

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09962

研究課題名（和文）ヒト造血幹細胞支持因子の同定と支持機構の解明

研究課題名（英文）Identification of human hematopoietic stem cell supporting factors

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：当該研究期間において報告者は、ヒト造血幹細胞と造血幹細胞支持能を有するヒト骨髓由来間質細胞との共培養系を用いて、その支持効果に対する阻害活性を有する抗体のスクリーニングを行った。スクリーニングには、報告者が独自に樹立したヒト臍帯血由来造血幹細胞分画に結合性を有する抗体群を用いた。その結果、ヒト骨髓間質細胞による造血幹細胞支持能に対する阻害活性を有する候補抗体を数個見出すことに成功した。現在、これらの抗体が認識する抗原の同定を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だ明らかになっていない骨髓ニッチにおけるヒト造血幹細胞の支持機構の解明を目的とし行った。本研究期間においては、ヒト骨髓由来間質細胞による支持能を打ち消す効果を有する抗体を複数個見出すことに成功した。このことから、骨髓ニッチによる造血幹細胞の支持は複数のシグナルにより制御されている可能性が考えられた。これは、今後、造血幹細胞の体外増幅を実現するにあたり、複数の因子を制御する必要があることを示唆する重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：During the research period, I screened blocking antibodies against the supporting effect of hematopoietic stem cell-supporting stromal cells using a co-culture system. For the screening, I used home-made antibody library which can react with human cord blood-derived hematopoietic stem cell fraction. As a result, I succeeded in identifying several candidate antibodies possessing blocking effect on the ability of human bone marrow stromal cells to support hematopoietic stem cells. Currently, the identification of antigens recognized by these antibodies is in progress.

研究分野：細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 造血幹細胞支持因子 自己複製

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(hematopoietic stem cell; 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。哺乳類において、HSC は骨髄ニッチ内でその未分化性を維持している(図1)。現在までに、マウスでは血管内皮細胞、CXCL-12 abundant reticular cell、nestin 陽性間葉系幹細胞等がニッチとして働いていることが報告されていた。しかしながら、これらの細胞に共通する HSC 支持機構は明らかになっていない。また、ヒトでは骨髄内で HSC が維持されていることは確かであるが、どのような細胞がニッチとして機能しているかも全く明らかになっていなかった。報告者は、すでに、ヒト骨髄よりヒト造血幹細胞支持能を有する間質細胞(DP-MSC)の単離に成功しており、この DP-MSC はヒト骨髄ニッチによる造血幹細胞支持機構を解明するのに有用な細胞資源であることが考えられた。

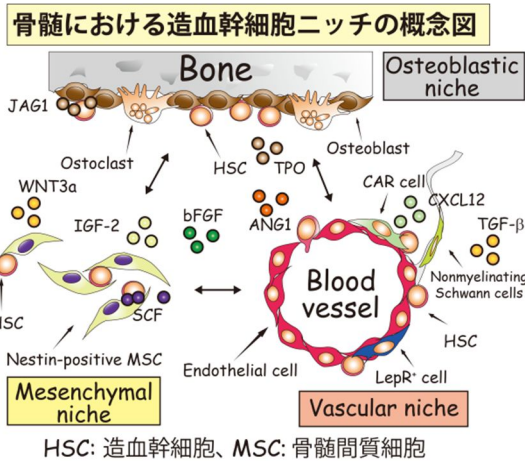


図 1: 骨髄ニッチの概念図。多くの種類の細胞が、造血幹細胞の支持に働いている。本研究では、この中から、mesenchymal niche に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、上述の DP-MSC と報告者が独自に作製したヒト造血幹細胞分画に結合性を有する抗体ライブラリーを用いることで、ヒト造血幹細胞支持因子を同定し、骨髄ニッチによるヒト造血幹細胞支持機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト HSC に特異的な結合を示す抗体のスクリーニング
報告者により樹立済みの約 500 クローンからなるヒト HSC に対する結合性を有する抗体ライブラリーの中から、よりヒト HSC に対する結合特異性の高いクローンのスクリーニングを行った。その後、これらの抗体を DP-MSC とヒト HSC の共培養系に添加し、その HSC 支持能阻害活性を評価した(図 2)。

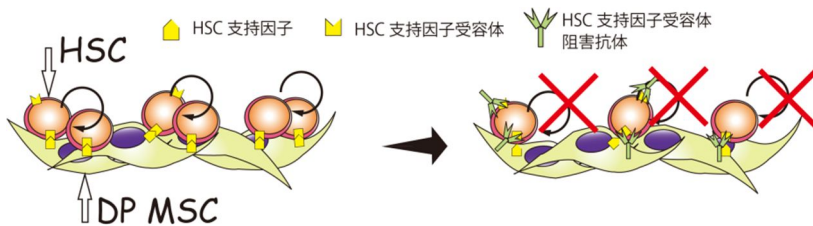


図 2: 本研究で行った HSC 支持因子阻害活性を有する抗体のスクリーニング方法の概念図。

(2) ヒト HSC 特異的な結合性を有する抗体の抗原の同定
上記の(1)により見出された候補抗体の抗原を同定するため、抗原の生化学的性質の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 最初に、ヒト臍帯血より比重遠心法により単核球分画を単離した後、個々の自家製抗体および CD34 抗体を用いた多重染色を行った。その後、フローサイトメーターにより自家製抗体陽性分画が、HSC が存在するとされている blast window 付近に集積する抗体を候補抗体とした。次いで、CD34 陽性分画が候補抗体により陽性および陰性分画に亜分画可能な抗体をスクリーニングした。その結果、9 つの抗体が上記の条件を満たすことを見出した。

