

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791078

研究課題名(和文)造血幹細胞の発生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for hematopoietic stem cell development

研究代表者

山根 利之(YAMANE, Toshiyuki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30452220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を兼ね備え、唯一造血系を持続的に維持することができる細胞集団である。本研究課題では、中胚葉系譜から造血細胞が発生してくる過程を詳細に解析し、造血幹細胞の起源を探索した。この解析の中で、リンパ球や骨髄球系譜への分化能に加え、胎仔型赤血球への分化能も有する初期の造血細胞が存在することを見いだした。またこれらの初期の造血細胞と後に発生する造血幹細胞の間の遺伝子発現差異を明らかとし、幹細胞性への関与を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSC) are a subset of cells that are capable of self-renewal and differentiation into all mature blood cell lineages. In this study, we identified the common precursors of primitive erythrocytes and multipotent hematopoietic cells in early mouse development before the emergence of HSC. We compared the gene expression profiles between pre-HSC stage hematopoietic cells and HSC. Though the analysis, we identified genes distinctly expressed between these early progenitors and stem cells, suggesting the involvement of these genes into the stemness of blood cell system.

研究分野：血液学 発生生物学 幹細胞生物学 免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 造血細胞移植学

キーワード：造血幹細胞 造血発生 幹細胞 発生 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を兼ね備えており、限られた細胞寿命を有する成熟血液細胞に対し、唯一造血系を持続的に維持することができる未分化細胞集団である。実験的には、他個体への移植後、長期に渡って造血系を再構築可能な細胞集団と定義される。マウス胚において、造血幹細胞は、胎齢 10.5-11 日に、大動脈周辺、卵黄囊、胎盤、卵黄動脈などに初めて観察されはじめる。しかしながら、これ以前に造血幹細胞が、どこで、どのような前駆細胞を経て、発生してくるのかについては未解明であった。研究開始当初、我々は造血幹細胞が出現する以前の胎齢 9.5 日に、T、B 細胞などのリンパ球や赤血球、顆粒球などの骨髄球へ分化する多分化能細胞を同定していた。これらの細胞は、CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>の細胞表面表現型を有し、大部分は卵黄囊に、また一部は胚体に存在していることを見いだしており[Yamane et al., Proc Natl Acad Sci USA 106: 8953, 2009]、造血幹細胞との関連性を示唆していた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、以下の点を解明することを目標とした。

(1) 造血幹細胞の発生経路の解明 (造血幹細胞の前駆細胞の同定)

上述のように、造血幹細胞は胎齢 10.5 日以降に出現するので、それ以前に存在し造血活性を有する細胞集団を前駆細胞の候補として、造血幹細胞へと分化する可能性を精査する。

(2) 造血幹細胞を規定する細胞内因子の解明

幹細胞活性を保持するに至る過程を、細胞内因子の諸々の変化から解析し、その分子メカニズムを明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞の発生経路の解明 (造血幹細胞の前駆細胞の同定)

前出の胎齢 9.5 日に存在する CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞に加え、造血幹細胞が出現する以前の中胚葉 (由来) 細胞群を、細胞表面マーカー発現を元に分画し、造血活性を有する細胞集団を特定し、造血幹細胞の候補集団として、その性状を精査する。マウス胚から十分な細胞数を得ることは困難であるため、この実験には、中胚葉とその中胚葉由来細胞を標識することができる MesP1<sup>cre/+</sup>/Rosa<sup>YFP/+</sup> マウスから樹立された ES 細胞の培養系を利用する。

幹細胞性については、まず、成体に比べより胎仔期の環境に近いと考えられる新生仔マウスへの移植系を用いて候補集団の幹細胞活性について検討を行う。

また、造血幹細胞が新規に形成されうる組織・器官培養系を確立し、造血幹細胞の候補集団について、その培養系への導入も試みる。

(2) 造血幹細胞を規定する細胞内因子の解明

胎生期に形成されたばかりの造血幹細胞と、その前駆細胞 (候補) 集団の遺伝子発現をマイクロアレイ解析にて比較し、遺伝子発現に差異のある因子 (群) について、幹細胞活性との関連をレトロウイルスによる遺伝子導入などを用いて調べる。

4. 研究成果

(1) 造血幹細胞の発生経路の解明 (造血幹細胞の前駆細胞の同定)

これまでに胎齢 9.5 日胚の CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞がリンパ球系譜、骨髄球系譜の両方へ分化可能なことを示してきた。この細胞以外の造血活性保有細胞を分離する目的で、さらに発生段階をさかのぼり、血液細胞の元となる中胚葉 (由来) 細胞群の中で、造血活性を最初に獲得する細胞集団を中胚葉を特異的に標識する MesP1<sup>cre/+</sup>/Rosa<sup>YFP/+</sup> マウスから樹立した ES 細胞の分化系を用いて探索した。その結果、細胞表面マーカーとして CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>-</sup> および CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup> の表現型を示す細胞が造血活性を有することを明らかとした。CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup> は、その性状解析から以前我々の単離していた CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup> 細胞の直近の前駆細胞であると考えられたが、興味深いことに、CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup> 細胞は、これまではリンパ球・骨髄球系譜とは別系譜であると考えられてきた胎仔型赤血球への分化能を有していた。胚体内において、CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup> 細胞は胎齢 8.5 日に卵黄囊に多く認められ、胎齢 9.5 日には胚本体にも検出されはじめた。

マウス胚から単離した CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>-</sup> 細胞は、単一細胞からリンパ球および胎仔型

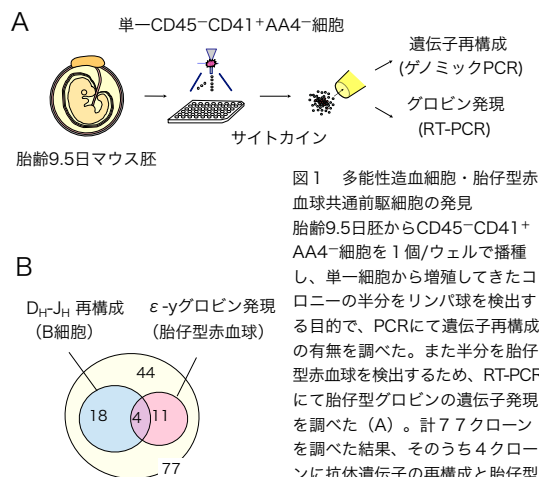


図1 多能性造血細胞・胎仔型赤血球共通前駆細胞の発見  
胎齢9.5日胚からCD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>-</sup>細胞を1個/ウェルで播種し、単一細胞から増殖してきたコロニーの半分をリンパ球を検出する目的で、PCRにて遺伝子再構成の有無を調べた。また半分を胎仔型赤血球を検出するため、RT-PCRにて胎仔型グロビンの遺伝子発現を調べた (A)。計77クローンを調べた結果、そのうち4クローンに抗体遺伝子の再構成と胎仔型グロビンの発現が同時に認められた (B)。

赤血球を培養皿中で同時に形成したことから(図1)、リンパ球・骨髄球を産生する多能性造血細胞と胎仔型赤血球の共通前駆細胞であると考えられた。またこの細胞は、血管内皮細胞への分化能を既に失った細胞であり、血液細胞系譜へ運命決定を受けた細胞であった。このことは、これまでいくつかのグループが主張してきた、造血活性を有する血管内皮細胞やこれらの共通前駆細胞として示唆されてきたヘマンジオブラストとは異なることを示しており、CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞は、血液細胞系譜へ運命決定を受けた細胞であり、最も未分化な造血前駆細胞と推察された(発表論文リスト①)。以上の結果を元に、CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞とともに、この多能性造血細胞・胎仔型赤血球共通前駆細胞の幹細胞活性への寄与について検討した。

まず、胎齢 9.5 日胚から単離した CD45<sup>-</sup>CD41<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞と CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞を半致死量の放射線照射を施した生後 48 時間以内の新生仔マウスへ顔面静脈を介して移植した。この実験系においてコントロール群の成体骨髄細胞は生着したものの、胎齢 9.5 日の候補細胞群の生着は認められなかった。しかしながら、この胎齢 9.5 日の造血細胞の移植系については、特定のグループから報告があるのみで、また報告されている実験データについても造血幹細胞の存在を実証したとは判断し難く、この実験系での生着不能性が、造血幹細胞の不在と同義であるかどうかについては、さらなる検討の余地を残した。

