

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19645

研究課題名(和文)造血幹細胞の分化多能性維持とmidbodyの動態

研究課題名(英文) Maintenance of multipotency of hematopoietic stem cells and distribution of midbody

研究代表者

田中 洋介(Tanaka, Yosuke)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10509087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の非対称分裂とmidbodyの非対称分配との関係性を調べるために本研究を行った。MidbodyのマーカであるMgcRacGAP(MRG)とhmKu02融合タンパク(MRG-hmKu02)をmidbody蛍光マーカーとしてレポーターマウス作製を計画したが、未だ作製中である。レトロウイルスベクターを用いてMRG-hmKu02を遺伝子導入した造血幹細胞を培養し、in vitroにおける造血幹細胞から成熟細胞への細胞系譜とmidbodyの継承・非継承との関係性を検証し、Midbodyを非継承した娘細胞はmidbodyを継承した娘細胞よりも分化多能性を維持している傾向があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の肝であったレポーターマウスの作製が難航し研究目標達成には至らなかったが、レトロウイルスベクターによりmidbodyマーカーを導入した造血幹細胞を用いた研究において、細胞分裂におけるmidbodyの継承は細胞の分化運命に影響を与えること、midbodyを継承した娘細胞はmidbodyを継承しなかった娘細胞と比べて細胞分裂・分化が抑制されることを明らかにした。今回の結果は、細胞分裂におけるmidbodyの継承の有無がその後の細胞の分化運命に影響を与えることを初めて実験的に示したものであり、学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to reveal relationships between asymmetric cell division of hematopoietic stem cells(HSCs) and asymmetric distribution of Midbody. We planned to generate a midbody reporter mouse line using fusion protein between MgcRacGAP(MRG; a midbody marker) and hmKu02, but it is still ongoing. We also examined relationships between maintenance of multipotency of HSCs and asymmetric distribution of midbody in vitro using HSCs retrovirally transduced with MRG-hmKu02 and found that daughter cells that released midbody tended to maintain their multipotency after cell divisions.

研究分野：幹細胞学

キーワード：造血幹細胞 非対称分裂 midbody

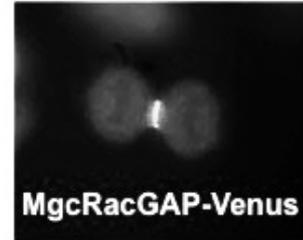
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は対称分裂 (2 個の幹細胞あるいは 2 個の分化した細胞) あるいは非対称分裂 (1 個の幹細胞と 1 個の分化した細胞) するが、細胞分裂と多能性維持との詳細な関連性は不明である。細胞分裂の際、midbody は娘細胞に非対称に継承されるか放出される。非対称に継承された場合は、その細胞分裂は非対称分裂と考えられる。一般的に、造血幹細胞は対称・非対称分裂をすることで造血幹細胞プールを維持していることが知られている。そこで、申請者は、midbody の非対称継承を利用して、造血幹細胞の対称・非対称分裂を可視化できないかと考えた。これまでに、造血幹細胞の対称・非対称分裂を生体内で観察した報告はない。目的達成のためには、**対称・非対称分裂を識別できるマーカーと造血幹細胞の 4D イメージング**が必要である。

対称・非対称分裂を識別できるマーカー

申請者の研究室では以前に midbody のマーカーとして midbody の構成要素のひとつである MgcRacGAP (Male germ cell Rac GTPase activating protein) を報告している (Minoshima Y. et al, Dev. Cell, 2003)。右図のように MgcRacGAP-mVenus 融合タンパクにより、midbody をライブイメージングすることが可能である (Nishimura K. et al, PLoS One, 2013)。



造血幹細胞の 4D イメージング

これまで、骨髄をライブイメージングすることは不可能と考えられてきたが、2 光子励起顕微鏡を利用することにより骨髄を生きたままの状態を観察することが可能になった (Ishii M et al, Nature 2009)。問題は 2 光子励起顕微鏡観察に利用可能な造血幹細胞特異的なプローブがないことであるが、造血幹細胞を外に取り出すことは容易であり、それを蛍光ラベルし、もう一度骨髄移植することでこの問題を解決できる。

