

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860741

研究課題名(和文) ヒト造血幹細胞におけるCD34抗原の発現意義とその機能解析

研究課題名(英文) Functional significance of the expression of CD34 antigen on the human hematopoietic stem cells

研究代表者

松岡 由和 (MATSUOKA, yoshikazu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70533420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HSCは、自己複製能と多分化能を有しており、生涯にわたり造血を支持する。従来より、ヒト骨髓HSCはCD34+分画に存在すると考えられてきた。しかしながら、ヒトHSCにおけるCD34抗原の発現意義は、未だに明らかになっていない。そこで、本研究はヒトHSCにおけるCD34抗原の機能的発現意義の解明を目的とした。本研究期間において、申請者は、CRISP/Cas9システムを用いることにより、ヒトCD34+ HSCからのCD34抗原のknock-out(KO)に成功した。しかしながら、今後の実験を正確に行うためには、KO効率をさらに上げる必要があり、現在高効率でのKOシステムを検討している。

研究成果の概要(英文)：The hematopoietic stem cells (HSCs) possess both self-renewal and multi-lineage differentiation abilities and maintain lifelong hematopoiesis. It is generally considered that all of human HSC exist in the CD34-positive fraction. However, it is not clarified that the functional significance of the expression of CD34 antigen on the human hematopoietic stem cells. In order to elucidate this problem, I tried to the knock-out (KO) of CD34 antigen from human HSCs using CRISPR/Cas9 system. In the results, I succeeded to KO CD34 antigen from human HSC, though the frequency of KO was slightly low. Therefore, it is necessary to improve the efficiency of CD34 antigen KO system. The modification of CD34 KO system is now ongoing.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 CD34抗原

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(HSC)は、自己複製能と多分化能を有しており、生涯にわたり造血を支持する。一般に、ヒト HSC は CD34 抗原陽性(CD34⁺)分画に存在すると考えられており、骨髄内微小環境(ニッチ)においてその未分化性を維持していると考えられている。一方で、近年、ヒト臍帯血由来 CD34 抗原陰性(CD34⁻)分画にも HSC が存在する事が明らかとなった。しかしながら、ヒト HSC における CD34 抗原の発現意義は明らかになっておらず、ヒト CD34^{+/-} HSC の特性理解には、CD34 抗原の機能を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究は以下の点を目的とし行った。

- (1) ヒト HSC における CD34 抗原の発現意義とその機能解析。
- (2) ヒト臍帯血由来 CD34^{+/-} HSC および骨髄由来 CD34⁺ HSC の幹細胞特性の比較解析。
- (3) ヒト骨髄間質細胞(MSC)との接触を介した、CD34⁻ HSC から CD34⁺ HSC への転換機構の解明。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト HSC からの CD34 抗原の knock-out (KO)による機能解析。

申請者は、近年、ヒト臍帯血由来 CD34^{+/-} HSC の陽性マーカーとして CD133 抗原を同定し報告した(Leukemia, 2014)。この CD133 抗原を陽性マーカーとして用いることで、ヒト臍帯血由来 18Linage 陰性(18Lin⁻)CD34^{+/-}CD133⁺分画に CD34^{+/-} HSC を

それぞれ 1/100 および 1/140 と高度に濃縮可能である。そこで、ヒト CD34⁺ 造血幹/前駆細胞(HSPC)が高度に濃縮される 18Lin⁻CD34⁺CD133⁺細胞から CRISPR/Cas9 を用いて CD34 抗原を KO することにより、ヒト HSC における CD34 抗原の発現意義の解析を試みる。

(2) ヒト骨髄ニッチによる CD34^{+/-} HSC 維持・産生機構の解析。

申請者は最近、ヒト CD34^{+/-} HSC の高度濃縮マーカーとして GPI-80 抗原が有用であることを報告した(Blood, 2016)。この GPI-80 抗原を濃縮マーカーとして用いることにより、ヒト臍帯血由来 18Lin⁻CD34⁺CD38⁻GPI-80⁺および 18Lin⁻CD34⁻GPI-80⁺分画に CD34^{+/-} HSC をそれぞれ 1/21 および 1/28 と高度に濃縮可能である。また、18Lin⁻CD34⁺CD38⁻GPI-80^{+/-}および 18Lin⁻CD34⁻GPI-80^{+/-}細胞を、申請者が独自に樹立した高いヒト HSC 支持能を有する、ヒト骨髄 CD45⁻Lin⁻CD271⁺SSEA-4⁺分画由来間質細胞(DP MSC)と 1 週間共培養すると、18Lin⁻CD34⁺CD38⁻GPI-80⁺ および 18Lin⁻CD34⁻GPI-80⁺細胞からのみ HSC 活性を有する、CD34⁺CD38⁻GPI-80⁺細胞の維持および産生が認められる。そこで、申請者は、DP MSC による HSC 支持因子の同定のため、すでに作製済みである CD34^{+/-} HSPCs に結合性を示すモノクローナル抗体群より、HSC 支持能に対する阻害活性を有する抗体のスクリーニングを行う。その後、阻害活性を有する抗体を用いて、免疫沈降および質量分析により HSC 支持因子受容体の同定を行う。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト HSC からの CD34 抗原の KO による機能解析。

