

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離

所属 熊本大学発生医学研究センター
器官形成部門・造血発生分野
研究者 高倉伸幸

要旨

いかなる分子機序によって造血幹細胞が自己複製を営むのかを、造血幹細胞の発生的基盤を解明することにより検討し、造血幹細胞の自己複製を誘導する因子を胎児期に造血幹細胞の増殖がいち早く観察される臍腸間膜動脈の血管内皮細胞から単離する。

1. 研究目的

造血幹細胞は多分化能および自己複製能を有することより骨髄移植や遺伝子治療における標的細胞になっている。そこで臨床応用にむけて、造血幹細胞の試験管内での増幅が切望されている。しかし現在のところ造血幹細胞の分化を抑制し、自己複製のみを誘導する成長因子は同定されておらず、新規造血幹細胞自己複製因子の単離が切望されている。しかし本因子の同定に先立って、いかに造血幹細胞が造血器官において自己複製を営むのかを分子レベルで解析する必要がある。そこで本研究では、1) いかなる領域で造血幹細胞の自己複製が旺盛に営まれるのか、2) 幹細胞が自己複製を営む領域ではどのような分子基盤がその幹細胞の局在あるいは未分化性の維持に機能しているのか、3) そのように幹細胞の自己複製を誘導を支持する構成細胞とはなにか、そしてその支持細胞から自己複製に関わる分子とはいかなる分子か、という点について検討し、造血幹細胞の増殖を試験管内で制御可能なシステムを確立し、造血幹細胞移植などの臨床応用に向けて検討することを目的とする。

2. 研究方法

1) 自己複製の営まれる領域

胎生期初期にいかなる領域で造血幹細胞が発生し、いかなる細胞構成によって幹細胞の増殖が支持されるのかを解析する為に、幹細胞の表面抗原であるc-Kitレセプター型チロシンキナーゼの発現を追跡、解析した。

2) 造血幹細胞の自己複製を誘導する分子基盤

造血幹細胞がマウス胎仔においていち早くその増殖が観察される臍腸間膜動脈内で、どのような分子によりその未分化性の維持機構が営まれるのかを解析した。本研究に関しては、本動脈内で造血幹細胞と血管内皮細胞において発現が共通して観察され、その遺伝子のノックアウトマウスで造血、血管新生ともに異常をきたすレセプター型チロシンキナーゼであるTIE2の機能解析を中心に行なった。

3) 造血幹細胞の自己複製を誘導する支持細胞からの分子クローニング

マウス胎生9.5日目の臍腸間膜動脈のみを実体顕微鏡下に採取し、その領域の血管内皮細胞をPECAM-1, TIE2を認識する抗体によりcell sorterによって回収する。得られた血管内皮細胞からpolyA RNAを抽出しcDNAライブラリーを作製し、酵母発現ベクターに組み換える。cDNAの中で細胞外に分泌される可能性の有る遺伝子を酵母を用いたsignal sequence trap法により選択する。得られたクローンのうち新規のものを中心にin situ hybridizationによりmRNAの発現する細胞を確認する。造血組織特異的にmRNAの発現の認められるクローンに関しては、遺伝子全長をクローニングし、COS細胞に細胞外領域のみを含む部分の遺伝子を導入し可溶性蛋白を精製する。血管内皮細胞、造血細胞の発生が両者とも支持できる培養系(P-Sp培養; 図1)に本因子を添加し、造血幹細胞に対し、分化抑制的に働く、あるいは増殖を誘導する精製蛋白に関しては、成体の骨髄中の造血幹細胞に自己複製を誘導する

ものかどうかを液体培養などにより確認する。

3.研究成果

1) マウスの胎仔期において、いかなる領域で造血幹細胞が発生し、どのような構成細胞により造血幹細胞の増殖が支持されるのかを検討した。その結果胎仔期ではまず造血幹細胞はP-Sp(para-aortic splanchnopleural mesoderm; 傍大動脈臓側板中胚葉)領域の最も腹側を走行し、胎仔と卵黄囊の血流に唯一貢献する動脈である臍腸間膜動脈において造血幹細胞がまず最初に増殖することが判明した。

