

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791083

研究課題名（和文） 新規細胞表面分子 Plxdc2 を指標とする造血幹細胞の局在とそのニッチの解明

研究課題名（英文） Elucidation of the localization of hematopoietic stem cells and their niche using a novel cell surface marker, Plxdc2

研究代表者

久保田 寧 (KUBOTA YASUSHI)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：60570413

研究成果の概要（和文）：DNA マイクロアレイを用いて抽出した造血幹細胞特異的遺伝子の中で細胞表面分子のひとつ、Plexin domain containing 2 (Plxdc2) に着目した。Plxdc2 : GFP knock in マウス骨髄を用いたフローサイトメトリー解析から全骨髄のわずか 0.2% が Plxdc2 陽性であることがわかった。さらに CD150 と組み合わせることでわずか 2 つのマーカーのみで全骨髄のわずか 0.01% の高純度の造血幹細胞集団を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We performed a stringent comparative gene expression profiling analysis to find genes preferentially expressed in the HSC population, and identified a total of 63 genes that are highly expressed in HSC among various hematopoietic cell population. In order to find HSC-specific marker we focused on genes encoding cell surface protein, and found that plexin domain containing 2 (Plxdc2) is highly expressed in CD34⁻c-Kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻(CD34⁻KSL) HSC population using Plxdc2::GFP knock-in mice. Only 0.2% of whole bone marrow cells were Plxdc2⁺. Furthermore, Plxdc2⁺CD150⁺ fraction represented only 0.01%±0.002% in whole bone marrow, suggesting that the simple combination of Plxdc2 and CD150 significantly increased HSC purity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：造血幹細胞移植学

キーワード：移植・再生医療、発生・分化、造血幹細胞、ニッチ、Plxdc2

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(hematopoietic stem cell:HSC)ニッチの存在については長い間謎に包まれていたが、これは HSC の局在部位を同定できなかったことによる。これまでに HSC ニッチとしては大きく分けて、骨芽細胞ニッチ(Nature 2003 に 2 報)、血管ニッチ (Kiel, et al. Cell 2005) が報告されている(図 1)。特に Kiel らは、CD150⁺CD48⁻CD41⁻細胞が高純度の HSC 集団で、骨髄の免疫染色でも観察可能であると報告した。しかし、陽性・陰性の区別が比較的容易なフローサイトメトリー (FCM) では可能であるとしても固定

した細胞の免疫染色で「陰性」の細胞を HSC と確定するのは困難であり、

より確実な証明法が必要と考えられる。いずれにせよ、異なる手法から異なる結論が導かれる状況であり、HSC の生体組織中における局在についてさらなる研究が必要と考えた。



2. 研究の目的

HSCの純化、という観点からは、CD34⁻KSL細胞は既に満足すべきレベルに達しているが (Science 1996)、生体内での局在をみる場合、この方法は使用するマーカーが多く、何よりCD34陰性、という弱点があり現実的でない。したがって確実に、かつシンプルにHSCの局在の同定するための優れた新規陽性マーカーがないか探索した。

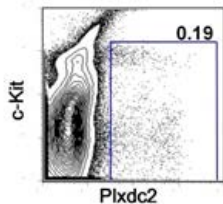
3. 研究の方法

DNAマイクロアレイを用いて成体マウスHSC特異的遺伝子のプロファイリングを行った。最終的に32遺伝子を同定し、これらの中にHSCの局在の同定するための優れた新規陽性マーカーがないか探索した。抗体やノックインマウスを用いて、HSCでの発現をFCMで解析したところ、CD150とPlxdc2がHSCで高発現していた。したがってPlxdc2 locusにGFPをノックインしてあるマウスを用いて実際のPlxdc2のHSCやその他の血液細胞での発現と、HSCであることの証明を骨髄再構築アッセイを用いて行った。

4. 研究成果

まずPlxdc2:GFPノックインマウス骨髄中のPlxdc2の発現をみた。驚くべきことに、

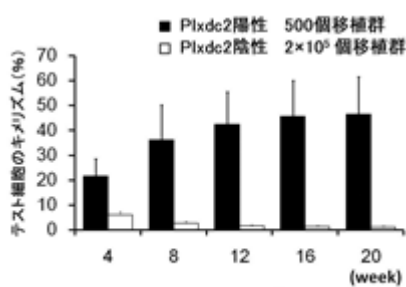
Plxdc2:GFP陽性細胞は全骨髄のわずか0.2%未満でしかなかった(図2)。全骨髄を単純にPlxdc2陽性と陰性細胞に分けて



(図2) 全骨髄中のPlxdc2陽性細胞 (%)

競合的骨髄移植アッセイに供したところ、わずか500個のPlxdc2陽性細胞を移植したレシピエントでのみドナー細胞の生着が観察された(図3)。非常に優れたマーカーとして認知

されているCD150ですら、その陽性細胞の頻度が約6%も



(図3) 競合的骨髄再構築アッセイ

あり、この結果から、Plxdc2単独でもCD150と比較し約30倍に濃縮した高純度のHSC集団を得られることが示された。実際にこのPlxdc2+CD150+細胞1個を致死量放射線照射したマウスに移植した場合に、レシピエントマウスの21%に長期骨髄再構築が観察されたことから少なくとも5個に1個は真の造血幹細胞であることが証明できた。

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7件)

1) 末岡榮三朗、山田尚友、山田麻里江、久保田 寧、他. 輸血後経過過剰症の現状と問題点. 日本輸血・細胞治療学会誌. 査読 (有) 59巻1号, 73-78, 2013

doi 10.5772/31367.

2) Itamura H, Kubota Y (他11名、9番目). Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult refractory hemophagocytic syndrome with anti-HLA antigen. Leuk Lymphoma 査読 (有) 53: 2307-2309, 2012.

doi: 10.3109/10428194.2012.680453.

3) Sugioka T, Kubota Y, Wakayama K, Kimura S. Severe steroid-resistant thrombocytopenia secondary to cytomegalovirus infection in an immunocompetent adult. Intern Med 査読 (有) 51: 1747-50, 2012.

doi.org/10.2169/internalmedicine.51.719

3

4) Tanaka Y, Kubota Y (他6名、3番目) Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 査読 (有) 109: 4515-4520, 2012.

doi: 10.1073/pnas.1115828109.

5) Kubota Y, Kimura S. Regulation of Hematopoietic Stem Cell Fate: Self-Renewal, Quiescence and Survival. 査読 (有) Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, Dr. Rosana Pelayo (Ed.), 2012.

6) Fukushima N, Kubota Y (他6名、6番目) Clinical Presentation and Outcome in Patients of over 75 Years Old with Malignant Lymphoma—Clinical Presentation

and Outcome in Elderly Lymphoma Patients. Int J Clin Med 査読 (有) 2 : 246-253, 2011.

7) Urata C, Kubota Y (他 6 名、5 番目) Lenalidomide in combination with dexamethasone induced rhabdomyolysis in a multiple myeloma patient treated with pravastatin. Int J Hematol 査読 (有) 94(2) : 216-217, 2011.

[学会発表] (計 27 件)

1) Sueoka E, Ide M, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nakamura H, Sotomaru Y, Taya C, Yonekawa H, Nakachi K, Kubota Y, Kimura S, Tanimoto K. The role of hypoxia inducible factors on maintenance of hematopoietic stem cells and leukemogenesis. 2012 Tumor Microenvironment GCRC International Symposium. Aug 23-24, 2012 Seoul

2) Yokoo M, Kubota Y, Ichinohe T, Kimura S. Combination Effects of Nilotinib and Zoledronic Acid On Chronic Myeloid Leukemia Are Canceled in the Co-Culture System Which Mimic the Bone Marrow Microenvironment. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. December 8-11, 2012. Atlanta, USA.

3) Yokoo M, Kubota Y, Mochinaga S, Maeda A, Ichinohe T, Fujito H, Higashi T, Motoyama K, Arima H, Irie T, Kimura S. Antiproliferative Effect of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CyD) Against Chronic Myeloid Leukemia In Vitro and In Vivo. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. December 8-11, 2012. Atlanta, USA.

4) 相原綾子、一戸辰夫、板村英和、吉村麻里子、横尾眞子、出勝、久富崇、久保田寧、福島伯泰、末岡榮三朗、木村晋也。遠隔地に居住する血縁ドナー候補者に対するHLA検査の諸問題。第34回日本造血細胞移植学会総会。2012年2月24-25日、大阪

5) 福島伯泰、板村英和、近藤誠司、浦田千紗子、吉村麻里子、横尾眞子、出勝、久富崇、久保田寧、末岡榮三朗、一戸辰夫、木村晋也。多彩な自己免疫疾患を有した難治性血球貪食症候群。に対し非骨髓破壊的臍帯血移植が奏効した1例。第34回日本造血細胞移植学会総会。2012年2月24-25日、大阪

6) Itamura H, Hisatomi T, Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Kubota Y, Fukushima N, Yoshihara M, Nagata M, Ichinohe T, Ohshima K, Aoki Y, Sueoka E, Kimura S. Concurrent

development of invasive cryptococcosis and mature B-cell neoplasm in an HIV-negative young adult. 第74回日本血液学会学術集会。2012.10.19-21, 京都

7) Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult refractory hemophagocytic syndrome with anti-HLA antigen. 第34回日本造血細胞移植学会学術集会。2012年2月24-25日、大阪

8) Kubota Y, Ichinohe T, Yoshimura M, Itamura H, Hisatomi T, Fukushima N, Sueoka E, Matsuzaki M, Sano M, Kimura S. Acute myeloid leukemia with t(3;8)(q26;q24) and monosomy 7 complicated with diabetes insipidus. 第74回日本血液学会学術集会。2012年10月19-21日, 京都

9) 末岡 榮三朗, 山田 尚友, 山田 麻里江, 久保田 寧, 東谷 孝徳, 木村 晋也。電子カルテによる輸血後鉄過剰症モニタリングプログラムの開発。日本臨床検査自動化学会第44回大会, 2012年10月11-13日。横浜

10) 山田 麻里江, 山田 尚友, 南雲 文夫, 久保田 寧, 木村 晋也, 末岡 榮三朗。RhD陰性患者にRhD陰性の赤血球濃厚液を輸血したにもかかわらず溶血を認めた1例。日本輸血・細胞治療学会九州支部会第58回総会・第79回例会。2012/12/17, 長崎

11) 板村英和、一戸辰夫、蒲池和晴、北村浩晃、吉原麻里、横尾眞子、出勝、久富崇、久保田寧、福島伯泰、末岡榮三朗、木村晋也。急性骨髄性白血病に対する化学療法の経過中にニューモシスチス肺炎の発症が疑われた2例。第2回日本血液学会九州地方会, 2012.7.7, 福岡

12) 板村英和、蒲池和晴、北村浩晃、吉原麻里、横尾眞子、出勝、久富崇、久保田寧、福島伯泰、末岡榮三朗、一戸辰夫、木村晋也。当院におけるCMLの治療状況。第3回筑後佐賀CML研究会。2012.11.16, 久留米

13) 北村浩晃, 久保田寧、他。上気道炎症状を契機に反応性の形質細胞増多症と多発リンパ節腫脹を来した1例。第299回日本内科学会九州地方会。2012.11.25, 宮崎

14) 山田麻里江, 山田尚友, 東谷孝徳, 久保田寧, 木村晋也, 末岡榮三朗。不規則抗体が新生児に与える影響についての検討。日本輸血細胞治療学会九州支部会, 2012/12/1, 別府

