

「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

- (1) 少数の純化した造血幹細胞から全長型cDNAライブラリーを作製し、造血幹細胞に特異的に発現されている膜型蛋白の遺伝子を効率よく同定する系を用いてスクリーニングを行った。得られた候補遺伝子の構造解析を行う一方で、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に遺伝子を導入し発現させるシステムをそれぞれ確立した。
- (2) 造血幹細胞と同様の方法を用いてマウス胎児肝臓中に含まれる肝幹細胞を分離同定する方法を確立した。この肝幹細胞は成熟肝細胞ならびに胆管上皮細胞に分化することが可能であるが、いまのところ血液細胞への分化は認められない。また、造血幹細胞を肝幹細胞の培養系に導入しても肝幹細胞は誘導されない。造血幹細胞と肝幹細胞の分化の可塑性はクローナルなシステムでさらに詳しい検証が必要であると考えられた。
- (3) 造血幹細胞の自己複製能を反映するものとして加齢マウス骨髄中に存在する造血幹細胞の性状を解析した。その結果、予想に反して造血幹細胞の数が増加していること、リンパ球系への分化能が低下した欠陥造血幹細胞が出現してくることが明らかになった。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 造血幹細胞に発現されている遺伝子のクローニング

造血幹細胞持つ多分化能と自己複製能を支える分子機構を明らかにするためには造血幹細胞に特異的に発現されている遺伝子を同定することが必要となる。そこで純化した5000個の造血幹細胞よりmRNAを抽出し、これを材料にしてPCRに基づくサブトラクション法であるRepresentational Difference Analysis、目的とする遺伝子が造血幹細胞の細胞表面に存在すると仮定したSignal Sequence Trap法、膜通過シグナルシーケンスを持つ遺伝子を選択的にクローニングするTransmembrane Trap法などを行った。得られた候補遺伝子の構造解析ならびに機能解析を進め、サイトカイン受容体類似の構造を持つ二つの新規遺伝子Cytokine Receptor-like Molecule(CRLM-2)ならびにM83について解析し、その

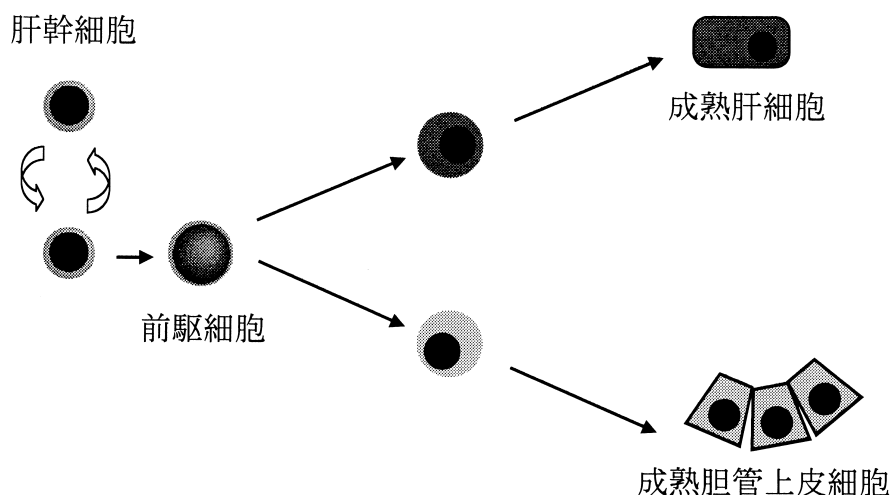
結果を報告した。これ以外にも前述のスクリーニングから造血幹細胞に特異的に発現している遺伝子を数多く同定することができた。

## (2) 造血幹細胞の分化の可塑性と他の幹細胞との比較

マウス胎児肝臓中に存在する造血幹細胞が受容体型チロシンキナーゼであるTie-2を発現していることを明らかにし、マウス胎児肝臓中においても単細胞レベルの移植実験が可能になった。これにより骨髄と胎児肝臓中に存在する造血幹細胞の自己複製能を定量的に比較解析することが可能になった。

一方で、胎児肝臓には造血幹細胞以外に肝臓の幹細胞が存在すると考えられる。しかし、胎児ならびに成体を問わず肝幹細胞の存在を明確に示した仕事は無い。造血幹細胞で用いたFACSとモノクローナル抗体による細胞分離法を用い、マウス胎児肝臓中に存在する多能性（肝細胞および胆管上皮細胞に分化できる）および自己複製可能な肝幹細胞を分離同定することに成功した。また、この細胞はin vitroでも自己複製させることが可能であることから、遺伝子導入も容易である。造血幹細胞は分化の可塑性を持っていて肝細胞にも分化できるとする報告もあるが、我々が純化した造血幹細胞や肝幹細胞を用いる限り、それぞれの間での分化の可塑性は認められていない。やはり幹細胞の可塑性はクローナルなレベルで厳密に検討されるべきことと考えられた。

