

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08865

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞から造血支持細胞に至る細胞系譜の同定

研究課題名(英文) Identification of mesenchymal stem cell, which gives rise to hematopoiesis supporting cells

研究代表者

宮城 聡 (Miyagi, Satoru)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：20400997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Pdgfr とSca1を共発現する骨髄間質細胞(P⁺S⁺)が造血支持細胞の祖先となる間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell; MSC)であると仮定し、P⁺S⁺を標識可能なレポーターマウスの開発し、細胞系譜追跡実験により検証することを目的とした。しかし、作成したレポーターマウスはP⁺S⁺に加えてLeptin receptor陽性のMSCも標識されるため、P⁺S⁺の系譜追跡実験には使用不可能であったが、解析を通じて、このマウス系統が骨髄間質細胞の解析に有用であること、tFP635-Sca1-Pdgfr⁺分画(tFP635-PDSP)に新規のMSCが存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血液産生を助ける働きのある造血支持細胞が、どのようにして成体内で維持されるかを明らかにすることを目的とした。このため、独自にレポーターマウスを作成・解析を行い、作成したレポーターマウスが既知の造血支持細胞をマーキングすることを見出した。さらに、骨髄中に造血支持細胞を産生する能力を持つと予想される新規の細胞を同定した。この結果は、血液産生の制御機構や白血病などの血液のガンの発症機構の解明につながる知見である。

研究成果の概要(英文)：A previous study showed that the FZD5 expression distinguishes immature human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro, and the FZD5 is crucial for maintaining the stemness of MSC. Therefore, we generated a transgenic mouse (Fzd5-CreERT-tFP635) that expresses CreERT and the TurboFP635 (tFP635) under the transcriptional control of the Fzd5 gene. In the bone marrow (BM) of the mice, tFP635 was preferentially expressed in MSC, Leptin receptor-expressing MSC (LepR+MSCs), and some Pdgfr⁺ Sca1⁺ MSC (P⁺S⁺). Inducible lineage tracing with the strain at the adult stage showed that Fzd5-expressing cells and their descendants were progressively dominant in LepR+MSC and P⁺S⁺, and the cells persisted for one year. These results showed that our transgenic mouse marks two different types of MSC, LepR+MSC and P⁺S⁺. We also found that tFP635-PDGFRa+Sca1⁺ stromal cells (tFP635-PDSP) are a putative novel MSC fraction.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 FZD5 造血支持細胞

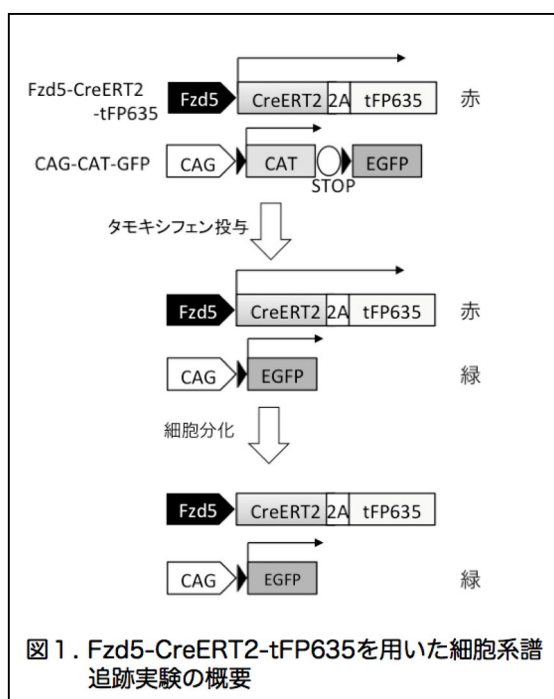
1. 研究開始当初の背景

骨髄と、その周りを取り囲む骨組織は、間葉系と造血系細胞から構成される。すべての造血細胞は造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells; HSC) から産生される。他方で、軟骨細胞・脂肪細胞・骨芽細胞、間質細胞等は、生涯を通じて間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) より供給される。この両系譜は、独立ではなく、機能的に相互連絡する。例えば、骨代謝は MSC 由来の骨芽細胞と HSC 由来の破骨細胞のバランスにより制御される。骨髄繊維症では巨核球から産生される TGF 等のサイトカインが間質細胞に作用し、骨髄の線維化・骨硬化等を引き起こす。また、一部の間質細胞は造血支持能を有し、骨髄内微小環境における HSC の量的・機能的な維持に重要な役割を果たすとされ、加齢に伴う脂肪髄化等の間質細胞の変化は、造血機能低下の一因となる。この様に、間葉系と造血系細胞は機能的に相互連絡し合い骨髄内の恒常性が保たれている

近年、間質細胞による造血支持の実態が明らかになりつつある。例えば、類洞周囲の Leptin receptor 陽性間葉系幹細胞(Lepr⁺MSC)や細動脈周囲の NG2 陽性間葉系幹細胞(NG2⁺MSC)は、造血支持因子 (SCF, Cxcl12) を発現しており、各遺伝子の細胞特異的遺伝子破壊マウスでは HSC の枯渇や末梢への動員が認められることから、HSC の維持に必須の役割を果たすと考えられる。一方で、造血支持因子の欠損を誘導する時期や細胞腫により、HSC に対する影響は異なることから、造血支持因子の機能は細胞・時期特異的である。さらに、CXCL12-abundant reticular cells (CAR)、Prx1⁺、Nestin⁺や Osterix⁺細胞も造血支持能を持つことが報告されている。この内、Lepr⁺MSC と CAR は大部分オーバーラップするが、異なるレポーターやマーカーを利用し同定されているため、これら造血支持細胞間の異動は十分には理解されていない。また、造血支持細胞は MSC より産生されると想定されるが、これら細胞間の階層性、起源となる MSC は明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者の所属する松崎研究室では Flow cytometry (FCM) を駆使し、ヒトおよびマウス骨髄より高純度な MSC の単離法を確立した (Morikawa, *J Exp Med*, 2009; Mabuchi, *Stem Cell Reports*, 2013)。マウスでは、骨髄間質中の CD45⁻Ter119⁻Sca1⁺PDGFR⁺ (P S) 細胞が MSC の性質を有する (Morikawa, *J Exp Med*, 2009)。P S は、造血支持細胞と比較して高い増殖能と分化多能性を有し、定常状態では Cxcl12 や SCF 等の造血支持因子を発現しないものの、移植に伴いレシピエントの骨髄環境中では Cxcl12 を発現する。これらの結果は、P S が造血支持細胞の上流に位置する可能性を強く示唆している。一方で、Wnt シグナル経路のレセプターである Fzd5 は P S で高発現する。さらに、ヒトでは増殖能・分化能の高いクローンで FZD5 が特異的に発現し、その機能障害は細胞老化を誘導し増殖能の著減を引き起こす。そこで、我々は BAC トランスジェニックシステムを用いて、Fzd5 遺伝子の発現制御領域の下で CreERT2 及び turboFP635 (tFP635) を発現するレポーターマウス (Fzd5-CreERT2-tFP635) を作成し、このシステムを用いた細胞系譜追跡実験から P S から造血支持細胞に至る細胞系譜を明らかにすることを目的とする (図 1)。以上の解析を通じて、“造血支持細胞の産生”という新たな造血制御を提唱したい。



3. 研究の方法

1) *Fzd5-CreERT2-tFP635* における FP635 の発現と特異性

レポーターマウスにおける tFP635 発現細胞を同定するため、大腿骨の凍結切片を作成し FP635 の蛍光観察を行なった。また、大腿骨・脛骨より骨髓細胞を調製し、種々の間質細胞マーカーで染色を行った後、FCM 解析を行った。MSC の骨髓内での局在は、そのサブタイプにより異なる。このため、P S の FCM 解析には骨片をコラゲナーゼ処理することにより遊離してきた細胞集団 (Whole bone; WB) を、Lepr⁺MSC の解析にはフラッシュアウトした骨髓をコラゲナーゼ処理して得られた細胞集団 (Bone marrow; Marrow) を用いた。

2) *Fzd5*⁺細胞の細胞系譜追跡

Fzd5⁺細胞の系譜追跡実験を行うために、*Fzd5-CreERT2-tFP635* と *CAG-CAT-EGFP* マウスを交配し、*Fzd5-CreERT2-tFP635;CAG-CAT-EGFP* (*Fzd5-CreERT* と略) を作成した。*Fzd5-CreERT* は、任意の時期にタモキシフェン(TM)投与することにより、*Fzd5*⁺細胞を tFP635 と GFP で、その子孫細胞は GFP でラベルすることが可能である(図 1)。この解析により、*Fzd5*⁺細胞から造血支持細胞への分化過程、さらに、複数同定されている造血支持細胞のいずれが P S より産生されるかを明らかにする。

