

## 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18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790915

研究課題名（和文） 胎生期造血幹細胞未分化性維持機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the maintenance of hematopoietic stem cells during embryogenesis

研究代表者

杉山 大介（SUGIYAMA DAISUKE）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00426652

## 研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、造血幹細胞増幅器官であるマウス胎仔肝臓の造血幹細胞制御機構に関する申請者独自の知見を基盤にして、造血幹細胞の未分化性維持機構を解明する事である。

## 1. KS-13 シグナル由来造血細胞分化関連因子の機能解析：

KS-13 シグナルの解析から、胎生期造血幹細胞が赤血球へ分化するにつれて発現が低下する因子、*Hmgn2*を同定した。*Hmgn2*遺伝子の機能獲得用 vector 構築を行い、構築 vector を多能性幹細胞及び白血病細胞株へ導入した。*Hmgn2* が赤血球細胞分化を抑制する事を明らかにし、論文発表した（Kulkeaw et al., 2012）。

## 2. 造血幹細胞分化関連因子の同定と機能解析：

胎生期肝臓は造血細胞、肝芽細胞、類洞内皮細胞より構成される。Dlk-1陽性肝芽細胞をFlow cytometry法で純化・採取し遺伝子・タンパク発現を検討すると、肝芽細胞はFibronectin、Vitronectinなどの細胞外マトリックスとSCF・EPOなどの細胞刺激因子を発現することで造血幹細胞分化を制御する事を明らかにし、昨年度、細胞刺激因子に関して論文発表した（Sugiyama et al., 2011）。細胞外マトリックスに関しては現在論文投稿中である。

肝芽細胞の造血幹細胞分化制御に及ぼす影響をさらに検討する為、肝芽細胞/肝細胞欠失マウスを用いた実験を行った。胎齢19.5日目DK0マウス肝臓よりCD45/c-Kit/Sca-1陽性造血幹細胞を純化・採取し、放射線照射レシピエントマウスへ移植したところ、コントロールであるWild typeマウス由来造血幹細胞はレシピエントマウス骨髄を再構築（再構築率3%以上）したにも関わらず、肝芽細胞/肝細胞欠失マウス由来造血幹細胞は極めて低率に再構築した（再構築率0.5%以下）。マイクロアレイ解析の結果、複数の候補因子の抽出に成功した。来年度以降も解析を継続する予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

## 1. Analysis of KS-13 signal.

By database of KS-13, we identified *Hmgn2*, which gene expression is down-regulated during erythroid differentiation. Over-expression of *Hmgn2* gene into leukemic cell lines resulted in suppression of erythroid differentiation *in vitro* (Kulkeaw et al., 2012).

## 2. Identification of novel molecules that regulate differentiation of hematopoietic stem cells.

Fetal liver comprises hematopoietic cells, hepatoblasts and sinusoid endothelial cells. By Flow cytometry, we sorted out Dlk-1(+) hepatoblasts, which primarily expressed extra-cellular matrix such as fibronectin and vitronectin, in addition to hematopoietic cytokines, SCF and EPO (Sugiyama et al., 2011). We have submitted the paper about extra-cellular matrix (Sugiyama et al., in revision).

To further investigate the roles of hepatoblasts, we used the mutant mice lacking both hepatoblasts and hepatocytes. We sorted out CD45(+)-c-Kit(+)-Sca-1(+) hematopoietic stem cells from E19.5 fetal liver of both mutants and wild type control and transplanted into irradiated recipient mice. Three to six months after transplantation, hematopoietic reconstitution was analyzed by flow

cytometry. The chimerism of wild type control was achieved to over 5%, whereas that of mutants was less than 0.5%. Using these samples, we performed micro-array analysis and identified several candidate genes that likely regulate differentiation of hematopoietic stem cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液内科学、造血幹細胞、造血発生

#### 1. 研究開始当初の背景

成体において造血幹細胞は骨髄に存在し、ニッチ細胞と呼ばれる造血幹細胞を取り囲む細胞群により制御を受け、その多くは細胞周期 G0 の状態で留まっている。成体骨髄造血幹細胞がその未分化性を維持するためには、intrinsic には Foxo3a や lipid raft が重要であり、extrinsic にはニッチ細胞から分泌される TGF- $\beta$  が重要と報告されている (Miyamoto et al., 2008; Yamazaki et al., 2009)。現在まで成体骨髄造血幹細胞を安全かつ高効率に、その未分化性を維持したまま大量培養する技術は開発されておらず、細胞刺激因子を用いた臍帯血造血幹細胞の大量培養において、ある一定の成果が認められている (Heike and Nakahata, 2002)。この臍帯血造血幹細胞や、将来的に有望なツールとして期待されている ES 細胞/ iPS 細胞など多能性幹細胞から誘導した造血幹細胞は、胎生期における造血幹細胞に相当する。これら胎生期造血幹細胞を安全かつ高効率に、その未分化性を維持したまま大量培養する技術を開発するためには、胎生期における造血幹細胞未分化性維持機構の解明が必要不可欠である。

