

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性巨核球前駆細胞の *in vitro* コロニー形成に対する Glycosaminoglycans の作用

寺町友絵,^a 柏倉幾郎,^{*,a} 高橋恒夫,^b 高木良成^a

北海道薬科大学放射薬品学研究室,^a 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門^b

Effects of Glycosaminoglycans on the *in vitro* Colony Formation of CD34⁺ Megakaryocytic Progenitor Cells in Human Placental/Umbilical Cord Blood

Tomoe TERAMACHI,^a Ikuo KASHIWAKURA,^{*,a} Tsuneo A. TAKAHASHI,^b and Yoshinari TAKAGI^a

Department of Radio Pharmaceutical Sciences, Hokkaido College of Pharmacy,^a 7-1 Katsuraoka-cho,
Otaru 047-0264, Japan and Cell Processing Department, The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo,^b 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-0071, Japan

(Received March 26, 2001; Accepted June 29, 2001)

The *in vitro* effect of various glycosaminoglycans (GAGs) on the clonal growth of CD34⁺ megakaryocytic progenitor cells (CFU-Megs) isolated from human placental/umbilical cord blood (CB) was evaluated in human plasma containing semisolid culture stimulated by recombinant human thrombopoietin (TPO). The GAGs, including hyaluronic acid from human umbilical cords (HA-h), pig skins (HA-p) and rooster combs (HA-r), or keratan sulfate (KS), various chondroitin sulfates (CS-A, B, C, D, E), and heparan sulfate (HS), were tested. Each GAG alone did not affect the clonal growth of CFU-Meg. In the presence of TPO, adding of HA-p or HS (100 μg/ml) resulted in an approximately 1.3-fold increase, in the total number of colonies, due to an increase in large megakaryocyte colonies. In contrast, CS-E led to a marked decrease in CFU-Meg growth. At the end of the culture, the total number of cells increased 3.0-fold of the initial value of the control, but adding HA-p or HS showed an approximately 9.1-fold or 18.3-fold increase. Similarly, the total number of CFU-Meg detected in the harvested cells increased to 4.8-fold of the initial value, while, an approximately 18.3-fold or 38.8-fold increase was observed in the culture containing HA-p or HS, respectively. Flow cytometric analysis of the harvested cells showed no significant difference in the expression of surface antigens and DNA ploidy distribution of megakaryocytes between the control and GAG treatments. These results suggest that HA-p and HS promote the proliferation of immature CB CD34⁺ CFU-Meg in the presence of TPO.

Key words—glycosaminoglycans; TPO; CD34⁺ cells; CFU-Meg

緒 論

すべての血球の源である造血幹細胞は、自己複製を行う一方で、特定の血球系へ方向づけられた造血前駆細胞に分化し、各種血球の産生へと向かう。^{1,2)} 造血組織におけるこの血球産生の過程は、サイトカインと呼ばれる生理活性因子と間質系細胞によって構成される造血微小環境によって制御されている。造血微小環境における血球産生は、細胞相互の直接的作用と共に、間質系細胞の細胞外マトリックス成分が血球産生に深く関与していることも示唆されている。^{3,4)} この細胞外マトリックスの主要構成成分として glycosaminoglycans (GAG) があり、分子量数万から数十万の直鎖状の高分子多糖体として存在している。主なものに、hyaluronic acid (HA), kera-

tan sulfate (KS), chondroitin sulfate A, B, C, D, E (CS-A, B, C, D, E), heparan sulfate (HS) などがある。未熟な造血幹・前駆細胞の維持能力を有する長期液体培養系における繊維芽細胞、前脂肪細胞、内皮細胞並びにマクロファージから構成される吸着細胞あるいは骨髄ストローマ細胞株は、HA や CS を産生・放出し、さらにその細胞膜上に HS をもつ。⁵⁻⁷⁾ これら GAG は、サイトカインを介する場合と細胞接着を介する場合とのいずれかの機構で造血に関与すると考えられている。これまでに、各種 GAG の造血幹・前駆細胞の分化・増殖に対する作用についての報告がいくつかある。⁸⁻¹⁰⁾ Han らはマウス骨髄細胞を用い、いくつかの GAG による巨核球前駆細胞 (colony-forming unit megakaryocyte, CFU-Meg) の *in vitro* コロニー形成に対する作用

を検討し, thrombopoietin (TPO) 及び interleukin-6 (IL-6) 存在下で, heparin が顕著に CFU-Meg 由来巨核球コロニー形成を促進することを報告している.⁹⁾ しかしながら, 各種 GAG のヒト造血幹・前駆細胞, 特に CFU-Meg の分化・増殖に対する報告は少なく, ヒト巨核球・血小板造血に対する GAG の作用の詳細には不明な点が多い. 本研究ではヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用い, CFU-Meg の分化・増殖に対する各種 GAG の作用について検討した.

