

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06163

研究課題名(和文)造血幹細胞の分化多能性とmidbodyの動態

研究課題名(英文) Multipotency of HSCs and midbody movement

研究代表者

田中 洋介 (TANAKA, YOSUKE)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10509087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cre誘導型のmidbodyレポーターマウスの作製と解析を中心に研究を行った。細胞質分裂時に2つの娘細胞をつなぐ構造物であるmidbodyのマーカースとしてMgcRacGAPと蛍光タンパクであるhmK02との融合タンパクを採用した。造血系特異的にMgcRacGAP-hmK02レポーターを発現させる目的で、Vav-Creマウスとの交配を行い、造血系特異的にMgcRacGAP-hmK02を発現するマウスを樹立した。このマウスから採取した造血幹細胞において、細胞分裂時にMidbodyをhmK02で観察可能であること、造血幹細胞は前駆細胞と比べると高い割合でmidbodyを放出することを明らかにした。

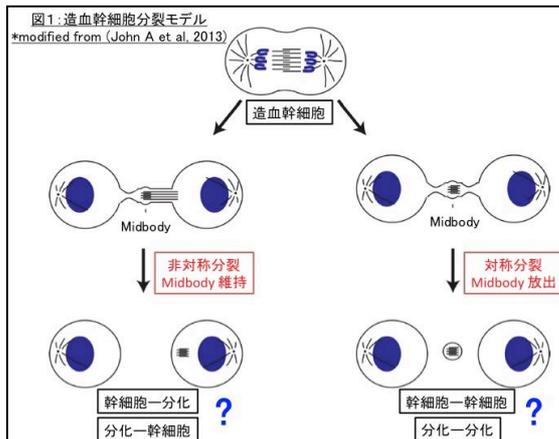
研究成果の概要(英文)：We established a novel Cre-inducible midbody reporter mouse line. Midbody is a unique structure that connects two daughter-cells at the end of cell division. MgcRacGAP-hmK02 fusion protein was used as a surrogate marker for midbody. To visualize midbody behavior in hematopoietic system, we crossed the Cre-inducible midbody reporter mouse line with Vav-Cre mouse line that expresses Cre in hematopoietic lineage. Hematopoietic stem cells from the mouse line nicely expressed MgcRacGAP-hmK02 reporter during cell division. We found that hematopoietic stem cells released midbody with higher probability than progenitor cells did. We are going to examine if this is also the case in vivo in the future.

研究分野：造血幹細胞学

キーワード：造血幹細胞 Midbody 非対称分裂

1. 研究開始当初の背景

Midbody (中央体) は細胞質分裂の際に形成される一時的な構造物である。細胞分裂が終わる際に、midbody はいずれかの娘細胞に継承されることが知られていたが、細胞外に放出されることもあることが最近判明した。(Marzesco, A. M. et al, J. Cell Sci, 2005)。また、midbody が継承または放出されるかは細胞種によって異なることや細胞分化と関係していることが示唆されている (Andreas W. E. et al, Nat. Commun, 2011)。また、幹細胞は癌細胞や不死化細胞と比較すると細胞分裂の際に midbody を放出する割合が高い。このことから、midbody の継承・放出と幹細胞の多能性維持・分化とは密接な関係があることが示唆された。このことから、midbody の継承・放出と幹細胞の多能性維持・分化は密接な関係があることが示唆される。幹細胞が分裂する際に、非対称分裂モデルでは midbody を片方の娘細胞が継承し、その違いにより一方は多能性を継承し他方は分化すること (図1) が予想できるが、いずれが多



能性を維持しているかは不明であり、また同じ midbody を放出した娘細胞でも対称分裂の場合ではどうなるかも不明である。Midbody の動態と造血幹細胞の対称・非対称分裂並びに多能性維持・分化とにある法則性を明らかにすることができれば、midbody の継承・放出を観察することで、造血幹細胞が分裂した後2個の娘細胞が多能性を維持しているかあるいは分化しているかどうかを容易に確認することが可能となる。

申請者の研究室では以前に midbody のマーカーとして MgcRacGAP (Male germ cell Rac GTPase activating protein) を報告している (Minoshima Y. et al, Dev. Cell, 2003)。MgcRacGAP-mVenus 融合タンパクにより、midbody をライブイメージングすることが可能である (Nishimura K. et al, PloS One, 2013)。この MgcRacGAP-mVenus を造血幹細胞・前駆細胞特異的エンハンサー (e1 enhancer: Koh et al, Histol Histopathol, 2015) 下で発現させることにより、in vivo 骨髄において造血幹細胞・前駆細胞特異的に対称・非対称細胞分裂をライブ

