

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591144

研究課題名（和文） ヒト未分化 CD34 抗原陰性造血幹細胞の特性解明と再生医療への応用

研究課題名（英文） Characterization of human CD34-negative hematopoietic stem cells and their application for regenerative medicine

研究代表者

藺田 精昭 (SONODA YOSHIAKI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60206688

研究成果の概要：

われわれは骨髄内直接移植法を開発することにより、ヒト臍帯血中に非常に未分化な CD34 抗原陰性造血幹細胞(CD34-HSC)の同定に初めて成功した。本研究で、この CD34-HSC が c-kit や flt3 というマウス HSC に重要な分子を発現しないこと、さらに、従来未分化とされていた CD34⁺CD38⁺HSC よりも未分化な幹細胞であり、異なる in vivo 増殖分化動態を示すことを明らかにした。一方、CD34-HSC の可塑性は極めて限定的なものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、臍帯血、CD34 抗原、骨髄内移植法、重症免疫不全マウス、可塑性、再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞(HSC)の本体の解明には、その純化が不可欠であることはいままでもない。マウスに関しては、Osawa らにより骨髄由来の 1 個の CD34⁺KSL(kit⁺Sca-1⁺Lin⁻)細胞が致死量の放射線を照射したマウスの骨髄を再構築することから、ほぼ純化された HSC と考えられていた(Science,1996)。一方、

ヒト HSC に関しては、その陽性マーカーが明らかにされていないことと、測定法の限界もあって十分に明らかにされていなかった。ヒト未分化 HSC の測定法としては、NOD/SCID マウスを用いる異種間移植系が開発(Nat Med,1996)されたことにより、ヒト長期骨髄再構築細胞 (LTR-HSC) と考えられる SCID-repopulating cell (SRC)の測定が可能に

なった。本法を用いることにより、CD34⁺SRCの幹細胞特性やその heterogeneity が次第に明らかにされつつあった。しかし、SRCの生物学的特性には不明の点が多く、その可塑性に関してはほとんど明らかにされていなかった。

われわれは、独自に開発した骨髓腔内直接移植 (Intra-bone marrow injection, IBMI) 法を用いることにより、ヒト臍帯血中にCD34⁺SRCが存在することを世界で初めて直接的に証明した (Blood 101:2924,2003)。しかしながら、このヒトCD34⁺SRCの純化レベルは1/24,000と低く、更なる純化法の開発と幹細胞特性の解明が待たれていた。

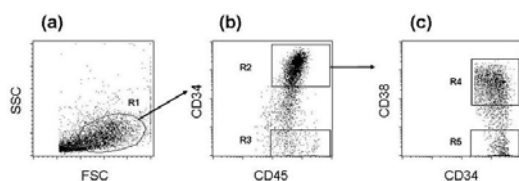
2. 研究の目的

本研究の目的は、われわれが、最近、IBMI法を用いてヒト臍帯血中に同定した新規なCD34⁺SRCの免疫特性と幹細胞性を明らかにすることにより、近い将来により効率的な造血幹細胞移植療法を開発・確立し、さらに、近未来の非造血組織の再生医療に応用することである。

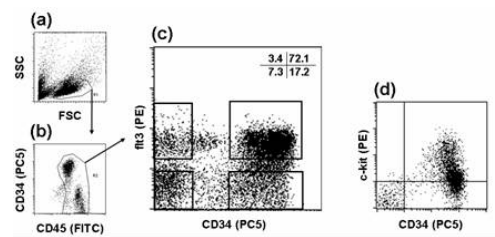
3. 研究の方法

(1) 標的幹細胞の純化方法

既報 (Blood101:2924,2003) に従って、ヒト臍帯血由来単核細胞より、8種類の抗体と免疫磁気コロイドを用いて分化抗原陰性 (Lin⁻)細胞を得る。この細胞を既報の抗CD34、抗CD38、抗CD45抗体で3重染色し、FACSを用いて Lin⁻CD45⁺CD34^{high/low} 及び Lin⁻CD45⁺CD34^{high}CD38⁺細胞を採取した (図1)。



(図1) 標的細胞のFACSによる分取法 (1)



(図2) 標的細胞のFACSによる分取法 (2)

同様に、図2に示すように Lin⁻CD45⁺CD34^{high/low}flt3⁺細胞を採取して、以下の *in vitro* および *in vivo* の実験に用いた。

(2) IBMI法を用いる Scid-repopulating cell (SRC)の測定方法と多臓器における解析法

SRCの測定方法は既報の方法を一部変更 (Blood 101:2924,2003; Int J Hematol 79:328, 2004) して行った。予め2.5Gyの放射線照射を行なった8~10週齢の雌NOD/SCID(あるいはNOG)マウスの左脛骨に純化した細胞分画をIBMI法で注入した。移植4~24週間後まで、マウスを経時的に犠牲死させて骨髓細胞及び末梢血を採取し、抗ヒトCD45抗体で染色後にFACS Caliburで解析した。同時に、抗ヒトCD13,CD14,CD33,CD34,CD19,CD3,CD41, GPAなどに対するモノクローナル抗体で染色し multilineage 解析も行った。さらに、マウスの脾臓、肝臓、膵臓、心臓など多臓器における解析も行った。

(3) CD34⁺SRCの免疫特性の解明と hierarchy 上の位置付けに関する研究

(1)で純化した Lin⁻CD45⁺CD34^{high/low}flt3⁺細胞をNOD/SCIDマウスに移植して、CD34, flt3の発現パターンとSRC活性を指標としてCD34⁺SRCの免疫特性について検討した。また、Lin⁻CD45⁺CD34^{high}細胞と Lin⁻CD45⁺CD34^{high}CD38⁺細胞を各々NOD/SCIDあるいはNOGマウスに移植して長期骨髓再構築能について詳細な検討を加えた。

(4) 臍帯血由来 Lin⁻CD45^{low}CD34⁺細胞に高発現する新規 (既知) マーカー分子の解析

(1)の方法で臍帯血より純化した Lin⁻CD45^{low}CD34⁺細胞および Lin⁻CD45^{low}CD34^{high}細胞（一部は Lin⁻CD34⁺CD38⁺細胞）より各々total RNA（あるいは poly(A)⁺RNA）を抽出し、GeneChip を用いる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(5) CD34⁺SRC の可塑性（分化転換能）に関する検討

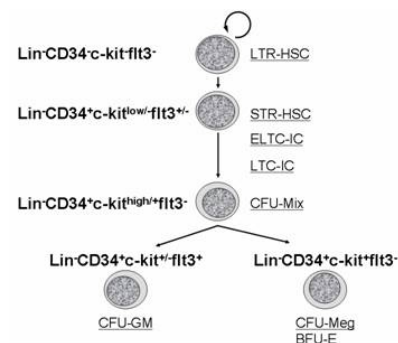
純化した Lin⁻CD34⁺細胞を NOD/SCID マウスに移植し、一定期間において採取したマウス臓器における、CD45⁺HLA-ABC⁺細胞の存在について FCM で解析した。一部のマウスにおいて、臓器よりパラフィン切片（あるいは凍結切片）標本を作製し、病理組織学および免疫組織化学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) CD34⁺HSC の免疫特性

CD34 抗原は、長い間ヒト HSC の重要なマーカーと信じられてきた。しかし、マウスにおいて長期の造血再構築能を示す HSC が CD34 抗原を発現していないことが示された。

われわれは最近になり、IBMI 法を開発することにより、ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSC の確実な同定に初めて成功した。本研究で CD34⁺SRC の免疫特性に関して詳細な検討を加え、最近その免疫特性が Lin⁻CD34⁺c-kit⁺flt3⁺であることを明らかにした（図3）。



