

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461410

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞からのプレ巨核球前駆細胞の同定と特性の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of pre megakaryocytic progenitor cells from adipose-derived stem cells

研究代表者

松原 由美子 (Matsubara, Yumiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：70365427

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)：血小板の産生機序は不明点が多い。本研究は、脂肪幹細胞から分化し、自らトロンボポエチンを分泌・消費しながら高率に巨核球分化に向かうプレ巨核球前駆細胞の同定を目的とした。候補解析を基にFACSで得たCD71の発現の有無の細胞を巨核球分化誘導培地で培養した。その巨核球産生量はCD71陰性脂肪幹細胞に比し、約6倍の産生を認めた。single cellの遺伝子解析結果との抱き合わせ解析によりc-MPLに着目した検討を行った結果、c-MPL陽性脂肪幹細胞では高い頻度の巨核球産生・血小板産生を認めた。本研究は、CD71/c-MPL陽性脂肪幹細胞は高率に巨核球に分化する細胞であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Megakaryocytes (MKs) and platelet production are complex processes beginning with stem cells. We recently reported that adipose-derived stem/stromal cells (ASCs) differentiate into MKs and platelets. Although ASCs are not hematopoietic lineage cells, the differentiation of ASCs into MKs does not require gene transfer as they utilize endogenous genes and is dependent on endogenous thrombopoietin (TPO). ASCs have various types of cells. Thus, this study aimed to identify pre megakaryocytic progenitor cells, MK-biased cells in ASCs. We performed flowcytometry analysis, FACS, and single cell analysis (gene expression), and the data suggested that MK and platelet production from CD71- and/or c-MPL-expressing ASCs was higher than that CD71/c-MPL-negative ASCs. We also showed that the production of endogenous TPO via the transferrin receptor CD71 is involved in MK differentiation from ASCs. Taken together, CD71- and/or c-MPL-expressing ASCs are involved in MK-biased cells in ASCs.

研究分野：血栓止血学、血液学

キーワード：血小板 巨核球

1. 研究開始当初の背景

血小板は、生体内において止血機能を担う他類なき血液細胞である。抗がん剤使用時など後天的あるいは先天的の血小板減少が重篤な場合は死に至るように、**血小板は生体機能維持に必須の細胞でありながら、その産生機序は、白血球や赤血球に比べて不明点が多く、血小板減少に対する予防や治療法の開発は十分に進んでいるとは言いがたい。血小板は巨核球から放出されるが、血小板産生機序の解明研究が遅れていた大きな理由は、生体内での巨核球の数が少なく、研究のため十分量の数を得ることが困難であったため、競争的な研究グループが多く存在するも、限られた条件での研究が遂行されてきた事である。**

このような背景の中、本研究の**分担者らは細胞分離と移植技術などを活かして、HSC から血小板産生経路の新たな概念を報告した**(文献#1: *Nature* 2013)。これまで HSC は、階層的な血球分化モデル、いわゆる Hierarchy に従って各血液細胞に分化するとされてきたが、この報告では、**HSC 集団の中に、トロンボポエチンに制御される巨核球・血小板へ分化しやすい細胞集団の存在が同定された。**驚くべき事に、その細胞集団は階層的な血球分化モデルに適合しない位置に存在していることが移植実験により示された。この知見は、従来の階層的な血球分化モデルとは異なるが、高度に巨核球分化が決定づけられた巨核球前駆細胞に類似する細胞が巨核球造血過程に存在する事を示唆している。

一方、本研究の**代表者らは、*in vitro*での巨核球・血小板分化誘導法の開発・その機序の解明研究を基に、脂肪幹細胞(脂肪前駆細胞)集団に巨核球・血小板へ効率よく分化する細胞が存在する事を報告している**(文献 #2-6: *Blood* 2012 など)。

1. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, **Matsuoka S**, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*, Advanced Online Publication. 2013.

2. **Matsubara Y**, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. OP9 bone marrow

stromal cells differentiate into megakaryocytes and platelets. *Plos One* 8 (3): e58123, 2013.

3. Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, Poncz M, **Matsubara Y**. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood* 120 (18): 3812-21, 2012.

4. **Matsubara Y**, Murata M, Ikeda Y. Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol.* 788: 249-58, 2012.

5. **Matsubara Y**, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 796-800, 2010.

6. **Matsubara Y**, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y: Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 716-720, 2009.

