

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791075

研究課題名（和文）造血幹細胞における Dlk1-Dio3 領域の microRNA 群の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of function of microRNAs in Dlk1-Dio3 region in hematopoietic stem cells

研究代表者

山本 玲（YAMAMOTO RYO）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：00581191

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞（CD34⁺KSL）において、CD150 の発現と自己複製能が相関することが知られている。CD150⁺CD34⁺KSL に特異的に発現する microRNA（Dlk1-Dio3 領域などに含まれる）を同定し、強制発現の系を利用して造血幹細胞の自己複製能を増幅させるもののスクリーニングを行った。自己複製能に関与する microRNA の同定には至らなかったが、候補 microRNA は、すでに巨核球など、より分化血球細胞に発現するものも存在し、造血幹細胞画分がヘテロな集団であることが推測された。実際、白血球だけでなく赤血球・血小板も蛍光タンパクで標識されたマウスを用いて CD34⁺KSL 細胞の単一細胞移植を行った。CD150⁺CD34⁺KSL 画分には、全血球を出す造血幹細胞以外に、骨髄球系細胞（顆粒球・赤血球・血小板）のみを産生する細胞集団が存在し、一方、CD150⁺CD34⁺KSL 画分は大多数が造血幹細胞であることが明らかとなった。上記、microRNA は、自己複製よりむしろ分化決定に関与する可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cells (HSCs, CD34⁺KSL) have self-renewal activity and multipotency. CD150⁺ cells in CD34⁺KSL fraction have long-term and myeloid-biased repopulating activity. We have identified microRNAs specific to CD150⁺CD34⁺KSL fraction and transplanted microRNA-transduced CD34⁺KSLs into lethally-irradiated mice. However, we could not detect microRNAs that expanded self-renewal activity. This is, in part, due to HSC heterogeneity because candidate microRNAs have been reported to be expressed in megakaryocytes. To assess this, we performed single-cell transplantation of bone marrows from mice in which all mature blood cells express fluorescent protein. We detected myeloid-restricted repopulating cells in addition to full-lineage HSC in HSC fraction, suggesting that some of candidate microRNAs have a role in lineage commitment rather than self-renewal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、自己複製能、多分化能、microRNA

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)は、様々な血液細胞に分化する能力

(多分化能)と多分化能を維持したまま自己を複製する能力(自己複製能)を有している。HSC の自己複製能に関わる分子の

同定を目的とした遺伝子発現の比較解析が複数のグループより報告されている。しかし、自己複製能を制御している詳細な分子機構は不明であり、少数の分子の関与が明らかとなっている。

HSC は CD34^c-Kit⁺Sca1⁺Lineage marker (CD34-KSL)画分に濃縮されるが、CD34-KSL 画分を CD150 の発現強度 (high, med, low) で分けた場合、CD150^{high}画分は、自己複製能が高いが、CD150^{low}画分は、自己複製能が低いことが分かっている (Morita ら, JEM, 2010)。このように造血幹細胞においても自己複製能に差異が存在する。そこで我々は、その分子機構を解明するために HSC・造血前駆細胞 (CD150^{high}/CD150^{med}/CD150^{low}CD34-KSL・CD34-KSL) の 4 画分の遺伝子発現の比較解析を行った。しかし、このアプローチのみでは、HSC の自己複製能に関与する分子を新たに同定することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、HSC の亜画分 (CD150^{high}/CD150^{med}/CD150^{low}CD34-KSL) 及び造血前駆細胞 (CD34-KSL) における microRNA の発現解析を行い、自己複製能の高い HSC 画分 (CD150^{high}CD34-KSL) において高発現する microRNA を抽出する。この候補 microRNA より HSC の自己複製能あるいは血球分化に関与するものをスクリーニングすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HSC に特異的な発現を示す microRNA の同定

HSC 画分 (CD34-KSL) を CD150 の発現強度 (high, med, low) に基づき 3 画分に分け、ソーティングを行う (CD150^{high}・CD150^{med}・CD150^{low}CD34-KSL)。さらに造血前駆細胞 (CD34-KSL) を分取する。以上の 4 画分の microRNA の発現アレイを行う。

