

# 論 文 要 旨

## A Revised Road Map for the Commitment of Human Cord Blood CD34-negative Hematopoietic Stem Cells

(臍帯血由来 CD34 抗原陰性造血幹細胞を頂点とするヒト造血幹細胞の  
新たな階層制モデルの提唱)

関西医科大学衛生学講座  
(指導：菌 田 精 昭 教授)

角 出 啓 輔

## 【研究の背景および目的】

造血幹細胞(HSC)は自己増殖能と多分化能を有しており、生涯に渡り造血を支持する。ヒト HSC の活性は、NOG や NSG マウスなどの重症免疫不全(SCID)マウスへの異種間移植により、SCID-repopulating cell (SRC)活性として検出される。従来、ヒト SRC (HSC)は CD34 抗原陽性(CD34<sup>+</sup>)分画にのみ存在すると考えられてきた。一方、マウスでは、最も未分化な HSC は CD34 抗原陰性(CD34<sup>-</sup>)分画に存在することが知られている(Science 1996;273:242-245)。しかしながら、ヒトでもマウスと同様に CD34<sup>-</sup>分画に未分化な HSC が存在するか否かについては、十分に検討されていなかった。

上記背景の中、2003 年、Sonoda らはヒト臍帯血(CB)中に骨髓内直接移植法によってのみマウス骨髓に生着可能な CD34<sup>-</sup> SRC が存在することを明らかにした(Blood, 2003;101:2924-31)。しかしながら、ヒト CB 由来 CD34<sup>-</sup> 分画における SRC (HSC)の存在頻度は極めて低く、その幹細胞特性を正確に解明することは困難であった。そこで、Sonoda らは、18 種類の Lineage 抗原(18Lin)を用いる negative selection 法を開発し、ヒト CB 由来 CD34<sup>-</sup> SRC (HSC)を 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> 分画におよそ 1/1,000 の頻度にまで純化することに成功した (Exp. Hematol., 2011; 39:203-213)。さらに、我々は CD133 抗原(Leukemia, 2014;28:1308-1315)および GPI-80 抗原(Blood, 2016;128:2258-2260)が、CD34<sup>-</sup> SRC の陽性分子マーカーであることを見出し、18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>分画および 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>GPI-80<sup>+</sup>分画に CD34<sup>-</sup> SRC (HSC)を、それぞれ 1/140 および 1/27.5 の頻度まで濃縮することに成功した。

しかしながら、CD34<sup>-</sup> HSC の本体を解明するためには、さらなる高度純化が必要であった。そこで、本研究では CD34<sup>-</sup> SRC (HSC)の陽性分子マーカーである CD133 抗原と GPI-80 抗原を同時に利用したヒト CD34<sup>-</sup> HSC の超高度純化法の開発と、CD34<sup>-</sup> HSC の幹細胞特性の解明を目的とした。

## 【方法と結果】

### 1) CD34<sup>+</sup>および CD34<sup>-</sup> HSCs の超高度純化法の開発

免疫磁気ビーズを用いてヒト CB より Lin<sup>-</sup> 細胞を分離し、抗 18Lin、抗 CD34、抗 CD38、抗 CD133 および抗 GPI-80 抗体により染色を行った。次いで、18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>GPI-80<sup>+</sup> (以下、34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>)及び 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>GPI-80<sup>+</sup> (以下、34<sup>-</sup>133<sup>+</sup> 80<sup>+</sup>)細胞を FACS にて分取し、以下の検討を行った。

- a) 分取した 34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>および 34<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>細胞にメイギムザ染色を施し、顕微鏡下でその形態を観察した。その結果、34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>および 34<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>細胞は共に、未分化な芽球様の形態を呈していた。
- b) 34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>および 34<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>分画における SRC の存在頻度を限界希釈法に

より測定した。その結果、両分画における SRC の頻度はそれぞれ 1/4.9 および 1/8.1 であった。これは、現時点におけるヒト CD34<sup>+</sup> SRCs (HSCs)の世界最高純度である。

## 2) CD34<sup>+</sup>および CD34<sup>-</sup> HSCs の幹細胞特性の解明

上記純化法により分取した、34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>細胞(以下、CD34<sup>+</sup> HSC と表記)および 34<sup>-</sup>133<sup>+</sup>80<sup>+</sup>細胞(以下、CD34<sup>-</sup> HSC と表記)を用いて CD34<sup>+</sup> HSCs の幹細胞特性を検討した。