したがって、MgcRacGAP 蛍光プローブを対称・非対称分裂を識別できるマーカーとして確立できれば、目的達成は可能である。このように考え、現在、血液細胞特異的に MgcRacGAP 蛍光プローブを発現するマウス (MgcRacGAP-hmK02 マウス) を作製中である。

2. 研究の目的

本研究では、造血幹細胞が対称・非対称分裂する際に midbody が一方の娘細胞に継承されるか、あるいはいずれにも取り込まれずに放出されるかを観察し、それぞれの場合において娘細胞が多能性を維持しているかどうかを検証することで、midbody の対称・非対称分裂マーカーとしての利用を模索する。具体的には、細胞分裂後の造血幹細胞のシングルセル RNASeq 解析を行い、midbody を継承した娘細胞と、継承しなかった娘細胞、さらに、midbody を放出した際の娘細胞の全遺伝子発現を定量し比較することで、非対称性を確認すると同時に非対称に発現する遺伝子をピックアップする。また、これらの 3 つの細胞について致死量放射線照射したマウスに骨髄移植することで、幹細胞の多能性を維持しているかどうかを確認する。最終的に midbody を非対称分裂マーカーとして in vivo で造血幹細胞の対称・非対称分裂をライブイメージングし、骨髄ニッチと造血幹細胞の対称・非対称分裂との関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

造血幹細胞の対称・非対称分裂時における midbody の継承・放出と娘細胞の多能性維持・分化との関連性明らかにするために、以下の研究を行う。

造血幹細胞が細胞分裂する際に、midbody を継承あるいは放出するという現象と娘細胞の多能性維持・分化とがどのような関係にあるかを in vitro で検証する。

MgcRacGAP-hmK02 マウスにおける hmK02 発現パターンを解析する。具体的には、造血幹細胞のソーティングに用いる CD150, CD48, cKit, Sca-1, Lineage markers で骨髄単核球分画を染色し、フローサイトメトリ解析を行い、正常造血がどうかを確認する。次に、このマウスから造血幹細胞を回収し、致死量放射線照射マウスに移植することで、造血幹細胞の多能性を確認する。ここで問題になるのは MgcRacGAP-hmK02 は細胞周期依存的に主に S/G2/M 期に発現するので、定常状態において 90% 以上が細胞周期の G0 期にある造血幹細胞における hmK02 の発現を確認することは困難である。そこで、このマウスに LPS や polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) を投与することで、造血幹細胞にストレスを与え細胞周期に入らせることにより、hmK02 の発現を確認する。また MgcRacGAP が細胞周期依存的ユビキチン-プロテアソーム系により適切に分解制御を受けているかどうかを確認する。

- ① MgcRacGAP-hmK02 マウスから造血幹細胞をソートし、多能性維持培地 (無血清培地 + SCF&TPO) あるいは分化培地 (無血清培地 + SCF& IL-3) で 48 時間培養し、タイムラプスライ

ブイメーシング(Nikon Biostaion IM)を行い、細胞分裂の際の midbody の継承・放出の割合を比較する。

- ② MgcRacGAP-hmK02 マウスから造血幹細胞をシングルセルソートし、多能性維持培地(無血清培地+SCF&TPO)あるいは分化培地(無血清培地+SCF&IL-3&IL-6&EPO&TPO)で Paired Daughter Cell(PDC) assay を行う。多点タイムラプス撮影装置(Nikon Biostaion CT)を使い造血幹細胞が分裂したウェルを識別し、48 時間培養後、その間に分裂した娘細胞をコロニーアッセイ培地に移し、それぞれの娘細胞のコロニー形成能を比較する。一部の娘細胞はさらに PDC assay を行なう予定である。
- ③ PDC assay から回収した娘細胞のシングルセル RNA-Seq 解析を行う。RNA-Seq ライブラリー作製と RNA-Seq 解析は共同研究先で行う。これにより、造血幹細胞の対称・非対称分裂と midbody の関連性をシングルセル遺伝子発現データより明らかにする。
- ④ MgcRacGAP-hmK02 マウス造血幹細胞・前駆細胞あるいはヒト臍帯血由来の CD34⁺造血幹細胞・前駆細胞にレトロウイルスを用いて MLL-AF9 を過剰発現させて造血器腫瘍化し、正常造血幹細胞・前駆細胞と造血器腫瘍細胞における midbody の継承・放出の違いを *in vitro* で検証する。マウス造血器腫瘍細胞については放射線照射したマウスに移植後、骨髓微小環境における midbody の継承・放出の割合を検証することも視野に入れて研究を行う。
- ⑤ MgcRacGAP-hmK02 マウスと G₀ マーカーマウス (mVenus-p27K⁻)、細胞周期マーカー(Fucci)マウスや骨髓ニッチマーカーマウス (CXCL12-GFP マウス (CAR 細胞 (CXCL12 を高発現する細網細胞)), Coll1a1-ECFP マウス (骨芽細胞)、a3-GFP マウス (破骨細胞)) とのかけあわせを開始する。

