

平成22年5月13日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790238  
 研究課題名(和文) ヒト化モデルマウスを利用したニッチシステムによるヒト造血幹細胞制御機構の解明  
 研究課題名(英文) Analysis of repopulating dynamics of human hematopoietic stem cells

研究代表者 八幡 崇(YAHATA TAKASHI)  
 東海大学・医学部・講師  
 研究者番号：10398753

研究成果の概要(和文)：血液腫瘍等の難治性疾患に施行される造血幹細胞移植は、再生医療の代表的な例である。我々は、ヒト造血幹細胞の移植に伴う造血再構築反応と恒常性維持機構をモデルシステムとして、幹細胞システム制御機構の再生医学への応用を目指した研究課題に取り組んだ。本研究課題では、個々の幹細胞の生体内動態をクローンレベルで解析する実験系を確立し、移植後の幹細胞の動態に関するより詳細な解析を実現した。本研究成果は、ヒト幹細胞の多能性制御機構の解明に寄与するものであり、得られた知見は難治性疾患に対する幹細胞システムを利用した再生医療法の適応拡大のみならず、幹細胞システムの破綻や老化に起因する腫瘍性疾患などの様々な疾患の発症・進行の機序解明につながる重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Hematopoiesis is a dynamic and strictly regulated process orchestrated by self-renewing hematopoietic stem cells (HSCs) and the supporting microenvironment. However, the exact mechanisms in which individual human HSCs involved to sustain hematopoietic homeostasis remain to be clarified. To understand how the long-term repopulating cell (LTRC) activity of individual human HSCs and the hematopoietic hierarchy are maintained in the BM microenvironment, we traced the repopulating dynamics of individual human HSC clones using viral integration site analysis. Our study provides a novel insight into repopulation dynamics, turnover, hierarchical structure and the cell cycle status of human HSCs in the recipient BM microenvironment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：造血幹細胞、ニッチ、クローン解析、ヒト化モデルマウス、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞は分化抗原陰性で CD34 陽性細胞集団に存在することが免疫不全マウスを用いた解析により明らかにされてきた。しかし、免疫不全マウスの改良や新しい移植法の開発によって、これまで長期骨髄再建能を示さないとされていた細胞集団にも幹細胞活性があることが報告され、ヒト造血幹細胞の階層性についての新しい知見として注目された。すなわち、CD34 陽性細胞集団においておもに移植早期の造血再構築を担う幹細胞集団 (STRC) と長期造血再構築を担う幹細胞集団 (LTRC) が存在し、その生体内動態を解析することが可能となった。しかしながら、ヒト造血幹細胞集団の階層性構築はどのような細胞によって担われ、どのような場 (ニッチ) において制御されているのかについては不明な点が多かった。これらは再生医療の実現化にとって克服すべき重要な課題であった

## 2. 研究の目的

ヒト HSC の階層性をクローンレベルで明らかにし、造血再生の動態とニッチによる幹細胞活性維持機構を解明し、そのニッチシステムを基盤とした幹細胞活性の低下を極力抑制した状態での画期的な再生医療・移植医療法の確立を実現することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト CD34 陽性細胞集団を CD38 抗原の発現強度に応じてセルソーターを用いて分離後、免疫不全マウスに移植し、その後の生体内動態、細胞周期、ニッチ細胞との相互作用などについて解析を行なった。

## 4. 研究成果

研究代表者らは個々のヒト HSC の生体内動態を LAM-PCR 法を利用してクローンレベルで解析する実験系を確立し、STRC と LTRC の解析を行った。CD34(+)細胞を GFP 遺伝子で標識後、NOG マウスに移植した。経時的に骨髄細胞を吸引回収し、リンパ球系、骨髄球系細胞を分離、クローン解析を行った。その結果、STRC の多くは CD34(+) stem cell pool から消失していく骨髄球系単独の分化能を示すクローンにより構成されていることが明らかとなった。一方、移植後期においては、LTRC クローンによって構成されていた。すなわち、移植早期に検出されたクローンとは別の、CD34(+) stem cell pool で自己複製しながらリンパ球系と骨髄球系の両方への分化能を示すクローンであった。さらに、一次移植

CD34(+)細胞を2匹のマウスに二次移植を行い、それぞれ移植後3週目と18週目にクローン解析を行った。その結果、二次移植では3週で得られた STRC クローンのほとんどが18週の LTRC と同一クローンであった。以上の結果から、LTRC は恒常的に STRC を産生し、CD34(+)細胞集団の中で個々のヒト HSC に特徴的な幹細胞活性、すなわち、分化能、自己複製能の違いによる階層性を構築している事をクローンレベルで初めて明らかにした。さらに、二次移植可能な LTRC クローンは、一次移植マウス骨髄内では極めて小さいクローンとして存在し、二次移植されることによって、クローンサイズが増幅するというところを見いだした。このことから、一次移植骨髄内では、LTRC クローンは休止期状態にあることが予想された。そこで、この一次移植骨髄内における細胞周期を解析したところ、休止期状態にある CD34(+)細胞は CD38 抗原が陰性であった。さらに、一次移植マウスの骨髄内 CD34(+)細胞の LTRC 活性を測定するために CD34(+)細胞を CD38 抗原の発現強度に応じて分離し、二次移植を行ったところ、休止期にある CD34(+)CD38(-)細胞のみが二次移植された。休止期状態にあるヒト CD34(+)細胞の多くは骨内膜周辺領域に存在し、骨芽細胞や血管内皮細胞と N-cadherin や SDF-1/CXCR4 を介して相互作用しているところを見いだした。以上の結果から、ヒト LTRC は、マウス骨髄内においても CD34(+)CD38(-)細胞集団に存在し、骨髄内ニッチにおいて休止期状態にありながら長期間にわたって幹細胞活性を維持しており、必要に応じて turn-over の速い STRC を産生することにより、幹細胞集団の階層性を構築していることが明らかとなった。さらに、ニッチを最適化することによるヒト HSC の維持・増幅を実現する可能性を示した。

## 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6件)

1. Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, Miyata Y, Naoe T. Adipocyte-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Am J Pathol. In

- press. 査読有り
2. Jin G, Matsushita H, Asai S, Tsukamoto H, Ono R, Nosaka T, Yahata T, Takahashi S, Miyachi H. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390(3):1001-6. 査読有り
  3. 八幡 崇、六車 ゆかり、安藤 潔 FACSを用いたヒト造血幹細胞の生体内における性状解析 *Cytometry Research*, 2009, 19(2): 19-23. 査読有り
  4. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, Sheng Y, Uno T, Matsuzawa H, Ito M, Kato S, Hotta T, Ando K. Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells.* 2008; 26(12):3228-36. 査読有り
  5. Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT, Habu S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med.* 2008;205(11):2507-13. 査読有り
  6. Sheng Y, Yahata T, Negishi N, Nakano Y, Habu S, Hozumi K, Ando K. Expression of Delta-like 1 in the splenic non-hematopoietic cells is essential for marginal zone B cell development. *Immunol Lett.* 2008;121(1):33-7. 査読有り
- [学会発表] (計9件)
1. 八幡 崇、他 DNA損傷の蓄積によるヒト造血幹細胞の自己複製能の低下 日本血液学会 2009年10月11日 京都
  2. Nakayama T, et al. Adipocyte-derived stromal cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo 日本血液学会 2009年10月12日 京都
  3. Muguruma Y, et al. Importance of Notch signaling in maintaining hematopoietic homeostasis 日本血液学会 2009年10月11日 京都
  4. Muguruma Y, et al. Importance of Notch signals in hematopoietic homeostasis 幹細胞シンポジウム 2009年5月15日 東京
  5. Muguruma Y, et al. Importance of Notch signals in hematopoietic homeostasis The 26th Naito Conference on Osteobiology 2009年11月5日 大阪
  6. 八幡 崇、他 ヒト造血幹細胞の造血再生の動態と老化 日本再生医療学会 2009年3月5日 東京
  7. 松下弘道、他 骨髄異形成症候群の in vivo モデルの確立 日本血液学会 2008年10月11日 福岡
  8. 六車 ゆかり、他 骨髄造血微小環境の恒常性維持における Jagged1 分子の重要性 日本血液学会 2008年10月11日 福岡
  9. 八幡 崇、他 FACSを用いたヒト造血幹細胞の生体内における性状解析 日本サイトメトリー学会 2008年6月26日 東京
- [図書] (計2件)
1. 八幡 崇 インターフェロンαは造血幹細胞を細胞周期に導入する 血液・腫瘍科 科学評論社 2009年 62-63

2. 八幡 崇 iPS細胞による鎌状貧血の治療  
血液フロンティア 医薬ジャーナル  
2008年 1750-1755

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八幡 崇 (YAHATA TAKASHI)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：10398753

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

中山ゆかり (六車ゆかり)  
(NAKAYAMA YUKARI (MUGURUMA YUKARI))  
東海大学・医学部・研究員  
研究者番号：80398750

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：70176014