

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19500

研究課題名(和文)造血幹細胞と骨髄ニッチ細胞との接触・接近の可視化技術の開発と真のニッチ細胞の探索

研究課題名(英文) Identification of true HSC niche by visualization of contact and proximity between HSCs and various niche cells

研究代表者

田中 洋介 (TANAKA, YOSUKE)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任講師

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)：造血幹細胞とニッチ細胞の接着を可視化するための準備として、マウス血液細胞株 BaF/3 とマウス骨髄ストローマ細胞 OP9 を用いて可視化システムの構築、最適化を行った。BaF/3 に GFP 抗体、Notch、tTA のキメラ受容体、TRE-tdTomato と tTS を、OP9 に EGFP-ligand をレンチウイルスベクターにより導入した。次に、BaF/3 と OP9 との共培養において OP9 に接着した BaF/3 が tdTomato を発現することが確認できた。現在、*in vivo* での検証のため、造血幹細胞に可視化システムを導入中、EGFP-ligand をニッチ細胞特異的に発現させるためのマウスを作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞が未分化性を維持するためには骨髄ニッチが必須である。これまでに様々な骨髄ニッチ細胞が提唱されてきたが、いずれのニッチ細胞が真のニッチかは不明のままであり議論が絶えない。造血幹細胞がいずれの細胞に接着しているかを評価する方法として骨髄のスナップショットによる画像評価が主要な方法であったが、様々な細胞がひしめき合っている骨髄においては正確な評価は不可能である。そこで、接着を可視化するシステムの構築によりこの問題を解決を試みることにした。本研究において、我々は細胞株を用いた試験管内での接着可視化システムの構築に成功し、現在 *in vivo* における接着可視化システムを構築中である。

研究成果の概要(英文)：In preparation for visualizing hematopoietic stem cell (HSC)-niche cell adhesion, a visualization system was constructed and optimised using the mouse blood cell line BaF/3 and the mouse bone marrow stromal cell line OP9. Lentiviral transductions of GFP antibodies, chimeric receptors for Notch and tTA, TRE-tdTomato and tTS into BaF/3 and EGFP-ligand into OP9 were performed. Then, we confirmed that BaF/3 adhering to OP9 in co-culture expressed tdTomato. For *in vivo* validation, we are introducing the visualization system into HSCs and establishing mice carrying the EGFP-ligand in a niche cell-specific manner.

研究分野：幹細胞学、血液学

キーワード：造血幹細胞 骨髄ニッチ

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、さまざまな方法で造血幹細胞ニッチの研究が行われてきたが、造血幹細胞がそのニッチの中でいずれのニッチ細胞と接着あるいは接近しているのか、さらにいずれのニッチ細胞との関わりが重要であるのかは不明のままである。これまでに主に以下の3つのアプローチで造血幹細胞の維持に重要なニッチ細胞の評価が行われてきた。

- A) ニッチ細胞を選択的に除去し造血幹細胞への影響を評価する方法。具体的には、ジフテリアトキシン受容体をニッチ細胞に選択的に発現させてジフテリアトキシン投与により除去し、造血幹細胞維持への影響を評価する。
- B) ニッチに重要であると考えられている因子を inducible Cre-loxP システムにより選択的に除去し、造血幹細胞維持への影響を検討する。
- C) In vivo イメージングによるニッチ細胞と造血幹細胞との距離を測定し、より距離の近いもの(接着あるいは接近しているもの)を特定する。

