

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19542

研究課題名(和文) 新たな巨核球分化経路の探索と、造血幹細胞移植マウスモデルにおける応用

研究課題名(英文) Investigation of novel differentiation of megakaryocyte and its application in the mouse model

研究代表者

栗田 尚樹 (KURITA, Naoki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30555561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト臍帯血より分離した巨核球前駆細胞を用い、単一細胞レベルで遺伝子発現解析を行ったところ、巨核球関連遺伝子であるcMpl、GPIb、vWF遺伝子の発現を認めた。我々がマウスで同定した巨核球前駆細胞の遺伝子発現と類似しており、同細胞がヒトにおけるカウンターパートである可能性が高い。成人造血器腫瘍15例に対して、臍帯血骨髓内移植を行った。血小板の回復は13例に認められ、臍帯血静脈内移植より有意に優れていた。また移植後早期に注入部位局所のドナー造血が亢進していた。ヒト臍帯血中に血小板分化に傾いた造血幹細胞(巨核球前駆細胞)が存在し、骨髓内移植された局所で血小板造血に与ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Gene expression at single cell level was analyzed with megakaryocytic progenitors extracted from human cord blood. The expression of megakaryocyte-related genes such as cMpl, GPIba, and vWF was observed, which is similar to the expression of the megakaryocytic progenitor that we previously found in mice.

Intrabone-marrow transplantation of cord blood was performed with 15 adult cases with hematological malignancies. Platelet recovery was seen in 13 cases, which was superior to that of intravenous cord-blood transplantation. On-site hematopoiesis was enhanced after intrabone-marrow transplantation. These results suggest that megakaryocytic progenitors of cord blood which engraft at the local site contribute to platelet production after transplantation.

研究分野：血液内科学

キーワード：巨核球前駆細胞 臍帯血骨髓内移植

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 血小板需要が高まった際には、血小板は新たな分化経路を辿る

正常造血において、造血幹細胞 (HSC) から骨髄球系共通前駆細胞 (CMP) を経て、巨核球・赤芽球共通前駆細胞 (MEP) へと分化した後、成熟巨核球・血小板が分化すると考えられてきた。しかし近年、CMP を経ずに HSC から分化早期の段階で巨核球へと運命決定される新たな分化経路の存在が示唆された。申請者らのグループは、化学療法後の造血回復期や造血幹細胞移植後など、血小板需要が高まった際には、新たな分化経路を辿って巨核球への分化が生じることをマウスにおいて明らかにした。この分化経路上にある細胞分画が CD34, GPIb $\alpha$  陽性巨核球前駆細胞 (以下「巨核球前駆細胞」) である。このように複数の巨核球供給経路が存在することは、生体の緊急需要に応じて血栓止血に必須な血小板を on demand に供給する為に合理的である。

### (2) 同種臍帯血移植では、血小板の生着不全が問題である

同種造血幹細胞移植は、臨床的に普及している唯一の幹細胞療法であり、また造血器腫瘍に対する最も強力な治療法である。臍帯血を用いた移植は、ドナーへの負担がないこと、迅速に移植片が入手できること、有害な免疫反応が少ないことから理想的な移植法である。しかし臍帯血に含まれる造血幹細胞の数は他の移植片 (骨髄あるいは末梢血幹細胞) より少ないことから、高率に好中球生着不全となるだけでなく、血小板の生着不全も 30% 以上に生じる。その結果、臍帯血移植後に易出血性の危険に長期間曝されるだけでなく、頻回の血小板輸血を必要とすることから、入院の長期化および頻回の外来通院により移植患者の生活の質が大きく損なわれるのみならず、医療経済への負担も大きい。

## 2. 研究の目的

### (1) ヒトにおける「巨核球前駆細胞」を同定し、新たな巨核球分化経路上にあることを証明する

申請者は、化学療法後の造血回復期にある造血器疾患患者の骨髄、*JAK2 V617F* 変異を有する本態性血小板血症患者の末梢血、およびヒト臍帯血より、CD34 および GPIb $\alpha$  陽性の細胞分画をフローサイトメトリー法で同定した。これは申請者のグループがマウスにおいて証明した「巨核球前駆細胞」に相当し、新たな巨核球分化経路上にある細胞であると考えた。本研究では、ヒトにおいて見出した CD34, GPIb $\alpha$  陽性細胞を単離し、単細胞を用いた RT-PCR による遺伝子発現を解析し、同細胞分画が巨核球への分化能を有した、ヒトにおける新たな巨核球分化経路にあることを示す。

### (2) 臍帯血骨髄内移植法により、血小板回復が促進されることを示す

接着分子である CXCR4 を欠くヒト造血幹細胞は、造血幹細胞移植マウスモデルにおいて静脈内投与では生着せず、骨髄内投与においてのみ生着が認められる。また同幹細胞は、巨核球に分化しやすい細胞分画であることが示されている。この知見に基づき、本研究ではヒトの臍帯血移植時に臍帯血を骨髄内に移植することで、その後の血小板回復が促進されることを示す。また移植後の局所骨髄および遠隔骨髄における造血を観察することにより、骨髄内移植後の造血の場を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 造血回復期における、ヒト巨核球前駆細胞の同定および単離

造血器腫瘍に対する化学療法後の造血回復期にある患者の骨髄、*JAK2 V617F* 変異を有する本態性血小板血症患者の末梢血、および臍帯血を対象検体とした。同検体中に CD34 および GPIb $\alpha$  陽性細胞が存在すると考えられ、これらは申請者らのグループが既にマウスで同定した巨核球前駆細胞 ( $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{cKit}^+ \text{CD34}^+ \text{GPIb}\alpha^+$ ) に相当する細胞分画であり、新たな巨核球分化経路に位置する細胞である可能性が高い。そこで同細胞分画をフローサイトメトリー法で検出を行い、セルソータ (FACS Aria $\text{\textcircled{R}}$ ) にて単離した。

### (2) ヒト巨核球前駆細胞の遺伝子発現

セルソータで単一細胞に分離した巨核球前駆細胞より cDNA を作成した後、RT-PCR にて遺伝子発現を解析した。巨核球関連遺伝子である *cMpl*, *vWF*, *GPIb $\alpha$* , *GATA1* 遺伝子の発現レベルを単一細胞にて定量した。

### (3) 臍帯血骨髄内移植

同種造血幹細胞移植の適応であり、HLA 適合ドナーを有しない成人造血器腫瘍症例に対し、前向き介入臨床試験として本研究を行った。移植に先立ち、骨髄破壊的前処置あるいは緩和的前処置を行った。臍帯血ユニットは 37 $^{\circ}\text{C}$  の恒温槽で解凍した後、シリンジ 4 本に分注した。患者の後腸骨稜に局所麻酔した後、骨髄穿刺針 4 本を挿入した。0.5ml の骨髄液を吸引し、穿刺針が適切な部位に挿入されていることを確認した後、4 本に分注した臍帯血を各 2 分かけて後腸骨稜に輸注した。生理食塩液 0.5ml を輸注した後に針を抜去した。移植後は通常と同種造血幹細胞移植に準じて処置を継続し、その後の血球回復 (好中球および血小板) を観察した。血球回復は、造血幹細胞移植データセンターより提供された本邦の移植レジストリーデータ (TRUMP) を用いて、臍帯血静脈内移植後のデータと比較した。

また骨髄内移植後の造血の場を同定するため、移植後に臍帯血輸注部位 (腸骨骨髄) と遠隔部位 (胸骨骨髄) から経時的に試料を採取

し、各部位におけるドナーキメラズムを XY-FISH 法または STR-PCR 法にて定量した。

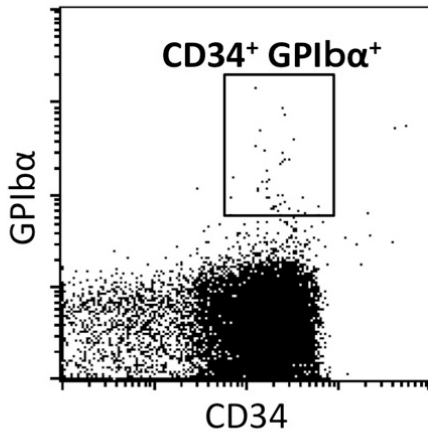
本試験は筑波大学附属病院倫理委員会の承認を得て行った。(UMIN000006175)

