6. *c-kit* を用いた血液幹細胞の純化およびその機能解析

須田 年生¹⁾ 郡 司 勇 治²⁾

熊本大学医学部 遺伝発生医学研究施設分化制御部門¹⁾, 自治医科大学 小児科²⁾

Expression and Function of *c-kit* Molecule in Hematopoietic Stem Cells

Toshio SUDA¹⁾ and Yuji GUNJI²⁾

*Department of Cell Differentiation, Institute of Molecular Embryology and Genetics,
Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan¹⁾*

Department of Pediatrics, Jichi Medical School, Tochigi, Japan²⁾

Summary

To clarify the phenotypes of various classes of human hematopoietic progenitor cells, we used a multicolor staining protocol in conjunction with CD34 and a newly developed mouse anti-human *c-kit* proto-oncogene product (KIT) monoclonal antibody (MoAb). We characterized three cell fractions in CD34⁺ cells which express *KIT*^{low} and *KIT*^{high} cells in addition to *KIT*⁻ cells.

A clonogenic assay demonstrated that most granulocyte-macrophage colony-forming cells (GM-CFC) were present in CD34⁺*KIT*^{high} populations, while erythroid burst forming cells (BFU-e) were detected mainly in CD34⁺*KIT*^{low} population. CD34⁺*KIT*⁻ fraction contained a small number of BFU-e. Morphological analysis showed that blast-like cells were more enriched in the CD34⁺*KIT*^{low} fraction, *KIT*^{low} cells contained CD34⁺CD38⁻ cells which were considered to be very primitive progenitor cells, determined by a replating assay.

In order to clarify the biological differences between both fractions, we examined the more primitive progenitor cell functions by assessing long-term culture-initiating cells (LTC-IC) on the stromal cells. At week 2, more colony forming cells (CFC) recovered from the culture in the fraction initiated with a CD34⁺*KIT*^{high} population. However, more LTC-IC during weeks 5 to 9 were present in CD34⁺*KIT*^{low} population. These results indicate that primitive progenitors are more enriched in *KIT*^{low} population and that the *KIT*^{high} population contains many GM-committed progenitor cells. We also demonstrated that anti-*KIT* MoAb inhibited the ability of CD34⁺ cells to generate CFC on the stromal layer in the LTC system. This suppressive effect was more evident in the generation of BFU-e by CD34⁺ *KIT*^{low} cells. Moreover, we confirmed that some CD34⁺*KIT*^{low} cells differentiate into CD34⁺*KIT*^{high} cells during coculture with allogeneic stromal cells. These results emphasize the pivotal role of the *KIT* and SCF interaction in hematopoiesis and indicate that *KIT*^{low} cells are more primitive than *KIT*^{high} cells.

緒 言

c-kit proto-oncogene のコードする蛋白は, tyrosine kinase 活性をもつ受容体である.

その結合因子は, ストロマ細胞からクローニングされ, stem cell factor (SCF) と名づけられた. 我々は, *c-kit* 抗体と FACS を用いて, 全血液有核細胞中, 1/10⁴ 以下の頻度で存在する幹細胞を純化し, その機能を解析してきた. マウスにおいては, 造血を再建する幹細胞は, 分化抗原陰性, *c-kit* 陽性の分画に存在した. さらに, この中から, Ly6 (Sca-1) 抗原陽性

細胞を分取すると, 幹細胞の指標となる CFU-S は, 約 80% に純化された. この幹細胞集団は, SCF によく反応し, 他の増殖因子との存在下に, 約 50% の頻度で, コロニーを形成した. *c-kit* 抗体により, ストロマ細胞上での幹細胞の *in vitro* 増殖が抑制されること, *in vivo* 脾コロニー形成が抑制されることから, *c-kit*/SCF の系は, 幹細胞の増殖に重要な機能を持つと考えられる.

本稿では, ヒト造血幹細胞における *c-kit* 分子の発現様式とその機能を中心に述べたい.

実験方法

1) 骨髓細胞

骨髓細胞は正常人ボランティアの胸骨よりヘパリン加採取し、リンホブレプを用いて遠心後骨髓単核細胞とし、リン酸緩衝液に 3% ウシ胎仔血清, 0.1% sodium azide を含んだ染色液に浮遊させた。

2) モノクローナル抗体を用いた染色

骨髓単核細胞, 培養細胞を streptavidin-allophycocyanin (APC) 標識した CD34 (4A1)¹⁾, avidin phycoerythrin (PE) 標識した CD33 (My9), CD38 (Leu17), fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗 KIT 抗体²⁾を用いて多重染色した。染色は氷上で 30 分インキュベートし、洗浄後 7-aminoactinomycin D を含む染色液に浮遊した。

3) FACS を用いた表面抗原の解析および sorting

染色細胞は FACStar plus (Becton-Dickinson) を用い、CD34 陽性細胞における *c-kit* の発現等の表面抗原の解析を行った^{3,4)}。また、sorting により血液前駆細胞 (CD34 陽性細胞) を *c-kit* (KIT) の発現の程度により CD34⁺KIT⁻, CD34⁺KIT^{low}, CD34⁺KIT^{high} に分取した。各細胞分画は May-Grünwald-Giemsa 染色を用い形態学的検討を加えた。

4) メチルセルロース培養を用いたコロニー形成能の検討

分離細胞および培養細胞の細胞数を 1×10^3 に調整し、30% ウシ血清アルブミン (BSA), 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (2-ME), 2 U/ml エリスロポイエチン (rhEpo), 5% PHA 刺激ヒトリンパ球培養上清 (PHA-LCM), 1.2% メチルセルロースに Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) を加えて全量を 1 ml とした培地で 37°C, 5% CO₂ の条件下で 14 日間培養し、構成細胞数 50 以上の細胞集団をコロニーとして数えた⁵⁾。他の実験では、この培養系に KIT 抗体を加えたり、PHA-LCM のかわりに種々のサイトカインを用いた。

用いたサイトカインは 100 ng/ml rhSCF, 20 ng/ml rhG-CSF, 10 ng/ml rhIL-3, 10 ng/ml rhGM-CSF, 20 ng/ml rhIL-6 である。

5) 骨髓長期培養系

Dexter らの方法を用いて allogeneic なストローマ細胞を作製した^{1,6,7)}。T25 フラスコを用い 3×10^6 の骨髓有核細胞を長期培養用培養液 (12.5% FCS, 12.5% ウマ血清 (HS), 5×10^{-5} M 2-ME, 10^{-6} M hydrocortison, 1,000 U/ml ペニシリン, 100 U/ml ストレ

プトマイシンに IMDM を加え 5 ml にする) に浮遊させ 5% CO₂, 33°C で培養した。T25 のフラスコにコンフルエントになったところで Coster の 24 穴の plate にストローマ細胞をまきなおしコンフルエントになったところで 15 Gy の放射線照射を行った。次に、このストローマ細胞と FACS により分離した骨髓細胞を共培養し各期間培養後、培養細胞およびストローマ細胞をメチルセルロース培養系に置いてコロニー形成能を検討した。一部の実験ではこの共培養の期間を 5 週以上とすることにより、最初の各分画における long-term culture-initiating cells の検討を行った。この長期培養系においては週に 1 度培養液の半量交換を行ったが、捨てられる培養液中の細胞も遠心後再び長期培養系にもどした。また、実験によってはこの共培養系に KIT に対する抗体を加え、その後コロニー形成能を検討することにより幹細胞とストローマ細胞の相互作用における KIT の役割を検討した。また、血液前駆細胞の長期培養後の表面抗原の変化についても検討した。

実験結果

1) 血液前駆細胞における KIT の発現

CD34 および KIT を用いた 2 color 分析の結果を Fig. 1 に示す。CD34 陽性細胞は KIT の発現の程度により三つの細胞分画に細分画された。約 55% の細胞はコントロールと比較して KIT を明らかに発現しており、残りの細胞分画は完全に KIT を発現していない群 (30%) と一部陽性細胞と連続性をもつ群 (15%) に分けられ、われわれは各々 KIT^{high}, KIT⁻, KIT^{low} と命名した。次にこの 3 分画の細胞についてサイトスピンを行い形態学的検討を行った。各分画に含まれる芽球の割合を見ると KIT^{high}, KIT^{low}, KIT⁻ それぞれ 44, 80, 51% で KIT^{low} 分画に最も多く含まれていた。また、KIT^{high} 細胞中 47% の細胞は分化した骨髓系細胞であり KIT⁻ 細胞中 49% の細胞はリンパ球と単球であった。また、CD34-KIT⁺ (low plus high) の検討も行ったが芽球は 8% しか含まれていなかった。

近年、CD34 陽性細胞中 CD38 陰性分画に最も未分化な血液前駆細胞 (幹細胞) が含まれていると報告されている⁸⁾。このためわれわれは 3 重染色を行い CD34 陽性細胞中の CD38 と KIT の発現について検討した。KIT^{low} 細胞は CD34 陽性細胞中 16% であったが CD34⁺CD38⁻ 細胞中では 36% 存在し、より未分化な細胞分画で KIT^{low} 細胞が enrich されていた。

Fig.1. Expression of KIT on CD34⁺ human bone marrow cells. Human bone marrow cells were stained with KIT (APC) and CD34 (FITC). For negative control, cells stained with APC conjugated MoAb against irrelevant antigen and anti-mouse IgG₁-FITC. CD34⁺ cells were divided into three fraction. Other 3 additional analyses showed the similar profiles.

2) FACS による分離細胞のメチルセルロース培養によるコロニー形成能の検討 (clonogenic assay)

3 種の各細胞分画につきコロニー形成能の検討 (CFU-GM, BFU-E/CFU-MIX) を行った (Fig.2). Epo と PHA-LCM の存在下で CD34⁺KIT^{high} 細胞

Fig.2. The number of colonies formed by CD34⁺KIT^{-/low/high} cells in the presence of PHA-LCM and Epo.

は 4 個に 1 個の細胞がコロニーを形成するのに対し、CD34⁺KIT^{low} 細胞は 7 個に 1 個の細胞がコロニー形成細胞であった。CD34⁺KIT⁻ は少数のコロニーしか形成せず、その 6 割が BFU-E 由来コロニーであった。CD34⁺KIT⁺ 細胞にはコロニー形成細胞は含まれていなかった。次に、各細胞分画に対する SCF や各種サイトカインの検討を行った。Fig. 3 に示すように、CFU-GM 由来コロニーについて見ると G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6 によるコロニーアッセイでは CD34⁺ 陽性細胞中 KIT^{high} でより多くのコロニーが形成された。また、この分画において、GM-CSF と SCF の組み合わせにより顕著なコロニー数の増加を見た。

逆に、BFU-E 由来コロニーについて見ると SCF によるコロニー数増加作用は CD34⁺ 陽性細胞中 KIT^{low} 分画で顕著に見られた (Fig.4)。

3) 分取した各細胞分画の骨髓長期培養系におけるコロニー形成能の維持

各細胞分画のストローマ上でのコロニー形成能の維持について見てみると、各々異なった生物学的特性を示した (Fig. 5)。まず、CD34⁺KIT⁻ 細胞はほとんどコロニー形成能の維持が見られなかった。また、2 週のコロニー形成能については、前と同様に CD34⁺KIT^{high} 細胞に多く認められたが、5 週から 9 週にかけてのコロニー形成能の維持は CD34⁺KIT^{low} 細胞分画で多くみられ、LTC-IC は KIT^{low} 分画に多く含まれているものと考えられた。また、4 週の長期培養後に KIT^{high} 細胞が KIT^{low} 細胞より出現して

Fig.3. Effect of SCF and various hematopoietic factors on colony formation by CD34⁺KIT⁻, CD34⁺KIT^{low} and CD34⁺KIT^{high} cells. Bars show the means and standard deviations of triplicate culture dishes. G : G-CSF, GM : GM-CSF.

Fig.4. Effect of SCF and Epo on colony formation by CD34⁺KIT⁻, CD34⁺KIT^{low} and CD34⁺KIT^{high} cells. Bars show the means and standard deviations of triplicate culture dishes.

くるのが確認された。

4) 抗 KIT 抗体によるストローマ上での造血維持の阻害

次に、血液前駆細胞とストローマとの相互作用における KIT の役割を検討するため、ストローマと CD34⁺KIT^{low} 細胞、CD34⁺KIT^{high} 細胞の共培養系に 2 µg/ml の抗 KIT 抗体を加えた。Fig.6 に示すように KIT 抗体は付着層のコロニー形成能を、KIT^{low} 分画で 62%、KIT^{high} 分画で 16% 抑制され、特に BFU-E 由来のコロニーの抑制が著明であった。

考 案

本研究において、われわれは新しい抗 KIT 抗体 (L6) を用い未分化な血液前駆細胞をふくむ CD34 陽性細胞を KIT⁻, KIT^{low}, KIT^{high} の三つに細分画した。以前の研究において、CD34 陽性細胞は約 2/3 の細胞が KIT を発現していると報告されているが^{9,10}、今回の検討において我々は新たに KIT^{low} の分画の存在を提唱した。

形態学的にみると、Broudy らは KIT⁺ 細胞が大型の芽球細胞であることを示したが、今回の検討にお

Fig.5. Colony forming cells generated by the total layers of long-term culture initiated with $CD34^{+}KIT^{-}$ cells, $CD34^{+}KIT^{low}$ cells and $CD34^{+}KIT^{high}$ cells. Each fraction was cocultured with allogeneic stromal cells for various periods. All of the non-adherent cells and adherent cells recovered from co-culture system were assayed for the incidence of colony-forming cells (CFC) per initial plated cells. The number of CFC per initial plated cells before the coculture were shown in Fig. 2. Additional two experiments showed the similar profiles to these representative data.

いて我々は芽球は KIT^{low} 分画に最も多く存在することを示した。さらに KIT^{low} 細胞は、最も未分化な血液前駆細胞（幹細胞）が存在すると考えられている $CD34^{+}CD38^{-}$ 分画⁸⁾に enrich されていた。これらの結果より KIT^{low} 分画は独立した細胞分画と考えられた。

つぎに、メチルセルロース培養を用いた血液前駆細胞（コロニー形成細胞：clonogenic assay）をみると、大部分の CFU-GM 由来コロニーは $CD34^{+}KIT^{high}$ 分画に存在していた。これらの結果は KIT^{+} 分画にコロニー形成細胞が存在するとして他グループの結果とも部分的には一致している⁹⁻¹²⁾が、 KIT^{+} 細胞を low, high に分けた検討は今回が初めてである。われわれはまた赤芽球前駆細胞は $CD34^{+}KIT^{low}$ 分画に多く含まれ、SCF による BFU-E 由来コロニーの増加作用も顕著であることを示した。

ここで、血液前駆細胞とストローマの共培養系（骨髓長期培養系）において、分化した前駆細胞は早期にコロニー形成能を失うのに対し、より未分化な前駆細胞（幹細胞を含む）は4週をこえてコロニー形成能を維持することがいわれ、Eaves らにより long-term culture initiating cells と命名されている^{13,14)}。これ

Fig.6. Effect of antibodies against KIT ($2 \mu g$) on the CFC recovered from adherent layers of coculture with stromal cells initiated with 1×10^3 $CD34^{+}KIT^{low}$ or $CD34^{+}KIT^{high}$ cells for 2 weeks.

ら非常に未分化な細胞が KIT を発現しているかどうかは非常に興味深い問題である。Bridle らは $CD34^{+}HLA-DR^{-}$ 細胞中 KIT 陽性細胞に BFU-Meg,

HPP-CFC, LTC-IC が存在することを示し, KIT が分化した前駆細胞とともに未分化な前駆細胞にも発現していることを示した¹⁰⁾. また, このことはマウスにおいて KIT 陽性細胞中に脾コロニー形成細胞や骨髓を再構築する細胞が含まれることも一致した^{15,16)}.

今回, われわれの, 骨髓長期培養を用いた検討において, さらに次の点が明らかになった. 1) 前および2週後のより分化している前駆細胞を評価しているコロニー形成能については CD34⁺KIT^{high} 分画に多く含まれていた. 2) 5週以降のコロニー形成能 (LTC-IC) について見てみると, CD34⁺KIT^{low} 分画に多く含まれていた. 3) KIT^{high} 細胞が KIT^{low} 細胞の長期培養中に出現してくることが確認された. これらのことより, KIT の発現は未分化前駆細胞の分化に伴い増加し, その後成熟に従って減少するものと考えられた. 以前, われわれはマウスの系において, 放射線照射後の骨髓移植を施行したマウスにおいて, 抗マウス KIT 抗体の *in vivo* の投与により day 8 の脾コロニー形成がほぼ完全に抑制されるのに対し, day 12 の脾コロニーは比較的保持されることを示したが¹⁶⁾, このことも比較的分化した細胞段階になってその増殖に KIT が重要な働きをしているものと考えられた. これらのことをつきつめると, 最も未分化な前駆細胞 (幹細胞) は KIT 陰性分画に存在するのではないかと考えられたが, 今回の骨髓長期培養系を用いた検討ではこの点については明らかにできなかった.

ヒトおよびマウスの造血において KIT とその ligand である SCF の相互作用が重要な働きを担っていると考えられているが^{9,17)}, マウス胎生期の血液幹細胞の増殖に SCF が必要ないことや¹⁵⁾, KIT/SCF 以外の機序が存在することが報告されている¹⁸⁾. さらに, いままでヒトの系においては, 血液前駆細胞とストローマの相互作用における KIT の機能については検討されていなかった. われわれは, 今回の検討において, 前駆細胞 (CD34⁺ 細胞) とストローマの共培養系に抗 KIT 抗体を加えることによりコロニー形成能の著明な低下を見ることを示し (データ未発表), また, この抑制が CD34⁺KIT^{high} 細胞より CD34⁺KIT^{low} 細胞で顕著にみられることを示し, これらのことより, KIT が血液前駆細胞とストローマとの相互作用に重要な働きをしているものと考えられた.

結 語

1) 骨髓長期培養系 および 新たに作製した抗 KIT

抗体を用いることにより血液前駆細胞 (CD34 陽性細胞) は3種類の細胞群に細分画された. 分化した血液前駆細胞 (CFC) は KIT^{high} 細胞分画に多く含まれ, 未分化な前駆細胞 (LTC-IC) は KIT^{low} 分画に多く含まれ, CD34⁺KIT^{low} 細胞により未分化な細胞が enrich されているものと考えられた. KIT⁻ 細胞には CFC, LTC-IC とほとんど含まれていなかった. 2) 抗体による阻害の実験よりストローマ上での造血の維持に KIT が重要な働きをしているものと考えられた.

文 献

- 1) Gunji Y., Nakamura, M., Hagiwara, K. *et al.* : *Blood*, **80**, 429 (1992)
- 2) Yamaguchi, Y., Gunji, Y., Nakamura, M. *et al.* : *Exp. Hematol.*, in press
- 3) Ema, H., Suda, T., Nagayoshi, K. *et al.* : *Blood*, **76**, 1956 (1990)
- 4) Ema, T., Suda, T., Miura, Y. *et al.* : *Blood*, **75**, 1941 (1990)
- 5) Iscove, N.N., Sieber, F. and Winterhalter, K.H. : *J. Cell. Physiol.*, **83**, 309 (1974)
- 6) Dexter, T.M., Moore, M.A.S. and Sheridan, A.P.C. : *J. Exp. Med.*, **145**, 1612 (1977)
- 7) Gunji, Y., Nagayoshi, K., Nakauchi, H. *et al.* : Human hematopoietic progenitor KIT^{low} cells are more primitive than KIT^{high} cells (submitted)
- 8) Terstappen, L.W., Haug, M.M.S., Safford, M. *et al.* : *Blood*, **77**, 1218 (1991)
- 9) Ashman, L.K., Cambareri, A.C., To, L.B. *et al.* : *Blood*, **78**, 30 (1991)
- 10) Briddle, R.A., Broudy, V.C., Bruno, E. *et al.* : *Blood*, **79**, 3159 (1992)
- 11) Broudy, V.C., Lin, N., Zsebo, K.M. *et al.* : *Blood*, **79**, 338 (1992)
- 12) Papayanopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C. *et al.* : *Blood*, **78**, 1403 (1991)
- 13) Andrew, R.G., Singer, J.W. and Bernstein, I.D. : *J. Exp. Med.*, **169**, 1721 (1989)
- 14) Sutherland, H.J., Eaves, C.E., Eaves, A.C. *et al.* : *Blood*, **74**, 1563 (1989)
- 15) Ikuta, K. and Weissman, I.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1502 (1992)
- 16) Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K. *et al.* : *Blood*, **78**, 1706 (1991)
- 17) Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S. *et al.* : *J. Exp. Med.*, **174**, 67 (1991)
- 18) Kodama, H., Nose, M., Yamaguchi, Y. *et al.* : *J. Exp. Med.*, **176**, 351 (1992)