

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790984

研究課題名(和文) ヒト骨髓ニッチにおける造血幹細胞支持機構の解明と造血幹細胞体外増幅法の開発

研究課題名(英文) Analysis of human HSCs-supporting mechanisms of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and development of a Human HSC expansion system

研究代表者

松岡 由和 (MATSUOKA, Yoshikazu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70533420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は当該研究期間において、ヒト造血幹細胞(HSC)が高度に濃縮された、ヒト臍帯血由来18Lin-CD34+/-分画細胞の一部あるいは全部に反応性を示す抗体産生ハイブリドーマを約500クローン作製した。これら抗体より、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(MSC)によるHSC支持能阻害活性を持つ抗体のスクリーニングを行った。このスクリーニングは、50クローン分程度終えており、その中には、ヒトMSCによるHSC支持能を約20%程度阻害するものも含まれていた。残りのクローンにおいても同様のスクリーニングを行う予定である。今後、阻害活性を有する抗体を見つけることにより、ヒトHSC支持因子の同定が期待される。

研究成果の概要(英文)：I developed about 500 hybridoma clones which produce the monoclonal antibody (mAb) against human cord blood-derived 18Lin-CD34+/- fractions. In this fraction, human primitive hematopoietic stem cells (HSCs) are highly concentrated. Then, I performed screening of neutralization antibodies against the human HSC supportive activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) using this antibody library. For this propose, these developed mAbs were added into coculture of MSC and 18Lin-CD34+/- cells. In the result, I found the antibody which inhibited (approximately 20%) the HSC supportive ability of MSCs from this antibody library. This screening is currently in progress.

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 骨髓ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (HSC) は、自己複製能と多分化能を有しており、生涯にわたり造血を支持する。HSC は成体において骨髓微小環境 (ニッチ) 中でその未分化性を維持すると考えられている。従来、ヒト HSC は、CD34 抗原陽性 (CD34<sup>+</sup>) 分画にのみ存在すると考えられてきたが、Sonoda らは、ヒト臍帯血において CD34 抗原陰性 (CD34<sup>-</sup>) 分画に、より未分化な HSC が存在することを報告した (Blood, 101:2924, 2003)。さらに、申請者らは、この CD34<sup>-</sup> HSC を 18 種類の分化抗原マーカー (18Lin) 抗体を用いることにより高度に純化する事に成功した (Exp Hematol, 39:203, 2011)。一方、マウスにおいて HSC ニッチの構成要素としては骨芽細胞 (Nature, 425:778, 2003.) や血管内皮細胞 (Cell, 121:1109, 2005)、CXCL12-abundant reticular cell (Immunity, 25:977, 2006) 骨髓間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) (Nature, 466:829, 2010) などが報告されていた。しかしながら、ヒト HSC ニッチに関しては、その構成要素および支持機構ともに、ほとんど明らかになっていない。そこで、申請者は、ヒト HSC ニッチによるヒト HSC 支持機構の解明と、その機構を利用したヒト HSC の体外増幅法の開発を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の 2 点を目的とし行った。

- (1) ヒト骨髓ニッチにおける HSC 支持機構の解明。
- (2) 上記 HSC 支持機構および CD34<sup>-</sup> HSC を利用したヒト HSC 体外増幅法の開発。

## 3. 研究の方法

申請者は予備的検討により、すでにヒト骨髓由来 CD45<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>CD271<sup>+</sup>SSEA-4<sup>+</sup>分画より他の分画より樹立した MSC と比較し、高いヒト HSC 支持能を有する MSC (DP MSC) の樹立に成功していた。そこで、本研究は以下の方法で行った。

- (1) 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>細胞に対する抗体の作製
- (2) 上記、(1)により作製される抗体ライブラリーを用いた、DP MSC による HSC 支持能に対する阻害活性を有する抗体のスクリーニング

## 4. 研究成果

- (1) 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>細胞に対する抗体の作製

最初に、ヒト HSC 支持因子受容体を同定するため、ヒト HSC が高度に濃縮された 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>細胞に結合可能な抗体の作製を試みた。具体的には、まず、18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>細胞あるいはヒト白血病細胞株である KG-1 細胞を、Balb/c マウスの足底部に 2 回/週で 2 週間にわたり注射し、マウスを犠牲死させた後、鼠径部リンパ節よりリンパ球を回収した。その後、回収したリンパ球をマウスのミエローマ細胞株と融合させ、ハイブリドーマを作製した。次いで、1 次スクリーニングとして 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>細胞に対する結合性を評価した。

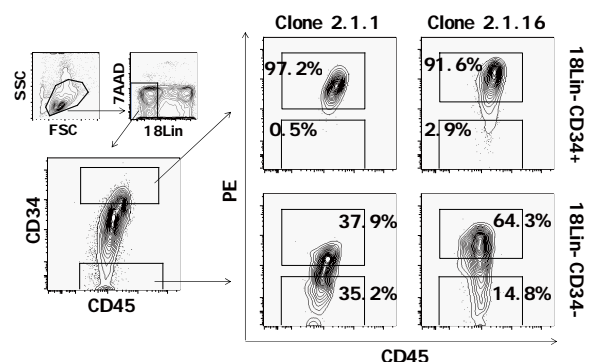


図 1: ヒト CB 由来 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+/+</sup>分画に反応性を示す抗体の例。PE 標識した goat anti-mouse IgG 二次抗体にて検出した。