しかしながら、これらの方法にはいくつかの弱点がある。A)、B)に関しては、ニッチ細胞、ニッチ因子の除去によりニッチそのものの構造や機能が変化している可能性があり、正常なニッチとは異なるものを観察している可能性を否定できない。C)については、距離を測ったとしても、様々なニッチ細胞がひしめき合っている骨髄の中で実際にいずれのニッチ細胞との接触が造血幹細胞維持に重要であるのかは不明である。また、これらすべてに共通する最大の問題は、ニッチ細胞に接着あるいは近接している造血幹細胞を抗体染色やレポーター等で識別するだけで、その造血幹細胞の骨髄再構築能を移植等により評価できないことである。そこで、申請者らは、造血幹細胞とそのニッチ細胞の細胞間接着(あるいは至近距離までに接近)をラベルしようと考えた。つまり、ある時点(解析時)にある特定のニッチ細胞と接着あるいは接近している造血幹細胞のみを蛍光色素などのレポーターでラベルできるというシステムの構築を目指す。これにより、目的の細胞をラベルすることで、in vivo イメージングやセルソーターで細胞を解析可能となり、ニッチ細胞に接着あるいは近接している造血幹細胞の骨髄再構築能を移植により評価できるようになる。

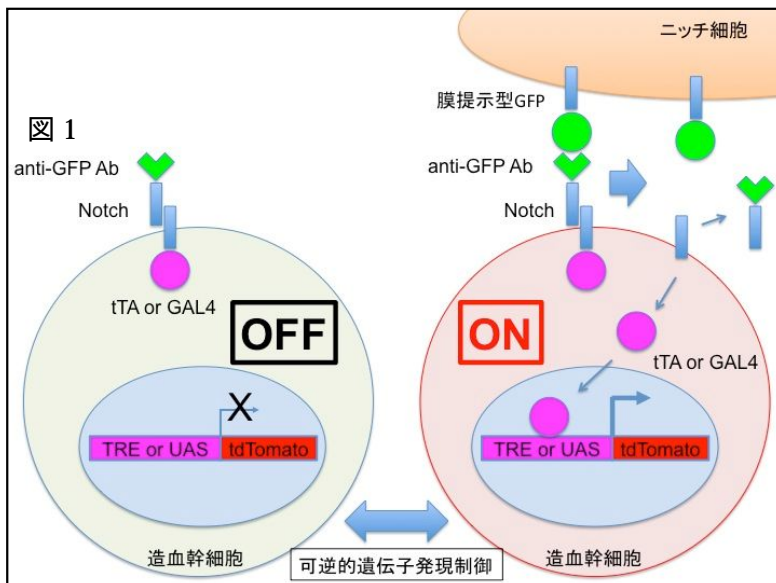
### 2. 研究の目的

**造血幹細胞とその様々なニッチ細胞との接着あるいは接近を可視化できるシステムを構築し、いずれのニッチ細胞が造血幹細胞の維持に重要であるかを特定することを目標とする。**

生体内において、細胞は単一に存在することなく、常に周囲の細胞と相互作用をしている。特に、組織幹細胞システムにおいては、組織幹細胞とその幹細胞ニッチの支持細胞との相互作用が組織幹細胞を維持するために重要であることが知られている。その中でも造血幹細胞とそのニッチである骨髄の支持細胞(ニッチ細胞)はよく研究されている。これまでにニッチ細胞として骨芽細胞や血管内皮細胞やその周囲に存在する CAR 細胞などの間葉系細胞などが提唱されているが、未だにいずれのニッチ細胞が重要かは結論が出ていない。そこで、本研究では、いずれのニッチ細胞が幹細胞性の維持に重要かを明らかにするために、特定のニッチ細胞と接触あるいは接近した造血幹細胞をそのニッチ細胞誘導的に蛍光色素でラベルし識別できるシステムを構築する。さらに、特定のニッチ細胞によってラベルされた造血幹細胞をセルソーティングにより取り出し、その骨髄再構築能を移植により評価することでいずれのニッチ細胞が重要かを評価することを目標とする。

### 3. 研究の方法

造血幹細胞とそのニッチ細胞の細胞間接着(あるいは至近距離までの接近)をラベルする方法を図1に示す。任意のニッチ細胞にリガンド、造血幹細胞側に受容体を発現させる。受容体を発現する細胞には、リガンド-受容体刺激で蛍光色素等のレポーターが動くように細工しておく。これにより、リガンド-受容体刺激つまり細胞が接着したときのみレポーターを ON にすることが可能になる。リガンド-受容体刺激でレポーターを発現させる方法であるが、申請者らは



Notch ファミリーのリガンド-受容体システムに注目した。つまり、リガンド刺激が入ると、細胞外ドメインが切断され、それにより細胞内ドメインが核内に移行し目的遺伝子を発現させるというシステムである。特に Notch シグナルは隣接する細胞間で伝達されるものであり、本研究目的に最適であるといえる。当初の予定では、ハエの Notch を利用することを検討したが、Notch シグナルは種を問わずよく保存されていることで知られており、そのままではマウス内在性リガンドと反応してしまうことが予想される。そこで、申請者らは、がん治療において注目されている CAR(キメラ抗原受容体)に注目し、Notch の受容体と抗原ではなくある特定のリガンドに対する抗体とのキメラ受容体を作成する構想にいたった。すなわち、ニッチ細胞側に膜提示型 GFP を発現させ、Notch-抗 GFP 抗体とのキメラ受容体に認識させるというシステムである。これにより、種を問わずにこのシステムが利用可能となる。また、マウスを作成する際は、特定のニッチ細胞に発現できるように Cre 誘導型を作成する。これにより、各種細胞特異的 Cre マウスとかけ合わせることで、任意の細胞に抗原を発現させることが可能である。抗原に GFP 等の蛍光タンパクを使うことにより、標的としているニッチ細胞を識別することも可能になる。Notch 受容体の細胞内ドメインであるが、このままでは Notch の標的遺伝子を活性化してしまうだけなので、改良する必要がある。シグナルが入ったときのみレポーターを発現させることが必要であるので、Tet-off システムや GAL4-UAS 遺伝子発現システムを代わりに導入する。すなわち、Notch の細胞内ドメインを切断される部位を残してテトラサイクリン制御性トランス活性因子 (tTA) あるいは Gal4 に置き換える。さらに同じ細胞に、テトラサイクリン応答因子 (TRE) レポーターあるいは UAS レポーターを発現させておく。これにより、シグナルが入ったときのみレポーターを活性化させることが可能になる。造血幹細胞にこのシステムを導入する方法として、*Hoxb5*(Chen et al., 2016), *Fgd5*(Gazit et al., 2014)や *Ctnaal1/ -catulin*(Acar et al., 2015)などの造血幹細胞特異的な遺伝子のプロモーター下に TRE/UAS-tdTomato レポーターを発現するマウスを作成する。または、全身にキメラ Notch 受容体を発現させたマウスを作成し、その造血幹細胞を膜提示型抗原マウスに移植する。このシステム(図2)を作り出すことで、ある特定のニッチ細胞に接着あるいは近接している造血幹細胞を識別可能になり、その解析が可能となる。また、造血幹細胞がニッチ細胞に接着あるいは近接しているときのみレポーターが ON になるので、in vivo ライブイメージングを行えば造血幹細胞が短期間にニッチを出入りするかどうか等も評価可能である。

