

平成21年 6 月 9 日現在

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2007~2008

課題番号: 19591257

研究課題名(和文) ヒト造血幹細胞の加齢に関する研究—造血幹細胞の年齢測定法の確立—

研究課題名(英文) Aging of human hematopoietic stem cells

- Establishment of aging evaluation method of hematopoietic stem cell-

研究代表者

河野 嘉文(KAWANO YOSHIFUMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20260680

研究成果の概要:

ヒト造血幹細胞のテロメア長は経年的な漸減傾向を示さないため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活性酸素種は実際の造血幹細胞移植によって短期的には変動しないことを確認した。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。

交付額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 小児血液腫瘍学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・小児科学

キーワード: ヒト造血幹細胞、造血細胞移植術、細胞加齢、活性酸素種、加齢マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄移植や末梢血幹細胞移植などの造血幹細胞移植術が日常診療の一つとして実施されている。骨髄移植として30年前に開発された当初は、年齢が近いHLA一致同胞からの提供を受けていたが、最近では免疫抑制方法の進歩によって骨髄バンクを介しての非血縁間移植の成績が向上し、従来は不可能と考えられて

きた親子間移植も実施されている。これらのドナーは成人なので、小児患者にとっては自分より高齢のドナー細胞を移植されることになる。他の臓器移植と異なり、造血細胞移植術後は免疫抑制剤が中止でき、QOLが高い完全社会復帰が果たせる。移植後数十年にわたって生活する“元患者”にとって、新しい造血組織がいつまで機能できるかについて関心が

高まってきている。

単純に他人から細胞が移植されるだけでなく、移植細胞には、吸引採取操作、加重遠心操作、凍結融解操作などのストレスが負荷される。これらの操作が移植細胞に与える影響も考慮されなければならない。高齢者に発生する骨髄異形成症候群や各種白血病は、一種の加齢現象と考えられており、寿命が短い造血幹細胞（老齢化した幹細胞）を移植した小児では、移植後数年から数十年の間に造血機能が失われたり、癌化する可能性も否定できない。

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、テロメラーゼ活性、活性酸素種 (ROS) の細胞内蓄積、 $p16^{INK4a}$  mRNA の増加、などが報告されてきた。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。

## 2. 研究の目的

本研究では、小児から成人に至るまでの造血幹細胞の加齢現象を追跡し、ヒトの暦年齢と造血幹細胞の細胞年齢の違いを検討することを目的とした。さらに造血細胞移植術そのものによる細胞の変化を観察し、新しい環境での加齢速度を観察する。最終的にヒト造血幹細胞の加齢機能評価方法を確立し、移植細胞としての骨髄バンク（年長者からの提供）や臍帯血バンク（凍結保存細胞の提供）からの細胞提供の是非を検討できることを目指す。

## 3. 研究の方法

造血幹細胞移植前後で造血幹細胞内の活性酸素を測定することにより、マウスモデルのように細胞内の活性酸素は増加するかどうかを評価した。

当科で家族をドナーとして造血幹細胞移植術を施行した7人の小児患者を対象とする。患者年齢は中央値で14歳（10-18歳）、ドナー年齢は中央値で18.5歳（17-20）。

(1)細胞；細胞は造血幹細胞移植前の骨髄細胞と造血幹細胞移植後30日目の骨髄細胞を対象とした。

(2)キメラ分析；造血幹細胞移植後30日目の骨髄細胞からDNAを抽出し、PCR法でキメラ分析を行った。STR用のマーカーとしてAPO-A11、vWF、ACTBP-2を使用した。PCR産物は2%アガロースゲルで観察した。

(3)CD34細胞の純化；骨髄単核球を分離し、CD34 Progenitor Isolation Kit と MiniMACS magnetic separation device (Miltenyi Biotec社, Bergisch Gladbach, Germany)を使用してCD34陽性細胞を純化した。CD34陽性細胞の純度はFACSscan and CellQuest software (Becton Dickinson社)を使用して確認した。

(4)細胞内活性酸素；細胞内の活性酸素はdichlorofluorescein (DCFH)を用いた。DCFHは細胞内に取り込まれ細胞内の活性酸素により蛍光を発するdichlorofluorescein (DCF)に変化する。純化したCD34陽性細胞をDCFHとCsAで37℃でインキュベートして、DCFの蛍光レベルをFACSscanで測定し、CellQuest softwareで解析した。

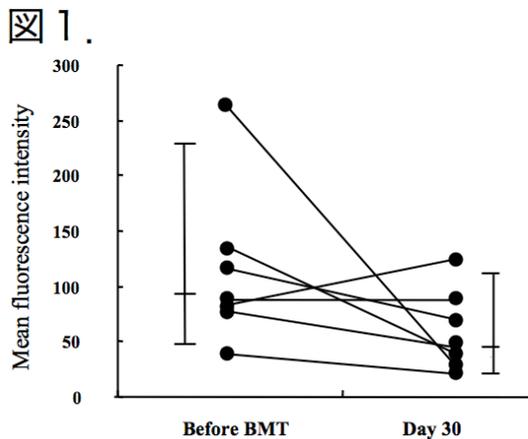
(5)統計；t-testで評価した。P<0.05で有意とした。

## 4. 研究成果

ヒト細胞のテロメア長は経年的な漸減傾向を示さないため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、 $p16^{INK4a}$  mRNAはヒト正常造血幹細胞での発現はきわ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。マウスとヒトの造血幹細胞純化に使用される抗体は異なり、対象となる細胞の分化過程に大きな違いあることが原因と考えられた。個々の細胞の加齢（老化）を検討しようする方法の限界であった。

移植ドナーの骨髄中にある造血幹細胞は実際に移植された30日後に患者骨髄から採取して調べても、細胞移植術を施行したドナー細胞内の活性酸素濃度は変化しなかった（図1）。



われわれの予測に反して、マウスモデルのように造血幹細胞移植後30日目の細胞内活性酸素は上昇しなかった。造血幹細胞内の活性酸素は造血幹細胞内での分化度と相関すると Jang YY らは報告している。つまりより未熟な造血幹細胞は活性酸素が低く、分化した成熟傾向にある造血幹細胞では活性酸素が高い。これが造血幹細胞移植においては、移植後早期において未熟な分化度の低い造血幹細胞が多いことで、細胞内活性酸素が低かった可能性がある。

以上の結果から、今後はヒト造血幹細胞 (CD34 or CD133 陽性細胞) 内の各種転写因子 mRNA 発現量と細胞表面マーカーから細胞分化を解析し、個々の細胞の評価ではなく造

血細胞集団としての加齢（老化）現象を掌握する方法を確立し、実際に移植した患者体内での造血細胞分画の加齢（老化）現象の推移を分析する。

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 4 件)

1. Nishikawa Takuro, Kawakami, Kiyoshi, Kumamoto, Takashi, Tonooka, Shiro, Abe Akiko, Hayasaka, Kiyoshi, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi: Severe Neurotoxicities in a Case of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2 Caused by Vincristine for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 30:519-521, 2008. ~
2. Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells*, 26:3237-3246, 2008
3. Inagaki J, Nagatoshi Y, Kawano Y, Saito Y, Takahashi D, Nagayama J, Shinkoda Y, Hirata H, Okamura J: Bone marrow transplantation in children with severe Aplastic anemia using a conditioning regimen containing 3 Gy of total body irradiation, cyclophosphamide with or without

- antilymphocyte globulin. *Pediatr Transplantation*, 11:180-186, 2007
4. Inagaki J, Nagatoshi Y, Kawano Y, Saito Y, Takahashi D, Nagayama J, Shinkoda Y, Hirata H, Okamura J: Bone marrow transplantation in children with severe Aplastic anemia using a conditioning regimen containing 3 Gy of total body irradiation, cyclophosphamide with or without antilymphocyte globulin. *Pediatr Transplantation*, 11:180-186, 2007

[学会発表] (計 1 件)

Yuichi Kodama, Yasuhiro Okamoto, Takuro Nishikawa, Yuichi Shinkoda, Takayuki Tanabe, Yoshifumi Kawano: Reactive Oxygen Species in Human Bone Marrow CD34-positive Cells at Day 30 post-Bone Marrow Transplantation were not Increased Compared to those in Grafts at Donation. Keystone Symposia: Stem cells, cancer, and aging, Singapore, November 29- October 4, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：20260680

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

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

平尾 敦 (HIRAO ATSUSHI)  
金沢大学・がん研究所・教授  
研究者番号：90343350