2) 本動脈内の造血幹細胞はc-Kit,TIE2,Flk-1などのレセプター型チロシンキナーゼを発現し、TIE2,Flk-1を発現する血管内皮細胞に接着して存在することが明らかとなった。TIE2遺伝子の欠損マウスでは造血幹細胞の本血管内における増殖が阻害されており、TIE2受容体は造血幹細胞の自己複製に関わる分子であることが推測された。興味深いことに成体の骨髄中の造血前駆細胞分画(Lin⁻c-Kit⁺細胞)はTIE2陰性と、陽性に分画され、TIE2陽性細胞がより未分化な造血幹細胞分画に属し、さらにTIE2の結合因子であるアンジオポエチン-1の発現がTIE2陽性造血幹細胞に特異的に観察された。試験管内でのTIE2陽性造血幹細胞とストロマ細胞との共培養で、本細胞はストロマ細胞下に潜り込み、比較的長期に未分化性を維持するのに対し、TIE2陰性造血前駆細胞はストロマ細胞上で分化した血液細胞のコロニーを形成する。このTIE2陽性幹細胞の試験管内における潜り込みの現象は、本培養中に可溶性TIE2受容体を添加することで抑制されることから、アンジオポエチン-1によるオートクライムループによることが示唆された(図2)。TIE2を強制発現させたBa/F3,B前駆細胞株の解析から、アンジオポエチン-1はインテグリンの活性化を介した、TIE2陽性細胞のコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスへの接着を誘導することが判明し、またTIE2受容体のリン酸化とインテグリン活性化のシグナルにより協調的に細胞死の回避を誘導することが判明した。骨髄内においてアンジオポエチン-1産生造血幹細胞は、微細な血管網を形成する血管の基底膜側に接着、局在している。現在TIE2の活性化単独による幹細胞の自己複製の誘導は観察されておらず、TIE2は細胞分裂の極めて遅い造血幹細胞において血管内皮細胞とマトリックスを介した接着を誘導し、細胞死の回避と細胞周期の遅延化機構に関与するものと考えられる。

さらに造血幹細胞から分泌されるアンジオポエチン-1は血管形成にも関与することが判明した。造血幹細胞の発生に完全に欠損するAML1遺伝子のノックアウトマウスでは、頭部、心外膜、卵黄囊などの領域で緻密な血管網が観察されない。そしてこの表現型はアンジオポエチン-1のノックアウトマウスと類似することが判明した。さらにP-Sp培養では造血幹細胞の増殖が観察される領域に一致して、血管内皮細胞の血管網が観察されるが、このAML1ノックアウトマウスではこの血管網の形成が抑制されている。しかしここに正常なマウス由来の造血幹細胞を添加すると、血液細胞がコロニーを形成する領域に一致して、血管網形成が誘導されることが判明した。本血管網の形成は造血幹細胞がアンジオポエチン-1を分泌し、血管内皮細胞の遊走(ケモタキシス)を誘導することによることが明確となった。実際、成体内でも造血幹細胞は未だ血管網の形成の観察されない無血管領域に血管内皮細胞よりも先に移動し、血管内皮細胞による血管網の形成を遠隔的に誘導することが証明された(図3)。

3) 造血幹細胞が血管内皮細胞に接着する領域は、造血幹細胞の増殖や自己複製における生態学適所(ニッチ)と考えられ、このような領域の血管内皮細胞から造血幹細胞の自己複製に関わる分子が分泌されている可能性がある。しかし成体の骨髄からこのような領域を構成する血管内皮細胞を回収することは困難である。そこで胎仔期に造血幹細胞の旺盛な増殖の観察される臍腸間膜動脈の血管内皮細胞から、signal sequence trap法を用い、細胞外に分泌される可能性のある分子をターゲットにし、造血幹細胞の自己複製に関わる分子の単離を行なった。現在までに解析した酵母クローン200万個中、signal sequenceを持つものが90クローン得られ、その中で新規の遺伝子を25クローン同定した。in situ hybridizationにて臍腸間膜動脈、背側大動脈、胎仔肝に特異的に発現する遺伝子に絞り込み、全長の遺

伝子クローニングを行った。これらはすでに可溶性の蛋白として精製を行っており、精製の終了した分子においては機能解析中である。得られた分子に関しては、造血幹細胞と血管内皮細胞との相互作用に関わる分子であるか否かを解析することが重要である。そこで血管内皮細胞の発生依存的に造血幹細胞の増殖が観察されるP-Sp培養中に、得られた分子を添加することにより、造血幹細胞の増殖、自己複製に関わる分子のスクリーニングを行っており、造血幹細胞の増殖に関与する分子を複数同定することができた。これら分子については、成体内での機能を解析する為に、遺伝子改変マウスを作成中である。

4. 考 察

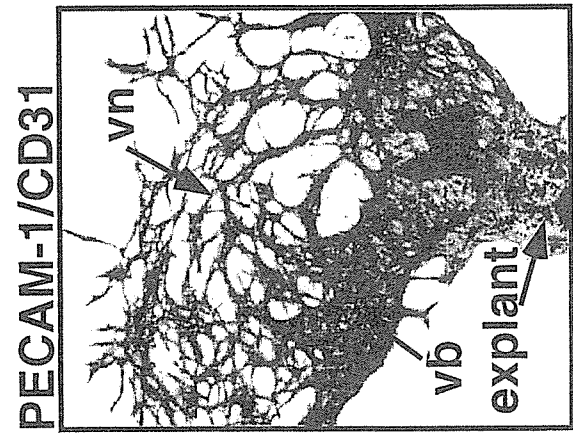
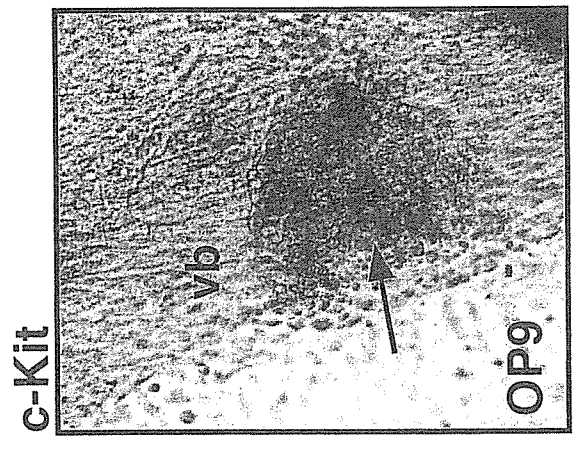
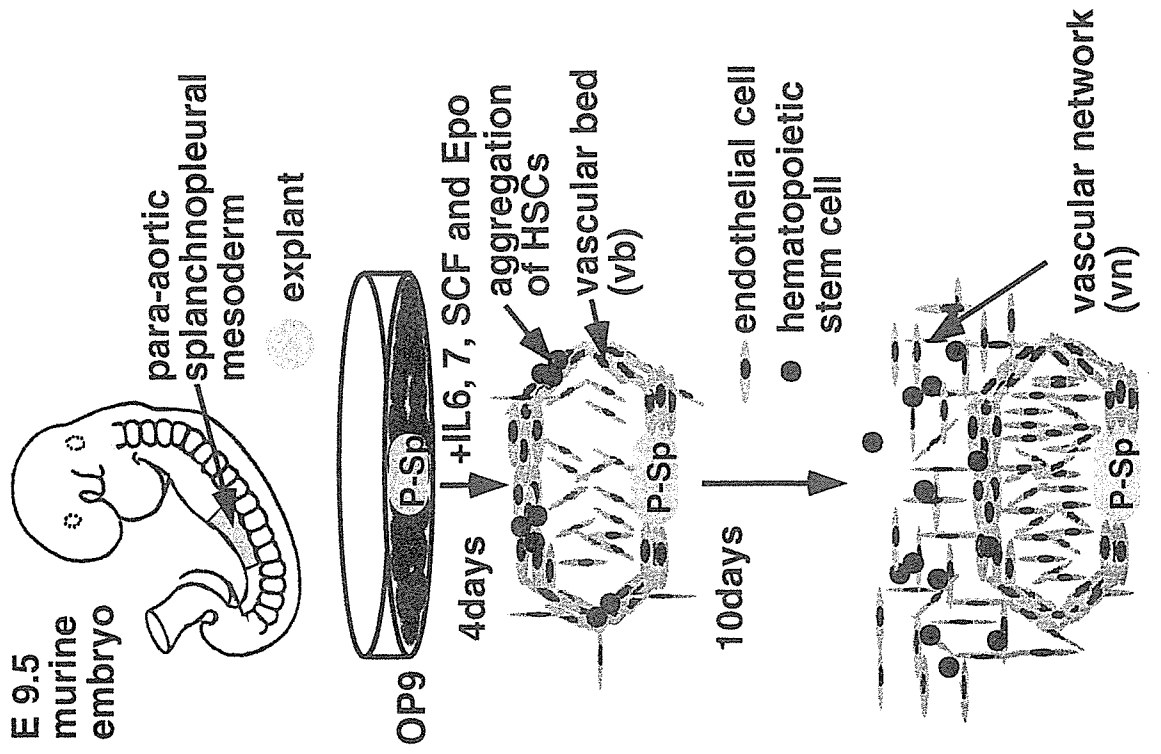
造血と血管形成は、その主たる構成細胞である造血幹細胞と血管内皮細胞が発生的にも機能的にも親密な関係にあることから、切り離して解析するのではなく、両者の相互作用を解析することがそれぞれのイベントを解析する上では重要である。今回の検討結果から、造血幹細胞は自ら骨髓や胎仔肝において共通して観察される緻密な血管網の形成を誘導し、その血管網を構築する内皮細胞を支持細胞として機能させる。そしてその血管内皮細胞の分泌する分子によって、幹細胞の自己複製が営まれると考えられるのである。このように幹細胞の自己複製が営まれる領域（ニッチェ）の解析は、本造血幹細胞ばかりではなく、他の幹細胞システムにとっても重要である。近年では、再生医療が注目されているが、臓器特異的、器官特異的な幹細胞の自己複製を誘導する領域の解明から、それぞれのシステム特異的な幹細胞制御因子の同定がなされると考えられる。

