

「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)
(東京大学医科学研究所 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

今年度はこれまでに行ってきた造血幹細胞の分化や自己複製に関与していると思われる候補遺伝子の機能解析を中心に研究を進めた。幹細胞としての能力を規定すると思われる分子の解析から、lnk というアダプター分子のノックアウトマウスにおいて造血幹細胞数ならびに自己複製能力が有意に増強していることを明らかにした。また、造血幹細胞が Hoechst 33342 色素を強く排出する性質 (Side Population 細胞) を持っている原因となる分子 (bcrp-1) を発現クローニング法により同定した。さらに造血幹細胞に発現されている転写因子である GATA-1、Gfi-1b、STAT-5、C/EBP などの機能についてもそれぞれ解析を行い、血液細胞の分化に与える影響を明らかにした。細胞生物学的な面では造血幹細胞の分化の可塑性について詳細な解析を行ったが、これまでに報告されている知見を再現することはほとんどできていない。しかし、我々が分離同定した肝幹細胞については同一胚葉由来である膵臓の膵管細胞や小腸粘膜細胞への分化を確認することができた。

2. 研究実施内容

1) 造血幹細胞の分化と自己複製に関与する候補遺伝子のクローニングとその機能解析

Lnk は SH-2 と PH ドメインを持つアダプター蛋白である。この遺伝子のノックアウトマウスは骨髄中の B 細胞系および顆粒球系の前駆細胞が増加しているだけでなく、骨髄中の造血幹細胞活性が正常マウスに比較して高い。実際、われわれの開発したアッセイを応用してこのマウスの造血幹細胞を解析したところ Lnk ノックアウトマウスの骨髄細胞数は正常と変わらなかったが、造血幹細胞集団である CD34⁻c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻細胞の割合は約10倍に増加していた。造血幹細胞1個を移植して、個々の造血幹細胞の能力を評価したところ、移植後に再生された造血幹細胞の再構築能は正常より低下しにくい傾向を認め、Lnk 遺伝子によってコードされる分子が造血幹細胞の未分化性維持に抑制的に働くことが示唆された。

造血幹細胞の未分化性維持に関与するもうひとつの候補分子として、造血幹細胞がもつ Hoechst 33342 色素を強く排出する性質を規定するトランスポーターがある。このトランスポーターが造血幹細胞の未分化性の維持にどのように関与しているかを明らかにすることを目的として、骨

髄から FACS で分離した SP 細胞由来の mRNA より全長型の cDNA 発現ライブラリーを作製した。このライブラリーをうずらの繊維芽細胞に導入し、Hoechst 33342 色素で染色した後、FACS で SP 分画細胞を分離培養した。このプロセスを 3 回繰り返すことにより安定して Hoechst 33342 色素を排出する細胞株を樹立し、cDNA を回収した。その結果、ABC transporter の一種である *bcrp-1* 遺伝子をクローニングすることができた。

2) 造血幹細胞の分化の可塑性と他の幹細胞との比較

数年前より造血幹細胞をはじめとする組織幹細胞の分化の可塑性が話題となっていて、造血幹細胞が神経細胞、肝細胞、筋細胞に分化したという報告がなされている。しかしこれらの報告は 1 例を除いて全て細胞集団を移植したものであり、必ずしも一個の造血幹細胞の可塑性を厳密には証明していない。そこで造血幹細胞の可塑性をクローナルレベルで厳密に検証することを目指し、GFP トランスジェニックマウス、LacZ トランスジェニックマウス骨髄より Side Population 細胞、CD34-KSL 細胞を一個、あるいは positive control として全骨髄細胞を致死量放射線照射したマウスに移植し、4 ヶ月以上経過してからドナー細胞による長期骨髄再建を確認した。その後、液体窒素、四塩化炭素、物理的な傷害などを筋組織、肝臓、神経組織などに与えた後、それぞれの組織を回収し、FACS、免疫組織染色、培養、コロニーアッセイなどにより GFP または LacZ 陽性ドナー細胞の有無を詳細に検索した。その結果、ほとんどの臓器でドナー由来の細胞が存在するものの、ほぼ全てがミクログリア、クッパー細胞など、造血幹細胞由来のマクロファージ系細胞であった。まれに Nu-1 をはじめとするニューロンのマーカーを発現している GFP 陽性細胞が認められたもののその頻度は極めて低く、細胞融合や共焦点顕微鏡でも分離できない細胞の重なりの可能性を完全には否定できない。総じて造血幹細胞の可塑性を示すこれまでの報告を支持するようなデータは得られていない。造血幹細胞の可塑性についてはクローナルな系で形態やマーカー抗原の発現だけでなく、機能についても厳密な検討が必要と考えられた。

マウス胎児肝臓由来の肝幹細胞の可塑性についてさらに検討を加えたところ、肝細胞や胆管上皮細胞に分化可能であるばかりでなく、*in vitro* において *insulin*, *glucagon*, *pdx-1*, *amylase* といった膵細胞に特異的に発現される遺伝子群、*gastrin* や *pepsinogen* など胃・小腸粘膜上皮細胞などで発現される遺伝子群が発現されてくることが明らかとなった。そこで GFP でマーキングした肝幹細胞を膵臓や小腸粘膜下に移植したところ、4 ヶ月後に GFP 陽性の膵幹細胞、*acinar cell*、小腸粘膜細胞が存在することを認めた。このように我々が分離同定した肝幹細胞(CFU-C)は肝細胞、胆管上皮細胞のみならず膵細胞や小腸粘膜上皮細胞にも分化する能力を持っていることが確認された。これは肝幹細胞の可塑性を見ているか、あるいは H-CFU-C が未分化な内胚葉系幹細胞であることを示唆するものである。

3) 造血幹細胞の分化や自己複製に関与する転写因子の機能解析

これまでに得られた候補転写因子の造血幹細胞における機能を検討するために、マウス造血幹細胞およびヒト造血幹細胞にレトロウイルスを用いた遺伝子導入を行い、*in vitro* における造血幹細胞の分化能を検定した。その結果、造血幹細胞の分化・増殖を制御する転写因子の新しい機能を明らかにした。

a) ランゲルハンス樹状細胞分化の制御因子

これまで骨髄球分化の制御因子として知られていた C/EBP および PU.1 転写因子がランゲルハンス樹状細胞の分化決定において C/EBP が抑制的に、PU.1 が促進的に関与し、これら2つの転写因子機能のバランスがランゲルハンス樹状細胞の分化制御に重要であることを示した。

b) 好酸球分化の制御因子

造血幹細胞からの赤芽球分化に必須な GATA-1 転写因子が、顆粒球の一種である好酸球分化を強く誘導し、GATA-1 遺伝子欠損マウスにおいては好酸球が分化発生しえないことを確認した。以上の所見は GATA-1 が好酸球分化に必須な制御因子であることを明確に示している。

c) 赤芽球の分化・増殖の制御因子

機能が不明であった zinc finger 蛋白 Gfi-1B が造血幹細胞から赤芽球にかけて特異的に発現することを見いだした。Gfi-1B を強制発現した場合、未分化赤芽球系前駆細胞がエリスロポエチン非依存性に増殖することを見出した。

d) 造血幹細胞の増殖・分化の制御因子

造血幹細胞の増幅に効果が知られているトロンボポエチンは主として細胞内シグナル分子として STAT5 を活性化する。そこで活性型 STAT5 を造血幹細胞に発現させたところ、STAT5 がサイトカイン非依存性に造血幹細胞の増殖および多様な分化を支持することが確認された。以上の所見は STAT5 が造血幹細胞の増殖および多分化能を担う主要な分子の一つであることを示しているが、自己複製の制御因子としても機能しうることが期待され、骨髄移植の系を用いてさらに検討を進めている。

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

ブタ胎児へのヒト細胞の移植は比較的安定して生着するようになったが、キメリズムが高くならない。サルは骨髄微小環境がよりヒトに近いと考えられ、高いキメリズムと免疫寛容が誘導できる可能性が高い。そこで非ヒト霊長類のカニクイサル胎仔に対して子宮内細胞移植の系を立ち上げ、ヒト血液キメラサルを作製することを試み、1)サル SP 細胞の同定法の確立、2)サル CD34 陽性細胞へのレトロウイルスによる遺伝子導入系の確立、3)サル子宮内細胞移植系の確立(超音波ガイド下で胎齢 45 日前後の胎児サルへの経子宮的細胞移植、ならびに胎齢 140 日前後の胎児臍帯からの採血ならびに臍帯への細胞移植)、を達成することができた。実際に 4 匹のサル胎児にヒト臍帯血 CD34 陽性細胞、EGFP 導入ヒト CD34 陽性細胞、EGFP 陽性サルT細胞(胎児臍帯血より採血して得た胎児臍帯血中のT細胞を in vitro で培養して EGFP 遺伝子を導入した後、再び同一胎児の臍帯に細胞を移植)を移植した。技術的には満足の行く進歩が得られたが、結果的には血液キメラが確認されたのは 1 例だけで、今後さらに移植の時期を含めて移植法全体を至適化する必要があると思われた。

3. 研究実施体制

氏名	所属	役職
<u>参加研究者研究グループ名: バイオアッセイグループ</u>		
中内啓光	筑波大学・基礎医学系	教授
<u>研究グループ名: 候補遺伝子機能解析グループ</u>		
山本雅之	筑波大学先端学際領域研究センター・ 基礎医学系	教授
<u>研究グループ名: 動物モデル作成グループ</u>		
工藤修	全国農業協同組合連合会・飼料畜産 中央研究所・豚育種グループ	グループリーダー

4. 主な研究成果の発表 (2000-)

(1) 論文発表

- Hiwasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H, and Iwama A. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J. Exp. Med.* 2002 May.
- Hideki Taniguchi, Atsushi Suzuki, Yun-wen Zheng, Katashi Fukao and Hiromitsu Nakauchi. “Prospective identification and enrichment of hepatic stem cells in the liver by flowcytometric cell sorting.”, 「*Tissue Engineering for Therapeutic Use V*」 (Excerpta Medica), 53-58, 2001.
- Iwama A, Osawa M, Hirasawa R, Uchiyama N, Kaneko S, Onodera M, Shibuya K, Shibuya A, Vinson C, Tenen DG, Nakauchi H. Reciprocal Roles for CCAAT/Enhancer Binding (C/EBP) and PU.1 Transcription Factors in Langerhans Cell Commitment Protein. *J Exp Med.* 195:547-558. 2002
- Sousuke Miyoshi, Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Mitsujiro Osawa, Takashi Hiroshima, Dong-Ku Kim, Yasuhito Tokumoto, Hiromitsu Nakauchi. A transmembrane trap method for efficient cloning of genes encoding proteins possessing transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 289:1192-8. 2002
- Tahara-H. S, Sudo K., Ema H., Miyoshi H., Nakauchi H. Lentiviral Vector-Mediated Transduction of Murine CD34- Hematopoietic Stem Cells. *Exp. Hematology.* 30:11-7. 2002
- Atsushi Suzuki, Yun-wen Zheng, Shin Kanako, Masafumi Onodera, Katashi Fukao, Hiromitsu Nakauchi, Hideki Taniguchi. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *Journal of Cell Biology* 156:173-84. 2002
- Shimizu Y., Honda S., Yotsumoto K., Tahara-Hanaoka S., Eyre HJ., Sutherland G., Endo Y., Shibuya K., Koyama A., Nakauchi H., Shibuya A. Fc α / μ receptor is a single gene-family member closely related to polymeric immunoglobulin receptor on chromosome 1.

Immunogenetics, 8:709–11. 2001

- Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting. *Cell Transplant*. 10:393–6. 2001
 - Tsutomu Motohashi, Yukio Nakamura, Mitsujiro Osawa, Takashi Hiroyama, Atsushi Iwama, Akira Shibuya, Hiromitsu Nakauchi. Increased cell surface expression of C-terminal truncated erythropoietin receptors in polycythemia. *European Journal of Haematology*, 67:88–93, 2001.
 - Tokoro Y., Shibuya K., Osawa M., Tahara-Hanaoka S., Iwama A., Kitamura T., Nakauchi H. and Shibuya A. Molecular Cloning and Characterization of mouse Tspan-3, A Novel Member of the Tetraspanin Superfamily, Expressed on Resting Dendritic Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commu*, 288: 178–183, 2001.
 - Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H and Sorrentino BP : The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7:1028–34, 2001
 - Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H : Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting. *Cell Transplant* 10:393–6., 2001
 - Osada H, Doi S, Fukushima T, Nakauchi H, Seki K, Sekiya S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion*. 41:499–503.2001.
 - Hiromitsu Nakauchi, Kazuhiro Sudo and Hideo Ema: Quantitative assessment of the stem cell self-renewal capacity. Stem Cell III. *Ann N Y Acad Sci* 938:18–25, 2001.
 - Takashi Hiroyama, Atsushi Iwama, Yukio Nakamura, and Hiromitsu Nakauchi. Fractalkine Shares Signal Sequence with TARC: Gene Structures and Expression Profiles of Two Chemokine genes. *Genomics* 75:3–5, 2001.
 - Norihisa Sakamoto, Kazuko Shibuya , Yoshio Shimizu, KatsumiYotsumoto, Tomoyuki Miyabayashi, Seiji Sakano, Takao Tsuji, Eiichi Nakayama, Hiromitsu Nakauchi and Akira Shibuya: A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed von both hematopoietic and non-hematopoietic tissue. *Eur. J. Immunol.* 31:1310–1316, 2001.
 - Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H : Hepatic stem/progenitor cells with high proliferative potential in liver organ formation. *Transplant Proc* 33:585–6., 2001
 - Kaneko S, Onodera M, Fujiki Y, Nagasawa T and Nakauchi H : Simplified Retroviral Vector GCsap with Murine Stem Cell Virus Long Terminal Repeat Allows High and Continued Expression of Enhanced Green Fluorescent Protein by Human Hematopoietic Progenitors Engrafted in Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice. *Hum Gene Ther* 12:35–44., 2001
- (2) 特許出願
なし