

論 文 要 旨

CD133 is a Positive Marker for a Distinct Class of Primitive Human Cord Blood-derived CD34-negative Hematopoietic stem cells

(CD133 はヒト臍帯血由来 CD34 抗原陰性未分化造血幹細胞の陽性マーカーである)

関西医科大学小児科学講座
(紹介：金子一成教授)

関西医科大学衛生学講座
(指導：菌田精昭教授)

高橋 雅也

【研究目的】

ヒト造血幹細胞 (HSC) は、自己複製能を持ち、全血球系統へ分化する多分化能を有する細胞と定義されている。Dick らは、ヒト未分化 HSC を重症免疫不全マウスに移植する異種間移植系において、ヒト造血を再構築する細胞 (SCID-repopulating cell : SRC) を測定する方法を開発した。現在 SRC は、ヒトで測定可能な最も未分化な HSC と考えられている。

最近まで、ヒトでは最も未分化な HSC は CD34 抗原陽性 (CD34⁺) と考えられていた。しかしながら、Sonoda らはヒト臍帯血中に CD34 抗原陰性 (CD34⁻) SRC の存在を、骨髓内直接移植 (IBMI) 法を用いて明らかにした (Blood, 2003)。しかし、その頻度は 1/25,000 であり、CD34⁻SRC の特性を解明するためにはさらなる純化が必要であった。近年、Ishii, Sonoda らは 18 種類の Lineage (Lin) 抗体を用いる純化法を開発し、その頻度を 1/1,000 にまで濃縮純化することに成功した (Exp Hematol, 2011)。

今回、私たちは CD34⁻SRC (HSC) の特性解明を目的として、CD34⁻SRC の陽性マーカーについて網羅的な検索を行い、さらなる高度純化法の開発を行った。

【方法】

ヒト臍帯血より比重遠心法で単核球を分離し、免疫磁気ビーズ (EasySep) で Lin 陽性細胞を除去した。その後、18 種類の Lin 抗体、7AAD、抗 CD34 抗体、抗 CD45 抗体で多重染色を行った。さらに陽性マーカー検索目的で、既知の HSC マーカーや接着分子など多種類の抗原をスクリーニングした。その中で、CD34⁻細胞分画を陽性および陰性分画に重分画する抗体を選別した。次に、その陽性分画を FSC/SSC scattergram 上で backgate をかけ、blast-lymphocyte windows に濃縮される抗原を候補として選択した。

選択された抗原を用いて CD34⁺および CD34⁻細胞を陽性および陰性分画に重分画し、この 4 つの分画を用いて以下の手順で本研究を行った。

① 造血前駆細胞 (CFC) コロニー形成能の測定

(メチルセルロース法を用いて SCF,TPO,IL-3,GM-CSF,G-CSF,Epo 存在下、30%FCS 添加、37°C,5%CO₂,5%O₂ で 12-14 日間培養)

② ヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (BM MSC) との共培養系における分化能の検討 (SCF,FL,TPO,IL-3,IL-6,G-CSF 存在下、37°C,5%CO₂,5%O₂ で 7 日間無血清培養)

③ IBMI 法を用いる SRC 活性の測

(重症免疫不全 (NOG) マウスを用いる SRC 活性の測定、および 2 次マウスへの移植による自己複製能の測定)

【結果】

初めに多数の抗原分子に対する抗体を用いて、網羅的に 18Lin⁻CD45⁺CD34^{+/+}細胞を染色してパターン解析を行った。その結果、CD133、CD90、c-kit、CD49f、CXCR4、および CD93 抗体が、CD34⁻細胞分画を陽性および陰性に重分画することを発見した。次に、CD34⁻細胞分画の陽性分画を FSC/SSC scattergram 上で

backgate をかけて、パターン解析を行った。その結果、CD133 が最も信頼できるマーカーであることが確認された。この結果に基づいて、CD133 を候補抗原とし CD34⁺SRC の陽性マーカーとなり得るか検討を行った。