造血幹細胞が分裂する際に、midbody を継承するかあるいは放出するかを指標として、娘細胞の多能性維持・分化と骨髓ニッチにおけるその局在との関係を解明する。

MgcRacGAP-hmK02 マウス骨髓における造血幹細胞の midbody を 2 光子励起顕微鏡によりライブイメーシングする。2 光子励起顕微鏡下で、造血幹細胞の midbody を識別できるかが本実験の肝であるが、その下準備として、まず平成 29 年度に MgcRacGAP-hmK02 の造血幹細胞を移植しておいた野生型マウスの骨髓の 2D イメーシングを行う。これにより、“hmK02 の輝度は十分か?” や “どのくらいの頻度で観察フレームに造血幹細胞が入ってくるか?” を共焦点顕微鏡により確認する。また、造血幹細胞のマーカー (CD150 や cKit や Sca-1) で染色を行い hmK02 シグナルとこれらのマーカーの局在が一致しているかどうかを評価する。本実験は、この手法の専門家である大阪大学免疫細胞生物学教室の水野助教との共同研究で行う予定である。具体的には、2 光子励起顕微鏡によるライブイメーシングにより以下のことを明らかにする。

- ① MgcRacGAP-hmK02 マウスの造血幹細胞を細胞分裂をカウントできる CFSE 蛍光色素でラベルしてから致死量放射線マウスに骨髓移植する。CFSE のシグナルは、細胞分裂ごとに減弱するが、造血幹細胞はほとんど分裂しないので、~1 ヶ月は検出可能である。
- ② MgcRacGAP-hmK02 マウスと細胞周期マーカーマウス (mVenus-p27K⁻マウス、Fucci マウス) とのかけ合わせにより MgcRacGAP-hmK02 融合タンパクが細胞周期依存的な分解制御を受けているかを確認した後、造血幹細胞分裂時の midbody の継承・放出を観察する。
- ③ 骨髓ニッチの違いによる造血幹細胞の細胞分裂時における midbody の継承・放出に与える影響について、平成 29 年度に交配したマウスを使って解析する。
- ④ 平成 29 年度の⑤の研究の続きとして、正常骨髓ニッチと向腫瘍性骨髓ニッチとにおける造血幹細胞・前駆細胞の midbody の継承・放出を観察し、その違いから治療に役立つ新しい知見を探索する。
- ⑤ 平成 29 年に行うシングルセル遺伝子発現解析のデータから新規の対称・非対称分裂マーカーを探す。

4. 研究成果

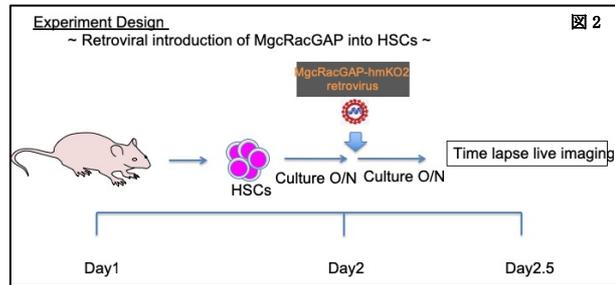
初年度は MRG-hmKu02 マウスの作製・解析を中心に研究を行なったが、MRG-hmKu02 の蛍光がフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で検出限界以下であることが判明した。そこで、当初の予定を変更し、新しく改良した MRG-hmKu02 マウスの作製と野生型マウスから採取した造血幹細胞にレトロウイルスベクターにより MRG-hmKu02 を遺伝子導入する系を用いて研究を行なった。

新しい MRG-hmKu02 マウスの作製

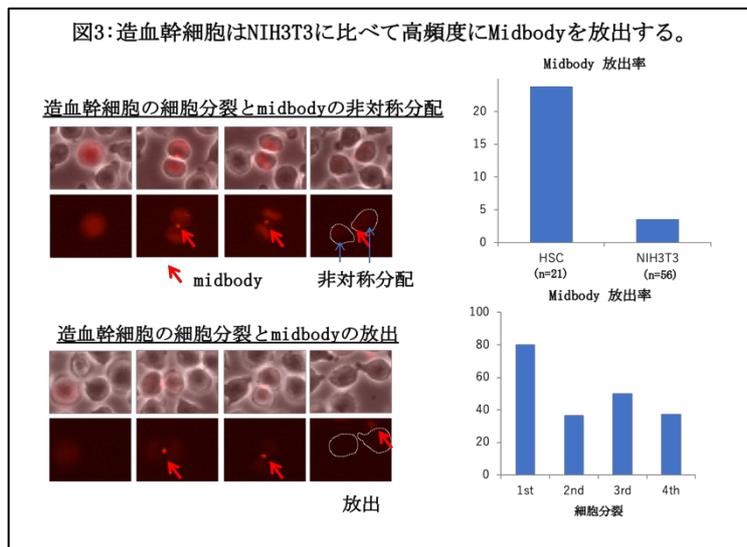
作製に失敗した MRG-hmKu02 マウスは Rosa26 遺伝子座に MRG-hmKu02 を loxP-Stop-loxP カセットの下に導入したものであり、Cre 誘導型であった。後述するが、MRG 自体が一部であるが過剰発現により細胞分裂を阻害することが判明したため、新しいマウスの作製は、MRG の遺伝子座の MRG の最後のエキソンの後に蛍光タンパクをノックインすることで、内在性の MRG を蛍光プローブとして利用することにした。現在、ターゲティングベクターの構築が完了、ES 細胞の相同組み換えクローンを選定中である。クローン選定後に ES 細胞において Midbody が可視化できるかどうかを検証予定である。

レトロウイルスによって遺伝子導入した造血幹細胞を用いて解析

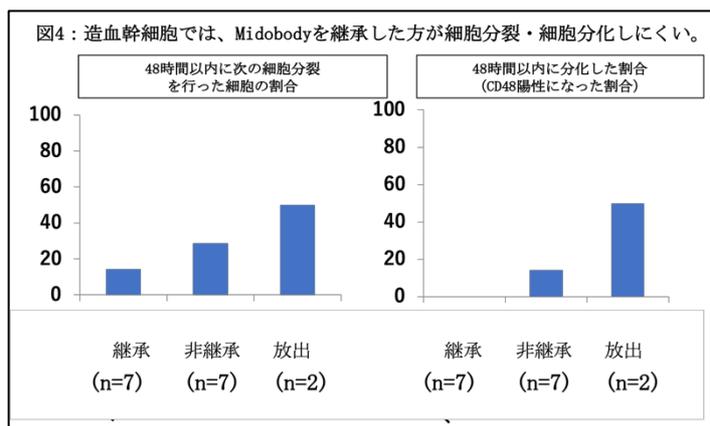
野生型マウスより造血幹細胞（骨髄細胞の CD150+, CD48-, cKit+, Sca1+, Lineage marker negative 分画）を採取し、造血幹細胞維持培地 (StemSpan SFEM II, 50ng/mL human TPO, 50ng/mL mouse SCF) 中で一晚培養後レトロウイルスにより MRG-hmKu02 を遺伝子導入した。遺伝子導入後 12 時間後に MRG-hmKu02 の発現が検出できることを確認できたので、遺伝子導入 12 時間後からタイムラプスライブセルイメージングを開始した (図 2)。