- a) 単一の CD34<sup>+</sup> HSCs の移植により、長期 SRC 活性を評価した。その結果、CD34<sup>+</sup> SRCs (HSCs)は共に 3 次マウスまで継代可能な、1 年以上にわたる長期骨髄再構築能と多分化能を示した。同時に、1 次マウスより回収した骨髄を等分し、2 匹の 2 次マウスに移植を行った。その結果、CD34<sup>+</sup> SRCs 共に 2 匹の 2 次マウスでヒト血球細胞の生着を示す例が認められた。同様に 2 次マウスから 3 次マウスへ移植を行ったところ、複数の 3 次マウスでヒト血球細胞の生着が観察され、マウス体内における、CD34<sup>+</sup> SRCs (HSCs)の自己複製能が観察された。
- b) CD34<sup>+</sup> HSCs の *in vitro* におけるコロニー形成能を検討した。その結果、CD34<sup>+</sup> HSC は高い混合コロニー形成能を、CD34<sup>-</sup> HSC は高い巨核球・赤芽球コロニー形成能を示した。
- c) CD34<sup>+</sup> HSCs の *in vivo* における分化能を検討した。具体的には、CD34<sup>+</sup> HSC および CD34<sup>-</sup> HSC をそれぞれ 200 個ずつ NOG マウスへ移植した。次いで、移植後 20~22 週目にマウス体内に生着したヒト血球細胞における、各種分化抗原マーカーの発現を解析した。その結果、CD34<sup>-</sup> HSC はマウス体内において、CD34<sup>+</sup> HSC と比較し有意に高い巨核球および赤芽球系細胞への分化能を示した。
- d) CD34<sup>+</sup> HSCs 間における階層制の検討を行った。具体的には、CD34<sup>+</sup> SRCs の生着を認めた 1 次マウス骨髄より、18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>および 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>細胞を FACS にて分取し、それぞれを 2 次マウスに移植した。その結果、CD34<sup>+</sup> HSCs より維持・産生された 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>細胞を移植した群では、いずれも 10 匹中 6 匹でヒト CD45<sup>+</sup>細胞の生着を認めた。一方、CD34<sup>+</sup> HSC より産生された 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>細胞を移植した群では、一例も生着が認められなかった。他方、CD34<sup>-</sup> HSC より維持・産生された 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>細胞を移植した群では、10 匹中 4 匹で生着を認めた。

ヒト HSC 支持能を有するヒト骨髄由来ストローマ細胞(Stem Cells 2015;33:1554-1565)と CD34<sup>+</sup>および CD34<sup>-</sup> HSCs との共培養実験においても、マウスへ

の移植実験と同様の結果が認められた。

- e) 単一の CD34<sup>+/+</sup> HSCs における未分化性維持および造血制御に関連する 83 遺伝子の発現を、single-cell qPCR により解析した。多変量解析の結果、CD34<sup>+</sup> HSC および CD34<sup>-</sup> HSC は明確に異なる遺伝子発現パターンを示した。次いで、個々の遺伝子の発現を詳細に解析した。その結果、CD34<sup>+/+</sup> HSCs はともに *KIT* や *RUNX1* といった HSC 未分化性維持に重要な遺伝子を一様に高く発現していた。また、CD34<sup>+</sup> HSC は炎症応答に関連する *IFITM1* 等の遺伝子を高く発現し、一方、CD34<sup>-</sup> HSC は胎生期造血に重要な *EZH2* や赤芽球系細胞への分化に重要な *MYB* を高く発現していた。次いで、microarray より得られたデータを用いて gene set enrichment analysis を行った。Single-cell qPCR から得られた結果と同様に、CD34<sup>+</sup> HSC では炎症応答等に関連する遺伝子群が高く発現しており、CD34<sup>-</sup> HSC では発生や巨核球・赤芽球系の関連遺伝子群が高く発現していた。

#### 【考察】

本研究では、CD34<sup>-</sup> HSC の陽性分子マーカーである CD133 と GPI-80 抗原を同時に用いることにより、ヒト CB 由来 CD34<sup>-</sup> HSC の超高度純化法の開発に成功した。同時に、ヒト CB 由来 CD34<sup>+</sup> HSC の超高度純化にも成功し、本純化法により CD34<sup>+/+</sup> HSCs を世界最高レベルまで純化することが可能となった。

本純化法を用いた単一細胞移植による検討の結果、CD34<sup>+/+</sup> SRCs (HSCs) はともに 1 年以上の長期骨髄再構築能を有していることが明らかとなった。一方、ヒト CB 由来 CD34<sup>-</sup> SRC は、*in vivo* および *in vitro* において CD34<sup>+/+</sup> SRCs (HSCs) を維持および産生可能であった。しかしながら、CD34<sup>+</sup> SRC は両系において CD34<sup>-</sup> SRC を産生できなかった。加えて、ヒト CD34<sup>+/+</sup> HSCs は互いに異なる遺伝子発現パターンを示した。これらの結果より、CD34<sup>-</sup> HSC は CD34<sup>+</sup> HSC とは異なる幹細胞特性を有する HSC 集団であり、CD34<sup>+</sup> HSC よりも階層制において上位の未分化 HSC であると考えられた。他方、ヒト CD34<sup>-</sup> HSC は、高い巨核球・赤芽球系関連遺伝子の発現を示し、実際に *in vivo* および *in vitro* で高い巨核球・赤芽球系細胞への分化能を認めた。しかしながら、マウス体内においては長期骨髄再構築能と多分化能を示すことから、niche 細胞/因子非存在下では、ヒト CD34<sup>-</sup> HSC が直接、巨核球・赤芽球系前駆細胞に分化する新たな分化経路(bypass route)が存在する可能性が示唆された。

本研究により、ヒト CD34<sup>+/+</sup> HSCs の単一細胞レベルでの解析が可能となったことで、不明な点が多かった CD34<sup>-</sup> HSC の幹細胞特性の一端が明らかとなった。本研究より得られた成果は、ヒト HSC の本体の解明や効率的な臍帯血幹細胞移植法、ならびに HSC の体外増幅法の開発への応用が多いに期待される。