

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591251

研究課題名（和文） ヒト未分化 CD34 抗原陰性造血幹細胞の特性解明と再生医療への応用

研究課題名（英文） Characterization of human CD34-negative hematopoietic stem cells and their application for regenerative medicine

研究代表者

藺田 精昭（SONODA YOSHIKI）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60206688

研究成果の概要（和文）：われわれは骨髄内直接移植法を用いることにより、ヒト臍帯血中に世界で初めて非常に未分化な CD34 抗原陰性造血幹細胞（CD34-HSC）を同定した。加えて、18 種類の lineage 抗体を用いる CD34-HSC の高度純化法を開発し、ヒト HSC に特異的な陽性分子マーカーを同定した。また、NOG マウスを用いて CD34-HSC が CD34⁺CD38⁻HSC よりも未分化であることを示し、新たな階層制を提唱した。

研究成果の概要（英文）：We have identified human cord blood-derived very primitive CD34-negative hematopoietic stem cell (CD34-HSC) using the intra-bone marrow injection technique for the first time. In addition, we developed a high resolution purification method for CD34-HSC using 18 lineage-specific antibodies and succeeded to identify positive markers of CD34-HSC. Furthermore, we demonstrated that the CD34-HSC seemed to be more immature than the CD34⁺CD38⁻HSC. Based on these data, we propose a novel model of human HSC hierarchy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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、臍帯血、CD34 抗原、骨髄内移植法、重症免疫不全マウス、再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞（HSC）の本体の解明には、その完全な純化が不可欠であることはいうまでもない。マウスに関しては、Osawa らにより骨髄由来の 1 個の CD34⁺KSL (kit⁺Sca-1⁺Lin⁻) 細胞が致死量の放射線を照射したマウスの骨髄を再構築することから、ほぼ純化さ

れた HSC と考えられていた (Science, 1996)。一方、ヒト HSC に関しては、その陽性マーカーが明らかにされていないことと、測定法の限界もあって十分に明らかにされていなかった。ヒト未分化 HSC の測定法としては、重症免疫不全マウス (NOD/SCID, NOG) を用いる異種間移植系が開発されたことにより、ヒ

ト長期骨髄再構築細胞 (LTR-HSC) と考えられる SCID-repopulating cell (SRC) の測定が可能になった。本法を用いることにより、CD34⁺ SRC の幹細胞特性やその heterogeneity が次第に明らかにされつつあった。しかし、SRC の生物学的特性には不明の点が多く、その可塑性に関しては明らかにされていない。

われわれは、独自に開発した骨髄腔内直接移植 (Intra-bone marrow injection, IBMI) 法を用いることにより、ヒト臍帯血中に CD34⁺ SRC が存在することを世界で初めて直接的に証明した (Blood 101:2924, 2003)。しかしながら、このヒト CD34⁺ SRC の純化レベルは 1/25,000 と低く、更なる純化法の開発と幹細胞特性の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

IBMI 法でのみ同定可能なヒト臍帯血由来 CD34⁺ SRC (HSC) の幹細胞特性を明らかにすることにより、近い将来により効率的な造血幹細胞移植療法を開発・確立し、再生医療に应用することである。

3. 研究の方法

既報 (Blood101:2924, 2003) に従って、ヒト臍帯血由来単核細胞より、8 種類の抗体と免疫磁気ビーズを用いて分化抗原陰性 (Lin⁻) 細胞を得る。この細胞を 7AAD、18 種類の抗 lineage 抗体、抗 CD34 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD45 抗体で 5 重染色し、FACSAria を用いて Lin⁻CD45⁺CD34^{high/-} 及び Lin⁻CD45⁺CD34^{high}CD38^{+/+} 細胞を分取した。

SCID-repopulating cell (SRC) の測定方法は既報の方法を一部改変 (Blood 101:2924, 2003; Int J Hematol 79:328, 2004) して行った。予め 2.5Gy の放射線照射を行なった 7~8 週齢の雌 NOD/SCID (あるいは NOG) マ

ウスの左脛骨に純化した細胞分画を IBMI 法で移植した。移植 5~24 週間後まで、マウスを経時的に犠牲死させて骨髄、末梢血、脾臓、胸腺などを採取し、抗ヒト CD45 抗体で染色後に FACSCanto で解析した。同時に、抗ヒト CD14, CD33, CD34, CD19, CD3, CD4, CD8, CD41, CD235a などに対するモノクローナル抗体で染色し multilineage 解析も行った。

また、自己複製能の指標として、移植後 24 週目に一次マウスの骨髄を採取して、二次マウス (NOD/SCID あるいは NOG) に移植し、12~24 週後にマウスを経時的に犠牲死させて骨髄、末梢血、脾臓、胸腺などを採取し、抗ヒト CD45 抗体で染色後に FACSCanto で解析した。

次に、骨髄移植の際に使用されるフィルターバッグより回収したヒト骨髄を用いて間葉系幹細胞 (MSC) の予期的分離を行った。抗 CD271 抗体、抗 SSEA-4 抗体を用いて骨髄細胞を重分画し、各分画より MSC の樹立を試みた。その後、樹立した、MSC を用いて、18Lin-CD34^{+/+}細胞との共培養系、NOG マウスを用いる異種間移植系における SRC 活性、各分画に発現している HSC/niche 関連遺伝子の発現について検討した。

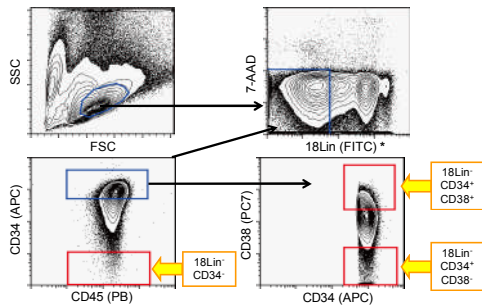
最後に、ヒト臍帯血由来 18Lin-CD34⁻細胞の陽性分子マーカーについて、既知の分子・抗原に対する抗体を用いて網羅的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) CD34⁻ SRC (HSC) の高度純化法の開発

われわれは 18 種類の抗 lineage 抗体を用いることにより、ヒト臍帯血由来の未分化 HSC である CD34⁻ SRC の新たな高度純化法の開発に成功した (Exp Hematol 39:203, 2011) (図 1)。

(図1) CD34-HSC の高度純化法

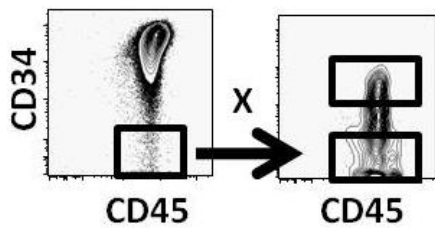


本法を用いて、CD34⁺SRC を 1/1,000 の頻度 (従来法 1/25,000 の 25 倍) まで高度に濃縮純化することに成功している。

(2) CD34-HSC の陽性分子マーカーの同定

本高度純化法を用いて、ヒト臍帯血由来 18Lin-CD34⁺細胞の陽性分子マーカーについて、既知の分子・抗原に対する抗体を用いて網羅的な解析を行った。その結果、有望な分子マーカーXを同定した (図2)。現在、この分子マーカーXを用いてCD34-HSCの幹細胞特性のさらなる解明を進めている。

(図2) 18Lin-CD34⁺細胞における分子Xの発現

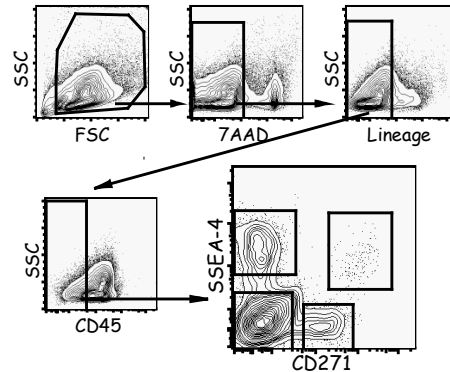


(3) ヒト未分化 HSC を支持するヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の樹立

MSC と HSC の密接な相互作用が報告されている。しかし、HSC の生存を支持するニッチとしての MSC の作用 (生存・維持・増殖分化における役割) は十分明らかにされていない。われわれは、ヒト骨髄由来 Lin⁻CD45⁻細胞より、抗 CD271 及び抗 SSEA-4 抗体を用いることにより、3 種類の MSCs を予期的に分離すること

に成功している (Blood 116:1575, 2010、投稿中)。

(図2) 骨髄細胞よりの MSC の予期的分離



中でも、CD271⁺SSEA-4⁺細胞より樹立した DP MSC は、in vitro 共培養系で高い CD34-SRC 支持能を示した。加えて、CD34-SRC が、従来最も未分化なヒト HSC と考えられていた CD34⁺CD38⁻CD90⁺SRC を本共培養系で産生することを明らかにしている (投稿準備中)。

以上の研究成果より、CD34-SRC は、CD34⁺CD38⁻CD90⁺SRC に比べてより未分化な (hierarchy 上より上位の) HSC であることが示唆された。

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 9 件)

1. Matsuoka Y, Sasaki Y, Nakatsuka R, Takahashi M, Iwaki R, Uemura Y, Sonoda Y: The low level of c-kit expression marks deeply quiescent murine hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 29:1783-1791, 2011. (査読有り)
2. Kimura T, Kohno H, Matsuoka Y, Murakami M, Nakatsuka R, Hase H, Yasuda K, Uemura Y, Sasaki Y, Fukuhara S, Sonoda Y: CXCL8 enhances the angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial

- cells in vitro. *Cell Biol Int* 35:201-208, 2011. (査読有り)
3. Ishii M, Matsuoka Y, Sasaki Y, Nakatsuka R, Takahashi M, Nakamoto T, Yasuda K, Matsui K, Asano H, Uemura Y, Fukuhara S, Sonoda Y: Development of a high resolution purification method for precise functional characterization of primitive human cord blood-derived CD34-negative SCID-repopulating cells. *Exp Hematol* 39:203-213, 2011. (査読有り)
 4. Kimura T, Kohno H, Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sasaki Y, Fukuhara S, Sonoda Y: CD16 antigen is a positive marker of peripheral blood-derived early endothelial progenitor cells. *Int J Hematol* 93:123-125, 2011. (査読有り)
 5. Nakatsuka R, Nozaki T, Uemura Y, Matsuoka Y, Sasaki Y, Shinohara M, Ohura K, Sonoda Y: 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol* 55:350-357, 2010. (査読有り)
 6. 藺田精昭: ヒト未分化CD34抗原陰性造血幹細胞の純化とその幹細胞特性。血液・腫瘍科 61:224-232, 2010. (査読無し)
 7. Kimura T, Matsuoka Y, Murakami M, Kimura T, Takahashi M, Nakamoto T, Yasuda K, Matsui K, Kobayashi K, Imai S, Asano H, Nakatsuka R, Uemura Y, Sasaki Y, Sonoda Y: *In vivo* dynamics of human cord blood-derived CD34⁻ SCID⁻ repopulating cells using intra-bone marrow injection. *Leukemia* 24:162-168, 2010. (査読有り)
 8. 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* 90:553-560, 2009. (査読有り)
- [学会発表] (計 31件)
1. Sonoda Y: A novel model of human hematopoietic stem cell hierarchy. The 34th Annual Meeting of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Presidential Symposium, Osaka, February 24, 2012.
 2. 松岡由和、高橋雅也、岩城隆二、佐々木豊、中塚隆介、河野比良夫、植村靖史、井上雅美、小川啓恭、高橋隆幸、石川 淳、日野雅之、藺田精昭: ヒト造血幹細胞支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞の予期的分離。第 34 回日本サイトメトリー学会ワークショップ、大阪、平成 24 年 2 月 24 日。
 3. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藺田精昭: マウス組織に由来する間葉系幹細胞と歯髄幹細胞機能比較～ヒト造血幹細胞の in vitro 支持能に関して、第 34 回日本造血細胞移植学会総会、大阪、2012 年 2 月 25 日。
 4. 佐々木豊: 造血幹細胞とニッチ。第 34 回日本造血細胞移植学会総会、教育講演、大阪、2012 年 2 月 25 日。
 5. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藺田精昭: マウス切歯由来歯髄幹細胞によるヒト造血幹細胞の in vitro 支持能の検討。第 73 回日本血液学会総会、名古屋、2011 年 10 月 14 日。
 6. 藺田精昭: 新しいヒト造血幹細胞の分化経路・階級性の提唱。第 64 回大阪血液疾患談話会、特別講演、大阪、平成 23 年 7 月 2 日。
 7. 佐々木豊、松岡由和、中塚隆介、高橋雅也、岩城隆二、植村靖史、藺田精昭: マウス骨髄造血幹細胞分画における c-kit 発現レベルの検討。第 21 回日本サイト

- メトリー学会、京都、平成 23 年 6 月 26 日。
8. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藪田精昭：歯形成端に存在する新規マウス歯髄幹細胞の予期的分離と特性解明。第 21 回日本サイトメトリー学会、京都、平成 23 年 6 月 26 日。
 9. 松岡由和、佐々木豊、藪田精昭：ヒト造血幹細胞支持能を有するヒト骨髄由来間葉系幹細胞の予期的分離。第 21 回日本サイトメトリー学会会長シンポジウム、京都、平成 23 年 6 月 25 日。
 10. Sonoda Y.: Identification and functional characterization of human primitive CD34-negative hematopoietic stem cells: Proposal of novel model of human hematopoietic cell hierarchy. *1st Baltic Stem Cell Meeting*. Szczecin, Poland, May 28, 2011. (招待講演)
 11. Nakatsuka R, Matsuoka Y., Takahashi M, Iwaki R, Sasaki Y., Sonoda Y.: Hypoxic culture condition facilitate the proliferation and differentiation potentials of mouse dental pulp stem cells. The 9th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, May 14, 2011.
 12. Sasaki Y., Matsuoka Y., Takahashi M, Iwaki R, Nakatsuka R, Sonoda Y.: Dynamics of the expression of CXCR4 on murine hematopoietic stem/progenitor cells. The 9th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, May 14, 2011.
 13. 松岡由和、佐々木豊、高橋雅也、岩城隆二、中塚隆介、井上雅美、小川啓恭、高橋隆幸、石川淳、日野雅之、藪田精昭：未分化造血幹細胞の支持能を持つヒト骨髄由来間葉系幹細胞の予期的分離とその機能解析。第 33 回日本造血細胞移植学会、松山、平成 23 年 3 月 10 日。
 14. 藪田精昭：ヒト造血幹細胞の本体はどこまで解明されたのか。第 6 回近畿血液疾患治療研究会、特別講演、京都、平成 23 年 1 月 22 日。
 15. Sonoda Y.: Prospective isolation and functional characterization of human bone marrow-derived hematopoietic stem cell-supportive mesenchymal stromal cells. Hematology Conference, James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, U.S.A., December 10, 2010. (招待講演)
 16. Matusoka Y., Sasaki Y., Takahashi M, Nakatsuka R, Uemura Y., Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Ishikawa J, Hino M, Sonoda Y.: Prospective isolation and functional characterization of human bone marrow-derived hematopoietic stem cell-supportive mesenchymal stromal cells. The 52nd Annual Meeting of American Society of Hematology, Orlando, U.S.A., Dec 7, 2010.
 17. Matusoka Y., Sasaki Y., Takahashi M, Nakatsuka R, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Ishikawa J, Hino M, Uemura Y., Sonoda Y.: Prospective isolation and functional characterization of human bone marrow-derived MSCs. 第 72 回日本血液学会、横浜、平成 22 年 9 月 24 日。
 18. Sasaki Y., Matusoka Y., Nakatsuka R, Uemura Y., Sonoda Y.: Characterization of murine hematopoietic stem cell compartment based on the c-kit expression level. 第 72 回日本血液学会、横浜、平成 22 年 9 月 25 日。
 19. 佐々木豊、石井真理、松岡由和、藪田精昭：ヒト未分化 CD34 抗原陰性造血幹細胞の高度純化と特性解明。第 20 回日本サイトメトリー学会、東京、平成 22 年 6 月 26 日。
 20. Matsuoka Y., Sasaki Y., Takahashi M, Nakatsuka R, Uemura Y., Sonoda Y.: Prospective isolation and functional characterization of human hematopoietic stem cell-supportive mesenchymal stromal cells. The 8th Stem Cell Research Symposium, Awaji, May 13, 2010.
 21. Sasaki Y., Murakami M, Matsuoka Y., Takahashi M, Nakatsuka R, Uemura Y., Sonoda Y.: High resolution purification and functional characterization of primitive human cord blood-derived CD34-negative SRCs. The 8th Stem Cell Research Symposium,

