

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05669

研究課題名(和文)新規骨髄ヒト化マウスを用いた正常及び悪性造血ニッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of normal and malignant hematopoietic niche using novel bone marrow humanized mice

研究代表者

滝澤 仁 (Takizawa, Hitoshi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号：10630866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,800,000円

研究成果の概要(和文)：生涯造血を担う骨髄には、血液の源となる造血幹細胞の他に、間葉系ストローマ細胞などの非血液細胞種が混在し、骨髄微小環境(ニッチ)を形成して液性因子や接着分子を介して造血幹細胞の細胞特性、つまり自己複製能と多分化能を維持していることが知られている。しかしながら、これらの知見はほとんどがマウスの研究によって明らかとなった。本研究では、今までほとんど知られていないヒト骨髄ニッチについて新たな実験モデルを用いて理解していく。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow that sustains lifelong blood production contains not only blood forming hematopoietic stem cells but also non-hematopoietic cells such as mesenchymal stromal cells to form bone marrow microenvironment, often referred to as niche. It is known to maintain hematopoietic stem cell identity, i.e., self-renewal and multi-lineage differentiation, via fluid factor, adhesion molecule and so on. However, these knowledge have been developed by studying experimental small animals, especially mouse. Relatively little is therefore known about human bone marrow niche, and this project aims to uncover human bone marrow niche using novel experimental animal model.

研究分野：感細胞生物学、血液学

キーワード：造血ニッチ 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生涯造血を担う骨髄には、血液の源となる造血幹細胞 (HSC) の他に、間葉系ストローマ細胞などの非血液細胞種が混在し、骨髄微小環境 (ニッチ) を形成して液性因子や接着分子を介して HSC の細胞特性、つまり自己複製能と多分化能を維持していることが知られている (Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Development 2014)。

HSC への遺伝子変異蓄積 (細胞変化) またはニッチ細胞機能異常 (環境変化) は自己複製能または多分化能異常を引き起こし、白血病や造血障害につながる恐れがある。実際、一部の白血病では、HSC に似た細胞特性を有する、白血病の原因と考えられる白血病幹細胞 (LSC) が同定された。さらに、ニッチ細胞の機能異常が造血障害・腫瘍化を誘発することが明らかになりつつあることから、HSC-ニッチ細胞間コミュニケーションの恒常性維持の破綻は造血異常に関与していることが提唱され、既存の化学療法による LSC 根絶治療の難しさの一つの理由と考えられている (Raaijmakers MH, 2011)。しかしながら、これらの知見のほとんどは遺伝子改変動物を用いた研究から明らかになったことであり、ヒト骨髄ニッチの分子基盤についてはほとんど分かっていない。

過去 20 年以上のあいだ、ヒト細胞や組織の生体内での機能を調べるために、免疫不全マウスに移植する異種移植モデルマウスが作出されてきた (Rongvaux A, Takizawa H, Ann Rev Immunol., 2013)。しかしながら、現行ヒト化マウスではヒト造血幹細胞の自己複製能を維持することはできない。代表者らはヒト骨髄ニッチ細胞の一つ、間葉系ストローマ細胞を試験管内で分化誘導したのち免疫不全マウスに移植することでヒト骨髄ニッチを再構築することに成功した (Scotti C, Piccinini E, Takizawa H, PNAS 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、代表者らが確立した上述のヒト化骨髄構築技術を用いて、実験モデルの欠如により未だ明らかでない、ヒト骨髄ニッチの細胞性・分子性特性を解明し、正常・異常骨髄ニッチの比較により治療標的となりうる LSC ニッチ因子の同定を目指した。同時に、特異的マーカー及び機能評価系の欠如から明らかとなっていない、間葉系ストローマ細胞 (MSC) の細胞階層性、自己複製能および多分化能の分子基盤を調べるために細胞表面マーカーを用いた MSC 前駆細胞の純化を試した。

3. 研究の方法

目的 1) 正常骨髄由来ヒト化骨髄組織の構築と HSC 機能評価

正常ヒト化骨髄を皮下移植した免疫不全マウスに、放射線照射後ヒト正常 HSC を移植し、ヒト化骨髄内に生着・維持されるヒト HSC を経時的に FACS 解析、その機能を試験管内コロニーアッセイ及び連続移植により評価した。また、組織免疫染色によりヒト化骨髄内 HSC-ニッチ細胞の空間的局在化を解析した。ヒト多能性幹細胞 (iPS) から MSC への分化誘導が報告されたので (Zou L, 2013)、京都大学 iPS 細胞研究所の江藤浩之教授の協力のもと、骨髄ドナー不足を回避できるヒト iPS からのヒト化骨髄作出も試みた。

目的 2) 間葉系ストローマ細胞の純化

健常人骨髄より間葉系ストローマ細胞を培養し、上述の軟骨分化培養により軟骨分化能を評価した。また、健常人骨髄細胞の表面抗原を免疫染色して、フローサイトメトリーにて免疫表現型を解析した。

目的 3) 白血病骨髄由来ヒト化骨髄の構築と LSC 機能評価

患者由来ヒト化骨髄による LSC の機能評価:

熊本大学、チューリッヒ大学血液内科の協力のもと、現行ヒト化マウスへ生着しにくく、ヒト骨髄環境に依存性と考えられる予後良好 AML(acute myeloid leukemia) 及び MDS(myelodysplastic syndrome) 骨髄サンプルを集める。スイス・バーゼル大学病院 (Prof. Ivan Martin) との共同研究により患者骨髄サンプル由来ヒト化骨髄を作出し、移植後ヒト化骨髄内にて維持される同患者由来 LSC の経時的な生着を FACS 解析、核型解析、遺伝子変異解析で評価する。患者ヒト化骨髄に対する正常 HSC 移植、または正常ヒト化骨髄に対する患者 LSC 移植を行い、幹細胞とニッチ相互作用が白血病化に与える影響を評価する。目的 1) A.と同様、患者由来 iPS を樹立し、ヒト化骨髄を創出する。

4. 研究成果

目的 1) ヒト化骨髄の作出と機能評価

代表者らはヒト正常骨髄由来間葉系ストローマ細胞 (MSC) をコラーゲン上で試験管内で軟骨分化へと分化誘導し、免疫不全マウス皮下でヒト様骨髄 (ヒト化骨髄) を再構築した (Scotti, PNAS 2013)。この論文ではヒト化骨髄がマウス造血幹細胞を呼び寄せ、その造血能を維持できることを示したが、ヒト造血幹細胞の造血能維持については検討しなかった。そこで、ヒト正常骨髄より初代培養した間葉系ストローマ細胞を 5 週間コラーゲン上で試験管内培養し、軟骨組織へ分化誘導した。免疫不全マウスの皮下へ移植してから 4 週間経過したのち、マウスに非致死量の放射線照射を処置して、造血幹細胞を含む臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移植した。造血幹細胞移植の 8 週間後、マウス骨髄またはヒト造血組織を採取してヒト血液細胞の維持および分化を解析した。その結果、再構築したヒト正常造血組織はマウス骨髄と同等もしくは高い頻度でヒト造血幹細胞を維持しうることを示された。また、ヒト正常造血組織は

造血幹細胞だけでなく、造血前駆細胞や B 前駆細胞も効率よく再構築されていることが分かった。このことから、ヒト造血組織はヒト造血幹細胞の維持因子を供給することで造血幹細胞機能恒常性を維持していることが強く示唆された。

ヒト正常造血組織において細胞の機能評価として、試験管内コロニーアッセイを行った。ヒト正常造血組織で維持される CD34 陽性細胞はマウス骨髄内の同細胞集団に比して、骨髄球系コロニー形成能が有意に高いことから、ヒト正常造血組織ではより多くの機能的な造血幹細胞または前駆細胞が維持されていることが示唆された。

造血幹細胞は骨髄において細胞周期の静止期 (G 0) に維持されている。ヒト造血組織で維持される造血幹細胞の細胞周期を解析した結果、マウス骨髄に存在する造血幹細胞に比べて有意に高い割合で細胞が G 0 にあることが分かった。

以上の結果は、ヒト骨髄間葉系ストローマ細胞より再構築したヒト化骨髄は造血幹細胞から成熟血液・免疫細胞への分化を支持するだけでなく、分化能をもつ造血幹細胞や前駆細胞を静止期に維持できることを示唆している。

iPS 由来 MSC についても上述の方法でヒト化骨髄の作製を試みたが、これまでのところ従来の方法ではうまく行かないことがわかっている。そこで、現在は培養期間の短縮、マウスへの直接移植、血管内皮細胞との共移植などを試みている。

目的 2) 間葉系ストローマ細胞の純化

連携病院から採取した正常骨髄から MSC を培養し、それをを用いて軟骨分化誘導をおこなった。その結果、全ドナー (2018年4月時点で約300例以上) のうち、約30%程度のドナーのみ軟骨分化能を示すことが

分かった。このことはドナー骨髄には大きな生物学的個体差があることを示唆しており、骨髄に存在すると予想される間葉系ストローマ前駆細胞の頻度、自己複製能または分化能に依存することが考えられた。そこで、先行研究で報告されている間葉系ストローマ細胞マーカーについて、その発現レベルを全骨髄細胞で調べた。その結果、Lin 陰性 (CD31-CD45-GPA-) のうち CD271 陽性細胞の割合が軟骨形成能をもつドナーで有意に高く相関があることが分かった。

骨髄組織の形成能をもつ MSC を純化するために、これまで報告のある細胞表面マーカー (CD271, CD146, CD51, CD105、SSEA-1 など) (FJ Lv, Stem Cells 2014) を FACS 解析した。そして、候補細胞をソーティングして、試験管内 CFU Fibroblast (CFU-F) の数で評価したところ、CFU-F を持つ細胞が CD45-CD31-GPA-CD271+ の分画に検出できた。そこで、CD45-CD31-GPA-CD271+ または CD45-CD31-GPA-CD271- の分画をソーティングして RNA-seq を行なった結果、いくつかの興味深い遺伝子群が同定できた。今後はこれらの候補遺伝子群を指標に、細胞分画を進め、造血形成能をもつ MSC の純化を進めていく。

目的 3) 白血病骨髄由来ヒト化骨髄の構築と LSC 機能評価

目的 1) と 2) がやや遅れているため、本目的には着手できていない。

今後について

本研究により、ヒト骨髄間葉系ストローマ細胞が造血幹細胞の多分化能および非分裂性を維持できるヒト骨髄の機能特性をもった造血組織を再構築することができることが明らかとなった。さらに、種々の細胞表面マーカーを用いて軟骨分化能を有する間葉系ストローマ前駆細胞を濃縮できる可能性

が示唆された。今後は、間葉系ストローマ前駆細胞の濃縮をさらに進め、シングルセルレベルでニッチ機能の分子基盤を明らかにしていく。今後、期待される成果は、効率的な HSC 試験管内増幅、骨髄再構築技術、骨髄移植に伴う拒絶反応制御など、新たな再生医療技術の開発につながると思われる。

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] 査読あり (計 1 件)

Fritsch K, Pigeot S, Bourguine PE, Feng X, Schroeder T, Martin I, Manz MG, Takizawa H, Engineered humanized bone organs maintain human hematopoiesis in vivo, Exp Hematol, 2018 May;61:45-51.e5. doi: 10.1016/j.exphem.2018.01.004.

[学会発表] (計 4 件)

Xiaomin Feng, Kristin Fritsch, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Markus G. Manz, Hitoshi Takizawa, Reconstitution of human bone marrow niche for better maintenance of human hematopoiesis in vivo, 2nd IRCMS symposium, 2016 年 10 月 31 日、熊本

Xiaomin Feng, Hitoshi Takizawa, “Prospective Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cell Progenitor” 日本免疫学会、2016年12月7日、沖縄

Xiaomin Feng, Kristin Fritsch, Sébastien Pigeot, Yuichiro Arima, Koichi Nishiyama, Ivan Martin, Markus G. Manz, Hitoshi Takizawa, “Humanization of bone marrow niche for better maintenance of human hematopoiesis in xenograft model”, 日本血液学会、2017年10月12-14日、東京

Hitoshi Takizawa, 2nd Symposium JSPS and NUS Joint Symposium “New Horizon In Normal and Cancer Stem Cell Research” Jan/18-20th/2018, Kumamoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://ircms.kumamoto-u.ac.jp/research/hitoshi_takizawa/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝澤 仁 (Hitoshi Takizawa)

熊本大学国際先端医学研究機構・特別招聘教授

研究者番号: 10630866

(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

()