

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15366

研究課題名(和文) シングルセル統合解析による新規間葉系幹細胞の同定と造血制御能の解明

研究課題名(英文) Identification of novel MSCs with hematopoiesis supporting capacity

研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa, Kentaro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90569584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シングルセル網羅的遺伝子発現解析によって骨内膜由来の骨芽細胞分画(AL+)中に造血ニッチ分子を高発現し、 $\alpha 8$ -integrin (Itga8)を特異的に発現する亜集団(Itga8+AL+)の存在を明らかにした。次にこの細胞の遺伝子発現プロファイルを既知の骨髄間葉系幹細胞や内骨膜由来間葉系幹/前駆細胞と比較したところ、どちらにも含まれない様式であることが分かった。またIn vitro培養系の解析から、Itga8+AL+細胞は高い分化能・増殖能を示すことから、従来とは性質の異なる間葉系幹/前駆細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found a subpopulation of osteoblast fraction (AL+) derived from endosteum by single cell gene expression analysis. This sub-fraction highly expressed hematopoietic niche factors and specifically expressed $\alpha 8$ -integrin (Itga8). To clarify the characteristics of Itga8+AL+ cells, we compared gene expression profiles of Itga8+AL+ cells with known bone marrow mesenchymal stem cells and mesenchymal stem/progenitor cells derived from endocardium, and it was found that expression pattern of Itga8+AL+ cells was not included in either. Analysis of the in vitro culture system showed Itga8+AL+ cells had highly differentiation ability and proliferation potential. Although AL+ fraction has been recognized as a population of osteoblast, these results suggest that AL+ fraction contains mesenchymal stem/progenitor cells expressing Itga8 with different character from BM MSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 間葉系幹細胞 ニッチ 骨芽細胞 骨内膜

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は造血微小環境“ニッチ”において中心的なニッチ細胞であり、造血幹細胞と間葉系幹細胞の相互作用が骨髄造血を維持するために非常に重要であることが明らかとなっている。しかしながら、間葉系幹細胞は均質ではなく、造血幹細胞と比べて、指標となる細胞表面マーカーが少ないため選択的単離は難しく、基本的な生物学的特性について不明な点も多い。

骨髄内には造血幹細胞のニッチに関しては、これまでに血管周囲のニッチと骨内膜表面のニッチが同定されている。特に血管周囲のニッチでは、細動脈周囲の NG2 陽性細胞 (Kunisaki et al. 2003)、類洞血管周囲の Leptin 受容体陽性細胞 (Zou et al. 2014) が間葉系幹細胞として造血幹細胞の制御に機能していることが報告されている。一方、申請者らのグループは骨内膜領域の細胞について解析を行い、骨内膜ニッチが間葉系前駆細胞 (Alcam-Sca-1+CD31-CD45-Ter119-分画 ; Sca1+)、骨芽細胞分画 (Alcam+Sca-1-CD31-CD45-Ter119-細胞 ; AL+) によって構成されることを示した。さらに AL+細胞の中に、造血ニッチ分子を高発現し、さらに Pou5f1、Nanog などの多能性幹細胞マーカーを高発現している特殊な亜集団が存在することを見出している (Nakamura et al. 2010)。さらに最近、Sca1+分画には多能性幹細胞マーカーの1つである SSEA1 を高発現する分画があることを見出した。これらの結果から、AL+細胞と Sca-1+SSEA1(high)細胞は新規骨髄間葉系幹細胞を同定する上で重要な候補と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、AL+細胞と Sca-1+SSEA1(high)細胞を対象として以下の点について研究を行い、造血制御における間葉系幹細胞の機能を明らかにする。

シングルセルレベルの網羅的 mRNA・タンパク発現を解析し、新規骨髄幹細胞を同定し、その特性について既知の間葉系幹細胞との違いを明らかにする。

新規骨髄幹細胞に特異的な細胞表面マーカーを明らかにすることにより、新規間葉系幹細胞を分離し、その分化能を明らかにする。

新規骨髄幹細胞の骨髄内局在および造血幹細胞との位置関係の解析、さらには造血支持能を解析することにより、ニッチ細胞としての性質 (静止期維持能/増殖支持能) を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) シングルセル解析による新規骨髄幹細胞とその特異的な細胞表面分子の同定:

ALCAM+Sca-1 - SSEA1(low)、Sca-1+SSEA1(high)、ALCAM-Sca-1+ の3分画とさらに ES 細胞を対象とし、多能性幹細胞および間葉系幹細胞に特異的な転写因子、サイトカイン受容体、接着分子など細胞表面分子の発現をシングルセル定量 PCR アレイで解析した。また、骨芽細胞マーカー、血管内皮細胞マーカー、その他のニッチ細胞マーカーの発現についても陰性コントロールマーカーとして検討した。

(2) 内骨膜領域の間葉系細胞 (CD45-CD31-TER119-細胞) から Sca1+および AL+細胞を分画し、さらに AL+細胞を 1) の検討で見出した a8-integrin (Itga8) の発現を基準に分画し、それぞれをシングルセル単位で網羅的な遺伝子発現解析 (シングルセル定量 PCR アレイ) を行う。シングルセル定量 PCR アレイ解析のターゲット遺伝子としては、多能性幹細胞マーカー、間葉系幹細胞マーカー、骨芽細胞・血管内皮細胞ニッチ細胞マーカーに加え、造血幹細胞の静止期維持と増殖の制御に関わるニッチ分子を用いる。またこの時、遺伝子発現プロファイルを主成分解析にて比較するため、比較対象として既知の骨髄由来間葉系幹細胞 (LeptinR+CD140a+CD51+CD45-CD31-TER119-; BMSCs) を同時に解析した。

(3) Itga8+AL+細胞の骨組織中における局在を明らかにするため、マウス大腿骨・脛骨を骨端部と骨幹部に分離し、それぞれから得られる AL+細胞中の Itga8+の割合を FACS により比較した。さらに、詳細な局在位置の解析のため、骨/骨髄組織内部における Itga8+AL+細胞の局在をイメージングによって解析した。

(4) Itga8+AL+細胞の多分化能と増殖能が BMSCs と比較してどう違うかを明らかにするため、in vitro 培養系を用いて解析した。多分化能に関しては骨・軟骨・脂肪の3系統への分化能を有することをそれぞれの分化誘導によって定性解析した。また、増殖能に関しては間葉系幹細胞培養培地で 1-2 週間培養し、細胞数を算定した。

4. 研究成果

(1) AL+Sca-1-SSEA1(low)、Sca-1+SSEA1(high)、AL-Sca-1+ の3分画とさらに ES 細胞を対象とし、多能性幹細胞および間葉系幹細胞に特異的な転写因子、サイトカイン受容体、接着分子など細胞表面分子、さらに陰性コントロールマーカーとして骨芽細胞マーカー

一、血管内皮細胞マーカー、その他のニッチ細胞マーカーの発現についても発現をシングルセル定量 PCR アレイで解析した。その結果、AL+Sca-1-SSEA1(low)細胞の一部に Pou5f1、Nanog 陽性細胞を見出し、この細胞集団で N-cadherin、Itga8 が特異的に発現していることを明らかにしている。これらの結果から、N-cadherin 抗体あるいは Itga8 抗体またはこれら 2 つの抗体を組合せることにより、新規骨髄幹細胞をより選択的に分離出来ると考えられた。

- (2) (1)で得られた結果から、抗 Itga8 抗体を用いた染色を組合せて Itga8 の発現量を指標に AL+分画を 2 つに分離するため、FACS による分離法を確立した。この方法では AL+分画のうち 20.3 ± 5.34% が Itga8 陽性であることが明らかになった。この方法を用いて分離した Itga8+AL+細胞の遺伝子発現プロファイルを、既知の BMMSCs や Sca-1+分画とシングルセル定量 PCR アレイで比較したところ、どちらにも含まれない発現様式であることが明らかになった。このことから、従来骨芽細胞分画だと考えられてきた AL+分画中には、既知の間葉系幹/前駆細胞とは異なる骨髄幹細胞が存在し、これが造血ニッチ分子を高発現する細胞であることから造血支持能を示すことが示唆された。
- (3) Itga8+AL+細胞の骨組織中における局在を明らかにするため、マウス大腿骨・脛骨を骨端部と骨幹部に分割し、それぞれから得られる AL+細胞中の Itga8+の割合を FACS により比較した。すると Itga8+AL+細胞は主に骨端部で検出され、骨幹部では極めて少ないことが明らかになった。また、骨/骨髄組織内部における Itga8+AL+細胞の局在をイメージングによって解析したところ、骨端部の一部の内骨膜領域に存在を確認することができた。
- (4) Itga8+AL+細胞の多分化能を定性解析するため、FACS によって分離し、分化誘導培養を行った。このとき同時に Itga8-AL+細胞および BMMSCs についても分離・培養を行い比較対象とした。その結果、Itga8+AL+細胞は BMMSCs と同様に骨・軟骨・脂肪の 3 系統への分化能を有することが示された。一方で Itga8-AL+細胞は骨・軟骨の 2 系統のみの分化能を示すことが分かった。一方で増殖能に関して、Itga8+AL+細胞は BMMSCs Itga8-AL+細胞やよりも高い増殖能を示すことが明らかになった。

以上の結果から、従来 AL+分画は骨芽細胞の集団として認識されてきたが、本研究により Itga8 を発現する間葉系幹/前駆細胞が含まれることが示唆された。また、現在この細胞の造血支持能を解析するため、造血幹細胞との共培養・骨髄移植の実験を行っている。

今後この研究が進展することにより、骨髄における造血幹細胞の支持機構の新たな知見が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, Ogawa M. Determining c-Myb Protein Levels Can Isolate Functional Hematopoietic Stem Cell Subtypes. Stem Cells. 33 (2):479-90., 2015 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

[国内学会・シンポジウム等における発表(いずれも査読あり)]

- (1) Kentaro Hosokawa, Ben. D. Macarthur, Shigemasa Hanazawa, Toshio Suda and Fumio Arai: Protection of telomeres 1 (Pot1) regulates hematopoietic stem cell activity during ageing. 第 77 回日本血液学会学術集会(金沢)平成 27 年 10 月

[国際会議における発表(いずれも査読あり)]

- (1) Kentaro Hosokawa, Ben. D. Macarthur, Shigemasa Hanazawa, Toshio Suda, Fumio Arai: Protection of telomeres 1 (Pot1) regulates hematopoietic stem cell activity during ageing. ISEH 44th Annual Scientific Meeting. Kyoto, Japan, September, 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa Kentaro)
九州大学大学院・医学研究院・助教
研究者番号：90569584

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()