

20030402

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

幹細胞機能のエンハンスメントによる
非破壊的造血幹細胞移植法の確立

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中内 啓光

平成16(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

免疫拒絶反応の制御系の確立 -----1

中内啓光

II. 分担研究報告

1. 造血幹細胞における Lnk の発現操作に関する研究-----5

高木 智

2. Lnk に対する RNAi を用いた造血幹細胞機能増強に関する研究-----9

岩間 厚志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----13

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----15

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

免疫拒絶反応の制御系の確立

主任研究者 中内 啓光 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

骨髄造血能が亢進していることが知られている Lnk ノックアウト(Lnk-KO)マウスを詳細かつ定量的に解析した。その結果、Lnk-KO マウスでは長期骨髄再建能を持つ造血幹細胞数が1.6倍に増えているだけでなく、増加している個々の造血幹細胞の能力が野生型マウス由来の造血幹細胞に比較して4倍に増加していることが示された。これらの事実は Lnk が単に造血幹細胞数の制御に関与しているだけでなく、造血能、おそらくは自己複製能に直接的に関与していること、Lnk の発現を制御することが造血幹細胞の機能をエンハンスすることに直結する可能性をそれぞれ強く示唆している。これらの結果を基に dominant-negative Lnk 分子の作成、および siRNA を作成し、Lnk 分子の機能発現抑制を試みた。既に両者とも基礎実験の段階で Lnk の発現を抑制する結果が得られており、これらの分子を造血幹細胞に導入し、その in vivo での効果を詳細に検討している。

分担研究者 高木 智 東京大学医科学研究所 助教授
岩間 厚志 東京大学医科学研究所 講師

A. 研究目的

骨髄移植の本質は造血幹細胞の骨髄ニッチへの生着とそこでの自己複製と分化にある。この機構を明らかにし、最小限の前処置で効率よく造血幹細胞を骨髄ニッチへ生着させることが臨床の現場から望まれている。しかしながら骨髄ニッチの本態は勿論のこと、造血幹細胞の分化と自己複製を制御する分子機構の詳細は依然として不明である。我々はこの問題に現実的な側面からアプローチすることを考え、Lnk ノックアウトマウスにおける骨髄造血活性の亢進を解析し、これを造血幹細胞の機能エンハンスメントに利用することを目指す。

B. 研究方法

Lnk^{-/-}マウスにおける造血能亢進の原因を解明するため、造血幹細胞の数ならびに能力をin vivo 競合再構築法を基本にしてCompetitive repopulation unit (CRU)ならびにRepopulation unit (RU)等の指標を用いて定量的に解析した(中内、高木)。また、Lnkの発現を制御することを目的とし、dominant negative formのLnkならびにsiRNAをそれぞれデザインし、その機能について解析をおこなった。(高木、岩間)。

(倫理面への配慮)

今年度の研究はすべてマウスを用いた動物実験であり、実験動物の使用に関しては動物愛護の観点から十分に配慮して実験を行った。

C. 研究結果

LnkKO マウスでは骨髄細胞 10⁵ 個あたり 63RU (野生型マウスでは RU=1)、CRU は 52.6 (野生型マウスでは CRU=3.2) と、どちらも優位に高い値を示し、このマウスが造血幹細胞数においても、造血能においても圧倒的に優れていることが示唆された。実際に一個の造血幹細胞を移植して、そのレシピエント骨髄の中でどれくらい増殖しているかを4ヶ月後に調べたところ野生型が350-1000倍程度増加していたのに対し、LnkKO マウス由来の造血幹細胞は1000-3000倍に増加しており、LnkKO マウスでは造血幹細胞数が増加しているだけでなく、個々の造血幹細胞の能力も亢進していることが証明された。

D. 考察

LnkKOマウスにおける造血能の亢進が、造血幹細胞数の増加によるものだけではなく、個々の造血幹細胞の造血能の亢進も関与していることが実験的に証明することができた。この造血能の亢進の機序が造血幹細胞の自己複製能の強化によるものなのか、それともホーミング能の亢進によるものなのか、詳細は不明である。しかし、Lnk の発現を低下させれば個々の造血幹細胞の造血活性が亢進することが十分に期待できる結果である。実際、Lnk ドミナントネガティブフォームを造血前駆細胞に導入してから移植するとコントロールより高いキメリズムが得られており、造血幹細胞の機能エンハンスメントを目的としてLnkを制御するという戦略の正当性が示されている。

E. 結論

LnkKO マウスにおいては造血幹細胞の絶対数の増加に加えて個々の造血幹細胞の造血能も亢進していることを明らかにした。また、Lnk は造血幹細胞の自己複製能を負に制御する分子であることから、Lnk の発現を低下させることにより造血幹細胞の機能をエンハンスすることが可能であると考えられる。この目的のため、Lnk dominant negative form や LnkRNAi を用いた Lnk の発現制御の手法が有効と考えられた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Takano H, Ema H, Nakauchi H.

Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs.

J Exp Med. 2004 199:295-302.

Ema H, Nakauchi H.

"Homing to Niche," a new criterion for hematopoietic stem cells?

Immunity. 2004 20:1-2.

Ema H, Nakauchi H.

Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells.

Curr Opin Genet Dev. 2003 13:508-12.

2. 学会発表

Nakauchi H. : "In vitro and in vivo clonal analysis of hematopoietic and liver stem cells", HUGO's 8th ANNUAL GENOME MEETING, Cancun (Mexico), April, 2003

Nakauchi H. : "Quantitative assessment of hematopoietic activity in Lnk-deficient mouse bone marrow" International Stem Cell Conference, Singapore 2003, Singapore, Oct. 2003

Nakauchi H. : “Regeneration potentials of the hematopoietic stem cells”
2003, The 7th International Cord Blood Symposium, Tokyo(Japan) Oct. 2003

Nakauchi H. : “In vitro and in vivo clonal analysis of hematopoietic and
liver stem cells”, Symposium on Stem Cell at Pusan National University,
Pusan (Korea), Nov. 2003

Nakauchi H. : “Expression of CD34 and bcrp-1 in mouse hematopoietic stem
cells” The 2nd Seoul International Symposium on Stem Cell Research, Seoul
(Korea), Nov. 2003

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録情報（予定を含む）

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業） 分担研究報告書

造血幹細胞における Lnk の発現操作に関する研究
分担研究者 高木 智 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨

骨髄移植に伴うリスクの軽減を目指して、造血幹細胞の造血能を向上させ選択的増殖優位性を付与することが期待される Lnk 阻害分子の開発を試みた。種々の Lnk 変異体を作製し、Lnk による増殖抑制には SH2 ドメインが必須であること、SH2 変異を持つ Lnk 変異体群はドミナントネガティブ変異体として働くことを明らかにした。SH2 変異体に種々の変異を組み合わせて導入することにより、さらに効率の良いドミナントネガティブ変異体の作製に成功した。

A. 研究目的

骨髄移植の本質は、造血幹細胞を骨髄ニッチェへ生着させ造血系を再構築することにある。この過程にはレシipientの骨髄抑制・破壊による多大なリスクが伴うため、最小限の前処置で効率よく造血幹細胞を骨髄ニッチェへ生着させる技術の開発が望まれる。Lnk は APS、SH2-B とともにファミリーを形成する細胞内アダプター蛋白質である。Lnk 欠損マウスでは造血前駆細胞及び B 前駆細胞の顕著な増加が生じること、Lnk 欠損前駆細胞による造血系再構築能が飛躍的に亢進することを示してきた。本研究では、Lnk 欠損による造血系再構築能亢進のメカニズムを解析し、造血幹細胞の増幅・維持機構解明への貢献を目指す。造血幹細胞の造血能を向上させ選択的増殖優位性を付与することが期待される Lnk 阻害分子を開発し、骨髄移植に伴うリスクの軽減への応用を図る。

B. 研究方法

Lnk は富プロリン部を含む N 末領域、PH、SH2 ドメイン、C 末端のチロシンリン酸化部位を持つ。これらの各部位にアミノ酸置換変異や欠失変異を導入して種々の Lnk 変異体を作製した。得られた各種 Lnk 変異体を c-Kit 依存性増殖を示す細胞株に発現させ、発現細胞の増殖能を親株と比較検討することにより Lnk の機能ドメインを同定した。また、Lnk 機能を阻害するドミナントネガティブ変異体の開発を試み、その造血

前駆細胞への効果についてマウス骨髄移植モデルを用いて検討した。

(倫理面への配慮) 本年度の研究は、培養細胞系及びマウス骨髄移植モデルを用いて推進した。実験動物の取扱いは、「東京大学動物実験規則」及び「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づき、「動物の愛護と管理に関する法案」を遵守して行った。

