

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390256

研究課題名(和文)造血幹細胞の骨髄ニッチ脱着を制御する新規分子群の役割

研究課題名(英文) Characterization and exploration of bone marrow niche regulators for hematopoietic stem cells

研究代表者

原 孝彦 (HARA, Takahiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・プロジェクトリーダー(参事研究員)

研究者番号：80280949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞(HSCs)が骨髄ニッチに結合する仕組みを理解するために、CXCL14とCMG-1の機能を解析し、転写因子Lhx2の下流エフェクターを探索した。まず、CXCL14がCXCR4に高親和性で結合し、CXCL12依存的な造血前駆細胞の細胞移動をブロックすることを発見した。しかし、CXCL14-KOマウスの骨髄HSCに大きな異常はなかった。造血系特異的なCMG-1-KOマウスにおいても、骨髄HSCの減少は観察されなかった。最後に、Lhx2によってHSCを体外増幅する実験系を用いて、HSCの未分化性と関連する膜タンパク質を探索し、Biglycan, Esam1, Jam3などを同定した。

研究成果の概要(英文)：To understand how hematopoietic stem cells (HSCs) interact with bone marrow niche, we investigated functions of chemokine CXCL14 and cilia protein CMG-1, and searched for downstream effect or molecules of the HSC-acting transcription factor Lhx2. We discovered that CXCL14 binds to CXCR4 with high affinity and completely inhibits the CXCL12-mediated migration of hematopoietic progenitor cells. However, number and frequency of bone marrow HSCs in CXCL14 knockout mice were similar as those in wild type mice. Same thing was true in bone marrows of HSC-specific CMG-1 conditional knockout mice. Lastly, we searched for membrane proteins that are relevant to the undifferentiated status of HSCs by using an Lhx2-triggered HSC expansion culture of ES cells. As a result, we identified several candidate genes such as Biglycan, Esam1, and Jam3.

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 骨髄ニッチ

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 Hematopoietic stem cells (HSCs) は、骨髄ニッチに結合して分裂静止状態を保っているが、一部は transit-amplifying cell となって増殖し、系統特異的な造血前駆細胞へと分化していく。幹細胞は非常に強い増殖能を持つため、ニッチを介した細胞分裂の抑制は、幹細胞自体をがん化させないために必須な組織機能でもある。造血幹細胞の骨髄ニッチへの結合には、CXCR4, CD44, c-Kit, VLA-4, N-cadherin, 1型コラーゲン受容体などの膜タンパク質が、重要な働きをしている。この分野の研究はとて進んでいるが、造血幹細胞がニッチから離脱するとき、上記の膜タンパク質がどのようにして発現抑制されるのかについては、まだ十分わかっていない。造血幹細胞と骨髄ニッチとの結合を弱めると、造血幹細胞が末梢血へと動員されて採取しやすくなることから、その分子メカニズムを理解することは、臨床応用の視点からも有益である。そこで本研究では、CXCR4 と 1型コラーゲン受容体の機能を制御する分子に焦点を当て、それらの生理的機能を検証する。さらに、申請者が最近開発した ES 細胞から造血幹細胞を *in vitro* 誘導する実験系を用いて、新しいニッチ結合関連分子の探索研究を実施する。

2. 研究目的

これまでの研究により、HSC を骨髄ニッチに誘引し定着させるプロセスには、ケモカイン CXCL12 と 1型コラーゲン受容体が必須の役割を果たしていることが明らかにされている。本研究では、これらの分子の機能と密接に関係するケモカイン CXCL14 と転写調節因子 CMG-1 に焦点を当て、HSC の骨髄ニッチ脱着に関わる新たな分子調節機構にアプローチした。また、ES 細胞から HSC を効率的に分化誘導する転写因子 Lhx2 の下流エフェクター探索を行う。これらの実験を通じて、HSC および白血病幹細胞の末梢血動員を促進する新しい方法を考案することを目的とした。

3. 研究方法

C57BL/6 マウスと SCID マウスは、日本クレアより購入した。CXCL14 ノックアウト (KO) マウスは、CXCL14(-/-)雄と CXCL14(+/-)雌マウスと交配によって作出した。すべての動物実験とウイルスベクター感染実験は、都医学研の動物倫理委員会、および遺伝子組換え生物安全委員会にて承認されたプロトコールに則って実施した。

骨髄 HSC は成獣マウスの大腿骨と腓骨から回収し、各種の抗体染色の後、FACS Aria III (BD Biosciences) を用いて解析した。HSC は c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻、CMP (骨髄球系共通前駆細胞) は Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺FcgR⁺CD34^{dull}、GMP (顆粒球・マクローファージ前駆細胞) は

Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺FcgR⁺CD34^{dull} 陰性、MEP (巨核球・赤芽球前駆細胞) は Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺FcgR⁺CD34⁺ 分画にそれぞれ回収した。

RNA 解析では、まず細胞をトライゾルに溶かし、クロロホルムを加え遠心し上清を回収した。上清をイソプロパノール沈殿することで RNA を得た。この RNA を逆転写反応させ cDNA を合成した。これを目的遺伝子のプライマーを用いて PCR 反応に供した。定量的 RT-PCR には、LightCycler 480 system (Roche) を用いた。

走化性試験には、Chemotaxicell チャンバー (Kurabo, 5μ ポア) を用い、細胞を載せて 37°C で 2 時間保温した。その後 Diff-quick にて染色し、チャンバーからウェル中に落下した細胞とチャンバー膜の裏側に移動した細胞数をカウントし合算した。

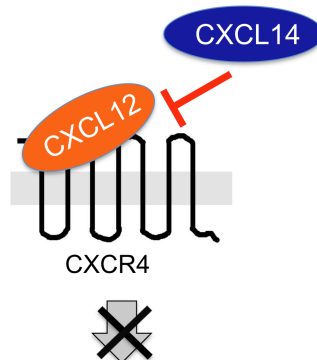
CXCL14 受容体と CXCL14 シグナル伝達系の解析には、CXCR4 cDNA を過剰発現させたヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を用いた。受容体への結合試験には、¹²⁵I 標識 CXCL14、または ¹²⁵I 標識 CXCL12 を用いた。

HSC における Lhx2 の機能を調べる実験には、Dox によって Lhx2 発現をオンオフできる A2Lox-iLhx2 ES 細胞を用いた。HSC 体外増幅目的には OP9 ストロマ細胞を、T 細胞の分化実験には OP9-DL1 ストロマ細胞をそれぞれ用いた。

4. 研究成果

CXCL14 は CXCL12 の natural inhibitor である

CXCL14 は肥満性糖尿病の悪化に関与し、また上皮性腫瘍の増殖抑制にも働くユニークなケモカインである。CXCL14 受容体の候補 GPCR のノックダウン実験によって、CXCL14 の機能には、CXCL12 受容体である CXCR4 が必須であることを発見した。興味深いことに、CXCL14 は CXCR4 に高親和性で結合し、CXCL12 依存的な造血前駆細胞の移動を完全にブロックした (図 1)。



造血幹細胞の誘引、癌細胞の増殖転移

図1. CXCL14によるCXCL12-CXCR4シグナル伝達系の抑制作用メカニズムを模式的に表した。

CXCL14 と CXCL12 の結合場所は異なり、CXCL14 は CXCR4 の internalization を誘導することで細胞を CXCL12 不応性にさせていた。しかし CXCR4 単独では CXCL14 のシグナル伝達には不十分であった。CXCL14 の生理的機能は、CXCL12 の活性阻害、あるいは CXCL14 特異的受容体の活性化のいずれかを介するものと推察される。

CXCL14-KO マウスの HSC 動態

HSC の CXCL14 に対する走化性を解析したところ、HSC は CXCL12 に誘引されたのに対して、CXCL14 には反応しなかった。HSC のニッチ定着に対する CXCL14 の間接的関与を疑って、HSC や様々な造血前駆細胞集団の存在比率を、CXCL14-KO マウスと野生型マウスとで比較解析した。その結果、CXCL14-KO マウスの骨髄 HSC の数と存在比率は、WT マウスと比べて減少傾向にはあるものの有意な差を示さなかった (図 2)。

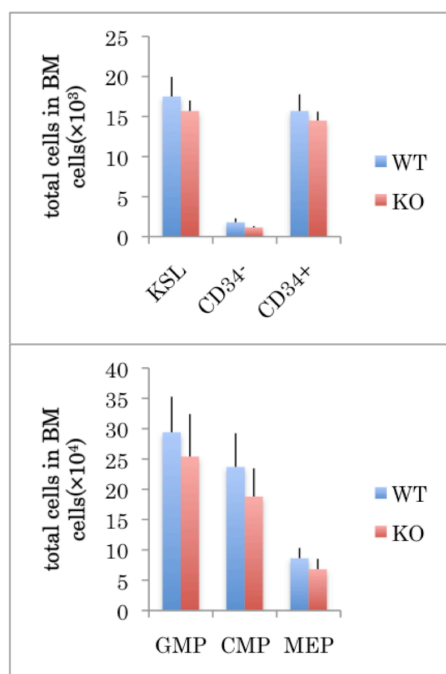


図2. CXCL14ノックアウトマウス骨髄における造血幹細胞・造血前駆細胞の存在比率
実験には、23週齢の雄マウスを用い (n=3)、数値はFACSデータに基づいて算出した。WT:野生型マウス;KO: CXCL14ノックアウトマウス;KSL:造血幹細胞を含むc-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻分画。

したがって、骨髄ニッチにおける定常的な HSC 維持に、CXCL14 は関与していない。しかしながら、CXCL14-KO マウスでは、骨芽細胞や血管内皮細胞などのニッチ構成細胞を含む CD45 陰性細胞の割合が WT マウスよりも減少していたことから、CXCL14 が骨髄環境形成に何らかの役割を果たしている可能性は残されている。

CXCL14 発現場所を可視化するマウス

骨髄ニッチにおける CXCL14 の発現場所

を明確にする目的で、CXCL14 遺伝子プロモーター直下に TdTomato 遺伝子を挿入した BAC トランスジェニックマウス系統を作出した。各種臓器の凍結切片を作り、TdTomato 発現細胞の局在を共焦点蛍光顕微鏡にて探索した。しかし、蛍光シグナルは極めて微弱であったため、CXCL12 との二重蛍光染色に使える材料にはならなかった。

CMG-1 欠損マウスの造血系

CMG-1 遺伝子は絨毛の構成タンパク質であるが、integrin- α 1, integrin- α 2, integrin- α 10, integrin- α 11 遺伝子の転写を正に制御する役割を我々は報告してきた。これらは、1型コラーゲン受容体のサブユニットである。そこで、コンディショナルノックアウト(CKO)マウスを用いて、CMG-1 が HSC のニッチ定着に必要などうか検討した。胎生期 HSC に作用する Cre トランスジェニックマウスを用いて、Tie2-Cre:CMG-1^{Flox/Flox} マウスを3頭作出した。これらのマウスはメンデルの比率で生まれ、明らかな健康障害は認められなかった。上記 CKO マウスの骨髄における HSC や各種造血前駆細胞の総数・比率を CMG-1^{Flox/Flox} マウスと比較したところ、どの分画においても有意な差は検出されなかった。残念ながら、CMG-1 遺伝子は造血幹細胞の機能維持に必須ではないと結論した。相補遺伝子、あるいは別の制御経路の働きによって、CMG-1 非存在下でも HSC の1型コラーゲン受容体レベルが下がらない可能性が推測される。

Lhx2 は ES 細胞由来の HSC-like cells を体外増幅する

Lhx2 は毛根幹細胞の自己複製に関与する LIM ホメオボックス型転写制御因子である。マウス ES/iPS 細胞由来の中胚葉細胞に Lhx2 を遺伝子導入し、OP9 ストロマ細胞との共培養によって造血系へ分化誘導すると、c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻細胞が大量に増加する。この HSC-like cells を放射線照射した同系マウスに移植したところ、T 細胞を除くすべての系統の成熟血液細胞がドナーから *in vivo* 分化し、長期に維持された。骨髄再建細胞の二次移植も成立し、これらの骨髄キメラマウスは白血病を発症しなかった。これらの実験結果は、Lhx2 はマウス ES/iPS 細胞から長期骨髄再建性 HSC を効率的に分化誘導するパワフルな分子ツールであることを証明している。

Lhx2 による HSC-like cells 体外増幅の分子機序

A2Lox-iLhx2 ES 細胞を用いて、Dox 添加 (Lhx2 過剰発現) による HSC-like cells の体外増幅メカニズムを解析した。まず最初に、Lhx2 は造血性血管内皮細胞 Hemogenic endothelial cells (HECs)からの HSC 出芽を促進するのではなく、pre-HSC である c-Kit⁺CD41⁺細胞の自己複製を強力に促進することを実験的に証明した。これは、別の転

写制御因子 *Gata2* が HSC の出芽頻度を約 3 倍高めたのと対照的である。過剰量の *Lhx2* は、血液細胞の系統分化開始に必須な *Lmo2-Ldb1* 複合体から *Lmo2* タンパク質をキックアウトし、ユビキチン-プロテアソーム系による急速なタンパク質分解を誘導した。また、*Lhx2* は *Gata3* を転写誘導し、*Gata3* の継続的発現によって血液細胞の系統分化がブロックされた。*Lhx2* 発現をオフにすると、*Hesx1*, *Tcf3*, *Fhl1*, *Sox4*, *Ebf2* といった他の転写因子の発現レベルも半分以下になった。したがって、*Lhx2* の過剰発現は、*Gata3* だけでなく、HSC の自己複製と分化阻害に関わる数多くの転写制御因子の発現にも影響を与えるものと推察される。

Lhx2 によって誘導された HSC-like cells の T 細胞分化能

A2Lox-iLhx2 ES 細胞から Dox 添加培養によって体外増幅した HSC-like cells を放射線照射した SCID マウスへ移植し、Dox を含む水を与えて 4 週間飼育した。末梢血の骨髓球や赤芽球の 80% 以上がドナー由来になっていたが、以前の実験結果通り、ドナー由来の T 細胞は検出されなかった。これは T 前駆細胞の自己複製に必要な *Lmo2* を *Lhx2* が分解してしまうことが主な原因と考えられる。しかし、驚くべきことに、飲料水から Dox を除去して飼育したところ、3 週間の内に、末梢血と胸腺にドナー由来の $CD4^+$ 、あるいは $CD8^+$ T 細胞が大量に出現してきた。*Lhx2* 過剰発現状態では、T 細胞分化は DN3 ステージで停止しており、*Lhx2* 発現をオフにすることによって、T 細胞分化が急速に再開されたも

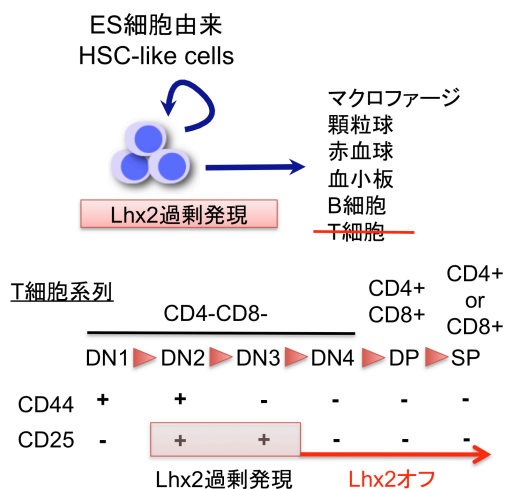


図3. *Lhx2* 発現によって誘導した HSC-like cells の多分化能

この HSC-like cells は自己複製し、T 細胞以外のすべての血液細胞を *in vivo* で作り出せる。*Lhx2* 存在下では T 細胞分化が途中で止まってしまうが、*Lhx2* の発現をオフにすれば、成熟 T 細胞への分化が再開する。

のと推測される。これは、*Lhx2* 過剰発現によって ES 細胞から誘導した HSC-like cells が、すべての系統の血液細胞を *in vivo* で作り出せることを証明する結果である (図 3)。

HSC の骨髓ニッチ定着と関連する分子の探索

A2Lox-iLhx2 ES 細胞から Dox 添加によって体外増幅した HSC-like cells は、Dox を除去すると 3 日以内にすべてが分化し、 Lin^+ となる。そこで、マイクロアレイを用いて Dox を除去したときに発現低下する mRNA を網羅的に解析した。膜タンパク質をコードする遺伝子の中では、*Biglycan*, *Esam1*, *Jam3*, *Tek*, *Mpl*, *integrin- α 9*, *integrin- α 6*, *CD34* 等の発現レベルが 2.5 倍以上低下していた。これらは、HSC の骨髓ニッチ定着と関係している可能性がある。

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 7 件)

1. T. Hara and K. Tanegashima. CXCL14 antagonizes the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *BioMol. Concepts*, 5: 167-173, 2014. (査読有)
2. K. Kitajima, M. Kawaguchi, M. Iacovino, M. Kyba, and T. Hara. Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor *Lhx2* in hematopoietic progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 31: 2680-2689, 2013. (査読有)
3. K. Tanegashima, K. Tsuji, K. Suzuki, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. Dimeric peptides of the C-terminal region of CXCL14 function as CXCL12 inhibitors. *FEBS Letters*, 587: 3770-3775, 2013. (査読有)
4. K. Tanegashima, K. Suzuki, Y. Nakayama, K. Tsuji, A. Shigenaga, A. Otaka, and T. Hara. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Letters*, 587: 1731-1735, 2013. (査読有)
5. K. Tsuji, K. Tanegashima, A. Shigenaga, K. Aihara, M. Denda, H. Ding, T. Hara, and A. Otaka. Synthesis of antagonistic peptide for putative CXCL14 receptor protein and their identification. *Peptide Science*, p31-32, 2013. (査読無)
6. T. Hara and K. Tanegashima. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. *J. Biochem.*, 151: 469-476, 2012. (査読有)
7. 原 孝彦, 北島健二: ES 細胞・iPS 細胞から機能的な血液細胞を作り出す方法. 羊土社. *実験医学*(増刊号), 30: 1671-1676, 2012. (査読無)

[学会発表] (計 16 件)

1. 種子島幸祐, 鈴木健司, 辻 耕平, 重永章, 大高 章, 原 孝彦. ケモカイン CXCL14 は、CXCL12-CXCR4 シグナル経路を阻害する. 第 36 回日本分子生物学会年会,

- 2013.12.3-6, 神戸.
2. 川口真実, 北島健二, 原 孝彦. Gata2 は hemogenic endothelial cells からの血液細胞出芽を促進する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-6, 神戸.
 3. 宮下和也, 北島健二, 原 孝彦. 転写制御因子 Lhx2 は急性 T リンパ芽球性白血病細胞の増殖を抑制する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-6, 神戸.
 4. *K. Kitajima, M. Kawaguchi, K. Miyashita, and T. Hara. In vitro induction of HSC-like cells from mouse ESCs/iPSCs by a transcription factor Lhx2. 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013.10.11-13, 札幌. (*口頭発表)
 5. K. Kitajima, M. Kawaguchi, K. Miyashita, M. Iacovino, M. Kyba, and *T. Hara. Molecular mechanisms of the *Lhx2*-mediated generation of hematopoietic stem cell-like cells from murine ES/iPS cells. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, 横浜. (*シンポジウム招待講演)
 6. *K. Kitajima, M. Kawaguchi, M. Iacovino, M. Kyba, and T. Hara. Molecular functions of the LIM-homeobox transcription factor Lhx2 in hematopoietic stem-like cell differentiation from mouse embryonic stem cells. 第 11 回幹細胞シンポジウム, 2013.5.17-18, 本郷. (*口頭発表)
 7. K. Tanegashima, K. Suzuki, T. Nagasawa, and T. Hara. Identification of The CXCL14 Receptor: CXCL14 is a Natural Inhibitor of The CXCL12/CXCR4 Axis. 第 11 回幹細胞シンポジウム, 2013.5.17-18, 本郷.
 8. *原 孝彦, 種子島幸祐, 鈴木健司, 辻 耕平, 重永 章, 長澤丘司, 大高 章. CXCL12-CXCR4 軸を介した幹細胞誘引の調節因子. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013.3.21-23, 福岡. (*シンポジウム招待講演)
 9. K. Kitajima, M. Kawaguchi, K. Miyashita, M. Iacovino, M. Kyba, and *T. Hara. Molecular mechanisms of the *Lhx2*-mediated generation of HSC-like cells from embryonic stem cells. 2nd IGAKUKEN International Symposium on Hematopoietic Stem Cell Development, 2013.2.8, Tokyo. (*シンポジウム招待講演)
 10. *北島健二, 川口真実, 榎山和沙, M. Kyba, 原 孝彦. Induction of hematopoietic stem-like cells from mouse pluripotent stem cells by LIM-homeobox transcription factor Lhx2. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.11-14, 福岡. (*ワークショップ口頭発表)
 11. 川口真実, 北島健二, M. Kyba, 原 孝彦. 転写因子 Lhx2 の強制発現はマウス ES 細胞からの原始造血前駆細胞分化を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012.12.11-14, 福岡.
 12. K. Kitajima, M. Kyba, and T. Hara. Underlying mechanisms of the in vitro induction of hematopoietic stem cell-like cells from mouse embryonic stem cells by Lim-homeobox transcription factor, Lhx2. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2012.6.13-16, Yokohama.
 13. *T. Hara, K. Tanegashima, K. Tsuji, K. Suzuki, Y. Nakayama, A. Shigenaga, T. Nagasawa, M. Mori, and A. Otaka. CXCL14 acts as a natural inhibitor for CXCL12/CXCR4 signaling. Gordon Research Conference "Chemotactic Cytokines", 2012.5.27 -6.1, Il Ciocco, Italy. (*Oral presentation)
 14. 鈴木健司, 種子島幸祐, 中山由紀, 重永 章, 長澤丘司, 大高 章, 森 正明, 原 孝彦. Identification of G protein coupled receptors which constitute the functional CXCL14 receptors. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜.
 15. 北島健二, 原 孝彦. Effects of ectopic expression of LIM-homeobox transcription factor *lhx2* on *in vitro* differentiation of ESCs/iPSCs. 第 44 回日本発生物学会年会, 2011.5.18-21, 宜野湾.
 16. K. Kitajima and T. Hara. *In vivo* analyses of mouse iPSC-derived HSC-like cells generated by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor *Lhx2*. 第 9 回幹細胞シンポジウム, 2011.5.13-14, 六本木.
- [その他]
ホームページ等
<http://www.igakuken.or.jp/stem-cell/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
原 孝彦 (HARA, Takahiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・幹細胞プロジェクトリーダー (参事研究員)
研究者番号 : 80280949
 - (2) 研究分担者
北島 健二 (KITAJIMA, Kenji)
公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員
研究者番号 : 10346132
 - (3) 連携研究者
なし