博士論文

論文題目　　ヒト造血幹前駆細胞が存在する骨髄微小環境の同定

氏　　名　　木村 隆治

目次

目次 1

略語一覧 2

第一章　要旨 4

第二章　序論 5

第三章　材料と方法 13

第四章　結果

　第一節 23

　第二節 26

　第三節 30

第五章　考察

　第一節 35

　第二節 43

参考文献 47

図 61

謝辞 84

略語一覧

APC	allophycocyanin
BM	bone marrow
CAR	CXCL12-abundant reticular
CB	cord blood
CD	cluster of differentiation
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor type 4
Cy	Cyanine
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethyl sulfoxide
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
GFAP	glial fibrillary acidic protein
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin

Lin	lineage
LNGFR	low affinity nerve growth factor receptor
MACS	magnetic activated cell sorting
NOD	non-obese diabetes
O.C.T.	optimal cutting temperature
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein complex
PBS	phosphate buffered saline
SCEM	super cryoembedding medium
SCF	stem cell factor
SCID	severe combined immunodeficiency
SMA	smooth muscle actin
TGFβ	transforming growth factor beta
TGFβR1	transforming growth factor beta receptor 1
TPO	thrombopoietin

第一章　要旨

造血幹細胞はニッチと呼ばれる特別な骨髄微小環境に存在すると考えられているが、その実態は不明である。本研究では造血系ヒト化マウスならびにヒト骨髄を詳細に解析することにより、ヒト骨髄ニッチの解明を試みた。その結果、マウス骨髄でヒト造血幹/前駆細胞はマウス造血幹細胞と同様にGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞の近傍に局在していること、さらに造血幹細胞の維持に関わるとわれているCXCL12、SCF、LNGFR各陽性細胞がヒト骨髄の血管周囲に存在することを見出した。以上の結果は、GFAP陽性細胞を含む血管周囲ニッチが、ヒトにおいても造血幹細胞の休眠状態および機能の維持に重要である可能性を示唆している。

第二章　序論

生涯にわたりすべての血液細胞を供給し続ける造血幹細胞は、特別な骨髄微小環境に存在すると考えられている。1970年前後に提唱されたこの概念は、1978年にSchofieldにより造血幹細胞“ニッチ”と名付けられた[1]。ニッチを構成する細胞は造血幹細胞を休眠状態に導くことで、細胞分裂や放射線などにより引き起こされる遺伝子損傷から造血幹細胞を保護すると考えられている。また、近年の免疫組織染色や遺伝子改変技術などの進歩によって、造血幹細胞の自己複製能や多分化能の維持において、様々な因子を介したニッチの重要性が認識され始めた[2]。骨髄におけるニッチ構成細胞の候補としては、2003年にマウス造血幹細胞に近接する骨芽細胞が最初に報告された[3]。遺伝子改変により骨芽細胞数が増加したマウスにおいて造血幹細胞数が増加することも確認され、骨芽細胞が造血幹細胞ニッチを構成する細胞であると考えられるようになった[3,4]。その後、この領域で産生される様々なタンパクや低酸素などの環境要因の重要性に関する報告が[5-12]、骨芽細胞を含む骨内膜下ニッチという概念を生み、近年における造血幹細胞ニッチ研究発展の引き金となった。骨芽細胞の報告に続いて2005年、マウス造血幹細胞がCD150陽性、CD48陰性、CD41陰性、分化マーカー陰性

(CD150^{+}CD48^{-}CD41^{-}Lin^{-})分画に濃縮して存在すると報告された。この論文の中で、CD150^{+}CD48^{-}CD41^{-}Lin^{-}細胞の多くが、マウス骨髄の類洞血管内皮細胞に接して存在することが確認された[13]。以上の結果から、血管内皮細胞を中心とした血管周囲が、新たに造血幹細胞ニッチであると考えられるようになった。胚発生において造血幹細胞が血管内皮細胞と共通の祖先から分化し[14-17]、胎仔肝臓や臍帯などの血管が豊富な領域にも造血幹細胞が多く存在する事実も[18-20]、血管周囲ニッチの存在を支持している。更に、肝臓および脾臓などで長期に渡り髄外造血を認める例もあることから[21-23]、成体においても血管およびその周囲と造血幹細胞が関係している可能性が示唆されている。血管周囲は血流が豊富であり、酸素や造血幹細胞を増殖させるサイトカインが豊富に存在すると考えられている一方で、骨内膜下は血管から距離があるため、血管周囲と比較し低酸素および低サイトカイン濃度と考えられている[24]。この環境要因から、造血幹細胞は骨内膜下ニッチで休眠状態に、血管周囲ニッチで活性化状態となると考えられていた。しかし後述する様々なニッチを構成する細胞の同定により、造血幹細胞ニッチは混沌とした状態となっており、その全容は未だ解明されていない。造血幹細胞表面に発現するCXCR4は、造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須の分子であり、そのノックアウトマウスは骨髄での造血不全により周産期に死亡す

る[25]。2006年、CXCR4のリガンドであるCXCL12をマウス骨髄で豊富に発現する細胞(CAR細胞)に隣接する造血幹細胞の存在が報告され[26]、CAR細胞の除去により造血幹細胞が減少することも確認された[27]。また2010年には、主に血管周囲に存在するネスチン陽性細胞の近傍に造血幹細胞が存在するとの報告がなされた[28]。この細胞は間葉系に属する様々な細胞に分化可能な間葉系幹細胞であることが明らかとなっており、様々なサイトカインを産生して造血幹細胞を支持すると考えられている。SCFは造血幹細胞の増殖および維持に必須のサイトカインであり、この遺伝子のノックアウトマウスは高度の貧血により周産期に死亡する[29]。2012年、コンディショナルノックアウトマウスによって様々な細胞からSCF遺伝子を除去した結果、血管内皮細胞および血管周囲に存在するレプチンレセプター陽性骨髄間質細胞からSCFを除去した場合にのみ造血幹細胞数が減少することが確認され、またこれらの細胞と接して造血幹細胞が存在することも報告された[30]。CAR細胞、ネスチン陽性間葉系幹細胞、SCF産生血管内皮および骨髄間質細胞は、サイトカインの産生や表面抗原、間葉系細胞への分化能などに類似する点が多く、一部は共通する細胞が含まれている可能性が存在するものの、造血幹細胞を支持する重要な細胞であることが示されている。これらの細胞とは異なり、造血幹細胞が骨髄において休眠状態で存在するという観点から報告

された造血幹細胞ニッチ構成細胞が存在する。細胞の休眠状態維持に重要な転写因子であるFOXO3aや、CDKインヒビターであるp57のノックアウトマウスでは造血幹細胞の細胞周期が亢進し、造血幹細胞数および造血能は経時的に低下することから、造血幹細胞は休眠状態で存在することがその機能維持に重要であることが示されている[31-33]。休眠状態で存在するマウス造血幹細胞では、脂質ラフトの凝集抑制による細胞表面レセプターであるc-Kitの凝集抑制、Aktの脱リン酸化、FOXO3aの核局在が観察される。一方で、造血幹細胞を増殖に導くサイトカイン刺激や造血前駆細胞への分化により、脂質ラフトの凝集によるc-Kitの凝集、Aktのリン酸化、FOXO3aの細胞質局在が観察されるようになる[34]。c-KitはそのリガンドであるSCFとの結合により造血幹細胞に増殖シグナルを伝達するが、やがて細胞内に取り込まれることによりそのシグナルは減弱する。しかしサイトカインレセプターが凝集した状態で存在することにより、リガンドが結合した際の細胞内への取り込みが抑制され、持続的にシグナルを伝達することでその作用が増強されると報告されている[34]。またAktはリン酸化により活性化され、転写因子であるFOXO3aをリン酸化し細胞質に局在させることで、その作用を減弱させる。従って、必要最小限のc-KitシグナルおよびFOXO3aの核局在による転写活性が、造血幹細胞の休眠状態の維持に重要であると考えられてい

る[34]。その後、造血幹細胞にこれらの現象を引き起こすサイトカインがTGFβであることが報告され、造血幹細胞の休眠状態維持にTGFβシグナルが重要な役割を果たすことが明らかとなった[35]。TGFβは不活性化タンパクと一体で産生され、不活性部分が切断された後も非共有結合でこのタンパクと結合することで、不活性の潜在型として存在する。TGFβの活性化には、不活性化タンパクがプロテアーゼによる切断を受けることや、インテグリンなどの接着因子との結合による構造変化を受けることが必要となる[36]。これらの知見から、骨髄における活性型TGFβ産生細胞が造血幹細胞ニッチを構成している可能性が考えられ、所属研究室から2011年、骨髄の様々な細胞が不活性型TGFβを産生するものの、血管周囲に存在するGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞のみがTGFβを活性化することが報告された[37]。この細胞の除去により造血幹細胞数の減少および細胞周期の亢進が認められることから、GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞はマウス骨髄において、造血幹細胞を休眠状態に導く造血幹細胞ニッチを構成することが明らかとなった[37]。現在では、これらの造血幹細胞ニッチを構成する細胞が、細胞間の接触および分泌因子を介して複雑に相互作用しながら造血幹細胞ニッチを形成し、造血幹細胞の増殖、分化、細胞周期、骨髄へのホーミングなどを調節していることが示されている[2, 38](図1)。それぞれが固有の機能を有して状況により造

血幹細胞が使い分けをしているのか、あるいはこれらの細胞が集中している領域が造血幹細胞ニッチであるのかなど、造血幹細胞ニッチの全体像は未だ解明されていない点が多く存在するものの、マウスモデルを用いて造血幹細胞ニッチ研究に大きな進展が認められた。ヒト造血幹細胞の機能維持においても造血幹細胞ニッチは重要であると考えられているが、ヒト造血幹細胞を取り巻く骨髄微小環境に関する報告はほとんど存在しない。ヒト造血幹細胞を体外で高度に増殖させ、移植ソースとして用いる試みがなされている。未だ満足する結果は得られていないが、造血幹細胞は骨髄内で増殖およびその機能維持をしているため、その微小環境を解明して再現できれば、in vitroでも造血幹細胞を自己複製させることが可能になると考えられている。これにより造血幹細胞移植のドナー不足を解消することが可能となれば、医学的な貢献は非常に大きい。

