

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659127

研究課題名(和文)シグナル応答性を指標とした造血幹細胞の新たな細分画法の確立

研究課題名(英文)A new method to sub-fractionate hematopoietic stem cells based on signal response characteristics

研究代表者

大津 真(OTSU, MAKOTO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30361330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本課題においては、細胞内シグナル応答性プローブを幹細胞に応用する新しい試みとして研究を行った。対象をキナーゼ応答性プローブと造血幹細胞の組み合わせとし、特定のシグナルに応答してリン酸化されることで蛍光を発する(あるいは変化する)プローブを細胞内に導入し、異なる反応性を示す細胞集団を生きたまま分取する技術を用いて、既存の方法では検出し得なかった新たな造血幹細胞の亜分画の同定を目指した。種々の技術的困難に対して改良を重ね、研究期間において次なる成果へとつなげるための研究基盤を確立することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this project we have aimed at the development of a new method to isolate previously unidentified subfractions in hematopoietic stem cells (HSC) by utilizing their varying responsiveness to a certain cytokine signal. Intracellular markers have been developed as the fluorescent nanoparticles containing peptide substrates for certain kinases. After screening candidate peptide substrates, the synthesized marker will be introduced into HSC to detect and/or subfractionate them for characterization.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：造血幹細胞 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の進歩は目覚しく、特に造血幹細胞はその純化、臨床応用が最も進んでいる体性幹細胞である。最先端の幹細胞研究では1個1個の細胞の機能・特性を比較する手法が求められる(single-cell biology)。造血幹細胞においては主に細胞表面マーカーの発現様式に基づくフローサイトメトリー法による純化技術に革新的進歩がみられ、ただ1個の細胞の移植によっても全系譜にわたって造血系を再構築しうる高度な純化が可能となっている。しかしながら、近年これらの細胞集団中にも機能・特性上の不均一性が見出されており、既存の技術による純化法の限界も指摘されている。一方で申請者は、造血サイトカイン刺激後の純化造血幹細胞集団中に、シグナル分子のリン酸化様式における明らかな不均一性をみる例をいくつか経験している。このことは、ある刺激に対する特定のシグナル応答性の違いを指標として造血幹細胞をさらに細分画できる可能性を示唆するが、従来、シグナル分子のリン酸化解析は細胞の固定を必要とするため、解析後に生細胞を回収し機能・特性を比較することは不可能と考えられてきた。そこで申請者は、特定のシグナル経路におけるリン酸化状態を蛍光強度により生細胞中でモニタリングし、ソーティングとその後機能・特性解析とを同時に可能とする新たな方法を発想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、特定のリン酸化シグナルを蛍光によって生細胞中で可視化する革新的技術「細胞内シグナル応答性プローブ」を造血幹細胞研究に応用し、従来の方法ではさらなる分画が困難であった細胞集団を特定の刺激に対するシグナル応答性により分画し、生細胞として回収することで機能・特性評価までを可能にする新たな細胞分画法を確立することを目的とする。提案する技術の原理証明が主題であるが、造血幹細胞をシグナル応答性により分画し、特性評価までを行なって新たな亜分画の存在を証明することが究極の目的である。

### 3. 研究の方法

はじめに造血幹細胞において、提唱する分画法の実現に最も適したサイトカインと標的シグナルの絞り込みを行う。シグナル反応性の異なる細胞株を混合し、「モデル細胞」として、1)リン酸化応答性プローブの細胞内導入、2)サイトカイン刺激、3)フローサイトメトリー解析・ソーティングという一連の流れが可能か、系の妥当性を検証する。造血幹細胞へのプローブ導入法の至適化を終了したのち、実際にシグナル応答性プローブを導入して、サイトカイン刺激後のリン酸化シグナル強度を指標としたソーティングを試み

る。分画、分取した細胞に関して特性・機能解析を行なって、特定のリン酸化応答性における差異が、質的に異なる造血幹細胞分画を規定しうることを実証する。

(1) サイトカインと標的シグナルの絞り込み：研究の対象となる造血幹細胞集団において、サイトカイン刺激後の各分子のリン酸化 kinetics を通常の細胞内染色フローサイトメトリー法でスクリーニングし、候補刺激-候補シグナルの絞り込みを行う。サイトカイン側は申請者らの研究室で既に造血幹細胞活性への影響が明らかな造血サイトカインで、また、シグナル分子側は研究分担者の片山が既に有している基質ペプチドを中心に試み、特に二極性の応答パターンを示すものに着目し結果の再現性等から決定する。

