

機関番号：34417  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591159  
 研究課題名（和文） ヒトおよびマウスにおける造血幹細胞と間葉系幹細胞間のMHC拘束性の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of MHC restriction between hemopoietic stem cells and mesenchymal stem cells in humans and mice  
 研究代表者  
 比舎 弘子 (HISHA HIRIKO)  
 関西医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：90151422

研究成果の概要（和文）：臍帯血由来造血幹細胞(HSC)の SCID マウスへの生着は、同一胎児(MHC一致)由来の間葉系幹細胞の同時移植により亢進した。同一胎児由来の両細胞を共培養すると、間葉系幹細胞からの G-CSF(顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子)産生上昇が観察され、これが HSC の増殖促進の一因であると推察できた。正常マウスでは、HSC の MHC class I 分子発現量と MHC 拘束性が相関していることも判明した。自己免疫疾患モデルマウスの HSC は発症後 MHC 不一致の環境下でも増殖できるが、これは、HSC 上の神経細胞接着分子(CD56)発現の上昇により獲得された形質であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Engraftment of umbilical cord blood-derived hemopoietic stem cells (HSC) into SCID mice was facilitated when mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the amnion of the same fetus were co-grafted. It is likely that G-CSF contributes to some extents to the preferential hemopoiesis-supporting ability of the MHC-matched MSCs. A higher proliferation of mouse HSCs was observed in co-culture system of HSCs expressing a high level of MHC class I molecule with MHC-matched MSCs than in that of HSCs expressing a low level of MHC class I molecule. Moreover, the abnormal proliferation (no MHC restriction) of HSCs in autoimmune-prone mice was attributed to increased expression of CD56 molecule on the HSC after the onset of autoimmune diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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、間葉系幹細胞、MHC 拘束性、MHC class I 分子、臍帯血、自己免疫疾患モデルマウス、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、神経細胞接着分子

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室で長年に渡り行われてきたマウス骨髄移植実験の結果から、骨髄移植の際にドナーの骨髄ストローマ細胞を造血幹細胞

(HSC)と共に移植すると、ドナー細胞が生着しにくい系統の組み合わせでも移植が成立することが明らかになった。ドナーのストローマ細胞の補充によりドナーHSCが増殖分化

しやすい環境がレシピエント内に作られ、生着率が上昇したと考えられる。さらに、マウス HSC と骨髄ストローマ細胞の共培養実験でも両者の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が一致した場合、HSC の増殖が亢進することも見出した。従って、HSC と 骨髄ストローマ細胞との間には MHC 拘束性が存在すると考えられる。また、マウス骨髄ストローマ細胞のサイトカイン (stem cell factor や FLT3-L 等) の message レベルが、MHC 一致 HSC と共培養することにより上昇することから、サイトカイン産生の亢進が MHC 拘束性の機序のひとつであると推察された。

自己免疫疾患マウスの HSC は、発症前は MHC 拘束性を示すが、発症後、MHC 不一致の間葉系幹細胞やレシピエントマウスにおいても遜色なく増殖分化するようになる。MHC 拘束性を受けない異常な HSC が発症後出現すると考えられるが、その性状は詳しく解析されていない。

近年注目を集めている間葉系幹細胞と、いわゆる骨髄ストローマ細胞 (造血支持能を有する線維芽細胞様形態を持つ骨髄由来付着性細胞) との差は message レベルではほとんどないと言われており、我々が見出した HSC と骨髄ストローマ細胞との間の MHC 拘束性は、HSC と間葉系幹細胞間の MHC 拘束性とも考えることができる。

我々は最近、ヒト羊膜から得られた付着性細胞が間葉系幹細胞の性質を有すること、また、臍帯血より精製した HSC の増殖・分化を 10 週以上の長期にわたって支持できることも見出した。さらに、HSC を同一胎児由来の羊膜付着性細胞上で培養した方が、他の胎児由来の羊膜付着性細胞上で培養したのとは比べると、有意に高いことが判明した。この結果は、ヒトにおいても HSC と間葉系幹細胞の間に MHC 拘束性が存在する可能性を強く示唆している。

## 2. 研究の目的

HSC と間葉系幹細胞の間に MHC 拘束性が存在することが、マウスとヒトにおいて見出されたが、この現象を細胞学的あるいは分子生物学的に詳しく解析する必要がある。

