

「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

ヒトの造血幹細胞を試験管の中で培養・増殖させることが骨髄移植や造血幹細胞を標的とした遺伝子治療を容易に行うために必要であるが、現時点ではこれは困難である。そこで本研究チームは未だ免疫系が未発達なブタの胎仔にヒトの造血幹細胞を移植してヒトの血液を産生するブタを作り出すことを考えた。母親ブタの子宮を介してブタ胎仔にヒト臍帯血を移植した後、生まれてきたブタ新生仔を調べると、ヒトの血液を産生しているブタが存在することが確認された。現時点ではまだブタの血液細胞に比してヒト血液細胞の占める割合は低いものの、さらに詳しく条件を検討することによりブタの体内でヒト造血幹細胞を増殖させることが可能になるかもしれない。加えて、これらのブタはヒト細胞に対して免疫寛容となっていると考えられ、血液だけでなく肝臓など、ヒトの他の臓器を移植して再生させたり、保存しておくことも将来的に考えられる。

2. 研究実施内容

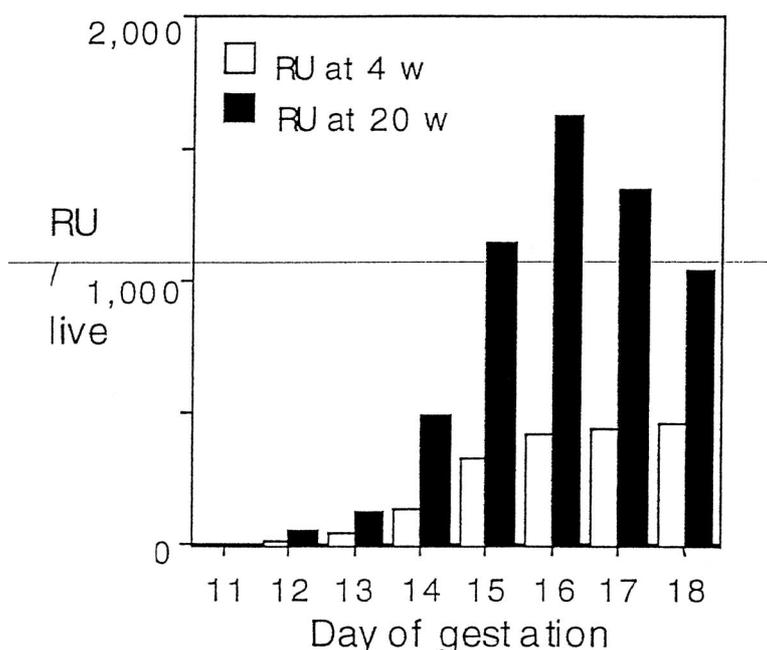
造血幹細胞のin vivoでの自己複製

1) 胎仔肝臓中での造血幹細胞の増殖

造血幹細胞が生体内で最も自己複製を頻回に行っているのは胎生期の胎仔肝臓中での造血であると考えられている。そこで胎生11日から出生前日(胎生18日)までの肝臓内の造血幹細胞活性を測定した。図は肝臓一臓器当たりの平均造血幹細胞活性をRU(repopulating units)で表している。1RUは成体骨髄細胞 1×10^5 個あたりに含まれる造血幹細胞活性と定義されている。胎生12日に50RUと検出された造血幹細胞活性は胎生16日まで増加し、その後減少傾向を示した。このことより(1)胎児肝臓における造血幹細胞活性は胎生16日がピークである(2)胎生11日には定量的に測定できる造血幹細胞活性はないことが分かった。

造血幹細胞活性の増加が造血幹細胞の細胞数の増加によるためか、あるいは一個当たりの造血幹細胞の活性が高くなるためかを知るために、胎生12日と16日の造血幹細胞の絶対数を測定した。一肝臓当たりの造血幹細胞数は胎生12日

で約40個、胎生16日では約1500個と算定され、この間に造血幹細胞が35倍以上増加したことが分かる。RUの結果と総合して考えると胎生12日と16日に検出した造血幹細胞は同等レベルの能力をもった細胞であり、造血幹細胞活性の増加は細胞数の増加によるものと結論した。この時期には体内で肝臓以外に造血を行っている組織は無いことから、造血幹細胞数の増加は肝臓内における自己複製によるものと考えられた。胎児肝臓における造血は造血幹細胞の自己複製の機構を解析する上で、重要かつ興味ある標的組織であることを明らかにした。



胎児肝臓内における造血幹細胞活性 (RU) の増加

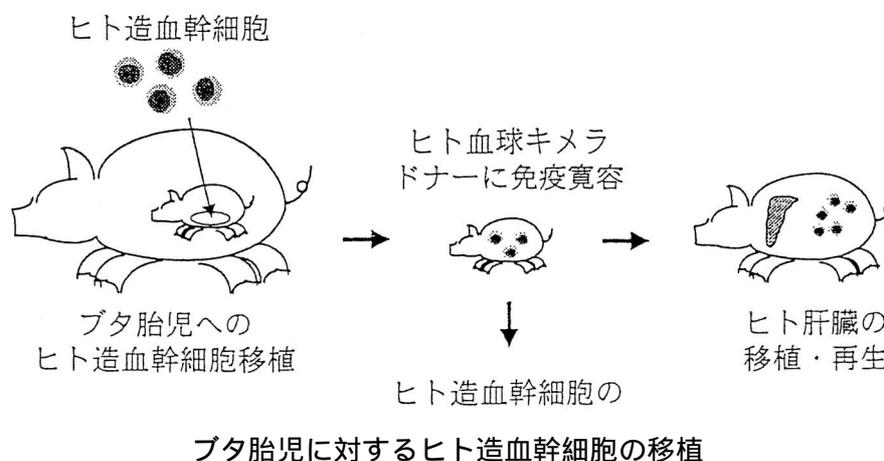
2) 動物個体を利用したヒト造血幹細胞のアッセイ系ならびに増殖系の開発

マウスにおいて造血幹細胞活性はin vivoでの長期骨髄再建能を指標として測定される。一方ヒトでは実験的骨髄移植が困難であることから、未だに造血幹細胞を実験的に同定することは難しい。ヒト造血幹細胞をアッセイするために大動物を用いることができれば、ヒト造血幹細胞を正確に評価することが可能となると考えられるが、これまでヒト血液系を導入できるような免疫不全を持つ大動物は知られていない。そこでヒト造血幹細胞を免疫系が未発達なブタ胎仔に移植する異種移植の実験系を開発し、ヒト血液キメラブタを作出することを試みた。

方法として侵襲の大きいと考えられる開腹術を施行せず、超音波ガイド下に母体の体外から胎仔に造血幹細胞移植を行う方法を開発した。妊娠ブタ35匹の91胎仔にヒト臍帯血由来造血幹細胞移植を行った。その結果10例、35移植胎仔

が術後流産し、分娩に至った移植胎仔52例中14例にヒト細胞が同定可能であった。移植が成立した胎児は妊娠52日で移植後キメラとなった、3匹を除き、すべて妊娠50日以前に移植を行ったものであった。これよりin utero transplantationにより移植成立が可能となるのはブタ胎仔の場合妊娠50日以前と考えられた。

移植細胞はCord Blood (CB) MNCs, T depleted CB, CD34+のすべてにおいて生着が認められ、最長では移植後300日でもPCRにてヒト細胞が同定された。しかしこれまでのところ、いずれのブタでもそのキメリズムは低く、最高でもヒト細胞はブタ細胞に対し0.58%の頻度である。生着したヒト細胞は末梢血、骨髓、胸腺、肝臓、脾臓の全ての解析臓器に認められた。骨髓ではヒト血液細胞はB細胞、骨髓球系細胞、NK細胞、巨核球(血小板系)と、T細胞を除く全ての系列が同定された。また骨髓中にはヒトCD34+の未熟な細胞が存在し、これらをFACS sortingにより回収しコロニーアッセイを施行したところ、in vitroコロニー形成能が維持されていることが示された。またこれらの細胞は致死量放射線照射を施した免疫不全マウスに二次移植すると、骨髓を再構築することも確認できた。このように胎仔へのin uteroヒト造血幹細胞移植により、免疫抑制や移植前処置を施すことなしにヒト血液キメラを作成できることが明らかとなった。一方で、そのヒト血液のキメリズムは低い。移植細胞の更なる検討、改良と、発生工学的手法等によりブタ側の条件(遺伝子導入やノックアウト)を操作することで更にキメリズムをあげることが今後可能になるだろう。移植実験系に於いてはPCRレベルでのマイクロキメリズムであっても免疫寛容に有効とされている。免疫寛容が誘導されていればヒト造血幹細胞の増殖系としてだけでなく、ヒト臓器の再生や保存の場としてキメラブタを利用できる可能性も考えられる。今後は血液キメラとなったブタのリンパ球を採取し、ドナー細胞への免疫寛容が誘導されているかをin vitroの実験系で検討する予定である。



3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

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

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

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

Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A and Nakauchi H : Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 17:286-94, 1999

Yamaguchi T, Watanabe N, Nakauchi H and Koito A : Human immunodeficiency virus type 1 Vpr modifies cell proliferation via multiple pathways. *Microbiol Immunol* 43:437-47, 1999

Matsuda K, Koguma M, Okuyama R, Nakazawa T, Matsuzaki Y, Nakauchi H, Yanai N, Terasaki T and Obinata M : A novel stromal cell-dependent B lymphoid stem-like cell line that induces immunoglobulin gene rearrangement. *J Biochem (Tokyo)* 125:602-12, 1999

Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, Zheng Y, Ito S, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K, Yoshiki A, Kusakabe M and Nakauchi H : Evidence for the presence of hepatic stem cells in the murine fetal liver. *Transplant Proc* 31:454, 1999

Apostolou I, Takahama Y, Belmont C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, Cui J, Taniguchi M, Nakauchi H, Fournie JJ, Kourilsky P and Gachelin G : Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 22;96(13):7610]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5141-6, 1999

Nakauchi H, Takano H, Ema H and Osawa M : Further characterization of CD34-low/negative mouse hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 872:57-66; discussion 66-70, 1999

Murata H, Nakauchi H and Sumida T : Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *Lancet* 354:220, 1999

Saitoh S, Momoi MY, Yamagata T, Nakauchi H, Nihei K and Fujii M : Single-cell analysis of mitochondrial DNA in patients and a carrier of the tRNA(Leu)(UUR) gene mutation. *J Inherit Metab Dis* 22:608-14, 1999

Shibuya K, Lanier LL, Phillips JH, Ochs HD, Shimizu K, Nakayama E, Nakauchi H and Shibuya A : Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* 11:615-23, 1999