2. 研究の目的

本研究の研究代表者あるいは分担者らのグループは、既存の階層的な血球分化モデルと異なる血小板産生経路の存在と造血幹細胞(HSC)の中に血小板へ分化しやすい細胞が存在する事を論文報告した(2013 *Nature*, 2012 *Blood* など)。血小板を放出する巨核球は細胞表面因子や転写因子の発現において、HSC に近いパターンをとる事から巨核球分化過程の研究は注目を集めている。本研究は、新規概念すなわち脂肪幹細胞から分化し、CD71 や CD41、c-mpl などの発現調節を介して自らトロンボポエチンを分泌・消費しながら高率に巨核球分化に向かう**プレ巨核球前駆細胞の同定と特性解析を行う**。この成果は、不明点の多い血小板産生の疑問解決、その基礎研究成果が十分でないために後れている血小板減少症の予防・治療に対する有用性の高い新規アプローチ法開発という問題解決につながる。

これまでの研究において、脂肪幹細胞の細胞株からは約 60%、初代培養細胞集団から約 30%の割合で巨核球・血小板に分化する細胞が存在する事を見いだしており、種々の方法でそれら細胞の特徴を検討したところ、それ

ら細胞は、トランスフェリン/CD71 刺激を介する自己分泌トロンボポエチン (2013 特許出願済:研究業績#6) を用いて成熟巨核球へ分化する、巨核球分化を促進する IL-6 や IL-11 を有している。巨核球分化誘導刺激前は、HSC 表面マーカーの c-kit は陰性、Sca-1 は陽性、その刺激後 2-3 日で巨核球マーカーの CD41 発現や巨核球分化に重要な因子 (c-mpl, p45NF-E2 など) の発現増加が認められる等、既存の巨核球前駆細胞と呼ばれている細胞とは明らかに異なる特徴を有する。特にトロンボポエチンに関して、HSC を巨核球分化誘導に用いる場合は、リコンビナントのトロンボポエチン添加は必須である。この知見は、前述の骨髄 HSC から巨核球分化の過程において「巨核球前駆細胞様の細胞の存在」が考えられるという仮説に適合するものである。これら知見に基づき、本研究において、新規概念すなわち 脂肪幹細胞から分化し、CD71 や CD41, c-mpl などの発現調節を介して自らトロンボポエチンを分泌・消費しながら高率に巨核球分化に向かうプレ巨核球前駆細胞(Pre Megakaryocytic Progenitor Cells: PMP)の同定と特性解析を行うために、既に基礎検討が詳細に行われている脂肪幹細胞を主に用いて進行する研究計画に至った。本研究は、代表者と分担者がそれぞれの専門分野で世界に先駆け発見した知見を統合して計画された。特に巨核球・血小板産生研究に脂肪幹細胞を用いることは、既存の技術では困難であったサンプル量の問題と他の血球細胞分化の干渉の問題を解決できる点で、非常に競争力のあるアプローチである。細胞数に関しては、マウス骨髄細胞から得た HSC の *in vitro* 増殖能はほとんど無いが、脂肪幹細胞は 3 日で 3 倍、7 回まで継代しても巨核球分化誘導効率低下しない。平均的に、脂肪幹細胞からは同数の HSC を用いた場合の 100 倍以上の巨核球を得ることが出来る。また、脂肪幹細胞は、巨核球・血小板分化に重要な転写因子(p45NF-E2, GATA2, RUNX1, Fli1, FOG1 など)を元々有しているが(研究業績#3)、赤血球や白血球分化に重要な転写因子を持たず、それら細胞には分化しないため、**巨核球分化特異的な因子や経路を解析できる。**

本研究期間内で明らかにしたい具体的な内容は、PMP 表面マーカー (未分化抗原の発現、間葉系幹細胞との比較を含む)、PMP が含有する因子(IL-6、IL-11 など)の同定とその発現動態、PMP の巨核球分化効率(巨核球にしか分化しない? HSC や CMP、MEP との比較)、PMP の発現解析: 骨髄や脂肪組織での発現部位や量、である。これらに関して、これまで蓄積した基礎検討データを基に統合的な検討を行う。得られた結果は、血小板産生刺激の標的細胞の発見につながり、骨髄移植時や化学療法、あるいは出血時の血小板減少に対する新規アプローチ法や *in vitro* 血小板産生技術開発につながると考える。

3. 研究の方法

本研究の目的である、プレ巨核球前駆細胞 (Pre Megakaryocytic Progenitor Cells: PMP) の同定と詳細な解析を行うために、マウスの細胞株や初代培養細胞、ヒト初代培養細胞を用いて、PMP 表面抗原の同定、未分化細胞や間葉系幹細胞、HSC との表面抗原の相違、PMP の他の血球への分化能、Single cell による PMP 遺伝子発現解析、PMP 含有・分泌因子解析、PMP の *in vivo* (野生型マウス、NOG マウス)機能解析を行った。自験データあるいは文献報告の考察による PMP 表面抗原の絞り込みを行った。使用した細胞は、マウス初代培養細胞(骨髄と皮下脂肪組織の脂肪幹細胞)、ヒト初代培養細胞 (骨髄と皮下脂肪組織の脂肪幹細胞: Cell Application 社)である。これまでに脂肪幹細胞から巨核球分化過程における機序の解明研究において見いだしているヒトおよびマウス PMP 表面抗原の候補、CD41、CD63、CD71、CD109、CD150 の発現検討を行った。CD71 の発現の有無による細胞分離を FACS を用いて行った。これら FACS により分離された細胞は、トロンボポエチン非添加の巨核球分化誘導培地で培養され、その巨核球産生量は、Single cell analyzer (Tali:ライフテクノロジー社)で血小板サイズの CD41 陽性の数をカウントした。single cell の遺伝子解析結果との抱き合わせ解析により c-MPL に着目した検討を行った。c-MPL の発現の有無による細胞分離を行い、トロンボポエチン非添加の巨核球分化誘導培地で培養した。

4. 研究成果

PMP 表面抗原の絞り込みを行うため、マウス初代培養細胞(骨髄と皮下脂肪組織の脂肪幹細胞)、ヒト初代培養細胞 (骨髄と皮下脂肪組織の脂肪幹細胞: Cell Application 社)である。これまでに脂肪幹細胞から巨核球分化過程における機序の解明研究において見いだしているヒトおよびマウス PMP 表面抗原の候補、CD41、CD63、CD71、CD109、CD150 の発現検討を行った。ところ、CD71 の発現有無が細胞により異なっていることを認めた。CD71 の発現の有無による細胞分離を FACS を用いて行い分離された細胞は、トロンボポエチン非添加の巨核球分化誘導培地で培養され、その巨核球産生量は CD71 陽性脂肪幹細胞では CD71 陰性脂肪幹細胞に比し、約 6 倍の産生を認めた。脂肪幹細胞は、トランスフェリンの添加刺激によりトランスフェリン受容体である CD71 を介して、巨核球分化誘導サイトカインであるトロンボポエチンを分泌する。そのトロンボポエチンと受容体 c-MPL の働きにより脂肪幹細胞は巨核球・血小板へ分化する(c-MPL 中和抗体存在下での培養で巨核球分化は約 90%減少)。CD71 は脂肪幹細胞群における PMP 細胞の表面抗原マーカーのひとつの候補と考えられるが、CD71 陽性脂肪幹細胞

の分化誘導効率は100%には達していない。従って、引き続き表面抗原探索を行った。single cell の遺伝子解析結果との抱き合わせ解析により c-MPL に着目した検討を行った結果、c-MPL 陽性脂肪幹細胞では c-MPL 陰性脂肪幹細胞に比し、有意に高い頻度の巨核球産生を認めた。c-MPL 陽性脂肪幹細胞では c-MPL 陰性脂肪幹細胞に比し、有意に高い頻度の巨核球産生に加え、血小板産生も高い頻度で認めた。

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9件)

1. Ono-Uruga Y, Tozawa K, Horiuchi T, Murata M, Okamoto S, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin. J Thromb Haemost. 14(6):1285-1297, 2016.(査読あり)

2. 松原由美子: *in vitro*での血小板産生 日本血栓止血学会誌 27(5) 532-537, 2016(査読なし)

3. 戸澤圭一、松原由美子: アナグレライド 日本血栓止血学会誌 27(1) 49-53, 2016(査読なし)

4. 小野-宇留賀友佳子、松原由美子: 体細胞から直接血小板を作成する技術 医学のあゆみ 257 (3) 213-218, 2016 (査読なし)

5. 松原由美子: 脂肪前駆細胞からの血小板作製 Thrombosis Medicine 5 (2) 22-27 2015 (査読なし)

6. 小野-宇留賀友佳子、松原由美子: 線維芽細胞 巨核球・血小板 (実験工学 別冊)ダイレクトリプログラミング 22-30 2015(査読なし)

7. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Matsubara Y. Megakaryopoiesis. Clinical and experimental thrombosis and hemostasis. Clin Exp Thromb Hemost,1(2)54-58, 2014 (査読あり)

8. 松原由美子: マウスおよびヒト線維芽細胞から血小板への直接リプログラミング 細胞 46 (5) 8-11, 2014 (査読なし)

9. 松原由美子: 線維芽細胞から巨核球へのダイレクトリプログラミング (Generation of Megakaryocytes from fibroblasts and preadipocytes) 臨床血液 55 (4) 387-395, 2014 (査読なし)

[学会発表](計11件)

1. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara: Manufacture of Platelets from Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Functional Comparison to Platelet Concentrates. 58th American Society of Hematology .2016年12月3日-2016年12月6日 サンディエゴ (アメリカ), 口演

2. Noriko Takizawa, Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara: c-MPL Adipose-derived Stromal Cells as a Megakaryocyte-biased Cells by a Single Cell Analysis. 第78回 日本血液学会学術集会, 2016年10月13日-2016年10月15日, 横浜パシフィコ(横浜), 口演

3. 松原由美子: 巨核球・血小板産生研究の新展開 第38回 日本血栓止血学会 2016年6月16日-2016年6月18日 奈良春日野国際フォーラム(奈良), 招待講演

4. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo

Ikeda, **Yumiko Matsubara**: Establishment of Human Adipose Tissue-derived Stromal Cell Lines: a Culture System to Manufacture Megakaryocytes Releasing Functional Platelets. 57th American Society of Hematology. 2015年12月5日-2015年12月8日 オーランド(アメリカ), 口演

5. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Yasuo Ikeda, Shin-ichiro Okamoto, **Yumiko Matsubara**; Establishment and Characterization of Human Pre-adipocyte Cell Line for Manufacturing Platelets. 第77回 日本血液学会学術集会, 2015年10月16日-2015年18日, 石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザホテル金沢、ホテル日航金沢、ホテル金沢、金沢市アートホール、もてなしドーム (金沢), 口演

6. Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, **Yumiko Matsubara**; Characterization of MPL in Human Pre-adipocytes and Its Role in Megakaryocyte Differentiation 第77回 日本血液学会学術集会, 2015年10月16日-2015年18日, 石川県立音楽堂、ANA クラウンプラザホテル金沢、ホテル日航金沢、ホテル金沢、金沢市アートホール、もてなしドーム (金沢), 口演

7. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, **Matsubara Y**: Identification of Megakaryocytic Progenitor Cells among Subcutaneous Pre-adipocytes Thrombopoietin. XXV The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2015年6月20日-2015年6月25日 トロント(カナダ), ポスター

8. 戸澤 圭一、小野-宇留賀 友佳子、堀内 正、村田 満、岡本 真一郎、池田 康夫、須田 年生、**松原 由美子**: ヒト脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導システム: トランスフェリン/CD71/TPO 分泌機序を介した高効率産生 第37回 日本血栓止血学会 2015年5月21日-2015年5月23日 甲府市総合市民会館 (甲府), 口演

9. **松原由美子**: 脂肪幹細胞(脂肪前駆細胞)由来の巨核球・血小板(教育講演) 第63回 日本輸血・細胞治療学会総会 2015年5月28日-2015年5月30日 京王プラザホテル(東京), 招待口演

10. Ono-Uruga Y, Tozawa K, Matsuoka S, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, **Matsubara Y**. A Novel Mechanism of Megakaryopoiesis from Pre-adipocytes: Involvement of Transferrin/ CD71/ TPO Pathways. 56rd The American Society of Hematology. 2014年12月5日-2014年12月9日 サンフランシスコ(アメリカ), ポスター

11. Ono-Uruga Y, Matsuoka S, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, and **Matsubara Y**. Megakaryocyte Differentiation from Preadipocytes through the Production of Endogenous Thrombopoietin via CD71 第76回 日本血液学会 2014年10月31日-2014年11月2日 大阪国際会議場 (大阪), 口演

〔図書〕(計 6 件)

1. 小野-宇留賀友佳子、**松原由美子**: 造血幹細胞ニッチとしての巨核球 巨核球 Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. Megakaryocytes maintain hematopoietic quiescence and promote post-injury

regeneration of hematopoietic stem cells.
Megakaryocytes are essential for HSC
quiescence through the production of
thrombopoietin. Annual Review 2016 血液
(中外医学社) 1-6 2016
(total 234 pages)

2. 松原由美子、村田満：血小板と止血 (単
行本) 止血・血栓ハンドブック (西村書店)
49-55 2015 (total 421 pages)

3. 松原由美子：血小板産生のメカニズム (新・
血栓止血血管学) 2015
金芳堂 total 251 pages

4. 松原由美子：血栓形成における血小板の役
割 (単行本) ファーマコナビゲーターシ
リーズ 抗凝固療法編 38-46 2014 メデ
ィカルレビュー社 total 415 pages

5. 松原由美子、村田満：血小板と止血 (単
行本) 止血・血栓ハンドブック (西村書店)
49-55 2014

6. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球・血小板
への direct conversion (単行本) Annual Review
2014 血液 181-185, 2014
中外医学社 total 240 pages

〔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
松原 由美子 (Yumiko Matsubara)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：70365427

(2) 研究分担者

松岡 佐保子 (Sahoko Matsuoka)
慶應義塾大学・医学部・訪問研究員研究者番
号：20317340

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者