5. まとめ

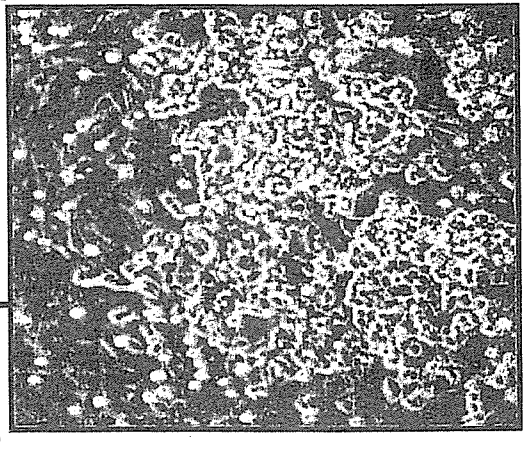
造血幹細胞移植は従来行なわれてきた血液疾患、特に白血病の克服のための治療にとどまらず、最近では各悪性腫瘍におけるミニ移植という治療法にも用いられる手段となってきた。さらに、造血幹細胞が局所で血管網を形成する作用が存在することから、幹細胞を用いた血管新生の細胞治療にも将来応用可能であると考えられる。そのような幹細胞の需要の高まる中、造血幹細胞の試験管内での増幅が社会的にも期待がもたれている。現在臍腸間膜動脈の内皮細胞から造血幹細胞自己複製因子を探索しているが、単一に幹細胞のみを誘導する因子の同定には至っていない。しかし幹細胞の自己複製は複数の分子によって制御されることも予想される為、今後その点を考慮した実験系の計画が必要である。

