

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591557

研究課題名(和文)造血幹細胞の加齢に関する研究—移植による変化—

研究課題名(英文)Aging process of hematopoietic stem cells induced by transplantation

研究代表者

河野 嘉文(Kawano, Yoshifumi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20260680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト造血幹細胞の加齢現象を評価する方法を確立すること、造血細胞移植前後による造血幹細胞の変化をとらえることを目的とした。具体的には、造血組織における幹細胞を集団としてとらえ細胞分画内の加齢(老化)現象を観察する方法を実施した。造血幹細胞分画のリンパ球系細胞と骨髄球系細胞の比率で細胞集団の加齢を評価する方法である。通常加齢マーカーに使用されるテロメア長では造血幹細胞の短期間での加齢現象は証明できないが、CD34陽性細胞のIkaros/CEBPa比では15～45歳のヒト造血幹細胞の変化を検出できる。しかしながら、その精度に課題が残るため、さらに高い精度で検出方法の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study were to establish the method of evaluating aging process in human hematopoietic stem cells (HSC) and to detect biological variations of HSC induced by HSC transplantation. We analyzed aging process of HSC with the use of CD34-positive cell population as a substitute for a single HSC. As a result, the ratio of Ikaros/CEBPa, which are transcription factors of lymphoid and myeloid respectively of primitive HSC, can be used as an evaluation method for HSC variation at the age of between 15 and 45. Although the precision of this method should be improved with some modifications, aging process by HSC transplantation can be shown with this method.

研究分野：医歯薬学

キーワード：造血幹細胞 加齢 老化 造血細胞移植 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、骨髄移植、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、患児と年齢が近い HLA 一致同胞ドナー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、同胞数の減少と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だろうか。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、現在までヒトでは解明されていない。

造血幹細胞の加齢に関する研究はマウスで行われてきた。マウス造血幹細胞で加齢マーカーになりうる指標はテロメア、テロメラゼ活性、活性酸素種 (ROS) の細胞内蓄積、p16<sup>INK4a</sup> mRNA の増加、などが報告されてきた。<sup>1,2)</sup> マウスでは serial transplantation という実験手法が可能で、移植による造血幹細胞の加齢 (老化) 現象が確認されているが、

ヒトでは不可能な方法である。我々はヒト造血幹細胞を CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞として純化し、ヒト造血細胞移植術によるヒト造血幹細胞の加齢 (老化) 現象の解明を目指してきた。一連の研究で、ヒト細胞のテロメア長は 10 歳以降では経年的な変化が小さく単独では造血細胞加齢の指標に利用しにくいこと、ヒト造血幹細胞内に蓄積される ROS は移植によって短期的には変動しないことを確認した。また、マウスで検討された p16<sup>INK4a</sup> mRNA はヒト正常造血幹細胞での発現は極めて微弱で検出が困難であった。これらの結果から、マウス造血幹細胞で証明されている加齢 (老化) マーカーはヒト造血幹細胞では指標にならないことが判明した。

## 2. 研究の目的

ヒト造血幹細胞の加齢現象を全年齢を通して評価する方法を確立すること、造血細胞移植前後による造血幹細胞の変化をとらえることを目的とした。具体的には、造血組織における幹細胞を集団としてとらえ細胞分画内の加齢 (老化) 現象を観察する方法を実施した。個々の細胞加齢を観察するのではなく、造血幹のリンパ球系細胞と骨髄球系細胞の比率で細胞集団の加齢を評価する方法である。

## 3. 研究の方法

(1) 研究用健常人細胞、小児がん患者への移植細胞、移植後患者細胞あるいは研究用臍帯血細胞から純化したヒト造血幹細胞 (CD34/CD133) 陽性細胞に発現する分化関連転写因子の mRNA 発現量を測定した。

### <細胞純化>

AutoMACS cell separator で細胞処理し純化した。

### <遺伝子>

- 1) リンパ球系分化：Ikaros
- 2) 骨髄球系分化：C/PBP α
- 3) 自己複製能保持：HOXB4, GATA-2（必要時検査）

以上を real time PCR 法を用いて定量的に測定した。

### <評価方法>

細胞内の参照遺伝子 GAPDH からみたリンパ球系遺伝子 IKARS と骨髄球系遺伝子 C/EBP α の発現量を Real-time PCR 法で算出する。凍結細胞も含む種々の年齢の骨髄 CD34 陽性細胞を対象としているので、細胞の条件を補正する目的で、一つの細胞の各遺伝子量を 1 と対象細胞の各遺伝子発現量との比で算出し、評価対象細胞の IKAROS/CEPBPA α 比を算出した。

(2) マウスで加齢と関連することが報告された Wnt5a について、発現量を (1) と同様に以下の方法で検討した。

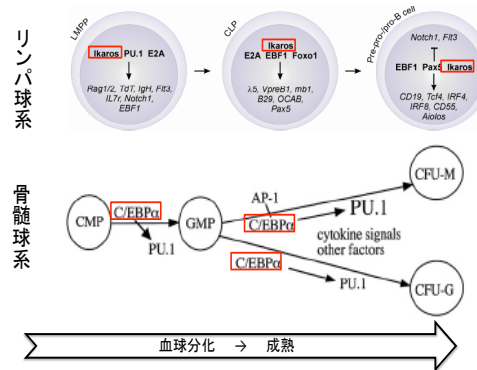
- 1) 臍帯血、小児白血病細胞の寛解期の骨髄、購入した成人骨髄の解凍
- 2) AutoMACS を用いて CD34 陽性細胞に純化
- 3) CD34 陽性細胞から Total RNA を抽出
- 4) RNA の確認
- 5) cDNA の作成
- 6) Wnt5a、GAPDH のリアルタイム PCR

### 4. 研究成果

(1) 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することで、一定の細胞集団の加齢(老化)現象を推定できると考え、種々の転写因子か

らリンパ球系で Ikaros、骨髄球系で CEBPA を選択した (図 1)。

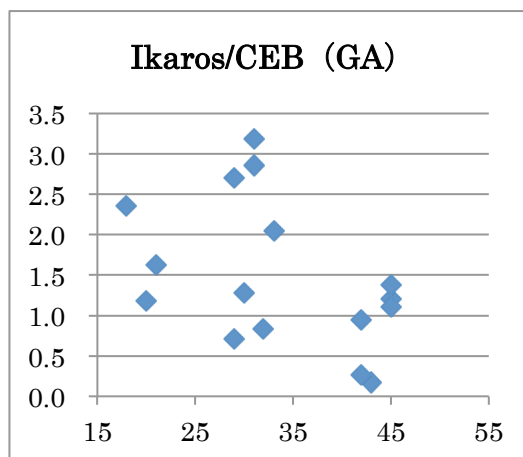
【図 1】



その結果、ヒト造血幹細胞 (CD34/CD133 陽性細胞) 内の転写因子 Ikaros の mRNA 発現量と造血幹細胞集団としての加齢 (老化) との関係を推測できることがわかった。同時に免疫系が発達する幼児期の細胞評価は Ikaros では加齢 (細胞疲弊) を評価しにくいことも判明した。

患者細胞では 8 歳児の細胞をコントロールとして、15~45 歳の症例の Ikaros/CEBPBA 比を対照遺伝子として GAPDH を用いて比較した。

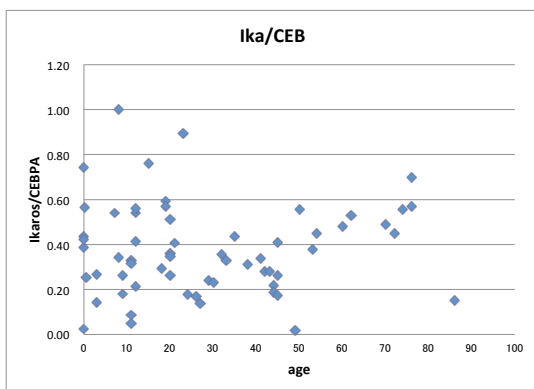
【図 2】



その結果、図 2 に示したように、15~45 歳の

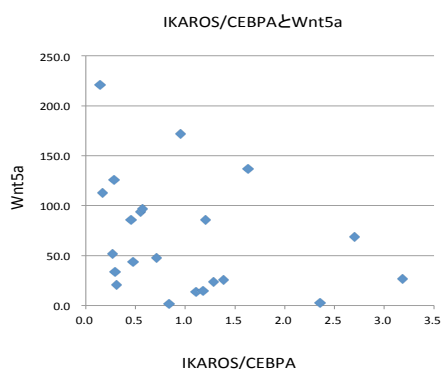
検体では、加齢とともにその比が低下する逆相関を認めた。造血幹細胞の加齢現象を明確に表現するためには、臍帯血移植を想定した乳幼児の検体、また年長者として40歳代からの検体では不十分で、平均寿命に近い高齢者の検体での検討が必要と考えた。そこで、図2の45歳以下の検体に加えて50～86歳の検体を加えて検討した。しかし、全年齢での相関係数0.048、 $p=0.71$ で、加齢とIkaros/CEBPA比で相関関係は得られなかった(図3)。