マウス造血幹細胞は、CD34陰性、c-kit陽性、Sca-1陽性、分化マーカー陰性(CD34$^-$KSL)分画に高度に濃縮している[39]。一方ヒト造血幹/前駆細胞は、分化マーカー陰性、CD34陽性、CD38陰性(Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$)分画に存在している[40,41]。さらにこの分画中の、CD90陽性、CD45RA陰性(Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$CD90$^+$CD45RA$^-$)分画もしくはCD90陽性、CD49f陽性(Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$CD90$^+$CD49f$^+$) 分画に、造血幹細胞はより濃縮して存在すると報告されている[42,43]。表面抗原は異なるもの

の、マウスとヒトで共通して造血幹細胞は細胞周期のG0期に存在し、細胞分裂にともなうDNA障害や活性酸素などの様々なストレスから防御されることが、造血幹細胞の機能維持に重要であると考えられている[44]。またこの機構は白血病幹細胞でも共通していると考えられており、白血病幹細胞を取り巻く骨髄微小環境が造血幹細胞ニッチと共通であるかは明らかとなっていないが、白血病幹細胞は白血病幹細胞ニッチに休眠状態で存在することにより、細胞周期依存性の抗がん剤や放射線に抵抗性となると考えられている[45]。従って、治療抵抗性白血病幹細胞の残存による再発を抑制するためには、白血病幹細胞ニッチから白血病幹細胞へのシグナルを解明することが重要である。

遺伝子改変マウスの作製や薬剤投与などの介入によって、これまで困難であったマウス造血幹細胞およびそのニッチに関する研究に進歩がもたらされた。マウスで得られた知見が、ヒト造血幹細胞の制御においても同様に働いているかどうかを示すことは、ヒトの造血機構、および疾患やその治療を考える上で非常に重要である。しかしながら、マウスで行われるこうした技術を実施することができないため、ヒト造血幹細胞およびそのニッチを解析すること自体が非常に困難である。こうした状況の中で、ヒト体外でヒト造血を行うモデル系を構築し解析を行うことは、その成果がヒトでの生理的な状態を解明したこと

と同一ではないものの、ヒト研究を行う前段階として重要な意味を持つと考えられる。現時点において、ヒト造血を長期に行うモデル系としてもっとも優れた系は、免疫不全マウスにヒト造血幹/前駆細胞を移植し造血系ヒト化マウスを作成する方法である[46-50]。マウスとヒトでは種が異なり、また造血因子の交差反応性の問題などからも、高度免疫不全マウスを用いてもヒト造血を完全に再現するまでには至っていない[51]。しかし、ヒト造血幹/前駆細胞の機能が長期にわたりマウス体内で維持されれば、マウスの造血幹細胞ニッチが一定の役割をはたしていると判断できるため、ヒト造血幹/前駆細胞ニッチの基盤的研究として有用であると考えられる。本研究では、まず高度免疫不全のNOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null} (NOG)マウスにヒト造血幹/前駆細胞を移植することで、造血系ヒト化マウスを作成した。そしてこの造血系ヒト化マウスにおけるヒト造血幹/前駆細胞の動態を解析することで、特にヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態を維持するニッチを推定することを第一の目的とした。またその成果をヒト骨髄で確認し、ヒト造血幹細胞を取り巻く微小環境をヒト骨髄で推定することを第二の目的とした。今後、ヒト造血幹/前駆細胞を生理的状態により近い状態で維持可能な免疫不全マウスが作製されれば、ヒト造血環境のより忠実な再現が可能になると考えられる。

第三章　材料と方法

動物

NOGマウスは実験動物中央研究所 (Kanagawa, Japan) より購入した。すべての動物実験は東京大学医科学研究所の実験動物安全委員会の指針に基づいて行った。

ヒト検体

ヒト臍帯血は日本赤十字社関東甲信越臍帯血バンクより、東京大学医科学研究所の倫理委員会により承認された方法を用いて入手した(23-62 ヒト造血幹細胞を取りまく微小環境（ニッチ）に関する研究, 承認番号: 23-62-240619)。ヒト骨髄は順天堂大学医学部付属病院より、順天堂大学医学部より承認された方法を用いて入手した(順大医倫第 2012036号)。具体的には、病期の診断目的で骨髄検査を施行される悪性リンパ腫患者に対して、文書並びに口頭で説明を行い、十分理解を得たうえで文書による同意を得た後に、骨髄穿刺液および生検検体を入手した。この中で骨髄浸潤のない患者より得られた骨髄を正常骨髄として扱い解析に用いた。単核球はFicoll-Paque PREMIUM (GE healthcare)を用いて調製

した。ホルマリン固定パラフィン包埋およびO.C.T.コンパウンド包埋凍結のヒト骨髄はCureline社 (South San Francisco, CA)より購入した。

ヒトCD34陽性細胞の純化と移植

ヒトCD34陽性細胞は、ヒト臍帯血単核球よりヒトCD34マイクロビーズキット (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を、製造元のプロトコールに従い使用し純化した。免疫不全マウスへの移植は、6〜8週齢のメスのNOGマウスに、2〜2.5Gyの放射線を照射し、2×10^5個のCD34陽性細胞を尾静脈より注入し行ったが、細胞数に余裕がある場合には、最大で4×10^5個のCD34陽性細胞を移植した。すべての解析は、移植後12週から16週の間に行った。

抗体

色素もしくはビオチン結合抗体

抗ヒトCD31-Alexa Fluor 488 (WM59, BioLegend, San Diego, CA)

抗ヒトCD34-PE, APC, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 (581, BioLegend)

抗ヒトCD38-PE/Cy7 (HB7, BD Biosciences)

抗ヒトCD38-Alexa Fluor 488 (HIT2, BioLegend)

抗ヒトCD45-Pacific Blue (HI30, BioLegend)

抗ヒトCD45RA-PerCP/Cy5.5, Pacific Blue (HI100, BioLegend)

抗ヒトCD49f-PerCP/Cy5.5 (GoH3, BioLegend)

抗ヒトCD90-FITC, PE (5E10, BioLegend)

抗ヒトGlycophorin A-FITC (HI264, BioLegend)

抗ヒトKi-67-FITC (Ki-67, BioLegend)

抗ヒトlineage cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)-FITC

(UCHT1, HCD14, 3G8, HIB19, 2H7, HCD56, BioLegend)

抗マウスCD45-Biotin, PE, APC (30-F11, BioLegend)

抗マウスTer119-Biotin, PE (TER-119, BioLegend)

抗マウスB220-FITC (RA3-6B2, BioLegend)

一次抗体

抗ヒトc-Kit抗体 (ウサギ, Cell Signaling Technologies, Charlottesville, VA)

抗ヒトp57抗体 (ウサギ, Cell Signaling Technologies)

抗ヒトFOXO3a抗体(ウサギ, Cell Signaling Technologies)

抗ヒトCD45抗体 (F10-89-4, マウス, Abcam, Cambridge)

抗ヒトSCF抗体 (ウサギ, Abcam)

抗ヒトSMA抗体 (ヤギ, Abcam)

抗ヒトLNGFR抗体 (NGFR5, マウス, Molecular Probes, Carlsbad, CA)

抗ヒトLNGFR抗体 (ウサギ, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri)

抗ヒト/マウスGFAP抗体 (ウサギ, Dako, Glostrup, Denmark)

抗ヒトCD34抗体 (QBEnd 10, マウス, Dako)

抗ヒト/マウスTGFβ抗体 (ウサギ, R&D systems, Minneapolis)

抗ヒトCXCL12抗体 (79018, マウス, R&D systems)

二次抗体

抗ウサギIgG-Alexa Fluor 488 (ヤギ, Molecular Probes)

抗ウサギIgG-Alexa Fluor 546 (ヤギ, Molecular Probes)

抗ウサギIgG-Alexa Fluor 546 (ロバ, Molecular Probes)

抗マウスIgG-Alexa Fluor 488 (ヤギ, Molecular Probes)

抗マウスIgG-Alexa Fluor 647 (ヤギ, Molecular Probes)

抗マウスIgG-Alexa Fluor 647 (ロバ, Molecular Probes)

抗ヤギIgG-Alexa Fluor 488 (ロバ, Molecular Probes)

Zenon Alexa Fluor 546 rabbit IgG labeling kit (Molecular Probes)

細胞純化

ヒト造血幹/前駆細胞のソーティングのために、まずHuman Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi Biotec)を製造元プロトコールに従い使用し、磁気細胞分離により分化マーカー陽性細胞を除去した。造血系ヒト化マウスでは、ビオチン結合の抗マウスCD45抗体および抗マウスTer119抗体を、マウス由来の血球除去のために加えた。分化マーカー陰性細胞を検出する必要がある際には、ストレプトアビジン-APC/Cy7 (BioLegend)を用いて染色した。ヒト造血幹/前駆細胞の解析およびソーティングには、抗ヒトCD34-PEもしくはAPC, 抗ヒトCD38-PE/Cy7 , 抗ヒトCD90-FITCもしくはPE, 抗ヒトCD45RA-PerCP/Cy5.5もしくはPacific Blue, 抗ヒトCD49f-PerCP/Cy5.5を使用した。末梢血キメリズム解析は、抗ヒトCD45-Pacific Blue、抗マウスCD45-APCを用いて行った。細胞の解析およびソーティングは、FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)により行った。

細胞周期解析

まずDNA染色のために10 μg/mlのHoechst 33342 (Sigma-Aldrich)、および

Hoechst 33342排出阻害のために40 μg/mlのVerapamil (Sigma-Aldrich)を用いて、骨髄もしくは臍帯血の細胞を37°Cで40分間染色した。その後、RNA染色のために0.5 μg/mlのPyronin Y (Sigma-Aldrich)を加えて37°Cで更に20分間染色を行い、PBSで洗浄した後に細胞表面抗原を染色し解析した。解析には大部分がG0分画に存在するマウスB220陽性脾臓B細胞をコントロールとして用いた[52]。解析ゲートは、まず全細胞のHoechst 33342ヒストグラムの形状から、大部分の細胞が存在するG0/G1分画(核型2n)をG2/M/S分画(核型2n<)と区別しゲートを設定した。次に、Hoechst 33342とPyronin Yで展開した散布図より、Hoechst 33342^{high}の細胞が存在しないPyronin Y^{low}領域をG0分画としてG1/G2/M/S分画と区別した。Ki-67を用いた解析では、細胞表面抗原を染色した後に、Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences)を用いて固定および膜透過処理を行い、抗ヒトKi-67-FITCおよび10 μg/mlのHoechst 33342を用いて染色し、アイソタイプコントロール抗体を用いた染色と比較しゲートを設定した。解析はFACSAriaを用いて行った。

