

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト造血幹前駆細胞が存在する骨髓微小環境の同定

氏名 木村 隆治

自己複製能および多分化能を持ち、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、造血幹細胞ニッチと呼ばれる特別な骨髓微小環境に休眠状態で存在すると考えられている。近年の技術の進歩により、造血幹細胞を休眠状態に導き機能を維持するために、様々な因子を介したニッチの重要性が認識され始めた。マウスを用いた研究から、骨芽細胞を中心とした骨内膜下ニッチおよび血管内皮細胞を中心とした血管周囲ニッチが想定されており、またそれ以外にも造血幹細胞ニッチ構成細胞が相次いで報告されている。このようにマウス造血幹細胞ニッチの研究で大きな進展が認められた一方で、ヒト造血幹細胞を取り巻く骨髓微小環境に関する報告はほとんど存在しない。造血幹細胞は骨髓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、未だ満足する結果が得られていないin vitroでの造血幹細胞の自己複製が可能になると考えられており、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。

しかしながら、マウスで行われる様々な介入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、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。本研究では、まず高度免疫不全マウスにヒト造血幹/前駆細胞を移植することで、ヒト造血を長期に維持する造血系ヒト化マウスを作成した。このマウスを解析することでヒト造血幹細胞ニッチを推定し、その成果をヒト臨床検体で確認することで、ヒト造血幹細胞を取り巻く骨髓微小環境を同定することを目的とした。

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免疫不全マウスに移植し作成した造血系ヒト化マウスは、ヒト造血を長期に維持することが確認された。このマウスの骨髓中には、ヒト造血幹/前駆細胞分画であるLin⁻CD34⁺CD38⁻分画、ヒト造血幹細胞分画であるLin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻分画およびLin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD49f⁺分画に存在する細胞集団が確認された。続いて機能的なヒト造血幹細胞分画を同定するために、造血系ヒト化マウス骨髓に存在する様々な細胞分画をソーティングし、亜致死量の放射線照射を施した免疫不全マウスに各分画を二次移植した。その結果、Lin⁻CD34⁺CD38⁻分画を移植した場合のみに末梢

血中にヒトCD45陽性血液細胞を認め、ヒト骨髄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⁻分画に濃縮して存在することが明らかとなった。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。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。その結果、Lin⁻CD34⁺CD38⁻造血幹/前駆細胞の58.55±4.49%がG0期に存在していた。ヒト骨髄では82.11±7.51%が、ヒト臍帯血では39.94±11.71%がG0期に存在していたことから、造血系ヒト化マウス骨髄はヒト骨髄と比較しG0期に存在する造血幹/前駆細胞の割合が有意に少ないが(p<0.005)、ヒト臍帯血と比較すると有意にG0期に存在する細胞が多いことが明らかとなった(p<0.05)。Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻造血幹細胞分画でも同様の結果が得られたことから、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機構が存在することが示された。

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サイトカインレセプターである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。造血系ヒト化マウスでヒト造血幹/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、In-droplet免疫染色法により解析を行った。その結果、造血前駆細胞では大部分のc-Kitが凝集していたが、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%, p<0.05)。また造血前駆細胞においてFOXO3aが核に存在する細胞をほとんど認めないものの、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%, p<0.05)。さらに、造血前駆細胞にはp57を発現する細胞は少ないものの、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%, p<0.05)。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。

これまでの結果から、マウス造血幹細胞ニッチがヒト造血幹/前駆細胞の休眠状態維持に何らかの影響を与えていることが想定される。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。イメージアナライザーを用いて定量的に解析した結果、20%のLin⁻CD34⁺CD38⁻造血幹/前駆細胞が、マウス造血幹細胞を休眠状態に導くと報告されているGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞に接して存在することが確認された。マウス骨髄のGFAP陽性非ミエリンシュワン細胞はTGFβを活性化し、活性型TGFβからのシグナルがマウス造血幹細胞の休眠状態維持に重要である。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TGFβレセプターインヒビターを投与し解析した。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、 $\text{Lin}^-\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{CD90}^+\text{CD45RA}^-$ 造血幹細胞の頻度に変化はないものの、G0分画が有意に減少し細胞周期が亢進することが確認された($73.9 \pm 3.1\%$ vs. $56.8 \pm 4.0\%$, $p < 0.05$)。以上の結果から、造血系ヒト化マウス骨髄において、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TGF β 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。

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認められる。研究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。マウス造血幹細胞は活性型TGF β により強力に増殖が抑制されるが、ヒト臍帯血から得られた造血幹/前駆細胞も、活性型TGF β 刺激により強力に増殖が抑制されることが確認された。ヒト骨髄におけるTGF β 活性化細胞を同定するために、ヒト骨髄から切片を作製し免疫染色による解析を行った。その結果、活性型TGF β は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。長紡錘形GFAP陽性細胞がCD31陽性血管内皮細胞周囲に存在し、この細胞に一致してのみ活性型TGF β が存在することも明らかとなり、これらの結果はマウス骨髄で報告されている結果と同様であることから、ヒト骨髄においても血管周囲に存在するGFAP陽性細胞がTGF β 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。

GFAP陽性細胞以外にも、造血幹細胞の維持に重要な因子を産生する細胞がマウスを用いた研究により報告されており、これらの細胞のヒト骨髄における存在部位を免疫染色により検討した。その結果、造血幹細胞の骨髄へのホーミングに必須の分子であるCXCL12は、CD31陽性血管内皮細胞に最も強く発現することが明らかとなった。マウス骨髄のCXCL12発現細胞は、造血幹細胞の増殖および維持に必須なSCFも発現することが報告されている。しかしヒト骨髄においてはCXCL12陽性細胞とSCFは共局在せず、SCF発現細胞はCD31陽性血管内皮細胞を取り囲むように存在していた。SCF発現細胞を同定するため平滑筋アクチンと共染色を行った結果、SCFは血管平滑筋細胞に発現することが明らかとなった。また間葉系幹細胞はマウス骨髄において、様々な因子を産生し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。ヒト骨髄においては、LNGFR陽性間葉系幹細胞は骨髄間質に散在性に存在するものの、大部分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。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。一部のCD34陽性造血幹/前駆細胞はGFAP陽性細胞の存在する血管周囲に確認され、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た。

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。マウスモデルを用いた解析は、ヒト造血幹細胞ニッチの全容解

明、およびヒト造血システムの理解を深めることに重要であると考えられる。