

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689041

研究課題名(和文)造血幹細胞における細胞競合を介した増殖制御機構の解明

研究課題名(英文)Function of Flower system in the regulation of hematopoietic stem cell

研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa, Kentaro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90569584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではFlowerおよびHippoシグナル系に着目し、各々の分子メカニズムが造血幹細胞の細胞競合時に与える影響を解析することで、幹細胞間の細胞競合の本質を明らかにするものである。本研究から、造血幹細胞の競合時においてアイソフォームFwe1とFwe2がそれぞれ増殖優位性と劣性を示すことが分かった。このことからFlowerはFitnessが低下した造血幹/前駆細胞を排除する組織恒常性の維持機構における指標であることが考えられた。一方、造血幹細胞の競合時にLats1/2の発現の有無により増殖の優劣が生じることから、Hippoシグナルも造血幹細胞の細胞競合システムに関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was the elucidation of the proliferation and self-renewal control mechanism of the hematopoietic stem cells (HSCs) by the cell competition through Flower code or Hippo pathway in the bone marrow niche. For this purpose, we analyzed the effect of these pathways on the regulation of HSCs proliferation at the cell competition. We found that Flower isoform Fwe1 showed proliferative advantage (winner) and Fwe2 indicated recessive (loser). It was suggested that Flower was the indicator to eliminate HSCs of low fitness for the maintenance of tissue homeostasis. On the other hand, we found that Lats1/2 regulated HSCs proliferation in the cell competition by analyzing of Lats KO HSCs. It was suggested that Hippo signal was also involved in cell competition system of HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞競合 造血幹細胞 増殖制御 Flower Hippo

1. 研究開始当初の背景

生体の幹細胞ニッチにおいてより健全な幹細胞を残すための細胞競合機構が働いていると考えられる。細胞競合は元来、器官・組織を正常な形や大きさに発生させるのに重要な役割を果たしていると考えられており、細胞間の健全度や細胞極性の適合性 (Fitness) の違いに基づいた能動的な恒常性維持機構である。

1) Flower システムによる細胞競合制御機構：共同研究者 Moreno らの研究から、ショウジョウバエにおける dFlowerLoseA/B は、マウスにおける 5930434B04Rik (mFlower, mFwe) に相当することが示され、mFlower の 4 つのアイソフォームが同定された。マウスにおいては Loser cell と認識された細胞は mFlower を発現し、mFlower を発現していない細胞により排除される。また Bondar らは、成体骨髄内の造血幹細胞の細胞競合について、p53 の活性の低い細胞、即ち、健全度が高い細胞において競合力が強いことを報告している (Bondar et al., 2010)。本研究では、Flower を介した細胞競合による造血幹細胞の増殖制御機構の解明を目指す。

2) Hippo シグナル系による細胞競合制御機構：Hippo シグナル経路は近接する細胞間の増殖や生存を制御することにより、均一な Fitness の細胞による組織維持に寄与することが知られている。しかしながら実際に骨髄ニッチにおいて未分化造血幹細胞の細胞競合時に Hippo シグナル伝達系の機能は不明な点が多い。そこで本研究では、Hippo シグナル系の増殖制御分子である Lats1/2 に焦点を当て、細胞競合時における造血幹細胞の増殖制御機構を明らかにする。

2. 研究の目的

造血幹細胞プールの適切な制御には細胞競合と呼ばれる細胞間の生存競争を利用した増殖制御機構が働くことが考えられる。本研究では、造血幹細胞間における細胞競合の役割について、細胞競合関連分子 Flower および Hippo シグナル伝達系の増殖制御因子 Lats1/2 をターゲットとした競合開始から増殖制御までの一連の機構を個体、細胞、分子レベルにおいて検討する。さらに細胞競合機構と増殖のクローン性の関連を明らかにすることにより、幹細胞における自己複製と増殖の分子基盤を解明し、新規骨髄移植法の開発及びがん幹細胞の増殖制御方法の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞のシングルセル単位の網羅的遺伝子発現解析：本研究においては、個別に採取した未分化造血幹細胞および前駆細胞を、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) により、シングルセル単位で遺伝子発現プロファイリングの比較を行った。

(2) 5-FU 投与後の各ステージにおける骨髄造血幹細胞の Fwe アイソフォームの発現比較：多様な Fitness の幹細胞が存在し、幹細胞同士の細胞競合が生じると考えられる骨髄回復期および定常時における各 Fwe アイソフォームおよびアポトーシス関連分子の発現を、シングルセル単位で解析し、生体内で Fwe による細胞競合の有無を確認した。

(3) Fwe アイソフォームの強制発現による造血幹細胞の *in vitro* での増殖比較：造血幹細胞に対し、レトロウイルスベクターを用いて各 Fwe アイソフォームを強制発現し、得られた細胞を同数ずつ競合培養し、アイソフォームの組み合わせごとに増殖およびその遺伝子発現を比較した。

(4) Fwe アイソフォーム間の骨髄再構築能に与える影響の比較：各 Fwe アイソフォームを強制発現した造血幹細胞をそれぞれ移植し、骨髄キメリズムの比較を行った。

(5) Fwe 欠損マウスの骨髄組織の解析：全 Fwe アイソフォームの欠損の骨髄組織の維持における影響を造血幹/前駆細胞分画の解析を行うことで検討した。

(6) Few の欠損による造血幹細胞の競合培養時の増殖への影響の検討：Fwe 全欠損造血幹細胞を野生型と共に競合培養し、増殖をそれぞれ比較した。

(7) Fwe 全欠損および単一アイソフォームの強制発現による造血幹細胞の骨髄再構築能に対する影響の検討：Fwe 全欠損造血幹細胞の移植による野生型との比較を行った。さらに Fwe 全欠損マウス由来造血幹細胞に Fwe アイソフォームを強制発現した細胞を移植し、骨髄キメリズムの比較を行った。

(8) 未分化造血幹細胞および前駆細胞における Hippo シグナル分子群の発現解析：Hippo シグナル伝達系における各分子の発現を造血幹/前駆細胞において解析した。

(9) 5-FU 投与後の各ステージにおける骨髄造血幹細胞の Lats2 分子の発現比較：5-FU 投与後のマウス骨髄の回復期や定常時など各ステージにおいて Lats2 の発現比較を行った。

(10) 造血幹細胞の競合培養による増殖比較：*in vitro* において Lats 分子を指標とした競合培養を行い、Hippo シグナル系の関与を検討した。Lats1 および Lats2 欠損マウス由来造血幹細胞と野生型造血幹細胞を *in vitro* にて競合培養し、細胞の増殖および自己複製を比較した。

(11) 生体内における造血幹細胞の骨髄再構築能に対する Hippo シグナル伝達系の影響の検討：造血幹細胞の骨髄再構築能に対する Lats2 の発現の影響を検討するため、Lats2 欠損造血幹細胞を移植し、野生型との比較を行った。

4. 研究成果

(1) LT-HSCs におけるシングルセル単位の遺伝子発現解析では、Fwe1 を発現する細胞は

Fwe2 を発現せず、逆に Fwe2 を発現するものは Fwe1 を発現しない傾向を見出した。さらに、pro-apoptotic 遺伝子群の発現は、Fwe1 発現細胞よりも Fwe2 発現細胞の方が高い傾向にあることが分かった。このことから、Fwe1 と Fwe2 が細胞競合における winner と loser に分かれることが示唆された。

(2) 5-FU 投与後 8 日目以降の骨髄回復期において、造血幹/前駆細胞分画における Fwe1、2 の発現が定常時に比べて 2-3 倍に上昇し、アポトーシス関連遺伝子の発現も 4-15 倍上昇することを見出した。このことから、細胞数は増殖しているが、個々の細胞の選別がこのステージにおいて行われていることが考えられた。

(3) 細胞同士の直接接触のある条件下で幹細胞の競合培養を行い、培養後の造血幹細胞の数を比較することで、Fwe の種類ごとの増殖優位性を検討した。この実験から、Fwe1 過剰発現 HSCs は、コントロールや Fwe2 過剰発現 HSCs との共培養時に増殖優位性を示した。逆に、Fwe2 の過剰発現 HSCs の増殖は Control および Fwe1 との共培養時に低下することが示された。さらに、Fwe1 発現細胞を competitor に持った Fwe2 発現細胞はアポトーシス関連遺伝子 Apaf1、Bbc3、Gadd45a、Trp53bp2 の上昇を引き起こし、逆に Fwe2 を competitor に持った Fwe1 発現細胞は Bmf や Mcl1 といった細胞の生存に関連する遺伝子の発現上昇を示した。

(4) Fwe1 および Fwe2 を過剰発現した造血幹細胞を移植した結果、末梢血キメリズムの解析より、Fwe2 を過剰発現した HSCs は骨髄再建能がコントロールと比較して有意に低下し、逆に Fwe1 の過剰発現を行った HSCs は向上する傾向が認められた。このことから、生体内においても Fwe1 の増殖優位性 (winner) および Fwe2 の増殖劣性 (loser) の性質が示唆された。

(5) Fwe 全欠損マウスの解析から、欠損マウスにおける造血幹細胞分画および T 細胞 B 細胞分化への著名な影響は見られなかった。一方で、巨核球赤血球前駆細胞への分化はやや低下していることが分かった。

(6) Fwe 全欠損造血幹細胞を用いた競合培養実験の結果から、野生型 (Fwe+/+) の LT-HSCs は、Fwe 欠損型 (Fwe-/-) LT-HSCs よりも増殖優位性が見られたことから、Fwe の発現しない細胞は、Fwe (1-4 のいずれか) を発現する細胞との競合では増殖劣性を示すことが考えられた。

(7) Fwe 欠損マウス由来造血幹細胞を移植し、野生型との骨髄キメリズムの比較を行ったが、野生型と比較して有意な差は認められなかった。一方で、Fwe 全欠損マウス由来造血幹細胞に Fwe1 または 2 をそれぞれ発現させた細胞を移植し、骨髄再構築能を比較すると、Fwe1 では Fwe2 よりも骨髄キメリズムが有意に高いことが分かった

(8) エフェクター分子 Yap1、Wwtr1 および Yap

の抑制因子 Lats1/2 が未分化造血幹細胞において特に強い発現をみることを見出した。

(9) 5-FU (150mg/Kg) 投与したマウス骨髄では骨髄抑制が起こり、造血幹細胞数は 4 日目前後まで減少し投与後 6 日目から増加に転じ、10 日目で投与前の数まで戻ることが報告されている。この実験系において造血幹細胞における Lats2 の発現は 6 日目で著減しその後徐々に回復することから、6 日目の造血幹細胞の増殖開始と共に Hippo シグナル系による細胞競合が起こることが考えられた。

(10) 野生型および Lats1 または Lats2 欠損マウス由来造血幹細胞の同時競合培養を行い、それぞれの造血幹細胞数の比較を行った。その結果、競合培養を行った Lats1 または Lats2 欠損造血幹細胞の増殖は野生型と比較して有意に高いことが分かった。一方で非競合培養の場合は同等の増殖が見られた。

(11) 生体内での細胞競合時の Lats2 の機能を解析するため、野生型および Lats2 欠損造血幹細胞を競合移植した。その結果、Lats2 欠損造血幹細胞を移植したマウスでは、野生型と比較して高い骨髄再構築能を示した。このことから骨髄再建の細胞競合時には、造血幹細胞の増殖制御に Hippo シグナル系が関与していることが示唆された。

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 6 件)

1) Toyama H, Arai F, Hosokawa K, Ikushima YM, Suda T. N-cadherin+ HSCs in fetal liver exhibit higher long-term bone marrow reconstitution activity than N-cadherin- HSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 428 (3): 354-359, 2012 (査読有)

2) Ikushima YM, Arai F, Nakamura Y, Hosokawa K, Kubota Y, Hirashima M, Toyama H, Suda T. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 430 (1): 20-25, 2013 (査読有)

3) Ikushima YM, Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T, Narumiya S, Suda T. Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. *Blood.* 121 (11): 1995-2007, 2013 (査読有)

4) Yamashita M, Nitta E, Nagamatsu G, Ikushima YM, Hosokawa K, Arai F, Suda T. Nucleostemin is indispensable for the maintenance and genetic stability of hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 441 (1): 196-201, 2013 (査読有)

5) Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y. Role of Endothelial Cell-Derived Angptl2 in Vascular Inflammation Leading to Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis Progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34 (4): 790-800, 2014 (査読有)

6) Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, Ogawa M. Determining c-Myb Protein Levels Can Isolate Functional Hematopoietic Stem Cell Subtypes. *Stem Cells.* 33 (2):479-90., 2015 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

[国際会議における発表(いずれも査読あり)]
1) Kentaro Hosokawa, Toshio Suda and Fumio Arai. FUNCTIONAL ANALYSIS OF POT1 IN THE MAINTENANCE OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS. ISEH 41th Annual Scientific Meeting. Amsterdam, Netherlands, August, 2012

2) Kentaro Hosokawa, Toshio Suda and Fumio Arai. Shelterin component protection of telomeres 1 (Pot1) plays a critical role in the self-renewal of HSCs. ISEH 42th Annual Scientific Meeting. Vienna, Austria, August, 2013

3) Kentaro Hosokawa, Yoshiko Ikushima, Benjamin MacArthur, Toshio Suda, Fumio Arai. POT1 regulates self-renewal activity of cord blood hematopoietic stem cells. ISEH 43th Annual Scientific Meeting. Montreal, Canada, August, 2014

[国内学会における発表(いずれも査読あり)]
4) Kentaro Hosokawa, Fumio Arai, Yumiko Gomei and Toshio Suda:

Functional analysis of POT1 in the maintenance of Hematopoietic stem cells.
第 11 回幹細胞シンポジウム (東京) 平成 25 年 5 月

5) Kentaro Hosokawa, Toshio Suda and Fumio Arai:
造血幹細胞の自己複製に対するテロメア結合因子 Pot1 の機能解析
第 75 回日本血液学会学術集会 (札幌) 平成 25 年 10 月

6) Kentaro Hosokawa, Yoshiko Ikushima, Benjamin MacArthur, Toshio Suda, Fumio Arai:
Pot1 regulates hematopoietic stem cell activity during aging
第 12 回幹細胞シンポジウム (福岡) 平成 26 年 5 月

[図書] (計 2 件)

1) Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T. The role of N-cadherin-mediated cell adhesion in the regulation of hematopoietic stem/progenitor cell activities in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci*1266 (1): 72-77, 2012. (査読有)

2) Arai F, Hosokawa K, Matsumoto Y, Toyama H, Suda T. Gene expression profiling and regulatory networks in single cell. *Network analysis in systems biology.* (Edited by Avi Ma'ayan and Ben D. Macarthur), Springer, pp. 1-13, 2012. (査読有)

[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 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.scr.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川 健太郎 (Hosokawa Kentaro)
九州大学大学院・医学研究院・助教
研究者番号 : 90569584

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :