

平成 27 年 10 月 16 日現在

機関番号：82610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893234

研究課題名(和文)Biomimetic環境での造血幹細胞の分裂様式解析と培養条件の最適化について

研究課題名(英文)Analyses of hematopoietic stem cell division patterns in biomimetic culture conditions and optimization of culture condition for hematopoietic stem cells

研究代表者

生島 芳子 (Ikushima, Yoshiko)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：00571366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞の分裂様式を単一細胞レベルで解析する独自の系と限界希釈移植実験の結果により、ファイブネクチンコートされたpolyethylene glycol (PEG) hydrogel microwell上でAngiopoietin-1 (Angpt1)を培地に添加して造血幹細胞を培養すると、細胞分裂に際して娘幹細胞の生じる割合が上昇し、in vitroにおける造血幹細胞の減少が抑制される事が明らかとなった。Biomimeticな培養環境では、娘幹細胞が生じる細胞分裂の割合が増えin vitroでの造血幹細胞維持・増幅につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated hematopoietic stem cell (HSC) division patterns at the single cell level based on gene expression profiles of paired daughter cells (PDCs) derived from highly purified long-term HSCs. Also we analyzed the frequency of daughter stem cells with long-term bone marrow (BM) reconstitution activity in PDCs by limiting dilution competitive BM transplantation assays. We revealed that HSCs cultured on fibronectin-coated PEG hydrogel microwells with Angpt1 produce more daughter stem cells compared to HSCs cultured on fibronectin-coated normal cell culture dish without Angpt1. Our data indicated that biomimetic cell culture condition could maintain HSCs in vitro.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：造血幹細胞 娘幹細胞 単一細胞 幹細胞維持 ニッチ分子

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は骨髄ニッチに存在し、静止期に留まるか自己複製あるいは分化を伴う細胞分裂を行うことにより造血システムの恒常性を維持している。細胞分裂の際、個々の造血幹細胞は2つの幹細胞あるいは2つの分化細胞を生じる対称分裂か幹細胞と分化細胞を1つずつ生じる非対称分裂のいずれかを行い、総体として幹細胞プールと分化細胞産生のバランスを保っていると考えられるが、これまでに多く行われてきた細胞集団を対象とする解析手法では集団内での平均化されたデータしか得ることが出来ず、個々の細胞の特性の評価や細胞分裂パターンの評価は困難であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、我々は、造血幹細胞が分裂して生じる娘細胞について、その遺伝子発現を単一細胞レベルで網羅的に解析する独自の系を立ち上げ(単一細胞遺伝子発現解析法 (Paired Daughter Cell (PDC) アッセイ法)、親造血幹細胞およびその娘細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイルを元に、個々の造血幹細胞の分裂パターンを評価・解析する独自の系を確立してきた。本研究の目的は、これまでに構築してきた PDC アッセイ法をもちいて、造血幹細胞の分裂動態を評価し、その制御機構を明らかにするとともに、*in vitro* において造血幹細胞がより多くの娘造血幹細胞を生じるような培養条件を検討し、造血幹細胞を *in vitro* で長期に維持・増幅出来る培養条件の最適化を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究にあたっては、親となる造血幹細胞の均一性が重要ととるため、東京大学黒川峰夫教授より Evi1-GFP レポーターマウスを供与頂き、FACS を用いて高度に純化された細胞 (Lineage⁻cKit⁺Sca1⁺CD41⁻CD48⁻CD34⁻CD150⁺Evi1-GFP^{high} 細胞) を親細胞として用いた (Kataoka K et al. JEM 2011)。

まず、極めて高度に純化された造血幹細胞を、基本メディウム (SF-O3 メディウム + 100ng/ml SCF, TPO) 内で2日間培養する。そして生じるPDCsをマイクロマニピュレーターにより個別に採取し、単一細胞遺伝子発現解析を行う (図 1)。得られる娘細胞の遺伝子発現プロファイルは親幹細胞や前駆細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイルと比較することで、娘細胞が「娘幹細胞」と「娘分化細胞」のいずれであるのかを評価する。この比較にあたっては、学習モデルの1つである Support Vector Machine (SVM) classifier を用いる。Support Vector Machine (SVM) classifier では、2つの異なる集団(本研究においては造血幹細胞集団と前駆細胞集団)のサンプルデータを入力すると、その集団を最も明瞭に区別するパラメータと境界を得る

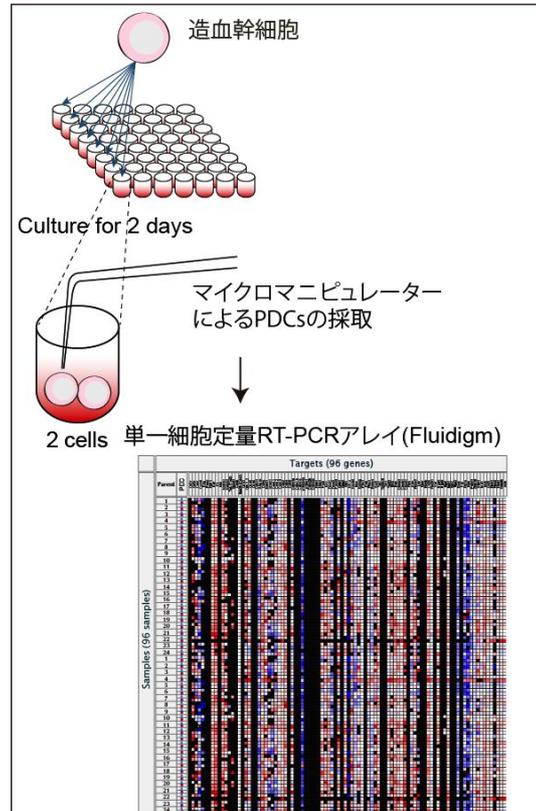


図 1. Paired Daughter Cell (PDC) アッセイ法

ことが出来る。その上で娘細胞の遺伝子発現プロファイルの情報を入力すれば、娘細胞が「幹細胞」と「前駆細胞」のどちらであるかを評価でき、1個の親細胞から生じた1ペアの娘細胞が「幹細胞-幹細胞」「幹細胞-前駆細胞」「前駆細胞-前駆細胞」のどの組み合わせであるか分類できる。以上の手法により、*in vitro* における造血幹細胞の分裂パターンを評価する (図 2)。ただし、この評価法はあくまで遺伝子発現パターンにもとづくもので、「娘幹細胞」と分類されたものが、実際に幹細胞としての性質、すなわち長期骨髄再構築能をもつかどうかについては限界希釈移植実験を用いて評価する。

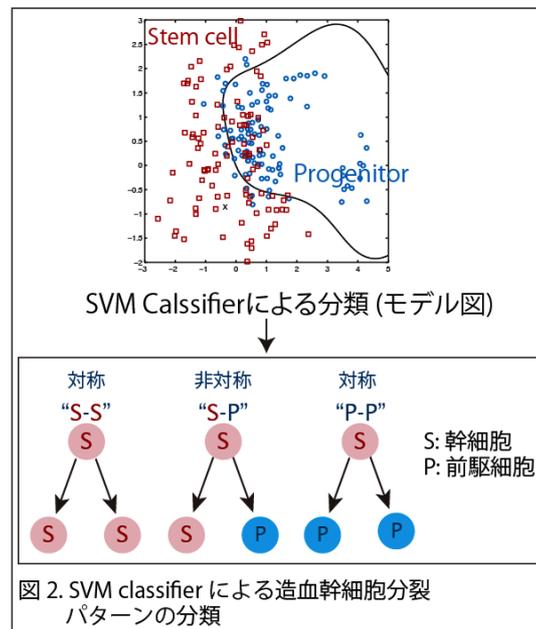


図 2. SVM classifier による造血幹細胞分裂パターンの分類

Biomimetic な培養環境としては、polyethylene glycol (PEG) hydrogel microwell を用いる (図 3)。これは PEG vinylsulfone (PEG-VS)を重合して作製される細胞培養材料で従来の細胞培養プレートに比して柔らかく保水性に優れている。さらに PEG hydrogel microwell はタンパク分子での修飾が可能である (Lutolf MP et al Integr Biol 2009, Lutolf MP, Blau HM Adv Mater 2009)。本研究では主にファイブロネクチンコートした PEG hydrogel microwell 上での造血幹細胞分裂パターンの評価を行った。また、これまでの骨芽細胞特異的な過剰発現マウスモデルでの実験および PDC アッセイの結果より、造血幹細胞数の増加に寄与する可能性が示唆されている Angiopoietin-1 (Angpt1)を液性のニッチ因子として主に用いた (Arai et al. Cell 2004, Gomei Y et al. Exp Hematol 2010, Ikushima YM et al. Biochem Biophys Res Commun 2012)。

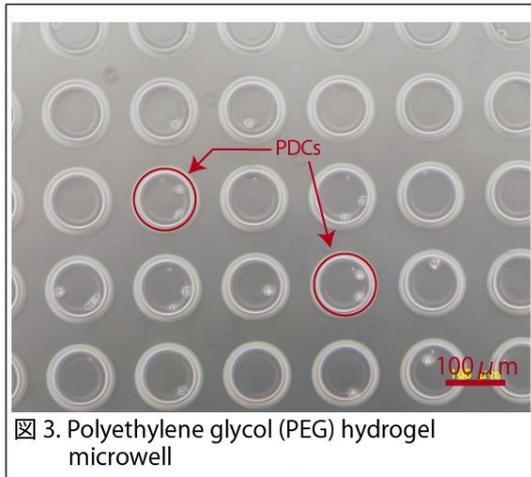


図 3. Polyethylene glycol (PEG) hydrogel microwell

4. 研究成果

(1) ファイブロネクチンコートされた通常の細胞培養プレートおよび PEG hydrogel microwell 上で得られた娘細胞について、本研究開始時までも既に PDC アッセイ法および SVM classifier による幹細胞性評価を行っていたが、本研究では、単一細胞レベルで網羅的に発現解析を行っている遺伝子のなかでも親造血幹細胞の分裂パターンを分類する上で特に重要となる遺伝子群の抽出をすすめ、これに基づいて、SVM classifier による造血幹細胞の分裂パターン解析を改善して再評価を行った。この結果、8 週齢のマウス由来の造血幹細胞をファイブロネクチンコートした通常の細胞培養プレートで培養した場合にはその多くは 2 つの前駆細胞に分裂してしまうものの、培養液に Angpt1 を添加することで少なくとも 1 つの娘幹細胞を生じる細胞分裂パターンが増える傾向があること、さらに、ファイブロネクチンコートされた PEG hydrogel microwell 上で同様の

実験を行った場合には Angpt1 添加培養液中では 2 つの前駆細胞を生じる分裂パターンの割合が Angpt1 無添加の条件と比べて有意に減少し、総体として造血幹細胞数の減少が抑制されるという結果を得た (図 4)。

また 4 週齢のマウス由来の造血幹細胞を親として、ファイブロネクチンコートされた通常の細胞培養プレートで PDC アッセイを行った場合には、Angpt1 の添加の有無に関わらず、過半数の細胞が「幹細胞-幹細胞」分裂をしているとの結果が得られ、若年期の造血幹細胞は *in vitro* においてもある程度幹細胞性を保持できる可能性が示唆された。

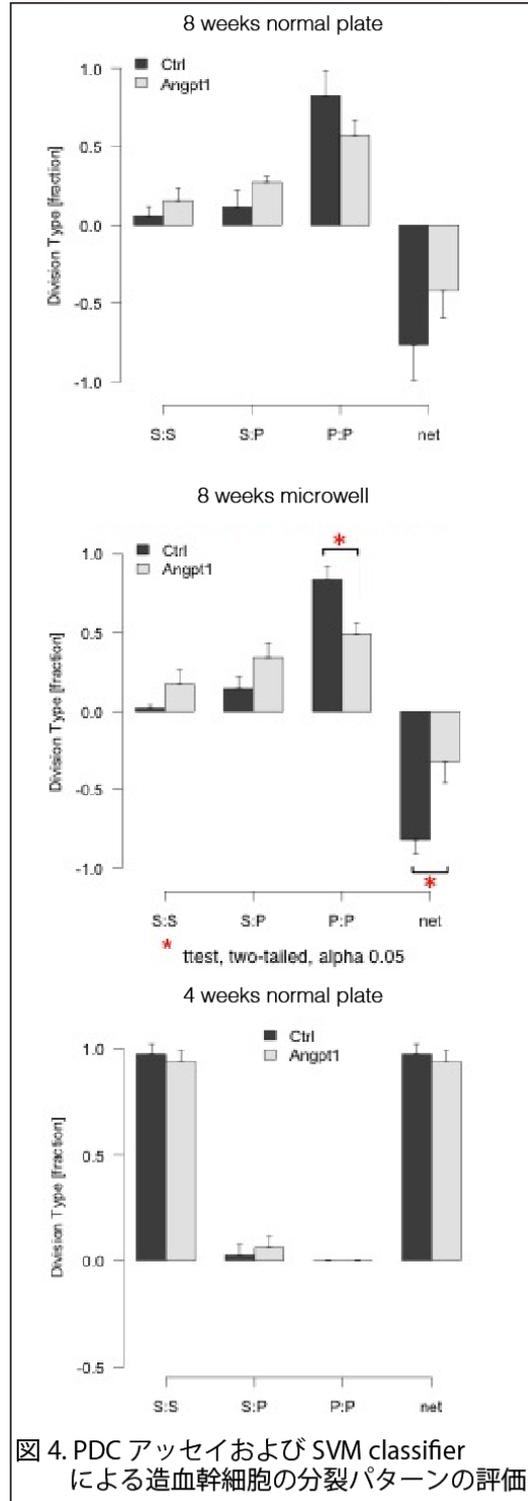


図 4. PDC アッセイおよび SVM classifier による造血幹細胞の分裂パターンの評価

(2)ファイブロンコートされた通常の細胞培養プレートおよび PEG hydrogel microwell 上で得られる娘細胞を用いて限界希釈移植実験を行った。この結果、どちら培養マテリアルを用いた場合にも培地に Angpt1 を添加することで、長期骨髄再構築能をもつ娘幹細胞がより高い割合で生じることを示唆するデータを得た。くわえて、同じ Angpt1 添加条件であっても、通常の細胞培養プレートに比べ、ファイブロンコートされた PEG hydrogel microwell 上では、さらに高い割合で長期骨髄再構築能をもつ娘幹細胞が生じることが分かり、今後、他のニッチ分子で修飾した PEG hydrogel microwell での造血幹細胞培養でも、高い幹細胞性の維持能力が発揮されるものと期待された。また、これらの移植結果は PDC アッセイ法と SVM classifier による娘細胞の幹細胞性の評価と関連しており、我々の単一細胞遺伝子発現プロファイルに基づく幹細胞性評価の方法の信頼性の高さが裏付けられた。

(3)長期的な細胞培養を視野に、ファイブロンコートされた通常の細胞培養プレート上で1つの親造血幹細胞を培養して生じる2ペア(4個)の grand daughter cell について単一細胞網羅的遺伝子発現解析を行い、同様に SVM を用いて幹細胞性の評価を行った。すると、全ての grand daughter cells は分化細胞に分類されてしまい、一般の細胞培養プレートでは造血幹細胞の維持が困難であることが浮き彫りとなった。

(4)これまで PDC アッセイ法では、造血幹細胞の維持や分化に重要であることが既に知られている 96 遺伝子を発現解析の対象としていた。新たに遺伝子発現解析の対象とする遺伝子セットを検討するために行った長期骨髄造血幹細胞分画(LSKCD48-CD41-CD34-CD150⁺Evi1-GFP^{hi}細胞)と前駆細胞分画(LSKCD48-CD41-CD34-CD150⁺Evi1-GFP^{lo}細胞)および LSKCD48-CD41-CD34⁺CD150⁻細胞)のマイクロアレイデータを解析する中で、長期骨髄造血幹細胞分画で特異的に発現の高い遺伝子が見出された。これらの遺伝子の造血幹細胞における働きの検討や造血幹細胞のマーカー分子としての有用性について、今後更なる研究の発展が期待できる。

以上、PDC アッセイ法および SVM classifier を用いた造血幹細胞の分裂様式の評価および限界希釈移植実験の結果、ファイブロンコートした PEG hydrogel microwell は通常の細胞培養プレートに比べ娘幹細胞を生じる分裂パターンを促進し、*in vitro* での造血幹細胞維持に寄与すること、Angpt1 を培地に添加することで、より一層造血幹細胞が維持されることが示唆された。

また PDC アッセイ法および SVM classifier を用いた娘細胞の幹細胞性の評価結果は移植実験の結果と関連しており、我々の単一細胞遺伝子発現プロファイルに基づく幹細胞性評価の手法は信頼性の高い評価方法であることが分かった。また、娘細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイルの解析とマイクロアレイデータの解析をすすめる中で、Flt3, Nanog, Pou5f1 など造血幹細胞の分裂パターンの評価に深く関与する遺伝子を抽出出来たとともに、造血幹細胞と前駆細胞を区別する上で有用な新たな遺伝子候補が浮かび上がった。

以上の結果から、PEG hydrogel microwell と液性ニッチ因子を用い biomimetic な培養環境を構築することで、造血幹細胞の分裂に際し娘幹細胞を生み出す細胞分裂を促進し、*in vitro* における造血幹細胞の維持・増幅ができる可能性が示唆された。本研究結果については、現在、論文作成中である。今後、PEG hydrogel microwell をファイブロンコート以外の細胞外マトリックス、細胞接着分子で修飾し、より長期的な幹細胞の維持が可能となるか検討する必要がある。現在は、N-カドヘリンでコートした PEG hydrogel microwell を用いて研究を進めている。

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1件)

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.* 査読有、2013 Nov 8;441(1):196-201
doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.032. Epub 2013 Oct 16.

〔学会発表〕(計2件)

生島芳子, Ben D MacArthur, 細川健太郎, Matthias P Lutolf, 須田年生, 新井文用, 単一細胞レベルでの造血幹細胞の分裂パターン制御機構の解析、第75回日本血液学会学術集会、2013年10月12日、ロイトン札幌他(北海道・札幌市)

生島芳子, Ben D MacArthur, Patrick S Stumph, 細川健太郎, Alain Roch, Matthias P Lutolf, 須田年生, 新井文用, 単一細胞レベルでの娘細胞解析に基づく Angpt1 の造血幹細胞分裂パターン決定における作用について、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
特に無し

〔その他〕
特に無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

生島 芳子 (Ikushima M Yoshiko)
国立国際医療研究センター研究所・糖尿病
研究センター・分子糖尿病医学研究部・上
級研究員
研究者番号：00571366

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

新井 文用 (Arai Fumio)
九州大学応用幹細胞医科学部門・幹
細胞再生修復医学分野・教授
研究者番号：90365403
細川 健太郎 (Hosokawa Kentaro)
九州大学応用幹細胞医科学部門・幹
細胞再生修復医学分野・助教
研究者番号：90569584

(4)研究協力者

須田 年生 (Suda Toshio)
Ben D. MacArthur
Patrich S Stumpf
Matthias P. Lutolf