

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860779

研究課題名(和文) 純粋巨核球前駆細胞の同定および巨核球造血シグナル制御の解明

研究課題名(英文) Identification of unipotent megakaryocyte progenitor and analysis of megakaryopoietic pathway

研究代表者

横山 泰久 (Yokoyama, Yasuhisa)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70512820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成熟巨核球マーカーであるCD42bは骨髄球系前駆細胞(CMP)の一部に発現している。このCD42b(+)CMPは巨核球への分化能のみを保持する純粋巨核球前駆細胞(MkP)であることを明らかにした。さらにCD42b(+)CMPは、Lineage(-)Sca1(+)cKit(+)細胞(LSK)のうちCD41(+)分画から生じることを明らかにした。分化実験および遺伝子発現パターンの比較から、CD41(+)LSK-MkP分化経路は、従来より知られている巨核球・赤血球前駆細胞を介する経路とは異なる経路であり、マウスを用いた生体モデルによって、この分化経路は緊急的血小板造血に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：CD42b was expressed on some of common myeloid progenitors (CMP). This CD42b(+) CMP population could differentiate into only megakaryocyte lineage, which indicated this population was unipotent megakaryocyte progenitor (MkP). CD42b(+)CMP was differentiated from CD41(+) subpopulation in Lineage(-)Sca1(+)Kit(+) cells (LSK). In single cell polymerase chain reaction analyses, the MkP and a fraction of CD41(+)LSK showed the similarities in mRNA expression profile, and were different from conventional bipotent megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP). On increased demand of platelet production after 5-FU treatment, a part of CD41(+)LSK population expressed CD42b on the surface, they showed skewed unipotent megakaryopoietic capacity. These results suggest that the CD41(+)LSK-MkP pathway is a novel, independent pathway of conventional CMP-MEP pathway, and may play physiologic roles especially in emergency megakaryopoiesis.

研究分野：血液内科学

キーワード：巨核球前駆細胞 巨核球分化経路

1. 研究開始当初の背景

(1)新規巨核球前駆細胞の同定と分化経路の解明

正常造血における巨核球・血小板分化経路は、造血幹細胞(HSC)から骨髓球系共通前駆細胞(CMP)を経て、巨核球・赤血球共通前駆細胞(MEP)へと分化した後、最終的に成熟巨核球・血小板へと分化するモデルが提唱されてきた(図1A)が、近年、CMPを経ない分化早期の段階でHSCから巨核球前駆細胞への分化運命が決定されるというモデル(バイパス経路)も提唱されてきており(図1B・C)、HSCから成熟巨核球への分化経路の詳細ははまだ明らかになっていない。また、巨核球分化経路上に存在が仮定される巨核球前駆細胞をprospectiveに同定する試みははまだ成功していない。

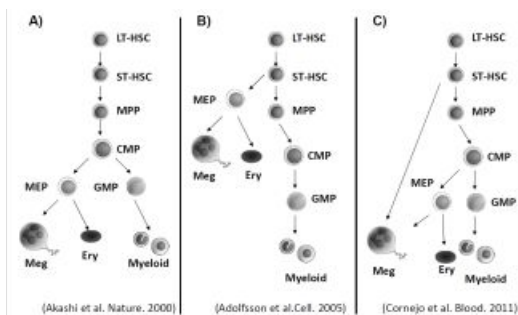


図1 既報に基づく巨核球分化経路モデル

Meg: 成熟巨核球

GMP: 顆粒球マクロファージ前駆細胞

細胞表面抗原によってHSCやCMPを含む分画を分けることができ、この際、CMP・GMP・MEPはcKit(+)/Sca1(-)分化抗原(Lin)(-)分画に含まれる(LSK)。我々は、従来は成熟巨核球に発現すると考えられてきたCD42b(GPIIb)に注目し、cKit(+)/Sca1(-)/Lin(-)分画のうち、CD42bはCMP分画の一部にのみ発現し、GMP・MEPには発現しないことを見出した。このCD42b(+)/CMPは、HSCマーカーであるCD150を同時に発現していた。さらにOP9細胞との共培養による分化実験では、CD42b(+)/CMPは巨核球のみに分化し、巨核球および赤芽球の2系統への分化能を保持するMEPとは異なっていた。これらの結果から、CD42b(+)/CMPは、従来のモデルによる定義ではCMPに含まれるにもかかわらず、巨核球のみへの分化運命がすでに決定づけられた細胞集団であり、分化経路上の位置づけとしてはCMPと異なることが示唆された。

CD42b(+)/CMPの起源についてin vitroの培養で検討した結果、CD150(+)/LSKからCD42b(+)/CMPが分化したのに対し、CD150(-)/LSK、CD42b(-)/CMP、およびMEPからはCD42b(+)/CMPの分化誘導は確認できなかった。これらの結果から、CD42b(+)/CMPはCMP/MEPを介さずに造血幹細胞より直接的に巨核球へ分化する経路上に位置する、新規の巨核球前駆細胞(MkP)集団である可能性を考

えた(図2)。

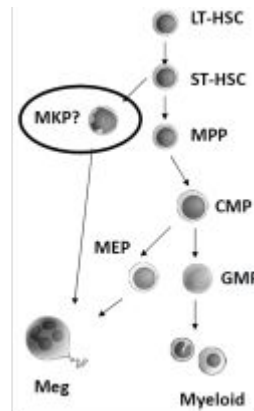


図2 新規巨核球前駆細胞および巨核球分化のバイパス経路

(2)巨核球分化とNotchシグナル

巨核球分化にはトロンボポエチン(TPO)とそのレセプターであるMplを介するシグナルが重要だが、TPOやMplのノックアウト(KO)マウスでも一定程度の巨核球や血小板が産生されて出血死を免れるため、TPO-Mplシグナル以外の巨核球分化シグナルの存在が示唆されていた。近年、巨核球分化においてNotchシグナルが重要であることが明らかになっている(Cell Stem Cell 3:314-326, 2008)。我々はMplのKOマウスでは野生型よりもCD42b(+)/CMPが減少するが、MEPでは差がみられないことを見出しており、これらの細胞分画は異なったシグナル制御を受けていると考えた。一方、骨髓内においてCD42b(+)/CMPはNotchリガンドのひとつであるDelta4を発現する細胞の近傍に位置していることや(図3)、CD42b(+)/CMPではNotchシグナルの下流に位置するHes1が高発現していることも見出しており、NotchシグナルによるCD42b(+)/CMPの制御の可能性を示唆していると考えた。

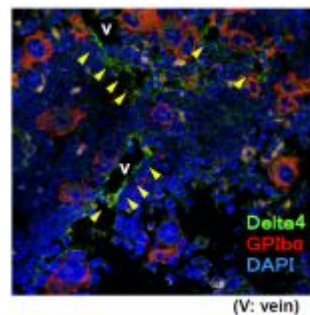


図3 CD42b(+)/CMPとDelta4

2. 研究の目的

(1) CD42b(+)/CMPが純粋なMkPであることの証明およびCD42b(+)/CMPを含む巨核球分化経路の解明

移植モデルを用いてCD42b(+)/CMPがin vivoにおいてMkPとしてはたらくことを示すと

もに、MEP を移植した場合と比較しつつ、巨核球分化までの日数や血小板産生能などを検討する。また、CD42b(+)CMP と MEP について、stemness の維持や巨核球分化に重要な転写因子の発現を single cell PCR により比較することで、CD42b(+)CMP と MEP の違いや関連を見出す。これらを通じて CD42b(+)CMP が純粋な MkP であることを示すとともに、HSC から成熟巨核球への分化において CD42b(+)CMP が経路のどこに位置するのか、特に MEP との違いに注目しつつ明らかにする。

#### (2)TPOシグナルとNotchシグナルによる巨核球分化制御

巨核芽球性白血病由来の細胞株である UT7/TPO を用い、Notch シグナルの下流にある Hes1 を抑制することで、本細胞の巨核球への分化における Notch シグナルの役割の一端を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) CD42b(+)CMP が純粋な MkP であることの証明および CD42b(+)CMP を含む巨核球分化経路の解明

移植モデルによる in vivo での CD42b(+)CMP の分化能の評価  
すでに in vitro では CD42b(+)CMP が巨核球にしか分化しない純粋な MkP である可能性を示したが、in vivo でも CD42b(+)CMP が純粋な MkP としてはたらくことを示すため、ユビキタスに緑色蛍光タンパク(GFP)を発現するトランスジェニックマウスから CD42b(+)CMP、MEP、通常の CMP 等を分取し、放射線照射をした野生型マウスに移植する。経時的に末梢血や骨髓を回収し、血小板や赤血球あるいは前駆細胞の GFP 発現率を算出し、CD42b(+)CMP、MEP、通常の CMP 等の in vivo での分化能を比較する。

CD42b(+)CMP の上流に位置する細胞の同定  
CD42b(+)CMP がどのような細胞から生じるかを明らかにすることで、CD42b(+)CMP を含む分化経路を明らかにする。造血幹細胞・前駆細胞を表面抗原によって分け、それぞれの分画から CD42b(+)CMP あるいは成熟巨核球への分化能を in vitro・in vivo で評価する。特に CD41(+)LSK 細胞に注目する。

single cell PCR による遺伝子発現パターンの比較

CD42b(+)CMP、CD41(+)LSK、MEP 等に分類される細胞について、単一細胞レベルで遺伝子発現パターンを比較する。これにより各分画間の近似性を評価し、分化経路図において近縁の細胞が否かの判断の一助とする。

緊急的血小板造血におけるバイパス経路の役割

マウスに 5-FU を投与し造血抑制を引き起こ

した後の回復過程において、骨髓や末梢血の細胞を採取し、含まれる細胞分画を解析することで、緊急的血小板造血における CD41(+)LSK-CD42b(+)CMP 経路や古典的な MEP を介した経路の役割を明らかにする。

(2)Notch シグナルに着目した巨核球分化制御の解明

巨核芽球性白血病由来の細胞株である UT7/TPO は巨核球への分化が可能な細胞である。この細胞に、C 末端を削除した Hes1 タンパクを発現する遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入する。これにより発現する C 末端欠損 Hes1 タンパクは、通常の Hes1 タンパクに対して抑制的(ドミナントネガティブ)にはたらくことが知られている。遺伝子導入 UT7/TPO およびコントロール UT7/TPO を巨核球へ分化させ、その違いを比較することで、Hes1 抑制が巨核球分化に与える影響を解明する。

### 4. 研究成果

(1) CD42b(+)CMP が純粋な MkP であることの証明および CD42b(+)CMP を含む巨核球分化経路の解明

CD42b(+)CMP は in vivo においても純粋な MkP である

GFP をユビキタスに発現するマウスから CD42b(+)CMP を分離し、放射線照射を行ったマウスに移植して分化能をみたところ、CMP・MEP を移植した場合とは異なり、CD42b(+)CMP は巨核球・血小板産生のみを示し他の骨髓球系細胞には分化しなかった。この結果、CD42b(+)CMP は巨核球のみにしか分化能を持たない、純粋 MkP であることが in vivo でも示された。

CD42b(+)CMP は、CD41(+)LSK 細胞から分化する

LSK は造血幹細胞/前駆細胞を含む分画として知られる。分化培養を行うと CD42b(+)CMP は LSK から生じ、CMP や MEP からは分化しないことを明らかにした。さらに、LSK のうち、CD41(+)LSK から CD42b(+)CMP が高頻度に分化誘導可能であることが分かった。CD41(+)LSK から誘導された CD42b(+)CMP は、マウスから直接採取された CD42b(+)CMP と同様に、巨核球への分化能のみを備えており、純粋 MkP であると考えられた。また、CD41(+)LSK をマウスへ移植すると、血小板とともに顆粒球や B 細胞・T 細胞への分化がみられるが、Flt3(+)LSK では血小板への分化はみられなかった。こういった結果から、CD41(+)LSK の一部が CD42b(+)CMP への分化能を有していると考えられた。

CD41(+)LSK と CD42b(+)CMP は類似の遺伝子発現パターンを呈する

単一細胞で遺伝子発現プロファイルを解析

すると、CD41(+)LSK と CD42b(+)CMP は非常に近い遺伝子発現パターンを呈するのに対し、これらと MEP とでは発現パターンは異なっていた。

～ の結果から、CD42b(+)CMP は純粋 MkP であり、この細胞は CD41(+)LSK から MEP を介さずに直接分化するバイパス経路を構成していることが示唆された。

緊急的血小板造血におけるバイパス経路の役割

マウスに 5-FU を投与し血小板減少を起こさせると、回復の過程で CD41(+)LSK の一部に CD42b の発現がみられた。この CD41(+)42b(+)LSK は巨核球への強い分化傾向を有していた。この結果から、CD41(+)LSK は、緊急的血小板造血において CD42b(+)を発現しつつ巨核球へと分化し、これを補うという役割を担っていることが示唆された。

(2) Notch シグナルに着目した巨核球分化制御の解明

UT7/TPO 細胞に C 末端欠損 Hes1 タンパクを発現させ Notch-Hes1 シグナルを抑制すると、巨核球への分化が抑制された。このことは Notch-Hes1 シグナルが巨核球造血への分化を促すはたらきを持っていることを示唆するが、詳細な機構の解明は今後の課題である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

金沢 陽介、他、TPO/cMpl-dependent megakaryocyte lineage decision at the proximity of hematopoietic stem cells、第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日～2013 年 10 月 13 日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1 研究代表者)

横山 泰久 (YOKOYAMA, YASUHISA)

筑波大学・医学医療系・講師