イメージングすることが可能である。これまでは骨の内部をライブイメージングすることは不可能と考えられてきたが、2光子励起顕微鏡を利用することにより骨髄を生きたままの状態を観察することが可能になった (Ishii M et al, Nature 2009)。様々な骨髄ニッチ細胞特異的なレポーターマウスや細胞周期モニタリングマウスとの組み合わせで、骨髄において造血幹細胞がどのように対称・非対称分裂をしているのか、どこで分裂しているのか、分裂の際に骨髄ニッチに接着しているのかあるいは浮遊しているのかなどの疑問を検証することが可能になってきている。Midbody の動態と造血幹細胞の対称・非対称分裂並びに多能性維持・分化との間にある法則性を明らかにすることができれば、これらのマウスに加えて MgcRacGAP レポーターマウスは骨髄における造血幹細胞の対称・非対称分裂と分化多能性維持の有無を確認することのできる有用なツールとなることが期待される。

そこで、本研究では造血幹細胞の非対称分裂と Midbody の非対称分配との関連性を検討することとした。

2. 研究の目的

造血幹細胞が対称・非対称分裂する際に midbody が一方の娘細胞に継承あるいは放出されるかを観察し、娘細胞が多能性を継承しているかどうかを検証することで、midbody の多能性維持マーカーとしての利用を模索する。Midbody をマーカーとして in vivo で造血幹細胞の対称・非対称分裂をライブイメージングすることを目指す。

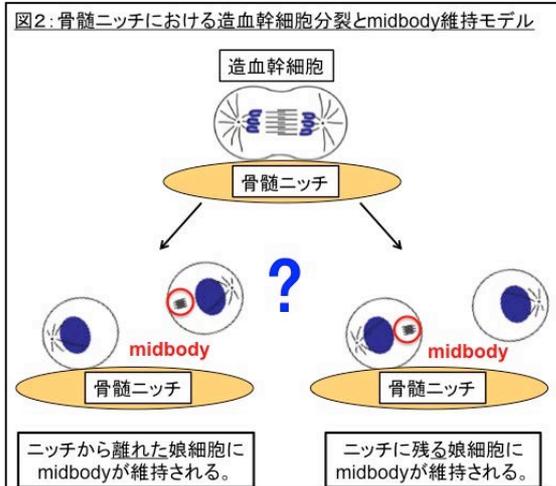
具体的には、

(1) In vitro において造血幹細胞が分裂した際の midbody の継承・放出と娘細胞の多能性維持・分化との関連性を解明する。造血幹細胞の対称・非対称分裂を解析する方法として Paired daughter cell assay (Suda T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984) がある。Paired daughter cell assay とは骨髄から採取した1個の造血幹細胞を in vitro で培養し、1回分裂させた後に2個の娘細胞の多能性分化能を比較する研究方法である。この手法を用いて、

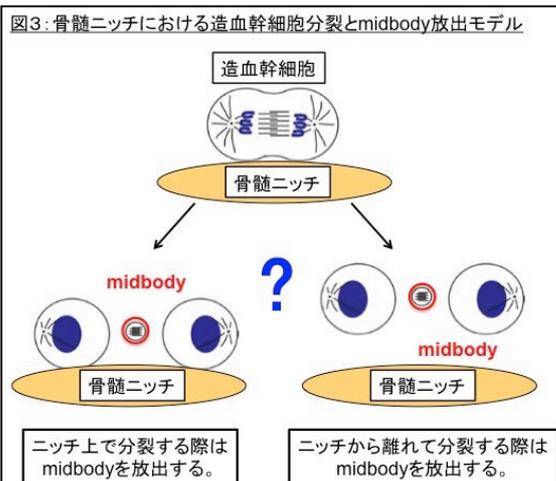
① MgcRacGAP レポーターマウスから造血幹細胞をシングルセルソートし、paired daughter cell assay を行い、多能性維持培地または分化培地で midbody の継承・放出の割合を比較解析する。

② 1回分裂後の2個の娘細胞のシングルセル RNA-Seq を行い、midbody の有無による娘細胞の遺伝子発現プロファイル比較解析を行い、造血幹細胞特異的な遺伝子の発現を確認することで娘細胞の多能性を判断し、midbody の有無と娘細胞の多能性維持との関連性を検証する。

(2) In vivo 骨髄における造血幹細胞が分裂する際の midbody の動態と娘細胞の多能性維持・分化との関連性を解析する。MgcRacGAP レポーターマウスと G0 マーカーマウス、骨髄ニッチ細胞特異的レポーターマウスとを組み合わせ、骨髄において造血幹細胞が分裂する際の midbody の動態を観察する。具体的には、Midbody が娘細胞に維持される場合に、骨髄ニッチに接着している細胞あるいは



骨髄ニッチから離れた細胞のいずれに midbody が維持されるのか (図2)、あるいは接着の有無とは関係はないのか等を観察する。分裂時に2個の娘細胞が骨髄ニッチに接着しているあるいは骨髄ニッチから浮遊している場合における、midbody の放出・維持



の違いや娘細胞の多能性維持・分化の違いを観察する (図3)。

(3) 正常造血幹細胞・前駆細胞と造血器腫瘍幹細胞・前駆細胞とでは細胞分裂時に midbody の動態に何か違いがあるかどうかを検証する。マウス骨髄由来造血幹細胞・前駆細胞や臍帯血由来 CD34+造血幹細胞・前駆細胞などを用いて in vitro において正常造血細胞と造血器腫瘍細胞 (MLL-AF9 を過剰発現) との違いを検証し、造血器腫瘍細胞にのみ見られる独自の細胞分裂メカニズムを見つけ出し、治療のターゲットを模索する。

3. 研究の方法

造血幹細胞の対称・非対称分裂時における midbody の継承・放出と娘細胞の多能性維持・分化との関連性、骨髄ニッチとの関連性について in vitro と in vivo で解析を行う。

(1) 造血細胞特異的に midbody のレポーターである MgcRacGAP-hmK02 を発現するマウスを構築する。

(2) 造血細胞特異的に midbody のレポーターである MgcRacGAP-hmK02 を発現するマウスから、造血幹細胞をソートし多能性維持培地と分化培地とで培養し midbody の継承・放出の割合を比較する。

(3) MgcRacGAP-hmK02 を発現するマウスからソートした造血幹細胞の Paired daughter cell assay、娘細胞のシングルセル RNA-Seq を行い、対称・非対称分裂それぞれの midbody の有無の違いによる娘細胞の多能性維持因子の発現の違いを比較解析する。

(4) 2 光子励起顕微鏡を用いて骨髄のライブイメージングを行い、骨髄ニッチにおける造血幹細胞の midbody の継承・放出の割合を検証する。

(5) マウス造血幹細胞あるいはヒト臍帯血由来造血幹細胞/前駆細胞を用いて、正常細胞と白血化細胞 (AML) との細胞分裂時における midbody の維持・放出の違いを比較する。

4. 研究成果

研究期間を通して、以下のことを明らかにした。

(1) MgcRacGAP-hmK02 レポーターマウスの樹立:

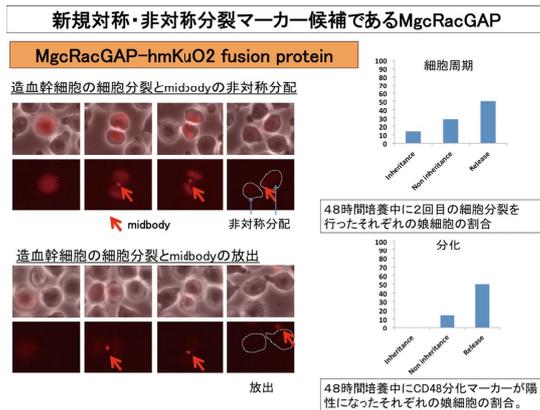
当初の計画通り MgcRacGAP-mVenus を造血幹細胞・前駆細胞特異的エンハンサー (eR1 enhancer) 下で発現させたトランスジェニックマウスを作製したが、残念ながら造血幹細胞・前駆細胞において MgcRacGAP-mVenus の発現を確認することが出来なかったため、計画を変更し、MgcRacGAP-hmK02 を Rosa26 遺伝子座に loxP-STOP-loxP カセットと共にノックインした Cre 誘導型 MgcRacGAP-hmK02 レポーターマウスを作製した。

(2) レトロウイルスにより MgcRacGAP-hmK02 を導入した造血幹細胞・前駆細胞を用いた予備実験:

レトロウイルスにより MgcRacGAP-hmK02 を導入した造血幹細胞・前駆細胞は in vitro において NIH3T3 細胞株 (不死化細胞) と比較すると、高い割合で midbody を放出することを明らかにした。また、midbody を継承した娘細胞のほうが、継承しなかった娘細胞 (放出を含む) よりも細胞周期のスピードが遅いだけでなく、分化するまでの時間も長いことを明らかにした (図4)。この結果は、midbody の継承と幹細胞性の維持とが関連していることを示唆するものであった。現在、

この点について研究を進めている。

図 4



(3) 血液細胞特異的に MgcRacGAP-hmK02 レポーターを発現するマウスの樹立と解析：

(2)の結果を *in vivo* 並びに *ex vivo* において確認する目的で、作製した Cre 誘導型 MgcRacGAP-hmK02 レポーターマウスと血液細胞特異的に Cre を発現する Vav-Cre マウスとを交配し、血液細胞特異的に MgcRacGAP-hmK02 レポーターを発現するマウスを得た。このマウスから造血幹細胞 (CD150⁺ CD48⁻ ckit⁺ Scal⁺ Lineage marker negative) を採取し、造血幹細胞の細胞分裂時における Midbody が MgcRacGAP-hmK02 レポーターにより識別できることを確認した。Rosa26 ヘテロミュータントであると蛍光が若干弱いので、現在 Rosa26 ホモミュータントを得るための交配中である。Rosa26 ホモミュータントが成熟し次第、造血幹細胞を採取し、Midbody の動態と対称・非対称分裂との関連性を明らかにする予定である。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

田中 洋介 (TANAKA Yosuke)
東京大学・医科学研究所・細胞療法分野・助教
研究者番号：10509087

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()