

## 造血幹細胞の維持と誘導

越智 清純<sup>1,2</sup>, 山崎 聡<sup>1</sup>

### 1. はじめに

造血幹細胞は組織幹細胞の一つであり、血液細胞におけるヒエラルキーの最も上位に存在する。多分化能と自己複製能を持つことで、生体内のすべての血液細胞を供給するとともに、基本的には一生のうちにすべてが枯渇することはない。これまでの研究から骨髓環境中には造血幹細胞を維持する特殊な微小環境、いわゆるニッチが存在するのではないかと考えられてきた。近年、分子生物学的手法の進歩や新しい知見の発見により、これまで多くの謎に包まれていた造血幹細胞の維持機構やニッチ細胞についての説明が進んでいる。著者らは、造血幹細胞が生体内でどのように維持されているかに注目し研究を行ってきた。これまでに造血幹細胞の休眠状態を制御するニッチ細胞の特定、造血幹細胞特異的遺伝子の同定ならびに骨髓内での造血幹細胞の局在の可視化、さらにはこれまで困難であった、ヒト人工多能性幹細胞から機能的な造血幹細胞を誘導する方法を報告した。また、造血幹細胞が置かれているアミノ酸バランスがその維持に重要であることを発見した。ここでは著者らの研究結果を中心に紹介するとともに、これまで報告された興味深い知見を概説する。

### 2. 造血幹細胞とニッチ

ニッチとは元来、西洋建築用語で「壁の凹み」を意味し、壁面などを半円にくり抜き、中に花瓶や彫像などの

装飾品を飾れるようにしたものである。血液学分野では、1978年にR. Schofieldによって造血幹細胞が置かれている骨髓の特殊な微小環境を表す概念として提唱された<sup>1)</sup>。骨髓造血幹細胞のニッチ細胞としてこれまでにさまざまな種類が報告されている<sup>2)</sup>。その中でも著者らの研究室で発見した骨髓造血幹細胞を休眠状態に誘導する非ミエリン髄鞘シュワン細胞について述べる<sup>3)</sup>。造血幹細胞の多くは細胞周期の休止期にとどまることで休眠状態になり、外部からのストレスを回避し造血幹細胞プールを維持している。そこで我々は、骨髓環境中には造血幹細胞の休眠状態の維持に関わる因子が存在すると考え、造血幹細胞の細胞分裂を抑制するタンパク質をスクリーニングし、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ) の発現の変化に注目した。造血幹細胞を含めた生体に存在するほとんどのTGF- $\beta$ は不活性型 (潜在型) TGF- $\beta$ として存在している<sup>4)</sup>。また、TGF- $\beta$ II型受容体ノックアウトマウスの造血幹細胞は野生型マウスと比較して細胞周期が亢進していることが報告されている<sup>5)</sup>。活性型TGF- $\beta$ のみを認識する抗活性型TGF- $\beta$ 抗体を用いてマウスの骨髓切片を免疫染色したところ、神経系細胞の一種であるグリア細胞のマーカーである抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体ならびに抗S100 $\beta$ 抗体陽性細胞と同時に染色される細胞を発見した。詳細な解析からこれらの細胞は非ミエリン髄鞘シュワン細胞と考えられ、血管内皮細胞マーカーであるVE-カドヘリン陽性細胞の近傍に存在していることがわかった。次に、自律神経を切断した除神経マウスの骨髓ではGFAP陽性細胞と活性型TGF- $\beta$ 陽性細胞の有意な減少が確認されたことから、造血幹細胞自体が顕著に減少していることがわかった。これらの造血幹細胞を解析したところ細胞周期が静止期でとどまらず亢進していることがわかった。これらの結果から、骨髓における非ミエリン髄鞘シュワン細胞は、潜在型TGF- $\beta$ を活性型TGF- $\beta$ へ変換することにより造血幹細胞の休眠状態を誘導する骨髓ニッチ細胞として存在することを明らかにした (図1)。

### 3. 骨髓造血幹細胞特異的遺伝子の同定による造血幹細胞の骨髓内での局在の可視化

骨髓に含まれる造血幹細胞はきわめてまれな細胞集団であり、その研究には同定・純化が必要となる。歴史的

<sup>1</sup> 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞治療部門 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

