

平成 22 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770181

研究課題名（和文）マウス胎仔造血器より直接得た未分化細胞の解析と血液発生に対する役割

研究課題名（英文）Analysis of undifferentiated hematopoietic cells from hematopoietic tissues of mouse embryo and role of the cells in hematopoiesis on ontogeny

研究代表者

信久 幾夫（NOBUHISA IKUO）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40332879

研究成果の概要（和文）：マウスの胎生期における未分化な血液細胞の単離を試みたところ、まず成体型造血が生じる AGM 領域において CD45^{low}c-Kit^{high}細胞を見出した。この細胞集団の出現時期が AGM 領域の造血能が高い時期と一致していた。さらにこの細胞集団は、胎生期における他の造血組織である卵黄嚢および胎児肝臓についても未分化性が高いことを示した。一方、胎盤においては、CD45 陽性かつ c-Kit 陽性の細胞集団に造血活性が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We try the identification of the undifferentiated hematopoietic cells on mouse embryos. In the AGM regions, which show the emergence of cells containing the long-term repopulating activity in irradiated adult mice, CD45^{low}c-Kit^{high} cells had the highest ability to form hematopoietic cell colonies in vitro. We found that CD45^{low}c-Kit^{high} cells were identified in the stages of showing hematopoiesis in the AGM regions. The CD45^{low}c-Kit^{high} cells were also identified in yolk sac and fetal liver. In the placenta, the hematopoietic activity of CD45^{high}c-Kit^{high} cells was highest.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

マウスにおける造血発生において、放射線照射を施して造血組織を破壊させたマウスへの移植により長期に渡って造血再建能を持つ造血幹細胞は、AGM 領域で最初に認められる(de Bruijn, M.F. et

al., Immunity 2002)。その後、胎仔肝臓へと造血発生の際は移り、最終的に出生前に骨髄へと移行する。最近の研究より、胎生中期から後期にかけて胎盤および卵黄嚢でも造血幹細胞が生じることが明らかとなった(Ottersbach K., et al., Dev.

Cell 2005, Kumaravelu P., et al., Development 2002)。これらの胎生期に異なる場で行われる造血発生システムの共通性および特異性について、現在までに詳細な検討はなされていない。マウスの造血発生について最初に造血幹細胞を認める AGM 領域での血管内皮様細胞から血球細胞へと分化する過程を *in vitro* で再現する系として AGM 領域の分散培養が知られている (Mukoyama Y., et al., Immunity 1997)。この培養系での血管内皮様細胞を含む付着細胞からの血球細胞輩出は、stem cell factor (SCF)、basic fibroblast growth factor、および IL-6 サイトカインファミリーである oncostatin M の添加により可能となる。この AGM 分散培養で生じる血球細胞について、未分化血球細胞の同定と分化過程の検討を行った。生じた血球細胞を血球のマーカーである CD45 および成体骨髄の造血幹細胞のマーカーの1つである c-Kit で展開すると CD45^{low}c-Kit⁺ (集団 A)、CD45^{low}c-Kit⁻ (集団 B)、CD45^{high}c-Kit^{low/-} (集団 C) の3つの細胞集団に分かれた。得られた3つの集団の中で、集団 A 細胞のみに、*in vitro* での集団 B と集団 C への分化能を認めた。さらに集団 A 細胞は、放射線照射したマウスへの移植の実験から *in vivo* での各種血液細胞に分化する能力を認めた。このことより、AGM 領域の分散培養より得られる集団 A すなわち CD45^{low}c-Kit⁺細胞が長期造血再建能を示す造血幹細胞であることを明らかとした (Exp. Cell Res., 2007)。

さらに、前述した AGM 分散培養についての準備研究の結果を踏まえて、*in vivo* におけるマウス胎生中期 AGM 領域中の未分化血球細胞の解析を行った。培養を経ずに胎生 11.5 日胚 AGM 領域より直接回収した細胞について CD45 および c-Kit の発現強度に基づいて分画すると、分散培養で見られた3つの細胞集団と異なり、CD45^{c-Kit⁻}, CD45^{c-Kit^{low}}, CD45^{c-Kit⁺}, CD45^{low}c-Kit⁺, CD45^{high}c-Kit⁺, および CD45^{high}c-Kit^{low/-} の6つの集団を認めた。得られたそれぞれの細胞集団についてストローマ細胞との共培養により生じる血球細胞コロニー数および半固形培地中でのコロニー形成数を解析すると、AGM 分散培養の結果と同じく CD45^{low}c-Kit⁺細胞集団が最もコロニー数が多かった。この結果より、胎生 11.5 日胚の AGM 領域において、分散培養で認めた集団と同様なマーカー蛋白質の発現を示し、高い造血能を持つ未分化な細胞集団の存在を明らかにした。

以上の解析から、CD45 と c-Kit の二種類の抗体を用いて定義される CD45^{low}c-Kit⁺細胞という未分化血球細胞が、胎生中期の AGM 領域の造血発生に

大きな役割を担っていると考えられるが、とりわけマウス胎子においては、*in vivo* での造血能を含めた詳細な性質の検討、さらなる造血能が高い集団の濃縮の検討、および他の造血組織においてこの細胞を認めるかの検討の必要性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胎生 11.5 日胚の AGM 領域より直接得られた未分化血球細胞 CD45^{low}c-Kit⁺細胞について、さらに詳細に解析すると共に、CD45^{low}c-Kit⁺細胞の未分化性が胎生期における他の造血器について適応可能な概念であるか検討することにある。

3. 研究の方法

マウスの胎子の造血組織である AGM 領域、卵黄嚢、胎盤、胎児肝臓より、細胞を回収し、様々なマーカータンパク質を認識する蛍光標識抗体を処理し、フローサイトメーターを用いて、分画および回収を行う。その後、ストローマ細胞との共培養および半固形培地での培養を行い、コロニー形成能を評価した。

4. 研究成果

- (1) AGM領域より得られる血球細胞中に SP細胞が含まれ、SP細胞かつ CD45^{low}c-Kit⁺細胞の造血活性が、SP細胞でない CD45^{low}c-Kit⁺細胞と比較して高いことを明らかにした。また、CD45^{low}c-Kit⁺細胞以外の細胞集団にも SP細胞を認めたが、この集団には造血能を認めなかった。
- (2) AGM領域由来の CD45^{low}c-Kit⁺細胞について、その他のマーカータンパク質と共染色を行った。その結果、細胞外基質である α 4-integrin、血管内皮細胞のマーカーである Vascular endothelial cadherin、未分化細胞のマーカーである CD34 の発現が、他の集団に比して高いことを認めた。
- (3) 発生に伴う AGM領域由来 CD45^{low}c-Kit⁺細胞の存在について検討を行った。AGM領域由来 CD45^{low}c-Kit⁺細胞は、胎生 9.5 日でわずかな数を認め、胎生 10.5 日および胎生 11.5 日で細胞数が増加し、胎生 12.5 日では細胞数が減少し、胎生 13.5 日以降では認めなかった。また、*in vitro* における造血活性は、いずれの胎齢においても CD45^{low}c-Kit⁺細胞が最も高かった。このことより CD45^{low}c-Kit⁺細胞の出現時期が、AGM領域の造血能が高い時期と一致していることが明らかとなった。
- (4) 胎生期における他の造血組織での CD45^{low}c-Kit⁺細胞についての検討を行った。卵黄嚢、肝臓では CD45^{low}c-Kit⁺細胞集団を認め、*in vitro* の造血活性が CD45 および c-Kit の発現強度に基づいて分画した他の細胞集

団よりも高いことを見出した。

(5) GFPトランスジェニックマウスより得た AGM領域由来のCD45^{low}c-Kit⁺細胞をストローマ細胞で培養すると顆粒球およびマクロファージに分化することを示した。さらに、血管内皮細胞を誘導する液性因子存在かでは、血管内皮細胞のマーカーを発現するシート状の細胞を得た。このことより、CD45^{low}c-Kit⁺細胞が血球および血管内皮細胞への分化能を持つことが示唆される。

(6) 胎生10.5日目から15.5日目まで1日ごとのマウス胎盤について、OP9ストローマ細胞上での敷石状コロニー形成能および半固形培地におけるコロニー形成能を指標に造血活性を解析したところ、調べたいずれの胎生時期においても、CD45陽性かつc-Kit陽性の細胞集団に造血活性が認められた。CD45陽性c-Kit陰性細胞集団、CD45陰性c-Kit陽性細胞集団、CD45陰性c-Kit陰性細胞集団には造血活性は殆ど検出されなかった。また、成体造血幹細胞が濃縮される細胞集団として知られているHoechst33342色素排出性のSP細胞集団は、CD45陽性c-Kit陽性細胞集団中に最も高い割合で観察された。胎盤は胎児側組織と母体側組織が入り組んでいるが、GFPトランスジェニックマウスの利用により、胎児由来細胞をGFP標識することを可能にした。

(7) in vitro で造血能が高い胎生 11.5 日胚 AGM 領域由来の CD45^{low}c-Kit⁺細胞について、さらに詳細な解析を行うために、マイクロアレイを用いて CD45^{low}c-Kit⁺細胞と比較として造血活性の低い CD45⁺c-Kit⁺細胞について、発現プロファイルの解析を行った。その結果、CD45^{low}c-Kit⁺細胞で発現が上昇および低下している遺伝子について、さらにその役割を検討するために現在解析を進めている。

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) So S, Chijiwa T, Ikeda N, Nobuhisa I, Oda-Ueda N, Hattori S, and Ohno M. Identification of the B Subtype of gamma-Phospholipase A(2) Inhibitor from Protobothrops flavoviridis Serum and Molecular Evolution of Snake Serum Phospholipase A(2) Inhibitors. J. Mol. Evol. 66(3): 298-307, 2008

〔学会発表〕(計6件)

(1) 信久幾夫、大津直樹、山崎奨太郎、田賀哲也：マウス胎生中期の造血組織に存在する未分化血球細胞集団の同定 第6回幹細胞シ

ンポジウム、学術総合センター、2008年5月16-17日

(2) Shoutarou Yamasaki, Ikuo Nobuhisa, Gomaa Ahmed, and Tetsuya Taga : Identification of yolk sac cells having hematopoietic activity in view of CD45/c-Kit expression. 第38回日本免疫学会総会、国立京都国際会館、2008年12月1-3日

(3) 信久幾夫、山崎奨太郎、Gomaa Ahmed、田賀哲也：CD45 およびc-Kit の発現により分画したマウス胎仔造血組織より得た未分化細胞の解析。第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド、2008年12月9-12日

(4) Gomaa Ahmed, Ikuo Nobuhisa, Shoutarou Yamasaki, and Tetsuya Taga : Characterization of cells that have hematopoietic activity in the placenta of mouse embryo. 第7回幹細胞シンポジウム、泉ガーデンパレス、2009年5月15-16日

(5) Gomaa Ahmed, Ikuo Nobuhisa, Shoutarou Yamasaki, and Tetsuya Taga : Characterization of cells that have hematopoietic activity in the placenta of mouse embryo. 第39回日本免疫学会総会、大阪国際会議場、2009年12月2-4日

(6) 信久幾夫、岸川陽子、山崎奨太郎、Gomaa Ahmed、田賀哲也：Sox-17 maintains immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009年12月9-12日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

信久 幾夫 (NOBUHISA IKUO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40332879

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし