

200400092B

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

骨髄ストローマ由来因子による造血幹細胞の増幅に関する研究

平成15年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 北村 俊雄

平成17(2005)年 4月

## 目 次

I. 総合研究報告	
骨髓ストローマ由来因子による造血幹細胞の増幅に関する研究.....	1
北村 俊雄	
II. 分担研究報告	
I. 骨髓ストローマ由来因子による造血幹細胞の増幅に関する研究.....	15
北村 俊雄	
2. Kirre のノックアウトマウスの作成に関する研究.....	23
野阪 哲哉	
3. ISF の機能解析に関する研究.....	28
中島 秀明	
4. Kirre の細胞外分泌型フォームの解析および同時に得られたストローマ細胞由来の膜・分泌型タンパク質の解析.....	34
上野 博夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	48

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）  
総合研究報告書

骨髄ストローマ由来因子による造血幹細胞の増幅に関する研究

主任研究者 北村俊雄 東京大学医科学研究所細胞療法分野教授

研究要旨

骨髄ストローマ細胞のニッチと呼ばれる部分は造血細胞の自己複製に適した場所と考えられている。我々がレトロウイルスベクターを利用した発現クローニング法で同定した骨髄ストローマ細胞由来の分子 ISF および mKirre はいずれも造血幹細胞の増幅を誘導する分子である。本研究ではこれらの分子が造血細胞の自己複製を誘導するメカニズムを解析すると同時に、その発現部位と骨髄ニッチの位置関係を検証した。

ISF はプロトンポンプのサブユニットであり、その造血支持能にはポンプ活性が必須であった。興味深いことに ISF は細胞膜上ではなく ER 膜上に主に発現していた。ISF の発現は多くの細胞に普遍的に認められ、生理的な条件下で造血にどれだけ関与しているかは現時点では不明である。しかしながら MS10 などのストローマ細胞株に過剰発現した場合の造血幹細胞増幅活性は mKirre より明らかに強かった。ISF を過剰発現した場合のストローマ細胞における遺伝子発現変化を DNA チップで調べ、ISF による造血幹細胞の増幅の少なくとも一部は SFRP-1 および TIMP3 の発現抑制によることを見いだした。

一方、mKirre の発現は胎生期では造血幹細胞の発生の地である AGM (Aorta-Gonado-Methonephros) 領域、成体では骨髄中の骨膜に近接した骨芽細胞 (つまり造血ニッチと考えられている部位) に発現していることが明らかにした。この結果は Kirre が生体内においても造血に深く関与していることを示唆している。

北村俊雄 東京大学医科学研究所  
細胞療法分野  
教授

中島秀明 東京大学医科学研究所

研究拠点形成  
間葉系幹細胞プロジェクト  
特任助教授

野阪哲哉 東京大学医科学研究所  
造血因子探索研究部  
客員助教授

上野博夫 国立がんセンター研究所  
ウイルス部  
室長

## A. 研究目的

造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) は、成体骨髄中にごくわずか存在し、自己複製を行うとともにすべての血液細胞に分化する能力を持った細胞である。造血幹細胞は骨髄中のニッチとよばれる微小環境に存在し、自らを複製・維持するとともに、必要に応じて分化・増殖し各種の血球細胞を産生する。このような造血幹細胞の動態は、サイトカイン・増殖因子・ケモカイン・接着因子・細胞外マトリックスなど、様々な外的因子により制御されていると考えられているが、骨髄ストローマ細胞が果たす役割はきわめて重要である。造血幹細胞は骨髄内ストローマ細胞に存在するニッチと呼ばれる場所に存在し自己複製を行っていると考えられている。ストローマ細胞は造血幹細胞と緊密に相互作用しその自己複製・分化・増殖に深く関わっていると考えられているが、その分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。最近、ストローマ細胞に存在するニッチが骨端軟

骨付近の骨梁の骨芽細胞 (オステオブラスト) そのものであることが示唆されにわかに注目されている。

我々は、造血幹細胞の自己複製メカニズムについてストローマ細胞による制御の観点から研究を行ってきたが、近年これに関わる骨髄ストローマ細胞由来因子として ISF (immune suppressor factor) (J. Biol. Chem. 2001) および mKirre (Nat. Immunol. 2003) を同定し報告した。ISF は6回膜貫通型の糖タンパク質で、vacuolar ATPase に会合するプロトンポンプのサブユニットであり、ISF を強発現させたストローマ細胞株ではマウス骨髄細胞の増殖支持能が亢進する。一方 mKirre は骨髄ストローマ細胞株 OP9 よりクローニングした1回膜貫通型分子で、*in vitro* における造血幹細胞の指標である LTC-IC (long term culture initiating cell) や CAFC (cobble stone-like area forming cell) を増幅させる。

本研究では、骨髄ストローマ細胞による造血幹細胞の自己複製制御メカニズムの解明と骨髄ニッチとの機能的関係を明らかにすることを目的として、ISF および mKirre の詳細な生理機能解析を行った。

## B. 研究方法

(I) mKirre の機能および発現部位の解析

### 1. mKirre の造血幹細胞増幅能の検定

mKirre を骨髄ストローマ細胞において過剰発現あるいは siRNA による発現のノックダウンを行い、骨髄ストローマ細胞の造血幹細胞増幅活性あるいは維持活性を *in vitro* の LTC-IC (long-term colony-initiating cell) および *in vivo* の骨髄移植における長期骨髄再建能 LTR-C (long-term reconstitution-competitive) を測定することにより調べる。

