発現の検討

前記ヒト burkitt リンパ腫の細胞株である Daudi 細胞、ヒト多発性骨髄腫細胞株 LP-1、ヒト pre-B 細胞白血病細胞株 SUP-B15、ヒト Ph1 陽性急性リンパ性白血病細胞株 IMS-PHL2 および KOPN-57 より RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出した。同様にヒト臍帯血細胞から Ficoll を用いた比重分離法により単核球を分離し全 RNA を抽出した。得られた全 RNA 1 μ g を用いて 1.と同様に cDNA を作成し、全量 20 μ l の cDNA より 2 μ l を用いて、定量 PCR 反応を行った。PCR 反応の条件は 50°C 2 分、95°C 10 分反応させた後、95°C 15 秒-60°C 1 分、50 サイクルで行った。

4) 無血清培地を用いた臍帯血 CD34 陽性細胞の培養

種々の造血因子やステロイドホルモンなどの影響を受けない環境で臍帯血幹細胞の培養を行うために、臍帯血由来 CD34 陽性細胞をマウス骨髄ストローマ細胞 HESS-V 細胞と共培養した。2 週、3 週、4 週間の培養後、それぞれの分化状態をフローサイトメトリーにより測定した。尚、臍帯血よりの CD34 陽性細胞の分離には MACS cell isolation kit (Miltenyi Biotec)を用い、培養条件としては X-VIVO15 培地(Biowittaker)をベースとして、1%無毒化ウシ血清アルブミン(detoxified BSA) (Stem Cell Technologies)、5x10⁻⁵M 2-メルカプトエタノール(2-ME) (Gibco)、2mM L-グルタミン(Gibco)、rhG-CSF 10ng/ml および rhSCF 50ng/ml で行った。細胞分化は CD4、7、8、19、33、34 など抗体を用いてフローサイトメトリーで検索した。

【結果】

1) 臍帯血細胞および細胞株での ER α 、 β の発現レベル

ER α は殆どの B 細胞系の白血病細胞株に発現しているが、ER β は Daudi 細胞など成熟傾向のある B リンパ系細胞のみに強く発現していた。また、臍帯血単核球では測定限界の低量で α 優位に両者の発現が認められた。

細胞	ER α 発現量 Copy/RNA 1 μ g	ER β 発現量 Copy/RNA 1 μ g
臍帯血単核球	2.00×10^2	3.90×10^1
Daudi	4.30×10^3	1.03×10^4
LP1	1.65×10^2	Not detected
SUP-B15	1.15×10^3	1.90×10^2
IMS-PHL2	1.15×10^3	Not detected
KOPN-57	5.60×10^2	Not detected

2) 臍帯血 CD34 陽性細胞の HESS-V との共培養

臍帯血より得られた CD34 陽性細胞は HESS-V を用いることにより、無血清下でも約 3 週間までは分化することなく維持培養できることがわかった。臍帯血より得られた CD34 陽性細胞を HESS-V 上で共培養し、3 週間の時点で CD33 陰性 CD34 陽性細胞として 30% 前後、CD33 陽性 CD34 陽性細胞として 5% 前後得られており、その他の分化マーカーは 5% 以下の発現であった。

【今後の研究】

現在、これらの系を利用して、臍帯血 CD34 陽性細胞をステロイドや造血因子などの添加による分化・培養試験を行い臍帯血の可塑性の検討を進めている。今後、ステロイド受容体など臍帯血幹細胞を制御している種々の遺伝子をレトロウイルスベクター pMC-Ig などに導入し、制御遺伝子を強制的に発現させることによる臍帯血幹細胞の持つポテンシャルの解析をさらに押し進めていく予定である。

一方、ER 受容体はダイオキシンなどの生体内活性物質とも密接な関わり合いを持っているとさ

れているため、本研究の系をさらに、ダイオキシンレセプター (Ahr/AhR) 等の発現の検討なども照らし合わせ、臍帯血幹細胞ポテンシャルの検討だけではなく、胎児や新生児造血能に対するダイオキシンなどの生体内活性物質の研究も検討中である。