興味深いことに、CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞をごく短期間、OP9 ストロマ細胞上で培養し、その後、培養細胞を免疫不全マウスへ移植することで、幹細胞活性は認められなかったのに対し、B 細胞系譜、また B 細胞系譜より頻度の低いものの T 細胞系譜への寄与も認められた(発表論文リスト②)。またこれらのリンパ球は長期間(20 週)に渡ってマウス体内で維持され続けた。このことは、胎齢 9 日以前のマウス胚が幹細胞活性を有していないものの、胎齢 9 日の造血細胞に由来する成熟細胞は、生涯に渡り、マウス体内にとどまる可能性を示唆した。またこのことは生着能の欠落が、未分化造血細胞の段階に特異的な現象であることを示した。

造血幹細胞を新規に形成させうる器官培養系の確立に着手した。これまでのところ、胎齢 10.5 日の胎仔肝臓を、1 週間程度培養し、c-Kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>未分化造血細胞を維持でき、かつリンパ球・骨髄球の分化を誘導できる器官培養条件を見いだした。胎仔肝臓は、造血幹細胞が劇的に増える場所であり、今度、候補細胞集団の導入、幹細胞誘導能の検討に応用する。

## (2) 造血幹細胞を規定する細胞内因子の解明

胎齢 9.5 日の CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞と後に形成される造血幹細胞は、概ね一致した多分

化能を示す。しかしながら、生後マウスへの生着能のいう点で異なり、この点を利用し、胎齢 9.5 日の卵黄嚢に由来する CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞と、幹細胞活性を十分に獲得した胎齢 14.5 日の胎仔肝臓の c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>細胞の遺伝子発現を比較した。微量に存在する胎齢 9.5 日の CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞から、通常解析に必要な量の mRNA を得るのは困難であるため、得られた微量の mRNA から cDNA を作製後、さらに cDNA を 2 回増幅し、マイクロアレイ解析を行った。既知の細胞表面マーカーなどの解析から cDNA 増幅後に得られたデータは十分に信頼のおけるものであることを確認した。複数の転写因子に差異を認めたため、候補となる転写因子遺伝子をクローニングし、レトロウイルスベクターへ組み込み後、胎齢 9.5 日胚卵黄嚢から単離した CD45<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>AA4<sup>+</sup>細胞へ感染させ、半致死量の放射線照射を施した免疫不全マウスへ移植を行い、スクリーニングを行った。また胎齢 9.5 日胚の同等と考えられ、同じく移植能を欠くマウス ES 細胞にも感染させ、同様に移植を行った。これまでのところ、幹細胞性を付与する cDNA クローンは得られていないが、現在もスクリーニングを継続中である。

また興味深い知見として、パスウェイ解析から、脂質代謝経路、解糖・糖新生経路、核酸代謝経路に差異を認めたので、これらの代謝経路と幹細胞性との間に関連がないか今後の検討課題となる。

## (3) 今後の展望

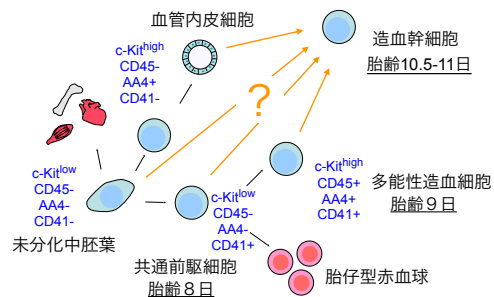


図2 造血幹細胞の発生経路に関する仮説モデル

これまで複数のグループが胎齢 10.5-11 日における造血幹細胞を含む細胞分画、また組織における局在を明らかにしているものの、胎齢 10 日以前の造血幹細胞の前駆細胞の実体については、依然未解明のままであり、本研究課題においても、その同定までには至らなかった。しかしながら中胚葉から造血細胞が形成される過程を、その細胞表現型を中心にして詳細に記述することができたことから、この分化過程に形成される未分化中胚葉細胞、胎仔型赤血球・多能性造血細胞共通前駆細胞、多能性造血細胞、あるいは血管内皮細胞を造血幹細胞前駆細胞の候補細胞集団として、胎仔肝臓の器官培養系へ移入し、造血幹細胞の発生源としての可能性について

今後検証を行う(図2)。また、これらの細胞の組織内での局在を明らかとすることで、造血幹細胞の発生に関わる微小環境についても、今後解明する。

また幹細胞性に関わる細胞内因子についても、遺伝子発現の差異を把握できたことから、幹細胞性を規定する分子機構について、パスウェイ解析の結果もふまえて、今後さらに解析を進める。

#### 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 4 件)

- ① Yamane T, Washino A, Yamazaki H. Common developmental pathway for primitive erythrocytes and multipotent hematopoietic progenitors in early mouse development. *Stem Cell Reports* 1: 590-603, 2013 (査読有) doi:10.1016/j.stemcr.2013.10.008.
- ② Ito C, Yamazaki H, Yamane T. Earliest hematopoietic progenitors at embryonic day 9 preferentially generate B-1 B cells rather than follicular B or marginal zone B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 437: 307-313, 2013 (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.073.
- ③ Komada Y, Yamane T, Kadota D, Isono K, Takakura N, Hayashi SI, Yamazaki H. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. *PLoS One* 7: e46436, 2012 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0046436.
- ④ Tsuneto M, Yamane T, Hayashi SI. Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. In: zur Nieden NI, ed. *Embryonic stem cell therapy for osteodegenerative diseases (Methods in Molecular Biology)* New York, NY: Springer, vol 690, p239-253, 2011 (査読無) doi: 10.1007/978-1-60761-962-8\_16.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 山根利之 「多能性造血細胞の発生と分化」第34回日本炎症・再生医学会 (シンポジウム:骨免疫と炎症性疾患) 2013年7月3日 京都 [招待講演]
- ② Naoki Tsunokuma, Toshiyuki Yamane, Kana Isono, Kyoko Imanaka-Yoshida, Hidetoshi Yamazaki “Contribution of neural crest- and mesoderm-derived mesenchymal cells to the mouse bone

marrow hemato-lymphopoiesis” 第65回日本細胞生物学会大会 2013年6月21日 名古屋

- ③ 山根利之、山崎英俊 「発生初期の多能性造血細胞は造血幹細胞と異なるBリンパ球サブセット分化傾向を持つ」 第65回日本細胞生物学会大会 2013年6月19日 名古屋
- ④ 山根利之 「多能性造血細胞の分化能の変遷」第65回日本細胞生物学会大会 (シンポジウム:幹細胞研究の新展開~組織発生から病態まで~) 2013年6月19日 名古屋 [招待講演]
- ⑤ Naoki Tsunokuma, Chiaki Matsumoto, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Contribution of neural crest-derived cells and mesodermal cells to the mouse bone-marrow and thymic hemato-lymphopoiesis” 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5日 神戸
- ⑥ Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Cell fate regulation of common primitive-definitive hematopoietic precursors” International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate 2012年11月6日 京都
- ⑦ Toshiyuki Yamane, Aya Washino, Hidetoshi Yamazaki “Cell fate regulation of the common primitive-definitive hematopoietic progenitors” 第73回日本血液学会学術集会 2012年10月20日 京都
- ⑧ Naoki Tsunokuma, Chiaki Matsumoto, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Contribution of neural crest and mesodermal cells to the mouse bone-marrow and thymic hematopoiesis” 第73回日本血液学会学術集会 2012年10月19日 京都
- ⑨ 栗谷建志, 山根利之, 山崎英俊 「マウスES細胞からの神経堤細胞の誘導」第81回東海実験動物研究会 2012年7月21日 津
- ⑩ 松本千晶, 角熊直樹, 山根利之, 山崎英俊 「神経堤或は中胚葉由来細胞の欠損による造血細胞の異常とストレス反応」第81回東海実験動物研究会 2012年7月21日 津

- ⑪ Toshiyuki Yamane, Aya Washino,  
Hidetoshi Yamazaki  
“ Characterization of the earliest  
hematolymphoid progenitors in mouse  
ontogeny” 第 73 回日本血液学会学術集  
会 2011 年 10 月 15 日 名古屋 [口頭発  
表]
- ⑫ 山根利之「胚発生期における造血細胞の  
系譜解析」新学術領域「細胞運命制御」  
若手の会 2011 年 9 月 24 日 軽井沢 [口  
頭発表]

[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  
三重大学大学院医学系研究科幹細胞発生学  
分野  
[http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山根 利之 (YAMANE, Toshiyuki)  
三重大学大学院・医学系研究科・准教授  
研究者番号：30452220

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：