(2) モデル細胞株を用いた実証実験：初代細胞での試行前に、シグナル応答性の明らかな細胞株を用いて研究計画の妥当性の検討を行う。はじめに複数の細胞株をサイトカイン刺激したときに反応性において明らかな差異のみられる基質ペプチドを選択する。片山は恒常的に蛍光を発する色素#1とリン酸化に反応して発光する色素#2の二種類を組み込んだナノ粒子の作製を担当する。リン酸化不応性株とリン酸化反応性株との混合培養にプローブを導入し、サイトカイン刺激後にフローサイトメトリー解析を行い、プローブ陽性細胞の中に、基質のリン酸化された集団と非リン酸化細胞を同定できるよう、条件設定を行う。さらに細胞株の混合比率を変えて感度・特異性の検討を行い、最終的にはソーティングによる生細胞の分取が可能となるよう至適化を進める。

(3) プローブの初代細胞への導入：並行して、既に確立済みのナノ粒子を用いてマウス骨髄細胞へのプローブ導入法の至適化を進める。ナノ粒子単独での導入と電気穿孔法との併用法とを試み、高効率、低毒性を実現する条件を決定する。細胞表面マーカーの染色とプローブ導入を組み合わせ、対象とする造血幹細胞分画への導入が可能となるようさらに条件設定を試みる。ヒト造血幹・前駆細胞分画での検討も同時に進める。

(4) プローブ導入造血幹細胞の活性評価：前年度よりのプローブ導入法の至適化をさらに進める。特に毒性の評価を厳密に行うため、移植によって造血再構築能をプローブ非導入細胞との比較において検討する。ヒト造血幹・前駆細胞としては、CD34 陽性 CD38 陰性細胞集団を用いて、移植は NOG マウスをレシピエントとして評価する。マウス造血幹細胞では、幹細胞活性の評価の標準法である Ly5.1/Ly5.2 congenic マウスシステムを用いて、プローブ導入後にも未処理造血幹細胞に遜色ない活性が保たれるような条件を確立する。

(5) 造血幹細胞の分画：プローブの導入法に目処が付いた時点より、実際の造血幹細胞を用いてプローブ導入、サイトカイン刺激、フローサイトメトリー解析およびソーティングの至適化を開始する。細胞株を用いた前年度の検討を参考に、プローブ導入後の刺激開始のタイミング、解析・ソーティングの開始時期、サイトカイン濃度等をヒト造血幹・前駆細胞とマウス造血幹細胞とでそれぞれ至適化する。

(6) 分画造血幹細胞の特性・機能評価：リン酸化の有無、強度を指標に分画した細胞をソーティングし、遺伝子発現プロファイル、in vitro colony assay、移植による特性および機能の評価を行い、分画に用いたシグナル応答性の差異が特性においてもまた機能の上でも造血幹細胞を異なる画分に分別しうるかの検証を行う。

(7) リン酸化シグナルと特性・機能との関連づけ：計画どおりに新たな造血幹細胞の亜分画が同定されれば、分画の基となったシグナル応答性の差異が何故観察される造血幹細胞活性の差異へと結びつくのかの検討を行う

#### 4. 研究成果

初年度は特にモデル細胞におけるシグナル応答性の評価系の整備を行った。被験シグナルとして SDF-1 刺激による CXCR4 シグナルを選択肢、至適化をすすめた。シグナル強度を人為的に変化させることでシグナル応答性プローブの反応性を validate できると考え、レトロウイルスベクターシステムを構築し、野生型レセプターおよび gain-of-function 型レセプターを被験細胞に過剰発現する系を確立した。C57BL/6J マウス骨髄から造血幹・前駆細胞を分取し、ベクターで遺伝子導入、蛍光マーカーを指標に遺伝子陽性細胞をソートにより得ることができた。SDF-1 刺激後に細胞を固定後、シグナル分子のモデルとしてリン酸化 Erk を特異的抗体で染色しフローサイトメトリーにて解析した。結果、gain-of-function を裏付けるシグナル強度の変化が観察され、本研究課題の目的に適うモデル細胞、モデルシグナルの構築を確認した。

平成 25 年度は標的細胞へのプローブ導入に備え、造血幹細胞におけるシグナル伝達様式の解析、細胞表面マーカーによる分画および、幹細胞機能評価法の至適化を行った。特に IL-1/IL-1R、SDF-1/Cxcr4 シグナルに着目し、後者においてはレセプター改変後の細胞におけるシグナル分子のリン酸化を網羅的に評価した。その結果、本研究課題が究極に目指す高品質の造血幹細胞分取に向けて、従来考えられてきた Akt ではなく、Erk のリン酸化がより幹細胞機能と相関する可能性が示された。片山は研究期間を通じて高分子イ

オン錯体型の蛍光プローブの開発を検討した。内部標準として Cy5 を濃度消光が起きない程度、カチオン性基質ペプチドを側鎖に有するデキストランに導入し、一方、キナーゼ応答型の蛍光を与えるための TAMRA をポリアスパラギン酸に導入したポリマーも合成して両者を混合し、ポリイオン錯体型ナノ粒子を調製した。得られたナノ粒子は Cy5 の蛍光はナノ粒子形成によっても不変であったが、TAMRA の蛍光は大きく消光した。一方、標的キナーゼでデキストラン側鎖の基質ペプチドをリン酸化すると TAMRA の蛍光は大きく回復し、Cy5 の蛍光は変化しなかった。そこで、両者の蛍光強度比を取ることで、正確にキナーゼ活性が評価できた。蛍光強度比を用いてキナーゼ阻害剤の阻害定数を評価することも可能であった。本プローブは、キナーゼ蛍光プローブとして、特に濃度や組織・細胞の厚みの影響を受けずに in vivo や培養細胞で正確に活性を評価できる可能性がある。本課題研究期間内には結論には至らなかったものの、継続研究の中での目的達成のための準備を研究代表者と研究分担者の協力によって整えることに成功した。

#### 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 12 件)

Kim, C. W., Toita, R., Kang, J. H., Li, K., Lee, E. K., Zhao, G. X., Funamoto, D., Nobori, T., Nakamura, Y., Mori, T., Niidome, T., & Katayama, Y. (2013). Stabilization of cancer-specific gene carrier via hydrophobic interaction for a clear-cut response to cancer signaling. *J Control Release*, 170(3), 469-476. doi:10.1016/j.jconrel.2013.06.011, 査読有

Lai, C. Y., Yamazaki, S., Okabe, M., Suzuki, S., Maeyama, Y., Imura, Y., Onodera, M., Kakuta, S., Iwakura, Y., Nojima, M., Otsu, M., & Nakauchi, H. (2014). Stage-specific roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1670, 査読有

Saka, K., Kawahara, M., Teng, J., Otsu, M., Nakauchi, H., & Nagamune, T. (2013). Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Biotechnol*, 168(4), 659-665. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.09.012, 査読有

Shiosaki, S., Nobori, T., Mori, T., Toita, R., Nakamura, Y., Kim, C. W., Yamamoto, T., Niidome, T., & Katayama,

Y. (2013). A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently-labeled peptides. Chem Commun (Camb), 49(49), 5592-5594. doi: 10.1039/c3cc41680a, 査読有

Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., & Nakauchi, H. (2013). Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. Mol Ther, 21(7), 1424-1431. doi: 10.1038/mt.2013.71, 査読有

Kumano, K., Arai, S., Hosoi, M., Taoka, K., Takayama, N., Otsu, M., Nagae, G., Ueda, K., Nakazaki, K., Kamikubo, Y., Eto, K., Aburatani, H., Nakauchi, H., & Kurokawa, M. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. Blood, 119(26), 6234-6242. doi:10.1182/blood-2011-07-367441, 査読有

〔学会発表〕(計10件)

Makoto Otsu. Translation of Stem Cell Science from Bench to Bedside. International Medi-Bio Symposium of SIMS-IMSUT-WIS (invited). 2013年11月18日, Asan, Korea.

Makoto Otsu. A possible therapeutic strategy for genetic diseases using hematopoietic stem cells generated from induced pluripotent stem cells. ESGCT and SETGyC Collaborative Congress. 2013年10月26日, Madrid, Spain.

Yoshiki Katayama. Intracellular signal-responsive gene regulation delivery to address recent problem in cancer targeting (invited). 2013年7月3日, Korea Institute of Science & Technology.

Makoto Otsu. Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment (invited). 2013年1月28日, Tokyo.

〔図書〕(計3件)

大津 真、診断と治療社、遺伝子治療-特集; 知っておきたい最新の免疫不全症分類-診断から治療まで、2013、481-486

大津 真、小児内科、夢の万能細胞 iPS細胞の臨床応用への道-遺伝病を中心に; 特集: ここまで治せるようになった先天代謝異常症、2012、1697-1702

大津 真、日本臨床、ES/iPS細胞技術と

造血幹細胞移植; 造血器腫瘍学-基礎と臨床の最新研究動向、2012、146-150

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 造血幹細胞移植用の組合せ細胞製剤および生着促進剤並びにこれらの製造方法

発明者: 大津 真、中内 啓光、高橋 聡、石田 隆

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-213024

出願年月日: 2013年10月10日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/scb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 真 (OTSU, Makoto)

東京大学医科学研究所・准教授

研究者番号: 30361330

(2) 研究分担者

片山 佳樹 (KATAYAMA, Yoshiki)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 70284528