## 肝幹細胞システム



## 3. 造血幹細胞に発現されている遺伝子の転写制御

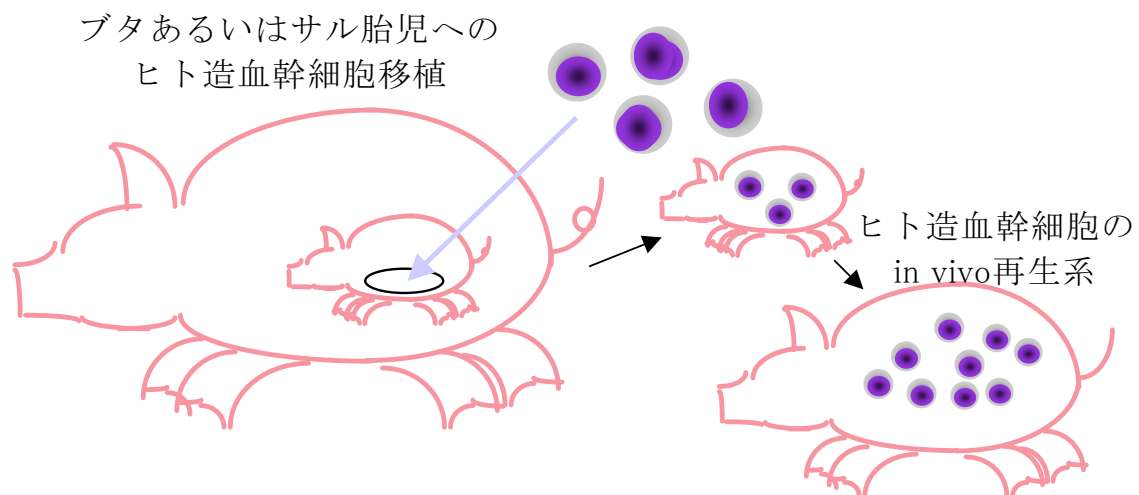
6つのzinc fingerモチーフとSNAGドメインを持つ最近同定されたGfi1ならびにGfi1bという転写因子が造血幹細胞に強く発現されていることを明らかにした。レトロウイルスベクターに組み込み、遺伝子導入により機能アッセイを行ったところ

造血前駆細胞の増殖ならびに細胞周期に影響を与えることがわかった。

発現誘導型のGATA-2ドミナントネガティブフォームのコンストラクトでトランスジェニックマウス作製を試みたが一匹も生まれてこなかった。おそらくリークして発現されたGATA-2ドミナントフォームが胎児に対して致死的に作用したと考えられた。今後、in vitroで遺伝子導入し、その発現が造血幹細胞の分化や自己複製に与える影響を解析する予定である。

#### 4．動物個体を利用したヒト造血幹細胞のアッセイ系ならびに増殖系の開発

ブタ胎児へのヒト造血幹細胞の子宮内胎児細胞移植の系を確立し、PCRレベルでは80%以上の確立でヒト血液細胞の生着が得られるようになった。しかし、高いキメリズムを安定して得ることは難しく、今後さらに工夫が必要と考えられた。一つの可能性としてヒト・ブタ間の種差により造血幹細胞の分化・自己複製に必要な微小環境因子が違いすぎることが考えられる。そこでカニクイザルを用いてヒト造血幹細胞の子宮内胎児細胞移植の実験を開始した。サルは妊娠期間が長いいため、まだ結果が得られていないが、既に2匹の胎児に移植を行った。



#### 5．加齢と造血幹細胞の関係。

生体内での造血幹細胞の自己複製を反映するものとして、加齢マウス(18カ月齢)における造血幹細胞の数と機能について解析した。同数の若いマウスならびに加齢マウス骨髓細胞を致死量放射線照射した若いマウス移植したところ、予想に反して加齢マウスの方が強い造血活性を示した。詳細な解析から加齢マウスでは造血幹細胞数が2倍に増加していること、同時に自己複製能は持っているがリンパ球系への分化能が低下している欠陥造血幹細胞および造血前駆細胞も増加していることが明らかとなった。造血幹細胞はin vivoで自己複製する際に、分化能に欠陥を示す造血幹細胞も産生されてくることが示唆された。加齢マウス骨髓中で造血幹細胞の絶対

数が増えているということを明確に示したことは、現在ドナーに年齢制限をもうけている骨髄移植医療にもインパクトのある成果である。

### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroshima, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Nakauchi, H : Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature Immunol.* 1:441-446, 2000

Suzuki A, Taniguchi H, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yazawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H : Clonal colony formation of hepatic stem/progenitor cells enhanced by embryonic fibroblast conditioning medium. *Transplant Proc* 32 : 2328-2330, 2000

Suzuki A, Taniguchi H, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yazawa K, Otsuka M, Yoshiki A, Kusakabe M, Fukao K and Nakauchi H : Proliferative and functional ability of transplanted murine neonatal hepatocytes in adult livers. *Transplant Proc* 32:2370-2371, 2000

Zheng YW, Taniguchi H, Suzuki A, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H : Effects of combined growth factors on clonal growth and albumin secretion of murine fetal hepatocytes in low density culture. *Transplant Proc* 32:2372-2373, 2000

Zheng YW, Taniguchi H, Suzuki A, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H : Effects of four extracellular matrices associated with growth factors on clonal culture and proliferation of murine fetal hepatocytes. *Transplant Proc* 32 : 2498-2499, 2000

Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H : Flow-Cytometric Separation and Enrichment of Hepatic Progenitor Cells in the Developing Mouse Liver. *Hepatology* 32 : 1230-1239, 2000

Hsu HC, Ema H, Osawa M, Nakamura Y, Suda T and Nakauchi H : Hematopoietic stem cells express Tie-2 receptor in the murine fetal liver. *Blood* 96 : 3757-3762, 2000

Sudo K, Ema H, Morita Y and Nakauchi H : Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192 : 1273-80, 2000

Ema H, Takano H, Sudo K and Nakauchi H : In Vitro Self-Renewal Division of Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med* 192 : 1281-1288, 2000

Nakauchi H, Osawa M, Sudo K and Ema H Isolation and Characterization of

CD34-Low/Negative Mouse Hematopoietic Stem cells. In : "*Cell Therapy.*", Y. Ikeda, J. Hata, S. Koyasu, Y. Kawakami, Y. Hattori ( eds ) Springer-Verlag Tokyo. : 95-103, 2000.

Hideo Ema and Hiromitsu Nakauchi. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95 : 2284-8, 2000.

Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG and Takahama Y A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164:256-64, 2000.

Watanabe N, Yamaguchi T, Akimoto Y, Rattner JB, Hirano H and Nakauchi H Induction of M-phase arrest and apoptosis after HIV-1 Vpr expression through uncoupling of nuclear and centrosomal cycle in HeLa cells. *Exp Cell Res* 258 : 261-9, 2000.

Taniguchi H, Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K and Nakauchi H Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver. *Transplant Proc* 32 : 249-51, 2000.

Fujiki Y, Onodera M, Yamaguchi T, Osawa M, Sudo K, Hamada H, Ema H, Shibuya A, Takiguchi M, Kubo T and Nakauchi H Dominant expansion of human T cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice implanted with human bone fragments. *Exp Hematol* 28 : 792-801, 2000.

Hiroshima T, Iwama A, Morita Y, Nakamura Y, Shibuya A and Nakauchi H Molecular cloning and characterization of CRLM-2, a novel type I cytokine receptor preferentially expressed in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272 : 224-9, 2000.

Tahara-Hanaoka S, Ushijima Y, Tarui H, Wada M, Hara T, Imanishi S, Yamaguchi T, Hattori T, Nakauchi H and Koito A Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates. *Microbiol Immunol* 44 : 489-98, 2000.

Miyoshi H, Ehashi T, Ema H, Hsu HC, Nakauchi H and Ohshima N Long-term culture of fetal liver cells using a three-dimensional porous polymer substrate . *Asaio J* 46 : 397-402, 2000.

Mitsujiro Osawa\*, Sousuke Miyoshi\*, Neal G. Copeland, Debra J. Gilbert, Nancy A. Jenkins, Takashi Hiroshima, Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Atsushi Iwama, and Hiromitsu Nakauchi. Characterization of Murine Interleukin-13 Receptor alpha 1 Gene. *Immunogenetics*. 51:974-81, 2000.

Tun T, Miyoshi H, Ema H, Nakauchi H and Ohshima N : New type of matrix

support for bone marrow cell cultures : in vitro culture and in vivo transplantation experiments. *Asaio J* 46 : 522-6, 2000.

Motohashi T, Miyoshi S, Osawa M, Eyre HJ, Sutherland GR, Matsuda Y, Nakamura Y, Shibuya A, Iwama A and Nakauchi H : Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel five-span transmembrane protein gene, M83. *Biochem Biophys Res Commun* 276 : 244-50, 2000.