- Awaji, May 13, 2010.
22. Nakatsuka R, Uemura Y, Matsuoka Y, Sasaki Y, Sonoda Y: Prospective isolation of mouse Sca-1+PDGFR α + dental pulp stem cells (DPSCs) existing in the tooth forming niche. The 8th Stem Cell Research Symposium, Awaji, May 13-15, 2010.
 23. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、菌田精昭: Sca-1 陽性 PDGFR α 陽性マウス歯髄幹細胞の予期的分離と特性の解析。第9回日本再生医療学会、広島、平成22年3月19日。
 24. 村上真理、松岡由和、中塚隆介、高橋雅也、植村靖史、佐々木豊、福原資郎、菌田精昭: ヒト臍帯血由来未分化 CD34 抗原陰性造血幹細胞の純化とその特性解明。第32回日本造血細胞移植学会、浜松、平成22年2月19日。
 25. Murakami M, Matusoka Y, Nakatsuka R, Takahashi M, Nakamoto T, Yasuda K, Matsui K, Uemura Y, Sasaki Y, Tsuji T, Fukuhara S, Sonoda Y: High resolution purification and characterization of human cord blood-derived CD34-negative SCID-repopulating cells with a very immature phenotype. The 51st Annual Meeting of American Society of Hematology, New Orleans, U.S.A., Dec 7, 2009.
 26. 村上真理、松岡由和、中塚隆介、植村靖史、佐々木豊、福原資郎、菌田精昭: ヒト未分化 CD34 抗原陰性造血幹細胞の純化とその特性解明。第71回日本血液学会、京都、平成21年10月23日。
 27. 佐々木豊、松岡由和、豊原貴之、長谷 真、中塚隆介、植村靖史、菌田精昭: 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、京都、平成21年10月25日。
 28. 松岡由和、佐々木豊、中塚隆介、植村靖史、菌田精昭: マウス骨髄由来 Lineage-Sca-1+c-kitlow/-細胞の造血幹(前駆)細胞特性の解明。第71回日本血液学会、京都、平成21年10月25日。
 29. Sonoda Y, Kimura T, Matusoka Y, Murakami M, Nakamoto T, Yasuda K, Nakatsuka R, Uemura Y, Sasaki Y: In vivo dynamics of human cord blood-derived CD34-negative SCID-repopulating cells (SRCs) in comparison to CD34+CD38+ and CD34+CD38- SRCs using intra-bone marrow injection. TERMIS 2nd World Congress, Seoul, Korea, Sep 2, 2009.
 30. Nakatsuka R, Matsuoka Y, Uemura Y, Sasaki Y, Sonoda Y: Isolation of mouse dental pulp-derived Sca-1+PDGFR α + tissue-committed stem cells. The 7th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, May 15-16, 2009.
 31. Sasaki Y, Matsuoka Y, Toyohara T, Hase M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y: Kinetics of CXCR4 expression on murine steady state KSL cells. The 7th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, May 15-16, 2009.
- [その他]
ホームページ等
幹細胞生物学講座(衛生学講座)
<http://WWW3.kmu.ac.jp/hygiene/index.html>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
菌田 精昭 (SONODA YOSHIAKI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60206688
 - (2) 連携研究者
佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80425066
 - (3) 連携研究者
植村 靖史 (UEMURA YASUSHI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40364781
平成21年~平成22年
 - (4) 連携研究者
松岡 由和 (MATSUOKA YOSHIKAZU)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70533420