In-droplet免疫染色

ソーティング後のヒト造血幹/前駆細胞の染色は、In-droplet免疫染色により行

った[53]。まず高撥水性印刷スライドグラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan)にPBSで液滴を形成し、ヒト造血幹/前駆細胞を直接ソーティングした後、細胞をスライドグラスに接着させるために37℃で1時間静置した。その後、細胞を4%パラホルムアルデヒドにより室温で10分間静置して固定を行い、PBSで洗浄した後にMAXblock blocking medium (Active Motif, Carlsbad, CA)を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。一次抗体は4℃で一晩反応させ、PBSで洗浄した後に二次抗体を室温で1時間反応させ、PBS洗浄後にDAPIにより核染色を行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用い、結果の解析はZEN software (Carl Zeiss)にて行った。一次抗体は、抗ヒトc-kit抗体 (1:100, ウサギ)、抗ヒトp57抗体 (1:100, ウサギ)、抗ヒトFOXO3a抗体 (1:100, ウサギ)、二次抗体は抗ウサギIgG-Alexa Fluor 488 (1:250, ヤギ)、抗ウサギIgG-Alexa Fluor 546 (1:250, ヤギ)を使用した。c-Kitの凝集は、細胞膜上に1つ以上の蛍光凝集塊が認められるものを陽性とし、FOXO3aの核局在は核に一致し蛍光が観察されるものを陽性とカウントした。またp57はコントロール抗体で観察されるバックグラウンドと比較し蛍光強度の高いものを陽性とした。

細胞内染色

細胞表面抗原を染色しPBSで洗浄した後に、Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kitを用いて固定および膜透過処理を行った。一次抗体は抗ヒトp57抗体を用いて染色し、二次抗体は蛍光色素結合の抗ウサギIgGを用いて行った。解析はFACSAriaを用いて行った。

免疫染色

骨髄凍結切片の作成および免疫染色は、川本法に準じて行った[37]。 マウス大腿骨およびヒト骨髄をSCEM (Leica Microsystems, Tokyo, Japan)に包埋し、冷却したヘキサン (Wako, Osaka, Japan)に投入し凍結させた。この凍結ブロックをクライオスタットCM3050 S (Leica Microsystems)に固定し、クライオフィルム (Leica Microsystems)上に7μmの組織切片を作成した。その後の固定および染色は、In-droplet免疫染色と同様に行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 710、Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific, Pittsburgh)、蛍光顕微鏡BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)を用いて行った。 一次抗体は抗ヒトCD45抗体(1:100, マウス)、抗マウスCD45-PE抗体、抗ヒトGlycophorin A-FITC、抗マウスTer119-PE、抗ヒトCD38-Alexa Fluor 488、 抗ヒトlineage cocktail-FITC、抗ヒトCD34-Alexa Fluor 488もしくはAlexa Fluor 647、抗ヒトCD31-Alexa Fluor 488、抗

ヒトLNGFR抗体 (1:100, マウス)、抗ヒト/マウスGFAP抗体 (1:200, ウサギ)、抗ヒトCD34抗体 (1:100, マウス)、抗ヒト/マウスTGFβ抗体 (1:25, ウサギ)、抗ヒトCXCL12抗体 (1:25, マウス)、抗ヒトSCF抗体 (1:100, ウサギ)、抗ヒトSMA抗体 (1:100, ヤギ)、抗ヒトLNGFR抗体 (1:100, ウサギ)、二次抗体は抗ウサギIgG-Alexa Fluor 488 (1:250, ヤギ)、抗マウスIgG-Alexa Fluor 488 (1:250, ヤギ)、抗ヤギIgG-Alexa Fluor 488 (1:250, ロバ)、 抗ウサギIgG-Alexa Fluor 546 (1:250, ヤギ)、 抗ウサギIgG-Alexa Fluor 546 (1:250, ロバ)、抗マウスIgG-Alexa Fluor 647 (1:250, ヤギ)、抗マウスIgG-Alexa Fluor 647 (1:250, ロバ)、 Zenon Alexa Fluor 546 rabbit IgG labeling kit (Molecular Probes)を使用した。各抗体による染色は連続切片を用いて、アイソタイプコントロール抗体では染色されないことを確認している。

TGFβR1インヒビター投与

TGFβR1インヒビターであるLY364947 (Merck Millipore, Billerica, MA)はDMSO (Sigma-Aldrich)に溶解し、造血系ヒト化マウスの腹腔内に10mg/kg (Day -7, -5, -3)および25mg/kg (Day -1)を投与した。造血系ヒト化マウスの骨髄より得られた細胞は、細胞表面抗原を染色した後に抗Ki-67抗体およびHoechst 33342を用い

て染色し、表面抗原および細胞周期をFACSAriaにて解析を行った。

ヒト造血幹/前駆細胞の培養

$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$および$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$細胞を、1穴にStemSpan SFEM media (Stem Cell Technologies)、SCF (50 ng/ml)、TPO (50 ng/ml)、Flt3 ligand (50 ng/ml)、IL-6 (20 ng/ml)、TGFβ添加群ではTGFβ (20 ng/ml, すべてPeprotech)を200μl含む96穴プレートに直接ソーティングし、5%CO2存在下37℃で14日間培養した。生細胞であるトリパンブルー非染色細胞は、7日ごとにカウントした。

統計解析

統計的有意差の有無を検定する際は、*t*検定により行った。すべての統計解析はprism 6 software (Graphpad, San Diego, CA)により行った。

第四章　結果

第一節　造血系ヒト化マウスにおけるヒト造血幹/前駆細胞ニッチの再現

1. 造血系ヒト化マウスの作出

ヒト造血幹/前駆細胞およびそのニッチの解析を行うために、ヒト臍帯血より純化したCD34陽性細胞を、亜致死量の放射線照射を施したNOGマウスに移植し造血系ヒト化マウスを作成した。すでに報告されているように、このマウスの末梢血中にはヒトCD45陽性のヒト血液細胞が確認され(図2A)、長期にわたりヒト造血を維持すことが確認された[48,49](図2B, C)。ヒト造血幹細胞は、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画に濃縮して存在すると報告されている[40,41]。フローサイトメトリーにて解析した結果、ヒト骨髄および臍帯血と同様に(図3A, B)、造血系ヒト化マウス骨髄においても$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画の存在が確認された (図3C)。しかしヒト骨髄、ヒト臍帯血、造血系ヒト化マウス骨髄の間でフローサイトメトリーのパターンは異なり、また由来が同一でもヒト造血幹細胞の割合は個体により異なることが確認された(図3)。ヒト造血幹細胞は、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$分画もしくは$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD49f^{+}$分画にさらに濃縮して存在している

[42,43] (図4A)。造血系ヒト化マウス骨髄をフローサイトメトリーにて解析した結果、造血系ヒト化マウスにおいてもこの表面抗原を有する細胞集団が確認された(図4B)。ヒト骨髄および臍帯血と同様に、造血系ヒト化マウスにおいてもヒト造血幹細胞は$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画に存在することが報告されている[54]。この結果を検証するために、造血系ヒト化マウス骨髄に存在する細胞を、抗ヒトLin抗体、抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD38抗体を用いて$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$、 $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$、$Lin^{-}CD34^{-}$分画にソーティングし、亜致死量の放射線照射を行ったNOGマウスに各分画の細胞を100個ずつそれぞれ5匹に二次移植した。その結果、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画を移植した場合にのみ8週以降もマウス末梢血中にヒトCD45陽性細胞を認め(図5)、造血系ヒト化マウスにおいてもヒト造血幹細胞は$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画にのみ存在することが確認された。

2. 造血系ヒト化マウスにおけるヒト造血幹/前駆細胞の細胞周期解析

ヒト造血幹/前駆細胞もマウスと同様に、骨髄において休眠状態で存在する[44]。マウス骨髄においても、移植されたヒト造血幹/前駆細胞が休眠状態を維持しているかを確認するために、造血系ヒト化マウス骨髄で細胞周期解析を行った。表面抗原と共に、細胞をヘキストおよびピロニンYで染色することにより、ヘキ

スト^{low}ピロニンY^{low}のG0分画、ヘキスト^{low}ピロニンY^{high}のG1分画、ヘキスト^{high}ピロニンY^{high}のG2/M/S分画に分画することが可能である[52,55,56]。ヒト骨髄では、Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}造血幹/前駆細胞の82.11±7.51%(n=5)がG0期に存在している(図6A,7)。一方、ヒト臍帯血ではG0期に存在するLin^{-}CD34^{+}CD38^{-}細胞は39.94±11.71%(n=7)であり(図6B, 7)、ヒト骨髄と比較しG0期に存在する造血幹/前駆細胞の割合が少ない($p<0.005$)。造血系ヒト化マウス骨髄の細胞周期を解析した結果、Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}細胞の58.55±4.49%(n=4)がG0期に存在しており(図6C, 7)、ヒト骨髄と比較するとG0期に存在する細胞が有意に少なかったものの($p<0.005$)、ヒト臍帯血と比較すると有意にG0期に存在する細胞は多かった($p<0.05$)。ピロニンYからの蛍光は、フローサイトメトリーの広範な検出器により検出されるため、より詳細な細胞分画の細胞周期を解析することは困難である。造血幹細胞がより濃縮されるとされる分画の細胞周期を解析するために、ピロニンYに代わり抗Ki-67抗体を用いて解析した。この方法では、ヘキスト^{low}Ki-67^{low}のG0分画、ヘキスト^{low}Ki-67^{high}のG1分画、ヘキスト^{high}Ki-67^{high}のG2/M/S分画に分画することが可能である[52,57]。ヒト造血幹細胞はLin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}分画に濃縮されており、Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{-}CD45RA^{-}、Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{-}CD45RA^{+}と表面抗原が変化するにつれて長期骨髄再建能を失っていくことが報告されている[42]。

ヒト骨髄を解析した結果、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$造血幹細胞分画の85.46±5.52%(n=4)がG0分画に存在していた(図8A, 9)。一方、ヒト臍帯血ではG0期に存在する$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$細胞は55.55±9.75%(n=4)であり(図8B, 9)、ヒト骨髄と比較しG0期に存在する造血幹細胞の割合が少ない($p<0.005$)。造血系ヒト化マウス骨髄を同様に解析した結果、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$細胞の75.65±5.18%(n=4)がG0分画に存在しており(図8C, 9)、G0分画の割合はヒト骨髄と比較し低頻度であったものの($p<0.05$)、ヒト臍帯血と比較すると有意にG0期に存在する細胞は多く($p<0.05$)、大部分のヒト造血幹細胞が長期にわたり休眠状態を維持していることが確認された。この結果から、造血系ヒト化マウスの骨髄環境は、細胞周期に関してヒト骨髄環境を完全に模倣することはできないまでも、ヒト造血幹細胞を休眠状態に導く何らかの機構が存在する可能性が示唆された。

第二節　造血系ヒト化マウス中のヒト造血幹/前駆細胞の休眠維持機構

1. 休眠状態を維持する分子機構の解明

マウス造血幹細胞の休眠状態を維持するために、様々な分子メカニズムが存

在する。脂質ラフトの凝集抑制はc-Kitの凝集を抑制し、そのリガンドであるSCFから造血幹細胞への増殖シグナルを弱める。またp57の発現やFOXO3aの核移行を介して、細胞は休眠状態に導かれる[34,35]。造血系ヒト化マウス中のヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態を維持する分子機構を解明するために、造血系ヒト化マウス骨髄に存在するヒト$Lin^-CD34^+CD38^-$造血幹/前駆細胞および$Lin^-CD34^+CD38^+$造血前駆細胞をソーティングし、In-droplet免疫染色により解析を行った。c-Kitの局在を解析した結果、$Lin^-CD34^+CD38^+$造血前駆細胞では大部分のc-Kitが凝集していたが、$Lin^-CD34^+CD38^-$造血幹/前駆細胞ではc-Kitが凝集している細胞は有意に少ないことが確認された(89.93±5.34% vs. 52.90±8.59%, n=3, $p<0.05$, 図10A)。また$Lin^-CD34^+CD38^+$造血前駆細胞においては、FOXO3aが核に存在する細胞をほとんど認めないものの、$Lin^-CD34^+CD38^-$造血幹/前駆細胞では有意に核に存在している細胞の割合が高いことが明らかとなった(8.13±4.23% vs. 27.50±4.26%, n=3, $p<0.05$, 図10B)。さらに、$Lin^-CD34^+CD38^+$造血前駆細胞にはp57を発現する細胞は少ないものの、$Lin^-CD34^+CD38^-$造血幹/前駆細胞で有意に多くの細胞で発現が認められた(13.43±2.17% vs. 36.90±6.60%, n=3, $p<0.05$, 図11A)。またp57を細胞内染色後にフローサイトメトリーにより解析を行った結果、p57の平均蛍光強度は$Lin^-CD34^+CD38^+$造血前駆細胞と比較し$Lin^-CD34^+CD38^-$造血幹/前駆細胞において

有意に高く(422.7±45.1 vs. 835.7±50.0, n=3, $p<0.005$)、造血幹/前駆細胞においてp57の発現量が高いことが明らかとなった(図11B, C)。これらの結果から、ヒト造血幹/前駆細胞は造血系ヒト化マウス骨髄において、マウス造血幹細胞と同様の機構で休眠状態を維持する細胞が存在することが示唆された。

2. 造血系ヒト化マウス骨髄におけるヒト造血幹/前駆細胞の存在部位

造血系ヒト化マウスは長期にわたりヒト造血を維持することから、マウス骨髄におけるマウス造血幹細胞ニッチが、ヒト造血幹細胞の機能維持に何らかの影響を与えていることが想定される。まず造血系ヒト化マウス骨髄でのヒト血球細胞の分布を確認するために、造血系ヒト化マウスの骨髄切片を作製し、抗ヒトCD45抗体を用いてヒト白血球、および抗ヒトグリコフォリンA抗体を用いてヒト赤血球を検出することでヒト由来血球細胞を、抗マウスCD45抗体を用いてマウス白血球、および抗マウスTer119抗体を用いてマウス赤血球を検出することでマウス由来血球細胞をそれぞれ検出した。その結果、ヒト血球細胞とマウス血球細胞は均一に混じり合って存在するのではなく、それぞれが住み分けられる傾向にあった(図12, 上段および中段)。次に、ヒト血球細胞の分化マーカーとして抗ヒトLin抗体および抗ヒトCD38抗体、また未分化マーカーとして抗ヒト

CD34抗体を用いて免疫染色を行い、ヒト血球細胞集団において分化度により存在様式に差があるか検討した。その結果、最も未分化なLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$細胞はほとんど認められないが、LinもしくはCD38陽性のヒト血球細胞集団の中でも、未分化細胞であるCD34陽性細胞の頻度は大きく異なっていた(図12, 下段)。Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$造血幹/前駆細胞の頻度は非常に低く、肉眼的な観察では検索ならびに定量的に解析することは困難である。アレイスキャンは、多数の細胞が存在する骨髄切片を定量的に解析し、蛍光強度により散布図を作成することが可能である。このイメージアナライザーを用いることにより、非常に頻度の少ない個々のLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$造血幹/前駆細胞の存在場所を、散布図からその表現型を用いてトラックバックすることが可能である。マウス骨髄では、GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞がマウス造血幹細胞の休眠状態維持に重要であり、造血幹細胞の23.3%がGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞に接して存在すると報告されている[37]。マウス骨髄において休眠状態で存在するヒト造血幹/前駆細胞が検出されることから、GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞に接するヒト造血幹/前駆細胞を解析した。GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞のマウス骨髄での頻度は非常に少ない(図13A)。アレイスキャンを用いて独立した3例の造血系ヒト化マウス骨髄を解析した結果、10細胞中2細胞(20%)のLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$造血幹/前駆細胞が、

GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞から1細胞以上離れず接して存在することが確認された(図13B)。GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞は、マウス骨髄における唯一のTGFβ活性化細胞であり、活性型TGFβからのシグナルが造血幹細胞の休眠状態に維持に重要であると報告されている[37]。活性型TGFβがヒト造血幹細胞に与える影響を検討するために、造血系ヒト化マウスにTGFβR1インヒビターであるLY364947を投与し解析した。その結果、コントロール群と比較してインヒビター投与群では、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$造血幹細胞の頻度に変化はないものの(0.00842±0.00181% (n=3) vs. 0.01106±0.00378% (n=4), p=0.5989, 図14A)、有意にG0分画が減少し細胞周期が亢進することが確認された(73.9±3.1% (n=3) vs. 56.8±4.0% (n=4), p<0.05, 図14B)。以上の結果から、造血系ヒト化マウスの骨髄において、マウスGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞にて活性化されるTGFβを使用し、休眠状態を維持するヒト造血幹細胞が存在していることが示唆された。

第三節　ヒト骨髄における造血幹細胞ニッチ

1. ヒト骨髄におけるGFAP陽性細胞および活性型TGFβ

マウスでの研究結果は非常に重要であるが、マウスとヒトでは結果が異なる

ことがしばしば観察される。マウスにおいてTGFβシグナルの阻害による細胞周期の亢進が、抗がん剤投与後の血球回復を促進するとの報告や[58]、慢性骨髄性白血病において分子標的薬であるイマチニブの感受性を亢進させるとの報告があり[59]、造血幹細胞ニッチからのTGFβシグナルの重要性が示唆されている。これらの成果を将来的に臨床応用するためには、マウスとヒトで造血幹細胞の機能維持に共通の機構が存在するかを確認することは極めて重要である。マウス造血幹細胞および造血前駆細胞は活性型TGFβにより強力に増殖が抑制される[35]。過去に報告されているように、ヒト臍帯血から得られた$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$造血前駆細胞も、マウスと同様に活性型TGFβの刺激により強力に増殖が抑制される[60](図15A)。マウス骨髄においては、血管周囲に存在するGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞がTGFβを活性化し、造血幹細胞を休眠状態に導くニッチを構成している[37]。ヒト骨髄におけるTGFβ活性化細胞を調べるために、ヒト骨髄切片を作製し免疫染色による解析を行った。抗活性型TGFβ抗体を用いて免疫染色を行うと、不活性型TGFβを豊富に産生する巨核球は染色されないが、酸処理にてTGFβを活性化することにより巨核球が染色されるようになることから、抗活性型TGFβ抗体は特異的に活性化型TGFβを認識する抗体である[37]。抗活性型TGFβ抗体を用いてヒト骨髄の免疫染色を行った結果、活

性型TGFβはマウス骨髄と同様に、長紡錘形の細胞と一致してのみ存在することが明らかとなった(図15B)。また長紡錘形のGFAP陽性細胞がCD31陽性血管内皮細胞周囲に存在し(図15C)、この細胞に一致してのみ活性型TGFβが存在することが確認された(図15D)。これらの結果から、マウスと同様にヒト骨髄においても血管周囲に存在するGFAP陽性細胞がTGFβ活性化細胞であり、ヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

2. ヒト骨髄における血管周囲ニッチ

造血幹細胞の機能を維持するための様々な細胞が、マウスを用いた研究により報告されている[26-28,30]。次にヒト骨髄において、GFAP陽性細胞以外これらの細胞がどの部位に存在するかを検討した。CXCL12はマウス造血幹細胞だけでなく、ヒト造血幹細胞の骨髄へのホーミングにも必須の分子である[25-27, 61]。CXCL12を骨髄中で発現する細胞を検出するために、抗CXCL12抗体により免疫染色を行った。その結果、CXCL12は骨髄に管腔様構造として最も強く染色された(図16A, 矢印)。また骨基質に存在するタンパクであるオステオポンチンと共染色した結果、骨内膜領域にCXCL12は染色されなかった(図16B)。これらの結果から、CXCL12と血管との関連が示唆されるため、血管内皮細胞のマーカーである

CD31と共染色を行った。その結果、CD31陽性血管内皮細胞にCXCL12が最も強く染色されることが確認された(図16C)。SCFはマウス造血幹細胞の増殖および維持に必須の因子であり、その発現細胞が造血幹細胞ニッチを構成すると報告されている[30]。ヒト骨髄におけるSCFを産生する細胞を検出するために、抗SCF抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、SCF産生細胞は、CXCL12と同様に管腔様構造として最も強く染色され(図17A, 矢印)、骨内膜領域には染色されなかった(図17B)。マウス骨髄では、CXCL12発現細胞はSCFを発現していることが報告されているが[27]、ヒト骨髄においてはCXCRL12陽性細胞とSCFが共局在しない(図17C)。この結果から、ヒト骨髄におけるSCF発現細胞は、CXCL12発現細胞とは異なる種類の細胞であることが明らかとなったが、SCF発現細胞はCD31陽性血管内皮細胞を取り囲むようにのみ局在していた(図17C)。SCF発現細胞を同定するため、血管平滑筋細胞に存在するα-SMAと共染色を行った。その結果、SCFは血管平滑筋細胞に発現することが明らかとなった(図18)。また血管周囲に弱くCXCL12を発現する網様細胞が確認されたが(図18)、血管から離れた部位にはCXCL12発現細胞は存在せず、CXCL12およびSCFは血管と深い関係があることが明らかとなった。間葉系幹細胞はマウス骨髄中において、造血幹細胞を支持する細胞であることが報告されている[28]。ヒト骨髄においては、LNGFRが間

葉系幹細胞のマーカーとして用いられる[62]。抗LNGFR抗体を用いて免疫染色した結果、LNGFR陽性細胞は骨髄間質に散在性に存在するものの、管腔様構造に集簇して存在することが明らかとなった(図19A, 矢印)。この存在様式から間葉系幹細胞も、CXCL12およびSCFと同様に血管との関連が示唆されるため、CD31もしくはCXCL12にα-SMAを加えて共染色を行った。その結果、大部分のLNGFR陽性細胞は血管平滑筋細胞を取り巻くように存在することが確認された(図19B, C)。LNGFR陽性細胞の一部に抗CXCL12抗体で染色されるものが存在するものの(図20A矢印)、大部分は抗CXCL12抗体では染色されなかった(図19B, 20B)。シュワン細胞はLNGFR陽性であると報告されていることから[63,64]、抗GFAP抗体に加えて抗LNGFR抗体およびCXCL12抗体を用いて免疫染色を行った結果、GFAP陽性細胞はLNGFRおよびCXCL12を共発現することが明らかとなった(図20C)。以上の結果から、ヒト骨髄の血管周囲には造血幹細胞の維持に重要な因子を発現する多くの細胞が存在することが明らかとなった。また一部のCD34陽性造血幹/前駆細胞がGFAP陽性細胞の存在する血管周囲に確認され(図21)、GFAP陽性細胞を含む血管周囲ニッチが、ヒト造血幹細胞の休眠状態および機能を維持する場所である可能性が考えられるが、ヒト造血幹細胞ニッチにおける血管周囲ニッチの生理的な意義を解明するためには、さらなる解析が必要である。

第五章　考察

第一節　造血系ヒト化マウスを用いた研究

1. 本研究で用いた造血系ヒト化マウスの問題点

マウスの体内でヒト造血を再現するにあたり、これまではマウスの免疫不全をより高度にすることにより、マウス体内でヒト由来細胞の生着率を高め、ヒト造血を効率よく再現する試みがなされてきた[48-50]。しかし高度な免疫不全マウスが作成されているにも関わらず、生理的なヒト造血をマウス体内で完全に再現することは未だ達成されていない。本研究においても、ヒト骨髄の造血幹/前駆細胞および造血幹細胞は、造血系ヒト化マウス骨髄の各細胞と比較した際に、有意に休眠状態で存在する割合が高いことが明らかとなっている(図7, 9)。ヒト骨髄環境を再構築する目的で、ヒト間葉系幹細胞をヒト造血幹/前駆細胞と共にマウスに移植する試みが行われているが、生着率の改善など一定の効果が認められるものの、その効果は限定的とされている[65]。マウスで産生される造血因子の中で、ヒト細胞表面に存在する受容体と交差反応を示さないものが存在するため[51]、それらを免疫不全マウスに組み込むことにより、マウス骨髄でのヒト造

血をより生理的な状態に近づける試みがなされている。マウス造血幹細胞ニッチより産生され、マウス造血幹細胞の維持に重要であると報告されている因子の中で、SCF、TPO、CXCL12およびTGFβは、in vitroにおいてヒトの受容体との間で交差反応が認められる[66-71]。しかし近年、ヒトSCFもしくはヒトTPOを組み込んだ免疫不全マウスは、ヒト造血細胞の生着率が向上することが報告された[66-68]。マウスSCFはその受容体であるヒトc-Kitに結合し活性化が可能であるが、ヒトSCFはマウスc-Kitに結合可能であるものの非常に弱くしか活性化できない[72,73]。全身性にヒトSCFを発現させ、ニッチ以外の細胞からもSCFが作用することで、ヒト造血幹細胞のSCFシグナルは増強される。加えて、ヒトSCFのマウスc-Kitへの結合はSCFシグナルを伝達しないだけでなく、マウスSCFとの結合を阻害することでSCFのシグナルを抑制する。このようにSCFノックアウトマウス様の作用でマウス造血幹細胞を減少させたことも、マウス骨髄で効率よくヒト造血を行うことに繋がったと考えられている。一方ヒトTPOノックインマウスにおいては、マウスおよびヒトTPOがその受容体であるc-Mplを、in vitroでそれぞれ交差活性化が可能であるにも関わらず、ヒトTPOを組み込んでいないマウスと比較しヒト造血幹/前駆細胞が2.8倍多く存在することが報告された[68]。マウスおよびヒトTPOのヒトc-Mplに対する、生理的な濃度での反応性の違いが想定されて

いるものの、詳細な解析はなされていない。これらのマウスは広く流通しておらず入手困難であるが、マウスにおけるヒト造血研究において、NOD/SCIDマウスからより高度免疫不全なNOGマウスなどに主流が移行したように、今後はヒトサイトカインを組み込んだマウスにその主流が移行していく可能性がある。しかし、これらのマウスを用いて作成された造血系ヒト化マウス骨髄における、細胞周期などのヒト造血幹/前駆細胞の状態に関しては詳細な解析はなされておらず、より生理的なヒト造血環境を模倣したことによる作用か不明であることは、十分に留意する必要がある。またどの組み合わせでヒト造血因子を組み込むことが最適かも未だ試行錯誤の状況でもあり、改変された免疫不全マウスの体内におけるヒト造血幹/前駆細胞の状態を本研究の結果と比較することが、生理的なヒト造血環境の再現に重要になると考えられる。

また本研究においては、侵襲なく容易に入手可能であることから、ヒト臍帯血より得られた造血幹/前駆細胞を移植して造血系ヒト化マウスを作成し、その骨髄におけるヒト造血幹/前駆細胞を解析した。臍帯と骨髄では造血環境が異なり、ヒトから単離した時点では$CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞の遺伝子発現パターンが異なるとの報告が存在する[74]。そのため、骨髄におけるヒト造血幹細胞およびそのニッチの解析には、骨髄由来細胞を移植し解析することでより生理的な

状態を反映する可能性が否定できない。しかしマウスにおいては、造血幹細胞の由来よりもそれをとりまく骨髄微小環境が、造血幹細胞の体内での性質を決定することに重要であるとの報告がなされている。マウスにおいて胎仔型造血を行う胎仔肝臓由来造血幹細胞は、成体骨髄由来造血幹細胞と比較し自己複製能が高く、細胞周期は亢進しており、また遺伝子発現は胎仔型でそのパターンは成体型と異なる。胎仔肝臓由来造血幹細胞を移植した際には、移植直後はその性質を維持するが、時間の経過と共に骨髄由来造血幹細胞と同様の性質に変化することが報告されている[75]。従って、ヒト臍帯血由来細胞を移植し作成した造血系ヒト化マウスと、ヒト骨髄由来細胞を移植し作成した造血系ヒト化マウスを比較した際に、経時的変化でヒト造血幹/前駆細胞の性質は同等になると予想される。しかし十分なヒト骨髄検体を得ることが困難な状況から未だ詳細な解析がなされておらず、両者の性質を比較する研究は今後重要であると考えられる。

2. 本研究で得られた結果と問題点

骨髄中の造血幹細胞は、自己複製能および多分化能を維持しながら生涯にわたり血液細胞を供給し続けるために、多くの期間を休眠状態で過ごし様々なス

トレスを回避していると考えられている。細胞を休眠状態に導く細胞内シグナル分子であるFOXO3aおよびp57を欠損させたマウスでは、造血幹細胞の休眠状態が維持できず、細胞周期の亢進にともなうDNAストレスが造血幹細胞に蓄積し、造血能は徐々に低下していくと考えられている[31-33]。またマウス造血幹細胞の休眠状態は、活性型TGFβの刺激によって誘導されることが知られている[35]。マウス骨髄において、巨核球を始めとする多くの細胞が不活性の潜在型TGFβを産生するが、活性型TGFβはGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞と一致してのみ存在する。従って、この細胞がマウスにおけるTGFβの活性化および造血幹細胞の休眠状態の維持に重要な役割を果たしていると結論されている[36]。造血系ヒト化マウス骨髄でG0期に存在するヒト造血幹/前駆細胞は、ヒト骨髄と比較するとその割合は有意に低く、細胞周期に関してヒト骨髄環境を完全に再現可能ではなかった。しかしヒト臍帯血と比較すると有意にG0期に存在するヒト造血幹/前駆細胞の割合は高く、マウス骨髄環境がヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態の維持に一定の役割をはたすことが示された。また造血系ヒト化マウスのヒト造血幹/前駆細胞において、c-Kitの凝集抑制および活性型TGFβにより引き起こされるp57の発現やFOXO3aの核局在が、ヒト造血前駆細胞と比較して有意に多く認められた。この結果は、マウス造血幹細胞を造血前駆細胞と比較した際に観察さ

れる結果と同様である[34]。更にTGFβシグナルの阻害により、造血系ヒト化マウスのヒト造血幹/前駆細胞で細胞周期が亢進することが明らかとなった。マウス骨髄ではGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞のみが活性型TGFβを産生し、マウス造血幹細胞の休眠状態を維持することから[37]、ヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態維持においても、この細胞が重要な働きを果たすと考えられる。以上の結果から、ヒトとマウスで造血幹細胞の休眠状態を維持する共通の機構が存在する可能性が示唆される。

本研究では、造血系ヒト化マウスにおいて、ヒト$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞の52.90±8.59%でc-Kitの凝集が認められた。一方、マウス$CD34^{-}KSL$造血幹細胞では、8%のみでc-Kitが凝集していると報告されている[34]。またp57が発現およびFOXO3aが核局在する細胞の割合に関しては数値が示されていないものの[31-35]、マウス造血幹細胞と同様の表現型を示す細胞の割合が、造血系ヒト化マウスのヒト造血幹/前駆細胞で少ない可能性がある。しかし造血系ヒト化マウス骨髄環境とヒト骨髄環境、およびヒト造血幹/前駆細胞とマウス造血幹細胞における休眠状態維持機構の違いを考慮する前に、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画がマウス$CD34^{-}KSL$分画ほど造血幹細胞を濃縮できていないことをまず考慮しなければ、正確な比較検討を行うことはできない。より造血幹細胞が濃縮された分画であ

るLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$CD90$^+$CD45RA$^-$分画もしくはLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$ CD90$^+$CD49f$^+$分画の解析を行うことがその答えとなるが、細胞数が非常に少なく本研究で行ったようなin-droplet免疫染色による解析が困難である。フローサイトメトリーにイメージング技術を組み合わせることで、従来型のフローサイトメトリーのように各細胞の蛍光強度のみを取得するのではなく、細胞のイメージも同時に撮影可能な機器が開発されている。特に細胞における局在が重要なc-KitおよびFOXO3aの解析において、非常に少数の細胞集団も定量的な解析が可能であると考えられ、造血系ヒト化マウスにおけるヒト造血幹細胞の解析に応用することで、マウス造血幹細胞との正確な比較が可能となると期待される。さらに細胞周期の解析と組み合わせることが可能となれば、造血幹細胞における休眠状態の維持に関して、ヒトとマウスで共通する機構の重要性がより明確となると考えられる。

また本研究でTGFβシグナルの阻害は、造血系ヒト化マウスのヒト造血幹細胞の細胞周期を有意に亢進させることが明らかとなったが、すべての造血幹細胞がG0期から脱してはいない。マウスにおいても同様の結果が得られており[37]、TGFβシグナル以外にも造血幹細胞の休眠状態を維持する別の機構が存在すると考えらえる。マウスにおいては低酸素などの環境要因も造血幹細胞の休眠状態

維持に重要であることが示されている[2,10]。TGFβシグナルの阻害に加えて低酸素応答に重要なタンパクの機能を阻害する研究を行ことが、ヒト造血幹細胞の休眠状態を維持する機構の全容解明に繋がると考えられる。

3. 白血病幹細胞ニッチ

本研究では、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を免疫不全マウスに移植することにより、ヒト正常造血を再現する造血系ヒト化マウスを作成し解析を行った。一方で、ヒト急性骨髄性白血病細胞を免疫不全マウスに移植することで、ヒト急性骨髄性白血病を発症するマウスを作成することも可能である。このマウスの骨髄を別の免疫不全マウスに移植することにより、急性骨髄性白血病を継代することが可能であることから、白血病を発症させる白血病幹細胞がマウスの体内で長期にわたり維持されていると考えられる[76]。造血幹細胞がそのニッチに存在し機能を維持しているように、白血病幹細胞もそのニッチに存在することが、その機能を維持することに重要であると想定されている。特に白血病幹細胞は休眠状態で存在することが、抗がん剤に対する抵抗性を獲得することに重要であるとされ、細胞周期を亢進させるサイトカインを抗がん剤と併用することにより、その感受性を高める試みがなされている[76]。しかしこうしたサイトカ

インとの併用により治療成績の向上が認められるものの、未だ白血病の再発は完全に克服されていない。白血病幹細胞の休眠状態を維持する微小環境が明らかとなり、その微小環境からのシグナルを阻害し細胞周期を亢進させることが可能となれば、白血病治療の新たなターゲットになると期待され、治療成績向上に極めて重要であると考えられる。白血病以外の血液悪性疾患においても、疾患の発症および進行に重要な役割をはたすがん幹細胞の存在が想定されており、免疫不全マウスに移植することで様々なヒト血液悪性疾患を再現する試みが行われている[77-80]。これらの疾患が再現され、がん幹細胞および骨髄微小環境との関係を研究することにより、がん幹細胞を標的とした新たな治療法開発に道が開かれることが期待されている。

第二節　ヒト骨髄を用いた研究

マウス骨髄では、GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞のみがTGFβを活性化する[37]。またヒト骨髄においても、血管周囲に存在するGFAP陽性細胞に一致してのみ活性型TGFβが認められることから、骨髄における造血幹細胞の休眠状態維持において、ヒトとマウスで共通してGFAP陽性細胞が重要な役割をはたす可能

性が示唆された(図22)。またGFAP陽性細胞だけでなく、マウスにおいて証明された造血幹細胞の機能維持に重要なCXCL12およびSCFの各産生細胞、造血幹細胞を支持する間葉系幹細胞が、ヒトでは血管およびその周囲にすべて集簇して存在している(図23)。これらの結果から、ヒトにおいて血管周囲ニッチは、造血幹細胞の機能を維持するために重要な役割をはたすと考えられる。この中で、マウス骨髄ではCXCL12産生細胞がSCFも産生すると報告されているが[27]、ヒト骨髄ではCXCL12産生細胞とSCF産生細胞は異なっている(図22)。またCXCL12を最も強く発現する細胞もヒト骨髄では血管内皮細胞でありとマウスと異なり、SCFが造血幹細胞に作用する機序が異なることが考えられる。ヒト骨髄において、血管内皮細胞から産生されるCXCL12は、血管腔側に産生されるものは血流により希釈されるが、骨髄間質側に産生されるものは血管に向かって濃度勾配を形成することが予想される。この濃度勾配により遊走する造血幹細胞が血管に達することで、血管周囲に存在するSCF、活性型TGFβ、間葉系幹細胞の作用を受けることが可能となり、ヒト造血幹細胞の機能および休眠状態が維持されると考えられる。またCXCL12の受容体であるCXCR4のアンタゴニストをヒトに投与することにより、投与後すみやかに造血幹細胞が血中に認められることも[61]、ヒト造血幹細胞が血管周囲に存在していることを示唆する所見である。しかし、

ヒトに対しての介入研究は高度に制限されていることから、ヒトにおける血管周囲ニッチの機能を評価することは困難である。マウスの骨髄では、交感神経切除により誘導されるワーラー変性により、骨髄中のGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞を減少させることが可能である。この手法を利用することで、GFAP陽性非ミエリンシュワン細胞が造血幹細胞の機能維持にはたす役割を、マウスの生体内で解析することが可能である[37]。しかし、ヒトにおいては同様の介入を行うことができず、ヒトGFAP陽性細胞が造血幹細胞におよぼす影響を評価することは困難である。ヒト脊髄損傷患者において、損傷された神経の支配領域の骨髄では、そうでない領域の骨髄と比較し造血幹/前駆細胞の減少が認められるとの報告が存在する[81]。詳細な解析はなされていないものの、GFAP陽性細胞の減少により骨髄中で活性型TGFβが減少し、そのシグナルの減弱によって造血幹前駆細胞の細胞周期が亢進したことで引き起こされた可能性が考えられる。こうした患者の造血幹細胞を詳細に解析することは困難であるが、臨床研究を計画し解析を行うことで、生理的なヒト骨髄環境でのGFAP陽性細胞およびTGFβシグナルの重要性が明らかとなると期待される。

骨髄におけるヒト造血幹細胞は、大部分が休眠状態で存在している。一方で、ヒト臍帯血におけるヒト造血幹細胞も、その割合は少ないものの休眠状態で存

在する細胞が認められる(図6B, 7)。臍帯においては骨内膜下ニッチが存在せず、また血流が豊富で低酸素環境も想定されていない。マウス骨髄におけるGFAP陽性細胞は、チロシン水酸化酵素陽性の交感神経を取り巻く非ミエリンシュワン細胞である[37]。ヒト臍帯における交感神経は、ミエリン鞘を持たない多数の交感神経線維の軸索を非ミエリンシュワン細胞が取り囲む構造であり、2本の臍帯動脈周囲に神経線維網を形成していると報告されている[82]。ヒト臍帯における非ミエリンシュワン細胞が、GFAP陽性かつTGFβ活性化細胞であるかは、臍帯血に比較し臍帯組織の入手が困難であることから確認できていない。ヒト臍帯における造血幹細胞の休眠状態維持にも、GFAP陽性細胞および活性型TGFβが重要な役割をはたす可能性が考えられ、ヒト臍帯において休眠状態の造血幹細胞が存在する意義も含め、今後検討していく必要がある。

ヒト造血システムはマウスと比較した際に複数の相違点が指摘されているが、解析が困難であるため理解が十分ではない。マウスにおける研究結果と対比して解析していくことが、ヒト造血幹細胞ニッチの全容解明にむけた第一歩としてだけでなく、ヒト造血システムの理解を深めることにも重要であると考えられる。

参考文献

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4: 7-25, 1978.

2. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(4):290-301, 2008.

3. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960):836-841, 2003.

4. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841-846, 2003.

5. Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, et al. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*, 105: 2340-2342, 2005.

6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-161, 2004.

7. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche.

Cell Stem Cell, 1: 685-697, 2007.

8. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*, 2: 274-283, 2008.

9. Sugimura R, He XC, Venkatraman A, et al. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*, 150: 351-365, 2012.

10. Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7: 391-402, 2010.

11. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439: 599-603, 2006.

12. Stier S, Ko Y, Forkert R, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of Experimental Medicine*, 201: 1781-1791, 2005.

13. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, et al. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*, 121(7):1109-1121, 2005.

14. Kennedy M, Firpo M, Choi K, et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*, 386(6624):488-93,1997.

15. North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity*, 16(5):661-72, 2002.

16. Oberlin E, Tavian M, Blazsek I, Péault B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development*, 129(17):4147-57, 2002.

17. Kubo H, Alitalo K. The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes Dev*, 17(3):322-9, 2003.

18. Prumrner O, Fliedner TM. The fetal liver as an alternative stem cell source for hemolymphopoietic reconstitution. *Int J Cell Cloning,* 4:237-249, 1986.

19. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22):10302-6, 1995.

20. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantablehematopoieticstedprogenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86:3828-3832, 1989.

21. Cardier JE, Barberá-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 26(1):165-75, 1997.

22. Sohawon D, Lau KK, Lau T, Bowden DK. Extra-medullary haematopoiesis: a pictorial review of its typical and atypical locations. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 56(5):538-44, 2012.

23. Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Veterinary Pathology*, 49(3):508-23, 2012.

24. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *Journal of Cell Physiology*, 222(1):17-22, 2010.

25. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592):635-638, 1996.

26. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*, 25(6):977-988, 2006.

27. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity*, 33(3):387-399, 2010.

28. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308):829-834, 2010.

29. Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood,* 90:1345-1364, 1997.

30. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382):457-462, 2012.

31. Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, et al. p57Kip2 and p27Kip1 Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, 9: 247-261, 2011.

32. Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, et al. p57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 9: 262-271, 2011.

33. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*, 1: 101-112, 2007.

34. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J*, 25(15):3515-3523, 2006.

35. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. TGF-β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*, 113(6):1250-1256, 2009.

36. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, 116:217–224, 2003.

37. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell*, 147(5):1146-1158, 2011.

38. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2):93-106, 2006.

39. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 12;273(5272):242-5, 2007.

40. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive

human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nature Medicine*, 2(12):1329-1337, 1996.

41. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10):5320-5325, 1997.

42. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*, 1(6):635-45, 2007.

43. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, et al. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, 333(6039):218-21, 2011.

44. Jordan CT, Yamasaki G, Minamoto D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Experimental hematology*, 24(11):1347-1355, 1996.

45. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, et al. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nature Biotechnology*, 23(3):275-280, 2010.

46. Hogan CJ, Shpall EJ, McNulty O, et al. Engraftment and Development of

Human CD34+-Enriched Cells From Umbilical Cord Blood in NOD/LtSz-scid/scid Mice. *Blood*, 90(1):85-96, 1997.

47. Gan OI, Murdoch B, Larochelle A, Dick JE. Differential Maintenance of Primitive Human SCID-Repopulating Cells, Clonogenic Progenitors, and Long-Term Culture-Initiating Cells After Incubation on Human Bone Marrow Stromal Cells. *Blood*, 90(2):641-650, 1997.

48. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/γ_c^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100(9):3175-3182, 2002.

49. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain null mice. *Blood*, 106(5):1565-1573, 2005.

50. Okada S, Harada H, Ito T, et al. Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3^{null} mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34^{+} cells. *International Journal of Hematology*, 88:476-482, 2008.

51. Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. *Annual Review of Immunology*.

31:635-74, 2013.

52. Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry A*, 83(1):27-37, 2013.

53. Ema H, Morita Y, Yamazaki S, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nature Protocols*, 1(6):2979-2987, 2007.

54. Yahata T, Muguruma Y, Yumino S, et al. Quiescent Human Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niches Organize the Hierarchical Structure of Hematopoiesis. *Stem Cells.* 26(12):3228-36, 2008.

55. Shapiro, H.M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry*, *2*:143–150, 1981.

56. Qiu L, Liu M, Pan K. A triple staining method for accurate cell cycle analysis using multiparameter flow cytometry. *Molecules,* 18(12):15412-21, 2013.

57. Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet*, 20(4):387-91, 1987.

58. Brenet F, Kermani P, Spektor R, et al. TGFβ restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy. *The Journal of Experimental*

Medicine, 210(3):623-39, 2013.

59. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF-β-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 463(7281):676-80, 2010.

60. Van Ranst PC, Snoeck HW, Lardon F, et al. TGF-beta and MIP-1 alpha exert their main inhibitory activity on very primitive CD34++CD38- cells but show opposite effects on more mature CD34+CD38+ human hematopoietic progenitors. *Experimental hematology*, 24(13):1509-15, 1996.

61. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood,* 102(8):2728-30, 2003.

62. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental hematology*, 30(7):783-791, 2002.

63. DiStefano PS, Johnson EM Jr. Nerve growth factor receptors on cultured rat Schwann cells. *The Journal of Neuroscience*, 8(1):231-241, 1988.

64. Vroemen M, Weidner N. Purification of Schwann cells by selection of p75

low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*, 124(2):135-143, 2003.

65. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 1;107(5):1878-87, 2006.

66. Brehm MA, Racki WJ, Leif J, et al. Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2rγ^{null} mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood*, 119(12):2778-2788, 2012.

67. Takagi S, Saito Y, Hijikata A, et al. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood*, 119(12):2768-2777, 2012.

68. Rongvaux A, Willinger T, Takizawa H, et al. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6):2378-2383, 2001.

69. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci.*, 938:83-95, 2001.

70. Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice. *Blood.* 99(3):792-9, 2002.

71. Derynck R, Miyazono K. TGF-β and the TGF-β Family. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 50:29-43, 2008.

72. Majumdar MK, Everett ET, Xiao X, et al. Xenogeneic expression of human stem cell factor in transgenic mice mimics codominant c-kit mutations. *Blood*, 87(8):3203-3211, 1996.

73. Kapur R, Everett ET, Uffman J, et al. Overexpression of Human Stem Cell Factor Impairs Melanocyte, Mast Cell, and Thymocyte Development: A Role for Receptor Tyrosine Kinase-Mediated Mitogen Activated Protein Kinase Activation in Cell Differentiation. *Blood*, 90(8):3018-3026, 1997.

74. Wang TY, Chang SJ, Chang MD, Wang HW. Unique biological properties and application potentials of CD34+ CD38- stem cells from various sources. *Taiwan J Obstet Gynecol,* 48(4):356-69, 2009.

75. Bowie MB, Kent DG, Dykstra B, et al. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(14):5878-82, 2007.

76. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature Biotechnology,* 25(11):1315-21, 2007.

77. Naoki Hosen. Multiple myeloma-initiating cells. *International Journal of Hematology,* 97:306–312, 2013.

78. Thanopoulou E, Cashman J, Kakagianne T, et al. Engraftment of NOD/SCID-beta2 microglobulin null mice with multilineage neoplastic cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Blood,* 103(11):4285-93, 2004.

79. Muguruma Y, Matsushita H, Yahata T, et al. Establishment of a xenograft model of human myelodysplastic syndromes. *Haematologica,* 96(4):543-51, 2011.

80. Sato F, Ishida T, Ito A, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leukemia Research,* 37(1):21-7, 2013.

81. Iversen PO, Hjeltnes N, Holm Br, et al. Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood*, 96(6):2081-2083, 2000.

82. Kawano M, Mori N. Confirmation of the Presence of Adrenergic Fibers in

Human Umbilical Cord by Electron Microscopy. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica.* 41(7): 833-836, 1989.

図

図1. マウス造血幹細胞ニッチ

マウス造血幹細胞ニッチを構成すると報告されている代表的な細胞、およびそれらの細胞から産生される因子を模式的に示した。

図2. 造血系ヒト化マウスの作成

ヒト臍帯血より得られたCD34陽性細胞を、亜致死量の放射線照射を行ったNOGマウスに移植し、(A) 12週間後に末梢血中のヒトCD45陽性細胞をフローサイトメトリーにて解析した。(B) 19匹の造血系ヒト化マウスにおける末梢血ヒトCD45陽性細胞を、移植後4週より12週まで解析。(C) 2×10^5のヒトCD34陽性細胞を移植した各マウスにおけるヒトCD45陽性細胞の経時的変化。

図3. ヒト骨髄、臍帯血、造血系ヒト化マウス骨髄の造血幹/前駆細胞分画

(A) ヒト骨髄、(B)ヒト臍帯血、(C) 造血系ヒト化マウス骨髄の各3例を、フローサイトメトリーにより解析した。ヒト骨髄および臍帯血は分化マーカー陰性集団。造血系ヒト化マウスはマウス由来細胞および分化マーカー陰性集団。

図4. 造血系ヒト化マウスにおける造血幹細胞分画の解析

ヒト造血/前駆細胞分画である$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$分画(青枠)、ヒト造血幹細胞分画である$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$および$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD49f^{+}$分画(赤枠)をフローサイトメトリーにて解析した。(A) ヒト骨髄。(B) 造血系ヒト化マウス。左のパネルは分化マーカー陰性集団。造血系ヒト化マウスは移植後16週で解析。

図5. 移植により同定された造血系ヒト化マウスにおける造血幹細胞分画

造血系ヒト化マウスよりFACSを用いて純化した、それぞれ100個の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$、もしくは$Lin^{-}CD34^{-}$細胞を、亜致死量の放射線照射した各5匹のNOGマウスに移植し、末梢血中のヒトCD45陽性細胞を経時的にフローサイトメトリーにて解析した。

図6. ヒト造血幹/前駆細胞の細胞周期解析-1

Hoechst 33342およびPyronin Yで細胞を染色し、細胞周期をフローサイトメトリーにて解析した。(A) ヒト骨髄、(B) ヒト臍帯血、(C) 造血系ヒト化マウスの各1例。左のパネルは分化マーカー陰性集団。Hoechst 33342およびPyronin Yで展開した散布図は、左のパネルは$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞分画、中央のパネルは$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$造血前駆細胞分画、右のパネルはコントロールとして用いたB220陽性脾臓B細胞。

図7. ヒト造血幹/前駆細胞の細胞周期解析-2

ヒト骨髄(n=5)、ヒト臍帯血(n=7)、造血系ヒト化マウス骨髄(n=4)をHoechst 33342およびPyronin Yで染色後、細胞周期をフローサイトメトリーにて解析し、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞における各細胞周期のグラフを作成した。

図8. ヒト造血幹細胞の細胞周期解析-1

フローサイトメトリーによる抗Ki-67抗体およびHoechstを用いた細胞周期解析。骨髄中の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$ヒト造血幹/前駆細胞分画をCD90およびCD45RAを用いて展開し、各分画の細胞周期を解析した。(A) ヒト骨髄、 (B) ヒト臍帯血、(C) 造血系ヒト化マウスの各1例。赤枠は$Ki\text{-}67^{low}$ $Hoechst^{low}$のG0分画を示す。

図9. ヒト造血幹細胞の細胞周期解析-2

ヒト骨髄(n=5)、ヒト臍帯血(n=4)、造血系ヒト化マウス骨髄(n=4)をHoechst 33342および抗Ki-67抗体を用いて染色し、$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$造血幹細分画の細胞周期をフローサイトメトリーにて解析しグラフを作成した。

図10. 造血系ヒト化マウスにおけるヒト造血幹/前駆細胞の免疫染色

造血系ヒト化マウスより得られたヒト$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$および$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$細胞を、(A) 抗c-Kit抗体(緑)およびDAPI (青)、(B) 抗FOXO3a抗体(赤)およびDAPI (青)を用いて染色した。それぞれ独立して3回の実験を施行し、(A) 59個の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$細胞および71個の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$細胞をカウントして作成したc-Kitが局在している細胞の割合、(B) 51個の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$細胞および90個の$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}$細胞をカウントして作成したFOXO3aが核に局在する細胞の割合を各右側に示す。エラーバーはSDを示す。

図11. 造血系ヒト化マウスにおけるp57の発現

(A) 造血系ヒト化マウスより得られたヒトLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$およびLin$^-$CD34$^+$CD38$^+$細胞を、抗p57抗体(緑)およびDAPI (青)を用いて染色した。独立して3回の実験を施行し、70個のLin$^-$CD34$^+$CD38$^-$細胞および91個のLin$^-$CD34$^+$CD38$^+$細胞をカウントして作成したp57発現細胞の割合を右図に示す。(B)造血系ヒト化マウス骨髄の細胞を、抗ヒトLin抗体、抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD38抗体を用いて染色した後、抗p57抗体を用いて細胞内染色を行いフローサイトメトリーにて解析した1例。(C) Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$細胞およびLin$^-$CD34$^+$CD38$^+$細胞における、p57の平均蛍光強度により作成したグラフ(n=3)。エラーバーはSDを示す。

図12. 造血系ヒト化マウスの免疫染色

造血系ヒト化マウス骨髄におけるヒト血球細胞の存在様式。上段および中段は造血系ヒト化マウスの骨髄切片を、抗ヒトCD45抗体および抗ヒトグリコフォリンA抗体(緑)、抗マウスCD45抗体および抗Ter119抗体(赤)を用いて、それぞれヒトおよびマウスの血球細胞を染色した。下段は抗ヒトLinおよびCD38抗体(緑)、抗ヒトCD34抗体(紫)、DAPI(青)を用いて染色した。3個体で類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは上段が1 mm、中段および下段は40 μm。

図13. 造血系ヒト化マウスのイメージアナライザー解析

(A) 造血系ヒト化マウス骨髄を、抗GFAP抗体(緑)、DAPI(青)で染色。(B) 造血系ヒト化マウス骨髄におけるヒト造血幹/前駆細胞の解析。左図はアレイスキャンにより得られた骨髄蛍光免疫染色の二次元散布図。赤枠で囲まれた細胞は$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞分画を示す。赤枠中の矢印(黒)で示された細胞を抗ヒトLinおよびCD38抗体(緑)、抗ヒトCD34抗体(紫)、抗GFAP抗体(水色)、DAPI(灰色)で表示。矢印(白)は$Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$造血幹/前駆細胞分画を示す。スケールバーは1 mm(A)、および20 μm(B)。

図14. TGFβR1インヒビター投与が造血幹細胞の細胞周期に与える影響

造血系ヒト化マウスにDMSO(n=3)もしくはTGFβR1インヒビターであるLY364947 (n=4)を投与し、(A) 分化マーカー陰性分画におけるヒト造血幹細胞の出現頻度、および(B) ヒト造血幹細胞の細胞周期を解析した。エラーバーはSDを示す。

図15. 活性型TGFβのヒト血球細胞に対する作用およびヒト骨髄での発現

(A) ヒト臍帯血単核球から、Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$造血幹/前駆細胞およびLin$^-$CD34$^+$CD38$^+$造血前駆細胞分画をソーティングし、SCF, TPO, Flt3L, IL-6に活性型TGFβ1存在もしくは非存在下で培養した。生細胞は顕微鏡下でトリパンブルー非染色細胞をカウントした。エラーバーはSDを示す。(B-D) ヒト骨髄切片の免疫染色。(B) 抗活性型TGFβ抗体(緑)およびDAPI(青)で染色。(C) 抗GFAP抗体(緑)、抗CD31抗体(紫)およびDAPI(青)で染色。(D) 抗活性型TGFβ抗体(緑)、抗GFAP抗体(赤) およびDAPI(青)で染色。免疫染色は、(B)5回、(C)5回、(D)4回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは(B)50 μm、(C, D)20 μm。

図16. ヒト骨髄におけるCXCL12産生細胞

ヒト骨髄切片を、(A) 抗CXCL12抗体(緑)およびDAPI(青)、(B) 抗CD31抗体(緑)、抗オステオポンチン抗体(白)、およびDAPI(青)、(C) 抗CD31抗体(緑)、抗CXCL12抗体(紫)、およびDAPI(青)にて染色。(A)の矢印はCXCL12陽性細胞の集団を示す。免疫染色は、各3回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは(A)200 μm、(B)100 μm、(C)50 μm。

図17. ヒト骨髄におけるSCF産生細胞-1

ヒト骨髄切片を、(A) 抗SCF抗体(緑)およびDAPI(青)、(B) 抗SCF抗体(緑)、抗オステオポンチン抗体(白)、およびDAPI(青)、(C) 抗CD31抗体(緑)、抗SCF抗体(赤)、抗CXCL12抗体(紫)、およびDAPI(青)にて染色。(A)の矢印はSCF陽性細胞の集団を示す。免疫染色は、(A, B)3回、(C)4回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは(A)200 μm、(B)100 μm、(C)50 μm。

Green: SMA Red: SCF Purple: CXCL12 Blue: DAPI

図18. ヒト骨髄におけるSCF産生細胞-2

ヒト骨髄切片を、抗SMA抗体(緑)、抗SCF抗体(赤)、抗CXCL12抗体(紫)およびDAPI(青)にて染色。免疫染色は、4回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは50 μm。

図19. ヒト骨髄における間葉系幹細胞

ヒト骨髄切片を、(A) 抗LNGFR抗体(緑)およびDAPI(青)、(B) 抗LNGFR抗体(緑)、抗SMA抗体(赤)、抗CXCL12抗体(白)、およびDAPI(青)、(C) 抗LNGFR抗体(緑)、抗SMA抗体(赤)、抗CD31抗体(白)、およびDAPI(青)にて染色。矢印はLNGFR陽性細胞の集団を示す。免疫染色は、(A)3回、(B, C)4回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは(A)200 μm、(B, C)20 μm。

図20. ヒト骨髄切片の免疫染色-1

(A) ヒト骨髄切片を、抗SMA抗体(緑)、抗LNGFR抗体(赤)、抗CXCL12抗体(紫)およびDAPI(青)にて染色。矢印はLNGFRおよびCXCL12共陽性細胞を示す。ヒト骨髄切片を、(B) 抗LNGFR抗体(緑)、抗CXCL12抗体(紫)およびDAPI(青)、(C) 上段:抗GFAP抗体(緑)、抗LNGFR抗体(紫)およびDAPI(青)、下段: 抗CXCL12抗体(緑)、抗GFAP抗体(赤)およびDAPI(青)にて染色。免疫染色は、各3回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは50 μm。

図21. ヒト骨髄切片の免疫染色-2

ヒト骨髄切片を、抗CD34抗体(緑)、抗GFAP抗体(赤)、抗CD31抗体(水色)およびDAPI(青)にて染色した。免疫染色は、3回の類似像を得ることで、再現性を確認している。スケールバーは40μm。

Molecules / Cells	Mouse	Human
active TGFβ	GFAP positive cells (Perivascular area)	GFAP positive cells (Perivascular area)
CXCL12	Bone marrow stroma (CAR cells) Perivascular area (MSCs, SCF expressing cells) GFAP positive cells	CD31+ endothelial cells GFAP positive cells > Perivascular stromal cells
SCF	Endothelial cells Perivascular stromal cells	Vascular smooth muscle cells
Mesenchymal stem cells	Perivascular area (= CXCL12 expressing cells)	Perivascular area (≠ CXCL12 expressing cells) > Bone marrow stroma

図22. マウスおよびヒト骨髄におけるニッチ構成要素の存在部位

活性型TGFβ、CXCL12、SCFの各発現細胞、および間葉系幹細胞の存在部位を示す。マウスとヒトで異なる部分を赤字で示す。

図23. ヒト骨髄における血管周囲造血幹細胞ニッチの概要

ヒト骨髄の血管周囲領域は、造血幹細胞の維持に必須なほぼすべての要素を備える。

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官として本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始ご指導を賜りました、東京大学医科学研究所　幹細胞治療分野　中内啓光教授に心より感謝申し上げます。

本研究全般にわたり入学当初よりご指導頂いた山崎聡博士、ヒト臨床検体の収集に御尽力いただきました順天堂大学血液内科 高久智行先生、小松則夫教授に深く感謝の意を表します。

また、論文をまとめるにあたり貴重な御意見を賜りました葛西正孝先生、実験を遂行する上で御協力を頂きました石井有実子氏、そして幹細胞治療分野およびJST ERATO 中内幹細胞制御プロジェクトの皆様に厚く御礼申し上げます。