

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26501004

研究課題名(和文)造血幹細胞の自己複製と分化の制御機構の解明とその再生医療への応用のための基盤研究

研究課題名(英文) Basic research on regulatory system for self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells for the purpose of future application to regenerative medicine

研究代表者

安永 晋一郎 (YASUNAGA, Shin'ichiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50336111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Gemininは、造血幹細胞の自己複製と静止期維持を同時に制御する造血幹細胞制御の鍵分子の候補であり、Gemininの発現や機能の精妙な操作により造血幹細胞活性を支配することができると考えられる。本研究では、Geminin-EYFPノックインマウス由来の骨髓細胞から、静止期の造血幹細胞と自己複製中の造血幹細胞を分画し、その遺伝子発現の違いをシングルセルレベルで解析した。また、Gemininを自在に発現導入できるシステムとして、膜透過型リコンビナントGemininタンパク質を作成した。

研究成果の概要(英文)：Geminin regulates both of self-renewal and quiescence maintenance of hematopoietic stem cells (HSCs), and is a candidate key molecule for HSC regulation. Therefore, sophisticated manipulation of Geminin expression and function may be able to control HSC activity. In this study, we sorted out quiescent HSCs and self-renewing HSCs from bone marrow cells derived from Geminin-EYFP knock-in mice and examined difference in their gene expression at single cell level. In addition, we generated recombinant Geminin protein with membrane-translocating motif for easy induction and withdraw of Geminin expression in hematopoietic cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医学 造血幹細胞 自己複製 細胞周期 細胞増殖 細胞分化 Geminin コピキチン化

1. 研究開始当初の背景

ES/iPS 細胞を用いた再生医療を現実的かつ実用的な臨床治療法として確立するためには、目的の成熟細胞を生体内で安定的に供給する幹細胞システムの確立が重要であると考えられる。造血系においては、ES/iPS 細胞から *ex vivo* においてほぼすべての成熟血球細胞を誘導できるが造血幹細胞だけは誘導することができない。また、Hoxb4 を導入すると ES/iPS 細胞から造血幹細胞様の細胞を *ex vivo* で誘導することができるが、この細胞として長期的には造血幹細胞として機能しない。造血幹細胞が長期的に誘導できない理由は、造血幹細胞が自己複製能を維持できず、やがて分化の方向へ誘導されるために、造血幹細胞として長期的に持続することがないと解釈されている。

研究代表者は、造血幹細胞活性制御における重要な細胞内因子として知られ、従来転写制御因子としてのみ働くと考えられてきたポリコム複合体 1 や Hoxb4/Hoxa9 が、DNA 複製ライセンス化制御因子でありかつクロマチンリモデリングを介した幹細胞未分化性維持因子でもある Geminin タンパク質に対する E3 コピキチンリガーゼとして機能し、そのタンパク質代謝を介して造血幹細胞活性を支持していることを明らかにした (PNAS 2008, PNAS 2010, PLoS ONE 2013, MCB 2013)。

Geminin は、細胞周期において APC/C を介したユビキチン-プロテアソーム系で分解制御されており、DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 を阻害して DNA 複製を制御することによって細胞増殖活性を調節する一方で、クロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF の機能的サブユニットである Brahma/Brg1 を抑制し幹細胞の未分化性を維持する機能をも担っている。代表者は上記の Geminin の分子機能とその造血各分化段階における発現パターンから Geminin が造血幹細胞の増殖 (自己複製)

と分化を統括する中枢因子として機能している可能性を提唱した。それは、すなわち造血幹細胞では高い Geminin の発現によって未分化性が保たれつつ静止期に維持され、Geminin の発現が低下すると多分化能性前駆細胞や前駆細胞へと分化するとともに活発な増殖活性によって大量の成熟血球細胞が産生されるというものである。実際、代表者は Geminin を、shRNA を用いてノックダウンした造血幹細胞を移植するとドナー由来の末梢血の成熟血球細胞の産生は増加するが、造血幹細胞の数自体は減少することを確認し、Geminin のダウンレギュレーションが、造血幹細胞からの分化増殖を誘導し活発な成熟血球細胞の産生を促す一方で造血幹細胞の自己複製には必ずしも有利に働くわけではないことを明らかにしている。

そこで代表者は、自己複製中の造血幹細胞における Geminin の発現動態を詳細に解析し、造血幹細胞の分化を抑制しつつ自己複製を促すために至適な Geminin の発現動態を同定することが極めて重要であると考え本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Geminin-EYFP ノックインマウスを用いて Geminin を可視化することで自己複製中の造血幹細胞を同定する方法を確立し、造血幹細胞の分化を抑制しつつ自己複製を亢進させるに至適な Geminin 発現動態や各種遺伝子発現パターンを明らかにし、Geminin の発現レベルを操作することによって造血幹細胞の分化を抑制しつつ自己複製能を賦与する方法を確立することである。将来的には、それらの知見をもとにして *ex vivo* で造血幹細胞を増幅したり ES/iPS 細胞から造血幹細胞を誘導したりする基盤技術の確立につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞ソーティング法により、Geminin-EYFP ノックインマウスの骨髄細胞から造血幹細胞(CD34-KSL 細胞)を分画し、Geminin の発現レベルによりさらに亜分画に分ける。

Geminin の基礎的な発現量は、細胞周期により変動し、CD34-KSL Geminin^{high}細胞は、自己複製中の造血幹細胞分画であることが期待される。そこで、マウスに BrdU を投与し細胞周期解析を行いCD34-KSL Geminin^{high}細胞がS/G₂/M期の細胞であることを確認する。次に単離したCD34-KSL Geminin^{high}細胞を致死的放射線照射したマウスに移植し、移植細胞から細胞周期の各期にある造血幹細胞が出現すること、そしてさらに各細胞系譜の前駆細胞や成熟血球細胞が長期にわたって生み出されることを確認し、CD34-KSL Geminin^{high}細胞が機能的にも自己複製中の造血幹細胞であることを確認する。

(2)そして、それらの分画における造血幹細胞や前駆細胞のマーカ遺伝子群や自己複製や分化の制御に重要とされる遺伝子群、その他の遺伝子群の発現をFludigm社のシングルセル RT-PCR システムを用いて解析し、Geminin が造血幹細胞の自己複製と分化を掛け分ける分子機構の詳細に迫る。

(3)また Geminin の発現操作法として、赤色蛍光をマーカーにしたレトロウイルスベクターや膜透過型リコンビナント Geminin タンパク質による Geminin 導入系を確立する。

4. 研究成果

(1)細胞ソーティング法により、Geminin-EYFP ノックインマウスの骨髄細胞から造血幹細胞を分画し、Geminin の発現レベルによりさらに亜分画に分けた。このマウスに BrdU を投与し細胞周期解析を行いCD34-KSL Geminin-high細胞がS/G₂/M期の細胞であることを確認した。次に単離したCD34-KSL Geminin-high細胞を致死的放射線照射したマウスに移植し、移植細胞から細胞

周期の各期にある造血幹細胞が出現すること、そしてさらに各細胞系譜の前駆細胞や成熟血球細胞が長期にわたって生み出されることを確認し、CD34-KSL Geminin^{high}細胞が機能的にも自己複製中の造血幹細胞であることを確認した。

(2)そして、それらの分画における造血幹細胞や前駆細胞のマーカ遺伝子群や自己複製と分化の制御に重要とされる遺伝子群の発現をFludigm社のシングルセル RT-PCR システムを用いて解析を行った。続けて幹細胞マーカーのみならず、アポトーシス、細胞生存シグナル、相同組換え修復、非相同組換え修復、p53 関連、DNA 複製ライセンス化、細胞周期などのマーカーを加え、幅広くシングルセルの遺伝子発現情報を収集した(論文準備中)。

(3)一方、Geminin-EYFP ノックイン細胞に導入することを目的に、赤色蛍光をマーカーにしたレトロウイルスベクターを用いた Geminin 発現操作系の作成を試みた。しかし、赤色蛍光マーカーは細胞毒性が問題となり、高発現を維持する赤色マーカーを持ったレトロウイルスシステムの作成は難航した。そこで別の Geminin 発現操作法として膜透過型リコンビナント Geminin タンパク質の有用性に着目し、Geminin タンパク質の細胞内への迅速な誘導と迅速な消退が可能であることを証明し、論文を作成した(PLoS One 2016)

(4)本研究の遂行により、今まさに自己複製を行っている造血幹細胞を含む分画を世界に先駆け同定することができ、その性状についてシングルセルレベルで解析することができた。また、Geminin タンパク質を直接導入することで、精妙な Geminin 発現操作を実現できるかもしれないシステムを作製した。本研究の成果は、将来的には *ex vivo* で造血幹細胞を増幅したり ES/iPS 細胞から造血幹細胞を誘導したりする基盤技術の確立に貢献するものである。

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10件)

Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Yasunaga S., Kurogi T., Santo M., Masuhiro Y., Hanazawa S., Ohtsubo M., Naka K. & Takahara Y. Manipulation of cell cycle and chromatin configuration by means of cell -penetrating Geminin. *PLoS ONE*, 11(5), e0155558, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0155558. eCollection 2016.

Yasunaga S., Ohno Y., Shirasu N., Zhang B., Suzuki-Takedachi K., Ohtsubo M., & Takahara Y. Role of Geminin in cell fate determination of hematopoietic stem cells (HSCs) *Int. J. Hematol.*, 104(3), 324-329, 2016. doi:10.1007/s12185-016-2060-9. Epub 2016 Jul 15. Review.

Shirasu N. & Yasunaga S. Duplex PCR-RFLP for the simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in ADH1B and ALDH2 genes. *Anal. Sci.*, 32(12), 1363-1366, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492658>

Gondo K., Ike A., Ogawa M., Shirai K., Sugihara M., Nishikawa H., Iwata A., Kawamura A., Mori K., Zhang B., Miura S., Yasunaga S. & Saku K. Is a bare-metal stent still useful for improving the outcome of percutaneous coronary intervention? From the FU-Registry.

J. Cardiol., 69, 652-659, 2017. doi:10.1016/j.jjcc.2016.06.009. Epub 2016 Aug 2.

Nam S.O., Yotsumoto F., Miyata K., Fukagawa S., Odawara T., Manabe S.,

Ishikawa T., Kuroki M., Yasunaga S. & Miyamoto S. Anti-tumor Effect of Intravenous Administration of CRM197 for Triple-negative Breast Cancer Therapy.

Anticancer Res. 36(7), 3651-3657, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27354636>

Hara, K., Tajima, G., Okada, S., Tsumura, M., Kagawa, R., Shirao, K., Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Hata, I., Sakura, N., Shigematsu, Y., Takahara, Y. & Kobayashi M. Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan.

J. Mol. Genet. Metabol., 118(1), 9-14, 2016. doi:10.1016/j.ymgme.2015.12.011. Epub 2015 Dec 29.

安永晋一郎、大野芳典、瀧原義宏
Gemininによる白血病幹細胞の制御
日本臨床、73(5), 800-805, 2015
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985634>

Hirata, O., Okada, S., Tsumura, M., Karakawa, S., Kimura, Y., Maihara, T., Yasunaga, S., Takahara, Y., Ohara, O., & Kobayashi, M. Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *J. Clin. Immunol.*, 35(5), 512-516, 2015. doi: 10.1007/s10875-015-0165-1. Epub 2015 Apr 26.

Ohno, Y., Saeki, K., Yasunaga, S., Kurogi, T., Suzuki-Takedachi, K., Shirai, M., Mihara K., Yoshida, K., Voncken J. W, Ohtsubo, M. & Takahara Y. Transcription of the Geminin gene is regulated by a negative-feedback loop. *Mol. Biol. Cell*, 25(8), 1374-1383,

2014. doi:10.1371/journal.pone.0155558. eCollection 2016.
Mizoguchi, Y., Tsumura, M., Okada, S., Hirata, O., Minegishi, S., Imai, K., Hyakuna, N., Muramatsu, H., Kojima, S., Ozaki, Y., Imai, T., Takeda, S., Okazaki, T., Ito, T, Yasunaga, S., Takahara, Y., Bryant, V.L., Kong, X.F., Cypowyj, S., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Casanova, J.L., Morio, T. & Kobayashi, M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.*, 95(4), 667-676, 2014. doi:10.1189/jlb.0513250. Epub 2013 Dec 16.

[学会発表](計27件)

大野芳典、鈴木-竹立恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、大坪素秋、仲一仁、安永晋一郎、瀧原義宏 「造血幹細胞の低線量率放射線被ばくに対する分子応答の解析」

第39回日本分子生物学年会、2016, 11/30-12/1、横浜。

Takahara Y., Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Santo M., Yasunaga S., Ohtsubo M., Naka K. A new strategy for manipulating expression and activity of Geminin could make it possible to regulate cell fates of HSCs.

