

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460483

研究課題名(和文)新規c-kit低発現マウス造血幹細胞の特性と老化における役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of c-kitlow murine hematopoietic stem cells for the role in aged animals

研究代表者

佐々木 豊 (SASAKI, Yutaka)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80425066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞(HSC)は長くG0期に留まる。マウスLin-Sca-1+c-kit+CD150+CD48-HSCの中のc-kitlow亜分画にはG0期細胞が濃縮されている。BrdU取込みの観察等から、HSCは生体内で緩徐な速度で分裂し、インビボでは常に一定のc-kit発現レベルを保つのではなく、c-kit発現量は時間とともに変動すると考えられた。c-kitlow細胞分画には、増殖刺激に応答しない細胞が存在した。また、ミトコンドリアや活性酸素種に乏しかった。網羅的遺伝子解析では、c-kitlow細胞はc-kithigh細胞と比べ、細胞周期関連、転写、リン酸化、代謝等の遺伝子群発現に相違が認められた。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) stay long in G0 of cell cycle status. The c-kitlow subfraction of the Lin-Sca-1+c-kit+CD150+CD48-HSCs contains cells in G0 in high frequency. Observation in vivo of integrated BrdU in HSCs suggested that HSCs divided slowly with fluctuating c-kit expression in the time course. The c-kitlow subfraction included cells that did not divide in response to pro-proliferation stimuli. These cells were poor in mitochondrial mass and in activities of reactive oxygen species. DNA microarray analyses indicated that c-kitlow cells differed from c-kithigh cells in the level of cell cycle related gene expression as well as genes for transcription, phosphorylation and metabolism.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：造血幹細胞 G0 c-kit

1. 研究開始当初の背景

骨髄HSCは長くG₀期に留まり活動性が低い。このHSCの特性が、幹細胞性維持/自己再生に必要であると考えられている。Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込みを利用した遡及的検討より、最も未分化なHSCの細胞周期は従来の想定よりはるかに長く、マウスの一生に5回程度しか分裂しないHSCが存在することが報告された(Wilson A et al. *Cell* 135:1118, 2008)。しかしこの長期間G₀期に留まるdormant (d)-HSCは、未だ予期的同定がなされていない。このd-HSCが同定され、生理的特性が明らかになれば、HSCの幹細胞性維持能に対する理解が進むと期待される。一方Kubotaらは、骨髄ニッチにあって非常に長期間分裂しない細胞は、HSCマーカーであるc-kitの発現が非常に弱いと報告(*BBRC* 366: 335, 2008)している。両者が同一のHSCを見ているのであれば、c-kit発現の弱いd-HSCの存在が想定される。

申請者は高度に純化されたマウス骨髄Lin⁻Sca-1⁺c-kit^{low}CD150⁺CD48⁻HSCをc-kit発現強度に基づき更に細分し、G₀期HSCがc-kit低発現分画(c-kit^{low})に高度に濃縮されていることを明らかにした(*Stem Cells* 29: 1783, 2011)。c-kit^{low}HSCは、細胞内c-kit及びpAKTに乏しく、加齢に伴ってG₀期比率が増加するという特性を持つ。また、CDKインヒビターp21、p57 mRNAを強く発現する。これらの特徴からc-kit^{low}HSCはd-HSCに類似すると考えられた。c-kit^{low}HSCの特性を解明することがd-HSCの直接的同定の手掛りとなると期待された。

2. 研究の目的

(1) c-kit^{low}HSCとd-HSCとの関連性を明らかにする

d-HSCは、その殆んどがG₀期にあると考えられ、30週齢以降のc-kit^{low}(Lin⁻Sca-1⁺CD150⁺CD48⁻)HSCと類似する。Wilsonらの行った*in vivo* BrdU実験を再現し、d-HSCのc-kit発現レベルを検討する。

(2) c-kit^{low}HSCの生理的特性を明らかにする

c-kit^{low}HSCの生理的特性は未だ明らかとはなっていない。HSCに特徴的な多分化能や緩徐な初回分裂、あるいは、アポトーシス、酸素分圧による影響などについて*in vitro*培養系で検討を加え、低c-kit発現がもたらす結果、あるいは低c-kit発現をもたらした要因を検討する。