最も未分化と考えられている多能性 HSC は CD34 や CD38 等のマーカーを発現せず唯一 MHC class I 分子を高発現していること、また、間葉系幹細胞も MHC class I 分子を発現していることが知られている。そこで、まず、(1)ヒトにおいてもマウスと同様に MHC 一致間葉系幹細胞の同時移植が SCID マウスでの生着に有効か、(2)ヒト HSC と間葉系幹細胞

の接着の結果どのような変化が造血幹細胞や間葉系幹細胞におこり MHC 拘束性が生ずるのかを解析する。さらにマウスにおいて、(3)自己免疫疾患モデルマウスの発症に伴う MHC 拘束性破綻の機序を解析し、(4)MHC class I 分子と結合することが知られている既知の分子が HSC や間葉系幹細胞上に存在するかを検討することにより、MHC class I 分子の造血系における生理機能と意義をマウスとヒトにおいて検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒトでの MHC 拘束性の解析

胎児の臍帯血と羊膜を採取し、臍帯血は凍結保存しておき、羊膜は付着性細胞を得るため細切して培養した。羊膜付着性細胞が得られた後、臍帯血から密度勾配遠心法、磁気ビーズ分離法にて HSC を濃縮し、さらにセルソーターを用いて CD34 陽性 CD45 弱陽性細胞 (HSC) を精製した。この HSC と羊膜付着性細胞とを混合して SCID マウスに移植した。移植には、静脈内骨髄移植 (IV-BMT) 法あるいは骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT) 法を用いた。移植後 4-5 週目に SCID マウス末梢血と骨髄細胞の細胞表面マーカー解析や PCR を行いヒト細胞の生着を検討した。また、両細胞の共培養実験も行い、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定し、両細胞の細胞表面分子の発現パターンをフローサイトメトリーで解析した。

### (2) マウスでの MHC 拘束性の解析

正常マウスの骨髄細胞から密度勾配遠心法および磁気ビーズ分離法で HSC を濃縮し、セルソーターを用いて c-kit 分子 (stem cell factor の受容体) 発現強度が陰性～低発現の HSC 集団と、低発現の HSC 集団を分取した。これらをマウス間葉系幹細胞株上で培養し増殖を経時的に観察した。

自己免疫疾患モデルマウスである MRL/lpr マウスと W/B F1 マウスより骨髄細胞を取り、密度勾配遠心法および磁気ビーズ分離法で HSC を精製した。発症前後の HSC における細胞表面分子の発現パターンをフローサイトメトリーで比較検討した。また、骨髄細胞を培養して得られた骨髄ストローマ細胞の細胞表面分子についても発症前後で比較した。さらに、血液中の IFN $\gamma$ 濃度を ELISA で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトでの MHC 拘束性の解析

#### ① 異種間移植における MHC 一致羊膜付着性細胞同時移植の有用性の検討

臍帯血より精製された低密度/成熟細胞抗原陰性/CD34 陽性 CD45 弱陽性細胞は、高い造血コロニー形成能を持ち、形態的にも HSC

の特質を備えていた。また、MHC class I 分子である HLA-ABC を高発現していた。この臍帯血由来 HSC と、同一胎児 (MHC 一致) の羊膜付着性細胞とを混合し、IV-BMT 法あるいは IBM-BMT 法で SCID マウスに移植した。HSC のみを SCID マウスに IV-BMT あるいは IBM-BMT 法で移植する群も作成した。移植後 4-5 週目の SCID マウス骨髄細胞中にヒト細胞が存在することを PCR 法にて確認した。さらに骨髄細胞を抗ヒト CD45 および CD34 抗体とで二重染色してヒト細胞の生着を検討したところ、IBM-BMT 法で HSC と羊膜付着性細胞とを同時移植した群では、両細胞を IV-BMT した群と比べ約 4 倍の陽性細胞が得られた。

これらの結果は、MHC 一致間葉系幹細胞が造血幹細胞の生着を促進していること、また、IBM-BMT 法で両細胞を直接骨髄内に移植する方が、静脈内移植よりも優れていることを示している。

#### ② 臍帯血由来 HSC と MHC 一致羊膜付着性細胞 (間葉系幹細胞) の共培養系での検討

臍帯血由来の HSC と同一胎児の羊膜付着性細胞の共培養系では、細胞数の増加のみならず、造血コロニー形成細胞数や CD34/c-kit 陽性細胞、CD34/CD133 陽性細胞等の HSC の割合が不一致の共培養系と比べ有意に高いことが明らかになった。

共培養系より得られた培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定したところ、GM-CSF (顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子) の濃度が、MHC 一致の共培養系において不一致のよりも有意に高かった (表 1)。GM-CSF は、好中球、好酸球 マクロファージ系前駆細胞の分化・増殖を刺激する重要な造血系刺激因子である。一方、他の造血系刺激因子である M-CSF、SCF、IL-6 等に関しては両群で有意差は認められなかった。従って、GM-CSF の産生亢進が MHC 拘束性誘導の一因であると推察できる。なお、HSC 単独培養では、培養上清中に殆どサイトカインが検出されず、従って GM-CSF は HSC からではなく羊膜付着性細胞から産生されていると考えられた。

表 1: 培養上清中のサイトカイン濃度

Cytokines	HSC と羊膜付着性細胞の組み合わせ	
	MHC-Matched	MHC-Mismatched
GM-CSF	2.28 ± 0.22	1.39 ± 0.18 **
M-CSF	2315 ± 483	2737 ± 320 *
G-CSF	0	0
SCF	7.3 ± 1.4	7.0 ± 1.6 *
LIF	38 ± 5.6	32 ± 6.6 *
IL-6	468 ± 4.8	468 ± 9.8 *

\*: NS and \*\*: P<0.01 versus MHC-matched combination

HSC や羊膜付着性細胞上の細胞表面分子 (CD29、CD34、CD44、CD62L 等) の発現強度が MHC 一致と不一致共培養で異なるかを解析したが、殆ど差は認められなかった。

#### ③ MHC class I 結合分子の発現の検討

MHC class I 分子と結合することが知られている LILR/CD85 が、ヒトの間葉系幹細胞株および HSC に発現しているかをフローサイトメトリーにて解析したが、検出されなかった。従って、未知の MHC class I 結合分子が間葉系幹細胞や HSC 上に存在し機能している可能性が示唆された。

#### (2) マウスでの MHC 拘束性の解析

##### ① HSC の MHC class I 分子発現量と MHC 拘束性の関連性の検討

マウスの多能性 HSC である低密度/成熟細胞抗原陰性/c-kit 分子陰性 ~ 低発現の c-kit<sup>low</sup> 細胞は、c-kit 分子の発現のみ異なる (c-kit が低発現) c-kit<sup>low</sup> 細胞に比べ、MHC class I 分子の発現量が高く、また、造血系長期構築能も高いことが知られている。

c-kit<sup>low</sup> 細胞の増殖・分化は、MHC 不一致のマウス間葉系幹細胞株上において著しく減少するのに対し、c-kit<sup>low</sup> 細胞の増殖の減少の程度はわずかであった。従って、HSC 上の MHC class I 分子発現量と MHC 拘束性が関連しており、多能性 HSC は分化段階の進んだ HSC と比べ MHC による増殖制御をより強く受けると推察できる。

##### ② 自己免疫疾患モデルマウスにおける HSC と間葉系幹細胞間の MHC 拘束性の解析

種々の細胞表面分子の発現を自己免疫疾患発症前後の HSC で比較検討したところ、MHC class I 分子と、神経細胞接着分子 (CD56、NCAM) の発現上昇が判明した。一方、CD44、CD62L、VLA-4、VCAM-1 等の細胞接着分子では、差が認められなかった。発症後血中の IFN $\gamma$  濃度の上昇が見られることから、MHC class I 分子発現上昇は、IFN $\gamma$  の影響を反映している可能性が考えられる (IFN $\gamma$  には CD56 の発現上昇作用はない)。また、我々のこれまでの研究により、HSC 上の CD56 分子が間葉系幹細胞上の CD56 分子と結合することにより、増殖分化が亢進することが明らかになっている。すなわち、異常な HSC とは、HSC 上の CD56 の発現量の増加により MHC 不一致の環境下でも増殖能力を獲得した細胞である可能性が推察できた。一方、骨髄ストローマ細胞においては、発症前後で MHC class I 分子と CD56 の発現に差異は認められなかった。

##### ③ MHC class I 結合分子発現の検討

MHC class I 分子と結合することが知られ

ている Ly49 や PIR-A/B のマウス間葉系幹細胞株および HSC における発現を検討したが、検出されなかった。従って、未知の MHC class I 結合分子の存在が示唆された。

#### 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 5 件)

- ① Xiaoli Wang, Hiroko Hisha, Tomomi Mizokami, Wenhao Cui, Yunze Cui, Aiping Shi, Changye Song, Satoshi Okazaki, Qing Li, Wei Feng, Junko Kato and Susumu Ikehara: Mouse mesenchymal stem cells can support human hemopoiesis both *in vitro* and *in vivo*: Crucial role of neural cell adhesion molecule (NCAM). **Haematologica**, 95:884-91, 2010 査読あり
- ② Desislav B. Kaplamadzhiev, Hiroko Hisha, Yasushi Adachi, Susumu Ikehara, Anton B. Tonchev, Nadezhda B. Boneva, Iliya V. Pyko, Mitsuru Kikuchi, Masa-aki Nakaya, Tomohoro Wakayama, Shoichi Isaki, and Tetsumori Yamashima: Bone marrow-derived stromal cells can express neuronal markers by DHA/GPR40 signaling. **Bioscience Trends**, 4:119-129, 2010 査読あり
- ③ Tomomi Mizokami, Hiroko Hisha, Satoshi Okazaki, Takashi Takaki, Xiao-Li Wang, Chang-Ye Song, Qing Li, Junko Kato, Naoki Hosaka, Muneo Inaba, Hideharu Kanzaki, and Susumu Ikehara: Preferential expansion of human umbilical cord blood-derived CD34-positive cells on MHC-matched amnion-derived mesenchymal stem cells. **Haematologica**, 94:618-628, 2009 査読あり
- ④ Junko Kato, Hiroko Hisha, Xiaoli Wang, Tomomi Mizokami, Satoshi Okazaki, Qing Li, Changye Song, Masahiko Maki, Naoki Hosaka, Yasushi Adachi, Muneo Inaba and Susumu Ikehara: Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to hemopoietic system in monkeys. **Ann Hematol**, 87:797-807, 2008 査読あり
- ⑤ Changye Song, Hiroko Hisha, Xiaoli Wang, Qing Li, Ming Li, Wenhao Cui, Kequan Guo, Satoshi Okazaki, Tomomi Mizokami, Junko Kato, Yunze Cui, Wei Feng, Yuming Zhang, Ming Shi, Muneo Inaba, Hongxue Fan and Susumu Ikehara: Facilitation of hematopoietic recovery by bone grafts with intra-bone marrow-bone marrow transplantation.

**Immunobiology**, 213: 455-468, 2008 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① Hiroko Hisha, Xiaoli Wang, Junko Kato, Tomomi Mizokami, Qing Li, Hideharu Kanzaki, and Susumu Ikehara: Hemopoiesis-supporting capacity of mouse mesenchymal stem cell line: Crucial role of neural cell adhesion molecule (NCAM). The 14th International Congress of Immunology 2010 年 8 月 23 日 神戸(神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場)
- ② Junko Kato, Hiroko Hisha, Qing Li, Yasushi Adachi, Muneo Inaba, Naoki Hosaka, Masahiko Maki and Susumu Ikehara: Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) on mouse, monkey and human mesenchymal stem cells. 第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 2 日 大阪(大阪国際会議場)
- ③ 加藤順子、比舍 弘子、李 清、池原 進: 神経細胞接着分子(NCAM、CD56)のサルおよびヒト造血系への関与 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都(国立京都国際会館)
- ④ Changye Song, Hiroko Hisha, Qing Li Wenhao Cui, Kequan Guo, Wei Feng, Junko Kato and Susumu Ikehara: Facilitating effects of intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT) co-grafted with donor bones on hemopoietic recovery. 第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 17 日 金沢(石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、もてなしドーム地下広場)

[図書] (計 1 件)

- ① Hiroko Hisha, Xiaoli Wang and Susumu Ikehara: Scientific Publishers, Adhesion Molecules (Edited by Preedy VR), 2010 年、p117-131

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

比舍 弘子 (HISHA HIROKO)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 9 0 1 5 1 4 2 2

##### (2) 研究分担者

稲葉 宗夫 (INABA MUNEKO)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 7 0 1 1 5 9 4 7