ISEH (International Society for Experimental Hematology) 45th Annual Scientific Meeting, August 25-28, 2016, San Diego, U.S.A.

Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Santo M., Guo Y., Kanno, Yasunaga S., Ohtsubo M., Naka K., Takahara Y. Effect of low dose-rate irradiation on the hematopoietic system.

The 14th Stem Cell Research Symposium,

May 20-21, 2016, Awaji, Japan.

Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Kurogi T., Santo M., Yasunaga S., Ohtsubo M., Naka K., Takahara Y. A new strategy for manipulating expression and activity of Geminin, a cell-fate determinant for HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 16-18, 2015, Kanazawa, Japan.

Suzuki-Takedachi K., Ohno Y., Kurogi T., Santo M., Yasunaga S., Ohtsubo M., Naka K., Takahara Y. Analysis of molecular role for Geminin in self-renewal and differentiation of HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 16-18, 2015, Kanazawa, Japan.

Takahara Y., Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Kurogi T., Naka K., Ohtsubo M., Yasunaga S. A new strategy for manipulating expression and activity of Geminin could make it possible to regulate cell fates of HSCs.

ISEH (International Society for Experimental Hematology) 44th Annual Scientific Meeting, September 17-19, 2015, Kyoto, Japan.

Ohno Y., Yasunaga S., Suzuki-Takedachi K., Kurogi T., Santo M., Ohtsubo M., Naka K., Takahara Y. Manipulation of the Geminin activity by using cell-penetrating Geminin and its domain-specific mutants.

The 13th Stem Cell Research Symposium, May 29-30, 2015, Tokyo, Japan.

Suzuki-Takedachi K., Yasunaga S., Ohno Y., Kurogi T., Ohtsubo M., Takahara Y. Geminin-EYFP knock-in mice provide a powerful tool for dissecting a molecular mechanism regulating self-

renewal or differentiation of hematopoietic stem cells.

The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology of Japan, November 25-27, 2014, Yokohama, Japan.

Kurogi T., Ohno Y., Yasunaga S., Suzuki-Takedachi K., Santo M., Masuhiro Y., Hanazawa S., Ohtsubo M., Takahara Y.

Cell-penetrating recombinant Geminin protein may provide a new strategy for regulating self-renewal or cellular differentiation in hematopoietic stem cells.

The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology of Japan, November 25-27, 2014, Yokohama, Japan.

Yasunaga S., Ohno Y., Suzuki-Takedachi K., Kurogi T., Santo M., Ohtsubo M., Takahara Y. Geminin visualization aids detailed molecular analysis of self-renewing hematopoietic stem cells.

The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 31-November 2, 2014, Osaka, Japan.

Ohno Y., Yasunaga S., Kurogi T., Suzuki-Takedachi K., Santo M., Ohtsubo M., Takahara Y. Direct transmission of a cell-penetrating form of Geminin, a regulator for hematopoietic stem cells.

The 76th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 31-November 2, 2014, Osaka, Japan.

Takahara Y., Yasunaga S., Ohno Y., Kurogi T., Suzuki-Takedachi K., Santo M., Ohtsubo M. Direct transduction of a cell-penetrating form of Geminin, a molecule regulating DNA replication and chromatin remodeling.

ISEH (International Society for

Experimental Hematology) 43rd Annual Scientific Meeting, August 21-24, 2014, Montreal, Canada.

〔図書〕(計3件)

安永晋一郎 編著

福岡大学医学部生化学講座

「モデル・コア・カリキュラム対応 医用生化学-生体物質の代謝と異常-2017年版」2017年3月31日、464ページ
ISBN978-4-9909426-0-1

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/biochem1/index-j.htm> (福岡大学医学部生化学講座)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 晋一郎 (YASUNAGA Shin'ichiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授
研究者番号：50336111

(2) 研究分担者

瀧原 義宏 (TAKIHARA Yoshihiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：60226967

大野 芳典 (OHNO Yoshinori)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：10548986

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし

竹立 恭子 (SUZUKI-TAKEDACHI Kyoko)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・技術職員

山藤 幹茂子 (MIMOKO Sato)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・技術職員

黒木 利知 (KUROGI Toshiaki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・技術職員

山田 博美 (YAMADA Hiromi)

福岡大学・医学部・技術職員