(3) c-kit^{low}HSC生成のメカニズムを明らかにする

c-kit発現量と相関する因子を同定することから、何らかの細胞外あるいは細胞内因子がc-kit発現を低下させる可能性を検討する。c-kit^{low}HSCは骨髄では低代謝、低酸素状態

にある(*Stem Cells* 29: 1783, 2011)ことから、ミトコンドリア、NADH量、HIF-1 α 蛋白等について、c-kit発現量との関連性を検討する。また、mRNAレベルでの網羅的な解析を行う。相関性が認められる因子については、阻害、発現抑制/促進等によって、細胞周期制御に関与する可能性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) c-kit^{low}HSCとd-HSCとの関連性を明らかにする

マウスにBrdUを10日間投与(腹腔内および飲水に含有)し、ラベルされた骨髄Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺CD150⁺CD48⁻CD34⁻細胞を1年程度の期間、経時的に解析(細胞中の残存BrdUを投与直後および投与後20~30日間隔で計測、各5匹および対照群)することにより、分裂回数の少ない(<5回程度)HSCをFACS等を用いて同定する。BrdU陽性細胞は、どの程度c-kit低発現となるか、どの時点からBrdU陽性c-kit低発現細胞が出現し始めるかを明らかとして、c-kit^{low}HSC出現の動態との比較検討を行う。BrdUによる標識化をピオチン標識に置き換えることにより、実験系の確からしさを検証する。

(2) c-kit^{low}HSCの生理的特性を明らかにする

c-kit発現の低下は、リガンドstem cell factor (SCF)に対する反応性を低下させる可能性がある。あるいはc-kit^{low}HSCは、骨髄中ではG₀にあるため、他のサイトカインへの反応性にも変化のある可能性が考えられる。HSCをc-kit発現レベルの違いに基づき分取し、*in vitro*条件下に各種サイトカインや酸素分圧への反応性(増殖動態、アポトーシス抑制等)を検討する。なお、予備的検討(c-kit^{low}HSCおよびc-kit^{high}HSCの1細胞/ウェル培養)から、c-kit^{low}HSCはSCFに対する反応性および、thrombopoietin (TPO)への反応性が低下していることを確認しており、細胞周期のみでは説明できない質的特性を保有することが示唆されている。

(3) c-kit^{low}HSC生成のメカニズムを明らかにする

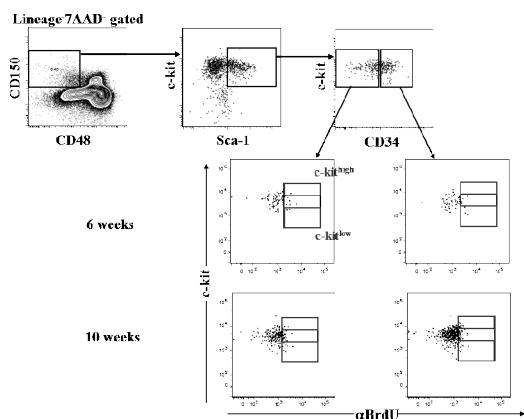
HSCの低代謝あるいは低酸素状態を反映する、ミトコンドリア活性、活性酸素種などを、FACS等を用いて計測し、c-kit発現量との関連性を検討する。また、DNAマイクロアレイ解析等を用い、HSCの発現遺伝子がc-kit発現量と相関性を有するかどうか広範に検討する。阻害、発現抑制/促進等が可能な場合は、これを行い、細胞周期制御を含めた機能的検証を行う。

4. 研究成果

(1) c-kit^{low}HSCとd-HSCとの関連性について

マウスに BrdU を 10 日間投与の後、経時的に骨髄中の造血幹細胞分画を解析し、BrdU 標識の減衰割合と c-kit 発現強度の間に関連性があるかどうか検討を行った。BrdU 陽性 HSC 分画細胞は、観察開始後 4 か月までに速やかに減少し、8 か月の観察期間内ではほぼ消失した。この BrdU 陽性 HSC の消失という結果は、既報 (Wilson A et al. *Cell* 135:1118, 2008) とは異なる。Wilson らが提唱する、長期間 G₀ 期に留まる d-HSC は、我々の手では確認できなかった。結果の乖離が手技的な問題によって生じた可能性を排除するため、我々は新たに、ピオチンを経静脈的に 30 週齢以降のマウスに投与し、細胞膜表面に取り込まれたピオチンの細胞分裂による減衰を調べることから、分裂周期の長い HSC 存在の有無を探索した。この手法を用いても、HSC 分画内細胞の分裂速度は BrdU を用いた手法による結果と近似し、Wilson らが報告した d-HSC を認めることはできなかった。マウスの老化によっても、この HSC のダイナミズムに影響は認められなかった。以上から、d-HSC の存在に対する確証が得られず、従って、d-HSC と c-kit^{low} 細胞との関連性を探求することは困難であり、これ以降の研究においては、c-kit^{high} 細胞および c-kit^{low} 細胞の質的違いを明らかとする検討に焦点を当てることとした。

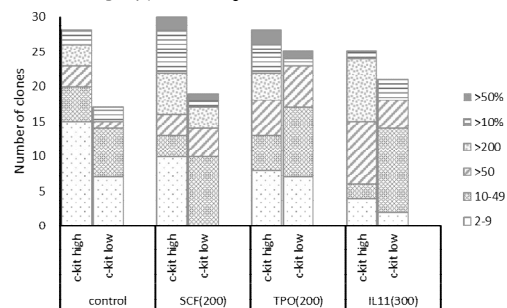
BrdU あるいはピオチンによって標識された細胞の割合は時間とともに減衰したが、いずれのラベルを用いた実験系においても、c-kit^{low} 細胞と c-kit^{high} 細胞の間には、減衰速度についての明確な相違は認められなかった。このことから、c-kit^{low} 細胞および c-kit^{high} 細胞は in vivo においてそれぞれ常に一定の c-kit 発現レベルを保っているのではなく、細胞表面上の c-kit 発現量は時間とともに変動しているのではないかと考えられた。そして、c-kit 発現レベルは、何等かの HSC の生理的状态、特に、細胞周期特性が反映されている可能性が考えられた。



図：c-kit^{low} および c-kit^{high} 細胞の CD34^{+/+} 亜分画における BrdU 陽性割合の推移。

(2) c-kit^{low} HSC の生理的特性について
c-kit^{low} 細胞は、c-kit 発現レベルが低いため、

c-kit リガンドである SCF に対する反応性が c-kit^{high} 細胞とは異なることが容易に推測されるが、実際、c-kit^{low} 細胞の初回分裂は c-kit^{high} 細胞のそれより 24 ~ 40 時間程度遅れて始まる。しかしながら、c-kit 発現量とは一見無関係と思われる TPO および interleukin (IL)-11 に対する反応性においても両者には違いが認められ、SCF の場合と同様に c-kit^{low} 細胞の初回分裂に遅延が観察された。また、SCF、TPO および IL-11 には、c-kit^{low} 細胞の維持、増殖において相加、相乗効果が認められた。一方、IL-3、nerve growth factor には明確な効果は認められなかった。また、一部の c-kit^{low} 細胞は、観察期間中一度も分裂することなく、存在した。これらの細胞は、SCF、TPO、あるいは IL-11 をそれぞれ、200、200、あるいは 300 ng/ml の高濃度で用いても分裂は認められなかったが、形態的には細胞死は認められなかった。c-kit^{high} 細胞は、ほぼ全ての細胞が観察期間中に分裂した。これらの結果は、c-kit^{low} 細胞と c-kit^{high} 細胞の細胞周期の違いを反映していると考えられ、特に、増殖刺激存在下にあっても長期に分裂しない細胞が存在することから、c-kit^{low} 細胞の一部は、極めて深い静止期にあることが示唆された。



図：c-kit^{low} および c-kit^{high} 細胞の細胞分裂を認めたクローン数 (/30 細胞)。クローンサイズは、細胞数あるいは細胞が培養ウェル底面を占める割合で示される。

(3) c-kit^{low} HSC 生成のメカニズムについて
HSC の静止期から細胞分裂サイクルへの移行には、活性酸素種 (ROS) が関与すると考えられている。また、ROS の主たる産生部位はミトコンドリアであるため、ミトコンドリア量および ROS について検討を行った。c-kit^{high} 細胞は c-kit^{low} 細胞と比べ、ミトコンドリア量、ROS 共に、多い傾向が認められ、G₁S/G₂M 期細胞を多く含む c-kit^{high} 細胞と G₀ 期細胞を多く含む c-kit^{low} 細胞の状態を反映していると考えられた。一方、in vitro 培養においては、c-kit^{high} 細胞と c-kit^{low} 細胞の初回分裂に対する酸素分圧 (5% vs 20%) の影響は認められなかった。細胞周期と ROS 産生との間にある原因と結果の関係の解明は、今後の検討課題である。

c-kit^{low} 細胞と c-kit^{high} 細胞の DNA アレイデータを作成し比較すると、細胞周期の違いに反映されていると考えられる一連の遺伝子

発現の相違に加え、転写、リン酸化、代謝等の遺伝子群の発現に相違が認められ、両細胞群の遺伝子発現には質的相違があると考えられた。発現に差異が認められた遺伝子群の中から細胞表面受容体をコードする遺伝子を抽出し、その中でさらに抗体を用いたFACSによる検討が可能な遺伝子については、実際の蛋白発現を検討した。複数の受容体について、c-kit^{low}細胞とc-kit^{high}細胞との間に遺伝子並びに蛋白レベルにおいて、発現量に差異が認められた。今後、これらの受容体が細胞周期を含むc-kit^{low}細胞とc-kit^{high}細胞の生理的特性にどのような役割を担うことが出来るのか明らかとすれば、HSCを長期に維持する機構を解明する一助となるのではないかと考える。

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)

[学会発表](計 6件)

佐々木豊、松岡由和、中塚隆介、角出啓輔、河村孟、藤岡龍哉、園田精昭、In vivo cell division kinetics for the cells of different c-kit intensity in murine HSC compartment、第77回日本血液学会学術集会、2015.10.16-18 石川県立音楽堂など(金沢市)

Sasaki Y、Matsuoka Y、Nakatsuka R、Sumide K、Kawamura H、Fujioka T、Sonoda Y、FACS-Segregated c-kit^{high} and c-kit^{low} cells in the murine hematopoietic stem cell compartment are functionally distinct、44th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology、2015.9.17-19 国立京都国際会館(京都市)

Yutaka Sasaki、Yoshikazu Matsuoka、Ryusuke Nakatsuka、Keisuke Sumide、Hiroshi Kawamura、Tatsuya Fujioka、Yoshiaki Sonoda、Investigation of the lower c-kit expressing cells in murine hematopoietic stem cell compartment、第13回幹細胞シンポジウム、2015.5.29-30 東京大学伊藤国際学術研究センター(文京区)

Yutaka Sasaki、Yoshikazu Matsuoka、Ryusuke Nakatsuka、Keisuke Sumide、Tatsuya Fujioka、Yoshiaki Sonoda、Characterization of the lower c-kit expressing cells in murine hematopoietic stem cell compartment、

第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2 大阪国際会議場(大阪市)

佐々木豊、松岡由和、中塚隆介、角出啓輔、藤岡龍哉、園田精昭、マウス骨髄造血幹細胞分画における低c-kit発現細胞の検討、第24回日本サイトメトリー学会学術集会、2014.6.28-29 関西医科大学(枚方市)

佐々木豊、松岡由和、中塚隆介、角出啓輔、藤岡龍哉、園田精昭、マウス骨髄造血幹細胞分画におけるc-kit発現レベルについての検討、第23回日本サイトメトリー学会学術集会、2013.6.22-23 橘桜会館(文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 豊 (SASAKI Yutaka)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80425066

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

園田 精昭 (SONODA Yoshiaki)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：60206688