#### 4. 研究成果

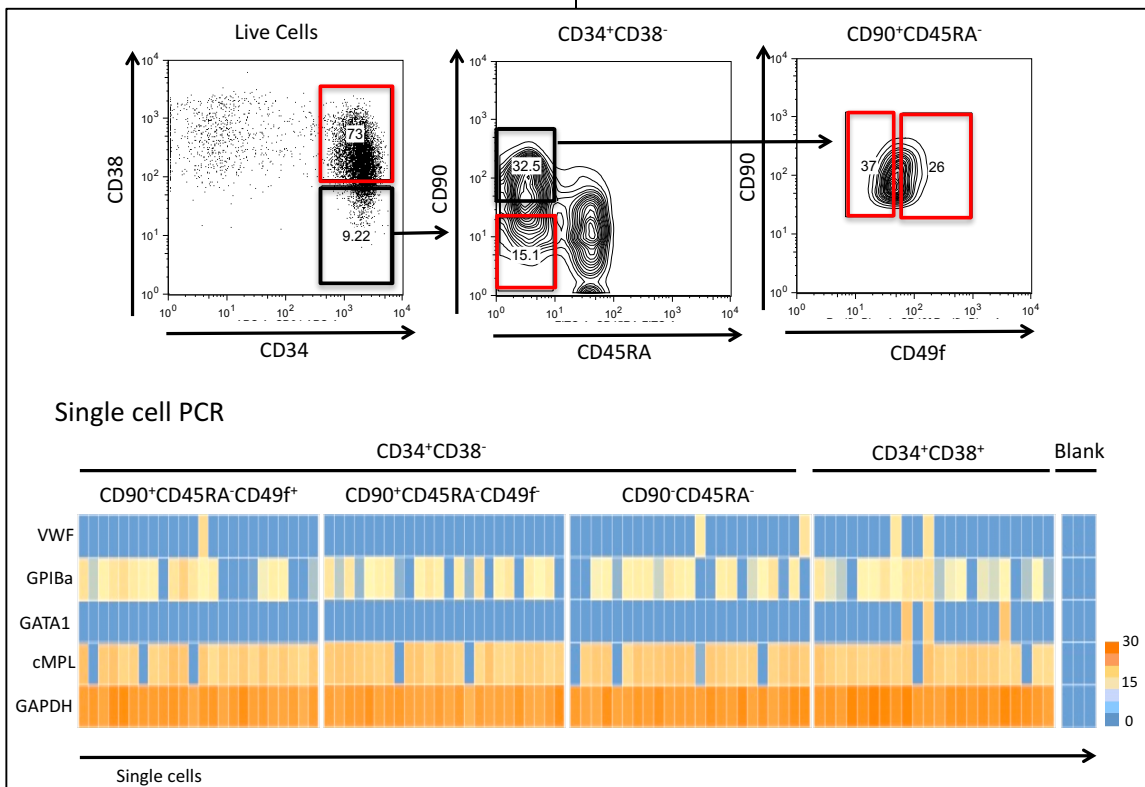
##### (1) 造血回復期における、ヒト巨核球前駆細胞の同定および単離

造血器腫瘍に対する化学療法後の造血回復期にある患者の骨髄、*JAK2* V617F 変異を有する本態性血小板血症患者の末梢血、および臍帯血バンクより提供された臍帯血を対象検体として、ヒトにおいて「巨核球前駆細胞」に相当する細胞を探索した結果、各検体において CD34, GPIb $\alpha$  陽性「巨核球前駆細胞」が存在することを見出した (図 1)。

