

201006017B

別紙1

総合研究報告書表紙レイアウト

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法に関する研究

平成21年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 杉山 大介

平成23(2011)年 5月

総合研究報告書目次レイアウト

目 次

I. 総合研究報告 新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法に関する研究―― 杉山大介	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
III. 研究成果の刊行物・別刷	56

別紙3

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業） （総括）研究報告書

新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法の開発に関する研究

研究代表者 杉山 大介 九州大学大学院医学研究院准教授

研究要旨

造血幹細胞は造血システムの最高位に位置し、自己複製能と多分化能を有する事で赤血球・白血球・血小板を持続的に供給し、生体のホメオスタシスを維持している。造血幹細胞移植療法は約30年前より臨床応用され、造血器疾患のみならず自己免疫疾患・悪性固形腫瘍・再生医療などに幅広く応用されている。現状では移植用造血幹細胞の供給源は自家骨髄・ドナー骨髄・臍帯血が使用されている。ドナー骨髄や臍帯血を使用する場合、移植造血幹細胞絶対数の不足・ドナー不足、更に免疫応答による生着不全・移植片対宿主病が問題になっており、より安全性の高い治療の開発が望まれている。したがって、自家骨髄由来自己造血幹細胞、人工多能性幹細胞由来自己造血幹細胞あるいは免疫反応が比較的少ない臍帯血造血幹細胞を試験管内で増幅してその絶対数を増やし移植出来れば、大きく現代医療の可能性が広がる。

現在までサイトカイン添加・遺伝子導入などによる増幅法が試みられて来たが、造血幹細胞の増幅効率・分化・腫瘍化が問題になり、臨床応用されていない。申請者は造血幹細胞の生理的増幅部位であるマウス胎仔肝臓より新規生理活性ペプチド（KS-13）を考案し、造血幹細胞の試験管内増幅に有効な知見を得た。KS-13は細胞内に取り込まれる事で細胞死を誘導する事無く分化を抑制する事が示唆されており、結合タンパクの解析では細胞シグナル・転写因子群・代謝・発生に関わるタンパク質との相互作用が確認されている。マウス胎仔肝臓造血幹細胞集団を用いて、サイトカインを含む培地に添加しコロニーアッセイを行

ったところ、容量依存的にコロニー形成を阻害しているにも関わらず、Mix コロニー（造血幹細胞に近い前駆細胞を反映する）のサイズは大きい傾向が認められ、分化が抑制されている知見が得られた。KS-13 をヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞集団へ添加培養し体外増幅を試みた所、コントロールに比し細胞数は増殖させないものの、既存のサイトカインによる造血幹細胞試験管内増幅法と遜色無く Mix コロニーの形成を増幅した。

そこで本研究提案では、KS-13 を応用した再生医療における革新的治療技術の開発を目指し、以下を目的とした研究を推進する。

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

A. 研究目的

造血幹細胞を体外に取り出して培養し、腫瘍化させることなく増幅する事が出来れば、移植関連問題の多くが解決され造血幹細胞移植療法の適応が広がる。更に将来的に iPS 細胞から誘導された臓器特異的幹細胞の移植療法開発へ発展し、新しい再生医療を開拓する可能性がある。

現在まで開発されてきた造血幹細胞増幅法においては、以下の問題点が挙げられる。

1. HoxB4 遺伝子を導入すると増幅するが、急性白血病が誘導される。
2. サイトカイン添加により成熟血球の分化が誘導され、造血幹細胞の未分化性維持が難しい。
3. 脱メチル化剤の添加で増幅効率は上がるが、エピジェネティクスに影響を与えるため安全性の確認が必要である。

造血幹細胞は自己複製能と多分化能という一見相反する能力を併せ持ち、サイトカインなどの刺激を受けて分化すると成熟血球が産生される。つまり造血幹細胞を増幅するためには、自己複製にアクセルをかけながら、様々な細胞系譜への分化にブレーキをかける必要がある。上記問題点を回避しながら新しい造血幹細胞増幅法を開発するため、申請者は造血幹細胞の生理的増幅部位であるマウス胎仔肝臓に発現するタンパク質を元に、分化を抑制する新規生理活性ペプチドを作製した (13 アミノ酸より成り KS-13 と命名)。マウス胎仔肝臓造血幹細胞 (CD45 陽性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性) 集団を用いて、サイトカインを含む培地に添加しコロニーアッセイを行ったところ、容量依存的にコロニー形成を阻害しているにも関わらず、Mix コロニーのサイズは大きい傾向が認められ、分化が抑制されている知見が得られた。KS-13 をヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞集団へ添加培養し体外増幅を試みた所、コントロールに比し細胞数は増殖させないものの、既存の造血幹細胞試験管内増幅法 (SCF, TPO, Flt3L, IL-6, sIL-6R) と遜色無く Mix コロニーの形成を増幅した。本研究提案では期間を 2 年に設定し、以下の研究成果を目標とする。

Aim1: KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

KS-13 は分化を抑制することでヒト臍帯血において Mix コロニーを増幅させることが示唆される。この効果を増強するために、種々のサイトカインとの組み合わせにより最適条件を検討する。同時に作用を増強する KS-13 の修飾体の開

発も行う。KS-13 添加培養で増幅された細胞は NOD/Scid マウスなどに移植し、造血系の再構築を評価する。また移植後長期に飼育し、腫瘍発生などに関して安全性の評価を行う。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)によりマウス胎仔造血幹細胞における KS-13 伝達経路の解析を行ったところ、細胞シグナル・転写因子群・代謝・発生に関わるタンパク質との相互作用が確認された。よって、タンパク質の抽出条件を変えながら再現性の確認を行う。また、マウス・ヒト造血幹細胞を用いて KS-13 添加液体培養を行い、培養前後のサンプルを用いて micro array により遺伝子発現の推移を検討する。発現パターンに大きな変化が認められたものでは real-time PCR も行い、遺伝子改変マウスの作製を検討する。

B. 研究方法

<平成21年度>

Aim1: KS-13を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

*マウス細胞を用いたコロニーアッセイによる培養条件の最適化

KS-13（特許申請中のため配列一部非公開）はマウスとヒトでホモロジーが高く、マウスで集積されたデータが直接的にヒトへ反映されやすい。マウス胎仔肝臓より採取した CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)細胞を KS-13 添加条件でコロニーアッセイしたところ、分化抑制は容量依存的に認められ、高容量（30 μ g/mL）使用においても未だプラトーに達していない。PI 染色による Flow cytometry 解析や Trypan-Blue 染色を用いた死細胞の判定においても、コントロールに比し大きな変化はなく、細胞毒性が少ないこともわかっている。そこで、まずマウス細胞を用いて KS-13 の添加最高容量を同定する。次に、サイトカインの組み合わせにより、培養条件の最適化を行う。

*脂肪酸修飾体を用いた効果の検討

また、KS-13 は細胞内に取り込まれて機能を発揮している可能性がある。これは KS-13 が細胞表面のリガンドに結合し、KS-13 と一緒にリガンドが細胞質内に内在化するために取り込まれる事が示唆される。細胞膜への介入において、所謂“油と油”の親和性とその透過性に寄与していることがわかっており、細胞膜に対するアンカーを付与するため、脂肪酸修飾体を用いて増幅効率を比較検討する。

Aim2: KS-13 作用メカニズムの解析

*MudPITによるKS-13結合タンパクの解析

近年 MudPIT を用いてあるタンパクの結合タンパク群を一挙に同定する事が出来るようになった。そこで、biotin 標識した KS-13 を胎齢 12.5 日目肝臓細胞と反応させ、Streptavidin-Microbeads で反応後 MACS を用いてカラムに標識細胞を吸着させ、引き続き 0.1% Triton で細胞膜を破砕する。破砕後、尿素とグリシン両者で KS-13 に結合したタンパク質の抽出を行い、MudPIT で解析を行う。プレリミナリーデータでは代謝に関わるタンパク質との相互作用が推測されたため、再現性を確認する。

*Micro arrayによる遺伝子発現解析

KS-13 添加液体培養前後のサンプルを用いて micro array (illumina, Expression Beadchips WG-6) を行い、遺伝子発現の推移を検討する。発現パターンに大きな変化が認められたものでは real-time PCR で遺伝子発現の定量を行う。

*造血幹細胞増幅メカニズムの解析

micro array の結果に基づき、造血幹細胞増幅・分化過程において real-time PCR で候補遺伝子の発現定量を行う。発現パターンに大きな変化が認められた遺伝子を造血幹細胞へ導入し、増幅に与える影響を検討する。

<平成22年度>

平成21年度の継続に加え、以下の研究を推進した。

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

*マウス細胞を用いた液体培養による造血幹細胞増幅・作製条件の最適化

平成21年度の成果を元に、KS-13 50 μ g/mL、SCF、TPO を組み合わせて液体培養を行い、続けてコロニーアッセイにより Mix コロニーの増幅を試みている。最大条件を同定後、レシピエントマウスへ移植し、骨髄再構築能を検討する事で、造血幹細胞増幅の評価を行う。また、多能性幹細胞から造血幹細胞の作製も試みる。移植したマウスは半年以上飼育し、腫瘍形成など副採用の検討も行う。

