

平成21年 5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19599010

研究課題名（和文）マウス胚性幹細胞に由来する多能性造血前駆細胞の解析

研究課題名（英文）Characterization of Multipotent Hematopoietic Progenitors  
Derived From Mouse Embryonic Stem Cells

研究代表者 山根 利之（TOSHIYUKI YAMANE）

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30452220

研究成果の概要：マウス胚性幹細胞を培養皿中で分化させ単離した胚発生の最初期に出現する多能性造血前駆細胞は、新生仔あるいは成体マウスへ移植しても生着しない。原因を探索したところ、胚性幹細胞由来造血細胞は移植直後には脾臓や骨髄などの造血組織に到達するもののすぐに骨髄組織から消滅し造血ニッチへ停留できない可能性が示唆された。またマウス胎内における相同細胞は造血開始時期に胚体に比べ卵黄嚢に多く存在することを突き止め、卵黄嚢が最初期の多能性造血前駆細胞の主な供給源であることを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000		2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：血液学、幹細胞生物学、発生生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血発生 胚性幹細胞 多能性造血前駆細胞 造血幹細胞 移植 卵黄嚢

## 1. 研究開始当初の背景

マウス発生過程において血液細胞は最初に卵黄嚢、続いて大動脈・生殖隆起・中腎領域、あるいは胎盤領域で検出される。その後、造血の場は胎仔肝臓、胎盤、骨髄、脾臓へと移行する。しかしながら発生過程において骨髄球系譜とリンパ球系譜の両方の分化能を有する最初期の多能性造血前駆細胞がどのような性質を持ち、またどこで

発生するのかについては一定の見解は得られていなかった。そこでまず、最初期の多能性造血前駆細胞を細胞表面抗原を指標に同定し純化する方法が必要であった。また最初に出現する多能性造血前駆細胞と造血幹細胞のヒエラルキーに関しても曖昧なままであり、細胞表面抗原を指標に明らかにする必要があった。

そこで我々は胎生3.5日の胚盤胞に由来し分化万能性を保持するマウス胚性幹(ES)細胞をストローマ細胞株上で分化させ、未分化細胞からの分化行程を培養皿内で再現させることで、最も初期の多能性造血前駆細胞がどのような性質を持っているのか検討を行ってきた。研究開始時点で我々は、細胞表面抗原としてc-Kit及びAA4.1両陽性(c-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>)の細胞が培養皿中で検出できる最初期の骨髓球系譜とリンパ球系譜の両方の分化能を有する多能性造血前駆細胞であること、またこれらの細胞は胎仔型βグロブリンを発現せず、成体型βグロブリンのみを発現する赤血球を産生することから成体型の造血細胞であることを見だしていた。しかしながら、ES細胞に由来するc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞を放射線照射を行った主要組織適合性抗原(MHC)の合致したマウス、あるいはT細胞、B細胞、NK細胞を欠き免疫機能を著しく低下させたRag2, IL2R $\gamma$ c両遺伝子ノックアウトマウスへ静脈注射により移植を行っても宿主マウスへ生着しないとともに、抗アポトーシス分子であるBcl-2分子を過剰発現したc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞を用いても移植能を付与できない。このことから少なくともリンパ球による免疫監視や細胞生存の可否では生着能を説明できないことを明らかにしていた。細胞移植治療の観点から、将来的に分化万能性を有する幹細胞から移植可能な造血幹細胞を誘導する技術へ応用するには、なぜES細胞由来造血細胞が移植後生着しないのか明らかにしておかなければならない課題である。2002年にはホメオボックス遺伝子であるHoxB4をES細胞に由来する造血細胞へ強制発現することで移植能が獲得されるという報告がなされた。しかしながら我々の純化したc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞は既にHoxB4を発現しており、またHoxB4のノックアウトマウスにおいても造血幹細胞に質的あるいは量的な変化は報告されていないので、HoxB4の発現の有無のみでは移植性の説明できないことが考えられた。またES細胞を胚盤胞へ戻しキメラマウスを作製するとES細胞由来の造血幹細胞がキメラ個体に観察されることから、ES細胞が先天的に移植能を有する造血幹細胞への分化能を欠いているわけではなく、なぜ培養皿内で誘導された最初期の多能性造血前駆細胞が移植能を欠くのか血液学、発生生物

学、細胞生物学観点から明らかにする必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では以下に挙げる点についての解明を目的にした。

(1) 移植不能性に関与する欠陥プロセスの調査と生着能に寄与する原因分子の探索  
まずc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞が何故移植後生着しないのか明らかにするため、移植直後に造血組織を調べ、ホーミング、停留能、あるいは分化能のどこに問題があるのか明らかにする。また、特定遺伝子発現の差異で移植性を説明できる可能性があるため、成体マウスへの生着能を有する胎仔肝臓の造血幹細胞を単離し、ES細胞に由来するc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞との間でマイクロアレイ解析を行うことで原因遺伝子の探索を行う。

(2) 胚胎内の相同細胞の同定と性状解析  
我々の単離した最初期の多能性造血前駆細胞であるc-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞のマウス胎内の相同細胞の探索を行う。特に胎仔循環の確立される胎生9日周辺に注目し、実験的に造血幹細胞の発生位置として示唆されている卵黄嚢・大動脈・生殖隆起・中腎領域を含む胎仔後方領域については特に詳細な検討を行う。マウス胎仔内に相同細胞が見つければ純化を行い、試験管内で多分化能を調べるとともにマウスへ移植を行い、それらの細胞が多能性造血前駆細胞あるいは血液幹細胞の基準を満たす細胞であるのかもしそうであれば胚胎内のどこで発生するのか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 移植不能性に関与する欠陥プロセスの調査と生着能に寄与する原因分子の探索

EF1 $\alpha$ プロモーター下にクラゲ由来緑色蛍光タンパク質EGFPを発現するD3ES細胞をストローマ細胞株ST2上で分化させ、多能性造血前駆細胞c-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞を細胞分取装置により単離し、放射線照射を行ったRag2, IL2R $\gamma$ c両遺伝子ノックアウトマウスへ静脈注射により移植した。その後、数時間から数日後にかけて、灌流操作により末梢血を除去した後、マウスの造血組織の細胞を回収し、ドナー細胞が造血組織へ到達しているのか、またその後の造血組織における動態をEGFP蛍光を指標にして検討した。

また、原因分子を探索するため、成体マウスへの生着能を有する胎齢14.5日の胎仔肝臓に存在する造血幹細胞であるc-Kit<sup>+</sup>Thy-

1.  $Lin^{-}Sca-1^{+}$ 細胞と ES 細胞から誘導した分化後 8 日目の  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞からそれぞれ RNA を調整し、マイクロアレイ解析を行った。

(2) 胚体内の相同細胞の同定

胎齢 7.5 日から 9.5 日のマウス胚を解剖し、胚体前方、胚体後方、卵黄囊にわけて回収し、コラゲナーゼ処理を行い、単一細胞へ解離した後、抗体染色を施した細胞をフローサイトメーターで解析することで、ES 細胞に由来する  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞の相同細胞の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 移植不能性に関与する欠陥プロセスの調査と生着能に寄与する原因分子の探索

$c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞を EGFP を発現する ES 細胞から誘導し、Rag2, IL2R $\gamma c$  両遺伝子ノックアウトマウスへ静脈注射により移植し、その後の造血組織における動態を EGFP 蛍光を指標に観察したところ、ES 細胞由来  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞は、成体骨髄の  $c-Kit^{+}Lin^{-}$ 細胞と比べ、若干効率は低いものの、移植後 3 時間から 6 時間の時点では、脾臓、大腿骨に到達しているものの、移植後 2 日目には EGFP 陽性細胞はほとんど観察されなくなり、ES 細胞由来  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞は一旦造血組織にホーミングしているものの、その後、造血組織に停留できないことが予測された。少なくとも ES 細胞由来  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞は CXCR4、インテグリン  $\alpha 4\beta 1$  を発現することからこれら以外の分子に起因すると考えられる。現在、スタンフォード大学の研究グループと共同で胎齢 14.5 日の胎仔肝造血幹細胞  $c-Kit^{+}Thy-1.1^{+}Lin^{-}Sca-1^{+}$ 細胞と ES 細胞由来  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞の間で遺伝子発現の差異を調べ原因遺伝子の探索を行っているが、今のところ原因遺伝子の特定には至っていない。

(2) 胚体内の相同細胞の同定

Ter119 陽性の胎仔型赤血球を除き、汎血球マーカーである CD45 を発現する

表 胎齢 9.5 日マウスにおける  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}CD45^{+}$ 細胞数

	実験 1	実験 2	実験 3
胎仔数*	8	6	7
平均体節数†	21.1	23.8	28.2
胎仔後方‡	20	44	75
卵黄囊	353	920	1,419

\*解析に用いた同腹仔の個体数

†1 個体あたりの平均体節数 (ペア数)

‡各部位における 1 個体あたりの平均  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}CD45^{+}$ 細胞数

細胞分画を調べると、 $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞

は、卵黄囊に多く存在し、僅かであるが、胎仔後方にも存在した。胎齢 9.5 日胚における定量結果を表に示した。 $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞は、胚体に比べ卵黄囊に約 20 倍多く存在することがわかる。また実際にこれらの細胞を単離し、試験管内で分化されたところ、骨髓球系譜 (赤血球、好中球、単球/マクロファージ) とリンパ球系譜 (T 細胞、B 細胞) へ骨髓の造血幹細胞 ( $c-Kit^{+}Sca-1^{+}Lin^{-}$ 細胞) と変わらぬ効率で分化し (図 1)、胚体内においても細胞表面抗原として  $c-Kit$  と AA4.1 を組み合わせることで骨髓球系譜とリンパ球系譜へ分化する最初期の多能性造血前駆細胞を単離できることを明らかにした。さらに胎

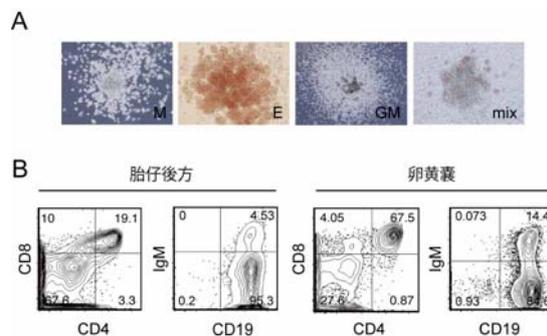


図 1 胎齢 9.5 日胚から単離した  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞の分化能 (A)  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞のコロニー形成能 M: マクロファージ E: 赤血球 GM: 顆粒球/マクロファージ Mix: 赤血球/顆粒球/マクロファージ混合コロニー (B)  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞の T リンパ球、B リンパ球への分化能

仔循環の確立していない胎齢 8.5 日胚においても、卵黄囊において CD45 の発現は未だ見られないものの  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞が見つかる。また胎齢 7.5 日胚においては  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞が検出できないことから、 $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞は胎齢 7.5 日から 8.5 日にかけて出現することが推察された。しかしながら胎齢 9.5 日胚から単離した  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞を放射線照射を行った Rag2, IL2R $\gamma c$  両遺伝子ノックアウトマウスの子仔へ静脈注射により移植を行っても、ES 細胞に由来する  $c-Kit^{+}AA4.1^{+}$ 細胞同様に新生仔マウスへの生着能を有していなかった。またこれらの細胞は骨髓および胎仔肝の幹細胞抗原である Sca-1 を発現しないことも判明した。

### (3) 研究の総括／今後の展望

ES 細胞由来の c-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞は造血組織に停留できない可能性が示唆されたので、造血ニッチに関連する分子に特に注目して原因分子の特定をめざし、今後も解析を進める。

c-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞の一部は胚体に存在するものの、大部分は卵黄嚢に存在することから、卵黄嚢が最初期の多能性造血前駆細胞の主な供給源となっている可能性が示唆された。これらの細胞は Sca-1 抗原を発現しないこと、また成体への生着能を有さないことから、胎仔肝臓などに存在する造血幹細胞とは異なる性質を持つことが明らかとなった。このことから、造血幹細胞の出現する胎齢 11 日以前に、リンパ球への分化能も有する多能性造血前駆細胞が存在することが明らかとなった。我々は卵黄嚢や胚体に存在する c-Kit<sup>+</sup>AA4.1<sup>+</sup>細胞が“プレ造血幹細胞”として機能し、胚体内で何らかのシグナルを受けることで胎仔肝臓など最初期の造血幹細胞へと分化するのではないかと推察している(図 2)。この仮説について今後解析を進める予定である。



図 2 本研究から推察される造血発生モデル

### 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 3 件)

- ① Yamane T, Hosen N, Yamazaki H, Weissman IL Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 印刷中 査読有
- ② 川添真史郎、駒田行哉、山根利之、山崎英俊 幹細胞生物学を基盤とした歯の再生口腔顎顔面外傷 7:2-7, 2008 査読無(レビュー)
- ③ Hosen N, Yamane T, Muijtjens M, Pham K, Clarke MF, Weissman IL Bmi-1-green

fluorescent protein (GFP)-knock-in mice reveal the dynamic regulation of Bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells* 25: 1635-1644, 2007 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 門田大司, 山根利之, 川添真史郎, 山崎英俊「胸腺と骨髄に存在する間葉細胞の由来および性状解析」第 31 回日本分子生物学学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 11 日 神戸
- ② 宮崎勝行, 山根利之, 川添真史郎, 山崎英俊「マウス胚性幹細胞を用いた神経堤細胞の誘導と分化能の検討」第 31 回日本分子生物学学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 9 日 神戸
- (火) Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Characterization of the earliest hematopoietic stem cells with lymphoid potential at pre-fetal liver stage” 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008 年 12 月 2 日 京都
- ④ 山根利之、山崎英俊「マウス胚発生期における c-Kit、AA4.1 両陽性細胞の局在および分化能の解析」第 70 回日本血液学会総会 2008 年 10 月 10 日 京都
- ⑤ 宮崎勝行、山根利之、川添真史郎、山崎英俊「マウス胚性幹細胞を用いた神経堤細胞の誘導と分化能の検討」第 6 回幹細胞シンポジウム 2008 年 5 月 16-17 日 東京
- ⑥ 山崎英俊、門田大司、駒田行哉、川添真史郎、山根利之「歯、胸腺および骨髄の間葉細胞の由来およびその分化能の検討」第 6 回幹細胞シンポジウム 2008 年 5 月 16-17 日 東京
- ⑦ 山崎英俊、山根利之「歯の間葉細胞の由来とその分化能」第 4 9 回歯科基礎医学会学術大会 2007 年 8 月 30 日 札幌
- ⑧ 山崎英俊、山根利之「歯の器官形成に關与する神経堤由来細胞とその分化能」第 28 回日本炎症・再生医学会 2007 年 8 月 2 日 東京
- ⑨ Hidetoshi Yamazaki, Toshiyuki Yamane, Shin-Ichi Hayashi “Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth” 第 40 回日本発生生物学学会大会 2007 年 5 月 30 日 福岡
- ⑩ 山根利之、山崎英俊、Irving L. Weissman

「マウス発生過程における AA4 陽性造血前駆細胞の解析」第 5 回幹細胞シンポジウム  
2007 年 5 月 18 日 淡路

[図書] (計 1 件)

① Tsuneto M, Yamane T, Hayashi SI  
“Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells” In: zur Nieden ed. Embryonic stem cell therapy for osteodegenerative diseases Humana Press Inc. 印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 利之 (TOSHIYUKI YAMANE)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30452220

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者