

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09958

研究課題名(和文)新規レポーターマウスを用いた造血幹細胞の発生・成熟機構の解析

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of hematopoietic stem cell development and maturation by using a novel reporter mouse

研究代表者

横溝 智雅 (Yokomizo, Tomomasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員

研究者番号：80590314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス胎児において、造血幹細胞がどのように産まれてくるのかを明らかにすることを目的としており、とくに幹細胞らしさがどのようにして獲得されるのかに焦点を当てて進められた。Hlf-tdTomatoレポーターマウスを利用した解析、およびHlf-CreERT2トレーサーマウスによる細胞系譜追跡実験から、Hlf遺伝子が造血幹細胞の発生経路特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、Hlf陽性細胞に特異的に発現する遺伝子群を探索し、幹細胞プログラムの候補を同定している。これらは、幹細胞らしさの獲得メカニズムの一端を明らかにする成果であり、造血幹細胞の試験管内誘導法開発への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、iPS細胞から様々な種類の細胞の誘導が試みられており、疾患治療・再生医療への応用が期待されている。血液細胞への分化誘導の研究も盛んにおこなわれており、現在までに多種の血液細胞の試験管内誘導が可能となっている。しかしながら、最も応用範囲が広いと思われる造血幹細胞の誘導については、いまだ成功の報告はない。誘導が成功しない理由として、生体内での造血幹細胞の発生メカニズムの詳細が分かっていないことで、生体を模倣した培養系を構築することができない点が指摘されている。本研究は造血幹細胞の発生メカニズムの一端を明らかにしたものであり、造血幹細胞の誘導法開発に向けての有用な情報を与えるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand how hematopoietic stem cells (HSCs) are generated during mouse development. Especially we focused on how stemness are obtained after the specification of hematopoietic cells. Using the Hlf-tdTomato reporter mouse and Hlf-CreERT2 tracer mouse, we found that Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells. Moreover, through the gene expression analysis of Hlf+ cells, we identified candidate HSC-specifying genes. These results could be applied for developing a new culture system for in vitro HSC induction.

研究分野：造血幹細胞の発生

キーワード：造血幹細胞 発生 血液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞からさまざまな種類の細胞の誘導が試みられており、疾患治療・再生医療への応用が期待されている。血液細胞への分化誘導の研究もさかんにおこなわれており、現在までに多種の血液細胞の試験管内誘導が可能となっている。しかしながら、もっとも応用範囲が広いと思われる造血幹細胞の試験管内誘導については、いまだ成功の報告はない。誘導が成功しない理由として、生体内での造血幹細胞の発生メカニズムの詳細が分かっていないことで、生体を模倣した効果的な培養系を構築することができないことが挙げられる。

造血幹細胞はもっとも解析の進んだ組織幹細胞のひとつであり、表面マーカーの組み合わせによってその単離が可能となっている。一方、発生直後の造血幹細胞については適切なマーカーが見つかっておらず、いまだ単離は可能となっていない。当然ながら、その性質や起源についても不明な点が多く、新たなマーカー探索が求められている。

申請者はこれまで、造血幹細胞の発生メカニズム解明を目的として、マウス胎仔における発生直後の造血幹細胞、およびその前駆段階の細胞（プレ造血幹細胞；pre-HSC）の同定を試みてきた。その過程において単一細胞マイクロアレイ解析をおこない、造血幹細胞の発生期に発現が上昇する遺伝子をいくつか同定している。その中で転写因子 Hlf (Hepatic Leukemia Factor) に着目し、蛍光タンパク tdTomato を Hlf 遺伝子座にノックインしたレポーターマウス (Hlf-tTomato マウス) を作製している。

2. 研究の目的

胎生期において、造血幹細胞は特殊な血管内皮細胞（造血性血管内皮細胞；hemogenic endothelium）から産み出されることが知られているが、血液細胞への運命づけ、および幹細胞性の獲得がどのように進行していくのかについては分かっていない。本研究では、我々が開発した新規レポーターマウス (Hlf-tTomato マウス) を利用して、造血幹細胞の発生経路を解明するとともに、その発生経路特異的な遺伝子群を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胎生 9~14 日目のマウス胎仔 (Hlf-tTomato マウス) の造血幹細胞、および造血幹細胞の前駆段階細胞（プレ造血幹細胞；pre-HSC）について、フローサイトメトリー、および共焦点顕微鏡を用いて tdTomato、表面タンパクの発現等を解析する。また、血管から生まれたばかりの血液細胞 (Hlf-tTomato⁺c-Kit⁺CD45⁺細胞) を、卵黄嚢と AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros; 大動脈・生殖隆起・中腎) 領域から単離し、RNA-seq 解析をおこなう。

