

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 8日現在

機関番号：47605
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21602005
 研究課題名（和文）ニッチー造血幹細胞間におけるG蛋白質共役型受容体TM7XN1の機能解析
 研究課題名（英文）Functional analysis of G protein-coupled receptor TM7XN1 between niche-hematopoietic stem cells.
 研究代表者
 長谷 真（HASE MAKOTO）
 別府大学短期大学部・准教授
 研究者番号：50425203

研究成果の概要（和文）：幹細胞の分化や維持は、腫瘍を含む多くの組織の発生とその恒常性に必須である。これらの幹細胞はニッチと呼ばれる機能的な場に存在している。しかし、幹細胞—ニッチ間の調整機能の分子機構はまだ解明されていない。ここではヒト造血幹細胞（HSC）と扁平上皮がん細胞株 A431 細胞のガン幹細胞分画を用いて、幹細胞上の TM7XN1 と他の G タンパク質結合レセプター（GPCRs）の発現レベルを評価し、それらがどのようにニッチとの相互作用に影響を及ぼすかについて分析した。

研究成果の概要（英文）：The differentiation and maintenance of stem cells are integral to the development and homeostasis of many tissues, including the tumors. These stem cells often live in specialized functional areas, called niches. However, the molecular mechanisms of stem cells and niches regulatory function remain unclear. Here, using human hematopoietic stem cell (HSC), and cancer stem cell compartment of squamous cancer cell strain A431 cell, we evaluated the level of expression of TM7XN1 and other G protein-coupled receptors (GPCRs) on stem cells, and analyzed how this affects their interaction with niche.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学

キーワード：細胞間接着 GPCR s 幹細胞 細胞内情報伝達系 G蛋白質共役型受容体

1. 研究開始当初の背景

（1）マウスの HSC に関しては、骨髄由来の 1 個の CD34 陰性 c-kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage 陰性 (CD34-KSL) 細胞が致死量の放射線を照射したマウスの骨髄を再構築すること（以下、同種間移植モデル）から、こ

れらがほぼ純化された造血幹細胞（HSC）と考えられている。ホーミングに関してはケモカインである CXCL12 とそのレセプターである CXCR4 を介したシグナルが骨髄への HSC のケモタキシス（遊走）や TMM（骨髄内移動）に必須であり骨髄での HSC の維持増幅に関わっている事が報告されているがロジックで

の役割についての詳細は未確定である。ヒトでは Lineage 陰性 CD34 陽性 CD38 陰性 (Lin-CD34+CD38-) の細胞表面形質をもつ細胞群が HSC の活性を持ち、さらに数 10 個のヒト Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA-細胞でも免疫不全マウス (胎児) への生着が可能であると近年報告されている。ヒトにおいてもホーミング時の CXCR4-CXCL12 シグナルの関与は重要であるが、細胞外 UTP, ATP といった新しいホーミング関連因子の報告やヒト Lin-CD34+CD38-CXCR4 + 細胞でも Lin-CD34+CD38-CXCR4-細胞でもマウス骨髄への生着が見られる事などから現在 CXCR4-CXCL12 シグナル以外のホーミング関連因子の探索の必要性が生じている。

特にロジックメントにおけるニッチ微小環境は HSC の定着 (休眠) 場所であり、同時に自己複製や分化の調節の場でもある。このような活性化-不活性化シグナルは単一細胞単体ではなく周辺の細胞との接触 (接着) により調節されている場合が多く (例えば動脈硬化部位や癌転移など)、それ故申請者はニッチにおける HSC の調節シグナルとしての細胞間接着を想定した。

(2) まず既存の細胞接着因子の中からヒト HSC におけるロジックメントに關与する蛋白質の検索をおこなった。その結果 CXCR4 と同様な 7 回膜貫通型 (seven transmembrane, 7TM or TM7) G 蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) の一種である TM7XN1 に着目した。TM7XN1 (あるいは G protein-coupled receptor54, GPR54 と呼ばれる) は、脳と HSC で多く発現しており、遺伝性脳疾患である両側性前頭頭頂多少脳回の原因遺伝子である事が報告されている。さらにマウス神経前駆細胞におけるマイグレーションを TM7XN1 の強制発現が阻害する事や下流シグナルとして Rho キナーゼの関与も報告されている。メラノーマ細胞株においては、TM7XN1 が転移能が低い株ほど多く発現しており、TM7XN1 のリガンドとしてトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) の存在が報告され両者の結合 (細胞間接着) によりメラノーマの増殖と転移能が阻害される。このようにヒト HSC のホーミングを調節している新しい分子候補として TM7XN1 は非常に有望であり、早急に詳細な解析を行なうべきであると考えられた

