

機関番号：34417

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591158

研究課題名 (和文) 骨髄内直接移植法を用いた新規マウス造血幹細胞の同定とその幹細胞特性の解明

研究課題名 (英文) Exploration for novel murine hematopoietic stem cells by the use of intra-bone marrow injection methods

研究代表者

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：80425066

研究成果の概要 (和文)：高効率の骨髄生着を可能とする骨髄腔内移植 (IBMI) 法を用い、マウス骨髄造血幹細胞 (HSC) が、c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻ (KSL) 分画外にも存在するかどうか検討した。c-kit 陰性分画 (c-kit⁻Sca-1⁺Lin⁻) 細胞移植では、IBMI 法を用いても、骨髄長期生着を再現性良く認めることはなかった。しかし極まれに長期造血再構築が認められるケースがあり、c-kit 陰性分画には、極めて低頻度あるいは低効率で骨髄生着する HSC の含まれる可能性が残った。一方 c-kit^{low} 分画には、低頻度ではあるが HSC の存在を認め、その特性を検討した。

研究成果の概要 (英文)：Intra-bone marrow injection (IBMI) is a powerful method that enables highly efficient hematopoietic stem cell (HSC) engraftment in recipients' bone marrow. Using this method, novel HSCs that are not included in the c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻ (KSL) compartment are explored. IBMI did not detect reproducibly the HSC activity in c-kit⁻Sca-1⁺Lin⁻ fraction, although in some rare cases, long-term hematopoietic reconstitution was observed in the fraction. Therefore, possibility remains that very rare HSCs exist in c-kit⁻ fraction. On the other hand, c-kit^{low} fraction was proved to contain HSCs in low frequency. These HSCs were characterized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、骨髄内移植、c-kit、移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

成体マウス骨髄に由来する HSC は、その殆んど全てが KSL の細胞表面形質を有すると考えられている。KSL 分画の外にも HSC が存在するかどうか、明確な結論は出されていない。ただし、c-kit 陰性分画については、HSC が存在する、あるいは存在しないという、相矛盾する幾つかの報告がなされている。果して

c-kit 陰性 HSC は存在しないのか、あるいは、技術的問題によって検出されていないのか、検討が待たれていた。

一方ヒト CD34⁺Lin⁻細胞は強い SRC 活性を有するにも拘らず、経尾静脈移植 (TVI) 法では十分な骨髄生着を示さず、IBMI 法を用いることにより初めて、生着する。さらに CD34⁺Lin⁻細胞には c-kit が検出されない

(Blood 101:2924, 2003、Stem Cells 25:1348, 2007) ことから、マウス c-kit 陰性 HSC が存在すれば、ヒト CD34⁺Lin⁻ 細胞と良く似た細胞表面形質を有すると言える。

従って、c-kit 陰性 HSC が IBMI 法を用いることによって検出される可能性が考えられた。

2. 研究の目的

IBMI 法は、HSC の高効率骨髄生着を可能とする。KSL 以外のマウス骨髄細胞分画に HSC が存在すれば、従来の移植法である TVI 法では検出不能であっても、IBMI 法を用いれば検出できる可能性があると考え、KSL 分画以外の新規 HSC が存在するかどうか検討することを目的とした。

そして、新規 HSC が造血ヒエラルキーのいかなる位置に存在するか、KSL 細胞との関連性はどうか、具体的には、新規 HSC が HSC 活性を有する KSL 細胞を産生することが可能であるかどうか、検討することとした。さらに、新規 HSC の IBMI 依存的骨髄生着のメカニズムを検討すること、特に、c-kit、CXCR4 発現の有無、また、その機能的意義を検討することを予定した。

3. 研究の方法

(1) 標的細胞の採取と純化

成体 C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウスより骨髄を採取し、抗 Lin 精製抗体と免疫磁気ビーズを用い、Lin⁺ 細胞を除去、除去後細胞を蛍光抗体 (抗 Sca-1、抗 c-kit、残存抗 Lin 抗体に対する二次抗体)、および死細胞除去目的の 7AAD で染色する。次にセルソーター (FACS Aria) を用い、未分化造血細胞が濃縮されている Lin⁻7AAD⁻ 分画を Sca-1、c-kit 発現様式に基づき細分化し分取する。

(2) IBMI と TVI を用いる HSC 活性の検討

致死量 (8.75Gy) あるいは半致死量 (7Gy) 照射成体 C57BL/6 マウスを麻酔下に固定、26G ハミルトン針を用いて、1) で回収した細胞を脛骨骨髄腔に直接緩徐に注入する。必要に応じ、TVI にてサポート骨髄細胞を移植する。一部の実験では IBMI との比較のため、1) の細胞分画を TVI にて移植する。HSC 活性検討のため、移植後 20 週以上の期間、造血再構築を観察する。さらに二次骨髄移植を行い、その 3 ヶ月後に HSC 活性を確認する。

(3) HSC 分画の特性の検討

標的細胞中の HSC をフローサイトメトリーを用いて検討するため、標的細胞集団をさらに CD150 および CD48 を用いて分画し、その細胞周期あるいは転写因子活性を

Ki-67/7AAD あるいは pAKT、pS6、pSTAT5 染色性に基づき検討する。さらに、c-kit、p21、p27、p57 mRNA レベルを Real-time RT-PCR 法を用いて検討する。

(4) インビボにおける HSC の低酸素性および血液灌流の検討

マウスに 60 mg/kg の pimonidazole を投与し、30 分~90 分後に pimonidazole が取り込まれる低酸素状態にある標的細胞を検討する。また、マウスに Hoechst 33342 を血管内投与し、10 分後にこれに染色される標的細胞を検討する。

4. 研究成果

c-kit 陰性分画 (c-kit⁻Sca-1⁺Lin⁻) 細胞移植では、TVI 法、IBMI 法のいずれを用いても、骨髄長期生着を再現性良く認めることはなかった。しかし IBMI 法によって、極まれに長期造血再構築が認められるケースがあり、c-kit 陰性分画には、極めて低頻度あるいは低効率で骨髄生着する HSC の含まれる可能性が残った。一方、c-kit 弱陽性分画 (c-kit^{low}Sca-1⁺Lin⁻) 細胞移植では、TVI、IBMI いずれの手法を用いても KSL 分画に匹敵する HSC 活性が確認できた。またレシピエント骨髄中に KSL 細胞が新生されることを確認した。しかし c-kit^{low}HSC の存在頻度は、かなり低いと考えられた。従って c-kit 発現レベルと HSC の存在頻度は相関的であった (図 1)。

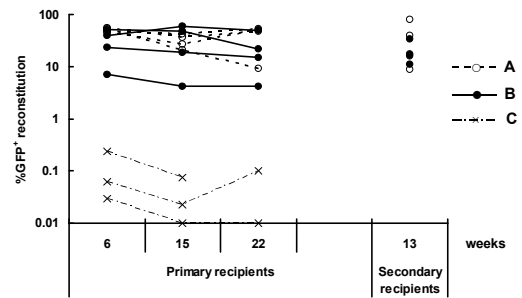


図 1: 長期造血再構築能の検討

致死量照射マウスに A: 500 KSL cells、B: 9,000 c-kit^{low}Sca-1⁺Lin⁻ cells、C: 50,000 c-kit^{low}Sca-1⁺Lin⁻ cells がそれぞれ 200,000 サポート骨髄細胞とともに TVI 法にて移植。

さて、c-kit^{low}HSC (CD150⁺CD48⁻c-kit^{low}Sca-1⁺Lin⁻) は、c-kit^{high}HSC (CD150⁺CD48⁻c-kit^{high}Sca-1⁺Lin⁻) と比べ、細胞周期 G0 の細胞が高度に濃縮された細胞集団であった (図 2)。特に、マウスの週齢が 30 週を上まわると、ほとんどの c-kit^{low}HSC は G0 期に存在し、細胞周期上は、ほぼ均一な集団とみな

すことが可能であった。これに対し $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC は、30 週齢以降においても G0 期細胞は 50%程度にとどまり、他の細胞周期に存在する細胞を包含していた (図 2)。

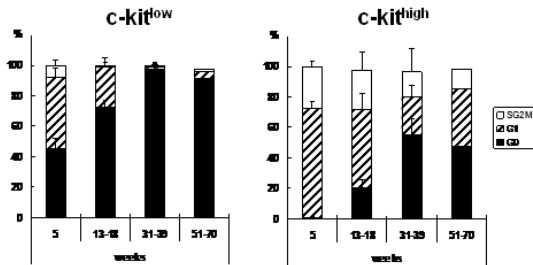


図 2: $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC および $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC の細胞周期

Ki-67/7AAD による 2 重染色により、 $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC および $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC の細胞周期上の分布を検討した。 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC は、G0 期に偏在することが明らかとなった。特に、週齢 30 週以降のマウスにおいてその傾向が顕著であった。

$c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC の $c\text{-kit}$ 発現レベルが低い理由を検討したところ、Real-time RT-PCR では、 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC と $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC と間に mRNA レベルの差は認められなかった (図 3)。また、細胞膜表面 $c\text{-kit}$ 受容体の、細胞内取り込みが原因である可能性も低いことを確認した。従って、 $c\text{-kit}$ の発現の低下は、転写後の何らかの調節によるものであると考えられた。なお、 $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC は、細胞周期抑制に働く p21 および p57 mRNA 発現が相対的に亢進しており、図 2 の細胞周期解析と矛盾しない結果であった。

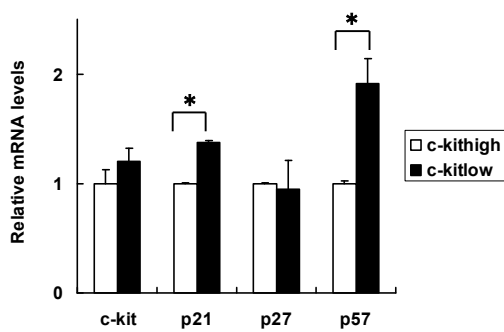


図 3: $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC および $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC の mRNA 解析

$c\text{-kit}$ mRNA 発現レベルにおいては、 $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC と $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC の間に有意差は認められない。一方、p21 および p57 mRNA は、有意差をもって $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC が高値であった。(* $p < 0.01$)

一方、 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC においては、pAKT、pS6、pSTAT5 のいずれも検出できなかったが、

$c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC においては pAKT のみ、一部の細胞に検出可能であった。このことは $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC が、より活動性の低い細胞集団であることを示唆するものである (図 4)。

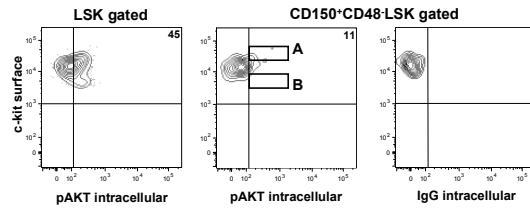


図 4: $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC の一部は pAKT 陽性である。

一部の $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC のみ pAKT 陽性であり、 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC は pAKT 陰性であった。

ニッチに存在する HSC は、一般的に長期間静止期にとどまると考えられている。このため、骨髄ニッチ存在 HSC のモデルとして考え、 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC の低酸素状態 (pimonidazole 染色性) および血流到達性 (Hoechst 33342 染色性) をインビボに検討した。その結果、 $c\text{-kit}^{\text{low}}$ HSC は $c\text{-kit}^{\text{high}}$ HSC と同等に低酸素状態にあり (pimonidazole 染色あり: 図 5A)、かつ容易に血流の接し得る (Hoechst 33342 染色あり) ことが明らかとなった (図 5B)。低酸素と低灌流が同一の事象ではないことが示唆された。

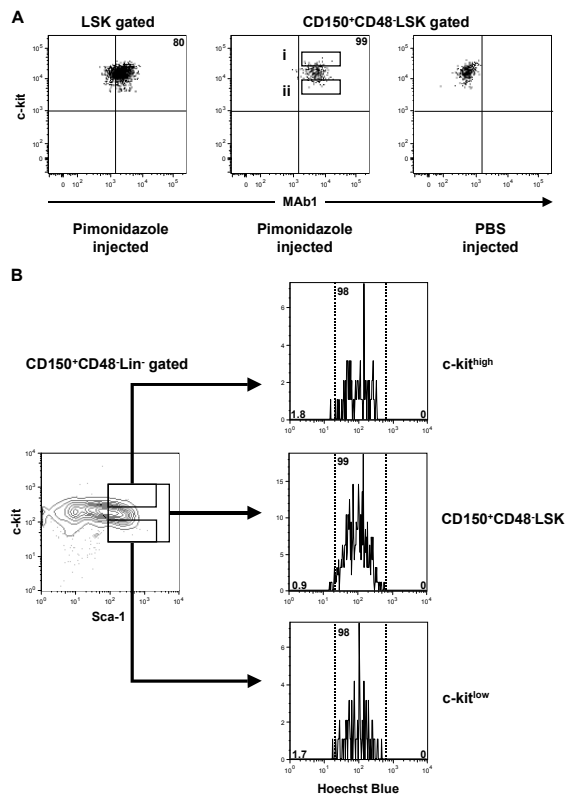


図 5 : A : c-kit^{low}HSC は c-kit^{hi}HSC と同等に pimonidazole 陽性(MAb1 陽性:低酸素状態)である。B : c-kit^{low}HSC は c-kit^{hi}HSC と同等に Hoechst33342 陽性(血液灌流あり)である。

HSC ニッチには、少なくとも 2 種類、つまり、骨内膜面に存在する骨芽細胞に近接し、骨髄内の類洞から離れている骨芽細胞性ニッチと類洞周囲内皮細胞からなる血管内皮性ニッチの存在が考えられている。その位置的特性から、骨芽細胞性ニッチは低酸素分圧、低灌流領域にあると考えられ、血管内皮性ニッチは、比較的酸素および血流に接し易いと推定されている。しかし、今回我々の得た知見は、HSC は低酸素状態にあっても血流に接し得ることを示すものであり、従来のニッチの概念に一石を投ずるものであると思われる。

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] (計 1 件)

- ① Sasaki Y, Matsuoka Y, Hase M, Toyohara T, Murakami M, Takahashi M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y: Marginal expression of CXCR4 on c-kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻ hematopoietic stem/progenitor cells. Int J Hematol、90、553-60、2009、査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐々木豊、松岡由和、中塚隆介、植村靖史、藪田精昭、c-kit 発現レベルに基づくマウス骨髄造血幹細胞分画の検討、第 72 回日本血液学会学術集会、2010.9.25 横浜(パシフィコ横浜)
- ② 松岡由和、佐々木豊、中塚隆介、植村靖史、藪田精昭、マウス骨髄由来 Lineage⁻Sca-1⁺c-kit^{low/-}細胞の造血幹(前駆)細胞特性の解明、第 71 回日本血液学会学術集会、2009.10.25 京都(国立京都国際会館)
- ③ 佐々木豊、松岡由和、豊原貴之、長谷真、中塚隆介、植村靖史、藪田精昭、マウス骨髄造血幹/前駆細胞は、CXCR4 低発現である、第 71 回日本血液学会学術集会、2009.10.25 京都(国立京都国際会館)
- ④ Sasaki Y, Matsuoka Y, Toyohara T, Hase M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y, Kinetics of CXCR4 expression on murine

steady state KSL cells、第 7 回幹細胞シンポジウム、2009.5.15 東京(泉ガーデンギャラリー)

- ⑤ 佐々木豊、松岡由和、長谷真、藪田精昭、マウス造血幹細胞に対する SDF-1 の作用機構の解析、第 18 回日本サイトメトリ学会学術集会、2008.6.28 東京(東京慈恵医科大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：80425066

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藪田 精昭 (SONODA YOSHIAKI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：60206688

長谷 真 (HASE MAKOTO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：50425203