

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08742

研究課題名（和文）ヒト造血幹細胞におけるCD34抗原の発現意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Significance of CD34 Antigen Expression in Human Hematopoietic Stem Cells

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト造血幹細胞(HSC)におけるCD34抗原の発現意義について解析を行った。具体的には、ヒト臍帯血由来CD34+ HSCよりCRISPR/Cas9を用いてCD34遺伝子をノックアウト(KO、以下CD34KO HSCとする)し、その造血幹細胞活性をin vitroおよびin vivoの両系で評価した。その結果、CD34+およびCD34KO HSCともに同等の骨髄再構築能と多分化能を有していることが明らかとなった。このことから、ヒトHSCにとってCD34抗原の発現は実験的に検出可能な範囲では、造血幹細胞活性に影響を与えないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在CD34抗原は、ヒト造血幹細胞のマーカーとして広く用いられているが、その機能的意義は明らかになっていない。本研究により、CD34抗原はヒト造血幹細胞に発現していてもしていなくてもその幹細胞としての性質に大きな差はない可能性が示唆された。この知見は、今後の造血幹細胞移植などのドナー選択の基準の策定等への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the significance of CD34 antigen expression in human hematopoietic stem cells (HSCs). Specifically, we knocked out the CD34 gene in CD34+ HSCs derived from human umbilical cord blood using CRISPR/Cas9, hereafter referred to as CD34KO HSCs, and evaluated their hematopoietic stem cell activity in both in vitro and in vivo systems. As a result, it became clear that both CD34+ and CD34KO HSCs possess equivalent bone marrow reconstruction and multi-differentiation abilities. From this, it was found that within the experimentally detectable range, the expression of the CD34 antigen does not affect the hematopoietic stem cell activity in human HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 CD34抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CD34 抗原はヒト造血幹細胞(HSC)のマーカーとして基礎研究から臨床に至るまで広く用いられている。特に、HSC 移植(HSCT)において CD34 陽性細胞数は移植用検体中の造血幹/前駆細胞数(HSPCs)を推定するための指標として重要視されている。現在まで、多くの研究グループにより HSC における CD34 抗原の機能的発現意義が調べられてきた。ヒト HSPCs においては CD34 抗原が、他の細胞との接着に働いていることも報告されているが、これらの研究を通して、ヒト HSC の未分化性の維持や幹細胞活性に関して CD34 抗原がどのような役割を果たしているのかは不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト HSC における CD34 抗原の発現意義とその機能の解明を目的とし行われた。

3. 研究の方法

最初にヒト臍帯血より HSC が 1/5 の頻度で濃縮される 18Lineage(Lin)<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>GPI-80<sup>+</sup>分画細胞( )をセルソーターにより分取した。次いで、この細胞に CD34 遺伝子のシグナルペプチド部分をターゲットとした crRNA を用いて gRNA を構築し、CRISPR/Cas9 システムにより CD34 遺伝子をノックアウトした(図 1)。CRISPR/Cas9 は HSC に高効率で導入可能な手法( )を用いて行った。対照群は crRNA を含まない RNP 導入群とした。RNP 導入後、HSC は我々がすでに報告しているヒト HSC 支持能を有する骨髄間質細胞(DP MSC、 )と 3 日間共培養した。次いで、細胞を回収した後、抗 CD34、抗 CD133 および抗 CD45 抗体で染色した。その後、セルソーターで CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>分画を回収し、この細胞を CD34KO HSC として後の実験に用いた。また、対照群より CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>分画を回収し CD34<sup>+</sup> HSC として同様に後の実験に用いた(図 1)。

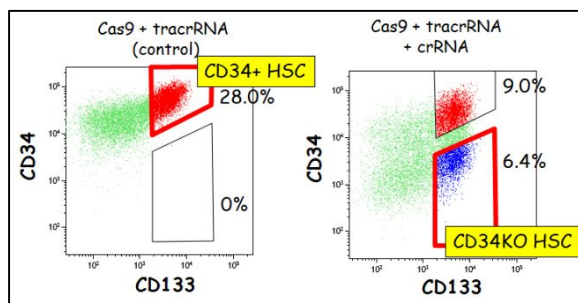


図 1: CD34<sup>+</sup> HSC と CD34KO HSC の単離方法。18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>GPI-80<sup>+</sup>細胞に CRISPR/Cas9 を導入した後、各細胞を回収した。(左)および(右)のプロット中の赤枠の分画細胞を回収し、それぞれ CD34<sup>+</sup>および CD34KO HSC とした。

また、CD34<sup>+</sup>および CD34KO HSC の準備段階での細胞分裂によるバイアスがないことを確認するため、両群における分裂回数をセルトレーサーダイを用いて確認した(図 2)。

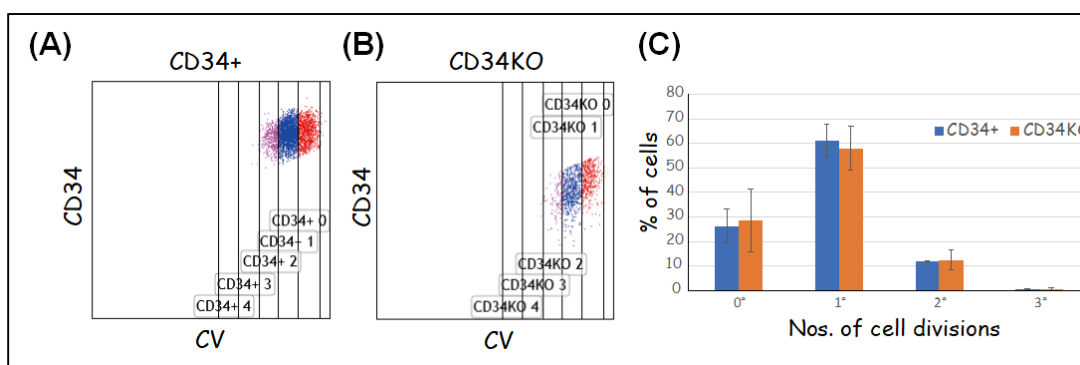


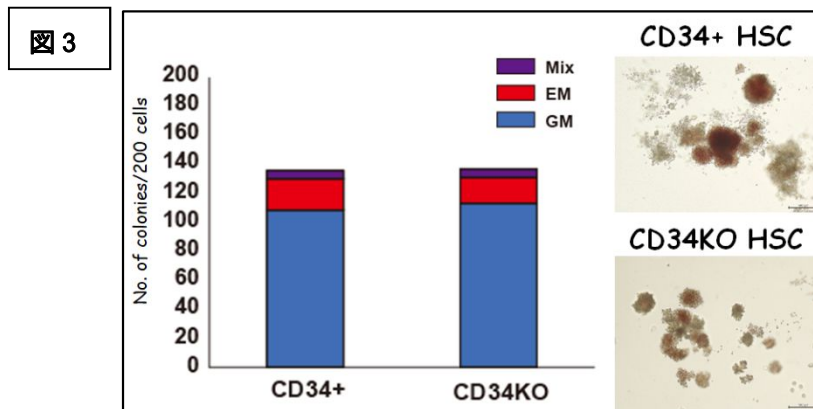
図 2: CRISPR/Cas9 導入 72 時間後における(A)CD34<sup>+</sup>および(B)CD34KO HSC の分裂回数の解析。(C)両群における分裂回数のまとめのグラフ。両群ともに分裂回数に有意な差は認められない。

これら、CD34<sup>+</sup> HSC および CD34KO HSC を用いて以下の実験によりその幹細胞活性を評価した。  
1) 半固形培地を用いたコロニー形成能試験(コロニーアッセイ)

