

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591367

研究課題名（和文）：ヒト造血幹細胞の加齢に関する研究

研究課題名（英文）：Research on aging of human hematopoietic stem cells

研究代表者：河野 嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20260680

研究成果の概要（和文）：

ヒト造血幹細胞の加齢現象を検討するため、2つの細胞転写因子の発現量を検討した。中央値21歳の移植ドナー細胞をCD34陽性細胞に純化し、純度90%以上の細胞分画を得た。それらの細胞の転写因子 *ikzf1* と *cebpa* の発現量を定量的に測定し、*ikzf1* の発現量とドナーの年齢の間に負の相関関係があることが判明した。一方、*cebpa* の発現量はドナー年齢と関係しなかった。これらの結果から、CD34陽性細胞内の *ikzf1* の mRNA レベルは骨髓内のヒト造血幹細胞の年齢を反映していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To investigate aging of human hematopoietic stem cells, we evaluated the expression levels. The median age of the donors was 21 y (range 0.2 – 44 y). The purity of CD34-positive cells was greater than 90%. Both target genes were quantitatively detected in all samples. There was an inverse correlation between the expression level of *ikzf1* and the donor's age ($r = -0.358$, $p = 0.032$). In contrast, there was no correlation between the expression level of *cebpa* and the donor's age. From the data, the mRNA level of *ikzf1* in purified CD34-positive cells may reflect the age of HSCs in human bone marrow.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、造血幹細胞移植、CD34陽性細胞、加齢、老化、転写因子

1. 研究開始当初の背景

白血病や再生不良性貧血などの造血器疾患の根本的治療法として確立された造血細胞移植術は、骨髓移植、臍帯血移植、および末梢血幹細胞移植の

総称であり、自己複製能(Self-renewal capacity)を有する造血幹細胞を採取して移植する方法である。開発当初は、患者と年齢に近い HLA 一致同胞ドナ

一からの提供を受けていたが、その後骨髄バンクを介しての非血縁間移植が可能になり、対象疾患の拡大とともに非血縁間移植数の増加が著明である。

小児患者は自分より高齢のドナー細胞を移植されることが多く、自分より暦年齢が高いドナーの造血幹細胞は、非自己組織という新しい環境で自身の細胞年齢をどのように維持できるのであろうか。高齢者に発生する骨髄異形成症候群や白血病は、造血幹細胞の加齢(老化)現象の一つと考えられている。小児患者に移植された造血幹細胞が移植後数年から数十年の間に造血機能を失うことや、種々のストレス下で加齢(老化)が促進され癌化の頻度が高くなることが懸念される。移植後の長期生存者の晩期障害として注目されるべき問題であるが、現在までヒトでは全く解明されていない。

2. 研究の目的

新しい造血幹細胞加齢評価方法を用い、小児患者に成人ドナー細胞を移植することの長期的問題点を、ヒト造血幹細胞の加齢(老化)の観点から明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではヒト造血幹細胞(CD34 or CD133陽性細胞)内の2つの転写因子mRNA発現量と細胞表面マーカーから細胞分化を解析し、個々の細胞の評価ではなく造血細胞集団としての加齢(老化)現象を掌握する方法を採用した。用いた標的遺伝子は *cebpa* と *ikzf1* で、前者は幹細胞から骨髄系細胞への分化、後者はリンパ球系細胞への分化を誘導する遺伝子である。

解析対象細胞は、骨髄細胞40検体(購入

骨髄、家族内骨髄移植ドナー、造血器腫瘍でなく、骨髄転移のない固形腫瘍)、臍帯血5検体(購入検体)などとし、細胞の純化はCD133による純化とCD34による純化を比較して両者に差がないことを確認したので、抗ヒトCD34マウスモノクローナル抗体を利用して MicroBead isolation kit と autoMACS (いずれもMiltenyi Biotec社) で実施した。

mRNAの定量にはreal time PCR法を用いた。CD34陽性細胞からのRNA抽出には NucleoSpin RNA XS、cDNA合成はTaKaRa PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit、real time PCRはTaKaRa PrimeScript RT reagent Kit, Thermal Cycler Dice, Real Time System, TP800, TaKaRaをそれぞれ用いた。データの解析は、GAPDH発現量で補正したものをthe $2^{-\Delta Ct}$ methodで行った。用いたプライマーを下記に示した。

cebpa ; F : GGGACCCTCAGCCTTGTTGTGA
R : GACTGATCGTGCTTCGTGTTCTTA
ikzf1 ; F : AGCGCAGCAGTTCAGCACA
R : CCACCCTCAAGACTGGGACTTAGA

結果の統計解析には SPSSでSpearman's correlationとMann WhitneyのU検定を使用した。

4. 研究成果

造血細胞の加齢現象は個々の細胞の加齢現象ではなく、造血幹細胞分画内のリンパ球系細胞と骨髄球系細胞の比率が加齢とともに減少するという前提で、造血幹細胞の初期分化段階に発現する転写因子のmRNA発現パターンを定量的に検討した。