(2) 9つの抗体の内、特に HSC 分画に高い結合特異性を示したクローン X およびクローン Y において dot blot により抗原の特性の解析を行った。最初に、十分なタンパク質の量を確保するため、クローン X および Y に対する抗原を高く発現している細胞株のスクリーニングを行った。その結果、クローン X 抗原は白血病由来細胞株である KG-1 細胞に、クローン Y 抗原は iPS 細胞から分化誘導により誘導した細胞種に高く発現していることが明らかとなった。次いで、各々の細胞より各試薬によりタンパク質を抽出し、その抗体認識部位の特性を解析した。その結果、クローン X および Y とともに SDS による抗原の可溶化後では抗原に対する結合性が失われることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuoka Yoshikazu, Nakamura Fumiaki, Hatanaka Kazuo, Fujioka Tatsuya, Otani Satoshi, Kimura Takafumi, Fujimura Yoshihiro, Asano Hiroaki, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 108
2. 論文標題 The number of CD34+CD133+ hematopoietic stem cells residing in umbilical cord blood (UCB) units is not correlated with the numbers of total nucleated cells and CD34+ cells: a possible new indicator for quality evaluation of UCB units	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 571 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2502-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松岡 由和、園田 精昭	4. 巻 28
2. 論文標題 ヒト臍帯血由来造血幹細胞の陽性分子マーカーとしてのGPI-80抗原の有用性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 サイトメトリーリサーチ	6. 最初と最後の頁 13 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.28.2_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sumide Keisuke, Matsuoka Yoshikazu, Kawamura Hiroshi, Nakatsuka Ryusuke, Fujioka Tatsuya, Asano Hiroaki, Takihara Yoshihiro, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04441-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka Yoshikazu, Sumide Keisuke, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 15
2. 論文標題 One-Year Observation of the SCID-Repopulating Cell Activities of Human Cord Blood-Derived CD34-Positive and -Negative Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 459 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-019-09884-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Tomoyuki, Matsuoka Yoshikazu, Nagao Yoshikazu, Sonoda Yoshiaki, Hanazono Yutaka	4. 巻 106
2. 論文標題 CD34-negative hematopoietic stem cells show distinct expression profiles of homing molecules that limit engraftment in mice and sheep	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 631 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2290-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Yoshikazu, Takahashi Masaya, Sumide Keisuke, Kawamura Hiroshi, Nakatsuka Ryusuke, Fujioka Tatsuya, Sonoda Yoshiaki	4. 巻 26
2. 論文標題 CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines a Novel Class of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3727/096368916X694201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松岡 由和、園田 精昭	4. 巻 27
2. 論文標題 ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞におけるMPL発現の機能的意義	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 サイトメトリーリサーチ	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.2_31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松岡由和, 中塚隆介, 藤岡龍哉, 園田 精昭
2. 発表標題 イメージサイトメトリーと 機械学習による明視野像を用いた細胞の自動判別
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡由和, 藤岡龍哉
2. 発表標題 ヒトCD3 4 抗原は SCID-repopulating cellの 生着に必須ではない
3. 学会等名 第81回日本血液学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡由和、園田精昭
2. 発表標題 ニッチ機能を持つヒト骨髓間質細胞による造血幹細胞支持機構の解析
3. 学会等名 第28回日本サイトメトリー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由和、角出啓輔、中塚隆介、藤岡 龍哉、園田精昭
2. 発表標題 重症免疫不全マウスにおける継代移植を用いないヒト造血幹細胞活性の長期解析
3. 学会等名 第28回日本サイトメトリー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由和
2. 発表標題 Automatic discrimination system for hematopoietic tumor-derived cell lines using Machine Learning
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由和, 中塚隆介, 藤岡龍哉
2. 発表標題 機械学習による血球細胞の自動判別システム
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由和, 角出啓輔, 中塚隆介, 白水泰昌, 藤岡龍哉, 園田精昭, 服部文幸, 人見浩史
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたヒト造血幹細胞におけるCD34抗原の発現意義の解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡由和, 藤岡龍哉, 角出啓輔, 浅野弘明, 大谷智司, 木村貴文, 藤村吉博, 畑中一生, 中村文明, 園田精昭
2. 発表標題 CD34+CD133+造血幹細胞数の定量と移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発
3. 学会等名 第40回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角出啓輔, 松岡由和, 中塚隆介, 河村 孟, 藤岡龍哉, 園田精昭
2. 発表標題 単一細胞解析による純化ヒト臍帯血由来CD34抗原陰性造血幹細胞の特性解明と新たな階層制モデルの提唱
3. 学会等名 第40回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡由和, 藤岡龍哉, 角出啓輔, 畑中一生, 中村文明, 大谷智司, 木村貴史, 浅野弘明, 藺田精昭
2. 発表標題 20 CD133抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発 -HSC数の計測と臍帯血移植への応用-
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松岡由和、角出啓輔、河村 孟、中塚隆介、白水泰昌、藤岡龍哉、藺田精昭
2. 発表標題 GPI-80抗原はヒト臍帯血由来CD34抗原陰性造血幹細胞の新規濃縮/純化マーカーである
3. 学会等名 第27回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----