

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定に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中内 啓光

平成17(2005)4年 10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. 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----- 10

岩間 厚志

2. 造血幹細胞における Lnk の発現操作に関する研究-----17

高木 智

III. 研究成果の刊行物・別刷-----23

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----77

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

Lnk KO マウスの詳細な解析より、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることが明らかとなった。Lnk は想定される自己複製シグナルを負に制御するアダプター蛋白であると考えられる。そこで、Lnk の機能抑制のためにドミナントネガティブ Lnk 変異体を開発した。この変異体を用いることにより、造血幹細胞・前駆細胞に内因性に発現する Lnk の機能を阻害することが可能であり、造血系再構築能を増強しうることを骨髄移植モデルで確認した。一方、ポリコム遺伝子 Bmi-1 は自己複製を正に制御する分子であることが確認され、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られることが示唆された。これらの所見は、造血幹細胞制御の標的分子として Lnk と Bmi-1 が非常に良い候補であることを示しており、これら造血幹細胞制御分子を複合的に制御することにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが可能であり、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつくものと考えられた。

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。すなわち、Lnk の発現あるいは機能を制御することにより造血幹細胞のニッチへのホーミング能力を高めること、あるいは選択的増殖優位性を付与し、最小限の前処置で造血幹細胞移植を成功させる方法を確立することを目的とする。さらには、申請者らが造血幹細胞の未分化性維持に関与する分子として同定してきた Bmi-1 などについても同様な解析を行い、造血幹細胞の能力を高める分子の応用を推進する。

B. 研究方法

Lnk KO 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)。具体的には、B6 マウスの骨髄から造血幹細胞集団である CD34 陰性ないし弱陽性、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、Lineage 陰性 (CD34⁻KSL) 細胞を FACS を用いて分離した。放射線照射後のマウス 1 匹に CD34⁻KSL 細胞 1 個を移植し (single cell reconstitution

assay)、再構築が成立したマウスの骨髄中の RU (Repopulating Unit) と CRU (Competitive Repopulating Unit) を二次移植を用いて測定した。一方、B6 マウスと Lnk KO マウスの骨髄細胞を用いて CRU の頻度を測定した。次に FACS を用いて骨髄中の CD34⁻KSL 細胞の頻度を比較した。また、1 個の CD34⁻KSL 細胞を移植し RU を算出した。さらに、二次移植によって Lnk KO 造血幹細胞の自己複製能を測定した。

平成 16 年度に作製したドミナントネガティブ Lnk 変異体を改良するとともに、ドミナントネガティブ Lnk ならびに siRNA の機能解析のために、レトロウイルスにドミナントネガティブ Lnk を、レンチウイルスに siRNA をクローニングし、ウイルスを用いて Lnk を強制発現した stem cell factor (SCF) 依存性肥満細胞株 MC9 に遺伝子発現し、Lnk に対する効果を判定した。次に、造血前駆細胞の造血能、骨髄再構築能に対する Lnk 変異体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 (高木、岩間)。

さらにポリコム遺伝子 Bmi-1 の造血幹細胞機能あるいは自己複製能の増強作用につき、レトロウイルスを用いた造血幹細胞への遺伝子導入の系を用いて解析した。具体的には遺伝子導入後の体外培養中に造血幹

細胞・前駆細胞の維持・増幅効果を *in vitro* の培養およびマウス骨髄移植モデルを用いて検討した (岩間)。

(倫理面への配慮)

本研究は、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. 研究成果

Lnk KO マウスの解析

Lnk KO マウスと野生型マウスとの間で骨髄細胞の総数に大差はなかったが、Lnk KO マウスの骨髄細胞中の CRU の頻度は正常マウスの 10 倍以上に増加していることが明らかとなった。Lnk KO マウス骨髄中に占める CD34⁺KSL 細胞の頻度も平均して約 10 倍に増加していた。Lnk KO マウスの CD34⁺KSL 細胞 1 個を移植した際の生着率は野生型のそれとほぼ同等であり、約 5 匹に 1 匹の割合で再構築が成立した。RU/cell の平均値の比較では Lnk KO 造血幹細胞を移植した群の方が野生型を移植した群より有意に高値を示した。また、2 次移植の結果は少なくとも一部の Lnk KO 造血幹細胞において自己複製能が増加していること

