

ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞の純化とその幹細胞特性の解明

角出啓輔

先端医療学専攻修復医療応用系 幹細胞生物学専攻第3学年

(衛生学講座)

【背景および目的】

造血幹細胞(HSC)は自己複製能と多分化能を有し、生涯にわたり造血を支持する。従来、ヒト HSC は CD34⁺分画にのみ存在すると考えられていた。しかしながら、当講座では、ヒト臍帯血(CB)中に CD34⁻ SCID-repopulating cell (SRC)が存在することを初めて明らかにした(Blood 2003;101, 2924)。さらに、18種類の分化抗原(18Lin)を用いる CD34⁻ SRC の純化法を開発し、CD34⁻ SRC を約 1/1,000 の頻度まで濃縮することに成功した(Exp Hematol. 2011;39;203)。最近、CD34^{+/-} SRC の陽性分子マーカーとして CD133 抗原を同定し、18Lin⁻CD34^{+/-}CD133⁺分画中に CD34^{+/-} SRC をそれぞれ約 1/100、約 1/140 の頻度まで高度に純化することに成功している(Leukemia, 2014;28;1308)。

本研究では、CD34^{+/-} HSC の新たな陽性分子マーカーを同定し、さらに高度に純化することにより、ヒト HSC の幹細胞特性および階層制の解明を目指した。

【方法】

ヒト CB より FACS にて 18Lin⁻CD34^{+/-}細胞を分取し、以下の検討を行った。1) CD34^{+/-} SRC の新たな陽性分子マーカー X の同定、2) CD133 抗原と分子 X を用いる CD34^{+/-} HSC の超高度純化法の開発、3) 純化された細胞分画を用いる単一細胞レベルでの CD34^{+/-} HSC の幹細胞特性の解明。

【結果および考察】

最初に、ヒト CB 由来 18Lin⁻CD34^{+/-}細胞を標的細胞とし、ヒト CD34^{+/-} SRC の陽性分子マーカーの網羅的探索を行い、新たに分子「X」を同定した。次に、限界希釈法を用いて、18Lin⁻CD34^{+/-}X^{+/-}分画における SRC の頻度を測定した。その結果、18Lin⁻CD34⁺X^{+/-}および 18Lin⁻CD34⁻X^{+/-}分画に SRC の頻度は、それぞれ 1/21、1/35 および 1/28、1/874 と CD34^{+/-}分画ともに X⁺分画に SRC が高度に濃縮されていた。そこで、上述の CD133 抗原に分子 X を加えて 18Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD133⁺X^{+/-} および 18Lin⁻CD34⁻CD133⁺X^{+/-}分画を FACS にて分取し、重症免疫不全マウスへ移植した。その結果、両分画中に 2 次移植可能な長期多分化能を有する SRCs の存在が認められた。両分画中の SRC の頻度は限界希釈法にて測定中である。次に、上記の細胞を用いて、ヒト CD34^{+/-} HSC の幹細胞特性について解析した。Colony assay では、18Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD133⁺X^{+/-}細胞と比較し、18Lin⁻CD34⁻CD133⁺X^{+/-}細胞において高い混合コロニー形成能を示した。次に、single-cell RT-qPCR 法を用いて両分画の遺伝子発現パターンを比較、解析した。その結果、PCA 解析で、両分画は明らかに異なる遺伝子発現パターンを示した。また、両分画は Runx-1 や Scl、Bmi-1、c-Myb などの HSC の未分化性維持に重要な遺伝子を高く発現していた。興味あることに、エピジェネティック制御に重要な Ezh-2 の発現レベルには、CD34^{+/-} HSC で明瞭な差が認められた。以上より、CD34^{+/-} HSC は、異なるクラスに属する HSC 集団である可能性が示唆された。