C. 研究結果

Lnk の各部位にアミノ酸置換変異や欠失変異を導入し種々の Lnk 変異体を作製した。これらの変異体を GFP を共発現するレトロウィルスベクターを用いて肥満細胞株 MC9 に感染導入し、c-Kit 依存性増殖におよぼす影響を GFP 陽性細胞の割合を指標として検討した。N 末領域、PH ドメイン、チロシンリン酸化部位の変異では Lnk による c-Kit 依存性増殖の抑制に影響はなかったものの、SH2 ドメイン変異により抑制効果が全く消失した。次に Lnk 強制発現により c-Kit 依存性増殖を示さない MC9-Lnk トランスフェクタント細胞に SH2 変異 Lnk を導入したところ c-Kit 依存性増殖能が回復し、SH2 変異 Lnk がドミナントネガティブ変異体として働きうることがわかった。SH2 変異に加えて、PH ドメイン欠損、C 末端領域欠損を組み合わせることにより、さらに効率よく野生型 Lnk の機能を阻害することができた。得られたドミナントネガティブ Lnk 変異体をレトロウィルスベクターを用いてマウス骨髄造血前駆細胞に感染導入した後、放射線照射したマウスへ移植した。それらの末梢血を経時的に解析し Lnk 変異体を導入した造血前駆細胞の造血能を比較検討した。Lnk 変異体を導入した造血前駆細胞を移植した群では、コントロール移植群に比し GFP 陽性血球細胞の割合が明らかに増加しており、Lnk 変異体を導入した造血前駆細胞の造血能亢進が観察された。

D. 考察

Lnk による c-Kit 依存性増殖の抑制には SH2 ドメインが必須であり、SH2 変異を持つ Lnk 変異体群はドミナントネガティブ変異体として働くことが分かった。SH2 変異に加えて、PH ドメイン欠損、C 末端領域欠損を組み合わせることにより、さらに効率のよいドミナントネガティブ変異体が作製できた。この Lnk 変異体は、造血前駆細胞に内因性に発現する Lnk 機能を阻害することによりその造血能を亢進させると考えられた。より安全で効率の良いドミナントネガティブ Lnk 変異体のデリバリー法の検討とともに作用機構の解明が肝要である。また、Lnk 依存性抑制経路を阻害する新たな阻害法の開発、標的分子の開拓を推進する意義は大きい。

E. 結論

今回同定した Lnk 変異体は、造血前駆細胞及び造血幹細胞の機能制御に有用であると思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nobuhisa I, Takizawa M, Takaki S, Inoue H, Okita K, Ueno M, Takatsu K, Taga T. Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol Cell Biol.* 23:8486-8494, 2003.

Takaki S, Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon SM, Armstead E, Nakao K, Katsuki M, Perlmutter RM, Takatsu K. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. *J Immunol.* 170:703-710, 2003.

2. 学会発表

イ. 口頭発表 (発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日)

Takaki S, Kubo C, Kwon SM, Sauer K, Armstead E, RM Perlmutter RM, Takatsu K. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in transgenic mice overexpressing Lnk. American Association of Immunologists annual meeting, May 2003.

高木 智、滝澤 仁、高津聖志、抑制性アダプタータンパク質 Lnk の機能ドメインとその阻害による造血前駆細胞の造血能増強効果、第 24 回日本炎症・再生医学会、2003 年 11 月。

滝澤 仁、権 相模、信久幾夫、田賀哲也、高津聖志、高木 智、抑制性アダプタータンパク質 Lnk の機能阻害は造血前駆細胞の造血能を増強する、第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月。

井関將典、久保千代美、權 相模、吉田進昭、高津聖志、高木 智、アダプター蛋白質 APS による B 細胞受容体シグナルの負の制御機構、第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月。

久保千代美、井関將典、權 相模、高津聖志、高木 智、肥満細胞の脱顆粒反応における Lnk ファミリーアダプター蛋白質 APS の制御作用、第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月。

H. 知的財産権の出願・登録情報

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業） 分担研究報告書

Lnk に対する RNAi を用いた造血幹細胞機能増強に関する研究

分担研究者 岩間 厚志 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨

レンチウイルスベクターを用いて RNAi を恒常的にマウス造血幹細胞に発現し Lnk の発現を抑制するシステムを構築した。Lnk ノックアウトマウスの造血幹細胞は強い幹細胞活性を示すことから、Lnk RNAi を用いて Lnk の発現を抑制することにより、正常造血幹細胞の機能増強が期待される。この系を用いてマウス造血幹細胞の機能増強が得られれば、効率がよく安全な骨髄移植が可能になるものと期待される。今年度は Lnk の発現を抑制する RNAi を2種類同定した。Lnk RNAi を造血幹細胞に導入し、その *in vivo* での効果の検討を始めている。

A. 研究目的

造血幹細胞の機能を制御することにより、最小限の前処置で効率よく骨髄移植を行うために、Lnk ノックアウトマウスに見られる骨髄造血活性の亢進を、造血幹細胞の機能エンハンスメントに応用することが本研究の目的である。

B. 研究方法

Lnk ノックアウトマウスと同様の骨髄造血活性の亢進を正常造血幹細胞に付与するために、Lnk の発現を抑制する RNAi システムを構築し、造血幹細胞の機能増強をはかる。