その結果、 $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{+/-}$ 分画細胞の一部あるいは全部に反応性を示す抗体産生ハイブリドーマを約500クローン作製した(図1)。その後、これらのハイブリドーマを自作の無血清培地に移し、その培養上清より抗体を回収および精製した。

(2) DP MSC による HSC 支持能に対する阻害活性を有する抗体のスクリーニング

二次スクリーニングとして、ハイブリドーマ上清より回収した精製抗体を、DP MSC と  $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{+/-}$ 細胞との共培養系に添加することにより、DP MSC による  $\text{CD}34^{+}$ 細胞維持・産生能を阻害する抗体のスクリーニングを行った。現在、50クローン分程度のスクリーニングを終えている。図2に、阻害活性を示した抗体の例を示す。今後、残りのクローンにおいても同様のスクリーニングを行う予定である。

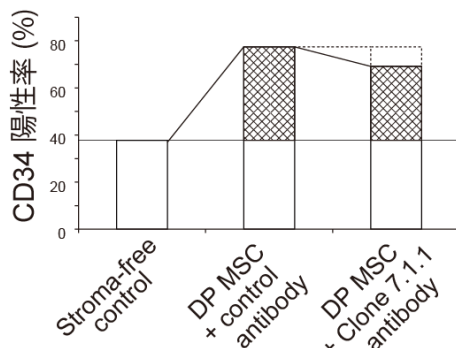


図2:  $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{+}$ 細胞と DP MSC の共培養系に作製した抗体を添加した。Clone 7.1.1 由来抗体は DP MSC の  $\text{CD}34^{+}$ 細胞支持能(中央:網掛け部分)に対して約20%の阻害活性(右:破線部分)を示した。

(3) *In vivo*における DP MSC の HSC 支持能の検討を行った。具体的には、NOGマウス左脛骨に  $2 \times 10^5$  /mouseの DP MSC と 8,000/mouseの  $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{-}$ 細胞を骨髄内直接移植 (IBMI)法にて同時に移植した。対照群には、 $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{-}$ 細胞単独で移植を行った。移植後20週目にマ

ウスを犠牲死させ、移植部位におけるヒト  $\text{CD}45$ 陽性細胞の生着率を解析した。その結果、 $18\text{Lin}^{-}\text{CD}34^{-}$ 細胞単独で移植を行っても80%以上の非常に高いヒト  $\text{CD}45$ 陽性細胞の生着を示すマウスが認められた。そのため、この系では、DP MSC によるヒト HSC 支持能を正確に評価することは困難であると考えられた。今後、新たな *in vivo*における HSC 支持能の評価系を開発する必要があると考えられた。

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)

[学会発表](計 7件)

松岡由和、藺田精昭。ヒト造血幹細胞支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞の予期的分離とその機能解析。第23回日本サイトメトリー学会。2013年6月21日~2013年6月22日。日本医科大学。橘桜会館。

Matsuoka, Yoshikazu et al. Functional Significance of MPL Expression in the Primitive Human Hematopoietic Stem Cell Compartment. The 11<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium. 2013年5月17日~2013年5月18日。東京都。東京大学 伊藤国際学術研究センター。

松岡由和 他、ヒト臍帯血由来  $\text{CD}34$  抗原陽性および陰性造血幹/前駆細胞は異なる分化能を有する。第21回近畿臍帯血幹細胞移植研究会。2013年05月11日。大阪府。ホテルグランヴィア大阪。

松岡由和 他、Human  $\text{CD}34$ -negative hematopoietic stem/progenitor cells possess potent erythroid/megakaryocytic differentiation potential. 第35回日本造血細胞移植学会総会。2013年03月07日~2013年03月09日。石川県。石川県立音楽堂

等。

松岡由和 他、Human CD34-negative hematopoietic stem cells express potent erythroid/megakaryocytic potential. 第74回日本血液学会学術集会。2012年10月19日～2012年10月21日。京都府。京都国際会館。

Matsuoka, Yoshikazu et al. Novel human bone marrow derived mesenchymal stromal cells lacking adipogenic differentiation potential support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting. 2012年6月13日～2012年6月16日。神奈川県。パシフィコ横浜。

Matsuoka, Yoshikazu et al. Biochemical analysis of human CD34<sup>+/-</sup> HSCs-supporting mechanisms by human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. The 10th Stem Cell Research Symposium. 2012年5月31日～2012年6月2日。兵庫県。淡路夢舞台国際会議場。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松岡 由和 (MATSUOKA, Yoshikazu)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70533420