15) 山田尚友, 山田麻里江, 東谷孝徳, 久保田寧, 木村晋也, 末岡榮三朗。輸血部門から院内医療安全管理委員会に報告した「インシデント・アクシデント」レポートの解析。日本輸血細胞治療学会九州支部会, 2012/12/1, 別府

16) Kubota Y, Lieberam I, Kimura S, Jessell TM, Nishikawa S-I. Plxdc2 marks hematopoietic stem cells and Th2 cytokine-producing innate lymphocytes in adult bone marrow. The American Society of Hematology (ASH) 53rd Annual Meeting and Exposition. 2011/12/11,

17) Itamura H, Fukushima N, Urata C, Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Ichinohe T, Sueoka E, Kimura S. Relation between CNS involvement and involved extranodal site at presentation in DLBL. 第73回日本血液学会学術集会. 2011/10/14-16、名古屋

18) Itoh Y, Itamura H, Urata C, Yoshimura M, Hisatomi T, Kubota Y, Fukushima N, Ichinohe T, Sueoka E, Kimura S. Successful treatment with dasatinib for CML-BC patient having extramedullary tumor. 第73回日本血液学会学術集会. 2011/10/14-16、名古屋

19) Kubota Y, Sano M, Kubota M, Itamura H, Urata C, Yoshimura M, Hisatomi T, Fukushima N, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Hemostatic abnormality in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma. 第73回日本血液学会学術集会. 2011/10/14-16、名古屋

20) 北村浩晃, 吉村麻里子, 福島伯泰, 板村英和, 浦田千紗子, 横尾眞子, 出勝, 久富崇, 久保田寧, 一戸辰夫, 末岡榮三朗, 木村晋也. 当院における濾胞型リンパ腫 82 例の臨床成績の検討. 第51回日本リンパ網内系学会総会. 2011/7/1、福岡

21) 末岡榮三朗、山田尚友、山田麻里江、久保田寧、木村晋也. 電子カルテを利用した自己血用マイ・カルテによる自己血輸血情報管理. 第59回日本輸血・細胞治療学会総会. 2011/4/14-16, 福島

22) Urata C, Yoshimura M, Itamura H, Hisatomi T, Kubota Y, Fukushima N, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Lenalidomide and dexamethasone induced rhabdomyolysis in a myeloma patient treated with pravastatin. 第73回日本血液学会学術集会. 2011/10/14-16、名古屋

23) Yoshimura M, Itamura H, Urata C, Hisatomi T, Kubota Y, Fukushima N, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. The influence of abl tyrosine kinase inhibitors on pulmonary alveolar proteinosis. 第73回日本血液学会学術集会. 2011/10/14-16、名古屋

24) 久富崇, 板村英和, 吉村麻里子, 横尾眞子, 出勝, 久保田寧, 福島伯泰, 末岡榮三朗, 一戸辰夫, 木村晋也. 造血器腫瘍に合併したDICに対するrTMの有効性. 第

1回日本血液学会九州地方会. 2011/9/3, 福岡

25) 木村亜由美, 吉村麻里子, 板村英和, 久富崇, 久保田寧, 福島伯泰, 一戸辰夫, 末岡榮三朗, 木村晋也. 赤芽球瘍を合併したGood症候群. 第295回日本内科学会九州地方会. 2011/11/20, 佐賀

26) 山田麻里江、山田尚友、南雲文夫、久保田寧、木村晋也、末岡榮三朗. RhD陰性患者にRhD陰性の赤血球濃厚液を輸血したにもかかわらず溶血を認めた1例. 日本輸血・細胞治療学会九州支部会、第58回総会. 2011/12/17, 長崎

27) 久保田寧, 他. Cytomegalovirus-Associated Immune Thrombocytopenia in Immunocompetent Adult -症例報告と最近の知見から- 第65回佐賀ブルーアートイベント. 2011/7/1, 佐賀

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.intmed.med.saga-u.ac.jp/kenkyuugroup/group/blood-hp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 寧 (KUBOTA YASUSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60570413