

学内グラント 終了時報告書

平成19年度 学内グラント報告書

CD34 陰性血液幹細胞からの無血清・無ストローマでの
血液分化誘導系の研究

研究代表者 浅田 留美子（埼玉医科大学 医学部 臨床検査医学科）

研究分担者 池淵 研二*

緒言

我々は、ヒト造血幹細胞として従来のCD34陽性の造血幹細胞に加え、CD34陰性の分画に属する、より未分化と考えられる造血幹細胞の存在を明らかにし(Blood 101:2924-2931, 2003)これに関する研究を行ってきた(Stem Cells 25:1348-1355, 2007)。またCD34陰性造血幹細胞の持つ未分化性から、ES細胞 cell lineの培養系のうちJean Luらの報告による培養条件(以下HESCOと略す)(PNAS 103(15):5688-5693, 2006)に着目し、これをヒト臍帯血CD34陰性細胞の培養に応用を試みた。無血清、ストローマフリーの*in vitro*の培養系にHESCOの培地と数種類のサイトカインを添加して、短期間(3～7日)培養することで3系統の血球系への分化を確認した。この際に見られる分化の過程が、特に赤芽球と一部のリンパ球に関して、コントロールとして培養したCD34陽性の分画からの分化動態と明らかな相違点があることを確認した。両者の異なる点としては、①培養3～4日目以降、GPA陽性細胞の分化・増殖がCD34陰性分画からの培養で優位に認められる、②培養3～4日目においては、CD34陰性分画からの培養でのみIL-7レセプター陽性の小リンパ球様の細胞が認められる、の2点が挙げられた。従来の研究ではCD34陰性細胞は*in vivo*の移植系では骨髄に生着し赤芽球やリンパ球を生成することは証明されているが、*in vitro*系では確認されていない。

以上の背景のもと、本研究ではまずCD34陰性血液幹細胞からの無血清・ストローマフリーでの赤芽球と小リンパ球が確実に分化誘導できる系をそれぞれ確立することを目指した。さらにHESCOに含まれるサイトカインbFGF, BAFF, Wnt3Aの他、血球分化に関わるサイトカインIL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSFのうち、何が赤芽球およびリンパ球系細胞増殖に必須のシグナル

であるか、組み合わせを変えて解析を行い解明することとした。

さらに、CD34陰性細胞から同じ培養条件で赤芽球と小リンパ球に分化する細胞が存在することから、共通の元になる幹細胞が存在するのか各々の細胞系の幹細胞が存在するのか、細胞表面抗原マーカーとセルソーティングを用いて単一細胞を培養する系で解析することを目指した。幹細胞が同定された場合には遺伝子発現の解析からも幹細胞を同定することを目指した。解析の候補としてc-kit, GATA-1, survivin(Leung CG, et al. J Exp Med 204: 1603-1611, 2007), HOXB4, Bmi-1, globin, Epo-R, c-Mpl, Nanog, SSEA-1, Oct4等を考えた。

材料と方法

(1) 標的細胞の純化方法

対象細胞として埼玉医科大学倫理委員会によって承認された正常妊婦出産時の臍帯血を用いた。其々のサンプルから単核球分画を比重遠心法で分離し、一旦凍結保存した。解析時には細胞を解凍後に、マグネティックビーズ(Easy Sep negative selection)を用いてlineage陽性細胞を除去後、再度抗lineage (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, GPA, CD4, CD10, CD20, CD41) 抗体, 抗CD45抗体, 抗CD34抗体, 7AADを用いて多重染色後に、本学中央研究施設に設置されているセルソーター (FACS Aria)を用いて目的とする細胞の純化を行う。

(2) *In vitro* 培養系

ソーティングで得られた細胞をbFGF, Wnt3A, BAFF, IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF, Insulin, transferrin, Albumin, Cholesterol lipid 存在下の培養条件で12, 24または96well plateを用いて37℃, 5% CO₂, 5% O₂で培養する。赤芽球またはリンパ球其々の分化誘導に必須のサイトカインシグナルを調べるため、サイトカインの組み合わせを変えた条件の培養も同時に行う。必要に

* 埼玉医科大学 医学部 臨床検査医学科

応じて細胞をサイトスピンで塗抹標本を作成し形態観察し、増殖能を調べるためにコロニーアッセイも行う。

(3) 解析

実験の目的によって、day2～4またはday7, day14の細胞を回収しGPA, CD34, CD36, CD45, IL-7R, c-kit等の抗体を用いて染色後、フローサイトメーターで解析または、再度ソーティングし目的細胞を得る。再ソーティングで得られた細胞は遺伝子解析のためのサンプルとしてRNAを回収する。サイトスピンの作成も必要に応じて行う。

(4) その他

赤血球系の分化に関しては、正染色赤芽球まではサイトスピン標本で確認されているが、脱核した赤血球までの誘導が可能であるか検討する。

結 果

(1) 標的細胞の純化

ヒト臍帯血を用いて、比重遠心で単核球分離後、マグネティックビーズでlineage陽性細胞を除去後、再度セルソーターにより細胞を分離した際のスキャッターグラムを図1に示す。7AADで死細胞を除去、lineage抗体のカクテル (FITC) とGPAによる染色でlineageとGPA陽性細胞を除いた分画をCD45とCD34抗原の染色で展開した。P7をCD34陽性細胞、P8をCD34陰性細胞として用いて実験を行った。

(2) *In vitro* 培養の条件による細胞の分化

CD34陽性および陰性細胞を其々 HESCO の条件下で培養しday2およびday5にフローサイトメーターで解析を行ったところ、day5の細胞数はCD34陽性細胞で6倍、陰性細胞では約2倍の増加を認め、CD34陽性細胞の培養系ではGPA陽性細胞は20%以下であったのに対し、CD34陰性細胞では70-80%がGPA陽性であった。また、CD34陰性細胞の培養システムでは培養期間中にCD34陽性細胞は生成されなかった。

次に、CD34陽性および陰性細胞を5種 (IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF) の血球分化誘導サイトカイン存在下に培養した場合と、これら5種のサイトカインにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた条件下での培養を比較検討した。day5にCD34陽性細胞の培養系ではCD34陽性細胞が約40%を占めるのに対し、CD34陰性細胞の培養系ではHESCOでの培養と同様CD34陽性細胞は認め

られなかった。

CD36陽性細胞に注目して観察したところ、CD34陽性細胞の培養系では培養細胞の約40%を占めそのほとんどがCD45陽性であったのに対し、CD34陰性細胞の培養系ではほとんど全ての細胞がCD36陽性で、これらはCD45が陰性の集団と弱く発現している異なる集団として分離された。またCD34陽性細胞の培養系では出現しなかったCD61陽性細胞が、CD34陰性細胞の培養系では7%前後の細胞に認められた。

IL-7レセプターの発現に関しては、5種のサイトカインにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた条件でのCD34陰性細胞の培養系でのみ1%前後と少数ではあるがIL-7レセプター陽性細胞が認められた (図2)。

GPA陽性細胞をソーティングしサイトスピン標本を作成しメイギムザ染色にて観察したところ、そのほとんどは赤芽球であることが確認できた。ただし脱核した赤血球の確認は困難であった。

(3) コロニーアッセイ

上記の通りCD34陰性細胞の培養ではCD34陽性細胞からの培養と異なり、CD34抗原の発現が培養期間中全く認められないまま、GPA陽性赤芽球に分化することが観察された。両集団の相違およびそれぞれの分化に各種サイトカインが及ぼす影響を知るため、サイトカインの条件を変えて、CD34陽性細胞、陰性細胞を其々コロニーアッセイを行った。①EPO ②EPO + SCF ③EPO + IL-3 ④EPO + SCF + IL-3 + G-CSF + GM-CSFの条件でアッセイを行った際の結果を (表1) に示す。CD34陽性細胞のコロニーアッセイの結果、SCFがあるとMixコロニー形成がフルに刺激され、IL-3があるとG, GMコロニー形成がフルに刺激される傾向があることが分かった。

CD34陰性細胞のコロニーアッセイの結果、赤芽球バースト (BFU-E) のみ形成し、GM, Mixコロニーは形成されない結果が得られた。

4) シングルセルソーティング

CD34陰性細胞の集団の培養結果では、短期間にGPA陽性細胞の分化および増殖が起っているように観察されたが、CD34陰性の細胞集団中に赤芽球コロニー前駆細胞の中の成熟型 (CFU-E) が混入している可能性は否定できない。より詳細な細胞の分化過程を調べるため、CD34陰性細胞を96well plateを用いてシングルセル

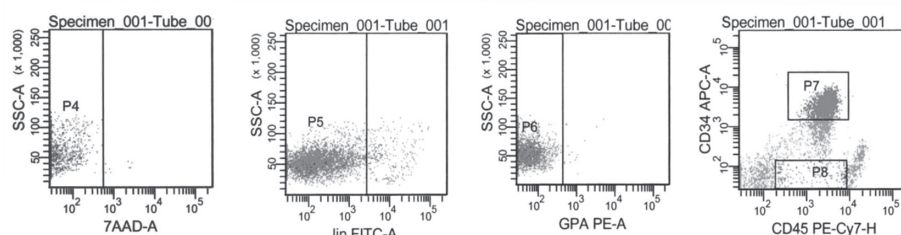


図 1. 標的細胞の純化。

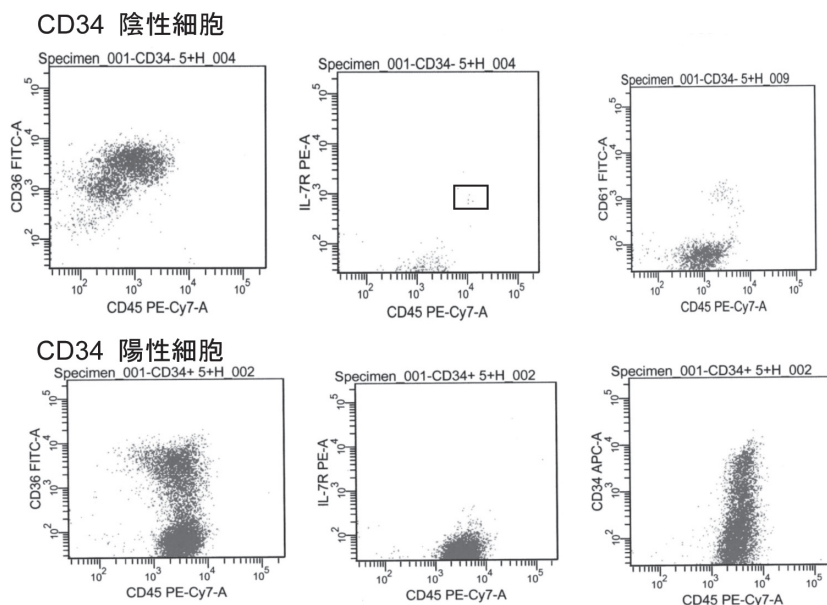


図 2. day5, のCD34 陰性および陽性細胞.

表 1. コロニーアッセイ

	CD34(-)				CD34(+)			
	Epoのみ	Epo+SCF	Epo+IL-3	5cvtokine	Epoのみ	Epo+SCF	Epo+IL-3	5cvtokine
BFU-E	8 (8/8)	9 (8/10)	14 (20/8)	10.5 (6/15)	17 (18/16)	29 (35/23)	44 (45/43)	29 (28/30)
G	0	0	0	0.5 (0/1)	20 (23/17)	21.5 (16/27)	23 (26/20)	31.5 (30/33)
GM	0	0	0	0	4 (6/2)	11.5 (15/8)	22.5 (15/10)	14.5 (14/15)
Mix	0	0	0	0	7.5 (9/6)	18 (17/19)	11 (6/16)	23 (21/25)
Macrophage	0	0	0	0	2.5 (3/2)	1.5 (3/0)	0 (0/0)	2 (1/3)

ソーティングを行い, IL-3, G-CSF, SCF, EPO, GM-CSF の5種のサイトカインと, これにbFGF, BAFF, Wnt-3Aを加えた2条件で培養しday7までの変化を観察した. どちらの条件でも6-7well/plateに細胞の増殖を認め, 各wellで数10倍から数1000倍程度の細胞増殖が確認された. ウェルから回収した細胞を用いてFACS解析したところいずれの培養後細胞でもCD34の発現は認められなかった. CD36の発現については陽性細胞の割合はwellにより異なるものの細胞増殖の見られた全てのwellで増殖した細胞の半数以上が陽性を示した. 一方でIL-7の明らかな陽性細胞は認められなかった. CD61とc-kit(CD117)に関して両抗原ともに発現が弱陽性の細胞が存在するwellが2-3well/plate, c-kitのみ発現している細胞集団を認めるwellが1well/plate見られた.

考 察

生体に移植する*in vivo*アッセイ系を用いた検討では, CD34陰性細胞がより未分化な造血幹細胞を含むことを示す研究成果が発表されている. *In vitro*アッセイ系で

もCD34陽性細胞とCD34陰性細胞の特性の違いを検討する目的で, 両者を無血清, ストローマフリーの培養系で本研究は検討を行ってきた.

結果で示したように, CD34陰性細胞の培養ではCD34抗原の発現はいずれのサイトカイン添加条件でも認められなかった. CD34陰性細胞からの培養の方がGPA抗原の発現が短期間で認められた. 本実験の開始時点では, より未熟なCD34陰性細胞の中に短期間で赤芽球へ分化する特殊な前駆細胞の存在も仮定したが, 現時点ではCFU-E存在の否定も難しく, このような細胞の証明には現在準備を進めている遺伝子解析他, さらに検討が必要である. 培養中に認められたCD36陽性細胞については, CD34陽性細胞ではほぼ全ての細胞がCD45抗原を発現していたのに対して, CD34陰性細胞ではCD45抗原を発現している集団と発現していない両集団が存在していた. 以上から一つの仮定としてCD34陽性細胞が赤芽球への分化において, CD34の発現を失いCD34陰性細胞となり, その後CD36陽性CD45陽性細胞, さらにCD36陽性CD45陰性細胞に変

化することが考えられる。また今回 CD34 陰性細胞の培養でのみ CD61 の発現が認められた。これまでのシングルセルカルチャーの解析では CD61 と CD36 の発現の関係については明らかにされていない。今後の解析では両抗原の発現を同一サンプルで確認する予定である。形態の観察で巨核球様の細胞が認められた well もあり、これも現時点では仮定の域を出ないがシングルセルカルチャーで CD61 陽性細胞と巨核球様細胞が一致し、さらに赤芽球の分化も確認されるとすれば CD34 陰性細胞中に赤芽球と巨核球共通の前駆細胞の存在が疑われることとなり、この分化能を持った細胞の解明が求められる。

IL-7 レセプター陽性の小リンパ球様細胞に関しては CD34 陰性細胞を bFGF, BAFF, Wnt-3A 存在下に培養した際に認められるが、陽性細胞が極めて少数であったため純化細胞として回収することが困難で

あった。今後は培養系をサイズアップして純化細胞として採取できるように改良していきたい。またデータは示さなかったが、培養条件を検討したところ bFGF, BAFF, Wnt-3A のそれぞれを 1 種類ずつ欠いた培養ではどの条件でも IL-7 レセプター陽性細胞は認められず興味深い。今後さらなる検討が必要である。

細胞表面マーカー解析と増殖分化能を解析するのと並行して、培養開始時の CD34 陰性分画の細胞、培養後いくつかのポイントで回収した細胞をサンプルとして、mRNA の発現について RT-PCR で確認し、より詳細な分化過程の解析も行わないと真の解明にはつながらないと考えている。CD34, c-kit, survivin, TAL-1 (SCL), GATA-1, HOXB4, Bmi-1, globin, Epo-R, c-Mpl, Nanog, SSEA-1, Oct4 等の発現の違いについて培養前後の各分画での検討を行なう予定である。