実験方法

1. 試料及び試薬 本研究では, すべて以下に示した生化学工業の GAG を用いた. Hyaluronic acid, sodium salt (HA-h: from human umbilical cord, HA-p: from pig skin, HA-r: from rooster comb, Artz[®]), keratan sulfate, sodium salt (KS: from bovine cornea), chondroitin sulfate (CS-A: from whale cartilage, CS-B: from hog skin, CS-C: from shark cartilage), chondroitin sulfate, sodium salt (CS-D: from shark cartilage, CS-E: from squid cartilage), heparan sulfate (HS: from bovine kidney) のそれぞれを Dulbecco's phosphate buffered salts (PBS) に 5 mg/ml になるように溶解後, メンブランフィルター (MILLEX-GP, 0.22 μ m) に通してろ過滅菌し, サンプルとした. 遺伝子組換え型ヒト thrombopoietin (TPO), 遺伝子組換え型ヒト stem cell factor (SCF) は, キリンビール (東京) から供与された.

フローサイトメーター (EPICS XL, Beckman Coulter, CA) の測定に使用した各種蛍光抗体溶液は, すべて以下に示した Beckman Coulter Immunotech のモノクローナル抗体を使用した. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD34 (FITC-CD34), FITC-conjugated anti-human CD41 (FITC-CD41), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD41 (PE-CD41), PE-cyanin 5 fluorochrome tandem (PC5)-conjugated anti-human CD45 (PC5-CD45).

2. 臍帯血採取法 母親からインフォームド・コンセントが得られた正期産, 正常妊娠分娩を対象とした. 東京臍帯血バンクにて採取した移植対象外サンプル (採取量 40 ml 未満), 若しくは同ガイド

ラインに基づく方法で福土助産所 (五所川原市) にて娩出後の胎盤及び臍帯から, 抗凝固剤 citrate-phosphate-dextrose 液入りの採血バッグ (CBC-20, ニッショー, 大阪) を用いて採取した.

3. CD34 陽性細胞の分離 採取後 48 時間以内の臍帯血を 5 mM EDTA-PBS を用いて約 2 倍に希釈後, Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) 15 ml 上に希釈試料 20 ml を積層し, 遠心分離 (300 g, 30 min) した. Buffy coat を回収し, 5 mM EDTA-PBS を用いて 2 回洗浄遠心 (4°C, 250 g, 10 min) し, 血小板を除去した. 得られた light-density 細胞より, MACS 磁気ビーズカラム法 (Miltenyi Biotec, Germany) により CD34 陽性細胞を分離・精製した. Light-density 細胞懸濁液にブロッキング試薬, CD34 抗体を添加し, 4°C, 15 分間インキュベートした. 0.5% BSA-5 mM EDTA-PBS を用いて洗浄遠心 (4°C, 250 g, 10 min), 再懸濁後, マイクロビーズを添加し 4°C, 15 分間インキュベートした. 終了後, 同様に洗浄, 再懸濁し磁気ビーズカラムにかけ非吸着細胞を溶出した. プランジャーを用いて吸着細胞を回収し, CD34 陽性細胞とした. 生細胞数は, トリパンプルを用い血球算定盤にて計数した. CD34 細胞陽性率は, フローサイトメーターを用いて測定した. 陽性率は, 85—95% であった.

4. CFU-Meg の測定 CFU-Meg の測定は, human AB platelet poor plasma (ヒト血漿) を用いた plasma clot 法若しくは軟寒天法により行った.^{11,12)} イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM, Gibco BRL) に 100 U/ml ペニシリン (Gibco BRL, NY), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Gibco BRL), 1 mM MEM ピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL), 1% MEM ビタミン混液 (Gibco BRL), 1% MEM nonessential アミノ酸 (Sigma, MO), 1×10^{-3} M チオグリセロール (Sigma), 0.2 g/ml L-アスパラギン (和光純薬, 東京), 7.4 mg/ml 塩化カルシウム (和光純薬), 0.2% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma) を加えた IMDM 混液に, 造血因子として 50 ng/ml TPO 及び 10—300 μ g/ml 各種 GAG を加え, さらに 2% アプロチニン (Trasylo[®], バイエル薬品, 大阪) 及び 15% ヒト血漿を含む培地若しくは 10% ヒト血漿を含む 0.2% 軟寒天培地を調製し, CD34 陽性細胞を 1×10^3

個/ml になるように懸濁した。この混合液を、24 wells のプレート (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ) に 300 μ l/well になるように播き、37°C、5% CO₂ 存在下 11—12 日間培養した。培養後アセトン・メタノール混液 (2:1) で固定、乾燥後、コロニー数測定まで -20°C で保存した。なお、両培養法で形成されるコロニー数に有意な差は認められなかった。

5. 巨核球コロニー染色法 固定処理後の各 well に、0.5% BSA-PBS 400 μ l/well を加え、室温で 10 分間インキュベートした。溶液を捨て、0.5% BSA-PBS にて 100—150 倍に希釈調製した FITC-CD41 抗体溶液 200 μ l/well を添加し、室温遮光下で 60 分間インキュベートした。処理後抗体溶液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、0.1% クエン酸ナトリウム溶液で希釈調製した propidium iodide (PI, Sigma) 溶液 (0.3 μ g/ml) 200 μ l/well を添加し、2 分間インキュベートした。PI 溶液を捨て、超純水で 2 回洗浄後、室温遮光下にて乾燥させた。処理後、蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) 下、FITC 陽性細胞 3 個以上 50 個未満の小型コロニーと 50 個以上の大型コロニーをそれぞれ計数した。

6. 液体培養法 CD34 陽性細胞 5×10^3 個/ml を、TPO 50 ng/ml 及び 20% ヒト血漿を含む IMDM 混液に懸濁し、24 wells のプレート (Falcon) に 500 μ l/well になるように播き、37°C、5% CO₂ 存在下 11—12 日間培養した。このヒト血漿濃度では plasma clot は形成されない。培養後細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて表面抗原並びに DNA ploidy の解析を行った。

7. 免疫学的表面抗原の測定法 培養前の CD34 陽性細胞及び液体培養後回収された細胞の懸濁液を、FITC-CD34、PE-CD41、PC5-CD45 の抗体混合溶液に添加し、暗所室温にて 20 分間インキュベート後、5 mM EDTA-PBS を用いて洗浄遠心 (4°C, 250 g, 10 min) し、0.5% BSA-5 mM EDTA-PBS に再懸濁した。細胞懸濁液を 35 μ m のナイロンメッシュ (Falcon) に通し、フローサイトメーターを用いて測定した。

8. DNA Ploidy の測定法 DNA ploidy の測定は、萩原らの方法により行った。¹²⁾ 培養前の CD34 陽性細胞及び液体培養後、回収された細胞の懸濁液に FITC-CD41 抗体を加え、室温にて 20 分

間インキュベートした。0.5% BSA-5 mM EDTA-PBS で洗浄遠心 (4°C, 250 g, 5 min) し、沈殿を CATCH medium に懸濁し、4°C、1 時間インキュベートした。終了後、1% パラホルムアルデヒド (和光純薬)-CATCH medium 溶液を等量添加し、5 分間固定後 PBS で洗浄遠心 (4°C, 250 g, 5 min) した。沈殿を 50 μ g/ml PI-0.7% クエン酸-0.6% 塩化ナトリウム溶液で 4°C、1 時間処理後、50 μ g/ml RNAase (Sigma) を添加し、暗所室温にて 30 分間インキュベートした。その後、35 μ m のナイロンメッシュに通し、フローサイトメーターを用いて測定した。DNA ploidy の分布は、新鮮分離したヒト臍帯血由来単核細胞の蛍光強度を 2N として相対評価を行った。

9. 統計処理 コントロール群と処理群間の有意差検定は、Student の *t* 検定で行った。

結 果

1. CFU-Meg 由来巨核球コロニー形成に対する各種 glycosaminoglycans の作用 臍帯血 CD34 陽性を、TPO 存在下 plasma clot 法若しくは軟寒天法で培養を行い、形成される巨核球コロニーに対する各種 GAG の作用を検討した (Tables 1, 2)。GAG を 10—100 μ g/ml の範囲で添加し、plasma clot 法で測定した。CS-B, CS-E 及び HS は、clot 形成を阻害するのでヒト血漿を含む軟寒天法で測定した。その結果 HA-p 及び HS は、それぞれ 100 μ g/ml の添加で総 CFU-Meg をコントロールの 1.3 倍に増加させ、一方 CS-E では、検討したいずれの濃度においても有意なコロニー数の減少が見られた。また TPO 非存在下では、いずれの GAG においても巨核球コロニー形成は認められず、これらの作用は TPO 依存性であることが示された。そこで CFU-Meg 由来巨核球コロニー形成を促進した HA-p 及び HS について、それぞれの最適濃度を調べるため、200 及び 300 μ g/ml についても検討した (Fig. 1)。その結果、HA-p 及び HS 共に 100 μ g/ml でコロニー数の増加は最大となり、それ以上の濃度での増加は観察されなかった。この時形成されたコロニーについて、構成細胞数の違いから、未熟 CFU-Meg 由来の大型巨核球コロニーと成熟 CFU-Meg 由来の小型巨核球コロニーに分類して計数した。Fig. 1 に示したように、いずれのコロニー形成

Table 1. Effect of Glycosaminoglycans on *in vitro* Growth of CD34⁺ CFU-Meg from Human Placental/Umbilical Cord Blood

GAG	Ratio of colonies to the control		
	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml
Hyaluronic acid (human umbilical cord)	1.13 \pm 0.33	1.10 \pm 0.59	1.12 \pm 0.37
Hyaluronic acid (pig skin)	1.03 \pm 0.40	1.12 \pm 0.32	1.32 \pm 0.35*
Hyaluronic acid (rooster comb)	1.03 \pm 0.36	0.90 \pm 0.33	0.95 \pm 0.47
Keratan sulfate	1.11 \pm 0.64	1.15 \pm 0.49	0.94 \pm 0.44
Chondroitin sulfate A	0.76 \pm 0.37	0.88 \pm 0.61	1.00 \pm 0.33
Chondroitin sulfate C	0.97 \pm 0.44	1.13 \pm 0.42	1.18 \pm 0.44
Chondroitin sulfate D	1.22 \pm 0.45	0.91 \pm 0.39	0.70 \pm 0.48

Purified CB CD34⁺ cells (1 \times 10³ cells/ml) were suspended in plasma clot culture supplemented with TPO (50 ng/ml) and various GAG, and cultured for 11 days. Mean \pm S.D. of 9 wells from 3 separate experiments. * p <0.05 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

Table 2. Effect of Glycosaminoglycans on *in vitro* Growth of CD34⁺ CFU-Meg from Human Placental/Umbilical Cord Blood

GAG	Ratio of colonies to the control		
	10 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml
Chondroitin sulfate B	0.99 \pm 0.35	0.93 \pm 0.35	1.12 \pm 0.27
Chondroitin sulfate E	0.66 \pm 0.39*	0.50 \pm 0.40**	0.36 \pm 0.33**
Heparan sulfate	1.08 \pm 0.11	1.16 \pm 0.15	1.29 \pm 0.14*

Purified CB CD34⁺ cells (1 \times 10³ cells/ml) were suspended in soft agar culture containing 10% human AB platelet poor plasma with TPO (50 ng/ml) and various GAG, and cultured for 11 days. Mean \pm S.D. of 9 wells from 3 separate experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

促進作用も主に未熟 CFU-Meg 由来の大型巨核球コロニーの増加によってもたらされていることが示された。

2. HA-p 及び HS の作用 CD34 陽性細胞の液体培養における HA-p 及び HS の作用を検討した。培養終了後細胞を回収し、トリパンブルーにより生細胞数を計数した。その結果コントロールの細胞数は培養開始時の 3 倍に増加したのに対し、HA-p 添加ではおよそ 9 倍に、HS ではおよそ 18 倍に細胞数が増加した (Table 3)。また回収された各細胞に含まれる CFU-Meg 数を測定したところ、コントロールでは培養開始時のおよそ 5 倍に増加し、一方 HA-p 及び HS の添加では、それぞれおよそ 18 倍、39 倍と CFU-Meg 数の高い増加が認められた (Table 3)。

各細胞について表面抗原 CD45, CD34, CD41 に対する蛍光標識モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメーターによる解析を行った。培養開始

時 90.6% であった CD45⁺CD34⁺ の両陽性細胞率は、いずれの培養においても 2—4% まで減少し、一方およそ 1% 程度であった CD45⁺CD41⁺ 及び CD34⁺CD41⁺ の両陽性細胞率は、それぞれおよそ 50% 及び 2—4% に増加した (Fig. 2)。また PI 染色による各細胞の DNA ploidy の測定から、培養開始時の細胞 97.5% の DNA ploidy が 2N であったのに対し、培養後 8N, 16N の高倍数体巨核球が検出され (Fig. 3)、培養による成熟巨核球の産生が示された。しかしながらこれらの変化は、コントロールと HA-p 及び HS 添加群との間に有意な差は認められなかった。

考 察

本研究において、ヒト臍帯血 CD34 陽性 CFU-Meg 由来の *in vitro* コロニー形成に対する各種 GAG の作用を検討したところ、HA-p と HS に有意な巨核球コロニー形成促進作用が認められた。

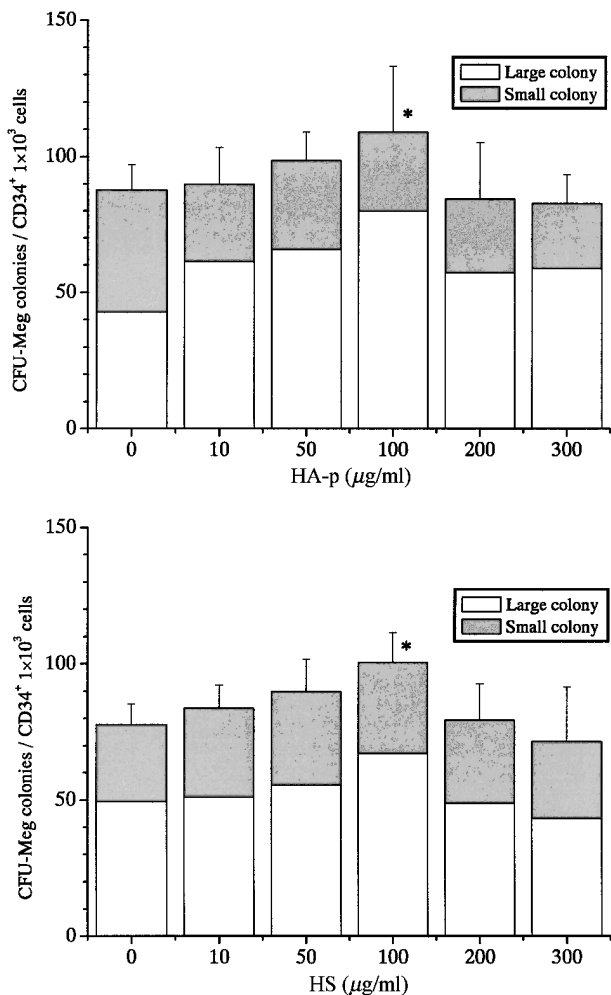


Fig. 1. Effect of HA-p and HS Concentration on *in vitro* Growth of CB CD34⁺ CFU-Meg

Purified CB CD34⁺ cells (1 × 10⁵ cells/ml) were assayed for CFU-Meg by soft agar culture containing 10% human AB platelet poor plasma with TPO (50 ng/ml) plus various concentrations (10–300 µg/ml) of HA-p or HS. Values represent the mean ± S.D. of 6 wells in 2 separate experiments. **p* < 0.05 compared to TPO alone by Student's *t*-test.

Table 3. Effect of HA-p and HS on the Generation of Human Placental/Umbilical Cord Blood CD34⁺ Cells in Liquid Culture

	Total cells (× 10 ⁴)	Total CFU-Meg (× 10 ³)
Initial cells	4.0 (1.00)	2.1 (1.00)
Control (TPO)	12.0 (3.00)	10.2 (4.81)
TPO + HA-p	36.5 (9.13)	38.9 (18.3)
TPO + HS	73.0 (18.3)	82.7 (38.8)

Purified CB CD34⁺ cells (5 × 10³ cells/ml) were suspended in liquid culture supplemented with TPO alone or TPO plus HA-p or HS, and cultured for 11 days. Each aliquot of harvested cells was assayed for CFU-Meg by plasma clot culture supplemented with TPO plus SCF. Each value in parentheses shows ratio of total number to the initial value.

HAはCD44のリガンドであり、CD44を発現しているCD34陽性細胞の細胞接着を促進し、また白血球への分化・増殖を促すことが報告されている。^{9,13)} 臍帯血CD34陽性細胞の92–99%にCD44抗原が発現しており、^{14,15)} HAがCD44リガンドとしてCD34陽性CFU-Megに作用した可能性が考えられる。しかしながら本研究においては、分子量の異なる3種類のHAで作用に大きな差が認められた。HA-hは80–120 × 10⁴ Da, HA-pは4–6 × 10⁴ Da, HA-rは60–120 × 10⁴ Daとそれぞれの分子量は大きく異なり、最も低分子のHA-pにのみ巨核球コロニー形成促進作用が認められた。一方データには示していないが、HA-rを加熱処理により分子量30 × 10⁴ Da及び4 × 10⁴ Daに低分子化したHAは、HA-pと同程度のコロニー形成促進作用を示した。HAにおける分子量の違いが、細胞の増殖に影響することについてはこれまでもいくつかの報告がなされている。^{16,17)} これらのことから、HAによる巨核球コロニー形成促進作用発現には、HAの分子量が関与している可能性が示唆された。

GAGは、ウロン酸若しくはガラクトースとアミノ糖で構成される二糖単位の繰り返し構造からなっており、様々な程度にO-硫酸化若しくはN-硫酸化されている。HAはグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンからなり、他のGAGと異なり硫酸基をもたない。巨核球コロニー形成促進作用を示したHSは、イズロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し構造を基本とするが、イズロン酸の代わりにC5-エピマー化を受けなかったグルクロン酸も存在する。そのため、HS上の一部に硫酸基に富む高硫酸化クラスターが形成されている。この高硫酸化クラスター構造が、fibroblast growth factor (FGF) ファミリーや hepatocyte growth factor などのサイトカインとHSとの特異的結合を可能にしている。^{18–20)} 特にこのHS高硫酸化クラスターは、O-硫酸基含量がN-硫酸基含量より低いにもかかわらず、O-硫酸基の方がサイトカインやCD34陽性細胞と特異的に結合するという報告がなされている。⁷⁾ 本研究で用いたウシ腎臓由来HSは、O-硫酸化グルクロン酸を高い割合で含んでおり、未分化造血幹細胞の生存・維持に作用する。²¹⁾ 硫酸基を含有するGAGのうち、HSの分子量は2–3 × 10⁴ Daであるが、巨核球コロニー形成促進作用を示さな

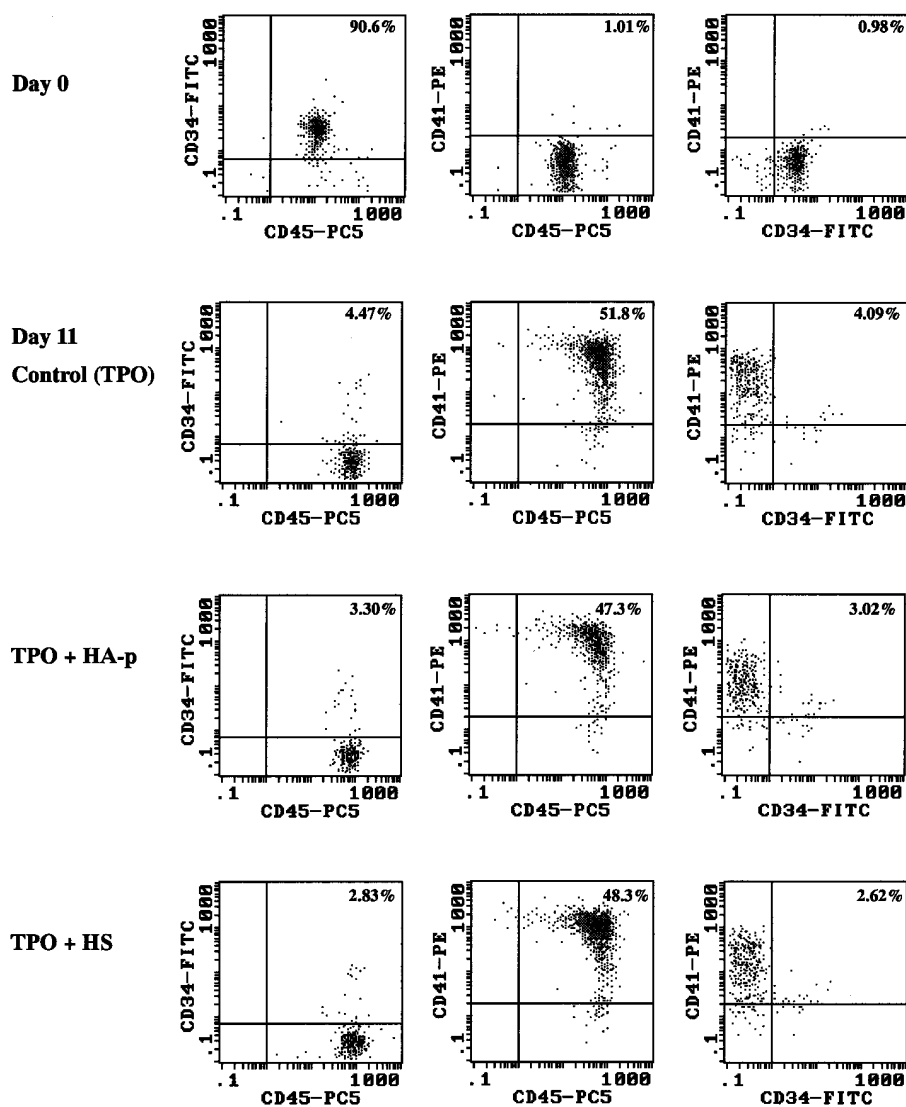


Fig. 2. Flow Cytometric Analysis of Freshly Purified CB CD34⁺ Cells and Suspended Cells in Liquid Culture

Purified CB CD34⁺ cells (5×10^3 cells/ml) were suspended in liquid culture supplemented with TPO alone or TPO plus HA-p or HS, and cultured for 11 days. Then the cells were harvested from the culture and were treated with anti-human FITC-CD34, PE-CD41 and PC5-CD45 MoAb. The expression of the surface antigen was analyzed by using a flow cytometer. Each value in figures shows the percentage of double positive cells.

った CS-A, B, C, D, E はそれぞれ $2.5-5 \times 10^4$ Da, $1.1-2.5 \times 10^4$ Da, $4-8 \times 10^4$ Da, 3×10^4 Da, 2×10^4 Da, KS は 1.3×10^4 Da と, HA の場合と異なり相互の分子量に大きな差は認められなかった。また, FGF は多機能な生物学的作用を示すサイトカインであり, 様々な細胞の分化・増殖に関与することが知られている。^{22,23)} FGF の作用は細胞表面にある FGF 受容体に結合することから開始されるが, この過程で FGF が細胞表面の FGF 受容体に効率よく結合するためには細胞表面の HS プロテオグリカンが必須であり, さらにこの HS プロテオグリカンの効果の発現には HS 鎖の硫酸化が必須であること

が知られている。さらに, 造血支持能を示すいくつかのストローマ細胞株から得られた HS が, ヒト造血幹細胞の生存・維持に作用することも報告されている。⁷⁾したがって, HS による巨核球コロニー形成促進作用発現には, HS の高硫酸化クラスター構造が重要であり, それが CD34 陽性細胞と TPO との結合性や安定性に関わっている可能性が推察される。一方, CS-E による巨核球コロニー形成の抑制作用発現には, 構造上にある硫酸基の差に由来する可能性が考えられるが, そのメカニズムの詳細は現時点では不明である。

