

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293221

研究課題名(和文) 1個の造血幹細胞からの自己複製誘導

研究課題名(英文) Induction of self-renewal in single hematopoietic stem cells

研究代表者

依馬 秀夫 (Ema, Hideo)

熊本大学・国際先端医学研究機構・教授

研究者番号：50344445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究によって、複数のサイトカインが造血幹細胞の自己複製をもたらすことが示唆されていた。本研究ではTPO (thrombopoietin)とIL-12 (Interleukin-12)に注目して、自己複製誘導作用に相違があるかどうかをシングルセルで検証した。その結果、SCF+TPOおよびSCF+IL-12によってShort-term HSC (Hematopoietic Stem Cells)が有意に増加することが明らかとなった。また、両者には一部のlong-term HSCsも増幅する作用があることが示唆された。両者の効果の相違を明らかにするため、現在も追加実験を施行中である。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that multiple cytokines can directly stimulate long-term hematopoietic stem cells (LT-HSC), resulting in their self-renewal. However, whether different cytokines lead to the expansion of different types of HSC was not known. In this study, we focused on thrombopoietin (TPO) and interleukin-12 (IL-12), and compared their self-renewal-inducing effects using single-cell culture combined with transplantation assay. Data showed that the number of short term-HSC was significantly increased after the culture with stem cells factor (SCF)+TPO or SCF+IL-12. Data also suggested that some LT-HSCs were expanded after those cultures. On-going experiments will confirm these findings and also clarify their different effects.

研究分野：実験血液学

キーワード：血液内科

## 1. 研究開始当初の背景

臍帯血移植には、臍帯血に含まれる造血幹細胞の絶対数が少ないため、生着不全を起こす危険がある。また、前駆細胞数も少ないため、造血が回復する以前に死亡することがある。造血幹細胞、前駆細胞の体外増幅はこの問題を解決する一法である。

造血幹細胞の増幅および維持にはサイトカインが必須である。しかし、至適サイトカインの組み合わせは不明であった。一方、近年、造血幹細胞には機能の異なる幹細胞が存在することが明らかになったが、どの造血幹細胞が増幅可能かを詳しく調べた報告はなかった。

## 2. 研究の目的

異なるサイトカインによって、機能的に異なる造血幹細胞をどの程度増幅可能かをシングルセルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Fluidigm を用いて single cell-RT-PCR を行った。

(2) FACS AriaIII を用いて、B6 マウスの骨髄から CD150+41-34-Kit+Sca-1+Lin<sup>-</sup> 細胞 (HSC1) を分離して LT(Long-Term, >6 ヶ月)-HSC として用いた。また、CD150-41-34-Kit+Sca-1+Lin<sup>-</sup> 細胞 (HSC2) を分離して ST(Short-Term, <6 ヶ月)-HSC として用いた。

(3) 無血清培養条件下で single-cell culture を行い、細胞分裂を観察した。

(4) 10-40 個の HSC1, HSC2 を用いて競合的骨髄移植を行った。同時に、これらの細胞をサイトカイン存在下で培養し、移植した。さらに、必要に応じて二次移植を行った。

(5) HSC1 を用いて Single-cell transplantation を行った。また、同時にサイトカイン存在下でシングルセル培養した後、移植した。さらに、必要に応じて二次移植を行った。

## 4. 研究成果

(1) Single-cell PCR

48 個の single HSC1 および HSC2 に対して 48 種類の遺伝子 (46 receptors + Actin + Gapdh) を 1 セットとして、2 種類のセットを用いて遺伝子発現解析を複数回行った。その結果、ほとんどの造血幹細胞には c-Kit、c-Mpl 受容体が発現していた。また、 $\beta_c$ 、 $\gamma_c$ 、gp130 等の共通受容体の発現が検出された。

しかし、IL-2ra、IL-3ra、IL-6ra、IL-11ra、GM-CSFra 等の特異的受容体はほとんど検出されなかった。一方、一部に IL-12rb1、IL-12rb2 の受容体の発現が検出されたが、両者を同時に発現している細胞はまれであった。

(2) Single-cell culture

SCF(Stem Cell Factor)、TPO(Thrombopoietin)、および IL-12(Interleukin-12) の 60 個の HSC1 または HSC2 の細胞分裂に対する効果を serum-free single-cell culture を用いて解析した。SCF+TPO 存在下で約 80% の HSC1 が数日以内に分裂した。SCF+IL-12 存在下では約 60% の HSC1 が分裂した。分裂速度は IL-12 の方が有意に遅かった。HSC2 を用いてもほぼ同様な結果が得られた。SCF+IL-6、SCF+IL-11、または SCF+G-CSF 存在下でも、一部の HSC1、HSC2 の分裂が観察された。これからの結果は受容体の発現解析の結果のみから、サイトカインに対する反応性を予測することは困難であることが示唆された。

(3) CD34-KSL 細胞と CD150+41-34-KSL 細胞の比較

従来、CD34-KSL 細胞を LT-HSC として用いて来たが、本研究から CD150+41-34-KSL 細胞を LT-HSC として用いた。そのため、両者を比較してデータの一貫性を確認する必要があった。40 個の CD34-KSL 細胞、20 個 CD150+41-34-KSL 細胞、ならびに 20 個 CD150-41-34-KSL 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^6$  個の競合細胞と共に放射線照射後のマウスに移植した。一方、これらの細胞を SCF+TPO 存在下で 1 週間無血清培養して、同様にマウスに移植した。1 年間の経過観察より、CD34-KSL 細胞中の LT-HSC 活性は CD150+41-34-KSL 細胞中に検出され、ST-HSC 活性は CD150-41-34-KSL 細胞中に検出された。また、興味深いことに、培養後の LT-HSC と ST-HSC 活性の両方とも、CD150+41-34-KSL 細胞由来の培養細胞中に検出され、CD150-41-34-KSL 細胞由来の培養細胞中には検出されなかった。これらの結果は、CD150+41-34-KSL 細胞を LT-HSC として用いた、本研究の妥当性を支持した。

(4) 10-40 個の LT-HSC 細胞移植

10 個ないし 40 個の HSC1 と  $5-10 \times 10^5$  骨髄細胞を混合して、放射線照射後のマウスに移植した。一方では SCF+TPO、SCF+IL-12、SCF+TPO+IL-12 存在下で 1 週間無血清培養した後に同数の骨髄細胞と共に、放射線照射したマウスに移植した。6 ヶ月以上末梢血を解析した後に、二次移植を行った。いずれの培養条件でも、移植後 1 ヶ月のキメリズは有意に上昇し、ST-HSC の増幅を示した。6 ヶ月以上のキメリズムおよび二次移植後のキメリズは低下傾向を示したが、中には培養前の細

胞より高いキメリズムを維持しているマウスも観察され、少なくとも一部で LT-HSC の増幅があることを示した。

#### (5) Single-cell transplantation

1 個の HSC1 を競合細胞と共に 1 匹の放射線照射後のマウスに移植した。一方、1 個の HSC1 を SCF+TPO、SCF+IL-12、SCF+TPO+IL-12 存在下で無血清培養を 7 日間行い、培養後の細胞を競合細胞と共に 1 匹の放射線照射後のマウスに移植した (各群 30 匹のマウス)。同様の実験を 3 回試行した。レシピエントマウスの多数が死亡した実験、LT-HSC が高頻度に含まれていなかった実験もあり、single-cell 移植をより効率よく、安全に行う方法の開発が求められた

#### (6) Single-cell transplantation の改良方法

放射線照射後のマウスは感染によって死亡した可能性が高いが、原因菌を特定することはできなかった。また、以前の研究により抗生剤や酸性水の使用は、生存率に影響を与えないことが判明しており、ある程度の時間を経て、繰り返し実験を行う他なかった。

実験によって、LT-HSC の頻度が大きく異なる (実験誤差) 原因を追求した結果、多少分化した細胞の混入が有ることが判明した。そのため、さらに 2 種類の抗体を追加し、HSC purification および single-cell transplantation の精度を上げることに成功した。そして、新しいプロトコルを用いて純化した LT-HSC を用いて、シングルセル実験を行った。現在も、シングルセル由来の培養細胞中の HSC 活性を観察中である。

#### 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 4 件)

1. Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K. L., Ema, H. & Nakauchi, H. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112-1126, doi:10.1016/j.cell.2013.08.007 (2013). 査読有

2. Ema, H., Morita, Y. & Suda, T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **42**, 74-82 e72, doi:10.1016/j.exphem.2013.11.004 (2014). 査読有

3. Wang, Z. & Ema, H. Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol*, doi:10.1007/s12185-015-1919-5 (2015). 査読有

4. Ema, H., Uchinomiya, K., Morita, Y., Suda, T. & Iwasa, Y. Repopulation dynamics of single hematopoietic stem cells in mouse transplantation experiments: Importance of stem cell composition in competitor cells. *J Theor Biol* **394**, 57-67, doi:10.1016/j.jtbi.2016.01.010 (2016). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Ema H. A new view of differentiation pathways from hematopoietic stem cells. International Forum on Stem Cells, Tianjin, China, 2014.11.03

2. O'Neill A, Suda T, Ema H. Distinction among long-term HSCs, short-term HSCs, and repopulating CMPs by a novel in vitro single-cell assay. ISEH, Montreal, 2014.08.22

3. Ema H., Wnag X, Dong F. The origins of gene mutations and leukemic stem cells in mouse acute leukemia models. International Forum on Stem Cells, Tianjin, China, 2016.10.28

4. Dong F, Bai H, Zhang S, Wang X, Wang J, Wang Z, Xie M, Hao S, Cheng T, Ema H. Early and late leukemic stem cells in mouse leukemia models. 58<sup>th</sup> ASH, San Diego, 2016.12.03

[図書] (計 1 件)

1. 依馬秀夫, 造血幹細胞の分化経路, Annual Review 2015 血液、中外医学社

[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：  
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

依馬秀夫 (EMA, Hideo)

熊本大学・国際先端医学研究機構・教授

研究者番号：50344445

(2) 研究分担者

滝澤仁 (TAKIZAWA, Hitosi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別  
招聘教授

研究者番号：10630866

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )