

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19570

研究課題名（和文）「かたち」と「うごき」に注目した造血幹細胞の分類・機能評価

研究課題名（英文）Measuring shape and movement of hematopoietic stem cells

研究代表者

田久保 圭誉（Takubo, Keiyo）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・生体恒常性プロジェクト長

研究者番号：50502788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定する二次元プラットフォームの確立を行い、次いで表面マーカーに基づいて定常状態の造血幹細胞と多能性前駆細胞などの分化細胞をフローサイトメーターで単離したうえで、同プラットフォームで「かたち」と「うごき」のデータを経時的に収集した。また、分化マーカーの蛍光標識抗体を培養に加えておくことで分化のタイミング前後で「かたち」と「うごき」に変化があるか経時的に解析していく。得られたデータは画像解析プログラムを用いて定量的な解析を実施し、造血幹細胞固有の特徴を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、表面マーカーに依存した細胞同定、という血液学研究の技術的ボトルネックの解消につながる成果が得られた。既存の手法とは全く違う方法からの細胞同定手法の萌芽が得られたといえ、造血分野にとどまらない創造的な外挿性・発展性のある技術への足掛かりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established a two-dimensional platform for measuring "shape" and "movement" of hematopoietic stem cells. We next isolated steady-state hematopoietic stem cells and differentiated progenitor cells using a flow cytometer based on surface markers. Then, we collected data on "shape" and "moving" using the platform over time. In addition, by adding a fluorophore-labeled antibody to the culture, we analyze whether there is a change in "shape" and "movement" before and after the timing of differentiation. The obtained data were quantitatively analyzed using an image analysis program, and the characteristics specific to hematopoietic stem cells were obtained.

研究分野：幹細胞生物学、血液学

キーワード：造血幹細胞 造血前駆細胞 幹細胞性 イメージング 画像解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器の細胞社会は、組織幹細胞と、それに由来して活発に増殖する前駆細胞、そして終末分化した細胞から構成されている。そのため、細胞社会を研究する際には、多数の構成細胞の中から解析対象である特定の細胞を見つけて、取り出して、解析する方法が不可欠である。全ての血液細胞を一生にわたって生み出し続ける造血幹細胞の研究においては、フローサイトメーターを用いて特定の血液細胞を同定し、取り出して様々な解析が行われている。このアプローチは強力で、これまで造血幹細胞システムの実態を明らかにすることに大きく貢献してきた。しかし、炎症時や培養後など、造血幹細胞を既存の手法である表面マーカーや遺伝学的レポーターではうまく同定できない状況が存在することをこれまでの研究から見出してきた(Cell Stem Cell 2013, 2016, Cell Reports 2015)。また、既存の手法ではさらなる造血幹細胞亜集団の純化や機能解析は、未だ達成できていなかった。これらの課題を解決するために、技術的に新たな造血幹細胞解析の方法論を生み出す必要が生じていた。

2. 研究の目的

本研究では、こうした典型的な造血幹細胞の同定手法の限界を突破するための、非古典的な数理生物学的な方法論の確立を目指した研究を実施することとした。具体的には、造血幹細胞の“見たい”、すなわち時空間形態情報をハイコンテンツアナライザーで情報収集し、それを用いて計算機で形態学的特徴の「造血幹細胞らしさ」について解析を実施する。得られた分類・機能評価手法の妥当性は *in vivo* のモデルを用いて検証した。これらの検討を踏まえて、最終的には造血幹細胞を形態学的特徴(「かたち」と「うごき」)に基づいて数理生物学的に分類・機能評価する手法の端緒をつかむことを目的として、2年度にわたる実験検討・データ解析を実施した。

3. 研究の方法

本研究では2年度で3項目の研究を実施して、造血幹細胞の数理生物学的分類・機能評価手法の確立を目指す。具体的にはまず、(i)造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定する二次元プラットフォームを確立し、次いで同プラットフォームを用いて(ii)様々な状況における造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定する。そして、得られた時空間解像度の高いデータに基づいて、(iii)造血幹細胞らしさについての画像解析を実施して、数理生物学的な造血幹細胞と分化細胞の分類を行う。具体的には以下に示すようなアプローチを用いることとした。

(i) 造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定する二次元プラットフォームの確立：

造血幹細胞の汎用可能な2次元プラットフォームはこれまで存在しなかった。そこで研究代表者はハイコンテンツアナライザーを用いて、細胞の接着器材やサイトカイン・培地などの培養条件を最適化することで造血幹細胞の「かたち」と「うごき」が測定可能なプラットフォームの確立を図る計画とした。さらなる培養条件の最適化を通じて、幹細胞性を高く保ったまま長時間の造血幹細胞の数理生物学的パラメーターを測定する手法の確立を行うこととした。

(ii) 様々な状況における造血幹細胞の「かたち」と「うごき」の測定：

表面マーカーに基づいて定常状態の造血幹細胞と多能性前駆細胞などの分化細胞をマウスより単離し、前項で確立したプラットフォームでそれらの「かたち」と「うごき」のデータを経時的に収集する。また、分化マーカーの蛍光標識抗体を培養に加えておくことで分化のタイミング前後で「かたち」と「うごき」に変化があるか経時的に解析する。データは画像解析プログラムを用いて定量的に取得する。

(iii) 画像解析に基づいた数理生物学的な造血幹細胞の分類：

得られた数理生物学的なデータに基づいて、「造血幹細胞らしさ」の同定を画像解析に基づいて実施する。また、炎症や前培養後などの、造血幹細胞性が低下した後のデータでも同様に高品質の造血幹細胞を同定できるか検証を行う。本研究については外部の画像解析の専門家の助力を仰ぎ、各種の予備検討を行ったうえで、本研究期間中も継続的に協働することで確実な研究遂行を目指した。

これらの2年度にわたる実験研究の実施を通じて、「かたち」と「うごき」の測定をすることで、造血幹細胞を同定・解析することを可能にする新たな手法の開発を目指した検討を実施することとした。

4. 研究成果

初年度は、まず造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定する二次元プラットフォームの確立をめざした検討を実施した。これまで造血幹細胞の汎用可能な同様のプラットフォームは存在しなかったことから、系の確立に関する詳細な検討と条件設定を繰り返した。その結果、ハイコンテンツアナライザーを用いて、細胞の接着器材やサイトカイン・培地などの培養条件を最適化することで造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定することが可能であることが見出された。特に、培地組成をはじめとする種々の培養条件の最適化を通じた、幹細胞性を高く保ったまま長

時間の造血幹細胞の数理生物学的パラメーター測定が重要であることを示唆する知見を得ている。こうした確立しつつある系を用いて様々な状況における未分化血液細胞の「かたち」と「うごき」の測定と、データを経時的に収集することが可能なことを示した。

第二年度は、前年度にある程度確立することができた造血幹細胞の「かたち」と「うごき」を測定するための二次元プラットフォームをさらに洗練して、幹細胞性を高く保ったまま長時間の造血幹細胞の数理生物学的パラメーターを測定することを可能にした。とりわけ培地条件の設定が重要であった。これらを踏まえたうえで、造血幹細胞と造血前駆細胞それぞれを体外で長時間培養し、ハイコンテンツアナライザーを用いて継続的に形態学的・動的特徴のデータを抽出して、得た画像を解析することで、造血幹細胞に特有の、造血前駆細胞とは異なる特徴を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukushima T, Tanaka Y, Hamey FK., Chang CH, Oki T, Asada S, Hayashi Y, Fujino T, Yonezawa T, Takeda R, Kawabata KC, Fukuyama T, Umemoto T, Takubo K, Takizawa H, Goyama S, Ishihama Y, Honda H, Gottgens B, Kitamura T	4. 巻 29
2. 論文標題 Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G0 Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4144 ~ 4158.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuchiya N, Zhang R, Iwama T, Ueda N, Liu T, Tatsumi M, Sasaki Y, Shimoda R, Osako Y, Sawada Y, Kubo Y, Miyashita A, Fukushima S, Cheng Z, Nakaki R, Takubo K, Okada S, Kaneko S, Ihn H, Kaisho T, Nishimura Y, Senju S, Endo I, Nakatsura T, Uemura Y	4. 巻 29
2. 論文標題 Type I Interferon Delivery by iPSC-Derived Myeloid Cells Elicits Antitumor Immunity via XCR1+ Dendritic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 162 ~ 175.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.08.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, Hase K	4. 巻 178
2. 論文標題 Fasting-Refeeding Impacts Immune Cell Dynamics and Mucosal Immune Responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1087.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.047	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 Kobayashi Hiroshi, Morikawa Takayuki, Okinaga Ayumi, Hamano Fumie, Hashidate-Yoshida Tomomi, Watanuki Shintaro, Hishikawa Daisuke, Shindou Hideo, Arai Fumio, Kabe Yasuaki, Suematsu Makoto, Shimizu Takao, Takubo Keiyo	4. 巻 28
2. 論文標題 Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanuki Shintaro, Kobayashi Hiroshi, Sorimachi Yuriko, Yamamoto Masamichi, Okamoto Shinichiro, Takubo Keiyo	4. 巻 514
2. 論文標題 ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.123	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 Mima Yuichiro, Suzuki Satoshi, Fujii Takeshi, Morikawa Takayuki, Tamaki Shinpei, Takubo Keiyo, Shimoda Masayuki, Miyamoto Takeshi, Watanabe Kota, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Fujita Nobuyuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Potential involvement of semaphorin 3A in maintaining intervertebral disc tissue homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 972 ~ 980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクト公式ウェブサイト
<https://takubolab.com/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----