<sup>2</sup> 東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

The hematopoietic stem cell and its niche

Kiyosumi Ochi<sup>1,2</sup> and Satoshi Yamazaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan, <sup>2</sup>Division of Molecular Therapy, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900183

© 2018 公益社団法人日本生化学会

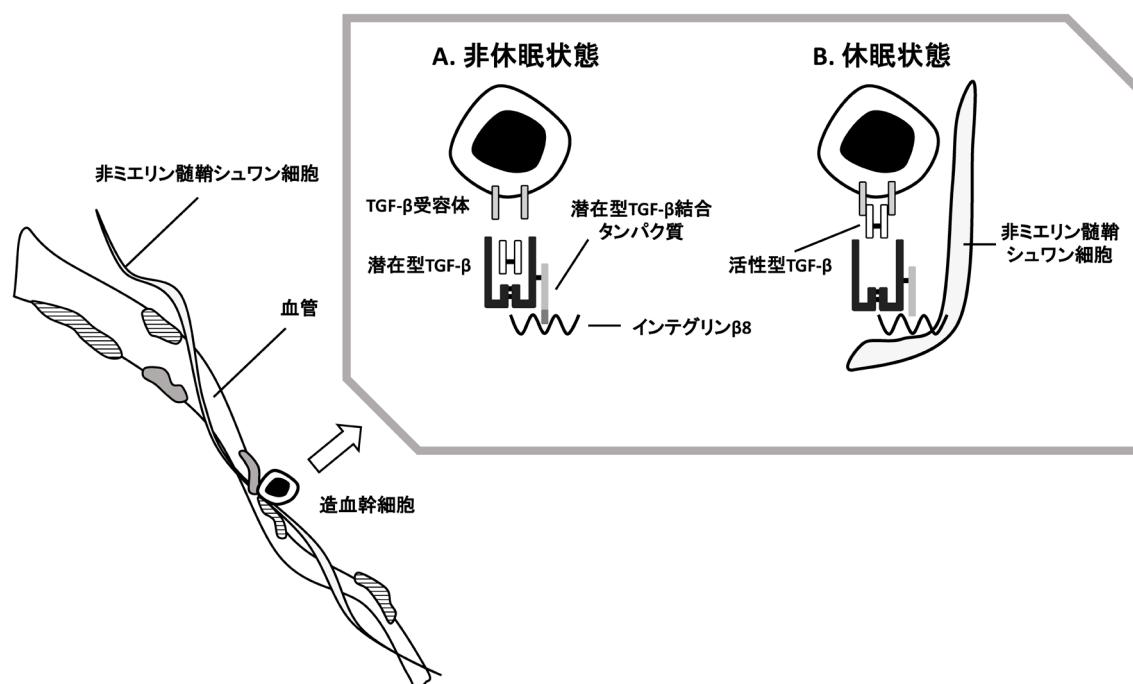


図1 TGF- $\beta$ による造血幹細胞の冬眠状態の維持

(A)潜在型TGF- $\beta$ のままでは造血幹細胞は非休眠状態となっている。(B)非ミエリン髄鞘シュワン細胞存在下では、活性型TGF- $\beta$ となり造血幹細胞のTGF- $\beta$ 受容体に結合することで、造血幹細胞は休眠状態となる。

には、脾コロニー形成法、半固形培地を用いた *in vitro* コロニー法が用いられてきたが、W. Coulterにより考案され1970年代に商品化されたフローサイトメーターの登場により革新的な進歩がもたらされた。これは、造血幹細胞が特異的に発現している細胞表面抗原に対し、蛍光色素で標識された抗体を用いて解析する方法である。フローサイトメーターを用いた解析方法の最大の利点としては多重染色が可能なことである。複数の蛍光標識抗体を用いることで特定の細胞集団を同定でき、ソーティング機能により分取した細胞は遺伝子解析や移植実験に用いることが可能である。1996年に中内啓光らはマウス骨髓細胞のうち、Lineage<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>-/low</sup>という表面抗原を発現する集団の1細胞のみを致死線量の放射線を照射したマウスへ移植した際に、5匹に1匹の割合で造血再構築能を有することを報告した<sup>6)</sup>。このことは、わずか1個の造血幹細胞によって骨髓が再構築できることを世界で初めて証明することとなった。最近ではsignaling lymphocyte activation molecule (SLAM) familyとして知られるCD48, CD244, CD150などを組み合わせることで造血幹細胞をさらに純化することが可能となっている<sup>7)</sup>。

これまで骨髓内における造血幹細胞とニッチとの関係を解析するためには、骨髓切片に対し造血幹細胞特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、その局在やニッチ細胞との関係性が議論されてきた。しかしながら、この方法では解剖学的な骨髓構造を破壊してしまうことに加え、観察

できる範囲も狭く二次元的な解析であることが欠点であった。そこで、これまでに表面抗原マーカーにより長期骨髓細胞再建能を持つ造血幹細胞 (long-term hematopoietic stem cell: LT-HSC) として報告されている細胞集団 (Lineage<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>-/low</sup>CD150<sup>+</sup>細胞) と28種類の血液細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することで、LT-HSC特異的に発現するHoxb5遺伝子を同定した。ゲノム編集技術を用いて赤色蛍光タンパク質mCherryをHoxb5遺伝子の終止コドンの直前に2A配列を介して配列し、Hoxb5遺伝子の内在性プロモーターにより蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作製した。これらのトランスジェニックマウスから採取したmCherry陽性細胞は、放射線照射した免疫不全マウスへ移植すると生着を認めることから、LT-HSCであることが確認された。これまで報告されている表面抗原を用いたLT-HSCの純化方法と比較したところ、従来想定されてきた細胞集団の約20%のみがLT-HSCとしての表現型を有するものの、残りの80%は短期骨髓再建能を持つ造血幹細胞 (short-term hematopoietic stem cell: ST-HSC) もしくはその下流にある細胞であることが示唆された。これらの造血幹細胞の骨髓内での局在を明らかにするために、理化学研究所と大阪大学の共同研究チームが開発した組織透明化/三次元イメージング技術CUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis)<sup>8)</sup>を応用し、骨髓を透明化試薬にて透明化処理を行い(図2)、シート照明型蛍光顕微鏡を用いて高速三次元撮影

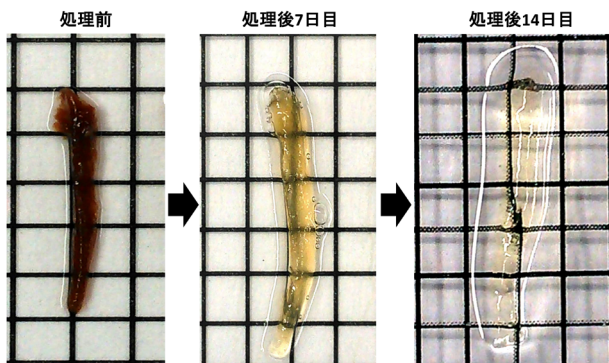


図2 透明化試薬を用いた骨髄の透明化処理の過程

を行った。その結果、約94%以上の長期骨髄造血幹細胞はVE-カドヘリン陽性血管内皮細胞と直接接していることがわかった。このことから少なくともVE-カドヘリン陽性血管内皮細胞がLT-HSCのニッチ細胞として働き、直接接することがその機能維持に重要であることを明らかにした。

#### 4. アミノ酸バランスによる造血幹細胞の機能制御

必須アミノ酸とは、その動物が生体内で十分な量を合成することができず、栄養分として摂取しなければならないアミノ酸である。ヒト・ラットにおいては、一般的に9種類の必須アミノ酸（メチオニン、フェニルアラニン、リシン、ヒスチジン、トリプトファン、イソロイシン、ロイシン、バリン、トレオニン）が知られており、幼若ラット・幼若マウスにおいてはアルギニンを加えた10種類とされている。1959年度ノーベル生理学・医学賞の受賞者であるA. Kornbergらは、1946年に発表した論文にてラットに低タンパク質の食事を与えることで、顆粒球減少と貧血を呈し、精製したアミノ酸によってこれらの表現型が可逆的に改善したことを報告している<sup>9)</sup>。このことは造血がアミノ酸によって調整されていることを示す重要な知見であったが、その後の研究において、これらの現象が十分に検証されることはなかった。今回、我々はそれぞれのアミノ酸を1種類ずつ除いた培養液を作製し、試験管培養において各アミノ酸が造血幹細胞に及ぼす影響を評価したところ、バリン欠乏条件下で培養すると急速に生存率および骨髄再建能が低下することを見いだした<sup>10)</sup>。これらの知見は、従来の抗がん剤や放射線照射を用いた前処置に代わる新しい移植法になりうる可能性を示した。

#### 5. 骨髄環境の理解による人工多能性幹細胞からの機能的造血幹細胞の分化誘導

京都大学iPS細胞研究所の山中伸弥が報告したヒト人工多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）は、体細胞へ数種類の遺伝子を導入することで、ヒト胚性幹細胞と同様の多分化能と

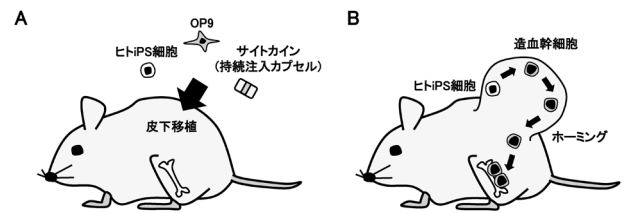


図3 テラトーマ形成を介したヒト造血幹細胞の誘導方法 (A)ヒトiPS細胞をヌードマウス（KSN/Slc系統）の皮下に造血を支持する間葉系細胞株OP9とともに移植し、浸透圧ポンプ（持続注入カプセル）を用いて各種サイトカインを持続投与するようす。(B)移植されたヒトiPS細胞から造血幹細胞が誘導され、マウス骨髄へホーミングするようす。

自己複製能を持つ細胞である<sup>11)</sup>。そのことから、ヒトiPS細胞から造血幹細胞が誘導できれば、血液内科領域で広く行われている造血幹細胞移植の新しい細胞ソースとしての利用が期待できる。著者らは、ヒトiPS細胞からテラトーマ形成を介して機能的な造血幹細胞の分化誘導に成功した<sup>12)</sup>。テラトーマとは奇形腫とも呼ばれ、三胚葉系へと分化する能力を持つ良性腫瘍である。マウス体内へ移植されたヒトiPS細胞はテラトーマを形成することが知られており、その内部で三胚葉への分化能を示すことは、ヒトiPS細胞が多分化能を持つことを検証する試験（テラトーマ形成試験）として用いられてきた。興味深いことに生体に生じるテラトーマ内には中胚葉から分化した造血細胞が含まれていることが古くから知られている<sup>13)</sup>。そのことから、テラトーマを作製する過程において支持細胞とともに造血幹細胞の維持に必要なサイトカインを持続投与することで造血幹細胞を誘導できないかと考えた。マウスiPS細胞から機能的な造血幹細胞が誘導されるか検討するために、緑色蛍光タンパク質GFP（green fluorescent protein）遺伝子を持つLnkノックアウトマウス（Lnk<sup>-/-</sup>マウス）からiPS細胞を樹立した。Lnk遺伝子は造血幹細胞の自己複製を負に制御することが報告されており、Lnk遺伝子ノックアウトマウスでは、造血幹細胞の自己複製能が向上し、移植した造血幹細胞の生着率が高いことが知られている<sup>14)</sup>。これらのマウスから得られたGFP陽性iPS細胞を、GFP遺伝子を持たないヌードマウス（KSN/Slc）の皮下に造血を支持する間葉系細胞株OP9とともに移植し、浸透圧ポンプを用いて各種サイトカインを持続投与した。その結果、テラトーマが形成されたマウスの末梢血中にGFP陽性血液細胞が検出された。このGFP陽性細胞中の造血幹細胞を分取し、放射線照射したマウス（C57BL/6）へ移植した結果、移植後長期にわたってマウス体内にiPS細胞由来血液細胞が生着し、すべての血球系統への分化が確認できた（図3）。そのことから、iPS細胞由来造血幹細胞は長期にわたって造血能を保持した機能的な細胞であることが示された。さらに、共通γ鎖遺伝子が欠損しているため