を示した。以上の結果から、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることが明らかとなった。

Lnk 変異体の造血幹細胞に対する効果

種々の Lnk 変異体の c-Kit 依存性増殖におよぼす影響を c-Kit 陽性 MC9 細胞株に発現させ検討した。c-Kit 依存性増殖を示さない Lnk 強発現トランスフェクタント細胞を用いてこれら変異体のドミナントネガティブ効果を検討したところ 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、より効率の良いドミナントネガティブ Lnk 変異体として作用することがわかった。一方、Lnk に対する siRNA の効果はドミナントネガティブ Lnk 変異体と比べて明らかに弱いことが明らかとなった。

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幹細胞・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。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、特に B 細胞及び顆粒球系細胞の産生亢進が観察された。

Bmi-1 の造血幹細胞に対する効果

造血幹細胞の自己複製能を評価する有効な解析法として paired daughter cell assay がある。これは造血幹細胞 1 つが 2 つに分裂した際に micromanipulation により別々の well に移してそれぞれの形成するコロニーを観察することにより、二つの娘細胞の形質を retrospective に評価するものである。造血幹細胞のほとんどが好中球・マクロファージ・赤芽球・巨核球の 4 系統の細胞を含む nmEM コロニーを形成するが、娘細胞両方が nmEM コロニーであれば、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持されたといえる。野生型造血幹細胞にレトロウイルスを用いて Bmi-1 を強制発現させると、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持される確率、すなわち nmEM/nmEM pair の数が有意に上昇することが示された。また、骨髄 CD34-KSL 造血幹細胞にレトロウイルスを用いて Bmi-1 を強制発現させ in vitro での培養系を用いて検討したところ、培養中に多能性前駆細胞は 56~81 倍にも増加しており、コントロールと比べ長期骨髄再構築活性は 35 倍に増強された。この効果は HoxB4 に匹敵するものであった。

D. 考察

Lnk KO の詳細な解析より、Lnk KO マウスでは造血幹細胞の数ばかりでなくその自己複製能が増加していることが明らかとなった。Lnk は想定される自己複製シグナルを負に制御するアダプター蛋白であると考えられる。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加えて、ホーミング能の亢進も関与するのか詳細は不明である。しかし、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、ドミナントネガティブ Lnk や Lnk に対する siRNA を用いた Lnk の発現・機能制御の手法が有効と考えられた。siRNA は有意な効果が得られなかったが、本研究で同定・開発したドミナントネガティブ Lnk 変異体を用いることで造血幹細胞・前駆細胞に内因性に発現する Lnk の機能を阻害することが可能であり、造血系再構築能を亢進させることができることを骨髄移植モデルで示すことができた。この所見は Lnk KO マウスの解析データとあわせて、造血幹細胞制御の標的分子として Lnk が非常に良い候補であることを示している。今後は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が肝

要であろう。また、Lnk は多量体を形成することにより機能を発揮すると考えられており、今回得られたドミナントネガティブ Lnk 変異体も多量体化ドメインを含んでおり、変異体が内因性の Lnk と多量体を形成することにより機能的な多量体形成を阻害している可能性が想定される。したがって、Lnk の多量体化を阻害するような低分子化合物が得られれば、効率良く Lnk の機能を阻害し得る可能性が考えられ、今後、このような低分子化合物のスクリーニングも重要であろう。

ポリコーム遺伝子 Bmi-1 に関しては Lnk とは反対に自己複製を正に制御する分子であることが確認され、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られるものと期待される。したがって、Bmi-1 に関してはその発現を増強する低分子化合物が有用であり、Lnk の機能を阻害する変異体あるいは低分子化合物と組み合わせることにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが可能となり、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつくものと考えられる。

E. 結論

本研究において、造血幹細胞機能の負の制御分子 Lnk と正の制御分子 Bmi-1 が造血幹細胞制御の優れた標的分子であることが提示された。今後はこれらの分子機能あるいは発現を効率良くかつ安全に制御し得る手段の開発が必要であり、このような研究を通して、造血幹細胞機能のエンハンスメントによる造血幹細胞移植法の臨床応用が実現するものと考えられる。

F. 研究危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko S, Nagasawa T, Nakauhi H, and Onodera M. An in vivo assay for retrovirally transduced human peripheral T lymphocytes using nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. 33:35-41, *Exp. Hematology*, 2005

Ema H, Sudo K, Seita J, Maeda A, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, and Nakauchi H. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice.

- Developmental Cell.* (in press)
- Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamiyo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, Lohuizen van M, and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product, Bmi-1. *Immunity.* 21: 843-851, 2004
- Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T. and Yuji Yamanashi. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.*
- Ojima K, Uezumi A, Miyoshi H, Masuda S, Morita Y, Fukase A, Hattori A, Nakauchi H, Miyagoe-Suzuki Y, Kakeda S. Mac-1^{low} early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 321:1051-1060, 2004
- 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.
- Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, Nakauchi H, Kageyama R, Matsui A. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat Genet.* 2004 6:83-7.
- Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes.* 53:2143-52, 2004
- Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two

distinct types of multipotent stem cells. *Mol Cell Biol.* 24:4207-20, 2004

Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatology.* 51:423-6, 2004

2. 学会発表

Morita Y, Ema H, and Nakauchi H. Non-side population hematopoietic stem cells in adult mouse bone marrow. ISAC International Congress, Montpellier, France, 22-27 May, 2004

Nakauchi H. "Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells" International Society for Stem Cell Research 2nd Annual Meeting (ISSCR), (Boston), 10-13 June, 2004

Iwama A, Nakauchi H "A polycomb gene product, Bmi-1 plays a role in the maintenance of hematopoietic stem cells in a multi-potential stage" International Society for Stem Cell

Research 2nd Annual Meeting (ISSCR), (Boston), 10-13 June, 2004

Seita J, Ema H, Sudo K, Satoshi T, Takatsu K, Nakauchi H. "Massive Expansion of Hematopoietic Stem Cells in Lnd-Deficient Mice" International Society for Stem Cell Research 2nd Annual Meeting (ISSCR), (Boston), 10-13 June, 2004

Nakauchi H "Control of hematopoietic stem cell self-renewal by a signal adaptor molecule, Lnk" 2004 Annual Symposium of Dental Research Institute, Seoul National University. Seoul, Korea. Oct, 2004

Yashiro Y, Bannai H, Yabiku T, Minao T, Osawa M, Iwama A, Miyano S, and Nakauchi H. "Transcriptional Profiling of Hematopoietic Stem Cells by High-Throughput Sequencing" The 11th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. 4-5 Dec. 2004 (Taiwan)

Ema H, Kaneda M, Maeda A, Takano H, Nakauchi H. "Lymphoid Lineage Restriction in Hematopoietic Stem Cells Through Their First Division"

- American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Maeda A, Iwama A, Eto K, Ema H, Kitamura T, Dietmar Vestweber, Nakauchi H. "Expression of Endomucin, a CD34-Like Sialomucin Marks Definitive Hematopoietic Stem Cells throughout Development" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Oguro H, Iwama A, Nakauchi H. "Enhanced Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells Mediated by the Polycomb Gene Product, Bmi-1" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Takahashi S, Watanabe N, Ooi j, Tomonari A, Takasugi K, Uchiyama M, Konuma T, Futami M, Yamanishi Y, Takahashi K, Tojo A, Nagamura T, Takahashi A. T, Mori T, Okamoto S, Nakauchi H, Asano S. "Contribution of T-Cell Reconstitution during the Early Phase after Cord Blood Transplantation to Favorable Clinical Outcomes" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Takayanagi S, Hiroshima T, Yamazaki S, Iwama A, Nakauchi H. "Tmtsp, a Novel Gene Encoding a Cell Surface Protein Highly Specific to Hematopoietic Stem and Endothelial Cells" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Kato Y, iwama A, Nakauchi H. "Selective Activation of STAT5 Unveils Its Role on the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells and the Development of Myeloproliferative Disorder" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)
- Nakauchi H. 'Lymphoid lineage commitment and asymmetric division at the level of hematopoietic stem cells' 8th International Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens, 34th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology, 12-16 Dec, 2004 (Adelaide)

Nakauchi H. 'Use of FACS for stem cell biology' 7th Federation of Immunological Societies of Asia Oceania (FIMSA) and the Australasian Society for Immunology (ASI), 7-10 Dec, 2004 (Adelaide)

Iwamori N, Iwama A, and Nakauchi H. 'Bmi-1 is essential for maintenance of spermatogonial stem cell.' Keystone Symposia 2005, 10-15 Feb, 2005 (Banff)

Nakauchi H. 'Regulation of Stem Cell Self Renewal and Aging' Days of Molecular medicine, 17-19 March, 2005 (La Jolla)

Nakauchi H. 'Massive Expansion of HSC in Lnk-deficient Mice.' USA-Japan Cooperative Cancer Research Program, 22-26 March, 2005 (Maui)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記なし

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

Lnk の発現抑制のために平成 15 年度に作製した siRNA の効果を、ドミナントネガティブ Lnk 変異体と比較検討したところ、明らかにドミナントネガティブ Lnk 変異体が有効であり、Lnk の発現抑制による造血幹細胞活性の増強を得るには厳密な発現抑制が必須であると考えられた。一方、「細胞の記憶システム」の一つとして機能し、クロマチン修飾であるポリコーム群遺伝子 Bmi-1 の強制発現の効果を検討したところ、*in vitro* におけるマウス骨髄 CD34⁺KSL⁺造血幹細胞の対称性分裂の確率が亢進し、細胞分裂を経た幹細胞形質の維持が促進されることが確認された。また、造血幹細胞に Bmi-1 を強制発現させ *in vitro* 培養系を用いて検討したところ、培養中に多能性前駆細胞は 56~81 倍にも増加し、コントロールと比べ長期骨髄再構築活性は 35 倍に増強された。以上の所見は、Bmi-1 が Lnk とは対照的に自己複製を正に制御する分子であり、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られることを示唆するものであり、造血幹細胞における Bmi-1 の発現制御を Lnk の機能阻害と組み合わせることにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが得られるものと期待された。

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。具体的には Lnk の発現を抑制する siRNA を用いた造血幹細胞機能増強を検討する。一方、ポ

リコーン遺伝子産物は一度決定された細胞形質が細胞分裂後も娘細胞に維持される「細胞の記憶システム」の一つとして機能し、クロマチン修飾を介して遺伝子発現抑制状態をエピジェネティックに維持する。遺伝子欠損マウスの解析から、Bmi-1 と Rae28/Mph1 が造血幹細胞機能に深く関与することが明らかにされた。そこで Bmi-1 を含めたポリコーン遺伝子の強制発現の造血幹細胞活性への効果を検討し、造血幹細胞の能力を高める分子の応用を推進する。

B. 研究方法

平成 15 年度に作製した siRNA の機能解析のためために、レンチウイルスベクターに siRNA をクローニングし、レンチウイルスを用いて Lnk siRNA を細胞に強制発現する。効果判定には stem cell factor (SCF) 依存性肥満細胞株 MC9 を用い、内在性あるいは強制発現された Lnk に対する効果を判定する。この際、コントロールとしてドミナントネガティブ Lnk 変異体を用い、Lnk の機能抑制における効果を比較検討する。

さらにポリコーン遺伝子 Bmi-1 の造血幹細胞機能あるいは自己複製能の増強作用につき、レトロウイルスを用いた造血幹細胞への遺伝子導入の系を用いて解析する。具体的には

造血幹細胞の自己複製能を評価する有効な解析法として知られる paired daughter cell assay を用いて Bmi-1 強制発現の効果を判定する。また、遺伝子導入後の体外培養中に造血幹細胞・前駆細胞の維持・増幅効果を in vitro の培養およびマウス骨髄移植モデルを用いて検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は、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. 研究成果

Lnk siRNA の造血幹細胞に対する効果
平成 15 年度に同定した Lnk の発現を抑制する siRNA を 2 種レンチウイルス発現ベクターに組み込み、細胞に発現しその効果を検討した。細胞は c-Kit を発現し SCF 依存性増殖を示す肥満細胞株 MC9 細胞株と、Lnk を強発現することにより SCF 依存性増殖を示さない Lnk 強発現 MC9 細胞を用いた。siRNA を発現することにより、Lnk 強発現 MC9 細胞の Lnk の発現を蛋白レベルで約 1/5~1/10 に抑制し得ることを確認した。次いで、Lnk 強発現 MC9 細胞の c-Kit 依存性増殖の回復効

果を指標に siRNA の効果を検定した。コントロールとして分担研究者の高木らが開発したドミナントネガティブ Lnk 変異体を用いた。ウイルス感染細胞の SCF 反応性増殖を比較したところ、ドミナント変異体が明らかに高い増殖能の回復を示し、意外にも siRNA の効果は有意ではなかった。蛋白レベルでは、約 1/5~1/10 程度まで抑えていたが、この程度の抑制では効果が十分に見られないものと判断された。

Bmi-1 の造血幹細胞に対する効果

Bmi-1 を含めたポリコム遺伝子の強制発現の造血幹細胞活性に対する効果を検討した。造血幹細胞の自己複製能を評価する有効な解析法として paired daughter cell assay がある。これは造血幹細胞 1 つが 2 つに分裂した際に micromanipulation により別々の well に移してそれぞれの形成するコロニーを観察することにより、二つの娘細胞の形質を retrospective に評価するものである。造血幹細胞のほとんどが好中球・マクロファージ・赤芽球・巨核球の 4 系統の細胞を含む nmEM コロニーを形成するが、娘細胞両方が nmEM コロニーであれば、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持されたといえる。野生型造血幹細胞にレトロウイ

ルスを用いて Bmi-1 を強制発現させると、細胞分裂を経て両方の娘細胞に幹細胞としての形質が維持される確率、すなわち nmEM/nmEM pair の数が有意に上昇することが示された。また、骨髄 CD34-KSL 造血幹細胞にレトロウイルスを用いて Bmi-1 を強制発現させ in vitro での培養系を用いて検討したところ、培養中に多能性前駆細胞は 56~81 倍にも増加しており、コントロールと比べ長期骨髄再構築活性は 35 倍に増強された。この効果は HoxB4 に匹敵するものであった。興味あることにこのような効果は Bmi-1 に特異的であり、他のポリコム遺伝子、Rae28/Mph1, M33, Ring1b では認められず、唯一、Bmi-1 と構造的に類似している Mel-18 が弱いながらも有意な増強効果を示した。

D. 考察

Lnk は自己複製シグナルを負に制御するアダプター蛋白であると考えられ、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期待された。しかし、今回の解析では、蛋白レベルで約 1/5~1/10 程度まで抑制しても c-Kit シグナルに対する十分な効果は得られなかった。Lnk^{+/+}マウスにおいて全く造血幹細胞の形質に変化が認められないことを考えあわせる

と、発現抑制により造血幹細胞の機能増強を得るにはより厳密な発現抑制が必要であるものと考えられた。この意味ではドミナントネガティブ Lnk 変異体により Lnk の機能を阻害する方がより有効と考えられた。

ポリコーム遺伝子 Bmi-1 に関しては Lnk とは反対に自己複製を正に制御する分子であることが確認され、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られるものと期待された。実際、強制発現により paired daughter cell assay において造血幹細胞の対称性分裂の頻度が亢進し、造血幹細胞活性の著明な増強が認められた。また、このような活性は他のポリコーム遺伝子には認められず、Bmi-1 が造血幹細胞の機能制御において中心的な機能を果たしているものと考えられた。したがって、Bmi-1 に関してはその発現を増強する低分子化合物が有用であり、Lnk の機能を阻害する変異体あるいは低分子化合物と組み合わせることにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが可能となり、より安全で簡便な造血幹細胞移植法の確立に結びつくものと期待される。

E. 結論

本研究において、Lnk の発現抑制のために平成 15 年度に作製した siRNA では有意な Lnk の機能抑制効果が得られないことが示された。ドミナントネガティブ Lnk 変異体と比較検討したところ、明らかにドミナントネガティブ Lnk 変異体が有効であり、Lnk の発現抑制による造血幹細胞活性の増強を得るにはより厳密な発現抑制が必須であると考えられた。一方、「細胞の記憶システム」の一つとして機能し、クロマチン修飾であるポリコーム群遺伝子 Bmi-1 の強制発現の効果を検討したところ、著明な造血幹細胞活性の増強が得られた。以上の所見は、Bmi-1 が Lnk とは対照的に自己複製を正に制御する分子であり、その発現を増強することによって造血幹細胞の増幅が得られることを示唆するものであり、造血幹細胞における Bmi-1 の発現制御を Lnk の機能阻害と組み合わせることにより、一層効率の良い造血幹細胞機能のエンハンスメントが得られるものと期待される。

F. 研究危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, and Nakauchi H. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal by polycomb group genes. *Int. J. Hematol.* 81, No. 4, May 2005 in press.

Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, and Harada M. Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein a in G-CSF signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, In press.

Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamiyo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M, and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product, Bmi-1. *Immunity* 21, 843-851, 2004.

Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y, Osawa M, Honda

K, Shinohara H, Sudo K, Tsuji K, Nakauchi H, Iwakura Y, Hirai H, Oda H, Yamamoto T and Yamanashi Y. Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J. Exp. Med.* 200, 1681-1687, 2004.

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, 2004.

2. 学会発表

Nakauchi H, Oguro H, Negishi M, and Iwama A. 'A polycomb gene product, Bmi-1 is the critical determinant for hematopoietic stem cell self-renewal.' 15th International Symposium on Molecular Biology of Hematopoiesis 2004 (Tokyo).

Iwama A, Nakauchi H. '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, 2004 (Boston)

Maeda A, Iwama A, Eto K, Ema H, Kitamura T, Dietmar Vestweber, Nakauchi H. "Expression of Endomucin, a CD34-Like Sialomucin Marks Definitive Hematopoietic Stem Cells throughout Development" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Oguro H, Iwama A, Nakauchi H. "Enhanced Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells Mediated by the Polycomb Gene Product, Bmi-1"

American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Takayanagi S, Hiroshima T, Yamazaki S, Iwama A, Nakauchi H. "Tmtsp, a Novel Gene Encoding a Cell Surface Protein Highly Specific to Hematopoietic Stem and Endothelial Cells" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Kato Y, Iwama A, Nakauchi H. "Selective Activation of STAT5 Unveils Its Role on the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells and the Development of Myeloproliferative Disorder" American Society of Hematology Meeting (ASH), 4-7 Dec, 2004 (San Diego)

Yashiro Y, Bannai H, Yabiku T, Minaowa T, Osawa M, Iwama A, Miyano S, and Nakauchi H. "Transcriptional Profiling of Hematopoietic Stem Cells by High-Throughput Sequencing" The 11th East Asian Joint Symposium on Biomedical Research. 4-5 Dec. 2004 (Taiwan)

Iwamori N, Iwama A, and Nakauchi H.
'Bmi-1 is essential for maintenance
of spermatogonial stem cell.'
Keystone Symposia 2005, 10-15 Feb,
2005 (Banff)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記なし

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

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。Lnk の各部位にアミノ酸置換変異や欠失変異を導入し作製した種々の Lnk 変異体を c-Kit 依存性に増殖する細胞株に発現させた。増殖能への影響を検討した結果、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(DN)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ることで、さらに効率の良い DN 変異体の作製に成功し、骨髄移植モデルを用いてその効果を検証した。DN-Lnk 変異体をレトロウイルスベクターにより導入することにより前駆細胞の造血能亢進が観察された。さらに、DN-Lnk 変異体のプラスミド DNA による一過性発現によっても造血前駆細胞の生着能が亢進すること、非骨髄破壊的移植条件下で免疫不全マウスのリンパ球コンパートメントを効率よく再建できることを明らかにした。

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。この過程にはレシピエントの骨髄抑制・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した。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った。

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 MC9 細胞株に発現させ、培養細胞中の GFP 陽性細胞の割合を径時的に測定した。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。

造血前駆細胞の造血能、骨髄再構築能に対する Lnk 変異体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。Lnk 変異体と GFP 共発現レトロウィルスベクターを作製し、これを用いてマウス骨髄造血前駆細胞に感染導入し致死量の放射線を照射したマウスへ移植した。レシピエントマウスの末梢血中の各細胞分画における GFP 陽性細胞率を経時的にフローサイトメトリーにより解析し、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。

さらにプラスミドベクターとエレクトロポレーション法を用いた一過性発現による効果を検討した。正常

マウスの骨髄細胞に AMAXA 社の Nucleofector トランスフェクションシステムを用いてプラスミドを導入した。一過性に Lnk 変異体を発現した造血前駆細胞を Ly6 アロタイプで区別が可能な骨髄細胞と共に致死量の放射線照射したマウスに移入し、競合条件下での造血能を検討した。また、非骨髄破壊的な条件下での効果について、低量の放射線を照射した *scid* 免疫不全マウスへ移入し、生着能をリンパ球コンパートメントの再建を指標に検討した。

(倫理面への配慮)

全研究は、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. 研究成果

種々の Lnk 変異体の c-Kit 依存性増殖におよぼす影響を c-Kit 陽性 MC9 細胞株に発現させ検討したところ、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 による増殖抑制効果に影響はなかったものの、SH2 ドメイン点変異により抑制効果が全く消失した。次に c-Kit 依存性増