

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06373

研究課題名(和文) 生体イメージングによる活性化造血幹細胞ニッチの同定

研究課題名(英文) Identification of activated hematopoietic stem cell niche using in vivo imaging technology

研究代表者

数藤 孝雄(SUDO, Takao)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：80631184

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)：造血幹細胞の細胞周期は、生理学的状況に応じて変動することが知られているが、その正確なメカニズムはわかっていない。本研究では、多光子励起顕微鏡法を用いて、定常状態及び活性化造血幹細胞の生体イメージングを行った。抗腫瘍薬5-FUによる前処置を行ったマウスに移植された造血幹細胞の運動性は、対照マウスに移植されたものと比較して有意に低下しており、その大部分は血管内皮細胞に近接していた。遺伝子発現解析の結果からは、骨髄抑制後の微小環境が造血幹細胞に増殖シグナルを供給し、その細胞周期に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain the turnover of mature blood cells in bone marrow (BM). The cell-cycle status of HSCs are known to fluctuate according to physiological circumstances. However, precise mechanisms regulating HSCs status remain elusive. We performed dynamic live imaging of BM to analyze homeostatic or activated HSCs using multiphoton microscopy. The mean velocity and displacement of HSCs transplanted into 5-fluorouracil (5-FU) treated mice were significantly decreased compared to those transplanted into control mice. Moreover, most of transplanted HSCs in 5-FU treated recipients were adjacent to endothelial cells. Gene expression analyses revealed that expression levels of cell-cycle related genes in transplanted cells were different between these 2 recipient groups. These results suggested that microenvironments after BM injury supply proliferative signals to HSCs and influence cell-cycle status of them.

研究分野：血液内科学

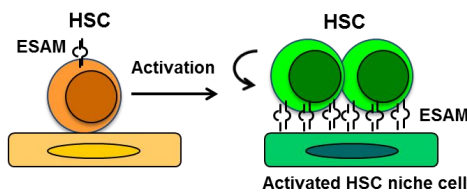
キーワード：造血幹細胞 造血幹細胞ニッチ 細胞周期 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の特徴は自己複製能と多分化能を有することであるが、その維持・調節のためには造血幹細胞を取り巻く造血微小環境が重要な働きをすることが示されている。その中で、造血幹細胞は“造血幹細胞ニッチ”と呼ばれる特有の環境に存在すると考えられている。造血幹細胞は骨膜近傍に存在する骨芽細胞より、幹細胞性維持に必要なシグナルを受けていることが報告され、骨芽細胞性ニッチの概念が提唱された。その後、未分化な造血幹細胞が血管内皮近傍に多く存在することが報告され、その構成要素として、細網細胞の一種である CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞や、間葉系幹細胞が注目されている。さらに、巨核球や、神経膠細胞もニッチ細胞として報告されており、骨髄内のさまざまな細胞がニッチの構成要素として機能していると考えられている。造血幹細胞の多くは静止状態にあるが、化学療法や放射線照射などによる骨髄抑制を受けた後は、減少した血球を補うべく細胞周期が活性化し、盛んに分裂するようになる。静止状態と自己複製的な増殖および成熟血球への分化のバランスを保つために、造血幹細胞は必要に応じたシグナルを享受する必要がある。そのため、造血幹細胞は状況に応じて、相互作用するニッチの場を移動すると考えられているが、詳細は明らかになっていない。

申請者は最近の成果として、血管内皮関連抗原 endothelial selective-adhesion molecule (ESAM) の発現が細胞周期の回転とともに著明に上昇し、造血幹細胞の有用な活性化マーカーであることを報告した(Sudo et al. J Immunol. 2012)。このことから、活性化造血幹細胞ニッチのモデルを提唱している(図1)。

図1 活性化造血幹細胞ニッチのモデル



さらに、ESAM が造血幹細胞上で発現上昇することが、正常造血回復、特に赤血球造血に重要であることを示す知見を得ている(Sudo et al; PLoS One. 2016)。

骨髄抑制後に起こる微小環境の変化としては、サイトカイン濃度の変化、微小血管の膨張とそれに伴う血管性ニッチの増大、活性酸素濃度の増加などあるが、それらの変化により細胞周期の挙動が変化すると考えられるが、詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では活性化造血幹細胞が周囲環境からどのようなシグナルを受容しているのかを解析し、休止状態に

ある造血幹細胞の細胞周期がどのようなメカニズムで活性化され、自己増殖を開始するのかを明らかにすることを目的とする。そのため、以下の計画を策定した。

- (1) 骨髄内の造血幹細胞の挙動や局在についてマウスが生きた状態で観察できる系を確立する。
- (2) 骨髄内のストレス後環境が造血幹細胞の細胞周期に与える影響を調べる。
- (3) 一連の研究結果をもとに、造血幹細胞の効率的な体外増幅方法の開発や白血病治療などへの臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

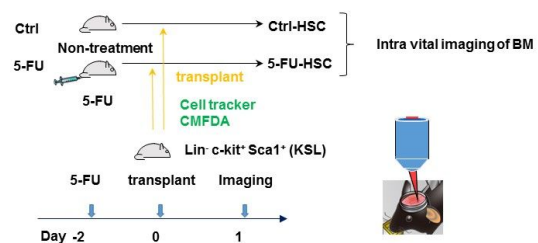
(1) 造血幹細胞移植

骨髄内の造血幹細胞の挙動を観察するための系を確立した。C57BL/6 野生型マウスの大腿骨、脛骨、骨盤骨から骨髄を採取し、造血幹細胞分画である Lineage⁻ c-kit⁺ Sca1⁺ 細胞をセルソーターを用いてソーティングし、緑色蛍光物質での染色を行った。染色後、直ちにレシピエントマウスへ静脈注射による移植を行った。レシピエントマウスとして、移植前に抗腫瘍薬 5-FU による前処置を行ったマウスと、前処置を行っていないコントロールマウスの2群を準備した。

(2) マウス骨髄内生体イメージング

移植翌日にレシピエントマウス骨髄内の生体イメージングを行った(図2)。マウスをイソフルランでの吸入麻酔下に頭頂部の皮膚切開を行い、頭頂骨を露出した後に、固定具を装着した。マウスを正立型二光子励起顕微鏡対物レンズ下に置き、20 倍水浸対物レンズを用いて観察した。マウスの保温状態を保つためにヒーターを用い、麻酔深度を調節するために心電図モニターを行った。1 視野あたり数時間程度のタイムラプスイメージングを行った。得られた画像の解析は専用ソフトを用いて行った。

図2 骨髄内造血幹細胞生体イメージング



(3) ホーミング細胞の遺伝子発現解析

ホーミングした造血幹細胞が環境からどのようなシグナルを受けるのかを明らかにするために、RNA-Seq 法を用いて遺伝子発現を網羅的に調べた。得られる細胞は少数であるため、RNA 抽出後に増幅を行い、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現を調べた。得られた変動遺伝子データについて解析ソフト

トを用いて上流解析を行った。

4. 研究成果

(1) 移植造血幹細胞の生体イメージング

まず、骨髄抑制後の骨髄環境にホーミングした造血幹細胞の動きやホーミング部位についての解析を行った。二光子励起顕微鏡を用いて、造血幹細胞を移植したマウス骨髄内の生体イメージングを行った。前処置として5-FUを投与したマウスにホーミングした造血幹細胞は、前処置を施していないマウスにホーミングした造血幹細胞と比較して平均速度、及び1時間あたりの直線移動距離が有意に低下していた。

次に、撮影開始時点での各造血幹細胞と、骨表面との距離を測定した。結果として前処置として5-FUを投与したマウスにホーミングした造血幹細胞は、前処置を施していないマウスにホーミングした造血幹細胞と比較して骨表面に近接する傾向が見られた。