【図3】



(2) Wnt5aは加齢とともに上昇すると報告されているので、Ikaros/CEBPa比にWnt5aを加えて年齢との関係を検討した。

【図4】



その結果、CD34陽性細胞ではその傾向が見られたが、図4のごとく、有意に相関すると言えるレベルではなかった。

またIkaros/CEBPA比とWnt5aは逆相関しているが、加齢現象は単純に暦年齢と相関するものとは言えず、Ikaros/CEBPa比が高く、Wnt5aが低い細胞は、暦年齢に関わらず細胞学的加齢現象が進んでいない細胞といえる可能性があると思われた。この方法では、Wnt5aの発現量はCD34陽性細胞では弱く、結果の再現性に課題が残った。

結論として、従来検討結果と合わせ、通常加齢マーカーに使用されるテロメア長では造血幹細胞の短期間での加齢現象は証明できないが、CD34陽性細胞のIkaros/CEBPa比では15～45歳のヒト造血幹細胞の変化を検出できる。しかしながら、その精度に課題が残るため、さらに高い精度で検出方法の開発が望まれる。また、乳幼児と50歳以上のヒト検体での評価はこの方法では難しく、出生児から80歳程度までを通して検出する方法がなければ、造血幹細胞の移植による変化を再現性よく示すことが困難である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Hiroshi Moritake, Sachiyo Kamimura, Hiroyuki Nunoi, Hideki Nakayama, Aiko Suminoe, Hiroko Inada, Jiro Inagaki, Fumio Yanai, **Yasuhiro Okamoto**, Yuichi Shinkoda, Maiko Shimomura, Nobuyoshi Itonaga, Noriko Hotta, Yasufumi Hidaka, Osamu Ohara, Masakatsu Yanagimachi, Noriko Nakajima, Jun Okamura, **Yoshifumi Kawano**: Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic

- leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu–Yamaguchi Children’s Cancer Study Group. *Int J Hematol*, 査読あり, 2014, 100:70–78
2. Emiko Miyahara, Takuro Nishikawa, Toru Takeuchi, Kaori Yasuda, Yasuhiro Okamoto, **Yoshifumi Kawano**, Masahisa Horiuchi: Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1, 2, 4,-benzenetriol. *Toxicology*, 査読あり, 2014, 317: 50–57.
  3. Yasuhiro Okamoto, Yoshihisa Nagatoshi, Yoshiyuki Kosaka, Akira Kikuchi, Shunichi Kato, Hisato Kigasawa, Yasuo Horikoshi, Megumi Oda, Makoto Kaneda, Tetsuya Mori, Hideo Mugishima, Masahiro Tsuchida, Shuichi Taniguchi and **Yoshifumi Kawano**: Prospective pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation in 25 children. *Pediatr Transplantation*, 査読あり, 2014: 18: 294–301
  4. Tomoko Iehara, Minoru Hamazaki, Tatsuro Tajiri, **Yoshifumi Kawano**, Michio Kaneko, Hitoshi Ikeda, Hajime Hosoi, Tohru Sugimoto, Tadashi Sawada • Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study Group: Successful treatment of infants with localized neuroblastoma based on their MYCN status. *Int J Clin Oncol*, 査読あり, 2013, 18(3):389-95.DOI 10.1007/s10147-012-0391-y
  5. 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*, 査読あり, 2012, 120:62–67. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1103437>
  6. Kodama Y, Okamoto Y, Hashiguchi T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Tanabe T, **Kawano Y**. Vascular endothelial growth factor corrected by the platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children. *Int J Hematol*, 査読あり, 2012, 95:494-499
  7. Ueno K, Nomura Y, Masamoto I, Masuda K, Morita Y, Eguchi T, Okamoto Y, **Kawano Y**. Potential role of autoantibody in severe neutropenia of a patient with Kawasaki

syndrome. *Scand J Immunol*. 査読あり, 2012, 75:120-126

8. Nishikawa T, Inagaki J, Nagatoshi Y, Fukano R, Nakashima K, Ito N, Sawa D, **Kawano Y**, Okamura J. The second therapeutic trial for children with hematological malignancies who relapsed after their first allogeneic SCT: Long-term outcomes. *Pediatr Transplant*, 査読あり, 2012, Nov;16(7):722-8

[学会発表] (計 2 件)

1. Nishikawa T, Okamoto Y, Tanabe T, Kurauchi K, Nakagawa S, Abematsu T, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y. Validation of a test dose strategy for administering intravenous busulfan in the setting of pediatric myeloablative stem cell transplantation: Clinical and pharmacokinetic results. 40th Annual Meeting of the EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation), Milan, Italy, 2014.03.30-04.02
2. Nishikawa T, Kurauchi K, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y. Mechanisms and prevention of fatal cardiotoxicity following high-dose cyclophosphamide. 40th Annual Meeting of the EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation), Milan, Italy, 2014.03.30-04.02

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

## 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