サブテーマ名：ＣＰＣ（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究

小テーマ名：造血幹細胞の増幅と増幅造血幹細胞の特性についての解析

テーマリーダー： (財) 先端医療振興財団、客員研究員、金倉　譲

研究従事者： (財) 先端医療振興財団、客員研究員、松村　到

(財) 先端医療振興財団、主任研究員、田中　宏和

● 研究の概要

造血幹細胞は全ての血液細胞を産生しうる最も未分化な造血細胞であり、血液悪性腫瘍などに対する移植療法に利用されているだけでなく、近年ではその可塑性を利用した再生医療への応用が期待されている。臍帯血中には末梢血や骨髄中と比較してより多くの造血幹細胞が含まれることが知られているが、成人を対象とした移植療法に用いる十分な量を得ることは困難である。従って体外で造血幹細胞を増幅させる方法の確立は、臨床サイドから基礎的研究に課せられた急務と考えられる。

造血幹細胞の体外増幅方法としては大きく外的及び内的因子操作法が挙げられる。外的因子操作法においては、造血幹細胞上に発現している受容体の解析から、体外増幅に有用な種々サイトカインの組み合わせが検討され、ある程度一定の見解が得られている。一方、造血幹細胞の自己複製に関与する様々な内的因子すなわち転写因子、細胞内シグナル伝達分子が同定され、外的因子操作と併用することによる応用が期待されているが、それら因子の作用機構に関しては未だ不明な点が多い。また、これまでの造血幹細胞の体外増幅における内的因子操作は、レトロウイルスやアデノウイルスを用いた遺伝子導入法が中心であり、造血幹細胞への導入効率が低いことや白血病の発症など染色体レベルでの影響が不可避である。また遺伝子産物であるタンパク質を直接導入する方法が試みられているが、活性を有する立体構造の解析を要するなど、現在の内的因子操作法では効能、安全性の面で解決すべき問題も多い。

本研究は、マウス及びヒト造血幹細胞の自己複製機構を解析することにより、分子基盤に基づいた造血幹細胞のより効率の良いかつ安全な増幅技術の開発を目的とし、体外増幅した臍帯血造血幹/前駆細胞を用いた臨床研究への応用を目指すものである。

１．フェーズＩ

（１）研究の目標

HOXB4 や Notch など既知の造血幹細胞の自己複製因子をマウス造血幹細胞に導入し、その分子機構について解析することにより、自己複製に関与する種々転写因子群の下流において機能する分子の同定を目指す。

（２）実施内容

マウス lin-, Sca-1+細胞に HOXB4 及び活性型 Notch をレトロウイルスを用いて遺伝子導入した場合、これまでの報告同様、培養 10 日目にはいずれの場合においても約 20 倍の造血幹細胞の増幅が認められた。この時の各々の細胞における DNA content を FACs にて検討した結果、HOXB4 及び活性型 Notch を導入した細胞では S 期及び G2/M 期の割合の細胞が増加しており、細胞周期が亢進していることが明らかとなった。G1-S 期移行に関与する種々細胞周期制御因子の発現変化を RT-PCR 法により検討した結果、

これらの細胞ではG1-S期移行を正に制御するc-Myc、E2F1の発現が誘導され、これらの発現が培養期間中維持されていることが明らかとなった。

様々な細胞の増殖、分化は細胞周期制御機構によって厳密に制御されていることが知られており、この普遍的な細胞増殖の制御機構は造血幹細胞の自己複製、増殖にも強く関与していると推測される。そこでc-Myc、E2F1と合成ステロイド4-hydroxytamoxyfen(4-HT)に結合する変異型エストロゲンレセプター(ERT)とのキメラ分子c-MycERT、E2F1ERTをレトロウイルスを用いてマウスlin-, Sca-1+造血幹細胞に導入した。4-HTによりこれら遺伝子の活性を誘導した場合、2週間の培養後に約20倍の表面形質上未分化な細胞の増殖が認められた。増幅させた細胞はin vitroのコロニーアッセイにおいて各系統の細胞に分化し得たこと、さらにLy5.1マウス由来の細胞にc-MycERTを導入し、4-HT存在下あるいは非存在下で28日間培養した細胞をLy5.2マウスに移植した場合、4-HT存在下で培養した細胞においてのみ生着が認められ、骨髄においてMac1/Gr-1陽性細胞、CD4/8陽性細胞、及びB220陽性細胞が確認されたことから、c-Myc、E2F1を誘導的に発現させることで、骨髄再構築能を有する幹細胞クローンの増幅が得られることが明らかとなった。

一般に細胞周期の強制的な進行は、血清除去やサイトカイン除去などのアポトーシス誘導刺激に対する感受性を亢進させることが知られているが、その分子機構については不明な点が多い。今回のc-Mycの活性を誘導的に発現させ増幅した細胞や、c-Myc、E2F1を過剰発現させ細胞周期を強制的に進行させた細胞株を用いた検討から、これらの細胞では細胞内に過剰な活性酸素種の蓄積が認められ、この活性酸素種を抗酸化剤処理にて消去することによって種々アポトーシス誘導刺激に対する感受性の亢進が解除されたことから、細胞周期の強制的な進行によるアポトーシス感受性亢進には活性酸素種が関与していると考えられた。

(3) 成　果

本研究において、HOXB4やNotchなど既知の因子による造血幹細胞の自己複製は、主としてc-Myc、E2F1などの細胞周期制御因子により制御されており、これら細胞周期制御因子を誘導的に発現させることで、骨髄再構築能を有する幹細胞クローンの増幅が得られた。またc-Myc、E2F1を誘導的に発現させることにより増幅させた細胞には、細胞内活性酸素種の蓄積が認められアポトーシスの感受性が亢進していたことから、内的因子操作に加え、抗酸化剤処理など外的操作を加えることで、より効率の良いかつ安全な体外増幅法が確立できると考えられた。

2．フェーズII

(1) 研究の目標

造血幹細胞の増殖や分化に重要なHOX転写因子群は、同じホメオボックス型転写因子PBX1とヘテロ複合体を形成し、種々の遺伝子発現を正または負に調節することが知られている。また近年、造血幹細胞の自己複製過程においてPBX1は自己複製因子HOXB4の活性を負に制御していること、骨髄球系への分化過程においては別のHOXファミリー遺伝子HOXA10の活性を正に制御していることが報告されている。

そこでフェーズIIでは、造血幹細胞を体外にて効率良くかつ安全に増幅させる新たな試みとして、内因性のHOX/PBX1複合体の活性を変化させ得るPBX1との結合領域部分のHOXタンパクのdecoyペプチドを設計、合成し、ヒト臍帯血造血幹細胞に導入することにより、

1） decoy ペプチドが造血幹細胞の自己複製能や多分化能に及ぼす影響についての検討

2） 系統特異的血球産生を誘導するシステム開発についての基礎検討

3） DNA マイクロアレイによる HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定

を行った。

（2） 実施内容

1）decoy ペプチド導入による新たな内的因子操作法の開発

作成した合成ペプチドは 27 アミノ酸からなり、特性値は分子量 3400Da、酸性度 3.7%、塩基性度 33.33%、中性度 14.8%、疎水性度 48.15%、等電点は 11.60 であった。

臍帯血より磁気ビーズ法にて分離した CD34 陽性造血幹細胞に、末端を蛍光標識した decoy ペプチド(以下 DP と表記)を Profect Reagent System (Tagetting System 社) を用い導入した。細胞内の蛍光強度を FACS にて解析した結果、DP の導入効率は約 70%であり、1 週間の培養後その発現はほぼ完全に消失していた。これまでに造血幹/前駆細胞において HOXB4 は c-*myc* の発現を誘導し、HOXA10 は $p21^{waf1/cip1}$ の発現を抑制することが報告されているが、DP 導入細胞では、c-*myc* の発現上昇と、$p21^{waf1/cip1}$ の発現低下が認められた。この結果から、DP は造血幹細胞内において HOXB4 の機能を増強し、HOXA10 の機能を減弱しうると考えられた。

DP 導入並びにコントロールペプチド(CP)導入細胞をサイトカイン （SCF, Flt-3 ligand, TPO, IL-6, 可溶性 IL-6 レセプター ） 添加無血清培地にて 7 日間培養し、細胞数、表面形質、コロニー形成能及び骨髄再構築能を測定した。DP は、培養後の生存細胞数にほとんど変化を及ぼさなかったが、DP 導入細胞では分化が抑制され、CP 導入細胞に比し未分化なコロニー形成細胞が約 2 倍増加していた。さらに DP 導入細胞及び CP 導入細胞をサイトカイン添加無血清培地にて 7 日間培養し、致死量の放射線照射した NOD/SCID マウスに移植した結果、末梢血、骨髄いずれにおいても DP 導入細胞移植群では、移植後 8 週までに CP 導入細胞移植群に比しより早期から、また有意なキメラ率の増加が認められた。限界希釈法の結果、CP 導入細胞では移植細胞約 7000 個に 1 個骨髄再構築能を有する造血幹細胞が含まれていたのに対し、DP 導入細胞では約 3500 個に 1 個含まれていたことから、DP 導入により約 2 倍の造血幹細胞の増幅が得られることが明らかとなった。さらに DP 導入細胞移植後 12 週のマウスにおける骨髄中ヒト細胞の表面形質を解析した結果、多くが CD33 陽性、及び CD19 陽性細胞で占められており、CD41、GPA 陽性細胞もわずかに認められ、移植細胞が多分化能を有していることが示唆された。また CD34 陽性細胞も検出され、その多くは CD38 陽性、HLA-DR 陽性であったたが、一部これらマーカー陰性の細胞が認められた。次に、移植後 12 週のマウス骨髄を用いた NOD/SCID マウスへの二次移植の結果、再移植後 6 週目に効率は低いもののヒト細胞の生着が認められたことから、DP 導入細胞はマウス生体内で自己複製することにより、長期間にわたり骨髄を再構築しうる能力を維持していると推測された。

2）系統特異的血球産生を誘導するシステム開発

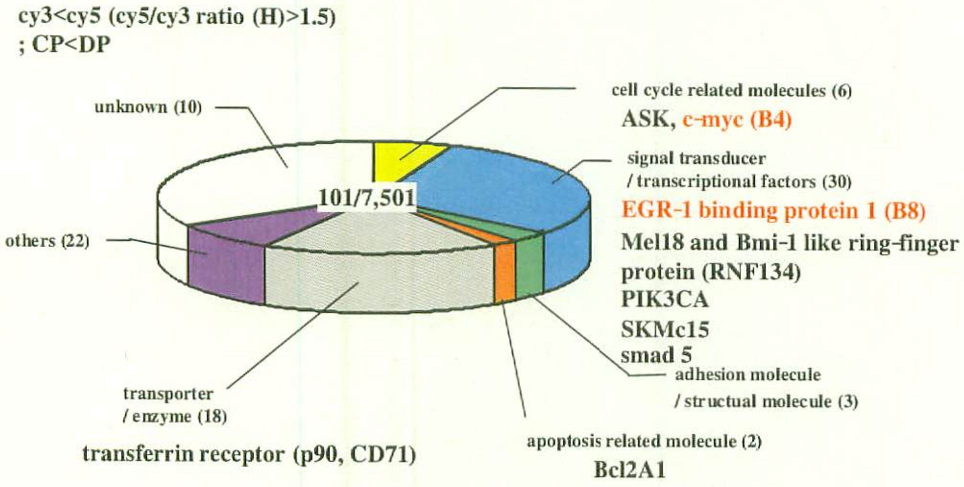
増幅させた造血幹細胞から系統特異的な血球産生を誘導するシステム開発のための基礎的検討として、まず、至適サイトカイン下にて造血幹細胞を巨核球系細胞へ分化させる系の構築を試みた。SCF, FL, TPO 添加 QBSF-60 培地にてヒト臍帯血由来造血幹細胞を 7 日間培養した場合、約 10%が CD41, CD61 陽性の巨核球系細胞の表面形質を呈し、これらの細胞は 2N から 32N までの多倍体化の傾向を示した。次に DP 導入細胞、及び CP 導入細胞を上記条件で培養した結果、CD41, 61 陽性細胞の割合が、DP 導

入細胞では、CP 導入細胞と比較して約 3 倍、30%程度認められ、形態学的にも胞体が大きく、多核の細胞が認められ、各成熟段階の巨核球系細胞が認められた。胞体には顆粒の存在も認められ、正常な巨核球に近い形態を示していたが、FACs を用いても培養液中には浮遊した血小板は確認できなかった。以上の結果より、至適サイトカイン存在下で臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を比較的効率良く巨核球系細胞へ分化誘導可能であり、decoy ペプチドを導入することで、より効率良く巨核球系細胞へ分化誘導出来る可能性が示唆されたが、最終分化である血小板産生には、新たな外的、内的因子操作法が必要であると推測された。

3）HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定

フェーズⅠにおいて、HOXB4 や Notch によるマウス造血幹細胞の自己複製が、主として c-Myc、E2F1 などの細胞周期制御因子により制御されていることを明らかにしてきたが、ヒト造血幹細胞における自己複製機序については未だ不明な点が多い。そこで DNA マイクロアレイを用いた、HOX 転写因子群の自己複製に関与する標的遺伝子の検討を行った。

CP 導入群を cy3 標識、DP 導入群を cy5 標識し、発現強度の比較を行った。遺伝子発現プロファイリングの結果、解析を行った 16,600 遺伝子中 7,501 遺伝子に両群で十分な発現が認められた。DP 導入細胞では 101/7,501 遺伝子の発現が CP 導入細胞と比較して有意に増加しており、73/7,501 遺伝子の発現が有意に低下していた。これらを細胞周期制御因子、シグナル伝達分子、細胞接着、細胞骨格に関与する因子、アポトーシス関連因子、酵素、その他、及び機能が未知の 7 種類にわけて分類したものを 図 1（次頁）に示す。



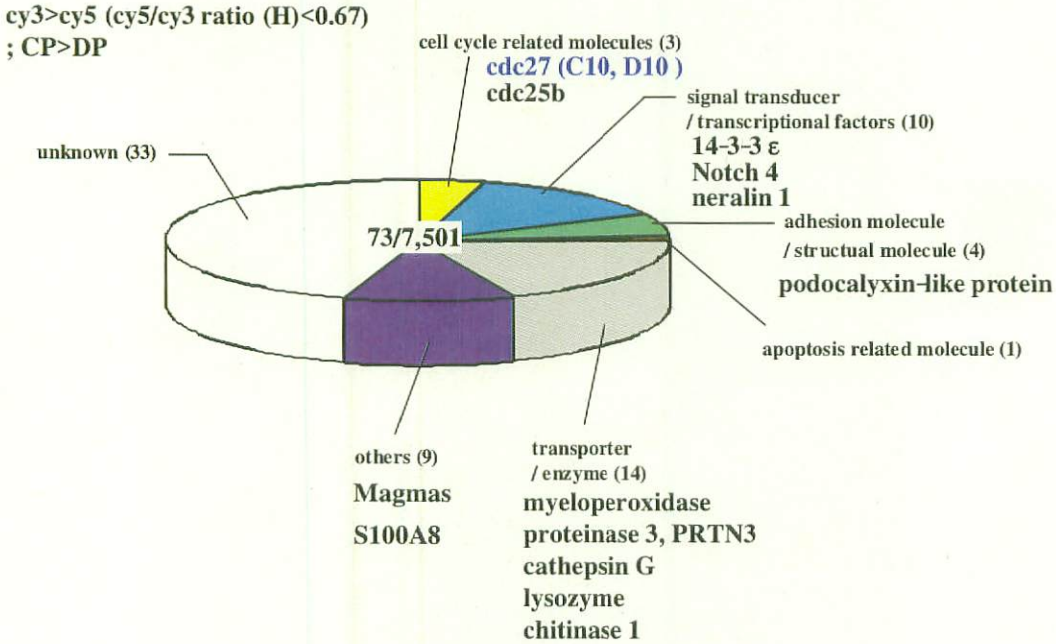


図１ Comparison of Gene Expression Profiles between NC- and DP-delivered hHSCs

これらの遺伝子には、PI3K、MAPK、BMP、Notch シグナルにおけるシグナル伝達分子、及び細胞周期(S 期)制御因子が含まれていた。

以上の結果から、HOX 転写因子群による造血幹細胞の自己複製能、多分化能維持には、これら様々な因子が関与していることが推測された。

（３）成　果

本研究により、HOX タンパクの decoy ペプチドは造血幹細胞において、HOX/PBX1 複合体の活性を変化させることにより、細胞周期制御因子の発現調節を介して造血幹細胞の自己複製を亢進させると推測された。合成ペプチドの造血幹細胞への導入効率は遺伝子導入効率と比較して高く、また細胞内で分解され、導入細胞の染色体に影響を与えないので、本法は造血幹細胞の体外増幅法として遺伝子導入法より安全で有効な方法と考えられた。 また合成ペプチド導入法は、系統特異的な細胞への分化誘導法、さ

らには細胞の増殖、分化機序解明の手法として有用であると考えられた。

3. 今後の展望

今後は、遺伝子発現プロファイリングにおいて変化の認められた遺伝子群の発現を RT-PCR 法等で検証すること、及び遺伝子を誘導あるいは消失させた際の造血幹細胞の特性を検討することにより、HOX 転写因子群の下流に位置する自己複製因子の同定を進めていくことを予定している。また他の内的因子を標的とした合成ペプチドを用いることにより、造血幹/前駆細胞の自己複製あるいは分化を効率的に誘導しうる技術開発へと発展させる予定である。さらに臨床応用に向け、合成ペプチド導入細胞の安全性を中心とした品質の評価を行う予定である。