更に、2時間のイメージング中に各細胞が血管内皮とどのような距離にあるかを2分ごとに測定した。結果として、5-FUを投与したマウスにホーミングした造血幹細胞は、前処置を施していないマウスにホーミングした造血幹細胞と比較して、常に血管内皮に接着している細胞の割合が高かった。

以上の結果から、抗腫瘍薬投与後のレシピエントに移植された造血幹細胞は、血管周囲ニッチにホーミングし、そこに固着していることが明らかになった。

(2) 移植造血幹細胞が環境から受けるシグナル

ホーミングした造血幹細胞が環境からどのようなシグナルを受けるのかを明らかにするために、RNA-Seq法を用いて遺伝子発現を網羅的に調べた。上流解析を行ったところ、5-FU投与後骨髄環境にホーミングした造血幹細胞は「細胞増殖」や「細胞周期」に関連する遺伝子群が高発現していることがわかった。このことは、骨髄障害後環境にホーミングした造血幹細胞は、周囲環境からシグナルを受け、結果として細胞周期が活性化することを示唆している。

RNA-Seq結果の詳細な解析を現在進めている。また、得られたシグナルの増強による、造血幹細胞の効率的な体外増幅方法の開発に取り組んでいる。

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4件)

(1) Sudo T, Yokota T, Okuzaki D, Ueda T, Ichii M, Ishibashi T, Isono T, Habuchi Y, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Expression in Hematopoietic

Stem/Progenitor Cells Is Essential for Erythropoiesis Recovery after Bone Marrow Injury. PLoS One. 2016;11(4):e0154189. doi:10.1371/journal.pone.0154189. 査読有り

(2) Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh Y, Doi Y, Ueda T, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. Exp Hematol. 2016;44:269-281. doi:10.1016/j.exphem.2015.12.010. 査読有り

(3) Sudo T, Yokota T, Kanakura Y. Role of endothelial antigen ESAM in activated hematopoietic stem cells. Rinsho Ketsueki. 2015;56:464-74. doi:10.11406/rinketsu.56.464. 査読有り

(4) Yokota T, Oritani K, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Habuchi Y, Ichii M, Fukushima K, Okuzaki D, Tomizuka K, Yamawaki K, Kakitani M, Shimono A, Morii E, Kincade PW, Kanakura Y. Estrogen-inducible sFRP5 inhibits early B-lymphopoiesis in vivo, but not during pregnancy. Eur J Immunol. 2015;45:1390-401. doi:10.1002/eji.201444939. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

(1) Ueda T, Yokota T, MD, Shingai Y, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Nagate Y, Tanimura A, Tokunaga M, Fujita J, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) is required for the ontogeny of definitive hematopoietic system in mice. The American Society of Hematology 58th Annual Meeting (2016.12.3-6, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA)

(2) Sudo T, Mizuno H, Ishii M. Dynamic analysis of activated hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow. 第78回日本血液学会学術集会 (2016.10.13-16、パシフィコ横浜)

(3) Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh T, Doi Y, Ueda T, Shingai Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial antigen ESAM is a human HSC marker associated with a subset of human leukemias. 第78回日本血液学会学術集会 (2016.10.13-16、パシフィコ横浜)

(4) Ueda T, Yokota T, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Tanimura A, Tokunaga M, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is required for the ontogeny of definitive hematopoietic system in mice. 第78回日本血液学会学術集会(2016.10.13-16、パシフィコ横浜)

(5) Ishibashi T, Yokota T, Tanaka H, Ichii M, Sudo T, Satoh T, Doi Y, Tanimura A, Hamanaka Y, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM is a novel human hematopoietic stem cell marker associated with a subset of human leukemias. The American Society of Hematology 57th Annual Meeting (2015.12.5-8, Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA)

〔その他〕

大阪大学 免疫細胞生物学ホームページ
www.icb.med.osaka-u.ac.jp/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

数藤 孝雄 (SUDO, Takao)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号：80631184