（倫理面への配慮）

ヒトの幹細胞を用いた解析を行う場合には、ヒトの臍帯血や骨髄細胞を入手する際に、インフォームドコンセントを必ず取ることを厳守する。また目的以外の個人情報に関わるような実験には用いず、実験終了後にはすべて処分し検体を保存しないことを厳守する。

C. 研究結果

デザインした12種類の Lnk RNAi の中から Lnk の発現を抑制する RNAi を2種同定した。これらは、Lnk mRNA の発現を効率良く抑制した。これらの RNAi をレンチウイルス発現ベクターに組み込み同様の効果を示すことを確認した。Lnk ノックアウトマウスの造血幹細胞は強い幹細胞活性を示すことから、Lnk RNAi を用いて Lnk の発現を抑制することにより、正常造血幹細胞の機能増強が期待される。そこで、現在、マウス正常造血幹細胞に Lnk RNAi をレンチウイルスにより導入後、骨髄移植を行い、この仮説が実証されるか否か検討中である。

D. 考察

レンチウイルスベクターを用いて RNAi を恒常的にマウス造血幹細胞に発現し Lnk の発現を抑制するシステムを構築した。この系を用いてマウス造血幹細胞の機能増強が得られれば、効率がよく安全な骨髄移植が可能になるものと期待される。マウスの系の検討が終了次第、ヒト造血幹細胞における検討が必要と考えている。

E. 結論

レンチウイルスベクターを用いて RNAi を恒常的にマウス造血幹細胞に発現し Lnk の発現を抑制するシステムを構築した。この系を用いてマウスさらにはヒト造血幹細胞の機能増強が得られるよう検証を推進中である。

F. 健康危険情報

特記すべき情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyagi S, Saito T, Mizutani K-I, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, and Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4207-4220, 2004

Rosenbauer F, Wagner K, Zhang P, Knobloch K-P, Iwama A, and Tenen DG. pDP4, a novel glycoprotein secreted by mature granulocytes is regulated by transcription factor PU.1. *Blood.* 103: 4294-4301

Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development.* 130: 2513-2524

Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Osawa M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tenen DG, Iwama A, Nakauchi H, and Shibuya A. Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and -II, regulate mast cell and macrophage myeloid activation, *J. Exp. Med.* 198: 223-233, 2003

2. 学会発表

Iwama A.(2003) Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. 3rd biennial symposium of the International Eosinophil Society (Colorado).

Iwama A.(2003) Selective activation of STAT5 maintains long-term bone marrow repopulating hematopoietic stem cells ex vivo. 32th Annual Meeting of the international Society for Experimental Hematology. (Paris)

Iwama A, Nakauchi H. (2004) A polycomb gene product, Bmi-1 plays a role in the maintenance of hematopoietic stem cells in multi-potential state. 2nd Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (Boston)

Kato Y, Iwama A, Nakauchi H. (2004) Selective activation of STAT5 maintains long-term bone marrow repopulating hematopoietic stem cells ex vivo. Keystone symposia, "Hematopoiesis" (California)

H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)

1. 特許取得

上記の系が機能すれば特許を申請していきたい。

研究結果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takano H, Ema H, Nakauchi H.	Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs.	J Exp Med.	199	295-302	2004
Ema H, Nakauchi H.	"Homing to Niche," a new criterion for hematopoietic stem cells?	Immunity.	20	1-2	2004
Miyagi S, Saito T, Mizutani K-I, Masuyama N, Gotoh Y, <u>Iwama A</u> , Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, and Okuda A.	The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct multipotent stem cells.	Mol. Cell. Biol	15	4207-20	2004
Rosenbauer F, Wagner K, Zhang P, Knobloch K-P, <u>Iwama A</u> , and Tenen DG.	pDP4, a novel glycoprotein secreted by mature granulocytes is regulated by transcription factor PU.1.	Blood	103	4294-301	2004
<u>Takaki S</u> , Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon SM, Armstead E, Nakao K, Katsuki M, Perlmutter RM, Takatsu K	Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein.	Journal of Immunology	170	703-10	2003
Nobuhisa I, Takizawa M, <u>Takaki S</u> , Inoue H, Okita K, Ueno M, Takatu K, Taga T,	Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein.	Mol. Cell. Biol	23	8486-94	2003
Suzuki A, <u>Iwama A</u> , Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H	Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells.	Development	130	2513-24	2003

Yotsumoto K, Okoshi Y, Shibuya K, Yamazaki S, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Osawa M, Kuroiwa A, Matsuda Y, Tenen DG, <u>Iwama A</u> , Nakauchi H, and Shibuya A.	Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and -II, regulate mast cell and macrophage myeloid activation,	J. Exp. Med.	198	223-33	2003
Ema H, Nakauchi H.	Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells.	Curr Opin Genet Dev.	13	508-12	2003

20030402

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。