

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 年 4 月 1 日～2009 年 3 月 31 日

課題番号：20790684

研究課題名（和文）

髄外造血における新しい造血ニッチ細胞の同定と未分解時機構の解析

研究課題名（英文）

Identification and Characterization of a Hematopoietic Stem Cell Niche in Spleen

研究代表者 水上拓郎（Takuo Mizukami）

国立感染症研究所 血液・安全性研究部

研究成果の概要：

造血幹細胞の未分化性・多分化能の維持はニッチという微小環境によって制御されており、骨髄内では骨梁領域の骨芽細胞が様々な機能を担っていると考えられている。しかし、骨髄以外での造血幹細胞の未分化性の維持機構については不明な点が多い。

そこで、本研究では髄外造血時のニッチ機構を明らかにする事を目的とした。まず、我々は大理石病モデルマウスで、恒常的に髄外造血を示す c-Fos ノックアウトマウスにおける造血幹細胞の局在を調べた結果、Tie2、SCL/tal1、Sca-1 陽性の造血幹細胞の一部が巨核球様細胞（MLCs; Megakaryocyte-like cells）近辺に存在している事が明らかとなった。また、致死性 X 線照射後の骨髄移植による一過性の脾臓での造血（CFU-S）においても同様の現象が認められ MLC が多数クラスターを形成して存在していた。MLCs を FCM によって分取し遺伝子発現解析を行った結果、通常の巨核球とは異なり、ニッチ分子である N-cadherin、 β -Catenin、Spp1、Jagged-1 や SDF-1 α を高発現していた。また、移植実験から、これらの MLC の 70～80% がドナー細胞由来である事が明らかとなった。さらにクラスターを形成している MLC を Laser Capture Micro-dissection 法を用いて単離し、遺伝子レベルで解析した結果、通常の巨核球とは異なる遺伝子発現プロファイルを認めた。また MLC を単離し、造血幹細胞(KSL)と共培養する事で有意な細胞増殖を認め、我々の単離した MLC が脾臓等におけるニッチの役割を果たしている事が示唆された。

また、脾臓に腫瘍を形成する ATL のモデルマウスである HTLV-Tax トランスジェニックマウスを用い、同様の解析を行った結果、腫瘍幹細胞の同定に成功し、脾臓および骨髄のニッチを同定することに成功した。

本研究により髄外造血等に MLC が関与している事が初めて明らかとなった。MLC を用いることで造血幹細胞の体外増幅等に応用可能であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：随外造血・造血幹細胞・ニッチ・Spp1・N-cadherin

1. 研究開始当初の背景

健全な成体において造血幹細胞は骨髄内では静止状態で存在しているが、溶血性貧血や、慢性低酸素症、肝硬変、感染症などの影響によって一過性に脾臓や肝臓での造血が亢進し、随外造血を呈する事が明らかとなっている。このように随外造血が行われる場合において、①一体どのような分子メカニズムで造血幹細胞が多分化能と同時に、自己複製能を維持しているか、②骨髄内のニッチ細胞の代わりにどのような細胞が随外ニッチを担っているかについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

そこで我々は随外造血に注目して造血幹細胞の未分化性維持及び多分化能に関与する分子の同定及び機能解析を行い、既にニッチ分子として明らかとなっているN-cadherinやJagged-1, β -catenin, SDF-1 α を強発現している細胞を同定する事を試みた。

3. 研究の方法

随外造血亢進脾臓において出現する①新規造血ニッチ細胞の特徴を詳細に明らかにすると共に、②既知のニッチシステムとの比較を行い、骨芽細胞やCxcl12強発現細胞との機能や分子メカニズムの相違から、脾臓ニッチのみならず③造血幹細胞の未分化性維持において重要な分子を同定する事を目的とした。

4. 研究成果

恒常的に随外造血を示すc-Fosノックアウトマウスにおける造血幹細胞の局在を調べた結果、Tie2, SCL/tal1, Sca-1陽性の造血幹細胞の一部が巨核球様細胞(MLCs; Megakaryocyte-like cells)近辺に存在している事が明らかとなった。また、致死性X線照射後の骨髄移植による一過性の脾臓での造血(CFU-S)においても同様の現象が認められMLCが多数クラスターを形成して存在していた。MLCsをFCMによって分取し遺伝

子発現解析を行った結果、通常の巨核球とは異なり、ニッチ分子であるN-cadherin、 β -Catenin、Spp1、Jagged-1やSDF-1 α を高発現していた。また、移植実験から、これらのMLCの70~80%がドナー細胞由来である事が明らかとなった。さらにクラスターを形成しているMLCをLaser Capture Micro-dissection法を用いて単離し、遺伝子レベルで解析した結果、通常の巨核球とは異なる遺伝子発現プロファイルを認めた。またMLCを単離し、造血幹細胞(KSL)と共培養する事で有意な細胞増殖を認め、我々の単離したMLCが脾臓等におけるニッチの役割を果たしている事が示唆された。

また、脾臓に腫瘍を形成するATLのモデルマウスであるHTLV-Taxトランスジェニックマウスを用い、同様の解析を行った結果、腫瘍幹細胞の同定に成功し、脾臓および骨髄の腫瘍ニッチを同定することに成功した。

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7件)

†Yamazaki J, †Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia / lymphoma (ATL). *Blood*, 28 May, 2009 Accepted

† These authors equally contributed to this work.

Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J, Furuhashi K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals*. 2009; 37: 8-17.

Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Kawamura M, **Mizukami T**, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*. 2008;26: 4686-4696.

Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*. 2008; 26: 227022-227083.

Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germ-line stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17: 67-80.

Kuramitsu M, Hamaguchi I, **Mizukami T**, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K. Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells.

Br J Haematol. 2008; 140: 348-59.

Mizukami T, Kanai Y, Fujisawa M, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M, Hayashi Y. Five azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, specifically inhibits testicular cord formation and Sertoli cell differentiation in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2008; 75: 1002-1010.

[学会発表] (計8件)

1. **Mizukami T**, Hamaguchi I, Takizawa T, Kuramitsu M, Momose H, Naito S, Masumi A, Okada S, Yamaguchi Y. Identification and Characterization of a Hematopoietic Stem Cell Niche in Spleen. Annual meeting of American Society of Hematology. 「ポスター」, 2008年12月.

2. 百瀬暖佳, 浜口功, 滝澤和也, **水上拓郎**, 倉光球, 益見厚子, 山口一成. Tie2 / Angiopoietin-1 シグナルを介した造血幹細胞の増殖制御 日本分子生物学会 「口頭」 2008年12月

3. **水上拓郎**, 今井順一, 浜口功, 河村未佳, 百瀬暖佳, 内藤誠之郎, 前山順一, 益見厚子, 倉光球, 滝澤和也, 野村信夫, 渡辺慎哉, 山口一成. 網羅的迅速検出法 (Luminex法) によるインフルエンザワクチンの新しい安全性評価法の開発の試み 日本ワクチン学会 「口頭」 2008年11月

4. **水上拓郎**, 浜口功, 山口一成. 新型インフルエンザ, ウエストナイルウイルス等に対する対策の現状 日本輸血・細胞治療学会 シンポジウム 2008年10月

5. **Mizukami T**, Yamazaki J, Hasegawa H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in Adult T-Cell Leukemia / lymphoma (ATL) model mouse Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse. 日本癌学会 「口頭」 2008年10月

6. **水上拓郎**, 浜口功, 滝澤和也, 倉光球, 百瀬暖佳, 内藤誠之郎, 益見厚子, 岡田誠治, 山口一成. 脾臓における造血幹細胞ニッチ細胞の解析 日本血液学会 「ポスター」 2008年10月

7. Atsuko Masumi, Isao Hamaguchi, Madoka Kuramitsu, **Takuo Mizukami**, Kazuya Takizawa, Haruka Momose, Seishirou Naito and Kazunari Yamaguchi. The role for IRF2 on megakaryo-poiesis mediated by IFN- γ induction. International Society for ICR. 「ポスター」 2008年9月

8. **水上拓郎**, 山崎 淳平, 滝澤 和也, 倉光球, 百瀬 暖佳, 益見 厚子, 長谷川 秀樹, 浜口 功, 山口 一成. HTLV-1 Taxトランスジェニックマウスを用いた腫瘍幹細胞の同定 HTLV-1 研究会 「口頭」 2008年8月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上拓郎 (Takuo Mizukami)

研究者番号：60415487

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書