

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度

課題番号：19591148

研究課題名 (和文) 組織幹細胞間の比較による幹細胞共通分子の探索と血液学的機能解析

研究課題名 (英文) Identification of the common factors specific for tissue stem cells and the functional analysis of them

研究代表者 浜口 功

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究者番号：90348780

研究成果の概要：

生殖幹細胞に特異的に発現する遺伝子のうち 7 分子 (Fth1, Cryab, Spp1, Bcap31, Arhgap1, Ctla2a, Serpina3g) が造血幹細胞にも特異的に発現していることを定量 PCR 法により明らかにした。またこれらの分子について、組織学的解析を行った結果、毛根部の幹細胞領域と思われるバルジ部位に特異的に発現している遺伝子として、Spp1 を同定した (Takuo Mizukami et al, Stem cell & Dev., 17:67-80, 2008)。このことは、多くの体性幹細胞において、幹細胞機能に深く関与していることが示唆された。同定された Spp1 遺伝子の機能を解析するため、Spp1 遺伝子欠損マウスを入手し、血液学的解析を行った。これまでのところ、Spp1 欠損マウスにおいて、造血幹細胞の激的な増加が、ニッチと考えられている骨内膜とは異なる部位で出生後 4 週まで続くことが観察している。Spp-1 がニッチにおいて未分化性維持を負に制御しているのではないかと考えられる。

さらに、生殖幹細胞に発現する HE4 (Homo sapiens epididymis-specific) がマウス造血幹細胞 (CD34 陰性 KSL 細胞) に特異的に発現しており、発現量は β -actin との発現量の 0.01 倍であり、Ta11 (造血幹細胞特異的転写因子) の 1000 倍の発現量であることを明らかにした。またヒト CD34 陽性 CD38 陰性分画でも特異的に発現しており、 β -actin との発現量の 0.003 倍であった。これまでに HE4 には WAP (whey scidic protein) domain が含まれており、他の類似分子の機能から、プロテインインヒビターであることが想定されるが、幹細胞特異的分子としての機能に関与していることも想定される。トランスジェニックマウスの作出を行い、血液学的機能解析を継続して行っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,800,000	0	1,800,000
平成 20 年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学

1. 研究開始当初の背景

ポリコム蛋白の Bmi-1 は、造血幹細胞の自己複製に必須の分子であるとともに、神経幹細胞や生殖幹細胞でも重要な働きをしていることも明らかとなった。このように1つの分子が複数の組織幹細胞で共通に発現し、細胞種を超えた幹細胞に特異的な機能に関与するものがあると想定される。この様な幹細胞に共通の機能分子に着目して、幹細胞の解析を推進させることは、幹細胞の本質的な理解につながるばかりでなく、幹細胞を用いた様々な治療の開発および応用に十分な科学的根拠を提供できると考えられる。近年では「がん」の発生においても幹細胞の存在が議論されつつある。慢性骨髄性白血病（CML）において、「がん幹細胞」がその発生・増殖機構に深く関与していると考えられている。正常幹細胞の制御機構の解明ががん発生のメカニズムの理解を増進し、治療戦略の開発をさらに推進しうると考えられた。

2. 研究の目的

これまでに幹細胞に共通に発現する分子

の同定がいくつかの研究グループから報告されているが、いずれもその比較対象に胎性幹細胞をおいていた。組織幹細胞と胎性幹細胞ではその分化レベルにおいてもかなりの差があり、未分化性維持のメカニズムにも大きく異なる点がある。申請者は胎性幹細胞の発現遺伝子を排除して検討することにより、組織幹細胞において特異的に機能する共通の分子の探索が可能であろうと考えた。この操作を加えることにより、これまで報告されてきた遺伝子群とは異なる新たな遺伝子群が探索する。さらに候補遺伝子の機能解析を行い、幹細胞の本質的な理解を深めるとともに、幹細胞を用いた様々な治療の開発および応用に十分な科学的根拠を提供する。

3. 研究の方法

胎性幹細胞と生殖幹細胞とさらに分化した生殖細胞の3者の中で発現遺伝子のサブトラクションを行い、生殖幹細胞にのみ発現する遺伝子群の同定を行なう。

本研究課題ではこれらの遺伝子の絞り込みを、リアルタイム PCR を用いて造血幹細胞分画での遺伝子発現を指標に行なう。また造血幹細胞の局在は、骨髓切片を用い

た組織学的解析によって行なった。組織学的解析のために、非脱灰骨髄を用いた *in situ hybridization* (ISH)法を用い、遺伝子発現細胞が造血のニッチと考えられている骨髄内の骨端領域の辺縁部で骨芽細胞と接しているかどうかを解析した。さらに、同定された幹細胞分子については、トランスジェニックマウスを用いて機能解析を行なった。

4. 研究成果

生殖幹細胞より高純度に RNA を精製し、高効率サブトラクションを 3 回連続で行い、得られた遺伝子断片をライブラリー化し、256 クローンを単離した。その内の 51 クローンのシーケンス解析を行い 49 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子発現を RT-PCR 法によって定量化したところ、49 遺伝子のうち生殖幹細胞に特異的に発現している 11 分子を同定した。このうち 7 分子 (Fth1, Cryab, Spp1, Bcap31, Arhgap1, Ctla2a, Serpina3g) が造血幹細胞にも特異的に発現していることを定量 PCR 法により明らかにした。またこれらの分子について、組織学的解析を行った結果、毛根部の幹細胞領域と思われるバルジ部位に特異的に発現している遺伝子として、Spp1 を同定した (Takuo Mizukami et al, Stem cell & Dev., 17:67-80, 2008)。このことは、多くの体性幹細胞において、幹細胞機能に深く関与していることが示唆された。さらに *in situ hybridization* 法により大腿骨骨梁部の骨内膜での局在など、未分化性維持に深く関わっているとされるニッチとの関係を明らかにしつつある。

一方で Spp1 遺伝子欠損マウスを入手し、機能解析を開始した。これまでのところ、Spp1 欠損マウスにおいて、造血幹細胞の

激的な増加が、ニッチと考えられている骨内膜とは異なる部位で出生後 4 週まで続くことが観察している。Spp-1 がニッチにおいて未分化性維持を負に制御しているのではないかと考えられる。

さらに、生殖幹細胞に発現する

HE4 (Homo sapiens epididymis-specific) がマウス造血幹細胞 (CD34 陰性 KSL 細胞) に特異的に発現しており、発現量は β -actin との発現量の 0.01 倍であり、Tal1 (造血幹細胞特異的転写因子) の 1000 倍の発現量であることを明らかにした。またヒト CD34 陽性 CD38 陰性分画でも特異的に発現しており、 β -actin との発現量の 0.003 倍であった。これまでに HE4 に WAP (whey acidic protein) domain が含まれており、他の類似分子の機能から、プロテインインヒビターであることが想定されるが、幹細胞特異的分子としての機能に関与していることも想定される。HE-4 の発現様式を明らかにするために、HE-4 のゲノム DNA を単離し、HE4 のプロモーター領域 (5kb) に EGFP 遺伝子をつないだコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスの作出を試みている。これまで造血幹細胞は複数の抗原分子の組み合わせにより純化されているが、本研究により、HE4 分子が造血幹細胞に特異的に高発現しており、トランスジェニックマウスにおいて造血幹細胞をマーキングでき、造血幹細胞の未分化性維持のメカニズム解明にも大いに役立つものと考えられる。また特定した HE4 プロモーター領域が造血幹細胞特異的であることが明

らかにされれば、造血幹細胞特異的な遺伝子発現調節が可能となることが想定される。

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 5 件)

Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I*, and Yamaguchi K: Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germline stem cells.

Stem Cell & Dev., 17: 67-80, 2008.

(* corresponding author)

Kuramitsu M, Hamaguchi I*, Mizukami T, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K: Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells.

Brit. J. Haematol., 140: 348-359, 2008.

(* corresponding author)

Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J, Karlsson S: RPS19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia.

Stem Cells, 26: 323-329, 2008.

Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A: Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity

Stem Cells, 26: 3237-3246, 2008

Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall WW, Tsujimoto H, Hamaguchi I*, Yamaguchi K: Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T- cell leukemia / lymphoma (ATL).

Blood, in press

(* corresponding author)

[学会発表] (計 5 件)

Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Mochizuki M, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I, Yamaguchi K

Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germline stem cells. -Sppl (Secreted phosphoprotein 1) is essential for the early niche formation in the bone marrow. 第5回国際幹細胞学会、Cairns、Australia、2007.

水上拓郎、浜口功、滝沢和也、倉光球、百瀬暖佳、内藤誠之郎、益見厚子、岡田誠治、山口一成

髄外造血機構を用いた造血幹細胞ニッチの解析

第69回日本血液学会総会、横浜、2007.

水上拓郎、浜口功、滝沢和也、倉光球、百瀬暖佳、内藤誠之郎、益見厚子、岡田誠治、山口一成

髄外造血機構を用いた造血幹細胞ニッチの解析

第145回日本獣医学会総会、相模原、2008.

水上拓郎、浜口功、滝沢和也、倉光球、百瀬暖佳、内藤誠之郎、益見厚子、岡田誠治、

山口一成
脾臓における造血幹細胞ニッチ細胞の解析
第 70 回日本血液学会総会、京都、2008

Mizukami T, Hamaguchi I, Takizawa K,
Kuramitsu M, Momose H, Naito S, Masumi A,
Okada S, and Yamaguchi K

Identification and Characterization of a
Hematopoietic Stem Cell Niche in Spleen
第 50 回アメリカ血液学会年会、San
Francisco、California、2008

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

(1)研究代表者
浜口 功

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし