

総 説

造血幹細胞に関する最近の知見

松本 憲二 中内 啓光

東京大学医科学研究所幹細胞治療研究分野

(平成 18 年 2 月 7 日受付)

(平成 18 年 5 月 15 日受理)

キーワード：造血幹細胞，自己複製，白血病幹細胞，ニッシュ，ホーミング

1. はじめに

造血幹細胞はすべての血液細胞へ分化する能力“多分化能”と未分化性を維持したまま増加する能力“自己複製能”を有する細胞と定義される。しかし造血幹細胞の絶対数が少ない事からこれらの制御機構は長い間解明されなかった。しかし近年、マウス造血幹細胞が CD34⁺, c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lineage marker-(CD34-KSL)分画に高度に濃縮される事が示され¹⁾、純化された造血幹細胞を用いた実験方法が確立された事から、徐々に制御機構の一端が明らかにされつつある。本稿では造血幹細胞の自己複製の制御機構、自己複製の限界、白血病幹細胞、分化のコミットメント、ニッシュ、ホーミングなどについて最近の報告を中心に概説する。

2. 造血幹細胞の自己複製の制御機構

造血幹細胞の自己複製に関して、いくつかの分子の関与が具体的にようになってきている。HoxB4 を造血幹細胞に強制的に過剰発現すると自己複製が亢進することが知られていたが、HoxB4 遺伝子を ES 細胞に導入すると、それまで不可能と考えられてきた長期骨髄再建能を持つ造血幹細胞を誘導できると報告され²⁾、非常に注目を浴びた。しかし、HoxB4 を利用しても ES 細胞からの造血幹細胞の誘導は必ずしも容易ではない。加えてこの方法で誘導した造血幹細胞からはリンパ球系細胞を分化誘導する事が困難である。ゼブラフィッシュの造血機構の解析から同定された cdx4 が HoxB4 と協調的に働き、ES 細胞からの造血幹細胞の誘導な

らびに機能を増強する³⁾。一方、ES 細胞から造血幹細胞の誘導が難しいのは骨髄ニッシュへのホーミング能が不十分であるからだとし、誘導した後、骨髄への直接移植すれば造血系を再構築することが可能であるという報告がなされた⁴⁾。しかし、この報告は国内外の複数の研究室で追試が困難である。また、Wnt, β カテニン系が造血幹細胞の自己複製に関与する事が報告されている⁵⁾⁶⁾。実際、純化した造血幹細胞には Wnt の受容体である Frizzled ファミリーのいくつかが特異的に発現されている。しかし、Wnt 蛋白の多くは不溶性のため精製が困難で、これらの研究成果の追試が困難である事、Frizzled の下流にある β カテニンの欠損マウスに造血系の異常が認められないことなど、いくつかの問題点が指摘されている。

自己複製は造血幹細胞における遺伝子発現パターンの細胞分裂を超えた記憶と捕らえる事ができる。こういった観点から、ヒストンのメチル化や脱アセチル化、DNA のメチル化などを介したエピジェネティックな遺伝子発現の制御にかかわるポリコーム遺伝子の造血幹細胞自己複製への関与も興味を持たれる。すでに Takihara らによって報告された Rae28⁷⁾に加えて Bmi-1 が造血幹細胞の自己複製に重要な役割をもっている事がノックアウトマウスの解析および遺伝子の強制発現実験などから示されている⁸⁾⁹⁾。さらに、興味深い事に Bmi-1 は神経幹細胞の自己複製にも関与している事が報告されており¹⁰⁾、幹細胞システムに共通な自己複製の制御機構として注目される。

Bmi-1 は p16, p19 の発現を負に制御して, その下流にある Rb や p53 を介して造血幹細胞における老化やアポトーシスを制御していると考えられる. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) 遺伝子欠損マウスでは活性酸素の蓄積と造血幹細胞の自己複製能の低下が認められるが, Bmi-1 を強制発現させることによりこの異常がレスキューされる事から, p16, p19 を介した経路はここでも造血幹細胞の制御因子として機能しているようである¹¹⁾.

3. 造血幹細胞の自己複製の限界

造血幹細胞の定義は教科書的には「多分化能と自己複製能を有する細胞」とされているが, 近年の幹細胞研究の成果によって, 造血幹細胞の自己複製には限界があることが示唆されてきつつある. 一つの純化した造血幹細胞をレシピエントマウスに移植し, 4カ月後にその骨髓細胞を回収して2次移植を行い造血能と長期骨髓再建能をもつ細胞数を測定したところ, 個々の幹細胞の造血能に大きな差があることが明らかになった¹²⁾. さらに1個の移植された造血幹細胞は4カ月後には300~1,000個くらいの長期骨髓再建能をもつ造血幹細胞を産生する. しかし, 個々の造血幹細胞の造血能は最初に移植されたものと比較して大きく低下している事から, 分裂に伴って徐々に造血能が低下していく事が考えられる. 移植を繰り返す事によって徐々に造血能が低下する事は以前から知られていたが, このように in put が1という形で in vitro の解析を行い, ここの造血幹細胞の造血能を定量的に測定し, その限界が示されたのは初めてである. このような限界はテロメアーゼ遺伝子を強制発現させて造血幹細胞におけるテロメアー長の短縮を防いでも観察されている事から¹³⁾, 単純にテロメアーの短縮だけでは説明できない. これらの実験結果は造血幹細胞が完璧な自己複製をしているのではない事を示唆するものである. 活性酸素の関与など造血幹細胞の老化という考え方も含めて, 幹細胞の自己複製の限界が客観的に, しかも分子レベルで理解され始めた.

4. 白血病幹細胞

細胞周期, アポトーシス, 老化など, 造血幹細胞

の自己複製に関与する分子が明らかになってきているが, これらの分子は当然のことながら発癌とも密接に関係している. 白血病においてごく一部の細胞だけが活発に増殖している事, つまり白血病幹細胞の存在が示唆されてから久しいが, ようやくその分子基盤が見えて来た. 前述の Bmi-1 は造血幹細胞において強く発現されているが, 多くの白血病においても高発現されている. HoxA9 と Meis1 を共発現させると白血病を発症するが, Bmi-1 欠損マウスでは白血病を誘発できても長期にわたって維持できない¹⁴⁾. 同様に活性化型 STAT5 を造血幹細胞に導入すると100%の確率でMPDを発症するが, 造血前駆細胞に導入してもMPD (myeloproliferative disease) は発症しない¹⁵⁾. これらの所見は白血病の発症が造血幹細胞のもつ自己複製機構に依存していることを強く示唆する. 最近, 多くのMPD症例でSTAT5を直接活性化するJAK2の活性化型変異が見つかったことも興味深い. 一方でMLL-ENLやMOZ-TIF融合遺伝子は前駆細胞に導入しても白血病を誘導できる事から, 造血幹細胞が本来持つ自己複製機構を使わない発症機転も存在すると考えられ白血病の病態や自己複製の機構を考える上で貴重な手がかりとなる. 白血病幹細胞の概念は治療を考える上でも重要である. これらの細胞はニッチェに存在してG0期にあるのであろうか. 白血病幹細胞と正常造血幹細胞をどのように区別して対応すれば良いのであろうか. 造血幹細胞の理解が新しい白血病の治療法開発にも大きく影響を与えるものと期待される.

5. 造血幹細胞のコミットメントの様式と初期分化

造血幹細胞の自己複製の機構と同様にコミットメントについても研究が進んでいる. 造血幹細胞は分裂に際して自己複製するか分化するのかの決定, そして分化する際にどの細胞系譜に分化するか, この2つの決断を迫られる. 自己複製する場合も対称性か非対称性か, 分化する場合も造血幹細胞は常に多能性の前駆細胞 (MPP: multipotent progenitor) に分化してから特定の細胞系譜にコミットした前駆細胞に分化するのか, あるいは

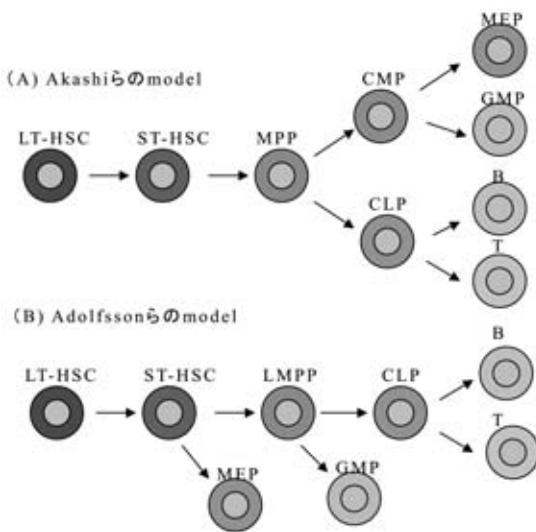


図1 造血幹細胞から成熟血球への分化モデル

LT-HSC:long-term HSC, ST-HSC:short-term HSC, MPP:multipotent progenitor, LMPP:lymphoid primed MPP, CMP:common myeloid progenitor, CLP:common lymphoid progenitor, MEP:megakaryocyte/erythroid progenitor, GMP:granulocyte/monocyte progenitor, B: B cell, T: T cell

MPPを介さずにいきなりコミットした前駆細胞になれるのか、などが問題となる。

現在世界中で最もよく受け入れられている血球分化モデルはAkashi, Weissmanらによって提唱されたものである¹⁶⁾(図1)。これはMPPからcommon lymphoid progenitor (CLP)とcommon myeloid progenitor (CMP)が分かれ、CMPから骨髄球系前駆細胞であるgranulocyte/monocyte progenitor (GMP)と赤芽球/巨核球系前駆細胞であるmegakaryocyte/erythroid progenitor (MEP)へと分かれ、CLPからTおよびBリンパ球前駆細胞へと分化するというモデルである。しかし、最近はこの異なるモデルも提唱し始められている。AdolfssonらはFlt-3をマーカーにして造血幹細胞が最初に迎えるコミットメントはリンパ球系の分離ではなく、赤芽球/巨核球系の分離であった¹⁷⁾。このモデルではshort-term HSCの後出現するFlt-3陽性細胞が好中球、単球、B細胞、T細胞への分化能は保持していたが、赤芽球/巨核球

への分可能を失っていることから、lymphoid primed multipotent progenitor (LMPP)の存在を提唱した。さらにTakanoらは純化した造血幹細胞を用いたpaired-daughter cellsの実験系を用いて答えを求めた。その結果、造血幹細胞のコミットメントは、非対称性に起こる事、分裂の際に存在していたサイトカインがコミットメントするかどうかの決定に際して影響を与えうること、造血幹細胞はMPPを介さずにいきなり1回の分裂後にCPPになりうる事を示した¹⁸⁾。また、造血幹細胞に発現されているBmi-1の量が自己複製/コミットメントを制御する事も示された⁹⁾。

分化の過程はさまざまな転写因子により制御されており、SCL, GATA-2など未熟な細胞分画に発現するものから、赤血球・巨核球系への分化に必須のGATA-1, NF-E2, 骨髄球分化に必須のC/EBP α , リンパ球系分化に必須のIkfars, E2A, Pax5などが知られている。これらの転写因子の発現制御の機序については未解明の部分が多いが、MiyamotoらはHSC, CMP, CLPなどさまざまな分化段階の細胞を分離し特異的遺伝子の発現を解析したところ、HSC, CMPでは骨髄球系(MPO, G-CSF receptor, C/EBP α など), 巨核球系/赤芽球系(Epo receptor, c-mpl, GATA-1など)の遺伝子が同時に発現しており、CLPではT/B細胞系の遺伝子が同時に発現していた¹⁹⁾。これらの事から幹細胞・前駆細胞レベルではそれぞれ分化ポテンシャルに応じた複数の系列特異的遺伝子がすべて発現しており、それらの系列に分化する準備をしていると考えられる。

6. 造血幹細胞とニッチ

幹細胞は細胞のみで自律的に生存維持されているのではなく、幹細胞を取り巻く環境因子により、さまざまな制御を受けている。このような幹細胞の未分化性の維持、さらに分化、増殖をコントロールする環境を幹細胞ニッチという。骨髄のニッチについては以前より骨芽細胞が造血幹細胞の支持細胞として機能しているのではないかと考えられてきたが、造血幹細胞の存在部位は明らかにされていなかった。このように概念上の場所であった骨髄のニッチに関する研究が遺伝子改変

マウスの解析から思わぬ展開を遂げた。ひとつは BMP 受容体 IA (BMPRIA) のコンディショナルノックアウトマウスにおいて²⁰⁾、もうひとつは骨芽細胞に特異的な活性型 PTH/PTHrP 受容体 (PPR) トランスジェニックマウスにおいて²¹⁾、どちらも骨芽細胞の増加と造血幹細胞の増加に相関があることを発見し、骨芽細胞がニッシュの本体であるとした。骨芽細胞と造血幹細胞の間を取り持つ分子として Jagged1 と Notch²⁰⁾、Ang-1 と Tie2²²⁾、N-cadherin²¹⁾ の関与が報告されている。さらに、最近、Morrison らは SLAM family の分子が造血幹細胞特異的なマーカーであるとし、比較的簡便な方法で骨髄内の造血幹細胞の位置を免疫染色で同定する方法を開発し、骨芽細胞に加えて骨髄や脾臓内の sinusoidal endothelium をニッシュとして提唱している²³⁾。造血幹細胞ニッシュについてはようやく細胞レベルでの局在がつかめてきているが、骨芽細胞や sinusoidal endothelium 細胞のすべてがニッシュというわけではないと考えられるので、今後さらに分子レベルでの機構解析が期待される。また、これらの研究の多くは造血幹細胞がニッシュからシグナルを受ける事により静止期に留まる事を示唆している。一方で、長期 BrdU 取り込み実験から、ニッシュに存在する造血幹細胞も 1~2 カ月に一度は分裂していると考えられる。これがどのような機構で制御されているかが今後の重要な課題の 1 つである。

7. ホーミング

静脈経由で移植された造血幹細胞が骨髄ニッシュに到達する確率を seeding efficiency という。松崎らは SP 法と抗体法を用いた純化法を組み合わせる事により一個の純化した造血幹細胞を移植して、95% 以上のレシピエントで長期骨髄再建が見られたと報告した²⁴⁾。物理的に分離した造血幹細胞を一個移植して 95% の確率で生着したという事は、造血幹細胞の純度も seeding efficiency も 95% 以上である事を示している。同様な結果は数学的な解析からも示唆されているが、当初は数パーセント程度と考えられていた seeding efficiency も造血幹細胞の純化法がより高度になった事により、少なくとも 60% 以上であることが確

実となった。造血幹細胞のこのような高いホーミング能を支える分子基盤の詳細は依然として不明であるが、ペプチターゼの一種である CD26 の発現が造血幹細胞のホーミングを負に制御するという Broxmeyer らの報告は興味深い²⁵⁾。ホーミングに関与する分子が明らかになり、それらの機能や発現を調節する事によって移植の効率を上げることが近い将来期待できるかもしれない。

ホーミングはマウス・マウス間の移植によりヒト造血幹細胞をマウスへ移植する際により顕著に影響するようである。これまでヒト造血幹細胞の NOD/SCID マウスへの移植は経静脈的に行われてきたが、骨髄に直接移植する方法が開発され、予想外の好結果が得られている。さらに、ヒト造血幹細胞のアッセイ法としてはこれまで使用されてきた NOD/SCID マウスに IL-2 受容体 γ 鎖欠損マウスを交配させて得た NOD/SCID γ^{null} (NOG マウス) が作成された。IL-2 受容体 γ 鎖を欠損する事により T、B 細胞に加えて NK 細胞も欠損する NOG マウスは、NOD/SCID マウスよりヒト細胞をより効率よく生着させ、ヒト T 細胞も分化誘導する事が可能である²⁶⁾。移植方法の改良や新しい実験動物の開発はヒト造血幹細胞の研究を大きく促進すると期待される。

8. 造血幹細胞の遺伝子プロファイリング

造血幹細胞の純化法の開発と遺伝子解析技術の進歩に伴い、造血幹細胞のような少ない細胞を対象とした遺伝子発現プロファイリングが進み、一部は Stem Cell Database として公開されている。さらに、造血幹細胞、神経幹細胞、ES 細胞の 3 種類の幹細胞に共通に発現する遺伝子群もマイクロアレイ解析によって同定された。しかし、材料として用いた細胞の純度によって結果は大きく異なっていて、このような解析が直接的に重要な機能分子の同定に結びつく事は少ない。Bmi-1 の標的遺伝子や SLAM ファミリー遺伝子などの同定はむしろ例外的であるといえる。マイクロアレイ解析の性質上、新規遺伝子の同定や発現の低い遺伝子を確認する事は必ずしも容易ではない。しかし、ヒトゲノム研究がそうであるように、こういった情報の蓄積は造血幹細胞に関する研究を進める