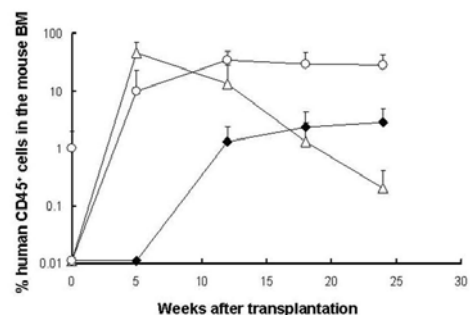
(図3) ヒト HSC の免疫特性

Flt3 の発現に関しては、長期骨髓再構築能

をもつマウス CD34⁺KSL 細胞も発現しておらず、flt3 の発現とともにリンパ球・顆粒球系への分化能を示す HSC（赤血球系、巨核球系細胞への分化能を失う）に分化することが報告されている。このように、ヒトとマウスの最も未分化と考えられる HSC の免疫特性は、c-kit の発現を除くと一致している（論文2,4）。

(2) CD34⁺HSC の hierarchy 上の位置付け

これまでの研究で、新たに同定した CD34⁺SRC が、①*in vitro* 及び *in vivo* で CD34⁺SRC を産生すること、②緩徐な骨髓再構築動態より深い細胞静止状態にあることが示唆されたことなどより、非常に未分化な幹細胞であることが窺われた。本研究では、CD34⁺SRC の hierarchy 上の位置付けをさらに明らかにする目的で、従来最も未分化とされていた CD34⁺CD38⁺SRC と自己複製能に関して NOG マウスを用いる長期異種間移植実験系で詳細な検討を加えた。



(図4)CD34⁺SRC (1個、●)、CD34⁺CD38⁺SRC (10個、○)、CD34⁺CD38⁺SRC (2~3個、△) 移植時の右脛骨中の生着率の推移

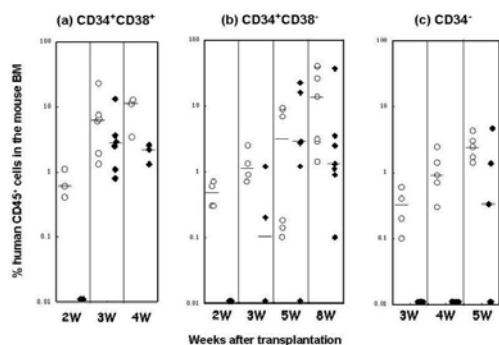
その結果、①CD34⁺CD38⁺SRC は、移植後5週間で生着率がピークとなり、その後減少していくこと、②CD34⁺CD38⁺SRC は、移植後12週で生着率がピークを示すが、24週目でも維持されていること、③CD34⁺SRC を1個移植した場合には、5週目ではまだ注入部位の反対側に生着が認められず、12週後以降に認められることが明らかになった。特に、1個の CD34⁺SRC を移植したマウスにおいて、

移植後 24 週目でも 10 個の CD34⁺CD38⁻SRC を移植したマウスと同等の生着率が認められた (図 4)。

以上の結果より、CD34⁺CD38⁺SRC は short-term repopulating HSC であり、一方、CD34⁺CD38⁻SRC と CD34⁺SRC は、NOG マウスにおいて少なくとも 24 週間ヒトの造血を支持する long-term repopulating HSC と考えられた。さらに、CD34⁺SRC は、CD34⁺CD38⁻SRC に比べて、増殖が緩序で、高い増殖能を示したことから、hierarchy 上より上位な未分化幹細胞であることが示唆された(投稿中)。

(3) CD34⁺SRC, CD34⁺CD38⁻SRC, CD34⁺CD38⁺SRC の in vivo 増殖分化動態

各々 2~3 個の CD34⁺SRC, CD34⁺CD38⁻SRC, CD34⁺CD38⁺SRC を IBMI 法で NOD/SCID マウスの左脛骨に移植し、移植後 2~8 週間経時的に移植部位と反対側の脛骨中の生着率を解析した。その結果、CD34⁺CD38⁺ SRC は移植後 3 週目には反対側に遊走して生着していた。CD34⁺CD38⁻SRC は、移植後 5 週目には反対側に遊走して生着していた。一方、CD34⁺SRC は、移植 5



週目でも約半数のマウスで移植した左脛骨内に留まっていた (図 5)。

(図 5) CD34⁺SRC, CD34⁺CD38⁻SRC, 及び CD34⁺CD38⁺SRC 移植後の注入部位 (左脛骨、○) と反対側 (右脛骨、●) の生着率の推移

このことから、CD34⁺SRC は、注入部位の

ニッチ内で比較的長く留まって、ゆっくりと増殖してから遊走していくものと推測された。以上より、CD34⁺SRC と CD34⁺CD38⁻ SRC 及び CD34⁺CD38⁺SRC は明らかに異なる in vivo 増殖分化動態を示すことが示唆された (投稿中)。

(4) 臍帯血由来 Lin⁻CD45^{low}CD34⁺細胞に高発現する新規 (既知) マーカー分子の同定

3-(1)の方法により純化した Lin⁻CD45^{low}CD34⁺細胞および Lin⁻CD45^{low}CD34^{high}細胞より各々 total RNA を抽出し、GeneChip を用いる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、Lin⁻CD34^{high}細胞により強く発現している 20 数個の遺伝子を同定した (この中には AC133, HoxA9, MLF-1, c-Mpl などが含まれている)。さらに、Lin⁻CD34⁺CD38⁺細胞と比較することにより、CD34⁺SRC に高率に発現していると考えられる 3 つの膜表面分子 (いずれも接着分子) を同定した (未発表)。

(5) CD34⁺SRC の可塑性 (分化転換能)

CD34⁺SRC の可塑性について解析するために、各々 CD34⁺SRC を IBMI 法で移植した NOD/SCID マウスにおいて、骨髄以外の臓器 (脾臓、肝臓、腎臓、心臓、消化管、脳) におけるヒト CD45⁺HLA-ABC⁺細胞の存在について詳細な解析を行った。

その結果、CD34⁺SRC を移植したいずれの NOD/SCID マウスにおいても、FCM 解析で肝臓中に少数の CD45⁺HLA-ABC⁺細胞が認められた。しかしながら、これらの細胞が肝細胞であることを免疫組織化学的解析で同定することは困難であった。これ以外の臓器においてはヒト由来細胞の存在は確認できなかった。

現在、①移植マウスをヒト細胞の生着率の高い NOG マウスに変更すること、②定常状態だけでなく、肝部分切除、CCl₄投与などの再生ストレス存在下、あるいは③組織再生促

進因子である HGF 投与下、における検討について準備している。

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 8 件)

1. Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Sonoda Y, et al. (他 18 名、22 番目): Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Va24 invariant natural killer T cells. *J Immunol*, 2009, in press.
2. Sonoda Y: Immunophenotype and functional characteristics of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: The significance of the intra-bone marrow injection. *J Autoimmunity* 30:136-144, 2008.
3. 藪田精昭: 造血幹細胞の骨髄内移植—その臨床的意義—. 最新医学; 63(12):27-33, 2008.
4. Kimura T, Asada R, Wang J, Kimura T, Morioka M, Matsui K, Kobayashi K, Henmi K, Imai S, Kita M, Tsuji T, Sasaki Y, Ikehara S, Sonoda Y: Identification of long-term repopulating potential of human cord blood-derived CD34⁺flt3⁻ severe combined immunodeficiency-repopulating cells by intra-bone marrow injection. *Stem Cells* 25:1348-1355, 2007.
5. Harada S, Kimura T, Sonoda Y, et al. (他 5 名、8 番目): Flt3 ligand promotes myeloid dendritic cell differentiation of human hematopoietic progenitor cells: Possible application for cancer immunotherapy. *Int J Oncol* 30:1461-1468, 2007.
6. Ueda Y, Itoh T, Fuji N, Sonoda Y, et al. (他 14 名、12 番目): Successful induction of clinically competent dendritic cells from

granulocyte colony-stimulating factor-mobilized monocytes for cancer vaccine therapy. *Cancer Immunol Immunother* 56:381-389, 2007.

7. Anderson K, Rusterholz, Sasaki Y, Jacobsen SEW, et al. (他 6 名、7 番目): Ectopic expression of PAX5 promotes self renewal of bi-phenotypic myeloid progenitors co-expressing myeloid and B-cell lineage associated genes. *Blood* 109:3697-3705, 2007.
8. 藪田精昭: 幹細胞と再生医学。血液・腫瘍科 55 (Suppl.5):52-62, 2007.

[学会発表] (計 12 件)

1. 中塚隆介、野崎中成、松岡由和、菅野渉平、植村靖史、佐々木 豊、藪田精昭: CD45 陰性歯髄幹細胞の探索と筋系譜細胞への分化転換。第 8 回日本再生医療学会総会、東京、2009.3.6.
2. 木村 卓、松岡由和、植村靖史、佐々木 豊、福原資郎、藪田精昭: 臍帯血由来血管内皮前駆細胞に対する IL-8 の作用について。第 31 回日本造血細胞移植学会総会ワークショップ、札幌、2009.2.5.
3. 木村 卓、松岡由和、村上真理、長谷 真、佐々木 豊、福原資郎、藪田精昭: 臍帯血由来血管内皮前駆細胞の同定とその機能解析。第 70 回日本血液学会総会、京都、2008.10.12.
4. 藪田精昭: ヒト造血幹細胞の本体はどこまで解明されたのか?—骨髄内直接移植法の臨床的意義について—。第 1 回 Lymphoma Club 特別講演、堺、2008.9.20.
5. 佐々木 豊、松岡由和、長谷 真、藪田精昭: マウス造血幹細胞に対する SDF-1 の作用機構の解析。第 18 回日本サイトメトリー学会総会シンポジウム、東京、2008.6.28

6. **Sonoda Y.** Functional characteristics of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: The significance of the intra-bone marrow injection. Hematology Conference, Louisville, KY, U.S.A., April 11, 2008.
7. **Sonoda Y:** Immunophenotype and functional characteristics of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: The significance of the intra-bone marrow injection. The 21st Century Center of Excellence (COE) Program “Novel BMT Methods for Intractable Diseases: From Benching to Bedside”, Osaka, October 27, 2007.
8. 木村貴文、浅田留美子、木村 卓、松岡由和、長谷 真、佐々木 豊、**菌田精昭**：ヒト CD34 陰性造血幹細胞の in vivo 増殖分化動態とその未分化性の解明。第 69 回日本血液学会総会、横浜、2007.10.11.
9. 原田佐智夫、木村貴文、伊藤 剛、上田祐二、**菌田精昭**：Flt3 リガンドによるヒト PBSC 由来 DC 前駆細胞の増幅とその機能解析。第 17 回日本サイトメトリー学会総会、浦安、2007.7.6.
10. 木村貴文、浅田留美子、木村 卓、二宗みのり、長谷 真、佐々木 豊、**菌田精昭**：ヒト CD34 抗原陰性未分化造血幹細胞の幹細胞特性の解明。第 17 回日本サイトメトリー学会総会シンポジウム、浦安、2007.7.5.
11. **菌田精昭**：ヒト造血幹細胞の本体はどこまで解明されたのか—骨髄内骨髄移植の臨床的意義—、第 15 回奈良県造血細胞移植研究会特別講演、奈良、2007.5.26.
12. 木村貴文、浅田留美子、木村 卓、長谷真、佐々木 豊、**菌田精昭**：ヒト CD34 抗原陰性造血幹細胞の未分化性について。

第 5 回幹細胞シンポジウム、淡路、2007.5.17.

〔図書〕(計 3 件)

1. **菌田精昭**：造血幹細胞の本体はどこまで解明されたのか。造血器腫瘍アトラス pp17-33, 日本医事新報社、東京、2009.
2. **菌田精昭**：骨髄内造血幹細胞移植。造血器腫瘍アトラス pp538-543, 日本医事新報社、東京、2009.
3. **Sonoda Y:** The use of bone marrow transplantation to treat autoimmune disease. Immunophenotype and functional characteristics of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: The significance of the intra-bone marrow injection. pp136-144, Elsevier Ltd. 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ：

幹細胞生物学講座(衛生学講座)

<http://www3.kmu.ac.jp/hygiene/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菌田 精昭 (SONODA YOSHIAKI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60206688

(2) 研究分担者(2007年度)

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80425066

(3) 連携研究者(2008年度)

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80425066