CFC コロニー形成能では、18Lin⁻CD45⁺CD34^{+/-}CD133^{+/-}細胞の plating efficiencies はそれぞれ 57%、65%、39%、19%であった。CD34⁺CD133⁺細胞ではすべてのコロニー (BFU-E、CFU-GM、CFU-mix) が形成された。CD34⁺CD133⁻細胞は 68%が BFU-E で 30%が CFU-mix であり、ほとんど CFU-GM コロニー (2%) を認めなかった。一方、CD34⁻CD133^{+/-}細胞は、主に BFU-E コロニー (71%、73%) と CFU-mix (25%、27%) コロニーの形成を認め、CFU-GM コロニーはわずかしが形成されなかった。この結果は Ishii らの報告を支持する結果であり、18Lin⁻CD45⁺CD34⁺細胞分画には造血前駆細胞が含まれることが示された。

次に 18Lin⁻CD45⁺CD34^{+/-}CD133^{+/-}細胞を BM MSC と共培養し、CD34⁺細胞の産生・維持や分化能の解析を行った。CD34⁺CD133^{+/-}細胞の増殖率は、各々 450 倍、130 倍であり、CD34⁺細胞は 39%と 31%の割合で認められた。一方、CD34⁻CD133^{+/-}細胞の増殖率は各々 130 倍、30 倍であり、CD34⁺細胞は 32%と 13%の割合で認められた。以上の結果から、CD34^{+/-}細胞ともに CD133⁺細胞分画に CD34⁺細胞の産生・維持能が有意に高いことが示された。また、CD34^{+/-}細胞は、CD133⁺細胞分画に CD33⁺細胞、CD14⁺細胞、CD11b⁺細胞等の顆粒球系細胞の産生能が有意に高いことが示された。一方、CD41⁺細胞の産生能においては、CD34⁺細胞では CD133⁻細胞分画が有意に高い結果であり、CD34⁻細胞では CD133⁺細胞分画と CD133⁻細胞分画に有意差は認められなかった。以上の結果から、*in vitro* における CD34^{+/-}CD133^{+/-}細胞分画の分化能は異なっていることが示唆された。

さらに SRC 活性の測定のため NOG マウスを用いた異種間移植実験を行った。各々、5,000 個の 18Lin⁻CD45⁺CD34^{+/-}CD133^{+/-}細胞を IBMI 法でマウス左脛骨内に移植し、骨髓吸引法を用いてヒト CD45⁺細胞の生着率を経時的に解析した。その結果、CD34⁺および CD34⁻細胞ともに CD133⁺細胞分画を移植したすべての NOG マウスでヒト CD45⁺細胞の生着を認めた。一方、CD133⁻細胞分画を移植した NOG マウスでは、ヒト CD45⁺細胞の生着を認めなかった。この結果から、CD133 が CD34⁺SRC の陽性マーカーであることが明確に示された。加えて、CD133 が CD34⁺SRC の陽性マーカーであることも明らかにされた。さらに、長期骨髓再構築能の検討のため、生着した 1 次マウスすべてで 2 次移植を行った。その結果、CD34^{+/-}CD133⁺細胞ともにすべての NOG マウスでヒト CD45⁺細胞の生着を認め、CD34^{+/-}CD133⁺SRC が、共に長期骨髓再構築能 (~38 週) を持つ HSC であることが確認された。また、1 次および 2 次マウスともに移植 18-20 週で犠牲死させ、末梢血、骨髓、脾臓、および胸腺を採取し、多分化能について解析した。その結果、B および T 細胞系、骨髓球系、赤芽球系、巨核球系、NK 細胞への多分化能を示すことが確認された。

最後に、CD34⁻CD133⁺SRC の頻度を限界希釈法で測定したところ、1/142 であり、Ishii らの報告比べて約 7 倍に濃縮・純化することに成功した。

【考察】

従来の純化法は negative selection 法であり、CD34⁺HSC のさらなる純化には陽性マーカーを用いる positive selection 法の開発が必須不可欠であった。本研究により、CD133 が信頼できる陽性マーカーであることが初めて明らかにされた。加えて、CD133 が CD34⁻HSC だけでなく、CD34⁺HSC の陽性マーカーであり、すべての SRC 活性を同定する機能性マーカーであることが示された。このことは、臍帯血移植の実地臨床において重要な意義を持っている。すなわち、現在、HSC 活性の指標として用いられている CD34⁺細胞数に比べて、CD133⁺細胞数を用いる方がより正確に HSC 活性を測定可能なことが示されたことである。以上の結果より、今後、CD133⁺細胞の移植医療への応用が期待される。