

## 生理活性ペプチドによる造血幹細胞の体外増幅分子機構の解明

杉山大介

九州大学 先端融合医療創成センター

### 【研究の背景】

臍帯血は、安全性と保存性の点から有用な造血幹細胞の供給源として注目されているが、含有される幹細胞数が少なく、成人への移植適用が制限される。申請者は、造血幹細胞の自己複製能維持に作用する新規生理活性ペプチドを開発し、それらをヒト臍帯血由来造血幹細胞に添加培養することで、造血幹細胞の数を 55 倍に増加させることに成功した。さらに、短期造腫瘍性を示さないことを確認した。

### 【目 的】

申請者の開発した生理活性ペプチドを用いて培養加工した造血幹細胞の臨床応用を目指すとともに、造血幹細胞増幅の分子機構を解析する。

### 【方 法】

本研究では、生理活性ペプチドの臨床応用と分子機構解明を目指して以下の検討を行った。

#### ① 既存の造血幹細胞体外増幅法との比較

申請者の開発した生理活性ペプチドを造血幹細胞に加えて培養し、その増幅法を検討する。またこれまで造血幹細胞を *in vitro* で増幅する方法が報告されており、これらの方法と比較検討を行う。さらに、免疫不全マウスへ移植およびコロニーアッセイ法により造血幹細胞活性を評価する。

#### ② 生理活性ペプチドシグナルのプロファイリング

RNA-seq 法を用いて、生理活性ペプチドにより発現が変動する遺伝子群を調べ、生理活性ペプチドの作用機序を検討する。

#### ③ 生理活性ペプチド結合因子の機能解析

申請者らはすでに、最新の微量タンパク質解析法である MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) 法を用いて、生理活性ペプチドと結合する因子の候補としてユビキチン様物質を同定している。成熟段階の異なる胎仔肝臓細胞群における、このユビキチン様物質の遺伝子発現を検討した結果、造血幹細胞で高発現していることが確認された。そこで、本研究では、このユビキチン様物質の機能獲得／抑制実験を行い、造血幹細胞増幅過程において示す機能を明らかにする。

### 【結 果】

#### ① 既存の造血幹細胞体外増幅法との比較

既存の造血幹細胞体外増幅法で使用される低分子化合物 (A および B) と生理活性ペプチドを 2 週間 *in vitro* で臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (造血幹・前駆細胞分画) を培養することで比較検討した。その結果、生理活性ペプチドは、既存の低分子化

化合物Aと同等の、Bを上回る造血幹細胞体外増幅効果が認められた。詳細は、特許申請準備中のため省略する。また、生理活性ペプチドによって増幅された造血幹細胞を免疫不全マウスに移植し、生着能をもつ細胞がコントロールと比較して有意に増加することを確認した。さらに、2次移植を行うことで生理活性ペプチドによって増幅された造血幹細胞の自己複製能を示した。

## ② 生理活性ペプチドシグナルのプロファイリング

RNA-seq 法を用いて生理活性ペプチドの分子メカニズムを現在解析中である。

## ③ 生理活性ペプチド結合因子の機能解析

臍帯血由来 CD34 陽性細胞にレンチウイルス shRNA システムを用いて候補分子のノックダウンを行い、現在解析中である。

## 【考 察】

申請者らが開発した生理活性ペプチドは、既存の低分子化合物 A と同等の、B を上回る造血幹細胞体外増幅効果が認められた。さらに、生理活性ペプチドによって増幅された造血幹細胞は免疫不全マウス体内で生着し、自己複製能を有することも証明された。今後は生理活性ペプチドがどのように臍帯血由来造血幹細胞を増幅させるのかメカニズムを明らかにしていく。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在、各種造血器疾患に対して造血幹細胞移植療法が行われている。移植患者数は日本国内で 5,292 人/年(日本造血細胞移植学会、2013 年)、世界では 146,808 人/年(Gratwohl *et al.*, *Haematologica*, 2013)と報告されている。臍帯血は、安全性と保存性の点から有用な造血幹細胞の供給源として注目されているが、含有される幹細胞数が少なく、成人への移植適用が制限される。本研究開発の目的が達成された場合、現在用いられている造血幹細胞移植の供給源と比較して、**①ドナーのリスクを回避することができ、②移植に必要な量の造血幹細胞の確保が容易になる**。本研究開発の達成後の展望として、培養した細胞製剤を凍結・長期保存することにより、**③移植を望む患者に対する細胞の迅速な供給が可能となる**。さらに、本法を応用することで幹細胞の自己複製能を維持したままの培養が可能になれば、**④ドナーいらずの造血幹細胞供給へと繋がる**。また、臨床用公的臍帯血バンクでは、ドナーから提供された臍帯血のうち造血幹細胞移植用に保管・利用される臍帯血は細胞数の多い臍帯血のみを対象としていることから、臨床用には適合外の臍帯血が約 7-8 割存在し、これらは研究用に使用されるか破棄となる(文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト/研究用臍帯血の利用状況に関する調査報告書/2014)。本研究開発により、**従来破棄されていた臍帯血の移植への利用が期待される**。

## 【参考・引用文献】

Alois Gratwohl, Helen Baldomero, Michael Gratwohl, Mahmoud Aljurf, Luis Fernando Bouzas, Mary Horowitz, Yoshihisa Kodaera, Jeff Lipton, Minako Iida, Marcelo C. Pasquini, Jakob Passweg, Jeff Szer, Alejandro Madrigal, Karl Frauendorfer, and Dietger Niederwieser<sup>11</sup>, for the Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation (WBMT). Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. *Haematologica*. 2013 Aug; 98(8): 1282-1290.

文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト/研究用臍帯血の利用状況に関する調査報告書/2014