

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790896

研究課題名（和文）巨核球分化における Notch シグナルが担う造血制御機構

研究課題名（英文）The role of Notch signaling in megakaryocytopoiesis

研究代表者

錦井 秀和（NISHIKII HIDEKAZU）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30512834

研究成果の概要（和文）：

造血幹細胞から巨核球へ分化する分化経路を明らかにし、その経路における Notch シグナルが担う造血制御機構を明らかにするため、新規マウス巨核球前駆細胞分画を明らかにし、その Notch シグナル分子を含む遺伝子発現パターンを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the precise differentiation pathway of megakaryocyte lineage from hematopoietic stem cell and the role of Notch signaling during megakaryocytopoiesis, we identified a new class of megakaryocyte progenitors in the adult mouse bone marrow and demonstrated the gene expression pattern (including Notch signal molecules).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：血栓・止血学

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは古くから細胞分化を決定するシグナルとして知られており、主に T 細胞を中心とした免疫担当細胞系の分化運命決定に関わると考えられており、巨核球・血小板分化運命決定にも、何らかの役割を担っ

ている事が予想されているがその詳細は明らかではない。正常造血における巨核球・血小板分化経路は、造血幹細胞（HSC）から骨髄球系共通前駆細胞（CMP）を経て、巨核球・赤芽球共通前駆細胞（MEP）へと分化した後、最終的に成熟巨核球・血小板へと分化するモデルが提唱されてきたが、近年になって CMP を経ずに分化早期の段階で造血幹細胞から

巨核球前駆細胞は分化運命が決定されるというモデルが提唱されており、各分化段階で Notch シグナルがどのような役割を担っているかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では正常巨核球分化経路における Notch シグナル制御の担う役割を明らかにする事を目的とし、巨核球分化マーカーとして知られている GPIba (CD42b) の発現に注目して、成体マウス骨髄内巨核球前駆細胞の分化経路の同定及び Notch シグナルが血液細胞特異的に障害される遺伝子改変を行ない、巨核球分化運命決定において Notch シグナルが担う役割を解明する目的で解析を行った。

3. 研究の方法

A) 成体マウス骨髄由来造血前駆細胞分画の単離及び解析

12週齢前後の C57BL/6 マウスの骨髄単核細胞を、Ficol 比重遠心法で単離し、分化抗原 (以下 Lin⁻, B220, TER119, Gr1, CD4, CD8a, Mac1) 陰性分画を MACS 法で純化し、巨核球関連抗原または造血幹細胞関連抗原 (cKit, Sca1, CD41, GPIba, CD150, CD16/32, CD9, CD105) に対する特異抗体で染色し、FACS Aria (BD社) を用いて各分画を Sorting し、遺伝子発現パターン及び、分化能の評価を行った。さらに同定した巨核球前駆分画の遺伝子発現パターン及び骨髄内での局在を RT-PCR 法及び骨髄凍結切片における蛍光免疫染色法により評価を行った。

染色には Anti-Hamster 抗 Delta1 抗体、Delta 4 抗体、Anti-Rabbit 抗 vWF 抗体、Anti-rat 抗 CD41、GPIba 抗体を用い、二次抗体として Alexa488, 54, 647 標識 Anti-rabbit/Hamster/rat IgG 抗体を用いた。核染色には DAPI を用い、共焦点顕微鏡で観察を行った。

B) レトロウイルスを用いた遺伝子導入

次にマウス Hes1 cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターを作成し、293gp 細胞に pCDNA-VSVG と co-transfection することで高力価レトロウイルス上清を作成した。さらに薬剤依存性ウイルス産生細胞株である 293gp 細胞にこのウイルス上清を用いて感染させることにより、安定してレトロウイルスを供給することができるシステムを樹立した。このウイルス上清をフローサイトメーターで単離した KSL 細胞に強制発現した後、

メチルセルロース半固形培地にてコロニー形成能を評価した。コロニー形成能はコロニー数とコロニーの Pick Up による形態観察、コロニー構成細胞を Mac1, Gr1 (顆粒球系マーカー)、TER119 (赤血球系マーカー)、CD41、GPIba (巨核球系マーカー) の蛍光抗体で染色し、コロニー構成細胞の表現型解析を行った。

C) 巨核芽球系細胞株 UT7/TPO を用いた検討

巨核芽球系の細胞株である UT7/TPO 細胞は、10%FBS, TPO10ng/ml Pyruvate を添加した IMDM で培養維持を行った。巨核球分化には TPO 100ng/ml で培養することで分化誘導を行った。Notch 関連分子の発現の有無はビオチン化 Hamster Anti-Human Notch1-4 抗体、Anti-Hamster Alexa 488 抗体を用い、フローサイトメーターにて評価した。

レトロウイルスを用いた Hes1 または Hes1 の C 末 deletion 変異体を導入を行った後、細胞株の増殖または多核化における影響を検討した。

4. 研究成果

造血幹細胞が濃縮されている cKit⁺ Sca1⁺ Lin⁻ (KSL) 分画には GPIba の発現は認めなかったが、興味深いことに CMP/GMP/MEP を含む cKit⁺ Sca1⁺ Lin⁻ (KS-L) 分画のうち、CD34⁺, CD16/32^{dull} の CMP 分画でのみ、巨核球成熟マーカーである GPIba の発現を認めていた。一方、顆粒球前駆細胞 (GMP) 分画や従来巨核球分化能を保持していると考えられてきた MEP 分画には GPIba の発現は認めなかった。

次に CMP 分画における GPIba 陽性細胞の多分化能及び増殖能について評価を行った。最初に cKit⁺ Sca1⁺ Lin⁻ CD34⁺ GPIba⁺ 分画 (以下 34a⁺ 細胞) の形態及び表現型解析を行った。34a⁺ 細胞は形態的には細胞質に乏しい単核の未分化な前駆細胞様であった。フローサイトメーターによる解析の結果、過去に報告されている巨核球前駆細胞マーカーである CD41、CD9 は全て陽性であり、幹細胞マーカーの一つである CD150 も 34a⁺ 細胞は陽性であった。

次にこの細胞の分化能をメチルセルロースコロニーアッセイ法、または OP9 ストロマ細胞との共培養法により評価を行った。メチルセルロース法の結果、造血幹細胞分画である KSL 細胞や、CMP、GMP 分画にあたる前駆細胞分画ではコロニー形成が確認されたが 34a⁺ 細胞はコロニー形成を観察することが

できなかった。しかし、OP9 共培養法では 34a+細胞ではすべての細胞が大型の成熟巨核球へと分化し、培養を継続すると血小板の前駆体である Proplatelet 形成を認めた。さらに 34a+細胞が赤血球分化能を有しているかどうか評価するために、EPO 添加下で OP9 ストロマ細胞との共培養を行ったが、34a+細胞は TER119 陽性赤血球への分化は認めず、巨核球への分化運命が決定した細胞集団である事が示唆された。以上の結果より、34a+細胞はいわゆる CMP 分画に含まれているにも関わらず、巨核球への分化運命が既に決定付けられた細胞分画である事が示された。

次に、34a+細胞の起源を明らかにするため、造血幹細胞を含む造血前駆細胞の短期培養より 34a+細胞が誘導することが可能か検討した。特に 34a+細胞が高度に純化された造血幹細胞によく発現する表面抗原である CD150 を発現していることに注目し、CD150 陽性 KSL 細胞 (CD150+KSL) と CD150 陰性 KSL 細胞 (CD150-KSL)、CMP 細胞、MEP 細胞を用いて、短期培養を行った後フローサイトメトリーで 34a+細胞が誘導されるかどうか検討した。その結果、CD150 陽性細胞の短期培養では 34a+細胞が認められるのに対し、CD150-KSL、CMP GPIba 陰性分画、MEP 細胞からの分化誘導は確認できなかった。

MEP 分画の細胞は、過去の報告通り巨核球分化能を有していたが、少なくとも試験管内では 34a+細胞を介さずに成熟巨核球 (CD34-CD41+GPIba+) へ分化していた。この結果は、34a+細胞は CMP/MEP を介さずに造血幹細胞より直接的に巨核球へ分化する経路上に位置する巨核球前駆細胞集団である事が示唆している。現在 CAG プロモーターにより恒常的に蛍光蛋白 GFP を発現し、移植した細胞から *in vivo* で分化した血小板が GFP でマーキングされたマウスより、34a+細胞及び KSL 細胞、MEP 細胞分画を単離し、非致死量の放射線を照射した血小板減少マウスモデルに移植を行い、*in vivo* における 34a 細胞の分化能について検討を行っている。

次に、我々は 34a+細胞の遺伝子発現パターン及び骨髄内での局在を RT-PCR 法及び骨髄凍結切片における蛍光免疫染色法により評価を行った。興味深いことに Notch シグナルの下流に位置する転写因子 HES 1 の発現を RT-PCR 法で確認したところ、cKit 陽性前駆細胞分画の中で、34a+細胞は他分画と比較し極めて HES1 の高い発現を示し、同分画への分化において、

Notch-Hes シグナルが何らかの役割を示している可能性が考えられた。

Notch レセプターのリガンドである Delta1, Delta4 は骨髄内において血管内皮、間質細胞を含む様々な細胞に発現していることが知られている。我々の検討では Delta1 は主に Osteoblast で、Delta4 は主に血管内皮細胞を含む間質細胞でよく発現していた。骨髄内における 34a+細胞の局在を蛍光免疫染色で確認したところ、GPIba 陽性の単核細胞 (通常 GPIba は多核化した成熟巨核球にのみ発現している) のみ発現しているため、GPIba 陽性の単核細胞は 34a 細胞を多く含んでいると考えられる) は vWF, Delta4 陽性血管内皮細胞に近接して局在していることが確認された。一方 Delta1 発現細胞と 34a+細胞に局在の近接性は認められなかった。

これらの結果から骨髄内においても骨髄内微小環境からの Notch-Delta シグナルが巨核球分化において何らかの役割を担っている可能性が示唆されたため、次に我々は、巨核球系細胞への分化運命の決定において Notch シグナルが担う役割を明らかにするために、Notch シグナル経路の下流転写因子である Hes1 を高力価レトロウイルスを用いて遺伝子導入を造血幹細胞に行った場合の変化を確認した。Hes1 cDNA をレトロウイルスにより KSL 細胞に強制発現した後、メチルセルロース半固形培地にてコロニー形成能を評価した。遺伝子導入効率はウイルスベクターに内包されている IRES-GFP システムを利用して、GFP 陽性率で評価を行った。その結果、過去の報告どおり、コントロール細胞と比較しコロニー形成能が亢進した。また、形成されたコロニーの構成細胞の表面抗原解析を行うと、Hes1 の強制発現により Mac1, Gr1 などの顆粒球系分化マーカーの発現は著明に抑制されているのに対し、巨核球系前駆細胞マーカーの一つとして知られている CD41 の発現が亢進していた。その一方 34a+細胞を含む GPIba 陽性細胞への分化誘導も抑制されていた。Notch-Hes1 シグナルの過剰亢進が巨核球前駆細胞増殖・成熟抑制に関わる可能性が示唆された。現在遺伝子改変マウスを用いた解析を進めており、*in vivo* の血小板造血における Notch シグナルの意義について研究を進めている。

さらに巨核球前駆細胞から多核化した巨核球への巨核球成熟過程における Notch-Hes1 経路が担う役割について検討を行った。巨核芽球系の細胞株である UT7/TPO

細胞は、TPO 依存的増殖を示し、TPO 濃度依存的に多核化し成熟巨核球様の形態へと分化することが知られている。まず、ヒト Notch 抗体及び RT-PCR 法を用いて UT7/TPO 細胞における Notch レセプターの発現を検証したところ、Notch1-4 全ての Notch レセプターを発現していた。また、ビオチン化 Notch 抗体を用いてフローサイトメーターによる発現解析を行ったところ、全ての Notch レセプターは UT7/TPO 細胞の細胞膜表面に発現していることが確認された。さらに UT7/TPO 細胞を TPO で刺激し巨核球成熟・多核化を促したところ (TPO 100ng/ml で刺激)、RT-PCR 法で Notch 下流転写因子 Hes1 の mRNA の発現変化を確認したところ、Hes1 mRNA の発現量は著明に亢進していた。この結果から巨核球成熟過程においても Notch-Hes 経路が何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

そこで、この細胞株にレトロウイルスを用いて Hes1 または DNA 結合部位が含まれる Hes1 の C 末を欠損させた変異体を導入し、細胞株の増殖または多核化における影響を検証した。その結果、全長型 Hes1 を導入しても細胞増殖・多核化に影響を認めなかったが、C 末欠損変異体 Hes1 を導入した細胞株では、多核化が障害された未分化な細胞の増殖を認めるようになった。C 末欠損変異体 Hes1 は過去の報告ではドミナントネガティブ変異体として機能することが知られていることから、Hes1 は巨核球成熟過程においては正の制御を行っている可能性が考えられた。

本研究の結果、従来成熟巨核球分化抗原と考えられていた GPIba が前駆細胞分画の一部、しかも、従来提唱されてきた分化経路では MEP 分画の上流に位置する CMP 分画の中に含まれており (=34a+細胞)、その分化能は巨核球系へと限定されている事が初めて明らかとなった。さらに、34a+細胞は試験管内の短期分化誘導法の結果からは、CD150+KSL 細胞から直接的に分化誘導している可能性が高く、正常な巨核球分化経路は従来の CMP→MEP を介した経路のみならず、造血幹細胞からかなり未分化な段階で既に分化運命が決定している可能性が高い。同様の分化経路の存在を提唱する報告は数報あるが、本研究は 34a+細胞分画というマーカー分子を決定したという観点から重要な結果と考えられる。

また、34a+細胞で Notch シグナルの下流転写因子である Hes1 の mRNA が高発現していることは同分化経路において Notch-Hes シグナ

ルが重要な役割を担っている事が示唆するデータである。Hes1 は造血幹細胞で高発現している事が知られており、純化された造血幹細胞分画にレトロウイルスで遺伝子導入し強制発現を行うと、未分化性を維持したまま造血幹細胞が増幅することが報告されており、最近では慢性骨髄性白血病の急性転化時の白血病幹細胞の増幅にも役割を担っている事も示唆されている。我々の解析結果からは、未分化な造血幹細胞から巨核球へと分化運命を決定付ける際にも Notch-Hes シグナルは役割を担っており、顆粒球系への分化は抑制すると考えられた。

骨髄凍結切片の免疫染色の結果からは、Delta をはじめとする Notch リガンドを発現する造血微小環境からのシグナル伝達により巨核球・血小板造血は生体のホメオスタシスを保つために綿密に制御されていることが予想される。

また、巨核芽球細胞株の実験結果からは、巨核球成熟には Hes1 は正の制御を行っていることが明らかとなった。未分化細胞から GPIba が発現する巨核球分化運命が決定する段階では Hes1 が過剰に存在することでむしろ分化抑制の方向に働く結果から、分化段階によって Notch-Hes シグナルは異なる働きを担っている事が示唆される。

急性巨核芽球性白血病における白血病細胞の表面抗原パターンの多くは、CD41 陽性であるがより成熟した巨核球マーカーとして考えられてきた GPIba は陰性である事が多い。この表現型は KSL 細胞に Hes1 を導入した際に見られる表現型と酷似しており、GATA-1 変異などの既報の急性巨核芽球性白血病に関わる遺伝子変異と協調的に働くことにより疾患発症に関わる可能性が考えられる。

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)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦井 秀和 (NISHIKII HIDEKAZU)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30512834

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：