上で極めて重要である。造血幹細胞研究においては機能解析が難しいため、遺伝子プロファイリングを行ったグループ自体が機能解析まで行うのは難しいのが現状かもしれない。

9. 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療

造血幹細胞を標的とした遺伝子治療もヨーロッパを中心に盛んに行われるようになってきており、ADA 欠損型免疫不全症、X 連鎖重症複合免疫不全症、慢性肉芽腫症で優れた治療成績が上がっている。フランスでは1999年からのX連鎖重症複合免疫不全症患者に造血幹細胞（CD34陽性細胞）を標的とした遺伝子治療が行われている²⁷⁾²⁸⁾。残念な事に治療を受けた患者のうち2名で約3年後にTリンパ球白血病が発症した²⁹⁾³⁰⁾。ヒトTリンパ腫の発癌因子であるLMO2遺伝子座の近傍にレトロウイルスのインテグレーションが見つかっていて白血病との関連が疑われている。しかし、同様な治療を4名の患者に対して行っているイギリスでは白血病の発症は報告されておらず、良好な治療効果が認められている。また、イタリアでもADA欠損患者に対してCD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療に成功し、25歳と26歳の2名の患者はともにきわめて良好な経過をたどっている。この疾患は免疫不全症などと比較して頻度が高く、その波及効果は非常に大きい。この分野で世界をリードするイタリアのグループでは現在、レンチウイルスを用いた造血幹細胞に対する遺伝子治療の実行段階に達しているという。遺伝子治療後の患者が白血病を発症した事は多くの人に遺伝子治療に対してネガティブな印象を与えた。しかし、ヨーロッパではこれを契機としてレトロウイルスベクターのインテグレーション部位の解析法やレンチウイルスベクターの使用に関してこれまでも増して積極的に研究が進められていて、今後の臨床研究へのトランスレーションが楽しみな分野となっている。

文 献

- 1) Osawa M, Hanada K, Nakauchi H, et al : Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273 : 242—245, 1996.
- 2) Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ, et al : HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 109 : 29—37, 2002.
- 3) Wang Y, Yates F, Daley GQ, et al : Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*, 102 : 19081—19086, 2005.
- 4) Burt RK, Verda L, Link C, et al : Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source : engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 199 : 895—904, 2004.
- 5) Reya T, Duncan AW, Weissman IL, et al : A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423 : 409—414, 2003.
- 6) Willert K, Brown JD, Nusse IR, et al : Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423 : 448—452, 2003.
- 7) Ohta H, Sawada A, Takihara Y, et al : Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 195 : 759—770, 2002.
- 8) Park IK, Qian D, Clarke MF, et al : Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 423 : 302—305, 2003.
- 9) Iwama A, Oguro H, Nakauchi H, et al : Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity*, 21 : 843—851, 2004.
- 10) Molofsky AV, Pardoll R, Morrison SJ, et al : Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, 425 : 962—967, 2003.
- 11) Ito K, Hirao A, Suda T, et al : Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431 : 997—1002, 2004.
- 12) Ema H, Sudo K, Nakauchi H, et al : Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell*, 8 : 907—914, 2005.
- 13) Allsopp RC, Morin GB, Weissman IL, et al : Effect of TERT over-expression on the long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 9 : 369—371, 2003.
- 14) Lessard J, Sauvageau G : Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 423 : 255—260, 2003.
- 15) Kato Y, Iwama A, Nakauchi, et al : Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*, 202 : 169—179, 2005.

- 16) Akashi K, Traver D, Weissman IL, et al : A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404 : 193—197, 2000.
 - 17) Addolfsson J, Mansson R, Jacobsen SE, et al : Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121 : 295—306, 2005.
 - 18) Takano H, Ema H, Sudo K, Nakauchi H : Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells : inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med*, 199 : 295—302, 2004.
 - 19) Miyamoto T, Iwasaki H, Weissman IL, et al : Myeloid or Lymphoid promiscuity as a Critical Step in Hematopoietic Lineage Commitment. *Dev Cell*, 3 : 137—147, 2002.
 - 20) Calvi LM, Adams GB, Scadden DT, et al : Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425 : 841—846, 2003.
 - 21) Zhang J, Niu C, Li L, et al : Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425 : 836—841, 2003.
 - 22) Arai F, Hirao A, Suda T, et al : Tie 2 / angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118 : 149—161, 2004.
 - 23) Kiel MJ, Yilmaz OH, Morrison SJ, et al : SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121 : 1109—1121, 2005.
 - 24) Matsuzaki Y, Kinjo K, Mulligan RC, Okano H, et al : Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity*, 20 : 87—93, 2004.
 - 25) Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE, et al : Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*, 305 : 1000—1003, 2004.
 - 26) Hiramatsu H, Nishikomori R, Nakahata T, et al : Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$ mice model. *Blood*, 102 : 843—880, 2003.
 - 27) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288 : 669—672, 2000.
 - 28) Hacein-Bay-Abina S, Le Deist F, Carlier F, et al : Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*, 346 : 1189—1193, 2002.
 - 29) Hacein-Bay-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al : LMO 2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302 : 415—419, 2003.
 - 30) McCormack MP, Rabbitts TH : Activation of the T-cell oncogene LMO 2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 350 : 913—922, 2004.
-