

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591432

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と分化経路・階層制の解明

研究課題名(英文)Characterization of human CD34-negative hematopoietic stem cells and their differentiation pathway and hierarchy

研究代表者

園田 精昭 (SONODA, YOSHIAKI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60206688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨髄内直接移植法を開発することにより、ヒト臍帯血中に非常に未分化なCD34抗原陰性造血幹細胞(CD34-HSC)を世界で初めて同定した。最近、このCD34-HSCの高度純化法を開発し、その陽性分子マーカーとしてCD133抗原を同定した。加えて、CD133抗原がCD34+/-HSCの共通の陽性分子マーカーであることも明らかにしている。一連の研究により、CD34-HSCは、従来最も未分化と考えられていたCD34+CD38-HSCに比べてより未分化であることが示唆された。以上より、CD34-HSCが階層制上頂点に位置する最も未分化なヒトHSCであるという新たなモデルを提唱している。

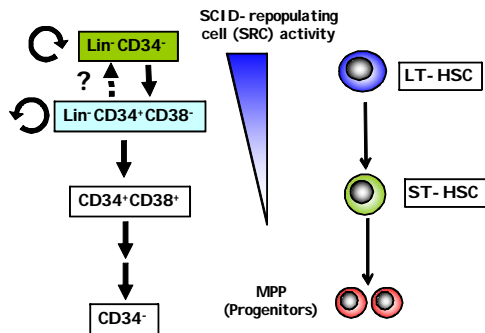
研究成果の概要(英文)：We have identified human cord blood-derived very primitive CD34-negative hematopoietic stem cell (CD34-HSC) using the intra-bone marrow injection method for the first time. Recently, we developed a high resolution purification method for CD34-HSC using 18 lineage specific antibodies and succeeded to identify CD133 antigen as a specific positive marker for CD34+/- HSCs. Furthermore, we performed a variety of in vitro and in vivo experiments to clarify the human HSC hierarchy. These data demonstrated that our identified CD34-HSC seemed to be more immature than the CD34+CD38-HSC which was previously thought as the most primitive human HSC. Based on these data, we propose that the myeloid-biased long-term repopulating CD34-HSCs reside in the apex of human HSC hierarchy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：造血幹細胞 臍帯血 CD34抗原 CD133抗原 骨髄内移植 SCID-repopulating cell 階層制 臍帯血移植

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植の根幹をなすヒト造血幹細胞 (HSC) の本体に関しては、その陽性マーカーが不明なことや測定法の限界もあり十分に明らかにされていなかった。加えて、ヒト未分化 HSC における CD34 抗原の可逆的な発現の可能性については、限られた報告しかなく、その陽性マーカーや分化経路についても十分に明らかにされていなかった (図 1)。



(図 1) ヒト未分化 HSC の分化経路と CD34 抗原の発現

研究代表者は、独自に開発した骨髄内直接移植 (IBMI) 法を用いることにより、ヒト臍帯血中に CD34⁺ SCID-repopulating cell (SRC) が存在することを初めて直接的に証明した (Blood 101: 2924, 2003)。一連の研究で、CD34⁺ SRC が従来最も未分化とされていた CD34⁺ CD38⁻ SRC を *in vitro* 及び *in vivo* で産生し、CD34⁺ CD38⁻ SRC と同等、あるいはそれ以上の幹細胞活性を示し、T 細胞系を含むすべての血球系統に分化することを明らかにしてきた (Int J Hematol 79:328, 2004; Stem Cells 25:1348, 2007; J Autoimmun 30:136, 2008; Leukemia 24:162, 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が独自に開発した IBMI 法を用いてヒト臍帯血中に初めて同定した CD34⁺ SRC (HSC) (Blood 101:2924, 2003) の幹細胞特性を解明し、従来最も未分化なヒト HSC と考えられてきた CD34⁺ CD38⁻ HSC と比較することにより、その分化経路や階層制 (hierarchy) 上の位

置づけ (図 1) を明らかにして、近未来の新たな細胞移植療法や再生医療に応用することである。

3. 研究の方法

最近、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)。本研究では、この高度純化法を用いて、CD34⁻ SRC (HSC) の膜表面に発現している陽性分子マーカーについて FACS により網羅的な探索を行った。SRC の測定方法は既報の方法 (Blood 101:2924, 2003; Int J Hematol 79:328, 2004) を一部改変して行った。標的細胞を NOG マウスに移植後 5~24 週まで、マウス骨髄を吸引法で採取し、抗ヒト CD45 抗体で染色後に FACS 解析した。同時に、multilineage 解析も行った。最終的に、マウスを犠牲死させて骨髄、末梢血、脾臓、胸腺などを採取し、同様に FACS 解析した。

また、自己複製能の指標として、移植後 20~24 週目に一次マウスの骨髄を採取して、二次マウスに移植し、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 FACS で解析した。

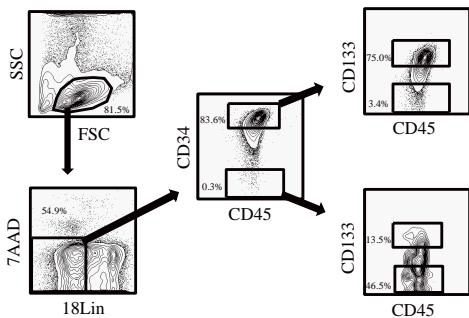
並行して、ヒト骨髄 CD271⁺ SSEA-4⁺ 細胞より樹立した間葉系幹細胞 (DP MSC) (Stem Cells 33:1554, 2015) を用いて 18Lin-CD34⁺ 細胞との共培養系における分化能、さらに SRC 活性の測定により、樹立した MSC の HSC 支持能、増幅能について解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト未分化 HSC の陽性分子マーカー (CD133 抗原) の同定と純化

独自に開発した高度純化法 (Exp Hematol 39:203, 2011) を用いて、臍帯血由来 CD34⁻ SRC (HSC) の膜表面に発現し

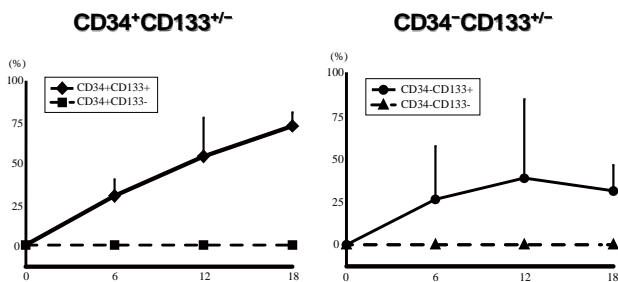
ている陽性分子マーカーについてFACSにより網羅的な探索を行ない、CD34-SRCの陽性分子マーカーとしてCD133抗原を同定した(Leukemia 28:1308, 2014)(図2)。そこで、 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^{+/+}$ 細胞をFACSで分取して以下の検討を行った。



(図2) $18\text{Lin}^- \text{CD}45^+ \text{CD}34^{+/+}$ 細胞におけるCD133抗原の発現パターン

初めに、 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^{+/+}$ 細胞をNOGマウスに移植しSRC活性について検討した。その結果、 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^{+/+}$ 細胞移植群では全ての1次マウスで生着が認められた。一方、 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^-$ 細胞移植群では全く生着が認められなかった(図3)。また、 $\text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^+ \text{SRCs}$ は、 $\text{CD}34^+, \text{CD}33^+, \text{CD}19^+$ 細胞を含む多血球系統に分化することも確認された。

以上より、CD133抗原は $\text{CD}34^- \text{SRC}$ のみならず $\text{CD}34^+ \text{SRC}$ の陽性分子マーカーであることが明瞭に示された。



(図3) $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^{+/+}$ 細胞のSRC活性(骨髄吸引による経時的解析)

最後に、限界希釈(LDA)法により $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^+$ 分画におけるSRCの頻度を測定した。その結果、 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/+} \text{CD}133^+$ 分画には、各々、 $1/99$ 個、 $1/142$ 個

と $\text{CD}34^{+/+} \text{SRC}$ が高度に濃縮されていた。

(2) 新規 $\text{CD}34^+ \text{HSC}$ の陽性分子マーカーの同定と超高度純化法の開発

前記高度純化法を用いて、ヒト臍帯血由来 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^-$ 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を新たに同定した。現在、この分子マーカーXとCD133抗原を同時に用いることにより、 $\text{CD}34^+ \text{HSC}$ の超高度純化法の開発を進めている(未発表)。

(3) DP MSC との共培養系を用いるヒト未分化HSCの体外増幅システムの開発

我々が同定した $\text{CD}34^+ \text{HSC}$ は、階層制上より上位のHSCであるため、共培養系で分裂・増殖することで $\text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{CD}90^+ \text{SRC}$ (HSC)を効率よく産生することができる。この基盤技術はすでに確立していることから、本研究では、1) DP MSC との共培養条件の最適化、2) $\text{CD}34^- \text{SRCs}$ と DP MSCs との共培養後の $\text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{SRC}$ の増幅効率の最適化に焦点を絞って検討した。その結果、無血清(StemPro34)下で6種類のサイトカイン(TPO, SCF, FL, G-CSF, IL-3, IL-6)を添加した場合に、最も高い $\text{CD}34^+$ 細胞比率が得られた。

次に、共培養系より回収した $12\text{Lin}^- \text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{CD}90^+ \text{CD}45\text{RA}^-$ 細胞のSRC活性と頻度についてLDAで測定した。その結果、本共培養系システムにより、多分化能を持つ $\text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{CD}90^+ \text{SRC}$ が産生されたことが確認された。しかしながら、HSC数としては約 $1/8$ に減少していた。この原因は、 $\text{CD}34^- \text{SRC}$ が分裂して娘細胞を産生する際に、自己複製あるいは階層制上より下位にある $\text{CD}34^+ \text{CD}38^- \text{SRC}$ (HSC)を産生する効率が低く、HSC以外の造血前駆細胞あるいはより分化した血球細胞を産生することであると推測された(投稿準備中)。

(4) ヒト未分化 HSC における CD34 抗原の可逆的発現について

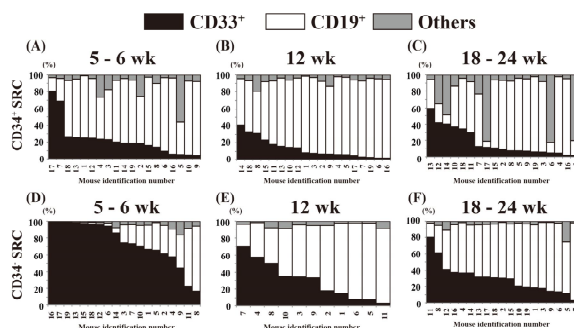
(3)で開発した DP MSC とヒト臍帯血由来 $18\text{Lin}^- \text{CD}34^{+/-}$ 細胞との共培養系において、CD34 抗原の可逆的発現について検討した。その結果、 $\text{CD}34^- \text{SRCs}$ は $\text{CD}34^+ \text{SRCs}$ を産生するが、 $\text{CD}34^+ \text{SRCs}$ は $\text{CD}34^- \text{SRCs}$ を産生できないことが明らかになった (Stem Cells 33:1554,2015)。また、NOG マウスを用いる in vivo 異種間移植系においても、 $\text{CD}34^- \text{SRCs}$ は $\text{CD}34^+ \text{SRCs}$ を産生するが、 $\text{CD}34^+ \text{SRCs}$ は $\text{CD}34^- \text{SRCs}$ を産生できないことが明らかになった(未発表)。以上より、ヒト臍帯血由来未分化 HSC においては、マウス HSC と異なり、CD34 抗原の可逆的な発現の可能性は低いと考えられた。

(5) ヒト未分化 $\text{CD}34^{+/-}$ HSC 階層制の解明

最近、マウスにおいて、HSC は分化特性の異なる多様性を持つ集団から構成される事が報告された。しかしながら、ヒト HSC 中に、このような分化特性の異なる集団が存在するかは明らかになっていない。

最近、我々は、NOG マウスを用いる異種間移植系において、 $\text{CD}34^-$ HSC が $\text{CD}34^+$ HSC と比較し、移植後 5 週 ~ 24 週のすべての期間において、優位に高い骨髓球系細胞への分化能を示すことを明らかにした (図 4)。

(図 4) ヒト臍帯血由来 $\text{CD}34^{+/-}$ SRC (HSC) の分化能の経時的解析



以上より、ヒト HSC は、分化特性の異なる 2 つの HSC 集団から構成される事が明らかとなった (Blood Cancer J 5,e290,2015)。

換言すると、 $\text{CD}34^-$ HSC は、myeloid-biased long-term repopulating HSC であり、ヒト HSC の階層制上頂点にある最も未分化な 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 5 件)

1. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y: Prospectively isolated human bone marrow cell-derived MSCs support primitive human $\text{CD}34^-$ hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 33:1554-1565, 2015. (査読有り)
2. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y: Human cord blood-derived $\text{CD}34^-$ hematopoietic stem cells (HSCs) are myeloid-biased long-term repopulating HSCs. *Blood Cancer J* (2015) 5, e290;doi:10.1038/bcj.2015.22. (査読有り)
3. Nakatsuka R, Matsuoka Y, Uemura Y, Sumide K, Iwaki R, Takahashi M, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y: Mouse dental pulp stem cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. *Cell Transplantation* 24:97-113,2015. (査読有り)
4. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, Sonoda Y: $\text{CD}133$ is a Positive Marker for a Distinct Class of Primitive Human Cord Blood-derived $\text{CD}34^-$ Hematopoietic Stem Cells. *Leukemia* 28:1308-1315,2014. (査読有り)

〔学会発表〕(計 38 件)

1. **園田精昭**：ヒト造血幹細胞 その特性はどこまで解明されたのかー。第 37 回日本造血細胞移植学会総会、教育講演、神戸国際会議場、2015 年 3 月 6 日。
(招待講演)
2. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Kaneko K, **Sonoda Y**: CD133 is a positive marker of human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Osaka International Convention Center, November 1, 2014.
3. Matsuoka Y, Sumide K, Takahashi M, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, **Sonoda Y**: Cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cell (HSC) is myeloid-biased HSC residing at the apex of human HSC hierarchy. The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Osaka International Convention Center, October 31, 2014.
4. **園田精昭**：ヒト造血幹細胞の純化と階層制の解明。第 24 回日本サイトメトリー学会総会、特別講演、関西医科大学、枚方、平成 26 年 6 月 29 日。**(招待講演)**
5. 松岡由和、角出啓輔、高橋雅也、中塚隆介、藤岡龍哉、佐々木豊、**園田精昭**：未分化ヒト臍帯血由来 CD34 抗原陰性造血幹細胞は骨髓球系細胞への分化指向性を有する。第 24 回日本サイトメトリー学会総会、関西医科大学、枚方、平成 26 年 6 月 28 日。
6. **園田精昭**：ヒト造血幹細胞の純化と階層制の解明。第 2 回 奈良県輸血・造血細胞治療研究会、特別講演、奈良県新公会堂、平成 26 年 6 月 7 日。**(招待講演)**
7. Matsuoka Y, Sumide K, Takahashi M, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, **Sonoda Y**: Cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells (HSCs) are myeloid-biased HSCs residing at the apex of the human HSC hierarchy. The 12th Stem Cell Research Symposium, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, May 30, 2014.
8. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Kaneko K, **Sonoda Y**: CD133 is a positive marker of human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. The 12th Stem Cell Research Symposium, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, May 30, 2014.
9. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, **Sonoda Y**: CD133 is a positive marker of human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. The 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA, December 7, 2013.
10. **園田精昭**：ヒト造血幹細胞の新しい階層制モデルの提唱。第 4 回癌・免疫若手セミナー、特別講演、関西医科大学、枚方、平成 25 年 9 月 20 日。
(招待講演)
11. **Sonoda Y**: A revised model of human hematopoietic stem cell hierarchy. Stem Cell Seminar at Seoul National University, Invited lecture, Seoul, Korea, July 3, 2013. **(招待講演)**
12. **Sonoda Y**: A revised model of human hematopoietic stem cell hierarchy. Asan Stem Cell Symposium 2013: New Horizon of Stem Cell Therapeutics,

Invited lecture, Seoul, Korea, July 3, 2013.

(招待講演)

- 1 3. **松岡由和、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とその機能解析。第 23 回日本サイトメトリー学会総会、橘桜会館、東京、平成 25 年 6 月 22 日。
- 1 4. **Sonoda Y**: Functional significance of MPL expression in the primitive human hematopoietic stem cell compartment. The 1st Conference of Polish Society of Regenerative Medicine, Invited lecture, Szczecin, Poland, May 31, 2013. **(招待講演)**
- 1 5. Takahashi M, **Matsuoka Y**, Iwaki R, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Matsui K, Asano H, **Sasaki Y**, Kaneko K, **Sonoda Y**: Functional significance of MPL expression in the human primitive hematopoietic stem cell compartment. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA, December 8, 2012.
- 1 6. **Matsuoka Y**, **Sasaki Y**, Takahashi M, Iwaki R, Nakatsuka R, Kohno H, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, **Sonoda Y**: Novel human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells lacking adipogenic differentiation potential support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells. The 10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Pacifico Yokohama, June 15, 2012.
- 1 7. **藪田精昭**：ヒト造血幹細胞の hierarchy に関する新しいモデルの提唱。第 1 回 Kagawa Basic Research Forum、特別講演、高松商工会議所、平成 24 年 5 月 26 日。 **(招待講演)**

〔図書〕(計 3 件)

1. **藪田精昭**：ヒト造血幹細胞の特性。造血器腫瘍アトラス改訂第 5 版、日本医事新報社、東京、印刷中。
2. **Sonoda Y**: Human CD34-negative hematopoietic stem cells. Book chapter in Ratajczak M, ed. "Adult Stem Cell Therapies : Alternatives to Plasticity". Humana Press, Springer, Berlin, pp.53-77, 2014.
3. **藪田精昭**：骨髄内移植法。臍帯血移植の基礎と臨床、医学書院、東京、pp.220-226, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：間葉系幹細胞の分離方法

発明者：藪田精昭、松岡由和、中塚隆介、飯田寛和

権利者：学校法人 関西医科大学

種類：特願

番号：2013-170480

出願年月日：平成 25 年 8 月 20 日

国内外の別：国内

名称：ヒト造血幹細胞濃縮画分の製造方法

発明者：藪田精昭、松岡由和、角出啓輔

権利者：学校法人 関西医科大学

種類：特願

番号：2014-090292

出願年月日：平成 26 年 4 月 24 日

国内外の別：国内

〔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

藪田 精昭 (SONODA YOSHIAKI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：6 0 2 0 6 6 8 8

(2) 連携研究者

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：8 0 4 2 5 0 6 6

(3) 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：7 0 5 3 3 4 2 0