

Title	新たな生体外ヒト造血幹細胞増幅法の確立
Sub Title	Development of culture system for human hematopoietic stem cells without cytokines
Author	櫻井, 政寿(Sakurai, Masatoshi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>ヒト造血幹細胞の生体外増幅は、血液学におけるゴールの1つである。多くの研究者はこの課題をサイトカインの組み合わせを工夫することで乗り越えようとしてきたが、実用化された方法は乏しい。近年ポリビニルアルコール (PVA) にサイトカインを組み合わせることによるマウス造血幹細胞の培養法が報告されたが、同手法ではヒト造血幹細胞の増幅は困難であった。</p> <p>申請者は、シグナル解析の結果から、サイトカインではなく化合物に着目し、PVAにPI3Kアクティベーターである740Y-PおよびTPO受容体作動薬を加える非常にシンプルな培養液で、ヒト造血幹細胞の生体外増幅を行うことに成功した。培養後の細胞は、免疫不全マウスへの異種移植実験にて長期間の造血再構築を達成し、自己複製能および分化能が保持されていることを確かめた。さらに申請者は、PVAよりも培養に適した高分子ポリマーを同定するため、種々のポリマーのスクリーニングを行い、polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (PCL-PVAc-PEG)はさらに効率的にヒト造血幹細胞を増幅できることを示した。PVAの代わりにPCL-PVAc-PEGを用いることにより、30日間の培養後に全細胞数は75倍に、CD34陽性細胞は55倍に増幅し、培養細胞は異種移植実験により、長期の造血再構成を維持することを示した。</p> <p>本課題研究において、サイトカインやアルブミンを含まないヒト造血幹細胞の長期増殖培養システムを開発した。この培養システムは、幹細胞生物学、白血病治療、次世代の造血幹細胞移植および遺伝子治療に従事する基礎研究者と臨床医の両方に強力なプラットフォームを提供する。Hematopoietic stem cells (HSCs) are a rare population of cells residing in the bone marrow (BM) and umbilical cord blood (CB) and continuously produce all mature blood cells throughout the lifespan. Ex vivo expansion of human HSCs, particularly CB HSCs, has therefore long been a major goal in hematology. Recently, we reported establish a novel long-term ex vivo expansion protocol for functional murine HSCs using polyvinyl alcohol (PVA) as a substitute for albumin as well as optimized concentrations of stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO). However, the expansion of human HSPCs in this PVA-based culture system was unstable and limited.</p> <p>To clarify the difference between mouse and human HSPCs during these cultures, we analyzed the phosphorylation status of major signaling pathways. The results showed significant decreases in PI3K and AKT pathways were observed in human cells as compared with the mouse cells, and we found that the expansion efficiency of human CD34+ cell was significantly improved by adding the PI3K activator 740Y-P. Furthermore, we found that human CD34+ cells could be expanded under PVA culture conditions for one week using 740Y-P and a TPO receptor agonist (TPO-RA) instead of SCF and TPO. The cultured cells maintained long-term hematopoietic reconstitution as confirmed by xenotransplantation assays.</p> <p>We next aimed to improve the rate of HSPC expansion ex vivo, and screened 10 polymers. The results showed that a polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (PCL-PVAc-PEG), as supportive of significantly higher cell expansion than PVA. 3a medium containing PCL-PVAc-PEG also supported cell proliferation longer-term, with a 75-fold expansion of total cells and 55-fold expansion of CD34+ cell observed after a 30-day culture. The cultured cells also maintained long-term hematopoietic reconstitution as confirmed by xenotransplantation assays.</p> <p>In conclusion, we have developed a long-term expansion culture system for human HSCs without recombinant cytokines or albumin. the culture system described here provides a powerful platform for both basic scientists and clinicians interested in stem cell biology, leukemia therapeutics, and the next generation of HSC transplantation and gene therapies.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200267">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200267</a>

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	専任講師(有期・医学部)	補助額	300 (A) 千円
	氏名	櫻井 政寿	氏名 (英語)	Masatoshi Sakurai		
研究課題 (日本語)						
新たな生体外ヒト造血幹細胞増幅法の確立						
研究課題 (英訳)						
Development of culture system for human hematopoietic stem cells without cytokines						
1. 研究成果実績の概要						
<p>ヒト造血幹細胞の生体外増幅は、血液学におけるゴールの1つである。多くの研究者はこの課題をサイトカインの組み合わせを工夫することで乗り越えようとしてきたが、実用化された方法は乏しい。近年ポリビニルアルコール(PVA)にサイトカインを組み合わせることによるマウス造血幹細胞の培養法が報告されたが、同手法ではヒト造血幹細胞の増幅は困難であった。</p> <p>申請者は、シグナル解析の結果から、サイトカインではなく化合物に着目し、PVAにPI3Kアクティベーターである740Y-PおよびTPO受容体作動薬を加える非常にシンプルな培養液で、ヒト造血幹細胞の生体外増幅を行うことに成功した。培養後の細胞は、免疫不全マウスへの異種移植実験にて長期間の造血再構築を達成し、自己複製能および分化能が保持されていることを確かめた。さらに申請者は、PVAよりも培養に適した高分子ポリマーを同定するため、種々のポリマーのスクリーニングを行い、polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (PCL-PVAc-PEG)はさらに効率的にヒト造血幹細胞を増幅できることを示した。PVAの代わりにPCL-PVAc-PEGを用いることにより、30日間の培養後に全細胞数は75倍に、CD34陽性細胞は55倍に増幅し、培養細胞は異種移植実験により、長期の造血再構築を維持することを示した。</p> <p>本課題研究において、サイトカインやアルブミンを含まないヒト造血幹細胞の長期増殖培養システムを開発した。この培養システムは、幹細胞生物学、白血病治療、次世代の造血幹細胞移植および遺伝子治療に従事する基礎研究者と臨床医の両方に強力なプラットフォームを提供する。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Hematopoietic stem cells (HSCs) are a rare population of cells residing in the bone marrow (BM) and umbilical cord blood (CB) and continuously produce all mature blood cells throughout the lifespan. Ex vivo expansion of human HSCs, particularly CB HSCs, has therefore long been a major goal in hematology. Recently, we reported establish a novel long-term ex vivo expansion protocol for functional murine HSCs using polyvinyl alcohol (PVA) as a substitute for albumin as well as optimized concentrations of stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO). However, the expansion of human HSPCs in this PVA-based culture system was unstable and limited.</p> <p>To clarify the difference between mouse and human HSPCs during these cultures, we analyzed the phosphorylation status of major signaling pathways. The results showed significant decreases in PI3K and AKT pathways were observed in human cells as compared with the mouse cells, and we found that the expansion efficiency of human CD34+ cell was significantly improved by adding the PI3K activator 740Y-P. Furthermore, we found that human CD34+ cells could be expanded under PVA culture conditions for one week using 740Y-P and a TPO receptor agonist (TPO-RA) instead of SCF and TPO. The cultured cells maintained long-term hematopoietic reconstitution as confirmed by xenotransplantation assays.</p> <p>We next aimed to improve the rate of HSPC expansion ex vivo, and screened 10 polymers. The results showed that a polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (PCL-PVAc-PEG), as supportive of significantly higher cell expansion than PVA. 3a medium containing PCL-PVAc-PEG also supported cell proliferation longer-term, with a 75-fold expansion of total cells and 55-fold expansion of CD34+ cell observed after a 30-day culture. The cultured cells also maintained long-term hematopoietic reconstitution as confirmed by xenotransplantation assays.</p> <p>In conclusion, we have developed a long-term expansion culture system for human HSCs without recombinant cytokines or albumin. the culture system described here provides a powerful platform for both basic scientists and clinicians interested in stem cell biology, leukemia therapeutics, and the next generation of HSC transplantation and gene therapies.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
櫻井政寿	新たなヒト造血幹細胞培養法の確立	第82回日本血液学会学術集会	2020年10月			
櫻井政寿	Development of culture system for human hematopoietic stem cells without cytokines	25th Annual Meeting of the European Hematology Association	2020年6月			
櫻井政寿	Long-Term Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Cytokine-Free Conditions	62nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition	2020年12月			