#### 2. 研究の目的

造血幹細胞は様々な成熟血球に分化できる多能性と、この多能性を維持したまま増殖可能な自己複製能を併せ持ち、既に造血幹細胞移植療法に応用されている。この自己複製能を保持し続けるためには、造血幹細胞がその未分化性を維持する必要があるが、その機構は解明されていない。造血幹細胞の未分化性

維持機構を解明すれば、造血幹細胞の未分化状態を維持したまま大量培養する技術が開発可能になるだけでなく、造血幹細胞維持機構が破綻した白血病幹細胞研究や、他の組織特異的幹細胞研究への波及効果が期待出来る。そこで本申請提案では、造血幹細胞増幅器官であるマウス胎仔肝臓の造血幹細胞制御機構に関する申請者独自の知見を基盤にして、造血幹細胞の未分化性維持機構を解明する。

#### 3. 研究の方法

MudPIT、マイクロアレイ法、CAGE (Cap Analysis Gene Expression) 法、real-time PCR 法を用いて、KS-13 シグナル関連遺伝子の候補を絞り込む。また、細胞外マトリックスのカクテルを作製し、造血幹細胞の分化を抑制する条件を検討後、KS-13 と同様に分化関連遺伝子を絞り込む。候補遺伝子において vector を構築し、ES 細胞へ遺伝子導入する。中胚葉系細胞を分化誘導後、造血細胞の分化誘導を行い、分化の抑制を検討する。次に、抑制効果が認められた vector を用いて、マウス造血幹細胞集団へ遺伝子導入し、細胞刺激因子添加培養において分化が抑制されるか検討する。更に、分化が抑制された造血幹細胞集団のコロニー形成能、骨髄再構築能、遺伝子発現などを検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1. KS-13 シグナル由来造血細胞分化関連因子の機能解析：

KS-13 シグナルの解析から、胎生期造血幹

細胞が赤血球へ分化するにつれて発現が低下する因子、*Hmgn2* を同定した。*Hmgn2* 遺伝子の機能獲得用 vector 構築を行い、構築 vector を多能性幹細胞及び白血病細胞株へ導入した。*Hmgn2* が赤血球細胞分化を抑制する事を明らかにし、論文発表した(Kulkeaw et al., 2012)。

## 2. 造血幹細胞分化関連因子の同定と機能解析:

胎生期肝臓は造血細胞, 肝芽細胞, 類洞内皮細胞より構成される。Dlk-1陽性肝芽細胞を Flow cytometry法で純化・採取し遺伝子・タンパク発現を検討すると、肝芽細胞は Fibronectin, Vitronectinなどの細胞外マトリックスとSCF・EPOなどの細胞刺激因子を発現することで造血幹細胞分化を制御する事を明らかにし、昨年度、細胞刺激因子に関して論文発表した(Sugiyama et al., 2011)。細胞外マトリックスに関しては現在論文投稿中である。

肝芽細胞の造血幹細胞分化制御に及ぼす影響をさらに検討する為、肝芽細胞/肝細胞欠失マウスを用いた実験を行った。胎齢19.5日目DKOマウス肝臓よりCD45/c-Kit/Sca-1陽性造血幹細胞を純化・採取し、放射線照射レシピエントマウスへ移植したところ、コントロールであるWild typeマウス由来造血幹細胞はレシピエントマウス骨髄を再構築(再構築率3%以上)したにも関わらず、肝芽細胞/肝細胞欠失マウス由来造血幹細胞は極めて低率に再構築した(再構築率0.5%以下)。マイクロアレイ解析の結果、複数の候補因子の抽出に成功した。来年度以降も解析を継続する予定である。

## 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)

[雑誌論文](計7件)

1. Mizuochi M, Fraser ST, Biasch K, Horio Y, Kikushige Y, Tani K, Akashi K, Tavian M and Sugiyama D.

Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic transition during early embryogenesis.

*PlosOne* (in press).

2. Kulkeaw K, Inoue T, Mizuochi C, Horio Y, Ishihama Y and Sugiyama D.

Ectopic expression of *Hmgn2* antagonizes mouse erythroid differentiation in vitro. *Cell Biol Int* 36(2): 195-202, 2012.

3. Inoue T, Kulkeaw K, Okayama S, Tani K and Sugiyama D.

Variation in Mesodermal and Hematopoietic Potential of Adult Skin-derived Induced Pluripotent Stem Cell Lines in Mice.

*Stem Cell Reviews and Reports* 7(4): 958-968, 2011.

4. Sugiyama D, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y and Okayama S.

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production

*Biochem Biophys Res Commun.* 410(2): 301-306, 2011.

5. Kulkeaw K, Ishitani T, Kanemaru T, Ivanovski O, Nakagawa M, Mizuochi C, Horio Y, Sugiyama D.

Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation.

*Genes to Cells* 16(4): 358-367, 2011

6. Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H, Komatsu N, and Tani K.

APOA-1 is a novel marker of erythroid cell maturation from hematopoietic stem cells in mice and humans.

*Stem Cell Reviews and Reports.* 7(1): 43-52, 2011

7, Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y, Nakao K, Akashi K and **Sugiyama D**.

Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/c-Kit signaling in embryonic mouse.

**Development**.137(23): 3941-3952, 2010, Selected for cover image.

[学会発表](計 21 件)

<国際学会>

1, **杉山大介**

Haematopoietic development in mice and implications for haemotherapy

TESMA (Tissue Engineering & Regenerative Medicine Society of Malaysia) seminar December 419, 2011, Kuala Lumpur (Malaysia)

口頭発表(招待講演)

2, **杉山大介**, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y, Okayama S, Inoue T

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production.

Cell Symposia (Stem Cell Programming & Reprogramming)

December 8-10, 2011, Lisbon (Portugal)

ポスター発表

3, Inoue T, Kulkeaw K, Horio Y, Okayama S, Mizuochi C, Srinoun K, Tani K, **杉山大介**,

Variation in hematopoietic potential of adult and embryonic skin-derived iPSC lines.

Cell Symposia (Stem Cell Programming & Reprogramming)

December 8-10, 2011, Lisbon (Portugal)

ポスター発表

4, Tomoko Inoue, **Daisuke Sugiyama**, Ryo Kurita, Kasem Kulkeaw, Yoshie Miura, Chiyo

Mizuochi, Yuka Horio, Norio Komatsu, Kenzaburo Tani.

APOA-1 is a novel marker of erythroid cell

maturation from hematopoietic stem cells.

第 1 回日本血液学会国際シンポジウム、秋田、2010 年 7 月、口頭発表

5, Tomoko Inoue, **Daisuke Sugiyama**, Ryo

Kurita, Kasem Kulkeaw, Yoshie Miura, Chiyo Mizuochi, Yuka Horio, Norio Komatsu,

Kenzaburo Tani.

APOA-1 Is a Novel Marker of Erythroid Cell

Maturation from Hematopoietic

Stem Cells in Mice and Humans

第 13 回米国遺伝子治療学会、ワシントン、

2010 年 5 月、ポスター発表

6, **杉山大介**

Haematopoietic development in mice and implications for haemotherapy

The 3<sup>rd</sup> International Conference on Thalassemia in China

November 4-6, 2010, China

口頭発表(招待講演)

<国内学会>

1. **杉山大介**、Kulkeaw Kasem、Kanitta

Srinoun、水落ちよ、堀尾有可、井上朋子

肝芽細胞による胎生期赤血球造血の制御機構

第 73 回日本血液学会学術集会総会、名古屋、2011 年 10 月 16 日

口頭発表

2. 井上朋子、Kulkeaw Kasem、Kanitta

Srinoun、水落ちよ、堀尾有可、**杉山大介**

成体及び胎仔マウス皮膚由来 iPSC 細胞における造血能の比較検討

第 73 回日本血液学会学術集会総会、名古屋、2011 年 10 月 14 日

口頭発表

3. 水落ちよ、Kulkeaw Kasem、Kanitta

Srinoun、堀尾有可、井上朋子、**杉山大介**

マウス卵黄嚢における造血細胞ニッチの検討

第 73 回日本血液学会学術集会総会、名古屋、2011 年 10 月 14 日

ポスター発表

4. Kanitta Srinoun, Kulkeaw Kasem, 水落ちよ、堀尾有可、井上朋子、**杉山大介**  
Ninjin Yoeito and Juzen Taihoto, Japanese Kampo drugs accelerate mouse erythropoiesis in vitro  
第 73 回日本血液学会学術集会総会、名古屋、2011 年 10 月 15 日  
ポスター発表 travel award

5. Kulkeaw Kasem, Kanitta Srinoun, 水落ちよ、堀尾有可、井上朋子、**杉山大介**  
Identification of novel genes regulating erythropoiesis by cold-exposed zebrafish  
第 73 回日本血液学会学術集会総会、名古屋、2011 年 10 月 16 日  
口頭発表

6, Tomoko Inoue, Kasem Kulkeaw, Yuka Horio, Satoko Okayama, Chiyo Mizuochi, Koichi Akashi, Kenzaburo Tani, **Daisuke Sugiyama**  
Variation in Hematopoietic Potential of Adult and Embryonic Skin-Derived iPSC Lines  
第 17 回 日本遺伝子治療学会、福岡、2011 年 7 月、口頭発表 (英語)

7, **杉山大介**, Kulkeaw Kasem, 水落ちよ、堀尾有可、井上朋子、岡山聡子、Kanitta Srinoun  
Fetal liver hematopoiesis and implications for haemotherapy  
日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、福岡、2011 年 5 月 16 日  
口頭発表 ( 招聘指定講演 )

8. 水落ちよ、Kulkeaw Kasem, 堀尾有可、井上朋子、岡山聡子、Kanitta Srinoun、**杉山大介**  
Regulation of HSCs in the mouse placental niche through SCF/c-Kit signaling  
日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、福岡、2011 年 5 月 16 日  
口頭発表

9. 井上朋子、Kulkeaw Kasem, 堀尾有可、水落ちよ、岡山聡子、Kanitta Srinoun、谷憲

三朗、**杉山大介**

Variation in hematopoietic potential of adult skin-derived iPSC lines.  
日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、福岡、2011 年 5 月 16 日  
口頭発表

10, Kulkeaw, Kasem, 石谷太、金丸孝昭、水落ちよ、堀尾有可、Ognen Ivanovski, Suthat Fucharoen、横尾朋子、**杉山大介**

Cold exposure down-regulate zebrafish erythropoiesis and pigmentation.  
第 72 回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010 年 9 月 26 日  
口頭発表

11, 堀尾有可、Kulkeaw, Kasem, 水落ちよ、小川峰太郎、**杉山大介**

Variation in hematopoietic potential of induced pluripotent stem cell lines.  
第 72 回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010 年 9 月 24 日  
ポスター発表

12, 水落ちよ、佐々木達哉、堀尾有可、バトツエツエグ・バトチュルウン、ロドリー・ジョーンズ、**杉山大介**  
マウス胎盤ニッチより産生される SCF による造血細胞クラスターの制御  
第 72 回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010 年 9 月 24 日  
ポスター発表

13, **杉山大介**、疋田隼人、Kulkeaw, Kasem, 水落ちよ、堀尾有可、Jones, Rhodri、竹原徹郎  
胎生期肝臓における造血・血管新生制御  
第 72 回日本血液学会学術集会総会、横浜、2010 年 9 月 24 日  
口頭発表

14, 井上朋子、**杉山大介**、栗田良、Kulkeaw Kasem、三浦由恵、水落ちよ、堀尾有可、小松則夫、谷憲三朗

APOA-1はマウス、ヒトにおいて造血幹細胞から赤血球への新しい成熟マーカーである  
第 72 回日本血液学会学術集会総会、横浜、  
2010 年 9 月 25 日  
ポスター発表

15, **杉山大介**  
造血発生システムの動作原理に基づく新規再生医療法の開発  
第 2 3 回セルセラピーセミナー、前橋、  
2010 年 6 月 25 日  
口頭発表（特別講演）

〔図書〕(計 1 件)

1. **Sugiyama D**, Inoue T and Kulkeaw K.  
Year Book of SCIENCE & TECHNOLOGY 2011.  
Stem cell maintenance in embryos and adults.  
2011. 258-261 pages.  
McGRAW-HILL

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：造血幹細胞または造血前期細胞の分化を抑制するペプチド及びその用途  
発明者：杉山大介  
権利者：九州大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2010/ 67011  
出願年月日：2010/09/29  
国内外の別：国外

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 大介 (SUGIYAMA DAISUKE)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：00426652