

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791003

研究課題名（和文） 静止期造血幹細胞のニッチ操作による新規移植療法の開発

研究課題名（英文） Control of the HSC Niche Signaling for the Efficient Long-Term Engraftment of Hematopoietic Stem Cells without Irradiation or High-Dose Chemotherapy

研究代表者

吉原 宏樹 (YOSHIHARA HIROKI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教

研究者番号：90348706

研究成果の概要（和文）：

造血幹細胞移植は広く用いられているが、放射線や大量化学療法 of 副作用を回避するためには、造血幹細胞を高率に生着させる必要がある。成体骨髄では、造血幹細胞は静止期を維持しており、幹細胞の微小環境ニッチとの相互作用が重要である。本研究では、造血幹細胞-ニッチ間相互作用を阻害することにより、骨髄非破壊的方法による骨髄移植を行い、Mpl受容体の中和抗体やインターフェロンアルファによりニッチを骨髄非破壊的に操作することが可能であることを示した。これらの分子は新規移植療法の発展につながる可能性があり、従来の移植に伴う副作用を回避できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Irradiation and high-dose chemotherapy followed by bone marrow transplantation (BMT) have been a routine treatment for hematological malignancies and solid tumors. These conditioning, however, should be minimized since the toxicity extends to all organs generating serious side effects. In the adult BM, HSCs interact with its microenvironment which supports the activity of HSCs to maintain quiescence or self-renew to provide blood cells throughout the lifetime of an individual. This particular microenvironment, called stem cell niche, is critical for the maintenance of HSCs. In this study, we manipulated the niche for efficient engraftment avoiding redundant side effects of conditionings. We found that AMM2 or interferon-alpha is a promising niche regulator for transplantation without irradiation or high dose chemotherapy. Achievement of non-irradiated BMT method will provide advancement in stem cell therapy overcoming serious side effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：移植・再生医療、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞と移植療法

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を合わせ持つ細胞である。造血組織を完全に再構築することができる造血幹細胞は、血液領域の再生医療において不可欠である。造血幹細胞移植は、その特徴を最大限に活用した治療法であり、白血病や骨髄異形成症候群のみならず、再生不良性貧血や先天性代謝異常症など、多岐の疾患に対し施行されている。しかし、移植療法が臨床で広く用いられているにも関わらず、レシピエント骨髄内でドナー細胞が生着する分子機構について詳細は不明であり、臨床現場では高い生着率を得るために放射線、大量化学療法が行われているのが現状である。

(2) 静止期造血幹細胞

長期骨髄再構築能をもつ造血幹細胞は、骨髄内の支持細胞や細胞外マトリクスによって形成される微小環境、ニッチに存在することにより、自己複製と分化のバランスを保つのみならず、細胞周期制御の観点から見ると静止期 (G0 期) を維持し、長期にわたりその幹細胞システム全体の恒常性維持に関わっていると考えられている。

(3) 造血幹細胞のニッチ制御

これまでに、成体骨髄内における幹細胞ニッチとしては、骨内膜表面領域の骨芽細胞性ニッチ、および洞様血管領域の血管性ニッチが同定されている。造血幹細胞が静止期を保ち、自己複製能、多分化能を維持するためには、ニッチから産生される未分化性を維持する因子、分化シグナルを抑制する因子の作用が重要と考えられている。研究代表者は、造血幹細胞の中でも静止期幹細胞で Mpl 受容体が特異的に発現していることを見だし、骨芽細胞性ニッチから発現される Mpl リガンド、トロンボポエチン (Thpo) によるシグナルを介して、造血幹細胞が静止期に制御されることを明らかとした (Yoshihara et al. Cell Stem Cell 2007)。

2. 研究の目的

(1) 静止期造血幹細胞のニッチ操作による新規移植療法の開発のため、骨髄環境や幹細胞の生着の分子機構を解明する。具体的には、静止期造血幹細胞がどこに局在するかを明らかとし、骨髄非破壊的前処置を行った際の、造血幹細胞の増殖、細胞周期の変化を明らかとする。

(2) 骨髄非破壊的前処置によって効率よく移植を成立させる条件検討を行う。同処置を行ったレシピエントマウスに対し、造血幹細胞移植を行い、骨髄再構築が可能であることを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 抗 Mpl 抗体 (AMM2) によるニッチ制御
野生型マウスを対象とし、AMM2 を投与し Thpo/Mpl シグナルを抑制することで幹細胞を活性化させ、少量の 5FU を併用し、放射線照射をせずに造血幹細胞の移植を行い、骨髄再構築能の検討を行った。

(2) インターフェロナルファ (IFN α) 投与後骨髄の解析

IFN α は肝炎や慢性骨髄性白血病の治療に用いられているが、造血幹細胞に対する作用は明らかとなっていない。そこで、マウスの IFN α 投与後の骨髄を解析し、細胞周期の経時的変化を確認することで、移植に適すると考えられる細胞周期の最も活性化した時期を確認した。さらに、同時期に幹細胞が生着可能であるかを検討するため、移植実験を行った。

(3) 野生型マウス、遺伝子変異マウスに対する骨髄非破壊的前処置の条件検討

骨髄非破壊的前処置による移植の系を確立するため、前述の AMM2、IFN α を組み合わせることにより、用量、時機の条件を検討した。レシピエントとして、生着が得られにくい野生型マウス、および骨髄ニッチ環境が脆弱と考えられている c-Kit 遺伝子変異のある W/W^v マウスを用いた。

(4) 造血幹細胞、ニッチのプロテオーム解析

造血幹細胞およびニッチ支持細胞の静止、活性化に関わるニッチ制御因子をさらに明らかとするため、幹細胞のリン酸化プロテオミクス解析に取り組んだ。前段階の実験として、K562 細胞株を用いたリン酸化プロテオーム解析を行い、幹細胞に応用するための条件を検討した。

4. 研究成果

(1) Mpl 中和抗体 (AMM2) によるニッチ制御による移植

AMM2 の投与時期、5-FU の有無によって、造血幹細胞移植後の骨髄再構築がどのように変化するか、条件検討を行った。AMM2 を day -6 に、低用量の 5-FU を day -2 にそれぞれ投与し、day 0 に放射線照射を用いずに造血幹細胞 (LSK 細胞) 10⁴ 個の移植を行うと、ドナー細胞による骨髄

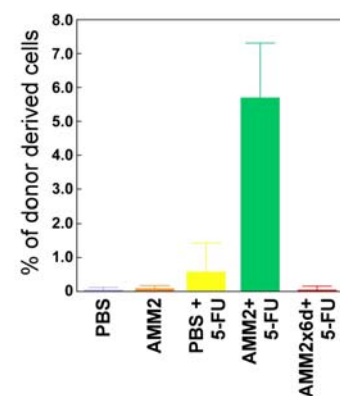


図1 AMM2 による移植後の骨髄再構築

再構築(5.8%)がみられた(図1)。この結果は、Thpo/Mpl シグナルの抑制により幹細胞の細胞周期が活性化し、続けて投与した 5-FU が活性化されたレシピエント幹細胞を排除することで、ドナー由来骨髄細胞の生着を可能にした機構によると考えられる。その他の条件では、高い再構築をみることはできなかった。特に、移植前日まで AMM2 を投与していた群 (AMM2x6d) では、全く生着がみられず、これは体内に残存した AMM2 が、ドナー由来細胞に作用することで生着を阻んだことが、原因と考えられた。

(2) インターフェロンアルファ投与後骨髄の解析

インターフェロンアルファ (IFN α) 投与後に造血幹細胞の細胞周期を経時的に調

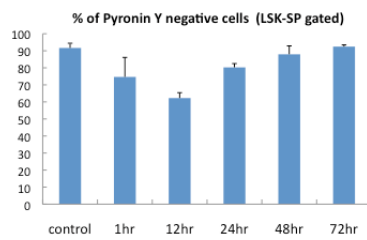


図2 IFN α 投与後骨髄の解析

べたところ、投与後12時間に最も活性化すること

が分かった(図2)。さらに移植実験では、野生型レシピエントマウスに day -3 および day -1 に poly(I:C) を、day 0 に 5-FU を投与し、day 3 にドナー由来骨髄細胞を放射線照射なしに移植すると、ドナー由来骨髄細胞が生着し、リンパ球系および骨髄球系の再構築が得られた。これらの結果から、IFN α の刺激により幹細胞の細胞周期が活性化し、ドナー骨髄細胞が生着可能なニッチが創られたことが考えられた。

(3) 遺伝子変異マウスに対する骨髄非破壊的移植

AMM2 および IFN α を用いて、移植に適した様々な条件検討を行った。レシピエントを W/W ν マウスとする

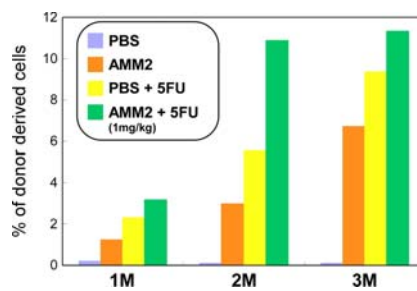


図3 AMM2 を用いた W/W ν マウスに対する移植

と 11.3% の骨髄再構築をみることもできた。再構築能の高かったマウスでは、骨髄の造血幹細胞 (LSK 細胞) が 96-98% ドナー由来細胞に置換されていた。W/W ν 遺伝子変異マウスでは、ニッチの造血幹細胞の静止期維持が障害されることが知られているが、さらに AMM2 などのニッチ制御因子を投与することにより、

移植を成立させるためのニッチ環境を十分に造り出せることが分かった。

(4) 造血幹細胞、ニッチのプロテオーム解析

造血幹細胞とニッチ支持細胞との間の相互作用による造血幹細胞の静止期維持機構を探るため、プロテオーム解析、とりわけリン酸化蛋白質を網羅的に調べる手法に取り組んだ。造血幹細胞は数が微小であるため、K562 細胞株を用いて、細胞数によってどの程度のリン酸化情報が得られるかを検討した。細胞由来の蛋白 100 μ g から、単回の質量分析計測定で数百のリン酸化ペプチドを同定することができ、合計 20 回の測定からは 4,550 のリン酸化サイト、1,901 のリン酸化蛋白質を同定することができた。蛋白質同士の物理的および機能的相互作用の情報から蛋白質間のネットワークを明らかにする、Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) データベースでこれらのリン酸化情報を解析すると、図4のよ

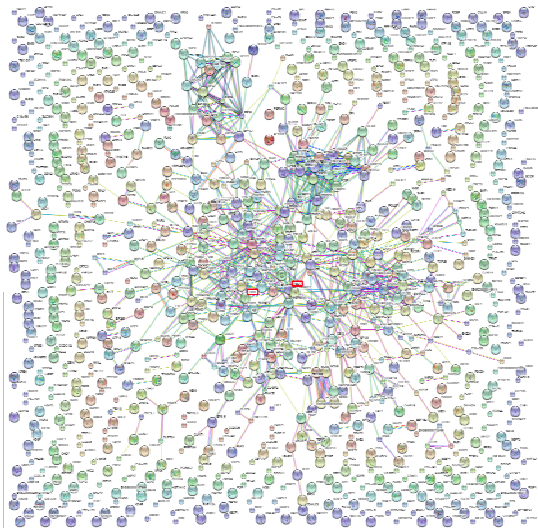


図4 K562 細胞株から得られたリン酸化プロテオームの STRING 解析

うにシグナル伝達のネットワークを網羅的に明らかにすることができた。マウスから 100 μ g の造血幹細胞やニッチ支持細胞を準備することは難しいため、今後、解析可能蛋白質量を微小化する技術の発展が不可欠である。また、臍帯血などのヒト由来造血幹細胞は、十分な細胞数を確保することができるため、今後のリン酸化プロテオーム解析に適している。これらから得られたリン酸化情報は、リン酸化を標的とした新規移植療法の開発につながると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

① 吉原宏樹、石濱泰. リン酸化タンパク質の網羅的解析. 病理と臨床 2010; 28(5):

512-517

② Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, Matsumoto Y, Yoshihara H, Suda T. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. Blood. 2010 Sep 2;116(9):1422-32. Epub 2010 May 14.

③ Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Nakamura Y, Gomei Y, Suda T. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. Blood. 2010; 116(4):554-63. 査読有り.

④ Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura Y, Gomei Y, Takubo K, Shiama H, Matsuoka S, Li L, Suda T. Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. Cell Stem Cell 2010; 6(3):194-8. 査読有り.

⑤ Gomei Y, Nakamura Y, Yoshihara H, Hosokawa K, Iwasaki H, Suda T, Arai F. Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. Exp Hematol 2010; 38(2):82-9. 査読有り.

⑥ Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. Ann N Y Acad Sci 2009; 1176:36-46. 査読有り.

⑦ Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. Nature Medicine 2009;15(6):696-700. 査読有り.

[学会発表] (計1件)

① Yoshihara H, Shimada H, Shima H, Tomita M, Ishihama Y. Phosphoproteomic Profiling of Leukemia Cells. Session Type: Poster Session. 15th Congress of the European Hematology Association, June 10-13, 2010, Barcelona, Spain.

[図書] (計1件)

① 吉原宏樹、須田年生. 中外医学社、Annual Review 血液 2010「生体内における造血幹細胞の動態」、2010、1-6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉原 宏樹 (YOSHIHARA HIROKI)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教

研究者番号：90348706

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：