

論文の内容の要旨

組み換えアルブミンを用いた培養系による造血幹細胞の増殖制御因子の探索 家保有希

<背景と目的>

造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cells; HSCs)は骨髄中のニッチと呼ばれる微小環境に存在していると考えられており、一生涯にわたり生体に必要な全血球細胞を供給している。骨髄ニッチの1つとしてシュワン細胞を含む血管性ニッチが挙げられるが、血管周囲では様々な液性因子が協調して HSCs の未分化性を維持していると考えられている。現在までに、これら骨髄ニッチの知見から、Stem Cell Factor (SCF)や Thrombopoietin (TPO)などの液性因子刺激における HSCs の増幅に関する研究が、数多くの研究者によって行われてきた。しかし、体外において未分化性を維持しつつ HSCs を増幅させることは未だ困難な状況である。また、1つの研究室で得られた知見が別の研究室では再現が困難であるという事例が、「実験条件の違いによるもの」として問題視されてこなかった。

私は、培養系でウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum; FBS)やウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin Fraction-V; BSA-FV)を用いることで得られた実験結果こそが、再現が困難な状況の一因であると仮説を立てた。そこで本研究では、無血清培地に BSA-FV を添加している現在の培養系の問題点を特定し、不確定な要素を含む BSA-FV を用いない、新たな培養系の構築を試みた。更に、構築した培養系を用いて、生体外における HSCs の維持因子の同定を行った。

<方法と結果>

1. HSCs の増殖能および骨髄再構築能に影響を及ぼす BSA-FV の不均一性

まず、製造ロットの異なる 15 種類の BSA-FV を用いてコロニーアッセイを行い、各 BSA-FV で培養した HSCs のコロニー形成能について調べた。その結果、5 種類の BSA-FV では、他 10 種の BSA-FV 使用時と比較して、コロニー形成能が低下していた(図 1A)。次に、コロニーを形成した 10 種類の BSA-FV を対象に HSCs を 1 週間培養後、競合的骨髄移植を行い、HSCs の骨髄再構築能を評価した。解析の結果、培養に用いた BSA-FV の製造ロットが異なることで、HSCs の骨髄再構築能に大きな差が確認された(図 1B)。移植 12 週後の末梢血のキメリズムは、#1 のように 50% 以上を示すものがある一方、#15 のように生着が殆ど検出できないロットも存在した。このように、培養に用いた BSA-FV の製造ロットが異なることで、培養した HSCs の増殖および骨髄再構築の維持能力に大きな差があることが示された。

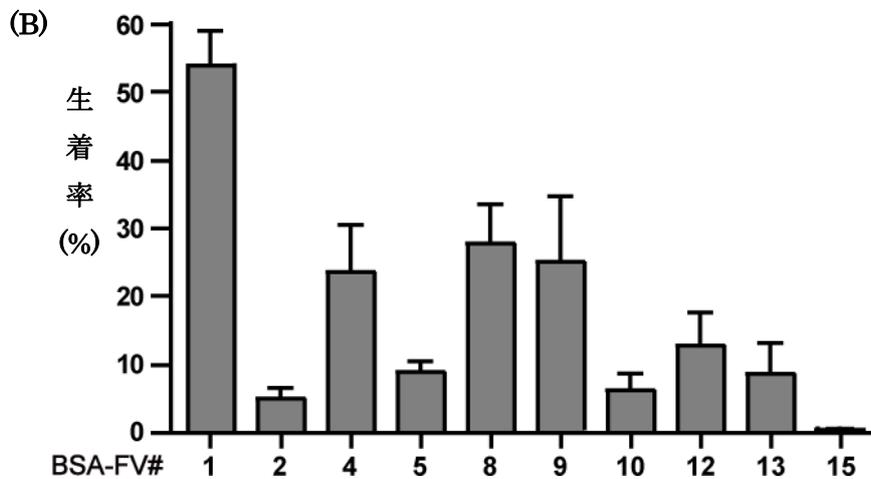
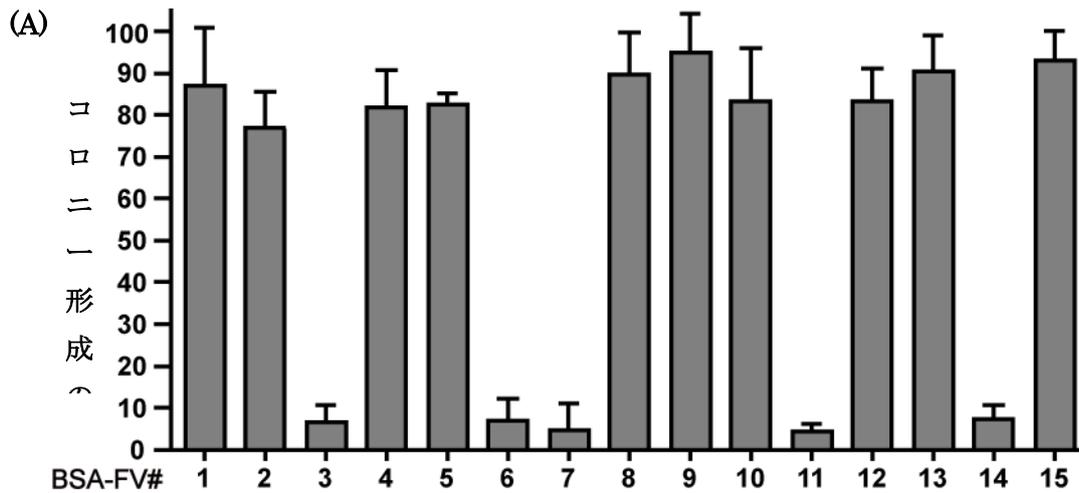