2. 研究の目的

本研究では、

(1) ヒト CD34+CD38-HSC と骨髄細胞間のホーミングに対する TM7XN1 の機能特性を in vivo 異種間移植実験ならびに in vitro 実験系を用いて明らかにする。移植を抑制する 21MI 抗体を用いて以下について検討した。

① in vivo 異種間移植実験における 21MI

抗体の HSC 生着能への影響の解析

② in vitro 実験系 (共培養系など) での 21MI 抗体の HSC 増殖、分化、遊走に対する影響についての検討

③ 骨髄 (ニッチ) 細胞を用いた TM7XN1 のリガンド候補 (TG2 あるいは未知の膜蛋白) の検索、同定

④ 培養細胞を用いた 21MI 抗体作用時の細胞内情報伝達系の解析

(2) また培養がん細胞株を用い、幹細胞分画細胞群と非がん幹細胞分画をセルソーターにて分離、取得し TM7XN1 遺伝子やその他の候補 GPCR とインターナルコントロール (GAPDH) の発現から相対発現量の検討を行い、がん幹細胞特異的に発現している GPCR の同定、解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 標的幹細胞の純化方法

① ヒト CD34+HSC の純化方法

既報 (Stem Cells 25:1348, 2007) に従って、ヒト臍帯血あるいは骨髄由来単核細胞より、8 種類の抗体と免疫磁気コロイドを用いて分化抗原陰性 (Lin-) 細胞を得る。得られた細胞を既報の 14~18 種類の Lin 抗体と抗 CD34、CD38、CD45 抗体で四重染色後にセルソーターを用いて、Lin-CD34+CD38-細胞を採取し、以下の in vitro および in vivo の実験に用いた。本研究においてはさらに TM7XN1 に対する抗体を用いて五重染色を行い、TM7XN1 のヒト HSC における発現やその意義についても検討した。

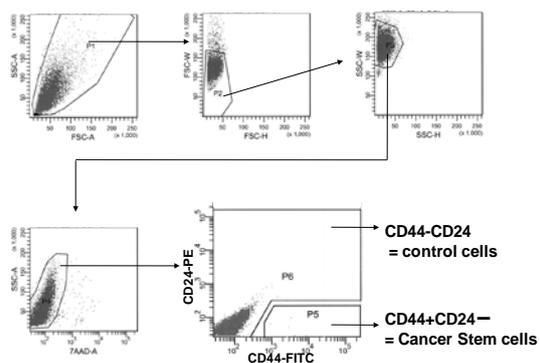


図 1

② 培養がん細胞株からのがん幹細胞の純化

ヒト扁平上皮がん細胞株 A431 培養細胞を培養皿より乖離しブロッキングの後、CD44-FITC/CD24-PE/7AAD にて染色、洗浄しセルソーターにて CD44+/CD24-細胞群を取得し、以下の in vitro および in vivo の実験に用いた (図 1)。研究においてはさらに抗ポドプラミン抗体などががん幹細胞マーカーとし

て報告のあるものでさらなる4～6カラー染色も試みる。がん細胞株の使用や後述のヌードマウスへの移植実験などは別府大学倫理委員会の承認に基づいて行った。

(2) マウス脛骨髄腔内直接移植 (IBMI) 法を用いる Scid-repopulating cell (SRC) の測定方法

(1) ①にて採取した Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞を用い *in vivo* におけるヒト HSC の骨髄再構築能 (キメラ率) を確認した。予め 2.5Gy の放射線照射を行ない、ネブタール麻酔を施した8週齢の雌 NOG マウスを仰臥位で固定する。TM7XN1 発現細胞、又は抗 TM7XN1 移植阻害抗体処理細胞、あるいは 3) a) で共培養した細胞分画 (10 μ L 以下) をハミルトン針で左脛骨内に直接緩徐に注入する。移植 4～18 週間後まで、経時的に骨髄を吸引し、また 24 週後にマウスを犠牲死させて骨髄、末梢血、脾臓、胸腺などを採取し、抗ヒト CD45 抗体で染色後にフローサイトメーター (FACSCalibur) で解析する。同時に、抗ヒト CD14, CD33, CD34, CD19, CD3, CD41, GPA などに対するモノクローナル抗体で染色し multilineage 解析も行った。

(3) *In vitro* 実験法による幹細胞の増殖分化・遊走シグナルの解析

① 液体培養ならびに共培養系による増殖分化の解析

各種生存因子存在下 1 週間以上の単一あるいはストローマ細胞との共培養で分化細胞を産生、増殖を評価した。又 *c* colony assay によって HSC の分化能 (造血前駆細胞 (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix など) 由来コロニー数の計測) を行った。

② Chemotaxis assay による HSC やがん幹細胞の遊走能への影響

トランスウェル遊走試験 (境界を直径 5 μ m の pore で遮った上下二層の培養皿の上部に細胞を入れ下部に遊走因子を添加しておき上部から下部への細胞の移動を確認する実験法) により遊走に対する中和抗体の効果、TM7XN1 陽性細胞への各種ケモカインへの応答について評価した。

③ 候補 GPCR のがん幹細胞での発現確認

(1) ②にて採取したがん幹細胞分画 (CD44⁺/CD24⁻細胞) とがん非幹細胞分画の比較を行い発現の有無 (強弱) を RT-PCR 確認した。各細胞群を同一細胞数採取し、RNA を抽出 (キアゲン) 後、市販の RT-PCR キット (タカラバイオ) にて逆転写し、リアルタイム-PCR に用いた。特に癌の転移、あるいは幹細胞特異的に発現があると報告のある GPCR 中の 3～50 の分子について解析を行った。

最終的な候補 GPCR に対して使用できる抗体が購入できた場合、セルソーターによるさらなる純化やウェスタンブロットによるタンパク質レベルでの発現も確認した。

4. 研究成果

本研究では TM7XN1 などの GPCR の細胞内における作用機序、特に HSC-骨髄ニッチ細胞間や、がん幹細胞とその周囲の微小空間との細胞接着の分子機序への関与を明らかにすることを目的とした。まず TM7XN1 の、HSC-骨髄ニッチ細胞間の細胞接着の分子機序への働きを明らかにするための第一歩として、HSC における TM7XN1 の発現と増殖への関与を解析した。ヒト臍帯血あるいは骨髄由来単核細胞より、分化抗原陰性 (Lin⁻) 細胞を得た。さらにセルソーターを用いて、Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞 (ヒト HSC 分画) を採取し、TM7XN1 の発現を解析した。その結果、Lin⁻CD34⁺CD38⁺細胞では約 54% の細胞しか TM7XN1 の発現がみられなかったが Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞のほぼすべてにおいて TM7XN1 が発現していることを確認した (図 2)。つまりヒト HSC において TM7XN1 が何らかの機能的役割を担っている可能性が示唆された。

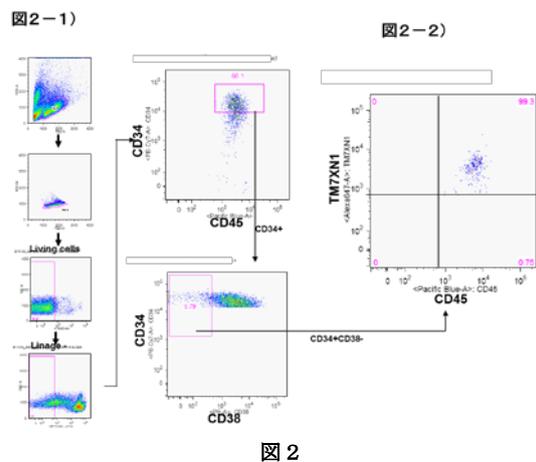


図 2

次に幹細胞の増殖、分化におけるニッチ細胞との相互作用への TM7XN1 の関与の可能性を確かめるために *in vitro* での HSC の培養条件下における抗 TM7XN1 中和抗体 (2.1 MI) の影響について調べた。Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞は SCF, FL, TPO, IL-3, IL-6, G-CSF 存在下 1 週間以上の単一あるいはストローマ細胞との共培養で HSC 自身や分化細胞を産生する。この系を用い抗体処理細胞の増殖、分化能を評価した。その結果、HSC 分画単独での浮遊培養系では 2.1 MI 抗体の増殖への阻害効果はみられなかった (図 3-1) が、Hess 5 ストローマ細胞と HSC 分画細胞の共培養条件下では増殖は阻害され (図 3-2)、また分化細

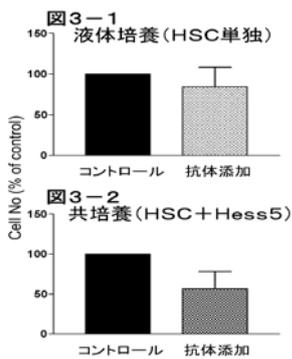


図 3

このように初期の研究計画においては TM7XN1 の HSC への関与を中心に解析する予定だったが、使用中であった抗 TM7XN1 抗体の大量入手が困難となり、研究期間の中期より研究の焦点を TM7XN1 を含む GPCR 全般に移行し解析を行った。まず試料を集めやすく均一である培養がん（幹）細胞を材料としてがん幹細胞特異的に発現している GPCR の特定とその機能について検討を加えた。

