

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15360

研究課題名(和文) 骨髄不全におけるCXCR4陽性造血幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy targeting CXCR4+ hematopoietic stem cells in patients with bone marrow failure

研究代表者

中尾 眞二 (Shinji, Nakao)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：70217660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：余剰造血幹前駆細胞(HSPC)のマーカであるCXCR4陽性のHSPCを活性化できれば、再生不良性貧血(再不貧)患者の造血機能を改善させられる可能性がある。免疫不全マウスの骨髄内にヒトCD34(+)細胞を移植したところ、3.3-20.4%のヒトCD45陽性細胞の再生を確認した。6pLOH陽性の再不貧患者単球由来iPS細胞からHSPCを誘導し、同じマウスに移植したところ、患者体内で優勢であった6pLOH(+)HSPCのCXCR4(+)細胞割合(平均10.2%)は野生型(50.7%)に比べて有意に低値であった。野生型CXCR4(+)HSPCをin vivoで活性化させる方法を現在検討中である。

研究成果の概要(英文)：A chemokine receptor CXCR4 is preferentially expressed by redundant hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) that do not contribute to hematopoiesis. Stimulation of residual CXCR4(+) HSPCs may restore hematopoietic function of patients with acquired aplastic anemia (AA). First, we optimized method of engrafting an immune-deficient mouse (BRGS mouse) with cord-blood CD34(+) cells using intra-bone marrow injection, and confirmed the presence of human CD45(+) cells that accounted for 3.3-20.4% of the various tissue-derived cells. Next, we induced HSPCs from iPS cells that were generated from monocytes of AA patients possessing 6pLOH(+) leukocytes, which were predominant in the patients' blood, as a result of uniparental disomy, and injected the HSPCs to the same mice. Regenerating human 6pLOH(+)CD34(+) cells in the mice expressed CXCR4 to a significantly lesser degree (mean 10.2%) than did 6pLOH(-)CD34(+) cells. We are currently exploring a method to activate CXCR4(+) HSPCs in vivo.

研究分野：血液内科学

キーワード：再生不良性貧血 造血幹前駆細胞 CXCR4 BRGSマウス iPS細胞 6pLOH

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血(再不貧)や低リスク骨髄異形成症候群(MDS)のような難治性の骨髄不全を改善させるためには、造血に寄与することなく静止期に留まっている造血幹細胞を造血に動員する必要がある。HLA領域を含む第6染色体短腕の片親性ダイソミーのため、loss of heterozygosity(6pLOH)を起こした造血幹細胞由来のHLA-Aアレル欠失血球を有する寛解期の再不貧患者骨髄 common myeloid progenitors (CMPs)を解析した最近の我々の研究によって、ケモカインレセプターのCXCR4発現が、造血に寄与していない余剰CMPsのマーカであることが示された。これは、ある再不貧患者において、顆粒球のほとんどすべてを占めるHLA-Aアレル欠失細胞が、CMPレベルではごく一部であり、その大部分がCXCR4陰性であることから示唆された(図1)。このCXCR4陽性CMPsを造血に動員することができれば、治療抵抗性骨髄不全患者の造血を改善させられる可能性がある。本研究では、CXCR4陽性ヒト造血幹細胞の動態を解析すると同時に、これを活性化するサイトカインやリガンドを同定することにより、難治性骨髄不全患者に対する新規治療法

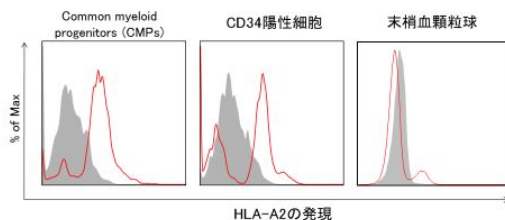


図1. 再生不良性貧血患者の血球別にみたHLA-A2欠失細胞の割合
顆粒球では90%以上を占めるHLA-A2欠失血球の割合はCMPレベルでは10%程度である。

の開発を目指した。

2. 研究の目的

- 1) 健常ヒト骨髄および臍帯血中のCMPs、CD34⁺CD38⁺細胞、CD34⁺CD38⁻細胞のそれぞれにおけるCXCR4発現を明らかにする。
- 2) 1)の各細胞分画におけるCXCR4陽性、CXCR4陰性細胞の造血再構築能を評価するため、SIRPA変異型遺伝子導入免疫不全マウス(BRGSマウス)に対するヒトCD34陽性細胞移植の至適条件を決定する。
- 3) 6pLOH陽性再不貧患者の末梢血単球から作製したiPS細胞を用いて造血幹・前駆細胞(hematopoietic stem/progenitor cells: HSPCs)を誘導し、正常形質、6pLOH形質のHSPCsと、BRGSマウス体内に生着したそれぞれのHSPCにおけるCXCR4発現を比較する。