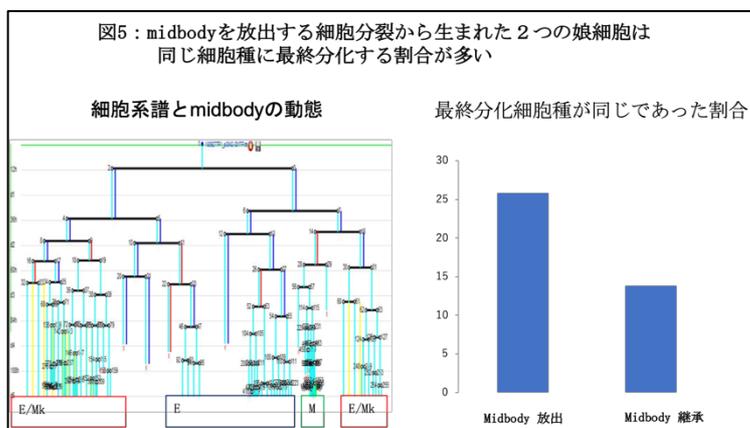
1 回目の細胞分裂時の midbody の動態を観察したところ、NIH3T3 細胞株と比較して高頻度に midbody を放出することが判明した。4 回目の細胞分裂までの midbody の動態を観察したところ、2 回目以降の細胞分裂では midbody を放出、継承する割合は同等であった (図 3)。このことから、幹細胞は midbody を高頻度に放出することが明らかになった。



次に、1 回目の細胞分裂後の娘細胞が 48 時間以内に 2 回目の細胞分裂をした割合、さらに分化マーカーである CD48 を発現する割合を調べたところ、midbody を放出する細胞分裂によって生まれた娘細胞の方が、midbody を継承する細胞分裂によって生まれた midbody を継承した娘細胞と midbody を継承しなかった娘細胞よりも 2 回目の細胞分裂をする割合、CD48 分化マーカーを発現する割合とも多いことが判明した (図 4)。このことから、midbody を継承しなかった娘細胞は分化・増殖しやすい傾向があることが判明した。このことは、midbody を継承した娘細胞は分化・増殖しにくい、つまりより幹細胞らしいことが示唆している。



本培養系において赤血球系 (E)、巨核球系 (Mk)、骨髄球系 (M) を識別できる抗体を培養液に添加しておくことにより、造血幹細胞がいずれの細胞を生み出したかを追跡することが可能である。図 5 に一例を挙げるが、最終分化までの細胞分裂系譜を書くことにより midbody の継承・放出と最終分化した細胞を調べることができる。そこで、造血幹細胞の多分化能と midbody の継承・放出との関係性を検証したところ、midbody を放出する細胞分裂から生まれた 2 つの娘細胞は同じ細胞種に最終分化する割合が多いことが判明した。このことは、midbody の継承という事象が細胞の分化運命に影響を与えていることを示している。



今回の研究から midbody の継承が細胞の分化運命に影響を与えることが判明したが、造血幹細胞の細胞分裂において midbody を継承した方が細胞分裂・分化しにくという一見矛盾する結果も得ていることから、幹細胞と前駆細胞では midbody の継承という影響が異なる可能性も示唆されている。今回の研究結果は、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入系であるために真の造血幹細胞の評価とまではいかなかったが、新しいノックインマウスの作製が完了し次第、本実験の再評価と in vivo の実験を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

該当なし

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 発表者: 田中洋介
発表タイトル: 造血幹細胞の非対称分裂と Midbody の非対称分配
学会名: 日本血液学会
発表年: 2017 年
- ② 発表者: 田中洋介
発表タイトル: Asymmetric Cell Division of Hematopoietic Stem Cells and Asymmetric Distribution of Midbody
学会名: 第 15 回幹細胞シンポジウム
発表年: 2017 年
- ③ 発表者: 田中洋介
発表タイトル: Asymmetric Cell Division of Hematopoietic Stem Cells and Asymmetric Distribution of Midbody
学会名: MBSJ2017
発表年: 2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。