### 2. mKirre に対する抗体の作成

mKirre に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作成を行う。

### 3. mKirre の発現部位

mKirre の発現部位は *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色法で行う。

### 4. mKirre のレセプターの同定

造血幹細胞には mKirre のレセプターが発現していると思われる。mKirre に結合するレセプター発現細胞を同定する目的で、mKirre-Fc 融合可溶性蛋白質を作成、精製し、可溶型 mKirre に結合する細胞を免疫染色法およびファックスで検索する。また mKirre レセプターの cDNA を同定するため骨髄細胞から作成したレトロウイルス cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングする。

### 5. mKirre 遺伝子破壊マウスの作成

mKirre のノックアウトマウスの作成を行う。

## (II) ISF による造血幹細胞支持活性の解析

### 1. ISF による造血幹細胞支持活性の解析

骨髄ストローマ細胞 MS10 および PA6 に ISF を過剰発現したときの造血支持活性の変化をコロニーアッセイやマウス *in vivo* の LTR-C アッセイを利用して調べる。またポンプ活性を欠失するミュータントを作成し、ISF のポンプ機能が造血支持活性に必要なかどうかを調べる。

### 2. ISF の発現部位の解析

ISF に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作成を行わない ISF の発現部位を調べる。

### 3. ISF の下流のシグナルの解析

ISF あるいは N 末欠失型の ShIF を過剰発現した場合の下流の遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイにより解析する。発現が変化した遺伝子群のうち幹細胞支持に関与しうる遺伝子 SFRP-1、TIMP3、MMP3 について調べる。

(倫理面への配慮)

ここまでの研究ではヒトのサンプルを使用していない。ヒトのサンプルを利用する場合は医科研の倫理審査委員会の指針に従って、該当者に説明を行い、同意書に署名をいただく。

動物実験においては、Sacrifice するときの麻酔をしっかりと行うなど動物（主にマウス）に苦痛を与えないように配慮する。また1年に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

## C. 研究結果と考察

### (I) mKirre の機能解析

骨髄ストローマ細胞由来I型膜蛋白質 mKirre と造血幹細胞の自己複製の間にはいかなる関係があるかを明らかにするためにさまざまな方向から研究している。

#### 1. mKirre の過剰発現および siRNA によるノックダウン

造血幹細胞維持活性のないストローマ細胞株 MS10 および造血幹細胞支持活性を有する AGM-S3、OP9 において mKirre の過剰発現株を作成した。骨髄細胞より分離した c-kit 陽性、Sca-I 陽性、lineage 陰性の造血幹細胞を含む KSL 細胞と ISF を過剰発現したストローマ細胞と一週間共培養を行い、造血幹細胞支持活性の変化を LTC-IC および LTR-C を測定した。いずれの細胞においても、mKirre の過剰発現による造血支持能の上昇は有意ではなかった。一方、造血支持活性の高い OP9 細胞において mKirre の発現を siRNA でノックダウンすると OP9 細胞の造血幹細胞支持活性が抑制されること

が LTR-C アッセイで判明した。これらの結果は、ストローマ細胞における mKirre の発現は造血幹細胞維持活性に必要である可能性はあるが、mKirre の発現のみでは十分ではないことを示唆している。

#### 2. mKirre の発現部位の検索

mKirre の発現部位を胎生期から成体にかけて発生学的にいかなる制御を受けているかも含めて mRNA in situ hybridization および免疫染色法により検索した。胎生12日に造血幹細胞が発生してくると考えられている AGM 領域に発現が認められた。AGM 以外には migrating myocyte (移動筋肉細胞) と呼ばれる筋肉の前駆細胞にも強い発現が認められた。一方、マウス成体では脳と骨髄に mKirre の限局的な mRNA 発現が認められることが、既にノーザンブロット解析で明らかになっていた。今回、脳と骨髄の in situ hybridization を行い詳細な発現部位を検討した。脳では海馬や嗅球の神経細胞に、骨髄では骨端軟骨付近の骨梁に接した骨芽細胞様の細胞の一部に mKirre の発現が認められた。この発現部位は抗 mKirre ポリクローナル抗体による免疫染色法の結果とほぼ合致している。現在までに mKirre に対するモノクローナル抗体で免疫染色に適した抗体は得られていない。従来、骨髄ストローマ細胞と呼ばれていた

細胞が実は骨芽細胞であること、その一部が概念的に造血ニッチと呼ばれていた場所であることが最近の研究で提唱されている。我々が mKirre の発現部位として同定した部位は最近報告された造血ニッチの部分に一致しており、mKirre が造血ニッチの構成分子であることが示唆された。

### 3. mKirre-Fc 融合蛋白の作成

mKirre cDNA の細胞外領域を免疫グロブリン Fc 領域と融合させた発現ベクターを構築、CHO 細胞に導入し、上清中に放出された mKirre-Fc 融合蛋白をウエスタンブロット法で確認した。さらにこの細胞の培養上清 3L から、プロテイン A カラムを用いて mKirre-Fc 融合蛋白を精製した。精製した mKirre-Fc 融合蛋白は予想されるサイズ (約 70kDa) の単一のバンドとして精製された。