各種ドナー細胞の暦年齢は中央値21歳(0.2-44y)で純度90%以上のCD34陽性細胞が得られた(図1)。

これらの細胞中の *cebpa* と *ikzf1* の発現量とドナーの年齢との関係を検討したと

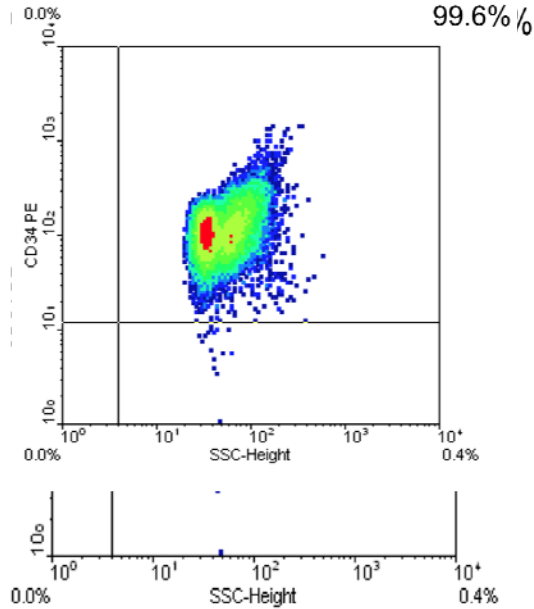


図1. 純化した CD34 陽性細胞の FACS

図2. *ikzf1* 発現量 (縦軸) とドナー年齢 (横軸) との関係

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 10 件)

1. Takuro Nishikawa, Emiko Miyahara, Masahisa Horiuchi, Kimiko Izumo, Yasuhiro Okamoto, Yoshichika Kawai, Yoshifumi Kawano and Toru Takeuchi: Benzene Metabolite 1,2,4-Benzenetriol Induces Halogenated DNA and Tyrosines Representing Halogenative Stress in the HL-60 Human Myeloid Cell Line, *Environ Health Perspect* 2012, 120:62–67, (査読有) <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1103437>
2. Takuro Nishikawa, Kimiko Izumo, Emiko Miyahara, Masahisa Horiuchi, Yasuhiro Okamoto, Yoshifumi Kawano, Toru Takeuchi. Benzene Induces Cytotoxicity without Metabolic Activation. *J Occup Health* 2011; 53: 84–92, (査読有)
3. Yoshihisa Nagatoshi, Akinobu Matsuzaki, Aiko Suminoe, Hiroko Inada, Kouichiro Ueda, Kiyoshi Kawakami, Fumio Yanai, Hideki Nakayama, Hiroshi Moritake, Nobuyoshi Itonaga, Noriko Hotta, Kyoko Fujita, Yasufumi Hidaka, Takeharu Yamanaka, Yoshifumi Kawano, Jun Okamura: Randomized Trial to Compare LSA2L2-Type Maintenance Therapy to Daily 6-Mercaptopurine and Weekly Methotrexate With Vincristine and Dexamethasone Pulse for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:239–247, (査読有) DOI 10.1002/pbc.22528

4. Okamoto Y, Kodama Y, Nishikawa T, Yamaki Y, Mougii H, Masamoto I, Tanabe T, Shinkoda Y, Kawano Y: Successful bone marrow transplantation for children with aplastic anemia based on a best-available evidence strategy. *Pediatr Transplant*. 2010, 14:980-5, (査読有)
5. Nishikawa T, Okamoto Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Kodama Y, Higashi M, Hirano H, Arita K, and Kawano Y: Unexpectedly high AUC levels in a child who received intravenous busulfan before stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2010, 45(3):602-604, (査読有)
6. Okamoto Y, Watanabe T, Watanabe H, Onishi T, Kawano Y. Double apheresis of peripheral blood stem cells in a single day in children mobilized by granulocyte colony-stimulating factor for transplantation. *Pediatr Transplant*. 2009, 13(4):440-443, (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. Kodama Y, Miyazono A, Okamoto Y, Yamaki Y, Kurauchi K, Nishikawa T, Tanabe T, Shinkoda Y, Kawano Y. Lymphoid commitment in human bone marrow CD34-positive cells reflects aging of hematopoietic stem cells. The 2nd Meeting of Asian Cellular Therapy Organization, Miyazaki, 2011.10.17-20
2. Kodama Y, Okamoto Y, Shinkoda Y, Tanabe T, Nishikawa T, Yamaki Y, Kawano Y. HIF-1 α is not associated with the clinical course of aplastic anemia in children. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH2011), Nagoya, 2011.10.14-16
3. Nishikawa T, Izumo K, Miyahara E, Horiuchi M, Okamoto Y, Kawai Y, Kawano Y, Takeuchi T. Myeloperoxidase-derived halogenative stress, a possible cause of benzene leukemogenesis. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH2011), Nagoya, 2011.10.14-16
4. Okamoto Y, Yamaki Y, Nishikawa T, Kodama Y, Shinkoda Y, Tanabe T, Kawano Y. Continued Complete Remissions in 3 ALL patients who received under optimal chemotherapy. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (JSH2011), Nagoya, 2011.10.14-16

6. 研究組織
(1) 研究代表者

河野 嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：20260680

(2)研究分担者

岡本 康裕 (OKAMOTO YASUHIRO)
鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師
研究者番号：30398002

新小田 雄一 (SHINKODA YUICHI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
特任助教
研究者番号：50457652

(3)連携研究者

平尾 敦 (HIRAO ATSUSHI)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：90343350