

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09495

研究課題名(和文) Ptpz1によるマウス造血幹細胞発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of Ptpz1 during the development of HSC in mouse embryo

研究代表者

山田 知子(稲川)(Yamada-Inagawa, Tomoko)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30714852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、造血幹細胞の元となるクラスター細胞の出現時に発現しているPtpz1の役割について調べた。マウス胎仔内にあるクラスター細胞出現領域でPtpz1は血管内皮細胞に発現し、Ptpz1の活性を阻害する実験からはクラスター細胞の減少が認められたことを踏まえ、Ptpz1は血管内皮細胞からクラスター細胞へ移動・分化に関与することが示唆された。マウス胎仔の特定の時期に血管内皮細胞からクラスター細胞へ移行・分化する際のわずかな時間に起こる細胞間相互作用にPtpz1が関与することが示唆されたことで、これらの知識が細胞培養系での造血幹細胞の誘導・獲得技術の開発の手助けとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of Ptpz1, which is expressed at the appearance of cluster cells that form the basis of hematopoietic stem cells. Based on the fact that Ptpz1 is expressed in vascular endothelial cells in the clustering cell appearance region in the mouse embryo and from the experiment that inhibits the activity of Ptpz1, cluster cells are decreased, Ptpz1 is transformed from intravascular cells to cluster cells. It was suggested that it is involved in migration / differentiation. It is expected that these knowledge will help the development of hematopoietic stem cell induction and acquisition technology in the cell culture system.

研究分野：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞出現機構 受容体型ホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 成体マウスの骨髄に局在する造血幹細胞は、体内の血液系の自己複製と血液細胞分化の役割を担っており、その細胞の起源は 10.5 日目頃の AGM 領域 (aorta-gonad-mesonephros) の背側大動脈の内腔腹側に出現する c-kit 陽性細胞に由来する。これらの細胞は細胞塊を形成することからクラスター細胞と呼ばれる。クラスター細胞は、血管内皮細胞が血管内腔へ移動し分化したものであると考えられ、その過程は細胞間シグナル Notch や BMP とそのリガンドや、Gata2、Runx1 や Meis1 などの転写因子、さらに、近年は miRNA もクラスター細胞形成に関与することが報告された。(Nimmo, et al, Dev. Cell 26, 2013, Lu, et al., Cell Res. 23, 2013) クラスター細胞マーカーには受容体型チロシンキナーゼ c-kit や Tei2 が知られている。

(2) 造血幹細胞前駆体として幹細胞性の獲得に Runx1 のコファクター CBFb の発現が重要であるが、Tei2 よりも Scal をコードする Ly6A 遺伝子との共発現が必要であることが報告された。(Chen, et al., Cell Stem Cell, 9, 2011) また、血管内皮細胞マーカーである PECAM-1 と Ly6A 遺伝子が共発現する細胞群が、血管内皮細胞でありながら血液細胞分化できる両方の特性をもつ細胞群であり、Ly6A 遺伝子に加えて、c-kit を発現するクラスター細胞の一部の細胞群 (PECAM-1/Ly6A/c-kit 細胞群) のみが放射線を照射したマウスの骨髄の血液細胞を再構築することを示した。(Solaimani Kartalaei, Yamada-Inagawa, et al. J Exp Med. 212, 2015) それらの細胞群についてトランスクリプトーム解析を行った結果、PECAM-1/Ly6A/c-kit 細胞群の PECAM-1 の発現量は c-kit 陰性細胞群よりも低下していることが示された。この結果から、PECAM-1/Ly6A/c-kit 細胞群には血管内皮細胞の特性を抑制する機構が存在すると推測した。

(3) トランスクリプトーム解析結果より、PECAM-1/Ly6A/c-kit 細胞群に受容体型チロシンホスファターゼである Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type zeta (Ptpz1) 遺伝子の発現を見出した。Ptpz1 は、脱リン酸化によって下流のシグナルを抑制しているが、リガンドと結合した場合は脱リン酸化の活性が抑えられ、リン酸化が亢進する。Ptpz1 のリガンドである Pleiotrophin (PTN) は、AGM 領域から採取されたストローマ細胞に発現していることが示されおり (Oostendor, et al, Stem

Cell, 23, 2005)、また骨髄の造血幹細胞の自己複製や障害を受けた造血幹細胞の再生を誘導することも報告されている。

(Himburg, et, al, Nat Med., 16, 2010) これらを踏まえて、受容体型ホスファターゼ Ptpz1 とそのリガンドは ON/OFF のスイッチを持って、血管内皮細胞の特性を抑制し、クラスター細胞形成、あるいはクラスター細胞が造血幹細胞前駆体の成熟と血液細胞への分化を制御すると推測できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス胚の発生過程において、AGM 領域でのクラスター細胞形成・複製と血液細胞への分化機構における Ptpz1 の役割と制御機構を解明することである。

- (1) マウス胚の AGM 領域内で、Ptpz1 とリガンド PTN の局在と発現している細胞を特定する。
- (2) AGM 領域組織を in vitro 培養をした際に、培養液中に添加したリガンド PTN による Ptpz1 活性阻害されることにより血管内皮細胞からクラスター細胞形成・成熟制御への影響を調べる。
- (3) クラスター細胞が血液細胞へ分化機構に Ptpz1 による抑制制御を受けるかどうか調べる。

3. 研究の方法

(1) Ptpz1 の発現局在

クラスター細胞の出現は 胎生 10 日目初期から 10.5 日目をピークに 胎生 12 日目初期までである。血管内皮細胞がクラスター細胞へコミットされるのは、胎生 10 日目前である。一方、造血幹細胞として不活性化した骨髄の再構築を可能とするには胎生 10.5 日目から始まり、胎生 11 日目初期には高い確率となる。胎生 10 日目から 11.5 日目までのマウス胚を固定後にホルマリン固定または組織切片にして、Ptpz1 と PTN の組織免疫染色法によって発現局在を調べた。また、抗体の性質によって未固定細胞をもちいたフローサイトメトリーによる解析を行った。血管内皮細胞マーカー (PECAM-1、VE-cad)、クラスター細胞マーカーの c-kit の共発現を見ることで、それぞれの分子の局在を明瞭化した。

(2) AGM 領域組織培養中の PTN 添加による Ptpz1 阻害効果

Ptpz1 のクラスター細胞形成機構との関与を調べるために、胎生 10 日目から胎生 11 日目の AGM 組織を用いて、培養液中へのリガンド PTN の添加によって Ptpz1

の脱リン酸活性を阻害し、3日間の培養後にそれぞれのマーカーで染色した細胞懸濁液についてフローサイトメトリー解析をおこなった。血管内皮細胞マーカーのPECAM-1 陽性細胞群から c-kit 陰性・陽性細胞のクラスター細胞を表示し、細胞数の増減を調べた。

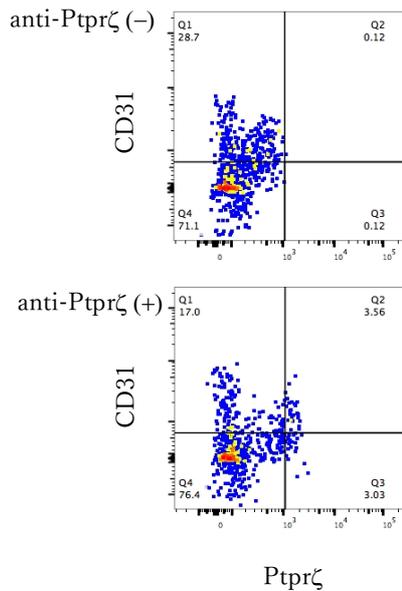
(3) クラスター細胞の血液分化と Ptpnz1 の効果

クラスター細胞の血液細胞分化能獲得と Ptpnz1 の活性の関与を確かめるために、AGM 組織を細胞懸濁液にし、PTN を添加したメチルセルロース培養液で培養、血液細胞への分化を調べるコロニーアッセイ (CFU-C) を行った。

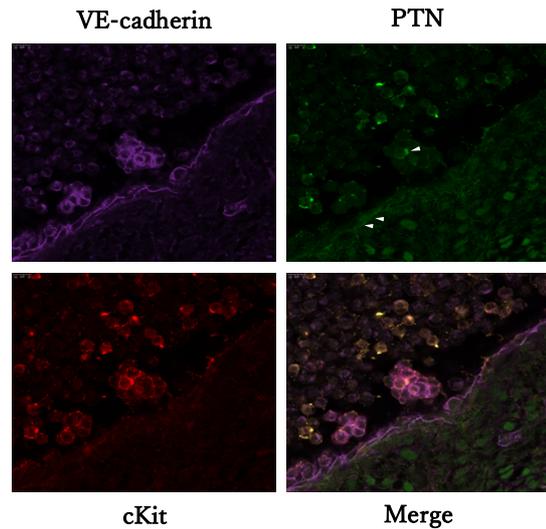
4. 研究成果

(1) 主な研究成果

① 胎生 10.5 日目と胎生 11.5 日目のマウス胚より AGM 組織を摘出し、細胞懸濁液を血管内皮細胞マーカー CD31 とクラスター細胞マーカー ckit、そして Ptpnz を認識する抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した結果、Ptpnz/ PECAM-1 を共発現する細胞が存在し、そのうちわずかに ckit 陽性細胞が認められた。(図 1) リガンドの PTN は 30sp から 42sp のマウス胚を観察したところ、一部のクラスター細胞間隙に強い発現が認められた。さらに、血液細胞にも発現が認められた。(図 2)

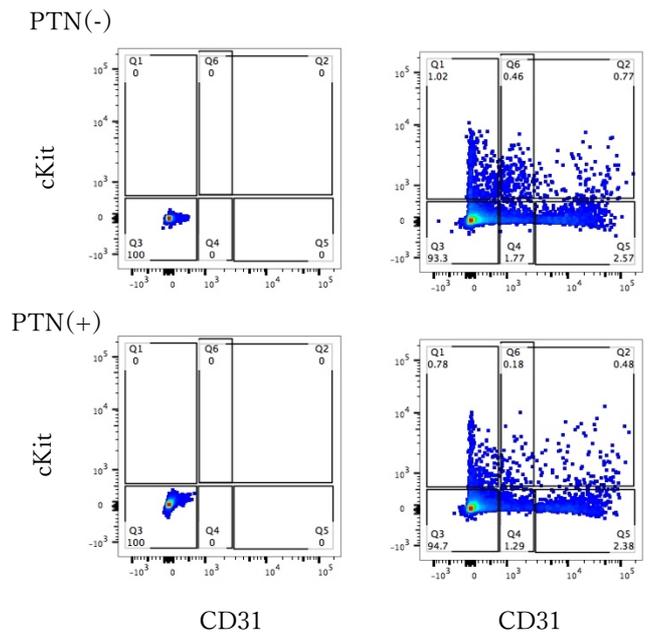


(図 1)



(図 2)

② PTN を添加した培養液で AGM 組織を培養したのちに、同様にフローサイトメトリー解析を行ったところ、PTN 非添加培養群と比べて、PECAM-1/c-kit の共発現細胞群の細胞数が減少していることが認められた。(図 3) これらの細胞には血液細胞も含まれているが、CD45 陽性細胞数には変化が認められなかった。一方、胎生 10 日目のマウス胚のみに PECAM-1 陽性細胞数が増加していた。AGM 細胞懸濁液をつかって CFU-C アッセイを行ったところ、分化した血液細胞のコロニー数には PTN 添加の有無による違いは見られなかった。



(図 3)

- (2) これらの結果より、マウス胚のクラスター細胞出現機構において、PTN の添加により血管内皮細胞の運動性が阻害されたことによってクラスター細胞への分化を抑制した、あるいは、Ptpz は VEGF と相互作用するが、PTN が大量に存在する培養液中では VEGF に負の競合が起こり、血管内皮細胞の維持が抑制されたと考えられる。一方、クラスター出現初期については、PECAM-1 陽性細胞が増加傾向にみられたことから、血管内皮細胞の特性を維持する傾向にあったと考えられる。マウス胚の特定の時期に血管内皮細胞からクラスター細胞へ移行・分化する際のわずかな時間に起こる細胞間相互作用に Ptpz1 が関与することが示唆されたことはこれまでの報告にはない新しい知見である。
- (3) Ptpz1 は受容体型ホスファターゼである。リン酸化による活性化した胚発生時における造血幹細胞の出現機構に関して、多くの細胞間シグナルや転写因子による細胞内シグナルの活性についての報告に従い、ES 細胞や iPS 細胞から造血幹細胞の誘導方法としてもシグナル活性化を検討する機会が多いが、その裏では細かい時間区分によって、負の制御も起こっていることが本研究によって示唆された。わずかな時間におこる造血幹細胞の出現機構においても、正と負の制御のバランスを制御する別のコントロール機構の存在も否定できない。これらの知識が、将来、細胞培養系での造血幹細胞の誘導・獲得技術の開発の手助けとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 稲川知子、関根祐子「マウス胚の AGM 領域に発現する受容体型チロシンホスファターゼ Ptpz の役割」第 16 回 日本再生医療学会総会、仙台、2017、3 月

2. Tomoko Yamada-Inagawa, Yuko Sekine 「The Influence to HSC emerging by ptpz inactivation in mouse embryo」46th Annual Scientific Meeting, ISEH, Frankfurt, 2017、8 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田(稲川) 知子 (Tomoko Yamada-Inagawa)
千葉大学医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30714852