(図 1)



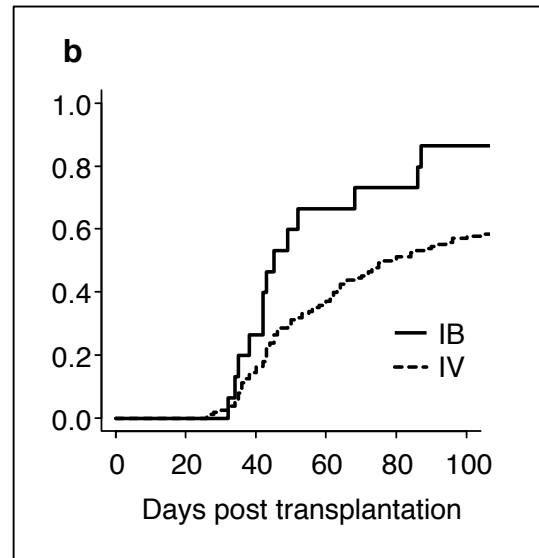
(図 2)



##### (2) ヒト巨核球前駆細胞の遺伝子発現

ヒト臍帯血よりセルソータで分離した巨核球前駆細胞を用いて、単一細胞レベルで遺伝子発現解析を行った (図 2)。その結果、未分化な造血幹細胞分画 (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>) に含まれる細胞中に、巨核球関連遺伝子である *cMpl*, *GPIb $\alpha$*  遺伝子の発現を認め、一部の細胞には *vWF* 遺伝子も発現していた。この結果は、我々のグループがマウスにおいて同定した巨核球前駆細胞 (Nishikii, Stem Cell 2016) の遺伝子発現と類似しており、同細胞がヒトにおけるカンターパートである可能性が高い。現在、同細胞分画を用いた分化能の解析を行っている。

(図 3)



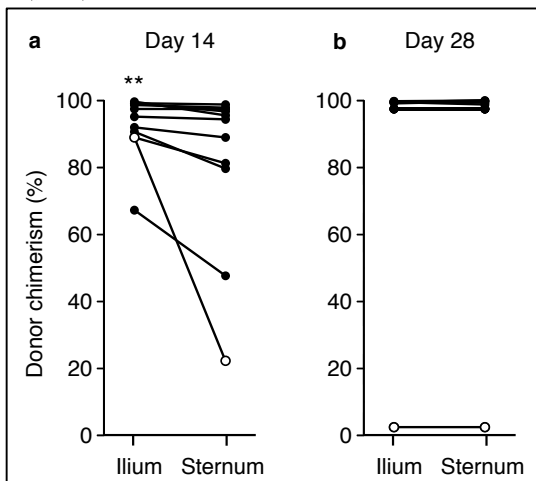
### (3) 臍帯血骨髄内移植

成人造血器腫瘍 15 例に対して、臍帯血骨髄内移植を行った。移植後の血小板の回復 (5 万/mm<sup>3</sup>) は 13 例 (87%) に認められ、その中央値は移植後 45 日 (範囲 32-87 日) であった。一方でレジストリデータにおける臍帯血静脈内移植後の血小板回復は 58%, 中央値 78 日であり、血小板回復は骨髄内移植群で有意に優れていた (図 3,  $P=0.007$ )。一方で、好中球生着は、骨髄内移植と静脈内移植で差を認めなかった ( $P=0.19$ )。

骨髄内移植法を行った症例に対し、移植後早期 (14 日)、血球回復後 (28 日) に輸注局所 (腸骨骨髄) および遠隔部位 (胸骨骨髄) より検体を採取し、両検体のドナーキメラを解析した。その結果、移植後早期に局注入部位のドナー造血が亢進していた (図 4,  $P=0.006$ )。