ンパ球への分化が認められない重症免疫不全症マウス (X-linked severe combined immunodeficiency: X-SCID) から iPS 細胞を樹立し, 正常遺伝子を導入したうえで, 同様にテラトーマ形成を介して造血幹細胞を誘導したところ, テラトーマが形成された免疫不全マウスの末梢血中に iPS 細胞由来リンパ球を含むすべての血球系への分化が確認された。このことから, ヒト患者においても遺伝子治療を施した iPS 細胞からテラトーマ形成法を介して誘導した造血幹細胞を自家移植することで, 免疫不全症をはじめとする遺伝性血液疾患を治療できる可能性が示された。

さらに, c-Kit 欠損マウスをホストマウスとして利用し, これまで線維芽細胞から造血幹細胞への分化転換 (transdifferentiation) させる遺伝子として報告された Gfi1b, c-Fos, Gata2 を導入することでテラトーマ形成を介する造血幹細胞への分化誘導効率を向上させることに成功している<sup>15)</sup>。

## 6. おわりに

ニッチ細胞として従来の骨芽細胞, ネスチン陽性間葉系幹細胞, CAR 細胞, 非ミエリン髄鞘シュワン細胞, 血管内皮細胞の他に, 脂肪細胞や巨核球・好中球もニッチ細胞として造血幹細胞の自己複製・分化に関わっていることが報告されている<sup>16)</sup>。このようにニッチを構成する細胞は, これまで想定されてきた以上に多種におよび, さらにそれぞれが協調しあって造血幹細胞プールを維持していることが明らかとなっている。今後も新たな知見や解析方法の登場により, その全貌が明らかになっていくと期待される。

## 謝辞

本稿でご紹介した研究内容は, 中内啓光教授 (東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞治療部門特任教授・米国スタンフォード大学 Stem Cell Biology & Regenerative Medicine 教授) の研究室ならびに各共同研究グループに

て遂行されました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Schofield, R. (1978) *Blood Cells*, **4**, 7–25.
- 2) Crane, G.M., Jeffery, E., & Morrison, S.J. (2017) *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 573–590.
- 3) Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., & Nakauchi, H. (2011) *Cell*, **147**, 1146–1158.
- 4) Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., & Springer, T.A. (2011) *Nature*, **474**, 343–351.
- 5) Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., & Doetschman, T. (1997) *Development*, **124**, 2659–2670.
- 6) Osawa, M., Hanada, K.-i., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996) *Science*, **273**, 242–245.
- 7) Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., & Morrison, S.J. (2005) *Cell*, **121**, 1109–1121.
- 8) Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., & Ueda, H.R. (2014) *Cell*, **157**, 726–739.
- 9) Kornberg, A. (1946) *J. Biol. Chem.*, **164**, 203–212.
- 10) Taya, Y., Ota, Y., Wilkinson, A.C., Kanazawa, A., Watarai, H., Kasai, M., Nakauchi, H., & Yamazaki, S. (2016) *Science*, **354**, 1152–1155.
- 11) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, **126**, 663–676.
- 12) Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., & Nakauchi, H. (2013) *Mol. Ther.*, **21**, 1424–1431.
- 13) Cudennec, C. & Nicolas, J.F. (1977) *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **38**, 203–210.
- 14) Seita, J., Ema, H., Ooehara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., & Nakauchi, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2349–2354.
- 15) Tsukada, M., Ota, Y., Wilkinson, A.C., Becker, H.J., Osato, M., Nakauchi, H., & Yamazaki, S. (2017) *Stem Cell Rep.*, **9**, 1024–1033.
- 16) Kumar, S. & Geiger, H. (2017) *Trends Mol. Med.*, **23**, 799–819.

## 著者寸描

### ●越智 清純 (おち きよすみ)

東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター特任研究員。医学博士。血液専門医。

■略歴 1982年愛媛県今治市に生る。2008年宮崎大学医学部医学科卒業。14年東京大学医学系研究科病因・病理学医学博士課程修了。東京都立墨東病院, 東京大学医科学研究所附属病院, 国立がん研究センター中央病院にて血液内科医として研修。17年より現職。

■研究テーマと抱負 再生医療, 幹細胞研究。ヒト胚性幹細胞ならびに人工多能性幹細胞を用いた造血細胞分化に従事し, 再生医療への応用を目指している。

■ウェブサイト <http://stemcell-u-tokyo.org/>

■趣味 ワイン収集家。ブルゴーニュ産ワインを中心にヴィンテージワインを多数所有。