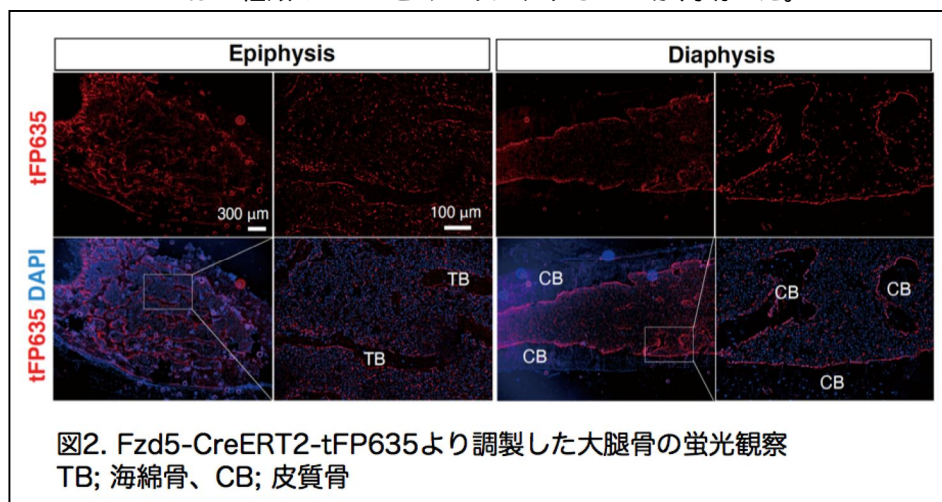
3) CFU-F アッセイと分化誘導

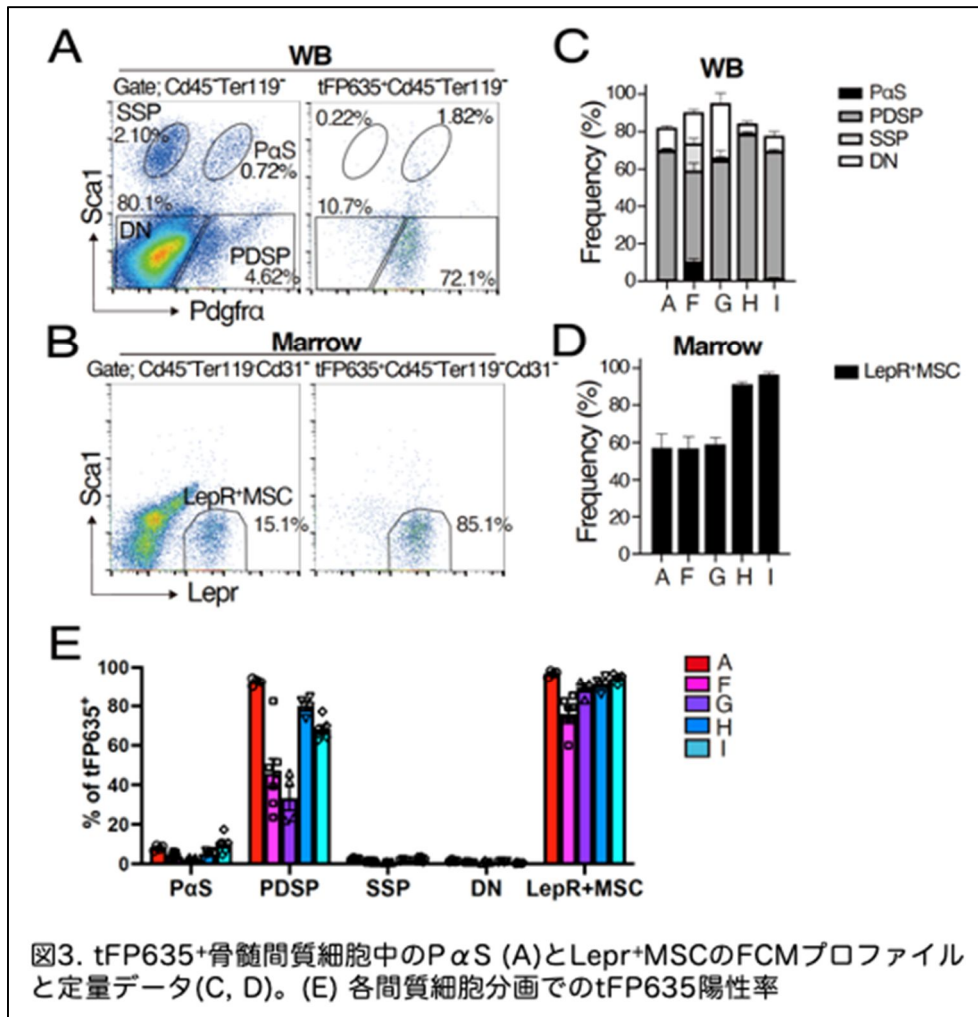
Fzd5-CreERT2-tFP635 の骨髓細胞を、PDGFR、SCA1、FP635 の発現をもとに 8 つの分画に分離後、常法に従い Colony forming unit-fibroblast (CFU-F) アッセイを行なった。また、同様にソーティングした細胞を短期間培養し増幅した後、脂肪または骨分化誘導実験に用いた。

4. 研究成果

1) *Fzd5-CreERT2-tFP635* における FP635 の発現と特異性

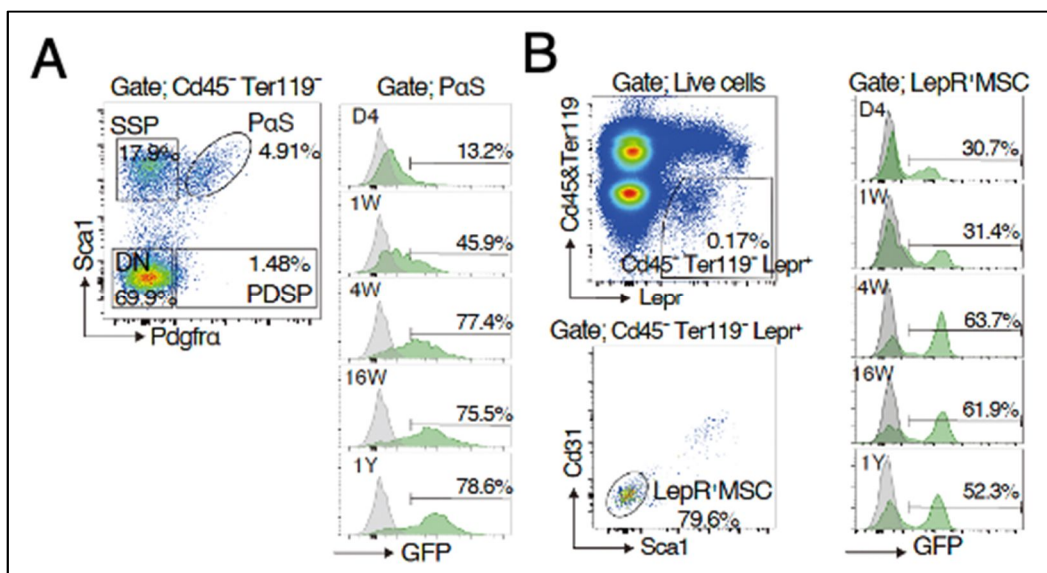
Fzd5-CreERT2-tFP635 における tFP635 の発現特異性を検討するために、大腿骨の凍結切片の蛍光観察を行なった。この結果、骨と骨髓の境界領域に局在する細胞集団と、骨髓中に点在する集団の 2 つが観察された(図 2)。次に、後肢骨の骨髓細胞を用いて FCM 解析を行なった。この結果、WB 由来の tFP635⁺細胞の 60-80% が PDGFR single positive cell (PDSP) であり、Marrow 由来の tFP635⁺細胞の 60-90% は Lepr⁺MSC であった (データは示していないが、WB 由来の PDSP の大部分は Lepr⁺MSC であり、両データは一致している)。一方で、P S および Lepr⁺MSC での tFP635 陽性率は、5-10% と 80-95% であった(図 3)。従って、*Fzd5-CreERT2-tFP635* は 2 種類の MSC をマーキングすることが判明した。





2) Fzd5⁺細胞の細胞系譜追跡

次に、Fzd5⁺MSCの骨髄内での動体を明らかにするため、8-12週齢のFzd5-CreERTにTMを投与し、経時的に骨髄中のGFP⁺細胞をFCMにより解析した。PSでは、TM投与後4日目には約15%がGFPを発現し、時間経過と共に陽性率が上昇し、TM処理後4週で約80%となり、その値は1年間維持された。同様に、Lepr⁺MSCにおけるGFP陽性率も1年間維持されていた(図4)。一方で、データは示していないが、脂肪前駆細胞、骨前駆細胞、間質細胞



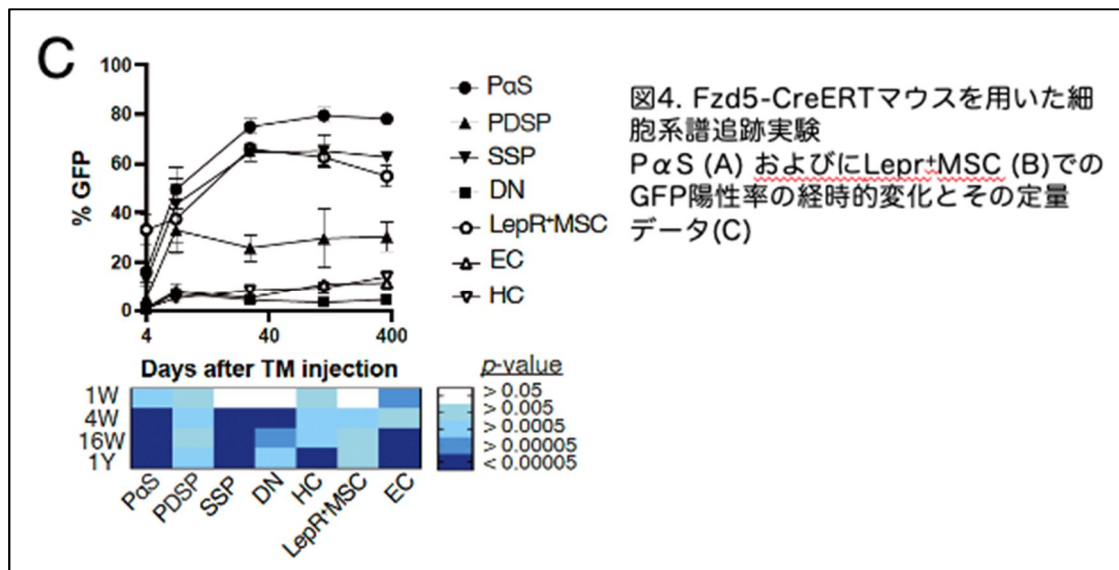


図4. Fzd5-CreERTマウスを用いた細胞系譜追跡実験
PαS (A) およびLepr+MSC (B)でのGFP陽性率の経時的変化とその定量データ(C)

においても GFP の発現が観察された。これらの結果は、Fzd5 を発現する P S と Lepr+MSC が自己複製能を有することを想像させるが、Fzd5-CreERT-tFP635 におけるレポーターの発現特異性が高くないため結論づけるのは難しい。これらを証明するためには、P S または Lepr+MSC を特異的にマーキング可能なマウス系統の作成が必須である。他方で、脂肪前駆細胞、骨前駆細胞、間質細胞、血管内皮細胞でも時間経過とともに GFP 陽性細胞が検出されることから、Fzd5-CreERT-tFP635 は個体老化や炎症等のシグナルに対する MSC や間質細胞の応答を研究する上で有用な研究ツールと成り得る。

3) CFU-F アッセイと分化誘導

Fzd5-CreERT2-tFP635 を用いて骨髄間質細胞の分画を行い、CFU-F 活性を検討した。この結果、tFP635-P S、tFP635+P S、tFP635-PDSP で一次コロニーの形成が確認された。この内、tFP635/tFP635+P S はリプレーティングで著しくコロニー形成能が失われたが、tFP635-PDSP では1次と同程度の2次コロニーが形成され、明らかな3次コロニーも認められた(図5)。さらに、データは示していないが、tFP635-PDSP は脂肪および骨芽細胞への分化能力を有していた。また、tFP635-PDSP では既存の MSC マーカーの発現は認められなかった。これらの結果は、tFP635-PDSP に頻度は低いものの、長期のリプレーティング活性を有する新規 MSC が存在することを強く示唆している。この新規 MSC の性状を明らかにするためには、モノクローナル抗体を用いた純化が必要である。また、レポーターマウスを開発し、*in vitro* および *in vivo* での自己複製能と分化能の検討を行いたい。

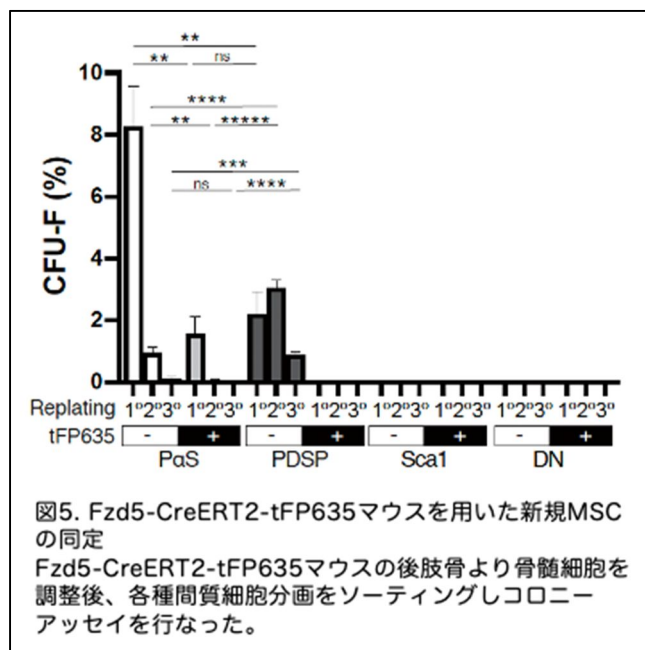


図5. Fzd5-CreERT2-tFP635マウスを用いた新規MSCの同定
Fzd5-CreERT2-tFP635マウスの後肢骨より骨髄細胞を調整後、各種間質細胞分画をソーティングしコロニーアッセイを行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Miyagi Satoru, Iwama Atsushi	4. 巻 27
2. 論文標題 Plant homeodomain finger protein 6 in the regulation of normal and malignant hematopoiesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Hematology	6. 最初と最後の頁 248 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MOH.0000000000000588	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 Miyagi Satoru, Sroczynska Patrycja, Kato Yuko, Nakajima-Takagi Yaeko, Oshima Motohiko, Rizq Ola, Takayama Naoya, Saraya Atsunori, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihito, Takahashi Satoru, Matsuzaki Yumi, Christensen Jesper, Helin Kristian, Iwama Atsushi	4. 巻 133
2. 論文標題 The chromatin-binding protein Phf6 restricts the self-renewal of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2495 ~ 2506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000468	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 Kanayama Kengo, Chiba Tetsuhiro, Oshima Motohiko, Kanzaki Hiroaki, Koide Shuhei, Saraya Atsunori, Miyagi Satoru, Mimura Naoya, Kusakabe Yuko, Saito Tomoko, Ogasawara Sadahisa, Suzuki Eiichiro, Ooka Yoshihiko, Maruyama Hitoshi, Iwama Atsushi, Kato Naoya	4. 巻 2019
2. 論文標題 Genome-Wide Mapping of Bivalent Histone Modifications in Hepatic Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9789240	査読の有無 無
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 Kato Yuko, Hou Li-Bo, Miyagi Satoru, Nitta Eriko, Aoyama Kazumasa, Shinoda Daisuke, Yamazaki Satoshi, Kuribayashi Wakako, Isshiki Yusuke, Koide Shuhei, Si Sha, Saraya Atsunori, Matsuzaki Yumi, van Lohuizen Maarten, Iwama Atsushi	4. 巻 76
2. 論文標題 Bmi1 restricts the adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells to maintain the integrity of the hematopoietic stem cell niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2019.07.006	査読の有無 無
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 Miyagi Satoru, Kato Yuko, Watanabe Ayako, Miyamoto Kenichi, Yoshikawa Rintaro, Hagiya Keita, Hirano Daisuke, Matsuzaki Yumi	4. 巻 42
2. 論文標題 Generation of a BAC transgenic mouse strain that expresses CreERT and a fluorescent protein under the transcriptional control of the Fzd5 locus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00194-x	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮城聡、加藤裕子、岩間厚志、松崎有未
2. 発表標題 造血幹細胞制御因子Phf6の結合因子の同定とその機能解析
3. 学会等名 炎症再生医学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------