

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790920

研究課題名（和文） 造血幹細胞の単一細胞単位での非対称分裂機構の解析

研究課題名（英文） Single cell Analysis of asymmetrical cell division of hematopoietic stem cell

研究代表者

細川 健太郎 (HOSOKAWA KENTARO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90569584

研究成果の概要(和文):我々は造血幹細胞の分裂から産生された一对の娘細胞(Paired Daughter Cells; PDCs)間における発現遺伝子の解析から、Tie2 の分子分配に着目した。Tie2 の各 PDC への分配は、定常時には非対称な分配が起こる一方で、活発な増殖期には均等な分配が起こることが分かった。また、Tie2 のリガンド Ang-1 による刺激は、非対称分裂を促進することも示唆された。本研究の知見は、造血幹細胞の分裂様式の操作や、幹細胞の増幅のための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文): We focused on the distribution of Tie2 on the Paired Daughter Cells (PDCs) of hematopoietic stem cells from the gene expression analysis data. The distribution pattern of Tie2 to PDCs was asymmetrically on steady state, on the other hand, it was symmetrically on the proliferative condition. Moreover, it was suggested that stimulation of Tie2 ligand, Ang-1 shifted the cell division pattern to asymmetric. It will be expected that the operation of cell division pattern of hematopoietic stem cells and stem cell expansion from this research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：造血幹細胞、非対称分裂、単一細胞、Tie2、Paired daughter cells、体外増幅

1. 研究開始当初の背景

- (1) 定常状態における成体骨髄内の造血幹細胞は、幹細胞ニッチに在って静止状態・未分化な状態で維持されており、極めて低頻度ではあるが分裂も行う。その際の分裂は、造血組織維持のためにニッチにおいて非対称に分裂すると考えら

れているが、とくに幼若期～成長期には造血組織の維持よりむしろ構築のために幹細胞の増幅が考えられ、実際にこの時期の幹細胞の細胞周期は活性化している。

- (2) これまでの成体造血幹細胞における分裂後の運命決定に関する研究から、培養

時にはサイトカインの存在が造血幹細胞の分化決定に影響を与え、Notch レポーターマウスを用いた観察システムにより造血幹/前駆細胞の分裂様式は支持環境によって変化することが明らかになっている。またヒト造血幹/前駆細胞でも分子を振り分けつつ非対称分裂を行うことが報告されている。

2. 研究の目的

造血幹細胞の自己複製における非対称分裂には、特定の分子の分配が起こると仮定し、発現する分子の発現量を単一細胞単位において解析する系を用いて、造血幹細胞の非対称分裂機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PDC の網羅的遺伝子発現解析：

本研究においては、一回分裂後の造血幹細胞のPDCをマイクロマニピュレーターシステムを用いて個別に採取する。その後、集積流体回路技術(IFC: Integrated Fluidic Circuit) を応用したデジタルPCR法 (BioMark システム、Dynamic Array および Digital Array) により、単一細胞レベルで各PDC同士の遺伝子発現プロファイリングの比較を行った。

(2) PDC のタンパク質レベルでの解析：

PDCを確認後、幹細胞特異的な分子の免疫染色を行い、それぞれのPDCごとに各分子の分配パターンの統計解析を行った。

(3) 造血幹細胞の Ang-1 刺激と移植による骨髄再構築能の検討：

造血幹細胞を SCF、THPO および Ang-1 存在下で1週間培養し、そのサンプルを用いて骨髄移植を行った。

4. 研究成果

- (1) 我々はまず厳密に純化された造血幹細胞1個から産生されたPDCを、単一細胞単位で遺伝子発現解析するための解析系を構築した。この解析には、従来の表面抗原の組合せだけでなく、未分化造血幹細胞のマーカであるEvi-1のノックイン GFP マウスの細胞を用いて行った。
- (2) 一回分裂後の各PDC間における発現遺伝子プロファイルの比較を行った。すると、遺伝子種によって発現パターンが対称的なものと非対称的なものとに区別できることが分かった。ここで非対称な分配を受けるものとしては Tie2、Numb、Notch1、Hoxb4、Foxo 遺伝子、p16INK4A、p21 などがあった。このうち特に Tie2 の発現は、PDC 間において非対称な分配の差が顕著であった。即ち、分裂後に未分化な母細胞に近い発現パターンを示す娘細胞側に Tie2 の発現が維持されることが考えられる。
- (3) (2)の結果を受け、Tie2 を指標とした造血幹細胞の細胞分裂制御について遺伝子およびタンパク質レベルでの発現解析を試みた。対称・非対称分裂の制御について検討するために、対象として増殖期の幹細胞モデルおよび、定常状態(コントロール)の幹細胞を用いて実験を行った。増殖期の幹細胞モデルとして5-FU投与後8日目の造血幹細胞を用い、各PDC間における遺伝子発現パターンの比較を行った。コントロールPDC間では非対称的に発現する Tie2 が、増殖期の幹細胞では対称的に発現することが分かった。一方で、この増殖期の造血幹細胞の発現パターンについて、免疫染色法を用いて分子の分配様式について解析を行ったところ、Tie2、あるいは CD48 と

いった造血幹細胞マーカーは対称的に分配が起こることが分かった。これらの結果から、造血幹細胞の分裂において、Tie2 の発現は未分化な幹細胞側にのみ分配され、増殖期には均等に Tie2 が発現することが明らかになった。

- (4) Tie2 のリガンドである Angiopoietin-1 (Ang-1) を ex vivo 培養下において添加することで、造血幹細胞の分裂様式に与える影響を PDC 間の発現遺伝子の解析から検討した。すると、Ang-1 非添加群に比べ、添加群では非対称に分裂する PDC が増加することが分かった。このことから、分裂前の Tie2/Ang-1 シグナルの増強は幹細胞の分裂様式を非対称なものにシフトさせることが示唆された。また、我々は、造血幹細胞の培養下において Ang-1 を添加することで、骨髄再構築能を維持できることを示しており (Gomei et al., Exp. Hematol., 2010)、これらの結果から、Tie2/Ang-1 シグナルの増強は、造血幹細胞の非対称分裂を促進することが考えられる。
- (5) 以上より本研究において我々は、幹細胞の採取法の改善によって、従来よりも精密な網羅的遺伝子解析系および、タンパク質レベルで確認する系を確立できた。また、定常状態においては不均等に分配される分子 (Tie2 など) が、造血幹細胞増殖期モデルにおいては、分配のされ方が対称的に変化することを見出し、さらに Tie2/Ang-1 シグナルが造血幹細胞における非対称性の分裂を促進することを見出した。これらの結果から我々は、造血幹細胞の増幅や操作に關与する分子の特定とその機能解析に關する基盤を確立できたと考えられる。

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6件)

Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, Tai I, Shinmyozu K, Tsukahara F, Maru Y, Nakayama K, Nakayama KI, Suda T. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell Stem Cell. (査読有), 9(3), 2011, 247-261.

Nitta E, Yamashita M, Hosokawa K, Xian M, Takubo K, Arai F, Nakada S, Suda T. Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. Blood. (査読有), 117(16) 2011, 4169-4180.

Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kobayashi I, Gomei Y, Matsumoto Y, Yoshihara H, Suda T. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. Blood. (査読有), 116(9), 2010, 1422-1432.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Nakamura Y, Gomei Y, Suda T. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. Blood. (査読有), 116(4), 2010, 554-563.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Hembree M, Yin T, Nakamura Y, Gomei Y, Takubo K, Shiama H,

Matsuoka S, Li L, Suda T. Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. Cell Stem Cell. (査読有), 6(3), 2010, 194-198.

Gomei Y, Nakamura Y, Yoshihara H, Hosokawa K, Iwasaki H, Suda T, Arai F. Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells. Exp Hematol. (査読有), 38, 2010, 82-89.

[学会発表](計3件)

Hosokawa K, Arai F, Nojima Y and Suda T. Function of Protection of Telomere (POT1) in the maintenance of hematopoietic stem cells. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine Sep. 8-9 2011 Kumamoto (Japan)

Hosokawa K, Arai F, Nojima Y and Suda T. Function of Protection of Telomere (Pot1) in the maintenance of hematopoietic stem cells. 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24~26日 横浜(神奈川)

Hosokawa K, Arai F, Nojima Y and Suda T. FUNCTION OF PROTECTION OF TELOMERE (POT1) IN THE MAINTENANCE OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS. ISEH 2010 Meeting. Aug. 15-18 2010 Melbourne (Australia)

[その他]

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/cellldiff/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 健太郎 (HOSOKAWA KENTARO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 90569584