図 1. BSA-FV の不均一性
 (A) single cell colony assay
 (11 日間)
 (B) 競合的骨髄移植 12 週後
 の末梢血における生着率

2. 組み換えアルブミンタンパク質を用いた培養系の構築

BSA-FV の製造ロットが異なることにより HSCs の骨髄再構築能の実験結果が変わるという事実から、今日の HSCs 培養系では信頼できる知見を得ることは困難であると考えた。そこで私は、BSA-FV 培養系に代わり、BSA-FV を用いない、基準となる新たな培養系の構築を試みた。まず BSA-FV を添加せず培養実験を行ったが、残念ながら HSCs のコロニーは形成されなかった。そこで、遺伝子組み換え技術を用いた非動物性組み換えアルブミンタンパク質(Recombinant Serum Albumin; RSA)に着目した。

BSA-FV#8 と RSA 使用時の HSCs のコロニー形成および *in vitro* 増殖能について解析したところ、両者に有意な差は認められなかった。更に、RSA を用いて 1

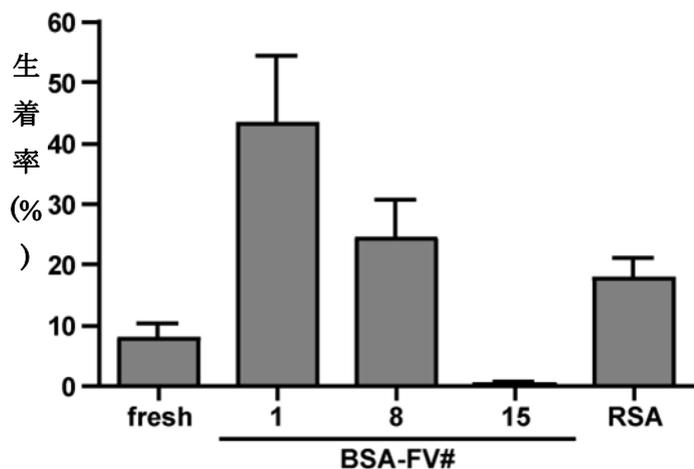


図 2. RSA を用いた競合的骨髄移植(12 週)

週間 HSCs を培養し移植を行って骨髄再構築能について評価したところ、BSA-FV#8 と同等程度のキメリズムを示した(図 2)。このように、組み換えアルブミンは BSA-FV#8 と同じように HSCs の実験培養系に用いることが可能であると確認された。これより、不確定要素を含む BSA-FV を用いない、基準となる培養系を確立することが出来た。

3. HSCs の維持因子の探索における組み換えアルブミンを用いた培養系の有用性

次に、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して HSCs の維持因子の探索を行った。HSCs の DNA のマイクロアレイデータをもとに、HSCs の細胞表面に受容体が存在している因子の候補を絞った。そして、候補因子を添加して HSCs を培養した後、骨髄移植を行って HSCs の能力を評価した。その結果、IL-1 α を添加した際に HSCs の骨髄再構築能は有意に増加した(図 3A)。

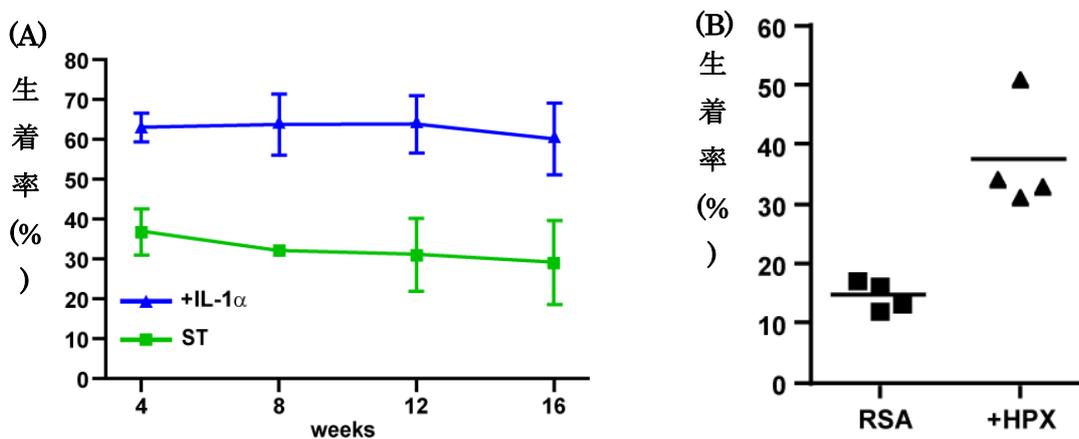


図 3. RSA 培養系を用いた候補因子の探索

(A) IL-1 α 添加培養時における HSCs 骨髄再構築能の推移

(B) HPX 添加培養後の競合的骨髄移植(移植後 12 週の末梢血における生着率)

4. BSA-FV に含まれる維持因子の探索

私は BSA-FV#1 を用いて培養した HSCs の骨髄再構築能が高いことを疑問に思い、BSA-FV#1 特異的に含まれる微量タンパク質の同定を試みるため、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して解析を行った。まず、BSA-FV#1、#8、#15 から大部分のアルブミンを除去した後、網羅的高速液体クロマトグラフィー/質量分析解析を行った。その結果から、BSA-FV#1 特異的なタンパク質として、ヘモペキシン(Hemopexin; HPX)を見出した(図 3B)。

次に、他の BSA-FV でも HPX が検出されるか否か調べるため、ロットの異なる 8 種類の BSA-FV を用いてウエスタンブロット解析を行った。すると 8 種類中 3 種の BSA-FV で HPX が確認された。これらの BSA-FV を用いて HSCs を 1 週間培養し骨髄再構築能を評価した。すると、HPX が検出

された3種類のBSA-FVでは、コントロール(RSA)よりもキメリズムが高く、培養したHSCsの骨髄再構築能とHPXには相関関係があると確認された。

過去の報告では、HPXは生体内で主に肝臓、肺、神経系で発現していると報告されている。また、神経系細胞であるシュワン細胞は骨髄ニッチの1種であると報告があることから、私は骨髄中のシュワン細胞においてHPXが発現しているのではないかと考えた。そこで、HPX抗体を用いて骨髄切片の免疫染色を行い、神経細胞とHPXの局在について解析した。その結果、両者は共局在もしくは非常に近接して存在していることが明らかになった。よって、HPXは生体内でも骨髄ニッチに存在し、HSCsの未分化性維持に寄与している可能性があることが示唆された。

<考察>

今日HSCsの培養に広く用いられているBSAは、エタノール分画法で精製された”BSA-FV”であり、生理的構造と機能を維持しているものの、血清アルブミン以外の微量タンパク質を多く含んでいた。これらの微量タンパク質によって、培養した造血幹細胞の増殖能、骨髄再構築能に差異が生じてきたと考えられる。本研究では、BSA-FVではなく組み換えアルブミンを用いることによって、実験培養系の不確定要素を軽減した基準となる培養系を構築することが出来たと考える。

更に、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用して、IL-1 α 及びHPXというHSCsの新たな維持因子を見出した。IL-1は、HSCsに及ぼす影響について先行研究で意見が割れていた。意見の不一致の原因として、先の研究ではFBSやBSA-FVを用いた培養系で解析していた点が考えられる。今回の組み換えアルブミンを用いた培養系を利用することで、FBS及びBSA-FVに含まれる不確定要素を排除したうえで、IL-1 α がHSCsに及ぼす影響を評価することが出来た。

また、BSA-FVに含まれる維持因子としてHPXを発見した。HPXは、生体内で血中の遊離ヘムに最も高い結合性を示す糖タンパク質である。HPXノックアウトマウスの造血系には異常がないと過去に報告されており、組み換えアルブミンを用いた培養系を利用しなければ、HPXをHSCsの維持因子として検出することは出来なかつたであろう。驚いたことに、培地の成分にはヘムが含まれていないにもかかわらず、HPX添加によって培養したHSCsのROSレベルの上昇は抑制された。HPXは、培地中で死細胞由来の遊離ヘムに結合し、生細胞へのROS傷害を抑制しているのかもしれない。更に、HPX添加のみでは、高いキメリズムを示すBSA-FVと同等の骨髄再構築能を維持することは出来なかつた。よって、BSA-FVの製造ロットによっては、HPX以外の維持因子を含有している可能性が高い。

これらの結果より、組み換えアルブミンを用いた培養系は、培養実験系の再現性向上という観点およびHSCsの維持因子の新たな探索系という点から、非常に重要であると思われる。