

「生体防御のメカニズム」  
平成9年度採択研究代表者

中内 啓光

(筑波大学基礎医学系 教授)

## 「造血幹細胞の分化と自己複製の制御機構」

### 1. 研究実施の概要

マウス骨髄ならびに胎仔肝臓中の造血幹細胞の純化法を確立し、クローナルな解析を行うことが可能になった。また、造血幹細胞の分化と増殖の様式をクローナルに詳しく解析することにより分化の方向性の決定が必ずしも無作為ではないことを示す最初の手がかりが得られた。一方で、純化した造血幹細胞を用いた分子生物学的な解析からいくつかの新規遺伝子がクローニングされ、機能のアセスメントを着実に進めることができた。

### 2. 研究実施内容

#### 1) Paired-daughter cell 実験法による個々の造血幹細胞の分化の様式の解析

マウス骨髄より FACS でクローンソートした 227 個の造血幹細胞を *in vitro* で培養し、最初の分裂を待って娘細胞をマイクロマニピュレーションによって分離した後、培養をつづけた。その結果 93 個 (41%) で両方の娘細胞のコロニーが形成され、そのうちの 81 ペアの娘細胞についてギムザ染色による細胞系譜の解析を行ったところ、1 から 6 種類の血球細胞を含む多様な組み合わせのコロニーが観察された。22 ペア (27%) で両方のコロニーに全く同一の細胞系譜への分化が観察されたが、残りの 59 ペア (73%) においては娘細胞間でコロニーを形成する細胞の種類が一致せず、造血幹細胞が分化の方向性に関して不均等に分裂したことが示唆された。この培養系における各血球細胞の出現頻度を基礎に、娘細胞由来のコロニーの両方に特定の血球細胞が出現する頻度を計算し、期待値と実測値と比較すると芽球、巨核球、好酸球が有意に高い頻度で娘細胞間コロニーに存在することが明らかになった。これらのデータは造血幹細胞からの血液細胞の分化が完全にはランダムに起こっているのではないことを強く示唆しており、造血幹細胞の分化の方向性の決定が *stochastic* に起こっているという血液学の定説をゆるがす興味ある所見である。

#### 2) 造血幹細胞の細胞周期制御機構の解析

造血幹細胞の細胞周期制御機構についても基礎的な解析が進み、造血幹細胞の

98%以上の細胞がG0G1期にあること、さらに長期間（4ヶ月）にわたる BrdU の取り込み実験から、全造血幹細胞の2%だけが造血に関わっているのではなく、骨髄中で幹細胞全体が数週間に一回の頻度でゆっくりと増殖していることを明らかにした。また、一ヶ月以上連続投与しても BrdU を取り込まない造血幹細胞の存在も示された。骨髄より造血幹細胞を分離し、EPO, SCF, IL-3 の存在下で培養し、最初の分裂までにかかった時間を調べると、造血前駆細胞が培養4日目までに最初の分裂を終えるのに対し、造血幹細胞は平均して4日以上、最長では18日経過後によく最初の分裂を開始するものも存在した。

このように *in vivo*、*in vitro* ともに造血幹細胞の細胞周期が特殊な機構により制御されていることを強く示唆するデータが得られた。

### 3) 加齢が造血幹細胞に与える影響

骨髄移植のこれまでの臨床における経験からドナー、レシピエントともに年齢が若い方が生着率が高いとされている。ところが加齢マウスの骨髄を調べてみると、CD34<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (CD34<sup>-</sup>KSL)という造血幹細胞のフェノタイプを持つ細胞が加齢とともに絶対数・相対数ともに増加していることを見いだした。機能的にみても HPP-CFU などの *in vitro* のアッセイ系ではこれらの細胞は若いマウスの骨髄由来の同じフェノタイプを持つ造血幹細胞と有意な差は見られない。また、細胞周期の点でも若いマウス骨髄中の造血幹細胞と有意な差は見られなかった。ところが造血幹細胞移植を行い、長期骨髄再建能における違いの有無を検討したところ、加齢マウス骨髄中の造血幹細胞にはリンパ球系を中心に骨髄再構築能が低いものが相対的に多く含まれていた。しかし、加齢マウスでは骨髄中の CD34-KSL 分画細胞自体が約 18 に増えていることから、全体的には長期骨髄再建能を持つ造血幹細胞の数は若いマウスより2倍程度増加していることが明らかになった。

### 3. 主に研究成果の発表（論文発表）

- Dong Ku Kim, Masaharu Kojima, Takashi Fukushima, Masayuki Miyasaka, and Hiromitsu Nakauchi. Engraftment of human myelodysplastic syndrome derived cell line in transgenic severe combined immunodeficient (TG-SCID) mice expressing human GM-CSF and IL-3. *Eur. J. Haematol.* 61:93-99, 1998.
- Kazuhiko Igarashi, Hideto Hoshino, Akihiko Muto, Naruyoshi Suwabe, Shinichi Nishikawa, Hiromitsu Nakauchi, and Masayuki Yamamoto. Multivalent DNA Binding Complex Generated by Small Maf and Bach1 as a Possible Biochemical Basis for  $\beta$ -Globin Locus Control Region Complex. *The Journal of Biological Chemistry.* *The Journal of Biological Chemistry.*

273:11783-11790,1998.

- Takashi Fukushima, Ryo Sumazaki, Kazuhiko Koike, Masahiro Tsuchida, Akira Matsui, Hiromitsu Nakauchi. Multicolor Flow-cytometric, Morphologic, and Clonogenic Analysis of Marrow CD10-Positive Cells in Children With Leukemia in Remission or Nonmalignant Diseases. *Journal of Pediatric Hematology / Oncology*. 20:222-228,1998.
- Akihiko Muto, Hideto Hoshino, Linda Madisen, Nobuaki Yanai, Masuo Obinata, Hajime Karasuyama, Norio Hayashi, Hiromitsu Nakauchi, Masayuki Yamamoto, Mark Groudine, and Kazuhiko Igarashi. Identification of Bach2 as a B cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulates the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J*. 17:5734-5743,1998.
- Hiromitsu Nakauchi. The hematopoietic stem cells. Are they CD34 positive or CD34 negative? *News and Views. Nature Medicine* 4:1009-1010,1998.