

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591549

研究課題名(和文) マイクロRNAセンサーベクターを用いた新規ヒト造血幹細胞分画の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel human hematopoietic stem cell populations using the micro-RNA sensor vector

研究代表者

平松 英文 (Hiramatsu, Hidefumi)

京都大学・大学院医学研究科発達小児科学・講師

研究者番号：40362503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：すべての血液細胞を生み出すことができるヒト造血幹細胞の性質については未だ不明な点が多く、その生物学的特徴を明らかにすることで、骨髄移植など造血幹細胞治療をより効率的に行うことが出来るようになると考えられる。造血幹細胞表面には特徴的なマーカーが発現しているが、我々は近年、造血幹細胞において重要な働きを担っているマイクロRNA-126という遺伝子を可視化できるシステムを開発し、従来、造血幹細胞が存在しないと考えられている細胞分画にマイクロRNA-126が強く発現している細胞群を見いだした。この細胞群は新たなヒト造血幹細胞ソースになる可能性を秘めており、生物学的特徴につきさらに研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：The characterization of human hematopoietic stem cells (HSCs) will facilitate the hematopoietic cell therapy such as bone marrow transplantation. Although the human HSCs have been identified by the expression of distinct surface markers, we have identified a microRNA, miR-126, is highly expressed and has an important role in human HSCs. We have developed a new system, which allows us to identify the cells with miR-126 expression and found a new population that might have a new hematopoietic stem cell activity. Further characterization of this population is under investigation.

研究分野：小児血液

キーワード：造血幹細胞 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

ヒト造血幹細胞は唯一臨床応用が確立した幹細胞システムであり、現在では骨髄、末梢血幹細胞、臍帯血という異なった細胞ソースを用いて造血幹細胞移植が行われている。移植では CD34 陽性細胞分画中に存在する造血幹細胞が患者骨髄内で生着、分化増殖すると考えられており、グラフト中の CD34 陽性細胞数が生着に関係の深いパラメーターとして広く用いられている。しかしながら、ヒト造血幹細胞の真のマーカに関してはマウスのそれに比べ不明な点が多い。近年 CD34 陰性分画にも造血幹細胞が存在するという報告があり、真のヒト造血幹細胞の全容は未だ把握できていない。

我々は造血幹細胞分画に高発現している micro RNA-126 を可視化できる lentivirus を用いたバイオイメージングシステムを開発した¹。同ベクターは未分化なヒト造血幹細胞/前駆細胞にも効率良く感染し、in vitro 実験系において、成熟に伴って造血前駆細胞が microRNA-126 の発現を失うと、それに応じて、GFP の輝度が上がっていく様子をリアルタイムで観察できることを確認した。また、本ベクターはマウスへの移植実験系少なくとも数ヶ月から半年以上の長期にわたってトランスジーンが発現が維持されていることも確認している。microRNA-126 sensing lentivirus vector を用いることにより、現在同定できる最も未分化なヒト造血幹細胞分画で microRNA-126 が極めて高発現していることを示し、microRNA-126 の発現がヒト造血幹細胞の新たなマーカーになり得ることを報告した。(Sci Transl Med 2010)

2. 研究の目的

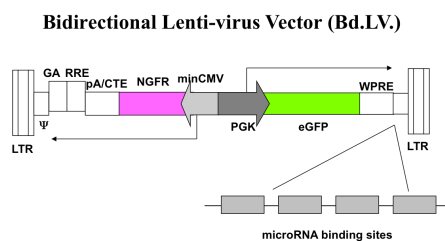
microRNA-126 sensing lentivirus vector を用いることで、従来の表面マーカーに頼る方法とは別に、ヒト造血幹細胞集団を探索することを第一の目的とする。特に、

microRNA-126 が高発現している集団の中で、造血幹細胞の最も重要なマーカーと考えられている CD34 の発現がみられない集団に着目する。CD34 陰性分画中の造血幹細胞の存在についての報告はいくつかなされているものの、統一した見解は得られていない。本研究ではマウスの移植系を用いてを miR-126 発現をマーカーにして、様々な細胞分画につき造血幹細胞活性が存在するかを検討し、従来知られている幹細胞マーカーとの比較を行う。新たな造血幹細胞分画の解明は、より効率の良い造血幹細胞移植法の確立に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 高力価ウイルス粒子の作成

細胞内での microRNA 発現を可視化できる miR sensing lentivirus vector は第 3 世代の SIN vector であり miR sensing part を持つバックボーンベクターに、3 種類のアクセサリプラスミド (RRE, RVE, VSV-G) を 293T 細胞に同時にトランスフェクションして感染ウイルスを作成する。



+ RRE/ REV/ VSV-G

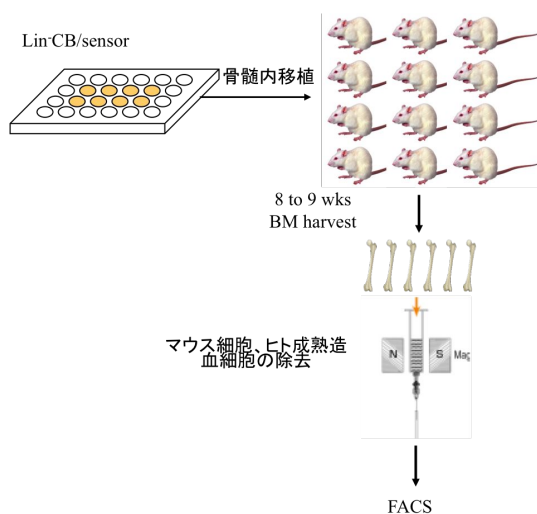
リン酸カルシウム法による 293T 細胞への co-transfection 上清の回収

(2) Lin-臍帯血への miR sensing lentivirus の導入

ヒト臍帯血から単核球を分離し、磁気ビーズによって成熟血球を除去したのち (Lin- CB)、miR-126 sensing vector virus を感染させ、免疫不全マウス (NOG マウス^{2,3}) へ移植して、ヒト造血の再構築を行う。

(3) 造血幹/前駆細胞における miR-126 解析

マウス体内で再構築された正常ヒト造血細胞を回収し、磁気ビーズを用いてマウスの血球並びにひと成熟細胞集団を除去してヒト造血幹細胞/前駆細胞を濃縮する。次にフローサイトメトリー法を用いて、microRNA-126 発現と、従来より知られている造血幹細胞マーカーである CD34, CD38 などの発現との関連を解析し、さらにそれらサブポピュレーションを分取して 2 次移植を行い、造血幹細胞としての性質につき検討する。



4. 研究成果

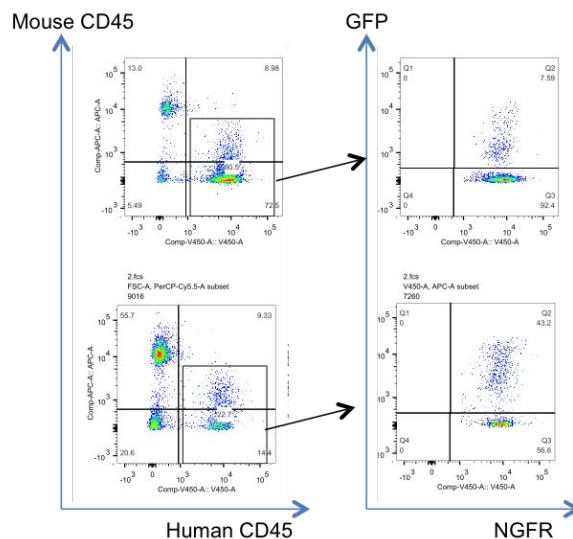
(1) microRNA-126 sensing lentivirus の産生

トランスフェクションの DNA 量や上清回収のタイミングを最適化することにより、Hela 細胞を用いた titer 測定で、10⁸/ml 以上の極めて高い titer のウイルス粒子を安定して作成することに成功した。

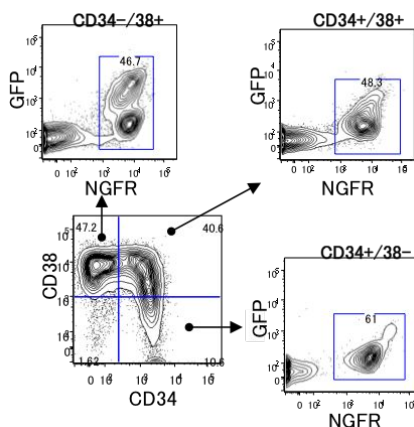
(2) NOG マウスを用いたヒト造血細胞の再構築

ウイルスを感染させた Lin-CB は 5 万個程度を目安に予め放射線照射を行った NOG マウスに骨髓内へ移植した。清潔環境下で飼育を続け、8~12 週後にマウスを sacrifice して、

フローサイトメトリーによる解析を行った。末梢血の FACS 解析の典型例を下を示す。



NOG マウスに生着したヒト造血細胞 (human CD45 陽性画分) を NGFR と GFP で展開すると十分な割合で microRNA-126 sensing lentivirus が感染しているが、末梢血中にみられるものは大部分が GFP high、つまり microRNA126 low の成熟細胞であることが分かる。次に、このようなマウスの骨髓細胞を出来るだけ回収し、上述の 3.(3)の方法によりヒト造血幹/前駆細胞に濃縮したのちに FACS 解析した例を下に示す。

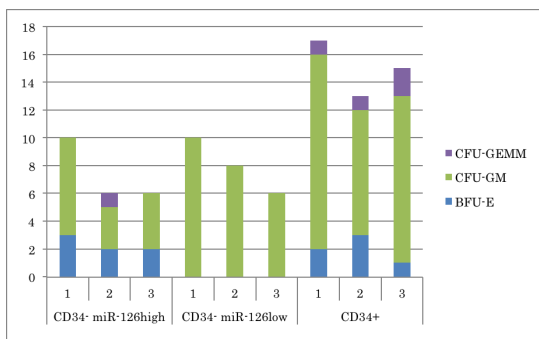


CD34 陽性かつ CD38 陰性の極めて未熟な造血細胞では GFP 低発現すなわち miR-126 が高発現している細胞がほとんどをしめるが CD34

陰性細胞にも miR-126 高発現を示す細胞群が存在することが確認された。これらの細胞は表面マーカー上は従来では造血幹細胞を含んでいないと考えられる集団であるが、microRNA-126 が高発現していることから造血幹細胞活性をもっている可能性がある。

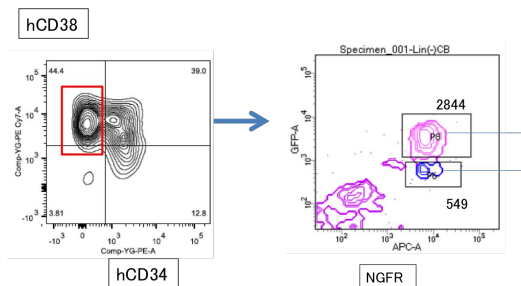
(3) CD34 陰性 miR-126 高発現細胞の機能解析

移植後マウスより上述の CD34 陰性 miR-126 高発現ならびに低発現細胞をソーティングしてコロニーアッセイ、さらには NOG マウスへの二次移植を行った。コロニーアッセイの結果を下に示す(コロニー/100細胞)。



MicroRNA-126 高発現群からは CFU-GEMM を含む様々なコロニーが観察されたが、低発現は CFU-GM の小コロニーを観察したのみであった。この結果は miR-126 陽性 CD34 陰性細胞のなかに多分化能を持つ造血細胞が存在していることを示唆している。

引き続き、miR-126 高発現ならびに低発現細胞を NOG マウスに移植した。



二次移植結果

| Experiment | CD34 | miR-126 | Cell dose | engraftment | week |
|------------|------|---------|-----------|-------------|------|
| #1 | - | high | 2800 | 0/1 | 20 |
| | - | low | 550 | 0/1 | |
| | + | / | 3600 | 0/1 | |
| #2 | - | high | 90 | 0/1 | 20 |
| | - | low | 300 | 0/1 | |
| | + | / | 11000 | 0/1 | |
| #3 | - | high | 114 | 0/1 | 20 |
| | - | low | 500 | 0/1 | |
| | + | / | 3800 | 0/1 | |
| #4 | - | high | 167 | 0/1 | 16 |
| | - | low | 371 | 0/1 | |
| | + | / | 1500 | 0/2 | |
| #5 | - | high | 2000 | 0/1 | 8 |
| | - | low | 9000 | 0/3 | |
| | + | / | 10000 | 0/2 | |

二次移植ではごく僅かな細胞集団がマウス骨髄に観察される例が見られたものの、明確に多分化能をもつ細胞の存在は明らかにできていない。不運なことに京大動物実験施設内で感染の多発がみられ、移植マウスを多数失うこととなり、ウイルスを再度調整し、実験の繰り返しが必要となっている状態ではあるが、移植後死亡マウス数もようやく減少傾向となり、引き続き実験を継続中である。また、CD34 陽性細胞の二次移植も明確な生着がみられないことが問題である。感染が起こると、マウスへのヒト細胞の生着性が低下する事が知られているが、マウスの飼育環境の改善を併せて行っている。

プレリミナリーな結果ではあるものの、in vitro の実験からは CD34 陰性分画中に造血幹細胞の存在の可能性を示唆する結果を得ており、新たに移植を行ったマウスの解析により、その存在を明らかにしたいと考えている。

<引用文献>

1. Gentner, B., Visigalli, I., Hiramatsu, H., Lechman, E., et.al, Identification of Hematopoietic Stem Cell-Specific miRNAs Enables Gene Therapy of Globoid Cell Leukodystrophy, *Science translational medicine*, 2(58), p. 58ra84.2010.
2. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., et.al., NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells, *Blood*, 100(9), pp. 3175-82.2002.
3. Hiramatsu, H., Nishikomori, R., Heike, T., Ito, et.al., Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammacnull mice model, *Blood*, 102(3), pp. 873-80.2003.

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)

Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., Bader, G.D., Dick, J.E. & Naldini, L., Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion, *Cell stem cell*, 11(6), pp. 799-811. 2012.

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 英文 (HIRAMATSU, Hidefumi)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40362503

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：