

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08758

研究課題名(和文)細胞系譜追跡を用いた造血システム発生様式の解析

研究課題名(英文)Analysis of hematopoietic system development using lineage tracing

研究代表者

横溝 智雅 (Yokomizo, Tomomasa)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80590314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス胎仔期において、造血幹細胞を含む造血システムがどのように形成されるのかを明らかにすることを目的としている。具体的には、「胎生期の造血前駆細胞は造血幹細胞に由来するのか」、「胎生期の造血幹細胞は分化しているのか」、「造血幹細胞への運命決定は転写因子Evi1の量依存的吗」の3つの問いに答えるべく研究をすすめた。その結果、胎仔肝に存在する造血幹細胞と造血前駆細胞は、Hlf陽性の起源細胞からそれぞれ独立して発生していること、胎生期の血液細胞の大部分は造血幹細胞由来ではないこと、Evi1の発現の高い起源細胞が造血幹細胞の産生に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、iPS細胞から様々な種類の細胞の誘導が試みられており、疾患治療・再生医療への応用が期待されている。血液細胞への分化誘導の研究もさかんにおこなわれており、現在までに多種の血液細胞の試験管内誘導が可能となっている。しかしながら、最も応用範囲が広いと思われる造血幹細胞については、いまだ有効な誘導法は確立していない。誘導が成功しない理由として、生体内での造血幹細胞の発生メカニズムの詳細が分かっていないことで、生体を模倣した培養系を構築することができない点が挙げられる。本研究は造血幹細胞の発生機構の一端を明らかにしたものであり、造血幹細胞の誘導法の開発に向けての有用な情報を与えるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate how the hematopoietic system, including hematopoietic stem cells (HSCs), is formed during the embryonic stage in mice. Specifically, the research addresses three questions: "Do hematopoietic progenitors during the embryonic stage originate from HSCs?", "Are fetal HSCs differentiated?", and "Is the fate determination of HSCs dependent on the amount of the transcription factor Evi1?" The results indicate that HSCs and hematopoietic progenitors in the fetal liver originate independently from Hlf-positive progenitor cells, that most blood cells during the embryonic stage are not derived from HSCs, and that progenitor cells with high Evi1 expression are involved in the production of HSCs.

研究分野：造血発生

キーワード：造血幹細胞 発生 造血システム

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の発生を人為的に制御することは、いまだできていない。現在広く用いられている培養法では、iPS 細胞から造血前駆細胞は誘導できるものの、造血幹細胞の誘導には至っていない。これを克服し生体を模倣した効果的な培養系を構築するためには、胎生期における造血幹細胞、および造血前駆細胞の発生・分化過程についての正確な理解が必要となる。胎生期の造血幹細胞についての研究は、その性質や挙動は成体骨髄中の造血幹細胞と似ているはずである、という仮定のもとに進められている場合が多い。ただし、この仮定では説明の困難な現象も幾つか見つかっている。

成体骨髄中の造血システムは、造血幹細胞を頂点とした階層性を持ち、各分化段階の造血前駆細胞は表面マーカーの組み合わせにより検出・単離が可能となっている。胎生期の肝臓でも同様の FACS 解析パターンが検出されることから、成体骨髄と同じ階層性の存在が想定されてきた。つまり、造血幹細胞は、その発生部位である 背側大動脈・生殖隆起・中腎 (AGM) 領域から肝臓に移動した直後に分化を開始することで、各種の造血前駆細胞を供給している、と考えられている。一方で、胎生期の造血幹細胞は、成体の造血幹細胞とは異なり、急速に増殖 (自己複製) していることも報告されている。すなわち、胎児肝臓では「自己複製」と「分化」という相反する 2 つの現象が短時間 (マウスの場合は 3 日間) で高頻度に起こっていることになる。この一見矛盾する現象をうまく説明しうる機構はいまだ明らかになっていない。そこで、造血幹細胞、および造血前駆細胞の発生・分化過程を生体内で追跡し、その動態を詳細に解析する研究が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は造血幹細胞を含む造血システム全体の発生様式の解明を目指すものである。とくに、以下の 3 つの問いについて明らかにする。

胎生期の造血前駆細胞は造血幹細胞に由来するのか

胎生期の造血幹細胞は分化しているのか

造血幹細胞への運命決定は転写因子 Evi1 の量依存的なのか

3. 研究の方法

(1) *Hlf-CreERT2* マウス、あるいは *Evi1-CreERT2* マウスと *ROSA-tdTomato* マウスを交配し、細胞系譜追跡実験をおこなう。妊娠 8~11 日目のマウスにタモキシフェンを投与し、胎生期 (11.5~18.5 日目) あるいは生後 (2 週から 8 ヶ月) にフローサイトメーターを用いて tdTomato 陽性細胞の分布を測定する。

(2) 胎生 9~14 日目のマウス胎仔 (*Hlf-tdTomato* マウス) の造血幹細胞、および造血幹細胞の前駆段階細胞 (プレ造血幹細胞; pre-HSC) について、フローサイトメトリー、および共焦点顕微鏡を用いて tdTomato、表面タンパクの発現等を解析する。

4. 研究成果

研究目的に示した 3 つの課題について、以下の結果を得ている。

胎生期の造血前駆細胞は造血幹細胞に由来するのか

Hlf-CreERT2 トレーサーマウスを用いた細胞系譜追跡実験から、胎仔肝 (胎生 14 日目) に存在する造血幹細胞と造血前駆細胞は、*Hlf* 陽性の起源細胞からそれぞれ独立して発生していることが明らかとなった。さらに、*Evi1*^{+/-}マウスの解析、および *Evi1-CreERT2* トレーサーマウス (新規作製) を用いた細胞系譜追跡実験の結果もこの結論を支持するものであった。

胎生期の造血幹細胞は分化しているのか

Evi1-CreERT2 トレーサーマウスを用いた細胞系譜追跡実験からは、胎生後期の造血幹細胞が造血前駆細胞へと分化している様子は観察されなかった (図 1)。この結果は、胎生期の血液細胞の大部分は造血幹細胞由来ではないことを強く示唆している。

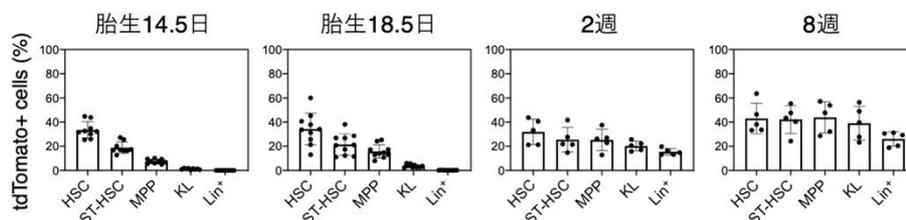


図 1 *Evi1-CreERT2* マウスによる細胞系譜追跡実験

胎生期は、ST-HSC/HSC の比が変化していない。このことは、造血幹細胞 (HSC) から短期造血幹細胞 (ST-HSC) への流入がおこっていないことを示している。

造血幹細胞への運命決定は転写因子 Evi1 の量依存的なのか
Evi1^{+/-}-マウスは、Evi1 強陽性細胞を欠損している。この性質を利用し、Evi1 の発現量と造血幹細胞形成の関係についての検討をおこなった。*Evi1*^{+/-}-マウスでは、造血幹細胞特異的な減少が観察された。さらに、Evi1 の強制発現系 (*ROSA-Evi1* マウス: 新規作製) を利用し、血管内皮細胞、および血液細胞クラスターで Evi1 を強制発現させたところ、造血幹細胞産生の増加が見られた (図 2)。これらの結果は、Evi1 の発現の高い起源細胞が造血幹細胞の産生に参与していること、および、Evi1 は血液細胞クラスター内で機能していることを示している。

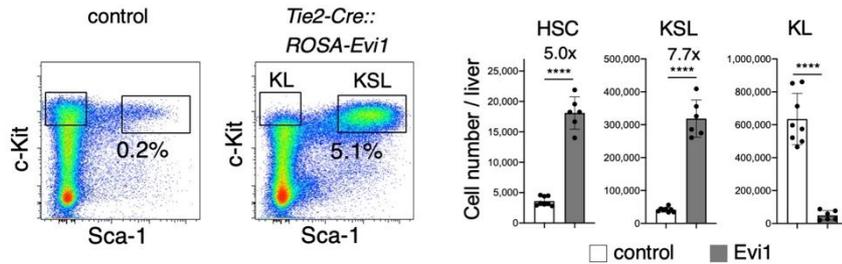


図 2 Evi1 の強制発現による造血幹細胞の誘導

Evi1 を強制発現したマウスの胎児肝臓では、造血幹細胞 (HSC) が 5 倍に増えている。

で得られた結果を考慮し、造血システム発生の新たなモデルを作成した (図 3)。このモデルにより、胎児肝臓で「自己複製」と「分化」という相反する 2 つの現象が観察される理由を説明できると考えている。

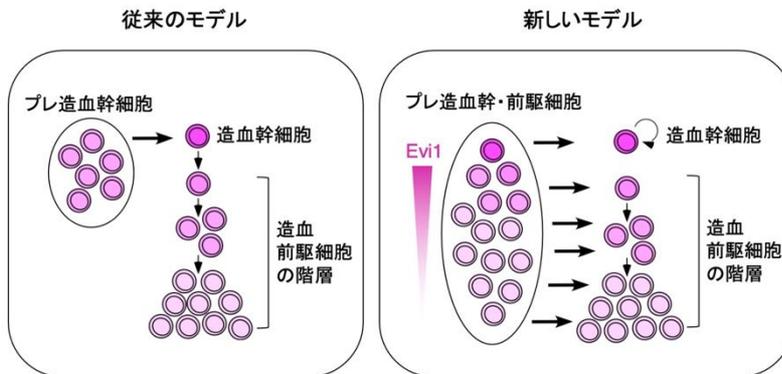


図 3 造血幹細胞・造血前駆細胞発生のモデル

造血幹細胞、造血前駆細胞はプレ造血幹・前駆細胞からそれぞれ独立して発生する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koh CP., Bahirvani AG., Wang CQ., Yokomizo T., Ng CEL., Du L., Tergaonkar V., Voon DC., Kitamura H., Hosoi H., Sonoki T., Michelle MMH., Tan LJ., Niibori-Nambu A., Zhang Y., Perkins AS., Hossain Z., Tenen DG., Ito Y., Venkatesh B., Osato M.	4. 巻 851
2. 論文標題 Highly efficient Runx1 enhancer eR1-mediated genetic engineering for fetal, child and adult hematopoietic stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 147049 ~ 147049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2022.147049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokomizo Tomomasa, Ideue Takako, Morino-Koga Saori, Tham Cheng Yong, Sato Tomohiko, Takeda Naoki, Kubota Yoshiaki, Kurokawa Mineo, Komatsu Norio, Ogawa Minetaro, Araki Kimi, Osato Motomi, Suda Toshio	4. 巻 609
2. 論文標題 Independent origins of fetal liver haematopoietic stem and progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 779 ~ 784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05203-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Koui Yuta, Ideue Takako, Boylan Michael, Anderson Matthew J., Osato Motomi, Suda Toshio, Yokomizo Tomomasa, Mukouyama Yoh-suke	4. 巻 11
2. 論文標題 Hepatic leukemia factor-expressing paraxial mesoderm cells contribute to the developing brain vasculature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio059510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.059510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahara Yuji, Higaki Takumi, Yokomizo Tomomasa, Umemoto Terumasa, Ariyoshi Kazunori, Hashimoto Michihiro, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Inoue Toshihiro, Suda Toshio, Mizuno Hidenobu	4. 巻 5
2. 論文標題 Bone marrow imaging reveals the migration dynamics of neonatal hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03733-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abdallah MG, Niibori-Nambu A, Morii M, Yokomizo T, Yokomizo T, Ideue T, Kubota S, Teoh VSI, Mok MMH, Wang CQ, Omar AA, Tokunaga K, Iwanaga E, Matsuoka M, Asou N, Nakagata N, Araki K, AboElenin M, Madboly SH, Sashida G, Osato M	4. 巻 35
2. 論文標題 RUNX1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) induces myeloid leukemia in mice in an age-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2983 ~ 2988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01268-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jeon Hyojung, Asano Keigo, Wakimoto Arata, Kulathunga Kaushalya, Tran Mai Thi Nhu, Nakamura Megumi, Yokomizo Tomomasa, Hamada Michito, Takahashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of reconstituted hemato-lymphoid murine embryos by placental transplantation into embryos lacking HSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83652-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Michihiro, Umemoto Terumasa, Nakamura-Ishizu Ayako, Matsumura Takayoshi, Yokomizo Tomomasa, Sezaki Maiko, Takizawa Hitoshi, Suda Toshio	4. 巻 5
2. 論文標題 Autophagy is dispensable for the maintenance of hematopoietic stem cells in neonates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1594 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo
2. 発表標題 Independent origins of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells
3. 学会等名 The 8th International Forum on Stem Cells, Virtual, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo
2. 発表標題 Tracing the origin of hierarchical hematopoietic structure in the fetal liver
3. 学会等名 The 51th Annual Scientific Meeting, International Society for Experimental Hematology, Edinburgh, UK (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Takako Ideue, Mineo Kurokawa, Norio Komatsu, Kimi Araki, Motomi Osato, Toshio Suda
2. 発表標題 Tracing the origin of hierarchical hematopoietic structure in fetal liver
3. 学会等名 第18回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Takako Ideue, Kimi Araki, Mineo Kurokawa, Norio Komatsu, Motomi Osato, Toshio Suda
2. 発表標題 In vivo tracing of hematopoietic stem and progenitor cell formation in the mouse embryo
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

胎児期に血液細胞が生まれるしくみを解明
<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20220926>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------