### 4. Kirre-Fc 融合蛋白質による Kirre レセプターの同定

Kirre 融合蛋白質に結合する細胞は Kirre のレセプターを発現していることが示唆される。骨髄中で Kirre 融合蛋白質に結合する細胞を免疫染色法で調べたところ、予備的実験結果ではあるが、造血ニッチから骨端軟骨に少し入った部分にごく一部樹状細胞様の細胞が Kirre 融合蛋白質と結合することが示唆された。現在、この細胞がどのような細胞であるのかを調べて

いる。また FACS で調べたところ、KSL 細胞、および幹細胞であることが示唆される SP 細胞は、Kirre-Fc に結合しなかった。つまり造血幹細胞と考えられる細胞は Kirre レセプターを発現していないことが示唆された。さらに Fc 部位に IgA の配列を一部付加し重合できるようにした FcGA との融合蛋白質を利用することにより感度を上げて、KSL 細胞あるいは SP 細胞に Kirre が結合するかどうかを再度検討したが、この実験においても造血幹細胞分画に Kirre と結合する分子は同定できなかった。

### 5. mKirre のノックアウトマウスの作成

mKirre の生体内での作用を知るためにノックアウトマウス用のコンストラクトを 2 種作成し、ES 細胞で相同組換体を樹立することを試みた。計 1700 位の細胞クローンを解析したが相同組換体は取得できなかった。そこで今度は第一エクソンの両側に lox-p サイトをノックアウトコンストラクトに変更を加え現在さらに ES 細胞の相同組換体を取得するためにスクリーニングを継続している。

### II) ISF の機能解析

ISF を MS10 や PA6 などの骨髄ストローマ細胞に過剰発現すると、KSL 細胞との共培養において KSL 細胞のストローマ細胞への潜り込み現象が顕

著になり、いわゆる cobble stone area を多く形成するようになる。この cobble stone area に含まれる細胞のコロニーアッセイを行ったところ、CFU-GM が特異的に増幅していることが観察された。ISF は ATPase に会合するプロトンポンプの  $\alpha 2$  サブユニットであり、これまでの我々の研究結果は造血幹細胞側に ISF のレセプターが発現しているわけではないということが示唆された。本研究においては ISF により増幅する造血前駆細胞が長期骨髄再建能を有するか調べると同時に、細胞内局在およびその過剰発現によりストローマ細胞における遺伝子発現変化を DNA チップを利用して解析した。

### 1. ISF による造血幹細胞の増幅

ISF およびその N 末欠失変異体 ShIF を発現したときに増幅する前駆細胞に真の造血幹細胞が含まれるかどうかをマウス骨髄長期再建能 (LTR-C) を測定することにより調べたところ、LTR-C 活性は明らかに増幅していた。KSL 細胞を致死量照射したマウスにそのまま移植すると 6 匹中 2 匹に 1% 程度の低いキメラ率で生着した。この KSL 細胞を PA6 細胞と一週間共培養後、同様の条件で移植すると全く生着が認められなくなった。しかしながら、ISF あるいは ShIF を過剰発現した PA6 と共培養した KSL 細胞は 6

匹中 6 あるいは 5 匹に生着し、キメラ率も 2-30% と有意に高かった。これらの結果は ISF の過剰発現により造血幹細胞が増幅していることを示している。

2. ISF による造血幹細胞増幅活性にはそのポンプ機能が必須である。

ISF はプロトンポンプの  $\alpha 2$  サブユニットであり、377 番目のアルギニンをアラニンに置換したミュータントはポンプ活性を欠失する。この変異型ポンプを骨髄ストローマ細胞に過剰発現し、ISF の造血幹細胞支持細胞にポンプ活性が必要かを調べた。ポンプ活性を欠失した ISF および ShIF を過剰発現したストローマ細胞と共培養した KSL 細胞は未熟性を失いコロニーを作れなくなった。この結果は ISF による造血幹細胞支持活性にはポンプ活性が必須であること、つまり造血幹細胞支持において ISF はポンプとして働くことを示唆している。

### 3. ISF の細胞内局在

ISF は 6 回膜貫通ドメインを有する分子であり、何度かのトライアルにもかかわらず、良いモノクローナル抗体がなかなか樹立できなかった。最近、抗ペプチド抗体を作成し、ISF の細胞内局在を調べたところ、ISF は細胞表面ではなく、ER あるいはゴルジに発現していることが示唆された。また GFP 融合蛋白質および FLAG-タグを



付加した蛋白質を利用して細胞内局在を確認した。

#### 4. ISF の過剰発現による遺伝子発現変化

ISF の過剰発現による骨髓ストローマ細胞の造血支持能の分子メカニズムを調べる目的で、ISF および ShIF を過剰発現したストローマ細胞の遺伝子発現解析を行った。DNA チップ解析によって、ISF および ShIF の発現により、MMP3 の発現が 3.3 倍に上昇し、TIMP-3、SFRP-1 の発現がそれぞれ 4.7 分の 1、3.6 分の 1 に低下することが判明した。これら遺伝子について、RT-PCR、ノーザンブロット解析により実際に遺伝子発現が変化しているかどうかを確認したところ、確かに ISF/ ShIF を発現している細胞では MMP-3 の発現上昇、TIMP-3、SFRP-1 の発現低下が見られた。

#### 6. ISF による遺伝子発現変化と造血幹細胞増幅能の機能的つながり

MMP-3 は MMP-9 を活性化し、活性化された MMP-9 は c-kit リガンド SCF の膜結合分子の細胞外ドメインを切断することにより、膜から SCF を放出させる。このことが間接的に造血を活性化している可能性が示唆される。しかしながら我々の実験系における ISF による造血幹細胞増幅には SCF/c-kit シグナルは関与していないことが示唆された。SFRP-1 は造血幹細胞の自

己複製を誘導する Wnt のシグナルを抑制することが知られている。従って、ISF の過剰発現で SFRP-1 の発現が抑制されれば、結果として Wnt のシグナルが強調され造血幹細胞の自己複製が誘導されうる。最近、我々は TIMP3 が Ang-1 に直接結合して Ang-1/Tie-2 のシグナルを抑制することを明らかにした（興味深いことにこの活性に TIMP3 のプロテアーゼ抑制活性は必要ない）。つまり TIMP3 の発現が抑制されれば、結果として Ang-1/Tie-2 のシグナルが強調され造血幹細胞の自己複製が誘導されうる。実際、ISF を過剰発現したストローマ細胞に同時に TIMP3 あるいは SFRP-1 を過剰発現させると、ストローマ細胞による造血幹細胞増幅能は著明に阻害される。以上の結果は、ISF による造血幹細胞の増幅能の少なくとも一部は TIMP3 および SFRP-1 の発現抑制を介していることを示している。

ISF の過剰発現と上記の遺伝子発現の変化の間の因果関係は不明であるが、いくつかの遺伝子の発現変化に共通の原因が存在することが予想される。ISF のポンプ機能が造血幹細胞増幅活性に必須であること、ISF の主な発現部位が ER あることから考えて何らかの分子の分泌促進などが効いている可能性もある。ISF を過剰発現とストローマ細胞から分泌される分子の

変化なども調べたが、現時点までストローマ細胞の培養上清に、上記のような遺伝子発現変化および造血幹細胞増幅能を誘導しうる活性は同定できていない。

#### D. 結論

発現クローニング法により造血幹細胞の自己複製の誘導に関与する骨髄ストローマ細胞由来分子 mKirre と ISF を同定した。mKirre は胎生期には造血幹細胞の発生の地として知られる AGM 領域、成体では骨髄内の骨端付近の骨梁に接した骨芽細胞に発現しており、造血幹細胞を支持する造血ニッチの構成分子であることが示唆された。これらの結果は mKirre が造血に重要な働きをすることを示唆している。一方の ISF は多くの細胞にユビキタスに発現している分子であり、生理的な条件下での造血への関与については不明だが、骨髄ストローマ細胞に過剰発現した場合の造血幹細胞増幅活性は mKirre より強力であった。ISF はプロトンポンプのサブユニットであり、その造血支持活性にはポンプ活性が必須である。ISF を過剰発現したストローマ細胞の造血幹細胞増幅能の少なくとも一部は TIMP-3 および SFRP-1 の発現低下によることが明らかとなった。また ISF による MMP-3 の発現増加も c-Kit のシグナルの増強

を介して造血幹細胞増幅を誘導することが予想される。ISF の過剰発現とこれらの一連の遺伝子発現変化の因果関係に興味を持たれる。この因果関係が明らかにできれば造血幹細胞の自己複製に至適な環境を作ることに関与するかもしれない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yujiri, T., Nawata, R., Takahashi, T., Sato, Y., Tanizawa, Y., Kitamura, T., and Oka, Y. (2003) MEK kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression. *J. Biol. Chem.* 278:3846-3851.

2) Ozawa, T., Sako, Y., Sato, M., Kitamura, T., and Umezawa, Y. (2003) A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat. Biotechnol.* 21:287-293.

3) Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y-C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S. Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M., and Kitamura, T. (2003) Phosphorylation by Aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev. Cell* 4:549-560.

- 4) Nosaka, T., Morita, S., Kitamura, H., Nakajima, H., Shibata, F., Morikawa, Y., Kataoka, Y., Ebihara, Y., Kawashima, T., Itoh, T., Ozaki, K., Senba, E., Tsuji, K., Makishima, F., Yoshida, N., and Kitamura, T. (2003) Mammalian twisted gastrulation is essential for skeleto-lymphogenesis. **Mol. Cell. Biol.** 23: 2969-2980.
- 5) Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003) Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning, powerful tools in functional genomics. **Exp. Hematol.** 31: 1007-1014.
- 6) Bao, Y-C., Tsuruga, H., Hirai, M., Kitamura, T., and Kumagai, H. Identification of a human cDNA sequence which encodes a novel membrane-associated protein containing a zinc metalloprotease motif. **DNA Research** 10: 123-128.
- 7) Murata, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Irie, M., Nakajima, H., Tamitsu, K., Nosaka, T., Asano, S., and Kitamura, T. (2003) A novel tyrosine kinase inhibitor GTP14564 specifically inhibits constitutively active fms-like tyrosine kinase 3 through inactivation of STAT5. **J. Biol. Chem.** 278: 32892-32898.
- 8) Ueno, H., Sakita-Ishikawa, M., Morikawa, Y., Nakano, T., Kitamura, T., and Saito, M. (2003) A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. **Nat. Immunol.** 4:457-463.
- 9) Hisaoka, T., Morikawa, Y., Kitamura, T., and Semba, E. (2003) Expression of a member of tumor necrosis factor receptor superfamily, TROY, in the developing and the adult mouse brain. **Brain Research**, 143: 105-109.
- 10) Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T., and Taga, T. (2003) Requirement of gp130 signaling for the AGM hematopoiesis. **Exp. Hematol.** 31: 283-289, 2003.
- 11) Tahara, H., Fujio, K., Araki, Y., Setoguchi, K., Misaki, Y., Kitamura, T., and Yamamoto, K. (2003) Reconstitution of CD8+ T cells by retroviral transfer of the T-cell receptor ab chain genes isolated from a clonally expanded P815 infiltrating lymphocytes. **J. Immunol.** 171:2154-2160.
- 12) Kumagai, H., Oki, T., Tamitsu, K., Feng, S-Z., Ono, M., Nakajima, H., Bao, Y-C., Kawakami, Y., Nagayoshi, K.,

- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Kawakami, T., and Kitamura, T. (2003) Identification and characterization of a new pair of immunoglobulin-like receptors LMIR1 and 2 derived from murine bone marrow-derived mast cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 307: 719-729.
- 13) Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Masuoka, N., Yamane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2004) Functional analysis of PU.1 domains in monocyte-specific gene regulation. **FEBS letters** 561: 63-68.
- 14) Nishiyama, C., Nishiyama, M., Ito, T., Masaki, S., Maeda, K., Masuoka, N., Yamane, H., Kitamura, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2004) Overproduction of PU.1 in mast cell progenitors: its effect on monocyte- and mast cell-specific gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 313: 516-521.
- 15) Chamoto, K., Tsuji, T., Funamoto, H., Kosaka, A., Matsuzaki, J., Sato, T., Abe, H., Fujio, K., Yamamoto, K., Kitamura, T., Takeshima, T., Togashi, Y., and Nishimura, T. (2004) Potentiation of tumor eradication by adoptive immunotherapy with T-cell receptor gene-transduced T-helper type 1 cells. **Cancer Res.** 64:386-390.
- 16) Nakayama, Y., Nara, N., Kawakita, Y., Takeshima, Y., Arakawa, M., Katoh, M., Morita, S., Iwatsuki, K., Tanaka, K., Okamoto, S., Kitamura, T., Seki, N., Matsuda, R., Matsuo, M., Saito, K. and Hara, T. (2004) Cloning of cDNA encoding a regeneration-associated muscle protease whose expression is attenuated in cell lines derived from Duchenne muscle dystrophy patients. **American J. Pathol.** 164: 1773-1782.
- 17) Ohtsuka M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, M., Kitamura, T., Moriya, H., and Saito, T. (2004) NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101: 8126-8131.
- 18) Ikeda, Y., Imai, Y., Kumagai, H., Nosaka, T., Morikawa, Y., Hisaoka, T., Manabe, I., Maemura, K., Nakaoka, T., Imamura, T., Miyazono, K., Komuro, I., Nagai, R. and Kitamura, T. (2004) Vasorin, a novel TGF- $\beta$  binding protein expressed in vascular smooth muscle

- cells, modulates the arterial response to injury in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**101:10732-10737.
- 19) Nishizawa, H., Matsuda, M., Yamada, Y., Kawai, K., Suzuki, E., Makishima, M., Kitamura, T., and Shimomura, I. (2004) Muscudin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. **J. Biol. Chem.** 279:19391-19395.
- 20) Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Bao, Y.C., Moon, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kawashima, T. and Kitamura, T. (2004) A GTPase activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and differentiation of a leukemic cell line. **Blood** 104: 3550-3557.
- 21) Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T., and Tsuji, K. (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cell** 22:649-658.
- 22) Sasanuma, H., Tatsuno, A., Tsuji, K., Hidano, S., Morita, S., Kitamura, T., Kubo, M., Kitamura, D., and Goitsuka, R. (2004) Transcriptional regulation of SLP-76 family hematopoietic cell adaptor MIST/Clnk by STAT5. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 321:145-153.
- 23) Li N., Nakamura K., Jiang Y., Tsurui H., Matsuoka S., Abe M., Ohtsuji M., Nishimura H., Kato K., Kawai T., Atsumi T., Koike T., Shirai T., Ueno H., and Hirose S. (2004) Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Hum. Mol. Genet.** 13 :171-179.
- 24) Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005) Two-step model of leukemogenesis in multiple lineages by dimerization of MLL fusion protein. **J Clin. Invest.** in press.
- 25) Oceguera-Yanez, F., Kimura, K., Yasuda, S., Higasida, T., Kitamura, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, N., and Narumiya, S. (2005) Ect-2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. **J. Cell Biol.** 168:221-232.
- 26) Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Suzuki, R., Kitamura, T., Akira, S., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2005) Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte

- differentiation. **Cell Metabolism**, in press.
- 27) Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y., and Nosaka, T. (2005) Two-step model of leukemogenesis in multiple lineages by dimerization of MLL fusion protein. **J Clin. Invest.** in press.
- 28) Urano, A., Endoh, M., Wada, T., Morikawa, Y., Itoh, M., Kataoka, Y., Taki, T., Akazawa, H., Nakajima, H., Komuro, I., Yoshida, N., Hayashi, Y., Handa, H., Kitamura, T., and Nosaka, T. Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia. **Mol. Cell. Biol.** in press.
- 29) 北村俊雄 (2003) レトロウイルスによる遺伝子導入法 新遺伝子工学ハンドブック (羊土社) p174-178.
- 30) 箕嶋幸範、川島敏行、北村俊雄 (2003) Aurora Bによりリン酸化された MgcRacGAP は細胞質分裂を制御する 実験医学 21:1218-1221
- 31) 北村俊雄 (2003) レトロウイルスベクター・ポストゲノム研究の強力なツール 必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール (羊土社) p82-88
- 32) 北村俊雄、野阪哲哉 (2004) 新規チロシンキナーゼ GTP14564 と Flt3 今日の新移植 17:416-420.
- 33) 北村俊雄、熊谷英敏、野阪哲哉 (2004) Flt3 阻害剤 血液フロンティア 14: 47-53.  
(学会発表)
- 1) Cloning and functional analysis of secreted and membrane molecules expressed in bone marrow stromal cells. Hiroo Ueno, Mao Sakita-Ishikawa, Toru Nakano, Yoshihiro Morikawa, Toshio Kitamura, & Masaki Saito. (Keystone Symposia, From Stem Cells to Therapy, Virology, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, Japan, Mar29-Apr3,2003)
- 2) 細胞内情報伝達・分子細胞医学：造血幹細胞のシグナル伝達 北村俊雄 (日本医学会総会、2003年4月6日)
- 3) マウス骨髄マスト細胞由来新規抑制型レセプターの同定と解析 熊谷英敏、沖俊彦、北村俊雄 (日本血液学

会・臨床血液学会、2003年8月28日)

4) Rho/Rac/MgcRacGAPによる細胞質分裂と細胞分化の調節 北村俊雄 (東京大学医科学研究所—大阪大学蛋白質研究所合同プロテオミックスシンポジウム、2003年11月25日)

5) IgE感作により惹起されるマスト細胞接着の解析 沖俊彦、熊谷英敏、北村俊雄 (免疫学会、2003年12月9日)

6) Aurora Bによりリン酸化されたMgcRacGAPは細胞質分裂を制御する 箕嶋幸範、川島敏行、廣瀬晃一、河尻愛恵、達家雅明、野阪哲哉、佐藤孝哉、稲垣昌樹、北村俊雄 (日本分子生物学会、2003年12月10日)

7) 白血病に対する分子標的療法 北村俊雄 (産学連携フォーラム、2004年2月19日)

8) High Efficiency Retrovirus-Mediated Gene Transfer and Its Application in a Variety of Experiments. Toshio Kitamura. (“免疫システムの構築・作動の分子機構とその制御技術の開発” 国際ワークショップ、2004年2月16日～17日)

9) Co-ordinate Control of Cell Division and Differentiation by a GTPase Activating Protein MgcRac GAP/Cyk4.

Toshio Kitamura. (日豪シンポジウム、2004年3月29日～31日)

10) 活性誘導型 C/EBP $\alpha$  を用いた血球分化可塑性の解析 福地由美、柴田文、越野裕子、北村俊雄、中島秀明 (第66回に本血液学会総会、2004年9月17日～19日)

11) Immune suppressor factor(ISF)による造血幹細胞増幅のメカニズム 中島秀明、越野裕子、福地由美、柴田文、北村俊雄 (第66回に本血液学会総会、2004年9月17日～19日)

12) Immune suppressor factor confers enhanced supporting activity for hematopoietic stem cells in bone marrow stroma. Hideaki Nakajima, Fumi Shibata, Yumi Fukuchi, Yuko Goto, Miyuki Ito, Toshio Kitamura. (ASH, 2004年12月4日～7日)

13) Conditional expression of C/EBP $\alpha$  in mice reveals developmental plasticity of lymphoid and erythroid/megakaryocyte precursors *in vivo*. Yumi Fukuchi, Fumi Shibata, Miyuki Ito, Yuko Goto-Koshino, Yusuke Sotomaru, Mamoru Ito, Toshio Kitamura, Hideaki Nakajima. (ASH, 2004年12月4日～7日)

**F. 知的所有権の取得状況**

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

1) 造血幹細胞増殖調整因子及びそれをコードするポリヌクレオチド

日本国出願番号 特願 2003-523654

PCT 出願番号 PCT/JP02/08456

2) 抗 mKirre 抗体

日本国出願番号 特願 2004-28638

以上出願中



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

骨髄ストローマ由来因子による造血幹細胞の増幅に関する研究

分担研究者 北村 俊雄 東京大学医科学研究所細胞療法分野教授

研究要旨

骨髄ストローマ細胞のニッチと呼ばれる部分は造血細胞の自己複製に適した場所と考えられている。レトロウイルスベクターを利用した発現クローニング法で同定した骨髄ストローマ細胞由来因子の分子 ISF および mKirre はいずれも造血幹細胞の増幅を誘導することが判明した。本研究ではこれらの分子が造血細胞の自己複製を誘導するメカニズムを解析すると同時に、その発現部位と骨髄ニッチの位置関係を検証した。ISF はプロトンポンプのサブユニットであり、その造血支持能にはポンプ活性が必須であった。興味深いことに ISF は細胞膜上ではなく ER 膜上に主に発現していた。一方 mKirre の発現は胎生期では AGM(Aorta-Gonado-Methonephros) 領域、成体では骨髄中の骨膜に近接したオステオブラストに発現していることが判明した。mKirre-Fc 融合分子を利用した実験により c-kit 陽性の造血細胞が mKirre に対するレセプターを発現していることが示唆された。

A. 研究目的

造血幹細胞は骨髄中にごくわずか存在し、自己複製を行うとともにすべての血液細胞に分化する能力を持った細胞である。造血幹細胞は骨髄中のニッチ (niche) とよばれる微小環境に存在し、自らを複製・維持するとともに、必要に応じて分化・増殖し各種の血球細胞を産生する。骨髄中で起こる造血幹細胞の自己複製・増殖・分化によって骨髄ストローマ細胞が果たす役割はきわめて重要である。骨髄の中では造血幹細胞はニッチに存在し、細胞表面に発現する細胞膜表面分子を介して接着 (homing)、静止状態を保ちながらゆっくりと自己複製を行っていると考えられている。

我々のグループは、造血幹細胞の自己複製について、特にストローマ細胞による制御の観点から研究を行ってきた。近年これに関わる骨髄ストローマ細胞由来因子として ISF(immune suppressor factor)(J. Biol. Chem. 2001)および mKirre(Nat. Immunol. 2003)を同定し報告した。ISF は6ないし8回膜貫通型の糖タンパク質で、vacuolar ATPase とよばれるプロトンポンプのサブユニットであり、これを強発現させたストローマ細胞株ではマウス骨髄細胞の増殖支持能が亢進することが判明している。一方、mKirre は骨髄ストローマ細胞株 OP9 よりクローニングしたI型の膜蛋白質で、in vitro における造血幹細胞の指標である LTC-IC(long term culture initiating cell)や

CAFC(cobble stone-like area forming cell)を増幅させる。

本研究では、骨髄ストローマ細胞による造血幹細胞の自己複製制御メカニズムの解明を目的として、ISF および mKirre の詳細な生理機能解析を進めている。平成15年度は mKirre については造血幹細胞側に存在すると考えられるレセプターを発現クローニング法で同定することを試みた。また ISF については、過剰発現による造血幹細胞支持能増強をマウスの骨髄移植系を用いて確認した。さらに ISF の生理的な幹細胞支持メカニズムの解明に焦点をあて、cDNA マイクロアレイなどの手法を駆使して下流分子の同定を試みた。なお同定した ISF の下流分子の解析は16年度に分担研究者の中島に引き継いだ。

## B. 研究方法

### 1. mKirre の機能解析

mKirre を骨髄ストローマ細胞において過剰発現あるいは siRNA による発現のノックダウンを行い、骨髄ストローマ細胞の造血幹細胞増幅活性あるいは維持活性を *in vitro* の LTC-IC(long-term colony-initiating cell)および *in vivo* の骨髄移植における長期骨髄再建能 LTR-C(long-term reconstitution-competitive) を測定することにより調べる。

### 2. mKirre リガンドの同定

(a) mKirre-Fc 融合蛋白の作製：mKirre cDNA の細胞外領域を免疫グロブリン Fc 領域と融合させた発現ベクターを構築、CHO 細胞に導入し、上清中に放出された mKirre-Fc 融合蛋白をウエスタンブロット法で確認した。さらにこの細胞の培養上清数 L を回収、プロテイン A カラムを用いて mKirre-Fc 融合蛋白を精

製した。精製した mKirre-Fc 融合蛋白は予想されるサイズ(約 70kDa)の単一のバンドとして精製された。

(b) レトロウイルスライブラリーの作製：マウス骨髄細胞・大脳から mRNA を抽出し、定法に従い cDNA ライブラリーを作製した。これを我々が開発したレトロウイルスベクター pMX にサブクローニング、ライブラリープラスミドをパッケージング細胞株 PLAT-E に transfection し、上清中に放出されたレトロウイルスを回収した。

(c) ライブラリースクリーニング：作製したレトロウイルスを BaF3 細胞に感染させ、細胞表面に発現すると予想される mKirre 結合分子(mKirre ligand)のスクリーニングを mKirre-Fc 融合蛋白を用いて FACS により行った。具体的には、ライブラリーウイルスを感染させた細胞を mKirre-Fc 融合蛋白と反応させ、mKirre が結合した細胞を FITC 標識抗 IgG-Fc 抗体にて検出、陽性細胞を FACS vantage を用いてソートした。さらにソートした細胞を再度 mKirre-Fc 融合蛋白で染色し、2回目・3回目の再ソーティングを行った。

3. ISF による造血幹細胞支持能増強作用の骨髄移植モデルによる確認

ISF が培養細胞株だけでなく、実際の造血幹細胞の自己複製・増殖を支持する可能性を検証するため、以下の実験を行った。

(a) ISF およびその short form である ShIF をレトロウイルスを用いて骨髄間質細胞株 MS10・PA6 に発現させ、安定発現細胞株を作成した(MS10/ISF,MS10/ShIF, PA6/ISF, PA6/ShIF)。

(b) C57BL/6 マウスより採取した骨髄細胞、あるいはソーティングした c-kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin-

(KSL)細胞を放射線照射により不活化した MS10,MS10/ISF,MS10/ShIF の上で共培養し、1週間後回収した細胞をメチルセルロース培地で培養し、コロニーアッセイを行った。また同様の共培養を5週間行い、回収した細胞を同様にコロニーアッセイを行った (LTC-IC)。

(c) C57BL/6 Ly5.1 マウスより骨髓細胞を採取し、c-kit+ Sca-1+ Lin- (KSL)細胞を FACS によりソートした。これを放射線照射により不活化した MS10,MS10/ISF,MS10/ShIF の上で共培養し、1週間後回収した細胞を  $2 \times 10^5$  個の Ly5.2 骨髓細胞とともに致死量放射線照射した Ly5.2 マウスに骨髓移植した。4・8・12週間後に採血、末梢血中に存在する Ly5.1 陽性細胞の比率を FACS により解析し、ISF/ShIF により造血幹細胞が増幅しているか否かを検討した。

(d) ISF の過剰発現は造血幹細胞の自己複製を制御する生理的メカニズムを増強している、との仮説に基づき、どのような生理的経路が増強しているかを遺伝子発現の面から検討した。MS10 および MS10/ISF,MS10/ShIF より抽出した mRNA から cDNA プローブを合成し、マイクロアレイを用いて約2万遺伝子の発現プロファイルを解析した。

(倫理面への配慮)

ここまでの研究ではヒトのサンプルを使用していない。ヒトのサンプルを利用する場合には医科研の倫理審査委員会の指針に従って、該当者に説明を行い、同意書に署名をいただく。

動物実験においては、Sacrifice するときの麻酔をしっかりと行うなど動物 (主にマウス) に苦痛を与えないように配慮する。また1年

に一回の動物慰霊祭に参加して動物に対する哀悼の意を持つ。

## C. 研究結果と考察

### 1. mKirre による造血支持作用能の解析

造血幹細胞維持活性のないストローマ細胞株 MS10 および造血幹細胞支持活性を有する AGM-S3、OP9 において mKirre の過剰発現株を作成した。骨髓細胞より分離した c-kit 陽性、Sca-1 陽性、lineage 陰性の造血幹細胞を含む KSL 細胞と ISF を過剰発現したストローマ細胞と一週間共培養を行い、造血幹細胞支持活性の変化を LTC-IC および LTR-C を測定した。いずれの細胞においても、mKirre の過剰発現による造血支持能の上昇は認められなかった。一方、造血支持活性の高い OP9 細胞において mKirre の発現を siRNA でノックダウンすると OP9 細胞の造血幹細胞支持活性が著しく抑制されることが LTR-C アッセイで判明した。これらの結果は、ストローマ細胞における mKirre の発現は造血幹細胞維持活性に必要ではあるが十分ではないことを示唆している。

### 2. mKirre のレセプターの発現クローニング

レトロウイルスベクターを利用した発現クローニング法で mKirre のレセプターを同定するために数回のライブラリースクリーニングを行った。いずれも1回目のスクリーニングでは数%の陽性細胞群を認めたものの、2回目以降のスクリーニングでは陽性細胞群は濃縮されず、mKirre レセプターの同定には至らなかった。

### 3. ISF/ShIF による造血幹細胞支持能の解析

MS10/ISF,MS10/ShIF の上で共培養した骨

髓細胞あるいは KSL 細胞はコントロールの MS10 上で培養したものに対して、より数が多く大きさの大きなコロニーを形成する。また LTC-IC も増加する。このことから、ISF/ShIF は造血幹細胞に近い未熟な細胞画分を増幅していることが示唆された。マウスの骨髓移植実験では、MS10/ISF,MS10/ShIF 上で培養した KSL 細胞はコントロールに比して顕著に長期骨髓再建能が増幅していた。このことから、ISF/ShIF は長期骨髓再建能を有する造血幹細胞を増幅していることが示された。

4. ISF による造血幹細胞増幅活性にはそのポンプ機能が必須である。

ISF はプロトンポンプの  $\alpha 2$  サブユニットであり、377番目のアルギニンをアラニンに置換したミュータントはポンプ活性を欠失する。この変異型ポンプを骨髓ストローマ細胞に過剰発現し、ISF の造血幹細胞支持細胞にポンプ活性が必要かを調べた。ポンプ活性を欠失した ISF および ShIF を過剰発現したストローマ細胞と共培養した KSL 細胞は未熟性を失いコロニーを作れなくなった。この結果は ISF による造血幹細胞支持活性にはポンプ活性が必須であること、つまり造血幹細胞支持において ISF はポンプとして働くことを示唆している。

5. ISF の細胞内局在

ISF は6回膜貫通ドメインを有する分子であり、何度かのトライアルにもかかわらず、良いモノクローナル抗体がなかなか樹立できない。最近、抗ペプチド抗体を作成し、ISF の細胞内局在を調べたところ、ISF は細胞表面ではなく、ER あるいはゴルジに発現していることが示唆された。今後、GFP 融合蛋白質を利用して細胞内局在を確認する予定であ

る。

6. ISF の下流分子の探索

ISF および ShIF を過剰発現した場合の遺伝子発現を DNA チップを用いて解析した。ISF/ShIF により発現が上昇する遺伝子として MMP-3、また発現が低下するものとして TIMP-3、SFRP-1 などが同定された。これら遺伝子について、RT-PCR、ノーザンブロット解析により実際に遺伝子発現が変化しているかどうかを確認したところ、確かに ISF/ShIF を発現している細胞では MMP-3 の発現上昇、TIMP-3、SFRP-1 の発現低下が見られた。これらの分子が ISF の下流でどのような働きをしているかは16年度に分担研究者の中島に引き継いだ。またノックアウトマウスを作成し実際の生体内造血においてどのような役割を担っているかを今後も検討してゆく予定である。

D. 結論

発現クローニング法により造血幹細胞の自己複製の誘導に関与する骨髓ストローマ細胞由来分子 mKirre と ISF を同定した。mKirre は胎生期には AGM 領域、成体ではオステオプラストに発現しており、造血幹細胞を支持する造血ニッチの構成分子であることが示唆された。ISF はプロトンポンプのサブユニットであり、その造血支持活性にはポンプ活性が必須である。ISF の過剰発現による MMP-3 の発現増加および SFRP-1 の発現低下が間接的に造血幹細胞増幅を誘導することが示唆された。

E. 健康危険情報

特になし