(2) Hlf-CreERT2 マウスと ROSA-tTomato マウスを交配し、細胞系譜追跡解析をおこなう。妊娠 8~11 日目のマウスにタモキシフェンを投与し、胎生 14.5 日目、あるいは生後 8 ヶ月でフローサイトメーターを用いて tdTomato 陽性細胞の分布を測定する。

4. 研究成果

(1) 造血幹細胞の発生経路における Hlf の発現

血液細胞の発生は、まず幹細胞が出現し、そこから前駆細胞や分化細胞が生まれてくる、といった直線的な進行を示すわけではない。マウス胚では、造血幹細胞 (HSC; Hematopoietic Stem Cell) の出現よりも前に、赤芽球骨髄球前駆細胞 (EMP; Erythroid-Myeloid Progenitor) が検出される。なぜこのような複雑な形で発生が進行するのかは不明である。また、現在広く用いられている ES/iPS 細胞からの *in vitro* 分化培養法では、造血幹細胞ではなく EMP ばかりが誘導されてしまうことから、EMP への経路をいかにして遮断するかが造血幹細胞の試験管内誘導へ向けての重要な課題となっている。

造血幹細胞と EMP は、造血性血管内皮細胞から生み出される。造血幹細胞を生み出す血管内皮細胞と、EMP を生み出す血管内皮細胞は、異なる細胞系譜だとする報告があるが、このモデルは遺伝子改変マウスを用いた複雑な実験系からの推論であり、その実態はよく分かっていなかった。我々は Hlf-tTomato マウスを用いて造血幹細胞と EMP における Hlf の発現を調べたところ、Hlf は造血幹細胞で発現し、EMP では発現していないことが分かった。

さらに、造血性血管内皮細胞から生み出された直後の血液細胞（血液細胞クラスター）における Hlf の発現を調べたところ、EMP が発生する胎生 9 日以前の血液細胞クラスターでは Hlf は発現しておらず、胎生 9 日以降の血液細胞クラスターで発現していることが分かった（図 1）。これらの結果は、Hlf は造血幹細胞の発生経路で発現しているが、EMP 発生経路では発現していないことを示しており、造血幹細胞を生み出す血管内皮細胞と、EMP を生み出す血管内皮細胞は、異なる細胞系譜であることを強く示唆している。この結論は Hlf-CreERT2 マウスを用いた実験によっても支持されており、細胞系譜追跡の結果、造血幹細胞特異的な標識を確認している。

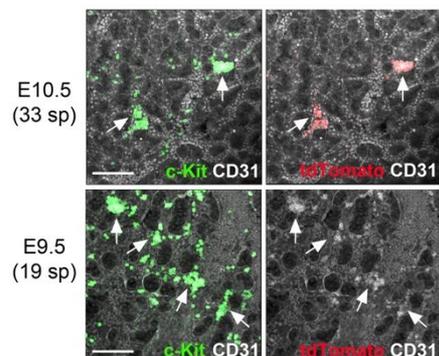
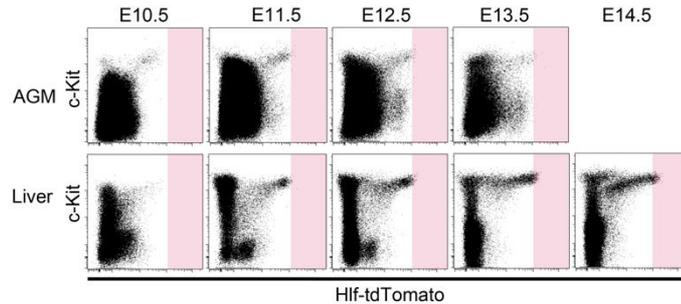


図 1 胎生 10 日目と 9 日目の血液細胞クラスター

(2) プレ造血幹細胞から造血幹細胞への成熟過程における Hif 発現の上昇
 血管内皮細胞から産まれたプレ造血幹細胞は、その後の成熟過程を経て造血幹細胞になる。プレ造血幹細胞と造血幹細胞での Hif の発現を比較したところ、造血幹細胞で高くなっていることが分かった。この結果は、プレ造血幹細胞から造血幹細胞への成熟過程で Hif の発現が上昇していることを示している。つづいて、Hif の発現上昇が起こる部位を特定するために、AGM 領域、および胎児肝での Hif 発現の変化を経時的に調べたところ、胎児肝において発現が大きく変化していることが分かった(図2)。この結果は、造血幹細胞への成熟がおもに胎児肝で起こっていることを示唆している。

図2 プレ造血幹細胞から造血幹細胞への成熟過程における Hif 発現の上昇



(3) 造血幹細胞の発生経路に特異的な遺伝子群の探索

造血幹細胞は AGM 領域の血管内皮細胞から生み出され、EMP はおもに卵黄囊の血管内皮細胞から生み出されると考えられている。血管から生まれたばかりの血液細胞 (Hif-tdTomato⁺c-Kit⁺CD45⁺細胞) を、卵黄囊と AGM 領域から単離し、RNA-seq 解析を用いて遺伝子発現を比較することにより、造血幹細胞の発生経路に特異的な遺伝子群の探索をおこなった。Runx1、Gata2、Tal1 などの血管内皮-血液転換 (Endothelial-Hematopoietic Transition; EHT) に必要な遺伝子群の発現は、卵黄囊と AGM 領域で共通していたが、Mecom、Procr、Hoxa9 などの遺伝子群は AGM 領域のみで強い発現がみられた(図3)。この結果は、造血幹細胞と EMP の発生経路では造血前駆細胞を規定するプログラムは共通しているが、これに幹細胞性を持たせるプログラムが加わることで、造血幹細胞が生み出される可能性を示唆している。

前述したように、iPS/ES 細胞からの造血幹細胞の試験管内誘導には未だ成功していない。本研究成果の応用は、造血幹細胞誘導のための効果的な培養条件の構築につながるものと期待している。

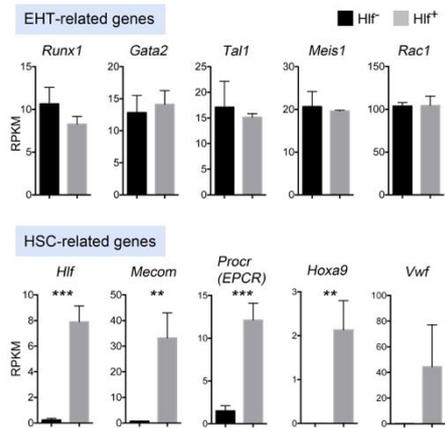


図3 Hif 陽性細胞 (AGM 領域) と Hif 陰性細胞 (卵黄囊) の遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Terumasa Umemoto, Junichi Matsuo, Ryota Harai, Yoshihiko Kihara, Eri Nakamura, Norihiro Tada, Tomohiko Sato, Tomoiku Takaku, Akihiko Shimono, Hitoshi Takizawa, Naomi Nakagata, Seiichi Mori, Mineo Kurokawa, Daniel G Tenen, Motomi Osato, Toshio Suda, Norio Komatsu	4. 巻 216
2. 論文標題 Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythro-myeloid progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1599-1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nieke S., Yasmin N., Kakugawa K., Yokomizo T., Muroi S., Taniuchi I.	4. 巻 17
2. 論文標題 Unique N-terminal sequences in two Runx1 isoforms are dispensable for Runx1 function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Dev Biol	6. 最初と最後の頁 117138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12861-017-0156-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang C.Q., Mok M. M. H., Yokomizo T., Tergaonkar V., Osato M.	4. 巻 962
2. 論文標題 Runx family genes in tissue stem cell dynamics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 117-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-3233-2_9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Takako Ideue, Mineo Kurokawa, Motomi Osato, Toshio Suda
2. 発表標題 Fate tracing of Hlf+ hematopoietic clusters in the developing mouse embryo
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Terumasa Umemoto, Tomoiku Takaku, Mohamed Gaber, Seiichi Mori, Mineo Kurokawa, Daniel G Tenen, Toshio Suda, Motomi Osato, Norio Komatsu
2. 発表標題 Hlf expression marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythroid-myeloid progenitors
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Terumasa Umemoto, Tomoiku Takaku, Toshio Suda, Mineo Kurokawa, Norio Komatsu, Motomi Osato
2. 発表標題 Evi-1/Hlf axis regulates HSC maturation in the mouse embryo
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Seiichi Mori, Mineo Kurokawa, Motomi Osato, Norio Komatsu
2. 発表標題 Hlf expression marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythroid-myeloid progenitors
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Tomoiku Takaku, Seiichi Mori, Motomi Osato and Norio Komatsu
2. 発表標題 Development of HSC-dependent and independent lineages in the mouse embryo
3. 学会等名 第15回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Tomoiku Takaku, Seiichi Mori, Motomi Osato and Norio Komatsu
2. 発表標題 Developmental origins of HSC-dependent and independent lineages in the mouse embryo
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomomasa Yokomizo, Naoki Watanabe, Terumasa Umemoto, Tomoiku Takaku, Seiichi Mori, Mineo Kurokawa, Toshio Suda, Motomi Osato and Norio Komatsu
2. 発表標題 Hlf expression marks developmental pathway for hematopoietic stem cells, but not for erythroid-myeloid progenitors
3. 学会等名 21st international Runx conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	梅本 晃正 (Umemoto Terumasa)		