HA-p と HS による CD34 陽性 CFU-Meg に対す

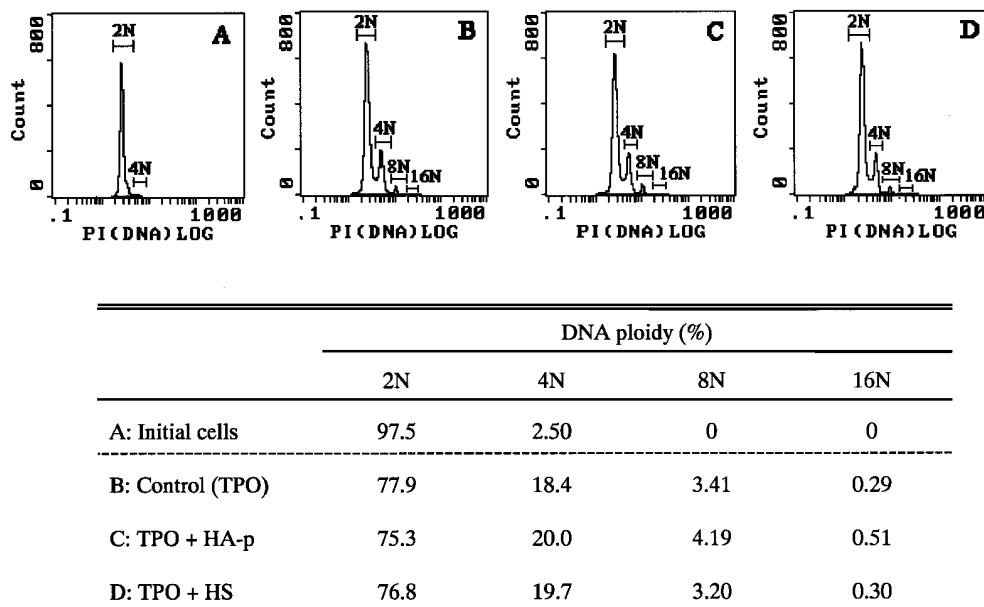


Fig. 3. DNA Ploidy Distributions of Cells Generated in Liquid Culture

The cells harvested from the culture were treated with anti-human FITC-CD41 and PI. DNA ploidy distribution were analyzed by using a flow cytometer. Panel A: Freshly purified CB CD34⁺ cells. Panel B: Suspended cells in liquid culture supplemented with TPO alone. Panel C, D: Suspended cells in liquid culture supplemented with TPO plus HA-p or HS. Each value of DNA ploidy distribution was summarized under the figures.

る巨核球コロニー形成促進作用は、未熟 CFU-Meg に由来する大型巨核球コロニー数の増加によりもたらされた (Fig. 1). また、液体培養後の細胞数及び CFU-Meg 数が、TPO 単独で培養開始時のおよそ 3 倍、5 倍にそれぞれ増加したのに対し、HA-p 及び HS の併用ではそれぞれおよそ 9 倍、18 倍及び 18 倍、39 倍とさらに高い増加を示した (Table 3). しかしながら、回収された細胞のフローサイトメーターによる細胞表面抗原発現率の解析結果から、HA-p 及び HS 添加群とコントロールとの間に有意な差は認められず、産生された巨核球の DNA ploidy の結果からも、巨核球の成熟に対する影響は認められなかった (Fig. 3). これらのことから、HA-p と HS は、CD34 陽性細胞に含まれる造血幹細胞や未熟な CFU-Meg の増殖を促進するが、巨核球の成熟作用は持たないものと考えられる。

臍帯血に含まれる造血幹・前駆細胞は、骨髄中に存在する細胞に比べ未熟でその濃度も高い.^{24,25)} また臍帯血には骨髄や末梢血に比べ巨核球前駆細胞数が多いことも知られているが、²⁶⁾ 一方で造血幹・前駆細胞の未熟さが一因となり、臍帯血造血幹細胞移植後の長期にわたる重篤な血小板減少症が頻発し、臨床上的大きな問題となっている。²⁷⁾ この問題を克服する目的で、分化した CFU-Meg を生体外で特異

的に増幅させたのち、移植することで血小板減少期間の短縮化を目指した試みがなされ、その有効性が示されている。^{28,29)} 多くの場合、TPO を基本に SCF, flt3-ligand, interleukin-3 (IL-3) など複数のサイトカインを組み合わせることで、高い増幅率を得ている。しかし、実際の臨床応用においては、遺伝子組換え型サイトカインを使用する場合のコストや特許の問題は軽視できず、より簡便かつ安価な方法が求められることは言うまでもない。本研究においては、液体培養後、HA-p 及び HS による細胞数と CFU-Meg 数の有意な増加が観察された (Table 3). このような HA-p や HS と TPO との併用効果は、少なくとも CFU-Meg や巨核球の生体外増幅への応用に対し 1 つの可能性を示唆するものである。また、今回 HA-p 及び HS に巨核球の成熟促進作用は認められなかった一方で、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞より成熟した造血前駆細胞を多く含むヒト末梢血 CD34 陽性細胞に対する GAG の作用を検討した結果では、CS-B に有意な巨核球コロニー形成促進作用と共に巨核球成熟促進作用が観察された (データ未発表)。現在ガン化学療法や造血幹細胞移植後におこる血小板減少症改善を目的とした TPO の臨床治験が進められているが、³⁰⁾ TPO は巨核球から直接血小板産生を刺激しないことが示されてお

り, ³¹⁻³³⁾ 別の制御因子・機構の存在が示唆されている。今回 TPO 単独刺激下で GAG それぞれの作用を検討したが、今後 TPO を含め、巨核球造血を促進することが報告されている SCF, erythropoietin, IL-3, IL-6, interleukin-11 など複数のサイトカインといくつかの GAG との組み合わせなど、より詳細な検討が必要であると考えられる。

謝辞 本研究において、臍帯血の採取・供与にご協力頂きました五所川原市・福士助産所福士レイ子先生並びに福士千恵子先生に深謝申し上げます。また、本研究に臍帯血を提供下さいましたすべてのお母さんとお子さんに感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Ogawa M., *Blood*, **81**, 2844-2853 (1993).
- 2) Graham G. J., Wright E. G., *Int. J. Exp. Path.*, **78**, 197-218 (1997).
- 3) Long M. W., *Exp. Hematol.*, **20**, 288-301 (1992).
- 4) Yoder M. C., Williams D. A., *Exp. Hematol.*, **23**, 961-967 (1995).
- 5) Keating A., Gordon M. Y., *Leukemia*, **2**, 766-769 (1988).
- 6) Gupta P., McCarthy J. B., Verfaillie C. M., *Blood*, **87**, 3229-3236 (1996).
- 7) Gupta P., Oegema T. R. Jr., Brazil J. J., Dudek A. Z., Slungaard A., Verfaillie C. M., *Blood*, **92**, 4641-4651 (1998).
- 8) Roberts R., Gallagher J., Spooncer E., Allen T. D., Bloomfield F., Dexter T. M., *Nature*, **332**, 376-378 (1988).
- 9) Hamann K. J., Dowling T. L., Neeley S. P., Grant J. A., Leff A. R., *J. Immunol.*, **154**, 4073-4080 (1995).
- 10) Han Z. C., Bellucci S., Shen Z. X., Maffrand J. P., Pascal M., Petitou M., Lormeau J., Caen J. P., *J. Cell. Physiol.*, **168**, 97-104 (1996).
- 11) Kashiwakura I., Kuwabara M., Inanami O., Murakami M., Hayase Y., Takahashi T. A., Takagi Y., *Radiat. Res.*, **153**, 144-152 (2000).
- 12) Hagiwara T., Kodama I., Horie K., Kato T., Miyazaki H., *Exp. Hematol.*, **26**, 228-235 (1998).
- 13) Harigaya K., Hirasawa A., *Annual Review Blood.*, 41-50 (1991).
- 14) Deguchi T., Komada Y., Sugiyama K., Zhang X. L., Azuma E., Yamamoto H., Sakurai M., *Exp. Hematol.*, **27**, 542-552 (1999).
- 15) Neu S., Geiselhart A., Sproll M., Hahn D., Kucçi S., Niethammer D., Handgretinger R., *Bone Marrow Transplant.*, **20**, 593-598 (1997).
- 16) Goldberg R. L., Toole B. P., *Arthritis. Rheum.*, **30**, 769-778 (1987).
- 17) Sattar A., Kumar S., West D. C., *Semin. Arthritis. Rheum.*, **22**, 37-43 (1992).
- 18) Turnbull J. E., Gallagher J. T., *Biochem. J.*, **265**, 715-724 (1990).
- 19) Turnbull J. E., Gallagher J. T., *Biochem. J.*, **273**, 553-559 (1991).
- 20) Sperinde G. V., Nugent M. A., *Biochemistry*, **39**, 3788-3796 (2000).
- 21) Maccarana M., Sakura Y., Tawada A., Yoshida K., Lindahl U., *J. Biol. Chem.*, **271**, 17804-17810 (1996).
- 22) Yayon A., Klagsbrun M., Esko J. D., Leder P., Ornitz D. M., *Cell*, **64**, 841-848 (1991).
- 23) Rapraeger A. C., Krufka A., Olwin B. B., *Science*, **252**, 1705-1708 (1991).
- 24) Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G., Cooper S., Bard J., English D., Arny M., Thomas L., Boyse E. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3828-3832 (1989).
- 25) Hao Q. L., Shah A. J., Thiemann F. T., Smogorzewska E. M., Crooks G. M., *Blood*, **86**, 3745-3753 (1995).
- 26) Tao H., Gaudry L., Rice A., Chong B., *Exp. Hematol.*, **27**, 293-301 (1999).
- 27) Cairo M. S., Wagner J. E., *Blood*, **90**, 4665-4678 (1997).
- 28) Bertolini F., Battaglia M., Pedrazzoli P., Da Prada G. A., Lanza A., Soligo D., Caneva L., Sarina B., Murphy S., Thomas T., della Cuna G. R., *Blood*, **89**, 2679-2688 (1997).
- 29) Bachier C. R., Gokmen E., Teale J., Lanzkron S., Childs C., Franklin W., Shpall E., Douville J., Weber S., Muller T., Armstrong D., Lemaistre C. F., *Exp. Hematol.*, **27**, 615-623 (1999).
- 30) Vadhan-Raj. S., *Semin. Hematol.*, **37**, 28-34 (2000).
- 31) Ito T., Ishida Y., Kashiwagi R., Kuriya S., *Br. J. Haematol.*, **94**, 387-390 (1996).

-
- 32) Choi E. S., Hokom M. M., Chen J. L. Skrine J., Faust J., Nichol J., Hunt P., *Br. J. Haematol.*, **95**, 227–233 (1996).
- 33) Schattner M., Green D., Cohen I., *Stem Cells*, **16**, 61–65 (1998).