3. 研究の方法

- 1) 骨髄移植用骨髄採取の際に、骨髄液を濾過するために使用したメッシュに残存する骨髄細胞、または分娩の際に得られた臍帯血単核細胞のCD34陽性細胞をマルチカラーフローサイトメトリーにより解析した。
- 2) 1)で得られた血球系統マーカー陰性CD34陽性細胞をBRGSマウスの大腿骨髄内に移植し、8週から12週目にヒトCD45陽性細胞の存在を評価した。
- 3) 6pLOHおよびHLA-B*40:02(症例1)またはB*54:01(症例2)構造遺伝子異常のためにHLA-B4002またはB5401を欠失した患者の末梢血単球からiPS細胞を樹立し、種々の造血因子の存在下で3-4週間培養することにより、70%前後のCD34陽性細胞を含む細胞集団を誘導した。このCD34陽性細胞をマイクロビーズで純化し、BRGSマウスの大腿骨髄内に移植後、9週から12週にかけて安楽死させた。このマウスの各臓器におけるヒトCD45細胞陽性細胞の細胞表面抗原を解析した。

4. 研究成果

- 1) 骨髄細胞の中で、最も未分化なCD34(+)CD38(-)CD45RA(-)CD90(+)CD49f(+)分画、分化が一段階進んだCD34(+)CD38(-)CD45RA(-)CD90(-)のMPP分画、さらに分化が進んだCMP分画、MEP分画、GMP分画においてCXCR4の発現を継続的に検討したところ、CXCR4は最も未分化なhematopoietic stem cell(HSC)では発現が低いものの、造血前駆細胞へと分化が進むにつれて陽性率が高くなり、さらに成熟すると、逆に発現レベルが低下することが明らかになった。
- 2) BRGSマウス(4-6週齢)22頭に対し、7回のlineage(-)CD34(+)臍帯血由来HSPCs)、同じく15回のlineage(-)CD34(+)骨髄細胞を骨髄内移植し、ヒト造血の構築を試みた結果、全例で構築を確認した。生着率を高めるためのポイントは、移植前の放射線照射量を5.8Gyから5.5Gyに減らし、HSPCをより純化するために分化抗原の種類を12から18に増やし、ヒト造血が構築されるために必要な移植細胞数の下限値を調べるための基礎検討を実施した点であった。骨髄内移植4-8週が経過した時点でBRGSマウスを安楽死させ、マウスの骨髄、胸腺、脾臓、末梢血を採取し、フローサイトメトリーにより、ヒトCD45陽性細胞中の割合を各血球マーカー別に解析したところ、ヒト由来細胞のキメラ率は、骨髄細胞を移植した場合(4.9-28.1%)とHSCsを移植した場合(3.3-20.4%)と

の間で同等であり、両者ともに、別のマウスへの二次移植が可能であった。

- 3) 症例 1、2 の各々の末梢血単球から、野生型、6pLOH(+), B4002 または B5402 の単独欠失、の 3 種類 2 組の iPS 細胞が樹立された。それぞれの iPS 細胞から誘導された CD34 陽性細胞は 71% ~ 99% が

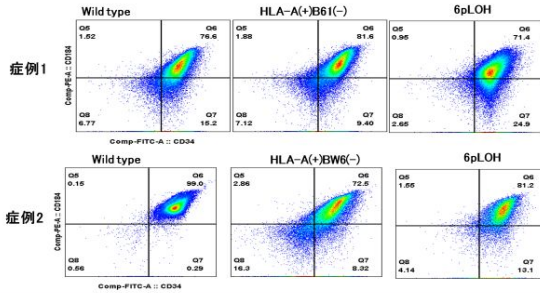


図2. 培養22日目の iPS 細胞における CD34+CXCR4+ (CD184+) 細胞の割合

CD34(+)CXCR4(+)であり、各群の間で CXCR4(+)細胞の割合に明らかな差は見られなかった (図 2)。

一方、BRGS マウスの骨髄内移植後 12 週目の骨髄における CD90(+)CD34(+)、および multipotent progenitor cell 分画における CXCR4(+)細胞割合を比較したところ、患者体内で優勢であった 6

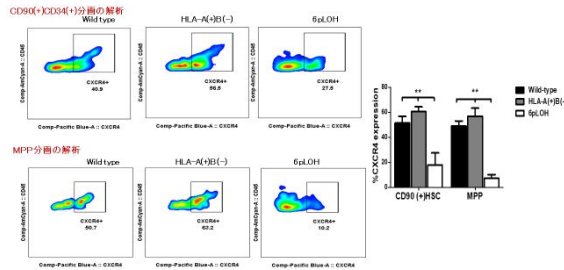


図3. BRGSマウスに生着したヒトHSPCsにおけるCXCR4陽性細胞の割合

pLOH(+)HSPC の CXCR4(+)細胞割合 (平均 10.2%) は野生型 CXCR4(+)細胞割合 (50.7%) に比べて有意に低値であった (図 3)。

以上の結果から、ヒト造血において大部分を占める 6pLOH(+)HSPC は、その造血能に応じて CXCR4 発現が低下しており、造血の占める割合の低い正常 HSPC では HSPC における CXCR4 発現細胞の割合が高いことが示唆された。また、本研究により、CXCR4 発現レベルの高い余剰 HSPC を評価できる *in vivo* の実験系を確立することができた。このモデルは、CXCR4 陽性 HSPC を活性化する因子の探索に有用であると考えられる。

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] (計 5 件)

- Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, Ozawa T, Nakagawa N, Imi T, Maruyama H, Katagiri T, Kishi H, Tajima A, Muraguchi A, Kashiwase K, Nakao S: Identification of an HLA class I allele

closely involved in the auto-antigen presentation in acquired aplastic anemia. Blood, in press, 2017. 査読有

DOI:10.1182/blood-2016-11-752378

- Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, Maruyama H, Ohumi R, Luzzatto L, Nakao S, Notaro R:

Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN-gamma-producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia. Blood 129:388-392, 2017. 査読有

DOI: 10.1182/blood-2016-09-740845

- Saito C, Ishiyama K, Yamazaki H, Zaimoku Y, Nakao S: Hypomegakaryocytic thrombocytopenia (HMT): an

immune-mediated bone marrow failure characterized by an increased number of PNH-phenotype cells and high plasma thrombopoietin levels. Br J Haematol 175:246-251, 2016. 査読有

DOI: 10.1111/bjh.14210

- Espinoza JL, Nguyen VH, Ichimura H, Pham TT, Nguyen CH, Pham TV, Elbadry MI, Yoshioka K, Tanaka J, Trung LQ, Takami A, Nakao S: A functional

polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. Sci Rep 6:39231, 2016. 査読有

DOI: 10.1038/srep39231

- Maruyama H, Katagiri T, Kashiwase K, Shiina T, Sato-Otsubo A, Zaimoku Y, Maruyama K, Hosokawa K, Ishiyama K, Yamazaki H, Inoko H, Ogawa S, Nakao S:

Clinical significance and origin of leukocytes that lack HLA-A allele expression in patients with acquired aplastic anemia. Exp Hematol 44:931-939 e933, 2016. 査読有

DOI: 10.1016/j.exphem.2016.05.013

[学会発表] (計 4 件)

- Yoshitaka Zaimoku, Shinji Nakao : Molecular and Clinical Advances in AAA and Stress Induced Marrow Dysfunction. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.
- Tatsuya Imi, Shinji Nakao. HLA Class I Allele-Lacking Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Support Long-Term Clonal Hematopoiesis without Oncogenic Driver Mutations in Acquired Aplastic Anemia. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.
- Noriharu Nakagawa, Shinji Nakao: Relatively Low Sensitivity of CD109(-)

Hematopoietic Stem/Progenitor Cells (HSPCs) to TGF- β : A Possible Mechanism Responsible for the Preferential Commitment of *Piga* Mutant HSPCs in Immune-Mediated Bone Marrow Failure. The 58th ASH Annual Meeting & Exposition, December 5, 2016, San Diego USA.

4. Luis Espinoza, Shinji Nakao: Generation of IPS Cell-Derived Hematopoietic Progenitor Cells from Patients with Acquired Aplastic Anemia Harboring Copy Number Neutral Loss of Heterozygosity of the Short Arm of Chromosome 6. The 57th ASH Annual Meeting & Exposition, December 6, 2015, Orlando, FL USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中尾 眞二 (NAKAO, Shinji)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：70217660

(2)連携研究者

吉田 善紀 (Yoshida, Yoshinori)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：20447965

西内 巧 (Nishiuchi, Takumi)
金沢大学・学際科学実験センター・准教授
研究者番号：20334790