(2) microRNA 強制発現による移植実験

候補 microRNA の強制発現レトロウイルスベクターを作成する。ソーティングした B6-Ly5.1 マウスの CD34-KSL 細胞 50 個にこれらのウイルスベクターを感染導入し、競合細胞として 2×10^5 個の B6-Ly5.1xLy5.2-F1 マウスの骨髓細胞と共に致死量放射線照射されたレシピエント B6-Ly5.2 マウスに骨髓移植を行った。その後、4 週間毎に末梢血の白血球画分におけるキメリズムを測定し、in vivo における自己複製能・分化能への影響を評価する。

(3) CD34-KSL 画分の機能評価アッセイ

これまでの移植系では、Ly5.1/Ly5.2 congenic system を用いているため白血球などの有核細胞以外の成熟血球 (赤血球・血小板) を観察していなかった。赤血球・血小板への分化は、in vitro アッセイが主な評価系であった。そこで我々は、in vivo で 3 系統血球を観察できる Ku0 マウス (全血球で Kusabira Orange が発現している) を用いることとした。この Ku0 マウスより骨髓を採取し、HSC 画分 (CD150⁺CD41⁻CD34-KSL あるいは CD150⁻CD41⁻CD34-KSL 細胞) を単一細胞分取し、移植を行った。

4. 研究成果

(1) HSC 画分に特徴的な microRNA の同定
CD150^{high-med}CD34-KSL 画分に高発現の認められる microRNA (miR224, miR410, miR34a, miR10a, miR130a などや Dlk1-Dio3 領域内の miR) を同定し、これら候補 microRNA の強制発現レトロウイルスベクターを作成した。また、これらは、HSC の自己複製に関与すると仮説を立てた。

(2) in vivo における機能アッセイ

作成したレトロウイルスベクターをマウスに移植を行い、ドナー細胞のキメリズムが上昇するか移植後 16 週まで検討したが、そのような microRNA は認められなかった。

これまで、HSC (CD150+CD34-KSL) に特異的な遺伝子・microRNA のスクリーニングにより自己複製能に関わるものの同定は成功していない。その要因として、この HSC 画分は我々が予想するよりヘテロな集団であることが考えられる。実際、(1) の CD150^{high-med}CD34-KSL 画分に特異的な microRNA の中には、他の血球系譜 (巨核球系など) での機能が報告されているものも散見された。

そこで、本研究で用いた HSC 画分の heterogeneity を再評価することとした。

(3) CD34-KSL 画分の単一細胞移植

全血球系譜 (白血球・赤血球・血小板) をマーキングした Ku0 マウスの CD34-KSL 画分の単一細胞移植を行った。その結果、CD150⁺CD41⁻CD34-KSL 画分には、full lineage reconstitution を認めるものは、約 50% しか存在せず、他は、myeloid-restricted lineage (CMP タイプ、MEP タイプあるいは MkP タイプ) に相当する血球の再構築を認めた。一方、より自己複製能の弱いとこれまで報告されている画分 CD150⁻CD41⁻CD34-KSL 画分においては、大多数が full-lineage の血液再構築を認めた。つまり、単一細胞移植により、CD150+CD34-KSL 画分は、非常にヘテロな集団であり、一方、CD150⁻CD34-KSL は、比較的均質な集団であることが明らかとなった。つまり、CD34-KSL を CD150 の発現強度により画分

し、各集団における microRNA の発現比較により抽出された候補は、自己複製能に関与するというよりむしろ分化系譜に関与する可能性が推測できる。今後、白血球以外に赤血球・血小板の分化も追跡できる Ku0 マウスを用い、これらの microRNA の強制発現により機能アッセイを行うことによってその機能が明らかになることが期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

Ryo Yamamoto, Myeloid lineage commitment in hematopoietic stem cells, ISSCR, 2012/6/15, パシフィコ横浜 (横浜)

Ryo Yamamoto, Earliest lineage commitment in hematopoietic stem cells, 分子生物学会, 2015/12/13, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡)

Ryo Yamamoto, In vivo clonal analysis of hematopoietic stem cells unveils novel non-stepwise differentiation pathways, 2013/1/18, Steamboat Springs, USA

山本 玲, 造血幹細胞の新規分化経路 (myeloid bypass pathway) の同定、2013/3/22, パシフィコ横浜 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 玲 (YAMAMOTO RYO)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号 : 00581191

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :