

平成21年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591250

研究課題名（和文） 造血幹細胞表面抗原修飾による骨髄生着促進の機構解析

研究課題名（英文） The cell-surface modification enhances the engraftment of human CD34-positive cells into immunodeficient mice

研究代表者

小林 正夫（KOBAYASHI MASAO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00162016

研究成果の概要：

造血幹細胞移植においてドナー細胞の生着促進は临床上重要な課題である。本研究ではヒト臍帯血由来造血細胞を純化後、生着促進に関係するケモカイン受容体の一つである CXCR4 の発現と免疫不全マウス（NOD/SCID）への移植（静脈内輸注）を行った。2時間の無血清培養、好中球エラストラーゼ処理を行うと造血幹細胞表面 CXCR4 の発現が有意に増加し、CXCR4 の inhibitor である AMD3100 を培養に添加すると CXCR4 の発現増加はほぼ完全に抑制された。培養後の造血細胞、AMD3100 添加培養後の細胞、非培養細胞の移植の結果、16 時間後のホーミング活性、8～10 週後のマウス骨髄再構築能ともに細胞表面 CXCR4 発現が増強された細胞群で有意なホーミング活性の増強とヒト細胞のマウス骨髄内の再構築能増加が認められた。臍帯血由来造血幹細胞は2時間の無血清培養により、自己複製能を維持しながら、CXCR4 の発現増強を介して骨髄生着促進が認められることが明らかとなり、造血幹細胞表面の接着因子の発現を増強させることにより、少量の造血幹細胞でも骨髄生着が可能となることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・小児科学

キーワード：造血幹細胞，細胞表面抗原，免疫不全マウス，細胞接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植において、ドナー細胞の生着、造血回復促進の分子機構を明らかにする

ことは臨床的に非常に重要である。ドナー細胞の生着に関与する主要三因子は、造血幹細胞、リンパ球、ストローマ細胞である。本研

究ではヒト造血幹細胞の純化とその細胞表面分子を修飾することにより、造血細胞とストローマ細胞との相互作用の分子機構を明らかとし、少量の幹細胞からの移植を可能にすることと、移植関連合併症を最小限とした効率的造血幹細胞移植への臨床応用の基礎研究を行うことが必要である。

## 2. 研究の目的

造血細胞表面には細胞接着に必要な多くの糖蛋白からなる分子が明らかとされているが、一部にはこれらの分子を不活化する酵素も同時に存在している。また、表面分子がある種の刺激によって抗原が新たに露出されることにより機能を発揮する分子、といった多くの機能が同時に存在している。そこで、造血幹細胞とストローマ細胞の相互作用に最も有効に機能する分子を明らかとすることを、造血幹細胞側を修飾することにより検討する。すでにマウスでは CD26 分子はペプチダーゼとしての機能を有していることから、接着分子の一部を不活化することが知られている。従ってこの分子を阻害することにより生着促進をする可能性が示されている。これらの事実を応用して、生着促進に繋がる分子の同定とその増強効果を明らかとすることで基礎実験のデータを造血幹細胞移植の臨床応用への発展を考えている。

免疫不全マウスを利用した異種間移植ではヒト細胞の長期骨髄再構築能が要求されるため、二次移植までの結果が必要である。従って最終的に細胞表面修飾した細胞の長期骨髄再構築能の評価には慎重である必要がある。一次移植の結果に基づき、生着した造血幹細胞表面がどのように変化しているかを生着したマウスから再びヒト造血前駆細胞を回収して細胞表面を観察することにより、長期のヒト造血細胞の評価が可能である。自己複製を行ったと思われる生着ヒト細胞は初代細胞と全く同様の表面形質を有しているのか、あるいは修飾された状態で自己複製能を有しているのか、一部では自己複製に必要な細胞表面分子の同定も可能となる。以上から、本研究ではヒト造血幹細胞の純化とその細胞表面分子を修飾することにより、造血細胞とストローマ細胞との相互作用の

分子機構を明らかとし、造血細胞とストローマ細胞との相互作用の分子機構を明らかとし、少量の幹細胞からの移植を可能にすることと、移植関連合併症を最小限とした効率的造血幹細胞移植への臨床応用が目的である。

## 3. 研究の方法

造血幹細胞移植において生着不全が最も懸念される臍帯血を用いて、CD34陽性細胞を純化し以下の検討を行う。CD34陽性細胞をタンパク分解酵素の一つである好中球エラストラーゼ処理し、細胞表面分子で細胞接着に関与するCXCR4の発現を検討する。種々の培養条件でCXCR4の細胞表面発現の変化を観察し、蛋白分解酵素の役割、CXCR4発現に影響を与える培養条件をCXCR4の特異的阻害剤を添加することで、確認する。CXCR4の発現は主にFACSで、一部ではmRNAの発現を定量的PCRで測定する。

これらの種々の条件で培養されたCD34陽性細胞を免疫不全マウス (NOD/SCIDマウス) に静注する異種間移植を行うことで、静注後のホーミング活性、骨髄再構築能、生着細胞のさらなる二次移植においてヒト細胞の長期骨髄再構築能を検討する。生着ヒト細胞の同定はヒト特異的CD45抗原陽性細胞の比率で行う。骨髄系、B、Tリンパ球系はそれぞれ、二重、三重染色で確認する。二次移植は初期移植で生着したマウス骨髄細胞からCD45陽性細胞を純化し、同様のマウスへ移植し、8週間後にヒト細胞を同定する。さらに、これらから、自己複製を行ったと思われる生着ヒト細胞は初代細胞と全く同様の表面形質を有しているのか、あるいは修飾された状態で自己複製能を有しているのか、一部では自己複製に必要な細胞表面分子の同定も可能となる。

## 4. 研究成果

ヒト臍帯血由来造血細胞を CD34 の発現から純化し、種々の条件で培養を行った。培養細胞を造血幹細胞上のケモカイン受容体、CXCR4 の発現の時間的变化と免疫不全マウス (NOD/SCID) への静脈内輸注を行い、16 時間後のホーミング活性と 8-10 週後の骨髄再構築能を検討した。2 時間の無血清培養、好中

球エラストラーゼ処理を行うと CXCR4 の発現の有意な増加が認められた。CXCR4 の inhibitor である AMD3100 をこれらの培養に添加すると CXCR4 の発現増加はほぼ完全に抑制された。CXCR4 の mRNA の発現変化は定量 PCR で検討したが、mRNA 発現の増加は認められなかったことから、細胞表面の CXCR4 発現増加は細胞内分子の細胞表面への移行の結果であると考えられた。培養後の造血細胞、AMD3100 添加培養後の細胞、非培養細胞を免疫不全マウスへ静注 16 時間後のホーミング細胞数は 2 時間培養細胞が有意に多く、AMD3100 処理によって、そのホーミング活性増加は完全に抑制された。この結果からヒト細胞のマウス骨髄へのホーミングに CXCR4 が重要な役割を果たしていることが確認された。移植後 8~10 週後の骨髄再構築能も同様にヒト細胞の同定と比較したが、2 時間培養細胞では有意にヒト細胞の割合が多く、AMD3100 処理によってその効果は抑制された。生着したヒト細胞は骨髄顆粒球系抗原、B リンパ球抗原を発現していることが確認されたが、T 細胞系細胞の生着あるいは分化は認められなかった。一次移植で生着したヒト細胞を純化し、同様に免疫不全マウスへ二次移植を行い、8 週間後にヒト CD45 細胞が生着していることを確認した。以上より、ヒト臍帯血由来造血幹細胞は 2 時間の培養により、自己複製能を維持しながら、CXCR4 の発現増強を介して骨髄生着促進が認められることが明らかとなった。造血幹細胞表面の接着因子の発現を増強させることにより、少量の造血幹細胞でも骨髄生着が可能であり、臨床応用への可能性が期待される研究成果と考えられた。

#### 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 14 件)

1. Shiohara M, Shigemura T, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Asada H, Ishii E, Koike K, Chin M, Kobayashi M, Koike K: *Ela2* mutations and clinical manifestations in familial congenital neutropenia. *Journal of Pediatric Hematology Oncology* 31: 319-324, 2009.

査読有

2. 小林正夫, 岡田賢, 溝口洋子: 重症先天性好中球減少症の分子病態 分子細胞治療 8: 110-116, 2009. 査読無

3. Ohno N, Kajiume T, Sera Y, Sato T, Kobayashi M: Short-term culture of umbilical cord blood-derived CD34<sup>+</sup> cells enhances the engraftment into NOD/SCID mice through the increased expression of CXCR4. *Stem Cells & Developments* 2009 (in press) 査読有

4. Nakamura K, Miki M, Karakawa S, Sato T, Kobayashi M: Deficiency of regulatory T cells in children with autoimmune neutropenia. *British Journal of Haematology*, 2009 (in press) 査読有

5. Kajiume T, Ohno N, Sera Y, Kawahara Y, Yuge L, Kobayashi M: Reciprocal expression of Bmi1 and Me1-18 is associated with the functioning of primitive hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 2009 (in press). 査読有

6. Okada S, Konishi N, Tsumura M, Shirao K, Yasunga S, Sakai H, Nishikomori R, Takihara Y, Kobayashi M: Cardiac infiltration in Early-Onset Sarcoidosis Associated with a Novel Heterozygous Mutation, G481D, in CARD15. *Rheumatology* 1093-1094 2009. (in press) 査読有

7. Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M: Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. *Journal of Transfusion Medicine* 2009. (in press) 査読有

8. Kono K, Harano Y, Hoshino H, Kobayashi M, Bazett-Jones DP, Muto A, Igarashi K, Tashiro S: The mobility of Bach2 nuclear

foci is regulated by SUMO-1 modification. *Experimental Cell Research* 314(4): 903-13, 2008. 査読有

9. Ohtsubo M, Yasunaga S, Ohno Y, Tsumura M, Okada S, Ishikawa N, Shirao K, Kikuchi A, Nishitani H, Kobayashi M, Takihara Y: Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(30): 10396-10401, 2008. 査読有

10. Ishikawa N, Okada S, Miki M, Shirao K, Kihara H, Tsumura M, Nakamura K, Kawaguchi H, Ohtsubo M, Yasunaga S, Matsubara K, Sako M, Hara J, Shiohara M, Kojima S, Sato T, Takihara Y, Kobayashi M: Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the *HAX1* gene. *Journal of Medical Genetics* 45(12): 802-807, 2008. 査読有

11. Tajima G, Sakura N, Shirao K, Okada S, Tsumura M, Nishimura Y, Ono H, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Kobayashi M: Development of a new enzymatic diagnosis method for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production and its application in tandem mass spectrometry-based selective screening and newborn screening in Japan. *Pediatric Research* 64: 667-672, 2008. 査読有

12. 岡田賢 末永麻由美, 川口浩史, 小林正夫: 非結核性抗酸菌による多発性骨髓炎を呈したインターフェロン $\gamma$ 受容体1異常症の2例 *日本小児科学会雑誌* 112: 1818-1825, 2008. 査読有

13. 小林正夫, 世羅康彦, 岡田賢: 好中球異常症 アレルギー・免疫 15:1350-1360, 2008. 査読無

14. 岡田賢, 津村弥来, 小林正夫: 好中球異常による先天性免疫不全症 *小児科臨床* 61: 1791-1796, 2008. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. Karakawa S, Nakamura K, Hara K, Mizoguchi Y, Miki M, Kawaguchi K, Sato T, Nishimura S, Kobayashi M: Reconstitution of Regulatory T Cells Involves in the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. American Society of Hematology, 50th Annual Meeting. San Francisco, CA, U.S.A., Dec. 7, 2008.

2. Okada S, Kajiume T, Tsumura M, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Sira MM, Kanegane H, Miyawaki T, Takihara Y, Kobayashi M: Novel Heterozygous Mutation 572insA in TACI Identified in a Patient with Selective IgA Deficiency. American Society of Hematology, 50th Annual Meeting. San Francisco, CA, U.S.A., Dec. 6, 2008.

3. Ohno N, Kajiume T, Sera Y, Sato T, Kobayashi M: Short-Term Culture of Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells Enhances the Engraftment into NOD/SCID Mice through the Increased Expression of CXCR4. American Society of Hematology, 50th Annual Meeting. San Francisco, CA, U.S.A., Dec. 6, 2008.

4. Okada S, Ishikawa N, Shirao K, Tsumura M, Sato T, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Takihara Y, Kobayashi M: Association of Neurodevelopmental Abnormalities Is a Common Clinical Character in Japanese Patients with Severe Congenital Neutropenia Due to HAX1 Deficiency. American Society of Hematology, 49th Annual Meeting. Atlanta, GA, U.S.A., Dec. 10, 2007.

5. Nakamura N, Miki M, Karakawa S, Onodera R, Kurita E, Hiraoka A, Sato T, Kobayashi M: The Decrease of Regulatory T Cells through the Low Levels of FOXP3 Expression Mediated by NFAT1 in Infancy with Autoimmune Neutropenia. American Society of Hematology, 49th Annual Meeting. Atlanta, GA, U.S.A., Dec. 10, 2007.

6. Kajiume T, Takashi Sato T, Kobayashi M: The Expression of Polycomb Group Genes Products, Bmi1 and Me1-18, Regulate the Function of Murine Primitive Hematopoietic Cells. American Society of Hematology, 49th Annual Meeting. Atlanta, GA, U.S.A., Dec. 8, 2007.

[図書] (計1件)

小林正夫, 岡田賢, 三木瑞香: 先天性好中球減少症の成因 Annual Review 2008  
pp. 94-100, 中外医学社 東京, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 正夫 (KOBAYASHI MASAO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00162016

### (2) 研究分担者

梶梅 輝之 (KAJIUME TERUYUKI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 40278924