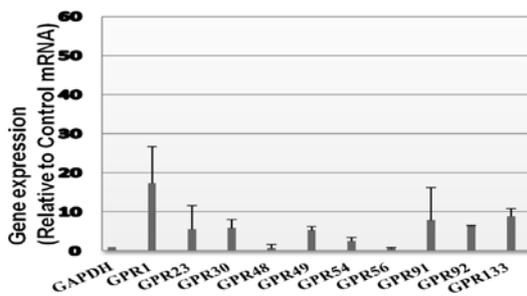


図 4

ヒト扁平上皮がん細胞株 A431 細胞を用い幹細胞分画と報告されている CD44+/CD24-細胞群と CD44-/CD24+or-細胞群(非がん幹細胞分画)を分離、取得し標的 GPCR 遺伝子とインターナルコントロール (GAPDH) の発現から相対発現量の検討を行った。その結果 CD44+/CD24-細胞群にのみ発現のみられる複数の GPCR を確認した。(図 4) それらの中で相対発現量が 1.0 倍以上の複数の GPCR に関して現在解析を行っている (投稿準備中)。また内皮細胞におけるアポトーシスへの SDF-1-CXCR4 伝達系の関与が報告されていることから、ヒト血管内皮細胞を用いたアポトーシス経路への GPCR の関与の検討も行いつつある。

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 6 件)

①長谷真 ミネラルならびに微量元素

によるヒト血管内皮細胞への影響 査読有 別府大学短期大学部紀要第 31 号 pp1-8 2012
 ②Kimura T, Kohno H, Matsuoka Y, Murakami M, Nakatsuka R, Hase M, Yasuda K, Uemura Y, Sasaki Y, Fukuhara S, Sonoda Y : Interleukin-8 enhances the proliferation and angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial cells in vitro. Cell Biol Int. 2011, 35(3): 201-208. (査読有)

③Narita Y, Hase M 他 11 名 7 番目 Natural killer T cell-based adjuvant properties and their application for anti-tumor immune response. Cytometry Research, 2010, 20, 19-25. (査読有)

④長谷真 ヒト造血幹細胞における G 蛋白質質共役型受容体 TM7XN1 とその結合蛋白質 TG2 の機能解析 平成 20 年度関西医科大学学内研究助成紀要 pp51-52、2010 年 2 月(査読無)

⑤Sasaki Y, Matsuoka Y, Hase M, Toyohara T, Murakami M, Takahashi M, Nakatsuka R, Yasuda K, Uemura Y, Sonoda Y : Marginal expression of CXCR4 on c-Kit+Sca-1+ Lineage- hematopoietic stem/progenitor cells. Int J Hematol. 2009, 90: 553-560 (査読有)

⑥Uemura Y, Hase M 他 21 名 14 番目 Cytokine-dependent modification of IL-12 p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Va24 invariant natural killer T cells. J. Immunol. 2009, 183: 201-208 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

①長谷真 健康展～「減塩」について(ミニ講義)別府大学学内 G P 「健康展」、2011 11 月 19 日 大分駅

②Uemura Y, Liu T, Narita Y, Suzuki M, Nakatsuka R, Hirose N, Matsuoka Y, Murakami M, Hase M, Kohno H, Sasaki Y, Sakamoto Y, Senju S, Sonoda Y : Modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by Valpha24 invariant NKT cells. : 第 71 回日本血液学会総会 2009 年 10 月 23 日、京都(国立京都国際会館)

③Sasaki Y, Matsuoka Y, Toyohara T, Hase M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y: マウス骨髄造血幹/前駆細胞は CXCR4 低発現である: 第 71 回日本血液学会総会 2009 年 10 月 25 日、京都(国立京都国際会館)

④鈴木元晴、植村靖史、成田弥生、劉天愆 廣澤成美、長谷真、千住覚、坂本安、藪田精昭: Va24 インバリアント NKT 細胞による樹状細胞の IL12/IL23 産生制御: 第 68 回日本癌学会 学術総会、2009 年 10 月 2 日、横浜 (パ

シフイコ横浜)

⑤Sasaki Y, Matsuoka Y, Toyohara T, Hase M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y : Kinetics of CXCR4 expression on murine steady state KSL cells : 第 7 回 幹細胞シンポジウム 2009 年 5 月 15 日、東京 (泉ガーデンギャラリー)

[図書] (計 1 件)

①Araki S. (2011). Vascular apoptosis-inducing protein 1. Handbook of Proteolytic Enzymes, third edition. Ed. Neil Rawlings and Guy Salvesen. Elsevier. (査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 真 (HASE MAKOTO)
別府大学短期大学部・准教授
研究者番号 : 50425203

(2) 研究分担者

佐々木 豊 (SASAKI YUTAKA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 8042808

研究分担者

荒木 聡彦 (ARAKI SATOHIKO)
名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号 : 80242808