

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

年 月 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 許 明 江
研究機関 東京大学医学研究所 研究指導者 中畑 龍俊 職名 教授
所在地 〒108-8639 港区白金台 4-6-1 電話 3449-5694 内線 _____

研究テーマ 造血幹細胞の自己複製機構の解析とヒト造血幹細胞の増幅への応用

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

Ming-jiang Xu, K. Tsuji, S. Matsuoka, F.C. Yang, Y. Ebihara, M. Eguchi, and T. Nakahata. Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. (Abstract 2331) The 40th Annual meeting of the American Society of Hematology. Miami Beach, FL, December 4-8, 1998.

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Ming-jiang Xu, Kohichiro Tsuji, Takahiro Ueda, Yoh-suke Mukouyama, Takahiro Hara, Feng-Chun Yang, Yasuhiro Ebihara, Sahoko Matsuoka, Atsushi Manabe, Akira Kikuchi, Mamoru Ito, Atsushi Miyajima, and Tatsutoshi Nakahata: Stimulation of mouse and human primitive hemaropoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood* 92, 2032-2040, 1998.

Ming-jiang Xu, Kohichiro Tsuji, Sahoko Matsuoka, Feng-Chun Yang, Yasuhiro Ebihara, Mitsuoki Eguchi, and Tatsutoshi Nakahata. Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. (*Blood*, in submission)
Feng-Chun Yang, Sumiko Watanabe, Kohichiro Tsuji, Ming-jiang Xu, Azusa Kaneko, Yasuhiro Ebihara, and Tatsutoshi Nakahata: Human G-CSF stimulates the development of primitive multipotential progenitors of human G-CSF receptor-transgenic mice, but does not affect their commitment in vitro and in vivo. *Blood* 92, 4632-4640, 1998.

3. 今後の研究計画


純化されたマウス造血幹細胞と胎生期の Megakaryocyte の cDNA ライブラリーより、造血幹細胞自己複製因子受容体の cDNA をバインディング法等を用いて単離することより、造血幹細胞の自己複製機構を明らかにする。また、マウス胎生期における造血に、Megakaryocyte が Platelet に分化し易いことより、Megakaryocyte が Platelet に分化機構に関する遺伝子を単離する。

4. 研究指導者の意見

許先生は極めて熱心な血球の発生学 (Cytology) 研究で、短期間で多くの成果をあげつつあります。

先生が樹立された aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域からのストロー細胞株は、造血幹細胞の増殖を支持する点から、世界中の注目を集めております。

また胎生型の巨核球の存在も世界で初めて明らかとなり、今後の研究の発展が期待されます。

現在、短期間米国での分子生物学手法の習得は行われており、帰国後の一層の研究の発展が期待されます。このように許先生は極めて特筆すべき研究者であり、
研究指導者氏名 中川能俊 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS 以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：マウス胎生期造血幹細胞の自己複製機
構の解析と一次造血における造血の解析

許明江 中国山東医科大学付属病院 医者

中畑龍俊 東京大学医科学研究所癌病態学研究部 教授

要旨：マウスの definitive hematopoiesis の起源となる造血幹細胞は、胎生10.5日マウスの aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域で著明に増幅された後胎児肝へ移動することより、この時期のAGM領域にはマウス造血幹細胞の自己複製を支持する分子を発現する細胞が存在すると考えられる。胎生10.5日マウスのAGM領域より細胞を分離、長期培養することにより、細胞株AGM-S1,2 と3を樹立した。純化された造血幹細胞を樹立された細胞株と共培養し、造血幹細胞の増殖を支持する機能を有する細胞株を選別し、最終的には培養造血幹細胞の造血再構築能を *in vivo* 移植実験にお

いて検討することにより、細胞株 AGM-S3 の造血幹細胞の自己複製支持能を確認した。

また、マウス胎生期造血においては、卵黄嚢に発生する一次造血と胎児肝を中心とする二次造血は、それぞれ性状の異なる Erythrocyte, Macrophage, Lymphocyte を有することが知られているが、Megakaryocyte, Platelet については明らかにされていない。それで我々は、マウス胎生期における造血について、特殊な Megakaryocyte, Platelet を発見し、その特性を character した。

Key words: 造血幹細胞, 自己複製, 胎生期造血, 巨核球

目的：造血幹細胞の自己複製は、基本的な生命現象のひとつである造血の根幹をなす現象であるばかりでなく、細胞の増殖、分化、死の本態とも関わる重要かつ本質的な問題であります。また、現在行なわれている骨髄移植療法において解決しなければならない課題のひとつは、ドナーが体格の小さな女性あるいはこどもである場合のように、必要とされるヒト造血幹細胞の

採取が困難な場合の移植造血幹細胞の確保の問題です。この問題の解決のためには、ヒト造血幹細胞の増幅法の確立が重要と考えられます。ヒト造血幹細胞の生体外での増幅法が確立されれば、幹細胞移植に必要な幹細胞数の少なくすることができ、造血幹細胞の採取を簡単にし、骨髄提供者の安全性の確保のためにも有益です。また、ヒト造血幹細胞を標的細胞とする遺伝子治療においても、遺伝子の導入効率を高めるための有効な手段となります。

また、多くの出血病の原因は、MegakaryocyteがPlateletに分化障害である。マウス胎生期造血においては、卵黄嚢に発生する一次造血と胎児肝を中心とする二次造血は、それぞれ性状の異なるErythrocyte, Macrophage, Lymphocyteを有することが知られているが、Megakaryocyte, Plateletについては明らかにされていない。それで我々は、マウス胎生期における造血に、MegakaryocyteがPlateletに分化し易いことを発見した。

方法と結果：造血幹細胞は胎生10.5日AGM領域に発生し著

明に増幅することより、この領域には造血幹細胞増幅因子が発現されている可能性が示唆される。我々は造血発生や造血幹細胞の増幅機構を明らかにするために、胎生10.5日胎仔マウスのAGM領域よりストローマ細胞株、AGM-

S3を樹立した。flow cytometryによる解析では、AGM-S3細胞はVCAM-1、CD13、Sca-1を発現していた。AGM-S3細胞はマウス骨髄細胞中のLin-c-Kit+Sca-1+細胞からのコロニー形成細胞およびCFU-Sの産生を支持した。またヒトCD34+細胞との共培養では、混合コロニー形成細胞を含むコロニー形成細胞の著明な増幅が認められ、特にCD34+CD38-細胞との共培養では、培養6週間後でも多数の混合コロニー形成細胞が認められた。更にNOD/SCIDへの移植実験により、ヒトの長期造血再構築能を有する細胞はAGM-S3細胞上で4週間維持されることが示された。RT-PCRによる各種サイトカインの発現の検討では、AGM-S3細胞はSCF、IL-6、OSMを発現していた。

また、マウス胎児の卵黄嚢、胎児肝及び成体マウスの骨髄細胞を種種のサイトカイン存在下で培養し、形成されるコロニーを検討した。Megakaryocyte, Erythroidを含む混合コロニー

中の Erythroid グロビンを RT-PCR をもちいて検討した。

胎体 7.5 日の卵黄嚢からは、多数の Megakaryocyte コロニー及び Megakaryocyte コロニーを含む混合コロニーが形成されたが、胚からのコロニー形成が認められなかった。コロニーに含まれる Megakaryocyte は、成体マウス骨髄細胞から形成されるコロニーと比較して、大型で、成熟傾向が強かった。また、Megakaryocyte、Erythroid を含む混合コロニー中の Erythroid は、RT-PCR により胚型 Erythroid であることが証明された。この一次造血由来 Megakaryocyte コロニーは、種類のサイトカインにたいして高い感受性をしめした。胎生 13.5 胎児肝及び成体マウスの骨髄細胞から形成されるコロニーには、一次造血由来 Megakaryocyte コロニーはほとんど含まれていなかった。

考查：樹立された造血幹細胞の自己複製支持能を有する細胞株 AGM-S3 より cDNA ライブラリーを作製し、線維芽細胞を用いた発現クローニング法により造血幹細胞自己複製因子の cDNA を単離しました。また、前述の FACS セルソーターによ

り純化されたマウス造血幹細胞のcDNAライブラリーより、造血幹細胞自己複製因子受容体のcDNAをバインディング法等を用いて単離することより、造血幹細胞の自己複製機構を明らかにするとそれをヒト造血幹細胞の増幅に応用するに、大きな影響があると考えられる。また、マウス胎生期における造血に、MegakaryocyteがPlateletに分化し易いことより、多くの出血病の根治には、有用と考えられる。MegakaryocyteがPlateletに分化機構を明らかにするにも有用と考えられる。

References

1. Dzierzak, E.A. & Medvinsky, A.L. Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* 11, 356-366 (1995).
2. Faust, N., Huber, M.C., Sippel, A.E. & Bonifer, C. Different macrophage populations develop from embryonic/fetal and adult hematopoietic tissues. *Exp Hematol* 25, 432-444 (1997).
3. Okuda, T., Deursen, J.V., Hiebert, S., Grosveld, G. & Downing, J.R. AML, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330 (1996).
4. Tanaka, Y., et al. Stem cell factor enhances proliferation, but not maturation, of murine megakaryocytic progenitors in serum-free culture. *Blood* 80, 1743-1749 (1992).

5. Bielinska, M., Narita, N., Heikinheimo, M., Porter, S. & Wilson, B. Erythropoiesis and vasculogenesis in embryoid bodies lacking visceral yolk sac endoderm. *Blood* 88, 3720-3730 (1996).
6. Kennedy, M., et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, (1997).
7. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101 (1994).
8. Wong, P.M.C., Chung, S.W., Reicheld, S.M. & Chui, D.H.K. Hemoglobin switching during murine embryonic development: evidence for two populations of embryonic erythropoietic progenitor cells. *Blood* 67, 716-721 (1986).
9. Nakahata, T., and M. Ogawa. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3843-3847 (1982).
10. Nakahata, T., et al. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature* 324, 65-67 (1986).
11. Koike, K., et al. Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. *Blood* 75, 2286-2291 (1990).
12. Sui, X., et al. gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2859-2863 (1995).
13. Imai, T., et al. Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 78, 1969 (1991).
14. Eguchi, M., Nakahata, T., Tsuji, K. & Furukawa T. Morphological

and cytochemical changes in human mast cells during culture. Med Electron Microsc 30, 25-30 (1997).

15.. Weiss, M.J., Keller, G. & Orkin, S.H. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1- embryonic stem cells. Genes & Dev. 8, 1184-1197 (1994).