*脂肪酸修飾体を用いた効果の検討

平成21年度の成果では、ミリスチン酸修飾体は分化抑制効果を更にあげる有望な候補と考えられた。そこで、Mix コロニーの増幅を指標に、培養最適濃度を検討する。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

*Micro arrayによる遺伝子発現解析

マウス胎仔肝臓より採取した CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)細胞を KS-13 添加

(100µg/mL) 培養し、サンプルをプールしている。10 万個の細胞をプールした後、micro array (illumina, Expression Beadchips WG-6) を行い、遺伝子発現の推移を検討する。平成 21 年度に作成した MudPIT のデータベースを併用し、*in silico* 解析を行う。

*** 造血幹細胞増幅メカニズムの解析**

データベースより抽出した HMG2, Prox2 など候補因子に関して、多能性幹細胞、白血病細胞株などへ遺伝子導入を行い、赤血球、白血球の分化誘導条件で培養し、Fow cytometry 解析、遺伝子発現解析を行い、機能の評価を行う。

*** 抗 KS-13 中和抗体の作製**

造血幹細胞の分化を抑制している細胞を同定するために、抗 KS-13 抗体の作製を行う。また、KS-13 シグナルの阻害実験を組めるように、中和活性のある抗体を抽出する。

(倫理面への配慮)

本実験計画を遂行するにあたり、遺伝子組換え実験と動物実験における承認を既に得ている。

遺伝子組換え実験計画承認番号：18-93

動物実験承認番号：18-065-3

C. 研究結果

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

* マウス細胞を用いたコロニーアッセイによる培養条件の最適化

マウス胎仔肝臓より採取した CD45(+) c-Kit(+) Sca-1(+) 細胞を KS-13 添加条件でコロニーアッセイしたところ、ロット間による差は認められたが、50-100 μ g/mL の濃度において分化抑制効果はプラトーに達した。

* 脂肪酸修飾体を用いた効果の検討

KS-13 の分子量を小さくする事で細胞内の取り込み増大を期待し、KS-13 の両末端を欠失した KS-12A, B を作製し、10 μ g/mL の濃度で分化抑制効果を検討したが、KS-13 を比較し、コロニー形成数に変化は認められなかった。次に、ミリスチン酸修飾体を用いて同様に効果を検討したところ、10 μ g/mL の濃度でオリジナルの KS-13 と同等の分化抑制効果を認めた。

* ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞への添加培養

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞へ KS-13 を添加し、1 1 日間の液体培養後、コロニー形成法によりどの血球系統において分化・増殖の抑制効果が認められる検討した。KS-13 添加群と不添加群を比較したところ、骨髓球系細胞への分化・増殖抑制が優位である事が明らかになった。

* 多能性幹細胞への応用

KS-13 は造血細胞の中でも、特に骨髓球系細胞の分化を有意に抑制する事が明らかになった。この性質を応用し、多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞より中胚葉系細胞を誘導し、KS-13 を添加し培養した。培養4日目には、造血幹細胞に近い細胞と考えられている、HPP-CFC (High Proliferative Potential Colony-Forming Cells) を誘導する事に成功した。

多能性幹細胞からの造血細胞誘導に関しては複数の報告があり、3次元的に Embryoid body を形成する方法と、2次元的に collagen type IV や OP9 細胞を用いる方法に大別される (図1)。両者共に中胚葉系細胞まで誘導されるが、造血幹細胞を経由せずに比較的分化した造血前駆細胞が誘導される。現段階では多能性幹細胞から臨床応用可能な造血幹細胞を作製出来ていない。ES 細胞から

の造血幹細胞分化・誘導には単一の遺伝子 (*HoxB4*) を導入する方法が報告されたが、2008年 Zang らは、犬や猿などの大型哺乳類では *HoxB4* を造血幹細胞に遺伝子導入すると高率に急性骨髄性白血病が誘導される事を報告した (図1ボックス1)。ES 細胞由来細胞を特殊な系 (新生仔肝臓移植法、骨髄直接注入法) で評価すると、造血幹細胞活性が認められる、つまり初期型造血幹細胞 (pre-HSC) が誘導された報告があるが、その後臨床応用へ進展していない。

そこで、以下の項目に関して詳細に検討を行った。

(1) : 造血幹細胞分化誘導のための iPS 細胞株種の選定

ES 細胞はその株種により造血細胞の分化誘導能が異なる事が報告されており、その誘導効率の高さから CCE 株が汎用されて来た。申請者は京都大学・山中伸弥博士よりマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17、iPS-MEF-Ng-178B-5、iPS-TTF-DsRed-256H-18、iPS-Hep-FB/gfp-98A-1、iPS-Stm-FB/gfp-99-1、iPS-MEF-Ng-492B-4) を供与され、その造血能を比較検討したところ、胎仔繊維芽細胞由来 iPS 細胞は造血細胞の分化誘導能が高い事を明らかにした (Stem Cell Reviews and Reports, 2010A)。

しかしながら、将来的に臨床応用を目指す場合、成体細胞由来 iPS 細胞における造血細胞分化誘導能の比較検討が必要である。そこで、山中博士より iPS-TTF-FB/Ng-212B-2、iPS-TTF-FB/Ng-212D-1、iPS-TTF-FB/Ng-335D-1、iPS-TTF-DsRed-256H-13 の4株種を追加で供与してもらい、それらの中胚葉系細胞分化誘導能および造血細胞分化誘導能の比較検討を行った。5種類の成体皮膚細胞由来 iPS 細胞において、細胞増殖・遺伝子発現 (*Brachyury*, *Tbx1*, *Gata1*, *Klf1*, *Csf1r*) およびタンパク質発現 (*Flk1*, *CD45*, *Ter119*) において差が認められた。特に 256H18 iPS 細胞株において、高い細胞増殖能・中胚葉誘導能・造血分化能を認め、多能性遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog*) の低い発現を認めた。一方、*c-Myc* 導入株である 212B2 iPS 細胞株は、低い細胞増殖能・中胚葉誘導能・造血分化能を認め、多能性遺伝子の高い発現を認めた。総じて、同一皮膚組織由来の iPS 細胞株間において中胚葉誘導能及び造血分化能に差があることを確認し、その差には *c-Myc* 発現の関与が示唆された (Stem Cell Reviews and Reports, 2010B)。

(2) : 新規造血幹細胞発生マーカーの同定

マウスにおいて、成体へ移植すると生着する成体型造血幹細胞は胎齢 10.5 日目大動脈-中腎-生殖隆起領域 (AGM 領域) と胎齢 11.5 日目胎盤で発生し、発生が進むにつれて肝臓へ移動して増幅し、脾臓を經由して最終的に骨髄へ定着する (図 2)。AGM 領域では造血幹細胞が集塊を形成し、大動脈基底部血管内皮に接着した造血幹細胞クラスターが認められる (図 3)。造血幹細胞クラスターの発生メカニズムを解明し、試験管内でその現象を再構築する事が出来れば、より効率良く ES 細胞や iPS 細胞から造血幹細胞を誘導する技術を開発出来る。造血幹細胞の発生機構の解明を目的として、我々はフローサイトメトリー、qPCR 法、免疫染色を用いて造血幹細胞クラスターの性状解析を試みた。免疫染色においてクラスターは c-Kit, CD31, CD34 陽性であり、最初のクラスターは胎齢 9.0 日目の臍腸間膜動脈で検出された。

c-Kit/CD31/CD34 陽性細胞をフローサイトメトリーにてさらに解析したところ、他の造血幹細胞マーカーである CD41 (94%)、CD45 (88%)、EPCR (55%)、CD150 (47%)、VE-Cadherin (35%)、Sca-1 (51%) の発現が認められた。特に、c-Kit/CD31/CD34 陽性細胞における CD45 の陽性率は胎齢が進むに連れて上昇し、CD45 が造血幹細胞クラスターの成熟を反映する事が示唆された (図 5)。そこで胎齢 10.5 日目において c-Kit/CD31/CD34 陽性細胞を CD45 陽性/陰性に分けて解析を行った。コロニー形成能を検討したところ、両者共にコロニーを形成したが、CFU-M を除き、両者に統計的有意差は認められなかった。さらに、c-Kit/CD31/CD34 陽性細胞を CD45 強陽性/弱陽性/陰性細胞に分類して Flow cytometer で純化・採取し、qPCR 法により、造血発生に重要な転写因子群 (*Runx1*, *c-Myb*, *SCL*, *Evi-1*, *GATA2*) 及び *CD45* の発現を検討したところ、*Runx1*, *c-Myb*, *SCL*, *Evi-1*, *GATA2* は弱陽性分画において発現の亢進が認められた。以上の結果から、血管内皮細胞が血球細胞へ分化する際に、これら転写因子群の発現亢進が重要な事が示唆された。また、マウス AGM 領域における造血幹細胞クラスターは c-Kit, CD31, CD34 に加え、様々な造血幹細胞マーカーを発現しており、その成熟の指標には CD45 が有用であることが示唆された。更に、各種ノックアウトマウス (*Evi1*, *Runx-1*, *c-Myb*) 胎齢 10.5 日目の AGM 領域の造血幹細胞クラスター解析を免疫染色により行ったところ、転写因子 *Evi-1*, *Runx-1* ノックアウトマウスにおいてはクラスター形成が観察されず、*c-Myb* ノックアウトマウスにおいては、クラスター形成が観察されものの、その成熟に障害がある事が示唆された。

(3) : 造血幹細胞分化誘導のための外因的制御因子の同定と機能解析

造血幹細胞を分化・誘導するためには、造血幹細胞の発生・分化メカニズムを明らかにし、その動作原理を造血幹細胞誘導法へ応用していく正攻法をとることが1つの手段である。造血幹細胞の発生は遺伝プログラムによる内因的制御と、造血幹細胞の周囲を取り囲むニッチ細胞による外因的制御に大別可能である。造血幹細胞を分化・誘導するためには、造血幹細胞発生における外因的制御因子の同定は必要不可欠である。そこで、まず胎盤における造血幹細胞をAGM領域の免疫染色法に準じて染色し、可視化を試みた。図6に示すように、胎齢11.5日目胎盤における造血幹細胞クラスターはc-Kit, CD31, CD34陽性であり、その可視化に成功した。次に、造血幹細胞が発生する胎盤の造血細胞クラスターを取り囲むニッチ細胞をLaser Micro-dissection (LMD)法で採取し細胞刺激因子の遺伝子発現を検討したところ、SCFのみが発現している事が明らかになった(図7)。SCFはc-Kitのリガンドであり、本シグナルが胎盤造血幹細胞発生に重要である知見を得、論文発表した(Development, 2010)。

(4) : 多能性幹細胞からの造血幹細胞分化誘導

造血幹細胞の起源は中胚葉系細胞であり、既に多能性幹細胞から中胚葉系細胞を誘導する技術は確立されている。3次元的にEmbryoid body (EB)を形成する方法と、2次元的にcollagen type IVやOP9細胞を用いる方法に大別されるが、より安価なEB形成法を用いて実験を進めた。(2)で述べたように、造血幹細胞の初期発生マーカーとしてCD45 mRNAの遺伝子発現は有用である。また(3)で述べたように、SCFは造血幹細胞発生を制御する外因的制御因子の1つである。そこで、マウスES細胞であるCCE株のEB形成法を用いて、中胚葉細胞のマーカーであるFLK-1とSCFのレセプターであるc-Kitの発現を検討したところ、培養5日目でFLK-1+/c-Kit+細胞が効率良く誘導された。そこで、培養5日目のEBより純化・採取したFLK-1+/c-Kit+細胞へSCFを添加し、CD45 mRNAの発現を指標に更に培養したところ、追加培養6日目でCD45 mRNAの発現は認められたものの、May-Giemsa染色による観察では培養細胞の多くがマクロファージであり、マクロファージの遺伝子マーカーである*Csf1r* mRNAを発現していた。そこで、申請者が開発したKS-13を添加する事でマクロファージの分化を抑制した状態で同様の実験を行った。KS-13添加培養条件において、CD45 mRNA

の発現は培養4日目と5日目で認められた(図9上図)。Runx-1 mRNAは、血管内皮細胞から造血幹細胞へ分化する直前に発現が亢進すると報告されており、本培養では培養3日目に発現が亢進した(図9左下図)。また、遺伝子導入により多能性幹細胞から造血幹細胞を分化・誘導するのに有効だったHoxB4 mRNAの発現は、培養4日目に亢進した(図9右下図)。培養後の細胞は一部集塊を形成した(図10右図)。Flow cytometry法により細胞を解析すると、その多くはc-KitおよびCD31を発現していた(図10左図)。本条件においてHPP-CFCが培養4日目の細胞より検出された事より、追加培養4日目に造血幹細胞が分化誘導された可能性が高い。そこで、C57BL/6マウスより樹立されたES細胞である、BRC5を用いて本細胞(5日目のEBより純化・採取したFLK-1+/c-Kit+細胞をSCFとKS-13の存在下で4日間培養した細胞)を誘導し、細胞を移植した。プロトコルの詳細を図11に示す。移植3ヶ月後に移植細胞による骨髄の再構築を評価するため、細胞を移植したマウス2匹の末梢血を採取しFlow cytometry法により解析した(図12、13、14)。移植マウス1、2共に、骨髄球系細胞およびリンパ球系細胞の再構築を認めた。その再構築率はリンパ球系細胞よりも骨髄球系細胞の方が高い事が明らかになった。

*組織特異的幹細胞への応用

KS-13が造血幹細胞以外の組織特異的幹細胞へ応用が可能か検討するため、間葉系幹細胞に注目した。マウス骨髄細胞をKS-13添加Mesencult(Stem Cell Technologies社)で14日間培養し、間葉系幹細胞数の指標であるCFU-Fの形成数を評価した。2x10⁷骨髄細胞に対し、KS-13を添加しないコントロールでは35.5のCFU-F、KS-13 50 μg/mL添加培養では、48.0のCFU-Fが形成された(図15)。以上より、KS-13はマウス間葉系幹細胞を14日間で1.4倍増殖する事が明らかになった。

Aim2: KS-13作用メカニズムの解析

*MudPITによるKS-13結合タンパクの解析と造血幹細胞増幅メカニズムの解析
MudPIT(Multidimensional Protein Identification Technology)法によりKS-13へ結合するタンパク質を解析したところ、造血幹細胞が赤血球へ分化する過程において、ある一定の発現パターンを示す物質を同定出来た。造血幹細胞が赤

血球へ分化するにつれて発現が低下するパターン、中間段階で発現が亢進するパターン、分化するにつれて発現が亢進するパターンへ分類出来、KS-13 へ結合するタンパク群が、分化に関与する事が明らかになった。

* ビオチン標識 KS-13 を用いた取り込み機序の検討

マウス骨髄細胞をビオチン標識した KS-13 で処理し、造血幹細胞のマーカーである CD45、c-Kit、Sca-1 に対する抗体で染色し、Flow cytometry で解析すると、造血幹細胞の一部の集団へ取込まれる事が明らかになった。また、免疫染色法に準じて、マウス胎仔肝臓切片を用いて c-Kit に対する抗体と共に二重染色したところ、一部の c-Kit 陽性細胞において、細胞膜直下及び核内に KS-13 が取り込まれる事が明らかになった。

* 赤血球造血における *Hmgn2* の役割

(1) : 赤芽球分化に伴うマウス胎児肝臓における *Hmgn2* の発現

MudPit法によるKS-13シグナルの解析から、*Hmgn2*を同定した。*Hmgn2*はクロマチン繊維をほどこき、DNA複製を促進するヌクレオソーム結合タンパク質で、上皮細胞と間葉系細胞の分化を制御している。コミットされていない造血幹細胞

(HSC) から成熟赤血球に至るまでの赤芽球細胞は、細胞表面分子CD45 (白血球共通抗原)、Sca-1(Stem cell antigen-1)、c-Kit (SCF受容体)、CD71 (トランスフェリン受容体)、Ter119 (グリコフォリン) 発現を元にフローサイトメトリー法にて細胞選別・分離を行った。各分化細胞は次のように5群に同定された：(1) CD45+/Sca-1+/c-Kit+ (造血幹細胞) (2) Sca-1-/c-Kit+/CD71-/Ter119- (BFU-E) (3) Sca-1-/c-Kit+/CD71+/ Ter119- (CFU-E) (4)

Sca-1-/c-Kit-/CD71+/Ter119+ (赤芽球) (5) Sca-1-/c-Kit-/CD71-/Ter119+ (網状赤血球、赤血球)。赤芽球分化における *Hmgn2* 発現レベルを定量化するために、各分画をソート後、リアルタイムPCR解析を行った。造血幹細胞がBFU-Eに分化する過程で *Hmgn2* 発現レベルはわずかに増加した (~1.4倍) が、赤芽球系細胞の分化後期では徐々に減少した (図 1 6)。BFU-EおよびCFU-Eでの *Hmgn2* 発現は、成熟赤血球に比べて、14-12倍高かった ($p < 0.05$)。さらに *Hmgn2* タンパク質発現を免疫組織化学的に調べた。胎齢12.5日目の造血幹細胞、BFU-E、CFU-E、赤芽球、赤血球のサイトスピン標本を作製後、*Hmgn2* 抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察した。*Hmgn2* 蛋白質はすべての分画に発現していた (図 1 7)。

(2) : Hmgn2の異所性発現は赤白血病細胞の分化を抑制する

赤血球分化における Hmgn2 の機能を調べるために、フレンド白血球細胞を用いて、Hmgn2 を異所的に発現させた。完全長マウス Hmgn2 をクローニングし発現プラスミドベクター (レポーター遺伝子として GFP を含む) を構築した。Hmgn2 配列はヌクレオソーム結合ドメイン (NBD) とクロマチンアンフォールディングドメイン (CHUD) に加え、核局在化シグナル (NLS1 と NLS2) を含んだ。フレンド白血球細胞へ Hmgn2 cDNA プラスミドまたは Mock プラスミドをエレクトロポレーション法により導入した。導入二日後に GFP 陽性細胞 (Hmgn2 遺伝子導入細胞) における転写因子 *Gata1* と *Klf1* の mRNA 発現を確認した。GFP 陽性 (Hmgn2 導入) 細胞での *Gata1*、*Klf1* 発現は、Mock コントロールと比較して低かった ($p < 0.05$) (図 18 上図)。しかしながら、分化培養 8 日後では Hmgn2 導入、Mock 導入間でそれらの発現レベルに有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (図 18 下図)。フローサイトメトリーでは、分化培養 8 日目に Mock コントロールでは 69% の c-Kit⁺/CD71⁺細胞 (CFU-E に相当) と 4.2% の c-Kit⁺/CD71⁻ (BFU-E に相当) が認められたのに対し、Hmgn2 導入細胞では 21.0% の c-Kit⁺/CD71⁺細胞 (CFU-E に相当) と 12.6% の c-Kit⁺/CD71⁻ (BFU-E に相当) が認められ、Hmgn2 の異所性発現による、赤芽球分化の抑制が示唆された (図 19 上図)。さらに、Hmgn2 導入細胞の CD71⁺/Ter119⁺ (proerythroblasts に相当) の割合 (1.4%) は Mock コントロール (0.16%) よりも低い値を示した (図 19 下図)。総じて Hmgn2 の異所性発現は、フレンド赤白血球細胞の赤血球分化を抑制した。

(3) : Hmgn2 強制発現は細胞周期 S 期で赤白血球細胞の数を増加させる

フレンド赤白血球細胞の分化を Hmgn2 がどのように制御するかを明らかにするために、Hmgn2 導入細胞の細胞周期をフローサイトメトリー法にて調べた。さらに G1 期特異的遺伝子 (サイクリン D1, D2) の発現を qPCR 法にて調べた。フレンド赤白血球細胞への遺伝子導入 2 日後、GFP 陽性 Hmgn2 導入細胞の 36% が S 期であり、一方 Mock コントロールの 26% が S 期 ($p < 0.05$) (図 20 左図) であった。分化培養 8 日後では Hmgn2 導入、Mock 導入細胞間の S 期の割合 (14%, 17%) に有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (図 20 右図)。さらに qPCR の結果、Hmgn2 導入 2 日後の細胞ではサイクリン D1, D2 の発現抑制が認められた ($p < 0.05$) のものの、8 日後では Hmgn2 導入、Mock 導入細胞で両者の mRNA 発現レベルに有意差は認めら

れなかった（図 2 1）。遺伝子導入細胞の有糸分裂をさらに解析するため、セリン10の抗リン酸化ヒストンH3（G2期から後期の指標）抗体を用いて、Hmgn2導入細胞のフローサイトメトリー解析を行った。培養 2 日では、Hmgn2導入、Mock 導入細胞で有糸分裂細胞の割合に有意差は認められなかった（6.28, 6.1%）（ $p>0.05$ ）（図 2 2）。

（4）：Hmgn2異所性発現は胎仔肝臓内赤芽球系細胞の分化を抑制する

白血病細胞と同様にマウス胎仔肝臓の赤血球分化における Hmgn2 の機能を調べるために、胎齢 12.5 日目のマウス胎仔肝臓より単離した単核球へ、Hmgn2 を異所的な導入実験を行った。エレクトロポレーションによる導入 2 日後に、GFP 陽性(Hmgn2 導入)CD71+Ter119-細胞をソートし、SCF、IL-3、EPO 下で 7 日間培養した。フローサイトメトリー解析の結果、Hmgn2 導入 c-Kit+/CD71+細胞の割合(26%)はMock コントロールにおける同細胞の割合(15.2%)に比べて高い値を示した。一方、Hmgn2 導入 CD71+/Ter119+細胞の割合(68.4%)はMock コントロールにおける同細胞の割合(73.6%)に比べて低い値を示した（図 2 3）。Hmgn2 導入細胞ではMock コントロールに比べ、*Gata1* mRNA の発現レベルが 4.2 倍低く、*Klf1* mRNA 発現にいたっては Hmgn2 導入細胞では検出されなかった（図 2 4）。これらの結果から Hmgn2 の異所性発現は、マウス胎仔肝臓において赤芽球分化を抑制していることが明らかとなった。

*リン酸化アレイによる KS-13 シグナルの解析

KS-13 によるリン酸化機構を検討するため、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を KS-13 存在下（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で 1 日間培養し、Phospho-Kinase Array Kit (Human), Proteome Profiler (R&D SYSTEM 社) を用いて解析した。図 2 5 に示すように、KS-13 は幹細胞の制御に重要と考えられている Akt と p53 をリン酸化する事が明らかになった。

*抗 KS-13 抗体の確立と応用性検討

フロンティア研究所へ委託し、KS-13 に対するモノクローナル抗体を 6 株樹立した（5-2-1、5-2-2、5-3-1、5-3-2、51-2-1、51-2-2）。胎齢 14.5 日目マウス胎仔肝臓を抗 KS-13 抗体で染色したところ、肝臓被膜、類洞血管内皮、一部の血液細胞が染色された（図 2 6）。

マウス骨髄急性白血病細胞株へ抗 KS-13 抗体を添加し培養すると、7 日後に 12%の細胞が Gr-1 陽性顆粒球へ分化した (図 2 7)。

次にフローサイトメトリー法でヒト白血病細胞株における KS-13 の発現解析を行った。5 つのヒト白血病細胞株において、概ね 70%が KS-13 あるいは KS-13 前駆体を細胞表面に発現していた。K562 白血病細胞株では、69%が KS-13 あるいは KS-13 前駆体を細胞表面に発現しており、既存の白血病幹細胞マーカーである Tim3 を一部発現していた。更に、K562 細胞株を KS-13 陽性/陰性分画に分離・採取し、NaB 添加培養により赤血球分化を誘導したところ、培養 4 日目に KS-13 陽性細胞株は Glycophorin A を 62.1%発現し、陰性細胞株よりも低い赤血球分化能を示した (図 2 8)。免疫染色法においては、概ね 70%の細胞が KS-13 あるいは KS-13 前駆体陽性であり、その発現は細胞表面と細胞質に認められた (図 2 9)。また qPCR 法では、KS-13 陽性 K562 細胞株は陰性細胞株の 11.1 倍の *CyclinD1* 遺伝子発現、0.8 倍の *c-Myc* 遺伝子発現を認めた (図 3 0)。

D. 考察

本研究提案では、KS-13 を応用した再生医療における革新的治療技術の開発を目指し、KS-13 を応用した造血幹細胞作製法の開発、KS-13 シグナルの解析、抗KS-13 抗体の有効性検討を行った。

まずマウス細胞を用いて KS-13 の至適濃度を検討したところ、50-100 μ g/mL の濃度において分化抑制効果はプラトーに達した。この結果より、マウス細胞において KS-13 は効果を認めるものの、ヒト細胞において効果が認められた 10 μ g/mL よりも高い濃度で作用する事が示された。KS-13 は 13 アミノ酸から構成されるペプチドである。ビオチン標識 KS-13 を用いた染色結果からは、KS-13 はレセプターを介して作用するのではなく、Endocytosis により細胞内に取り込まれて作用を発揮する事が示唆された。そこで Endocytosis 促進に有効と考えられた改変体を作製しその効果を検討したところ、ミリスチン酸修飾体はオリジナルの KS-13 と少なくとも同等の効果を持つ事が示唆された。しかしながら、KS-13 の N 末端、C 末端より 1 アミノ酸削除した改変体では効果は認められなかった。ヒト細胞における検討では、骨髓球系細胞の分化・増殖抑制が認められた。現在多能性幹細胞から造血幹細胞を誘導する試みが注目されているが、未だ安全かつ高効率な誘導法は確立されていない。多能性幹細胞を造血細胞分化条件において培養すると、効率にマクロファージが産生される。そこで、KS-13 を用いて多能性幹細胞からマクロファージへの分化・増殖を抑えながら、他系統の細胞へ分化を誘導する事を試みたところ、良好な結果が得られた。今後更に検討する予定である。また、MudPIT 法により KS-13 シグナルを解析し、造血幹細胞の分化に関与すると考えられる候補遺伝子を複数同定した。よって、KS-13 は分化を抑制する物質としての使用方法だけではなく、新しい分化関連因子の同定へ応用が可能な事が明らかになった。

多能性幹細胞の造血能比較検討を通じて、株間により差がある事が明らかになり、多能性幹細胞から造血幹細胞を作製する際には適切な多能性幹細胞株を選択する必要がある事が示唆された。AGM 領域の造血幹細胞発生機構の解析より、造血幹細胞作製の際、CD45 がその指標になる事が明らかになった。また、胎盤の造血幹細胞発生・制御機構の解析より、細胞刺激因子 SCF がその制御機構に重要である事が示唆された。これらの知見を新しい造血幹細胞作製法へ応用し、報告者は、遺伝子導入法を用いずに造血幹細胞を作製する事に成功した。また移植による安全性の検討も行い、半年間の経過観察では白血病の発症は認めら

れなかった。今後更に効率良く造血幹細胞を作製するため、本法の改善が期待される。

MudPit 法による KS-13 シグナルの解析から、Hmgn2 を同定した。Hmgn2 の異所性発現により *in vitro* でのマウス赤芽球分化を抑制し、DNA 複製促進および、または S 期での有糸分裂エントリーを阻害した。今後、他の候補因子を解析することで、造血幹細胞の分化制御機構の解明が期待される。

抗 KS-13 モノクローナル抗体を樹立し、KS-13 あるいは KS-13 前駆体の発現解析を行った。白血病細胞株は単一細胞由来であるにも関わらず、抗 KS-13 抗体により性質の異なる 2 つの細胞群に分類可能な事が明らかになった。