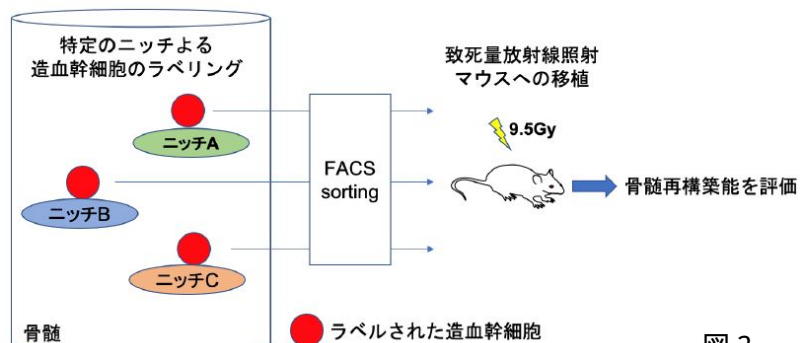


図 2

#### 4. 研究成果

造血幹細胞とニッチ細胞の接着あるいは近接を可視化するための準備として、マウス血液細胞株 BaF/3 とマウス骨髄ストローマ細胞 OP9 を用いて可視化システムの構築、最適化を行った。マウス BaF/3 に GFP 抗体、Notch、tTA のキメラ受容体 (以下: SynNotch-GFP-tTA 受容体) と TRE-tdTomato をレンチウイルスベクターにより導入した。Tet-free FBS を用いた培養においても tdTomato の蛍光が認められたため、さらにテトラサイクリン調節性の転写サイレンサー (tTS) を導入した。OP9 細胞には同じくレンチウイルスベクターにより EGFP-ligand を導入した。次に、BaF/3 と OP9 と共培養することで、OP9 細胞に接着することで tdTomato の発現の有無を検証した。最終的に、OP9 に接着した BaF/3 における tdTomato の発現が確認できた。このことから、血液細胞における接着可視化システムの動くことを明らかにした。現在、マウスモデルにおける造血幹細胞とニッチ細胞の接着可視化システムを構築中である。具体的には、Cre 誘導的に EGFP-ligand を発現するマウス (Ai9-EGFP-ligand マウス) を作成中である。このマウスとニッチ細胞特異的に Cre を発現するマウスとを交配し、ニッチ細胞特異的に EGFP-ligand を発現するマウスの作成を目指す。造血幹細胞側には BaF/3 と同様にレンチウイルスベクターにより SynNotch-GFP-tTA 受容体、TRE-tdTomato、tTS の導入を試みているが、造血幹細胞はアンチウイルス遺伝子が発現しているため感染効率が良くなかった。そこで、シクロスポリン H (造血幹細胞のウイルス抵抗性を軽減できる) を利用して感染効率の向上を検討している。複数のウイルス感染が必要なこと、SynNotch-GFP-tTA 受容体の発現レベルを最適化することから、造血幹細胞の未分化せいが維持できることで有名になった筑波大学山崎教授が開発した PVA を用いた造血幹細胞増幅培養系を導入し、様々な SynNotch-GFP-tTA 受容体の発現強度を持つクローンをストック中である。ニッチ細胞特異的 EGFP-ligand 発現マウスが完成する間に、OP9 細胞により検証を行う。

### 1. 接着可視化システムの構築

レンチウイルスにより BaF/3 細胞に LaG17\_synNotch\_TetRVP64、TRE-tdTomato、OP9 細胞に EGFP-ligand を導入した (図 1)。導入当初は、tdTomato の発現のリークが見られたことから、新たに tTS を BaF/3 細胞に導入した。後述する共培養実験に用いた BaF/3 細胞はセルソーターによりシングルセルクローニングし、LaG17\_synNotch\_TetRVP64 と tdTomato の発現の異なるクローンを複数準備したもののうちから最適なものを用いた。

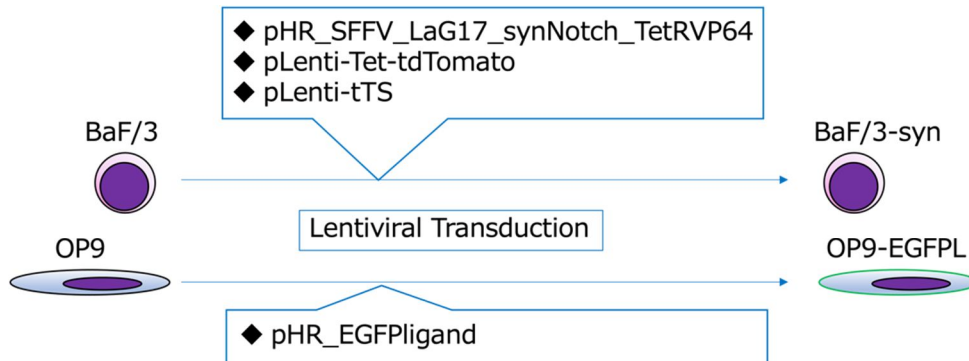


図1: BaF/3細胞とOP9細胞を用いた接着可視化システム構築

### 2. BaF/3 細胞と OP9 細胞との共培養によるシステムの動作確認。

BaF/3-syn 細胞と OP9-EGFP 細胞とを一晩共培養し、OP9-EGFP 細胞と接着している BaF/3-syn 細胞と接着せずに浮いている BaF/3-syn 細胞を回収し、FACS 解析により tdTomato の発現を確認することにより接着可視化システムの動作確認を行った。また、コントロールとして BaF/3-syn 細胞と野生型 OP9 細胞とを一晩共培養した。結果を図 2 に示す。OP9-EGFP 細胞と接着している BaF/3-syn 細胞に tdTomato 陽性細胞が多く確認された。このことから、接着可視化システムが動作していることが確認できたが、全体の 30%ほどしか発現が見られなかったことから、何らかのシステムの不具合が懸念された。おそらく、BaF/3 細胞に導入したいずれかのコンストラクトのサイレンシングが起っている可能性が考えられる。今後、100%の効率を目指して最適化を行う予定である。

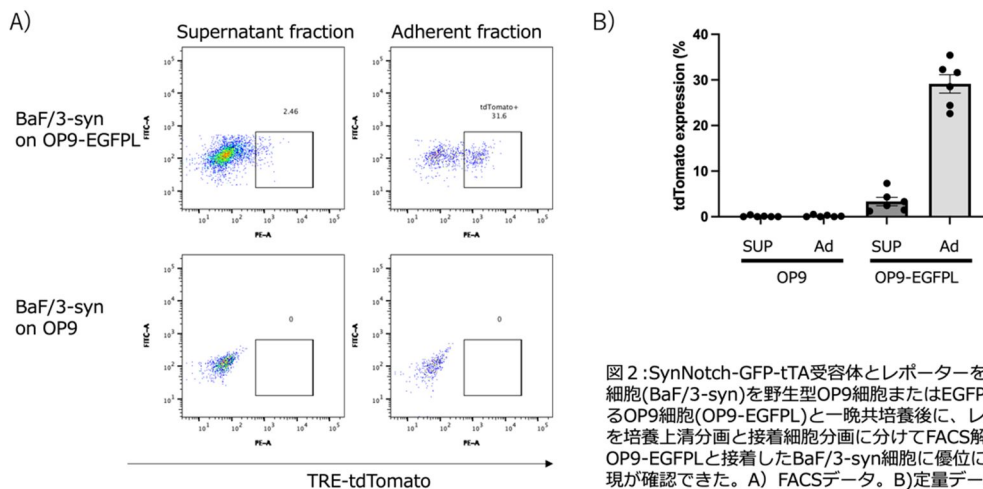


図 2: SynNotch-GFP-tTA 受容体とレポーターを発現する BaF/3 細胞 (BaF/3-syn) を野生型 OP9 細胞または EGFP-ligand を発現する OP9 細胞 (OP9-EGFP) と一晩共培養後に、レポーターの発現を培養上清分画と接着細胞分画に分けて FACS 解析を行った。OP9-EGFP と接着した BaF/3-syn 細胞に優位に tdTomato の発現が確認できた。A) FACS データ。B) 定量データ。

### 3. Ai9-EGFP-ligand マウスの作成

様々なニッチ細胞にだけ EGFP-ligand を発現するシステムを構築する必要がある。現在、様々なニッチ細胞特異的 Cre マウスが利用可能であることから、Cre 誘導的に EGFP-ligand を発現するマウス (Ai-EGFP-ligand) を作成することにした。現在、作成中である。

### 4. 造血幹細胞への接着可視化システムの導入

C57BL/6 マウスから造血幹細胞をセルソーターにより採取し、スピンインフェクションにより接着可視化システムのコンストラクトを導入中。導入効率が低いため、シクロスポリン H を用いた導入を試みているが、感染効率は 30% 弱である。BaF/3 細胞のときと同様に、LaG17\_synNotch\_TetRVP64 と tdTomato の発現を最適化するためにシングルセルクローニングを行う必要があるため、現在筑波大学山崎研究室との共同研究で造血幹細胞をシングルセルから増幅できる培養系を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------