

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15501

研究課題名(和文)多機能TVAシステムによる新規造血幹細胞解析システムの構築

研究課題名(英文)Construction of a new hematopoietic stem cell analysis system with multifunctional TVA system

研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50625580

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)：CK7遺伝子座の終止コドン部分に、自己切断ペプチドT2AにつないだTVAをコードする配列を挿入したCK7-TVA knock-in ES細胞を作製した。これらはRCASウイルスによって遺伝子導入が可能であることが認められた。続いてCK7-TVA knock-in ES細胞をマウス胚盤胞に注入し、キメラマウスを得た。また近年、血液細胞において転写因子Evi-1が造血幹細胞特異的な発現を示すことが報告されている。その為、CK7と同様に、Evi-1遺伝子座にTVAをknock-inしたES細胞およびマウスを作製した。これらの結果は2017年にScientific reportsに掲載された。

研究成果の概要(英文)：CK7-TVA knock-in ES cells were prepared by inserting a sequence coding for TVA connected to the self-cleaving peptide T2A at the termination codon portion of the CK7 locus. They were found to be capable of gene transfer by RCAS virus. Subsequently, CK7-TVA knock-in ES cells were injected into mouse blastocysts to obtain chimeric mice. Recently, it has been reported that the transcription factor Evi-1 shows hematopoietic stem cell-specific expression in blood cells. Therefore, like CK7, ES cells and mice knocking in TVA at the Evi-1 locus were prepared. These results were published in Scientific reports in 2017.

研究分野：血液内科

キーワード：造血幹細胞 RCAS TVA システム

1. 研究開始当初の背景

全ての血液細胞の基になる造血幹細胞は、最も古くから研究されている組織幹細胞の一つであり、骨髄微小環境(ニッチ)で休眠状態のまま未分化性を維持し続けながら種々の血液細胞を長期間供給する能力を有している(Yamazaki et al. *EMBO*, 2006)。造血幹細胞の未分化性を維持するニッチ因子として、SCF, TPO, Ang-1, Cxcr4 など、様々な蛋白質が同定されている。また、造血幹細胞以外の組織幹細胞にも固有のニッチが存在し、未分化性維持に同様の因子が関与していることを示唆する報告が相次いでいる。申請者はこれまでの研究において、骨髄ニッチが造血幹細胞の休眠状態を誘導していることを明らかにし、その原因因子が TGF-beta であることを発見した(Yamazaki et al. *blood*, 2009)。さらに、骨髄中のシュワン細胞が TGF-beta を産生し、造血幹細胞の休眠状態維持に重要な骨髄ニッチを構築していることを報告した(Yamazaki et al. *Cell*, 2011)。さらに、申請者は生体内に存在する造血幹細胞とその微小環境を深く理解することにより iPS 細胞から造血幹細胞の分化誘導法を確立している。しかし、さらに研究を進めていく過程で、生理的条件下における造血幹細胞の分子機構、さらには造血幹細胞が骨髄中でどのように振る舞っているかはほとんど明らかになっていないことに気づいた。そこで、我々は造血幹細胞を生体外に取り出すことなく生体内において遺伝子導入が可能にし、蛍光標識、細胞分離を迅速かつ簡便に行える多機能な造血幹細胞解析マウスの作製を目指すことにした。

2. 研究の目的

造血幹細胞は、生体中の全血液細胞を生み出すことができる能力(多分化能)と、多分化能を保ったまま増殖する能力(自己複製能)を兼ね揃えた組織幹細胞である。造血幹細胞

が他の幹細胞に先立って研究が進められたのは、生体から容易に分離することが可能であったことに加え、放射線を照射したマウスを用いることで可能となった造血幹細胞移植という幹細胞の能力を評価する実験系が存在したからに他ならない。しかし一方で、生理的条件下における造血幹細胞の分子機構、さらには造血幹細胞が骨髄中でどのように振る舞っているかはほとんど明らかになっていない。我々は、上記のような問題点を解決するために、定常状態である生体内における造血幹細胞特異的な遺伝子導入法システムを持つ動物を作成することで、造血幹細胞の動態解析および自己複製と分化の制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は造血幹細胞を対象にした実験を向上させるための多機能マウスシステムの構築であり、各ステップを計画的かつ確実にを行うことで将来の実験に有効なシステムを作製した。具体的には3つの工程を同時並行的に進めることで本研究機関にて目的を果たした。1)造血幹細胞特異的遺伝子の選択とその遺伝子を発現する細胞に TVA タンパク質を発現するマウスの作製。2)フローサイトメーター解析、免疫染色解析、免疫沈降にも対応可能な抗 TVA 抗体の樹立。3)静止期に存在する細胞にもウイルス感染が可能な RCAS ウイルス改変レンチウイルスの開発。この3つのシステムを誘導することにより造血幹細胞における多機能マウスシステムを構築した。生体内における造血幹細胞特異的ウイルス感染に関してはウイルスの投与量や投与部位を詳細に検討した。また、成体ならず胎児や新生児マウスを用いた実験も行った。

4. 研究成果

従来、造血幹細胞の単離には複数の細胞表

面抗原に対する抗体を組み合わせ使用しており(例; CD34⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lineage marker⁻), 幹細胞特異的な発現を示す単一のマーカーの報告は極めて少ない。申請者は、造血幹細胞の自己複製に関わる分子をスクリーニングする目的で行ったタンパク質発現アレイの結果から、中間径フィラメントであるサイトケラチンファミリーの数種類が造血幹細胞で高く発現していることに着目した。全血球系細胞において 20 種類以上のサイトケラチンファミリーの発現を半定量 PCR および定量 PCR によって解析した結果、*Cytokeratin 7* (CK7) が造血幹細胞分画に最も特異的に発現することを見出した。さらに、in droplet 免疫染色法を用いることで、造血幹細胞分画特異的に CK7 がタンパク質レベルにおいても発現していることを確認した。そこで、CK7 遺伝子座の終止コドン部分に、自己切断ペプチド T2A につないだ TVA をコードする配列を挿入した CK7-TVA knock-in ES 細胞を作製した。CK7-TVA knock-in ES 細胞を胚様体 (EB) 形成によって分化させると、一部で CK7 発現細胞が出現し、これらは RCAS ウイルスによって遺伝子導入が可能であることが認められた。続いて CK7-TVA knock-in ES 細胞をマウス胚盤胞に注入し、キメラマウスを得た。キメラマウスを野生型マウスと掛け合わせ、産仔の genomic PCR を行った結果、CK7-TVA knock-in マウスの作製に成功した。また近年、血液細胞において転写因子 Evi-1 が造血幹細胞特異的な発現を示すことが報告されている。その為、CK7 と同様に、Evi-1 遺伝子座に TVA を knock-in した ES 細胞およびマウスを作製した。これらの結果は 2017 年に Scientific reports に掲載された。

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. Ieyasu A, Ishida R, Kimura T, Morita M, Wilkinson AC, Sudo K, Nishimura T, Ohehara J, Tajima Y, Lai CY, Otsu M, Nakamura Y, Ema H, Nakauchi H, Yamazaki S. An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8(3):500-508. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.015. Epub 2017 Feb 23. PMID:28238792
2. Tajima Y, Ito K, Umino A, Wilkinson AC, Nakauchi H, Yamazaki S. Continuous cell supply from Krt7-expressing hematopoietic stem cells during native hematopoiesis revealed by targeted in vivo gene transfer method. *Sci Rep*. 2017 Jan 18;7:40684. doi: 10.1038/srep40684. PMID:28098173
3. Taya, Y., Ota, Y., Wilkinson, A. C., Kanazawa, A., Watarai, H., Kasai, M., Nakauchi, H. and Yamazaki, S. Depleting dietary valine permits nonmyeloablative mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science*. 2016 Dec 2;354:1152-1155. "PMID": 27934766.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. アミノ酸バランスが司る造血幹細胞の制御, 口頭, 山崎聡, ConBio2017, 2017/12/9, 神戸, 国内
2. デザイン生命工学 異種細胞間・異種階層間のコミュニケーションのデザインを目指して, 口頭, 山崎聡, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/7, 神戸, 国内

- | | |
|--|---|
| <p>3. 骨髓環境の理解と造血幹細胞制御, 口頭, <u>山崎聡</u>, 第38回セルセラピーセミナー, 2017/11/24, 群馬, 国内</p> | <p>Research Symposium, 2017/5/26, 東京, 国内</p> <p>〔図書〕(計 0件)</p> |
| <p>4. Understanding of bone marrow environment and control of hematopoietic stem cells, 口頭, <u>Satoshi Yamazaki</u>, The27th Hot Spring Harbor International Symposium, 2017/10/31, 九州, 国内</p> | <p>〔産業財産権〕</p> <p>出願状況(計 0件)</p> |
| <p>5. Induction of Hematopoietic Stem Cells from Teratoma, 口頭, <u>Satoshi Yamazaki</u>, The Jackson Laboratory Seminar, 2017/10/9, CT, USA, 国外</p> | <p>名称:</p> <p>発明者:</p> <p>権利者:</p> <p>種類:</p> <p>番号:</p> |
| <p>6. Optimizing in vivo generation of engraftable murine hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells through hemogenic endothelium in teratomas, 口頭, <u>Satoshi Yamazaki</u>, The 3rd Africa International biotechnology and biomedical conference(AIBBC2017), 2017/9/14, 国外</p> | <p>出願年月日:</p> <p>国内外の別:</p> <p>取得状況(計 0件)</p> |
| <p>7. 白血病治療に繋がる生体内アミノ酸バランス制御, 口頭, <u>山崎聡</u>, 第5回がん代謝研究会, 2017/7/14, 札幌, 国内</p> | <p>名称:</p> <p>発明者:</p> <p>権利者:</p> <p>種類:</p> <p>番号:</p> <p>取得年月日:</p> <p>国内外の別:</p> |
| <p>8. In vivo generation of hematopoietic stem cells from iPSCs through teratoma formation. 口頭, <u>Satoshi Yamazaki</u>, Canadian Institutes of Health Research and AMED joint Program in Epigenetics and Stem Cells meeting, 2017/6/19, Canada, 国外</p> | <p>〔その他〕</p> <p>http://stemcell-u-tokyo.org/sct/</p> |
| <p>9. 造血幹細胞は生体内アミノ酸バランスに制御される, 口頭, <u>山崎聡</u>, 第15回先端血液学セミナー, 2017/6/10, 東京, 国内</p> | <p>6. 研究組織</p> <p>(1)研究代表者</p> <p>山崎 聡 (Satoshi Yamazaki)</p> <p>東京大学・医科学研究所・特任准教授</p> <p>研究者番号: 50625580</p> |
| <p>10. Valine starving permits hematopoietic stem cell transplantation without chemoradiative myeloablation, 口頭, <u>Satoshi Yamazaki</u>, 15th Stem Cell</p> | |