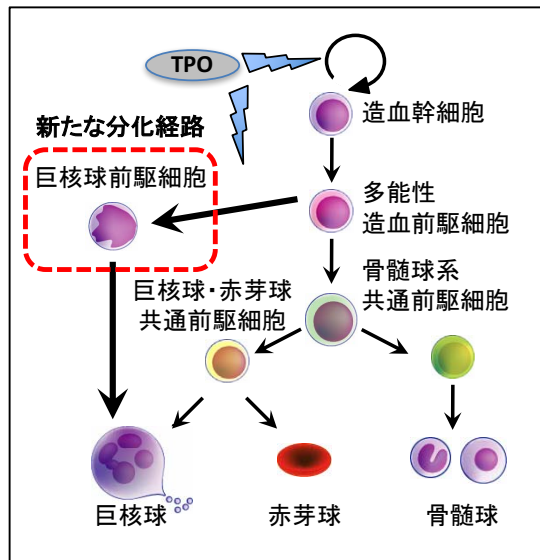
これらのことから、ヒト臍帯血中に血小板分化に傾いた造血幹細胞 (巨核球前駆細胞) が存在し、骨髄内移植された局所に生着することで移植後の造血 (特に血小板産生) に与ることが示唆された。

(図 4)



以上の一連の解析から、マウスだけではなくヒトにおいても血小板造血に傾いた造血幹細胞 (巨核球前駆細胞) の存在が示唆された。巨核球前駆細胞の分化、成熟にはトロンボポエチンが重要な働きをすることを示唆するデータが得られたため (未発表データ)、トロンボポエチンシグナルを用いた巨核球前駆細胞の細胞生物学的、分子学的解析を行っている (図 5)。

(図 5)



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Nishikii H, Kurita N, Chiba S. The road map for megakaryopoietic lineage from hematopoietic stem/progenitor cells. Stem Cells Translational Medicine, in press.

2. Kurita N, Goshō M, Yokoyama Y, Kato T, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Hasegawa Y, Uchida N, Takahashi S, Kouzai Y, Atsuta Y, Kurata M, Ichinohe T, Chiba S. A phase I/II trial of intrabone marrow cord blood transplantation and comparison of the hematological recovery with the Japanese nationwide database. Bone Marrow Transplantation 52: 574-79, 2017. DOI: 10.1038/bmt.2016.319

3. Kurita N, Frassoni F, Chiba S, Podesta M. Impact of length of cryopreservation and origin of cord blood units on hematologic recovery following cord blood transplantation. Bone Marrow Transplantation 50: 818-21, 2015. DOI: 10.1038/bmt.2015.56

[学会発表] (計 4 件)

1. Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Takayasu Kato, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba. Comparison of rTM and conventional therapy for DIC in cases with hematological malignancies.

第 78 回日本血液学会学術集会 (2016 年 10 月 13-15 日, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)

研究者番号 : 30555561

2. Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Hideharu Muto, Takayasu Kato, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba.

Recombinant thrombomodulin ameliorates hematological malignancy-induced disseminated intravascular coagulation more promptly than conventional therapy without causing severe hemorrhagic events. 21st congress of European Hematology Association (2016 年 6 月 9-12 日, コペンハーゲン, デンマーク)

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし

3. Naoki Kurita, Masahiko Goshō, Yasuhisa Yokoyama, Hideharu Muto, Takayasu Kato, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, Yoshiko Atsuta, Tatsuo Ichinohe, Francesco Frassoni, Shigeru Chiba.

Improved Platelet Recovery after Intra-Bone Marrow Cord Blood Transplantation: a Result of Phase I/II Trial and a Comparison with Japanese Nation-Wide Transplant Database.

The 7th JSH International Symposium 2016 (2016 年 5 月 13-14 日, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫県淡路市)

4. Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Sachie Suzuki, Masanori Seki, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, Francesco Frassoni, Shigeru Chiba.

Hematological recovery after intra-bone marrow cord-blood transplant was enhanced through local engraftment of injected site. A single center prospective phase I/II trial in Japan.

20th congress of European Hematology Association (2015 年 6 月 11-14 日, ウィーン, オーストリア)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗田 尚樹 (KURITA NAOKI)

筑波大学・医学医療系・講師