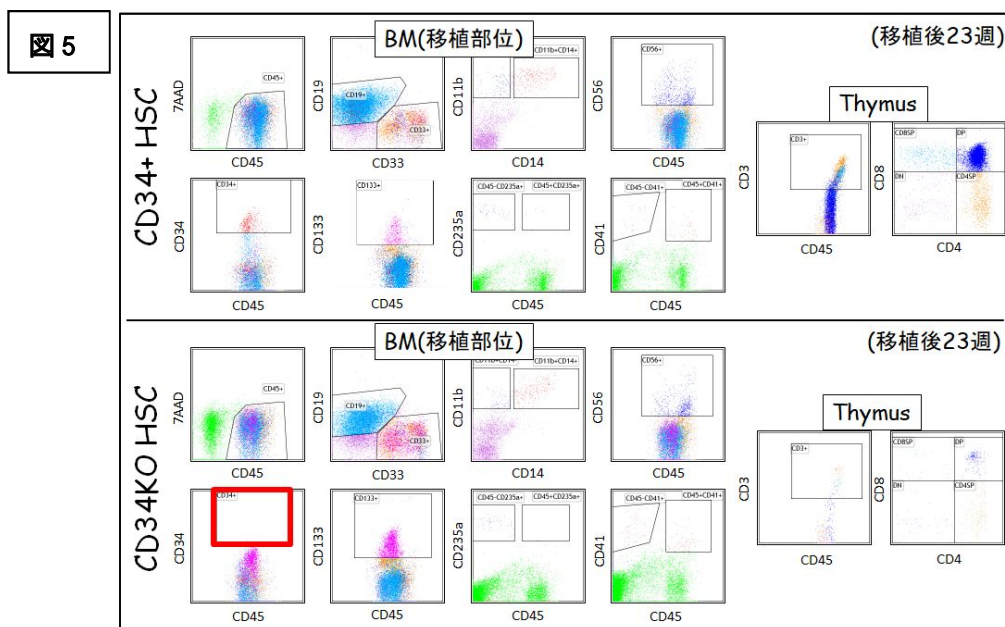
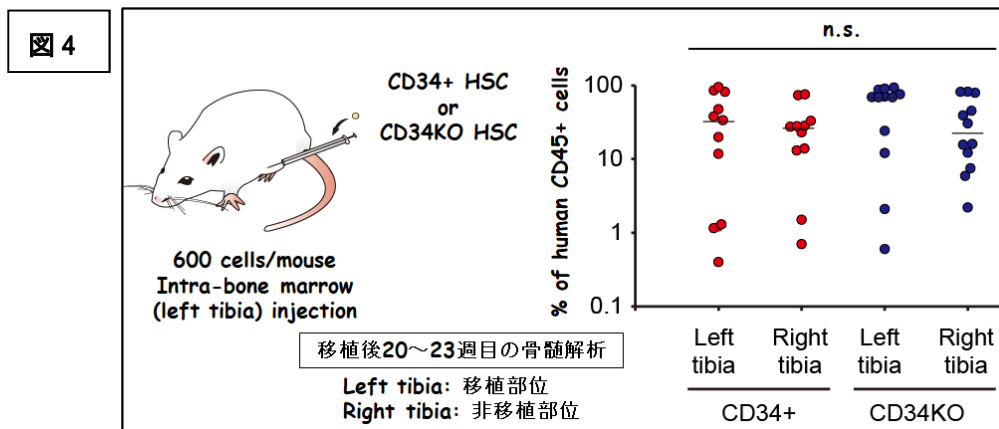
- 2) 重症免疫不全マウスへの異種間移植による長期骨髄再構築能の検討 (SRC アッセイ)
- 3) RNA-seq による遺伝子発現の比較解析
- 4) In vitro における T 細胞への分化能の比較
- 5) 機械学習による細胞の形態の比較解析

#### 4. 研究成果

1) コロニーアッセイにおいては CD34<sup>+</sup> HSC および CD34KO HSC とともに形成するコロニーの種類およびその数に有意な差は認められなかった。また、その形態に関しても大きな差は認められなかった (図 3)。

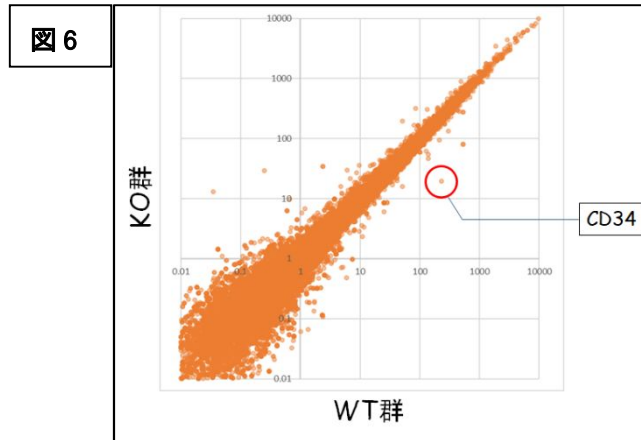


2) SRC アッセイにおいては、1 次マウスにおいて CD34<sup>+</sup> HSC と CD34KO HSC 移植群間でヒト CD45<sup>+</sup> 細胞の生着率に有意な差は認められなかった (図 4)。また、CD34KO HSC 移植群においも、非移植部位でのヒト CD45<sup>+</sup> 細胞の生着が認められた。両群ともに、多血球系統への分化能が認められた (図 5)。2 次マウスにおける長期生着解析においても有意な差は認められなかった。

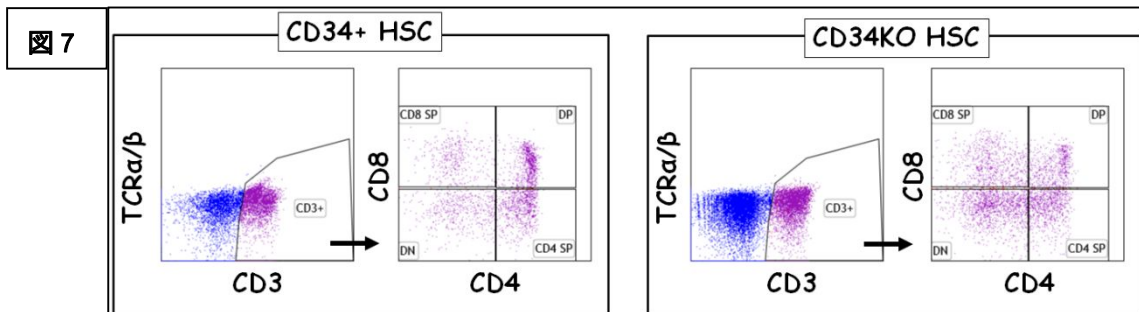


3) RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、CD34 を KO しても全体として大きな遺伝子発現変動

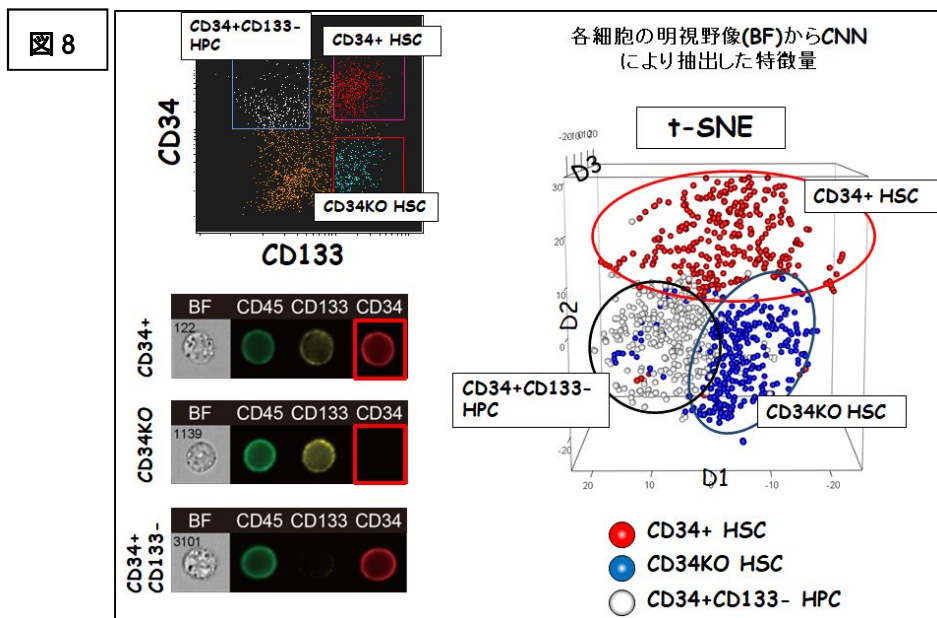
は認められなかった(図6)。特に HSC の未分化性維持や分化に係る遺伝子発現にスポットを当てて解析を行ったが、発現変動は認められなかった。



4) 異種間移植における T 細胞分化は個体差への依存が大きいため、定量的な評価が困難である。そこで、単一の CD34<sup>+</sup>および CD34KO HSC を用いて in vitro で T 細胞への分化能を評価した。その結果、両群に有意な差は認められなかった(図7)。



5) イメージングフローサイトメーターを用いて、CD34<sup>+</sup>および CD34KO HSC の画像の明視野像を取得し、深層学習(畳み込みニューラルネットワーク)により各分画細胞の形態の特徴量を抽出し、比較した。その結果、CD34KO HSC は CD34<sup>+</sup> HSC とは明確に異なる形態的特徴を有していることが明らかとなった(図8)



今回の検討において、ヒト HSC において CD34 抗原の発現の有無は HSC 活性に検出可能な範囲で影響を与えていないことが明らかとなった。しかしながら、CD34 抗原の発現が HSC から失われることで、その形態に何かしらの変化が起こることも分かった。本研究で行った検討は、異種間移植系を用いた 1 年程度の HSC 活性の評価であり、実際のヒトの寿命には遠く及ばない期間での評価でしかない。より長期においては、CD34 抗原の存在の有無が HSC 活性に影響を与える可能性は十分に考えられる。今後、より長期の観察が可能な評価系を構築し、その HSC 活性に与

える影響を詳細に解析する予定である。

<引用文献>

Okuno, Y., Iwasaki, H., Huettner, C.S., Radomska, H.S., Gonzalez, D.A., Tenen, D.G., and Akashi, K. (2002). Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 6246-6251. 10.1073/pnas.092027799.

Hu, M.C., and Chien, S.L. (1998). The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood* 91, 1152-1162.

AbuSamra, D.B., Aleisa, F.A., Al-Amoodi, A.S., Jalal Ahmed, H.M., Chin, C.J., Abuelela, A.F., Bergam, P., Sougrat, R., and Merzaban, J.S. (2017). Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Adv* 1, 2799-2816. 10.1182/bloodadvances.2017004317.

Sumide, K., Matsuoka, Y., Kawamura, H., Nakatsuka, R., Fujioka, T., Asano, H., Takihara, Y., and Sonoda, Y. (2018). A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells. *Nat Commun* 9, 2202. 10.1038/s41467-018-04441-z.

Gundry, M.C., Brunetti, L., Lin, A., Mayle, A.E., Kitano, A., Wagner, D., Hsu, J.I., Hoegenauer, K.A., Rooney, C.M., Goodell, M.A., et al. (2016). Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Reports* 17, 1453-1461. 10.1016/j.celrep.2016.09.092.

Matsuoka, Y., Nakatsuka, R., Sumide, K., Kawamura, H., Takahashi, M., Fujioka, T., Uemura, Y., Asano, H., Sasaki, Y., Inoue, M., et al. (2015). Prospectively Isolated Human Bone Marrow Cell-Derived MSCs Support Primitive Human CD34-Negative Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* 33, 1554-1565. 10.1002/stem.1941.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuoka Yoshikazu, Nakatsuka Ryusuke, Fujioka Tatsuya	4. 巻 34
2. 論文標題 Automatic discrimination of human hematopoietic tumor cell lines using a combination of imaging flow cytometry and convolutional neural network	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-021-00506-2	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	4. 巻 30
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytometry Research	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18947/cytometryresearch.30.1_15_19	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------