6. 研究発表

N. Takakura, T. Watanabe, S. Suenobu, Y. Yamada, T. Noda, Y. Ito, M. Satake & Suda T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 102,199-209 (2000)



Hematopoietic Colony



TIE2

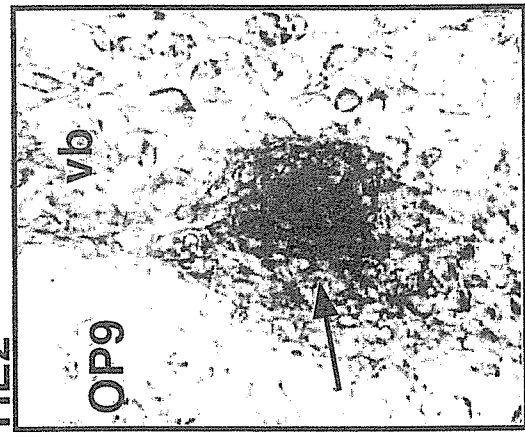


Fig.1 P-Sp Culture System Supports Vasculo-angiogenesis and Hematopoiesis

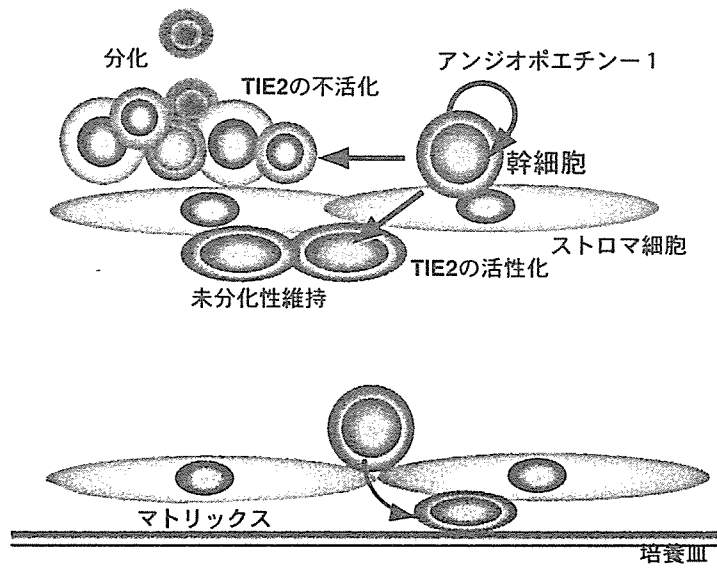


Fig.2 Autocrine loop of TIE2-Angiopoietin-1 is Essential for Transmigration of Hematopoietic Stem Cells under Stromal Cells and Maintenance of Immature Phenotype of Hematopoietic Stem Cells

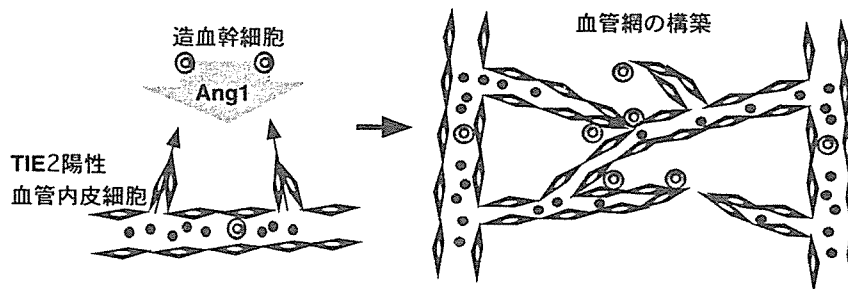


Fig. 3 Hematopoietic Stem Cells Promote Angiogenesis

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社