ヒト HSC から CD34 抗原を KO するための予備実験として、ヒト臍帯血由来 18Lin⁻CD34⁺CD133⁺への高効率での遺伝子導入

法を探索した。通常の lipofection 法やレンチウイルスを用いた導入方法では、ヒト HSC への遺伝子導入効率は非常に低いことが知られている。そこで、申請者は、electroporation 法を元に開発された、nucleofection 法を用いて、18Lin⁻CD34⁺CD133⁺へ GFP 遺伝子の導入を試みた。その結果、90%以上の細胞で GFP の発現が認められ、非常に高効率で遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。次いで、この nucleofection 法を用いて、CD34 遺伝子のエキソン 1 を標的とした guide RNA を組み込んだプラスミド (pX458) を用いて、実際に CD34 遺伝子の KO を試みた。その結果、およそ 10%程度の細胞で CD34 遺伝子の KO が認められた。しかしながら、今後の実験に用いるには、十分な KO 効率とは言えない。そのため、現在、Cas9/guide RNA RNP 複合体を細胞内へ直接導入する方法を検討している。

2) ヒト骨髄ニッチによる CD34⁺ HSC 維持・産生機構の解析。

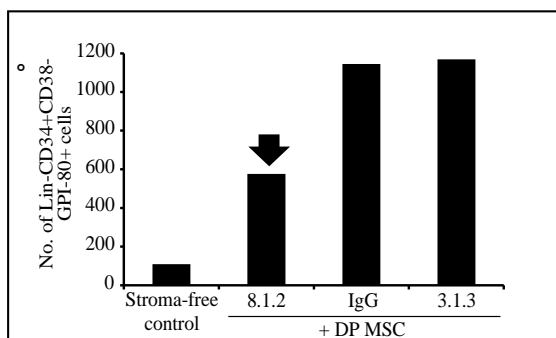


図 1: DP MSC と 18Lin⁻CD34⁺CD38⁻GPI-80⁺細胞の共培養系に各抗体を添加し、1 週間後に細胞を回収した。各 well 中に維持・産生された Lin⁻CD34⁺CD38⁻GPI-80⁺細胞の絶対数を FCM にて計測した。一番左は DP MSC を feeder として用いない control。クローン 8.1.2 (左から 2 番目: 矢印) は非特異的 IgG 抗体添加群 (右から 2 番目) と比較し、50%程度の HSC 支持能阻害効果を示した。一番右は HSPCs に結合はするが阻害活性は有していない抗体。

およそ 250 クローンの CD34⁺ HSPCs に結合性を示すモノクローナル抗体を用いて、前述のスクリーニングを行った。その結果、DP MSC からの HSC 支持能を 50%程度阻害する抗体クローン 8.1.2 を見出した (図 1)。今後、このクローン 8.1.2 の認識する抗原を質量分析にて同定した後、CRISPR/Cas9 により KO して、その機能解析を行う予定である。

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 2 件)

Matsuoka, Yoshikazu et al. CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines A Novel Class Of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic Stem Cells. Cell Transplantation, 査読あり、in press DOI: 10.3727/096368916X694201

Matsuoka, Yoshikazu et al. GPI-80 Expression Highly Purifies Human Cord Blood-Derived Primitive CD34-Negative Hematopoietic Stem Cells. Blood, 査読あり、Vol.128, 2016, pp.2258-2260 DOI: 10.1182/blood-2016-03-704668

[学会発表](計 4 件)

松岡 由和 他、CD133抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発-移植用臍帯血ユニットに含まれるHSC数の計測と臍帯血移植への応用-。第39回日本造血細胞移植学会総会。2017年3月2日~2017年3月4日。島根県。くにびきメッセ、島根県民会館。

松岡 由和 他、GPI-80抗原はヒト臍帯血由来CD34抗原陰性造血幹細胞の高度濃縮/純化マーカーである。第39回日本造血細胞移植学会総会。2017年3月2日~2017年3月4日。島根県。くにびきメッセ、島根県民会館。

松岡由和 他、Human CD34-negative hematopoietic stem cells express potent erythroid/megakaryocytic potential. 第78回日本血液学会学術集会。2016年10月13日～2016年10月15日。京都府。京都国際会館。

Matsuoka, Yoshikazu et al. Human bone marrow-derived CD271⁺SSEA-4⁺ mesenchymal stromal cells support hematopoietic stem/progenitor cells through the cell-cell contact. The 14th Stem Cell Research Symposium. 2016年5月20日～2016年5月21日。兵庫県。淡路夢舞台国際会議場。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松岡 由和 (MATSUOKA, Yoshikazu)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：70533420