

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591400

研究課題名(和文) c-Myb レポーターマウスを用いた血液幹細胞維持および分化機構の分子論的解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of HSC maintenance and differentiation utilizing c-Myb reporter mice

研究代表者

坂本 比呂志 (Sakamoto, Hiroshi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：00347014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：内因性のc-Mybタンパク質をモニターできるc-Mybレポーターマウスの樹立に成功した。このマウスより、in vivoにおいてもc-Mybはその発現量に応じて、細胞機能を調節していることが明らかとなった。また、近年のLineage-biased HSCsの概念を確認できるとともに、これらは同様にdormant HSCsになっていることも確認できた。また、このレポーターマウスは、胎児期、成体期を通じて自己複製時のHSCsを高い割合で単離できることより、自己複製機構の解明のよき道具となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：We have established c-Myb reporter mice that can monitor the endogenous c-Myb protein. Utilizing the mice, we proved that c-Myb protein was able to control cell functions, especially HSCs, according to c-Myb expression levels. We have also confirmed the concepts of lineage-biased and dormant HSCs. We anticipate that these mice will become a new research tool that can efficiently isolate HSCs self-renewing from the embryonic to the adult stage.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血液幹細胞 転写因子 c-myb

1. 研究開始当初の背景

転写因子 c-myb は、細胞増殖において非常に重要であることは、細胞株での遺伝子発現や ストレート ノックアウト(KO)の解析により明らかになっている。一方、近年の臓器特異的 KO などの解析から、各種細胞系譜の分化にも重要であることが示された。

我々は、先に「ES 細胞の試験管内分化システム」と「テトラサイクリン(Tet)による外来遺伝子発現システム」を組み合わせた実験方法を、c-myb(-/-)ES 細胞に適用し、c-myb の発現が完全に人為的に行える ES 細胞の樹立を行った。この細胞を用いた実験より、我々も c-myb は様々な血液細胞系譜の分化に重要であることを示した。さらに、その制御には、c-myb の微妙な発現量による制御が大切であることを示した。

血液幹細胞(HSCs)においては、c-myb の組織特異的 KO マウスは、HSC 活性に変化をもたらした。面白いことに、ある種の chemical mutagenesis mouse (=hypomorphic phenotype)では、HSC 活性の増加となっている。このことは、c-myb の減少が単なる HSC 活性の減少ではなく、その発現量に応じて、c-myb の機能の変化が起こっていることを示すものであり、我々の仮説した「c-myb の制御には、c-myb の微妙な発現量による制御が大切である」に合致する。そこで、c-myb レポーターマウスの作成に着手した。

2. 研究の目的

我々の先の研究は ES 細胞分化システムであり、人工的な実験系のため、生体内で同じような「c-myb の微妙な発現量変化による機能発現の違い」のシステムが働いているかを検討するためには、c-myb をモニターできるマウスが必要である。さらに、そのマウスを利用して、先の仮説を検討する。

3. 研究の方法

この研究には c-myb をモニターできるマウスが必須である。しかし、c-myb をモニターできるマウスの報告はない。そこで、最初に c-myb レポーターマウスの作成に注力した。しかし、レポーター遺伝子を first ATG に挿入した方法では上手くいかないことを、共同研究者より情報を得ていた。そこで、c-myb 3'-UTR をターゲットとした。

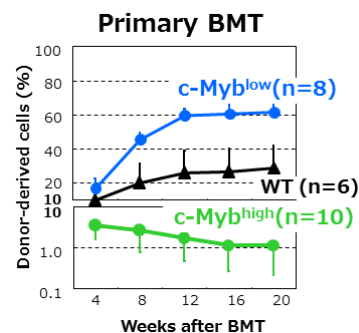
4. 研究成果

(1)当初は転写のみをモニターする目的で、c-myb 遺伝子の stop codon と 3'-UTR の間 IRES-EGFP の挿入を ES 細胞に行った。(c-myb 遺伝子の転写において 3'-UTR が重要な役割を果たしているため、この部分は手を加えないように注意した。)しかし、この方法では EGFP と c-myb はまったく発現しなかった。恐らく、IRES の 2 次構造が何らかの影響を与えたと考えている。

そこで次に、c-Myb タンパク質と EGFP の間に長鎖の linker(30 単純アミノ酸)を入れた融合 c-Myb タンパク質とすることとした。長鎖のリンカーは、EGFP の持つ立体障害を避ける事が目的である。しかし、この場合も EGFP と c-myb の発現も観察できなかった。そこで、neo の挿入位置を exon から離れた場所に変更したところ、この ES 細胞の in vitro 分化を行った細胞からは、EGFP を発現していた。そこで、このターゲティングベクターを用いて C57/BL6 の ES 細胞で遺伝子改変を行い、マウスを樹立した(ここで C57/BL6 の ES 細胞を使ったことで、backcross に要する 2 年近くが必要なくなった。)このマウスはホモ接合体でも正常に生まれ成長する。つまり、c-Myb-EGFP の融合タンパク質は内因性の c-Myb タンパク質と同様の機能を有することが、証明された。以降の実験はすべてホモ接合体で行った。

(2) EGFP (= c-Myb)の発現を既知の様々な前駆細胞で検討した。既に報告のある前駆細胞ではすべて EGFP の発現は確認された。T 細胞においては、c-myb は発現の上下を繰返す。そこで、EGFP の発現を検討したところ既知の報告の通りに発現は上下した。これらの結果より c-Myb レポーターマウスは正確に内在性の c-Myb タンパク質をモニター出来ていることが確認出来た。

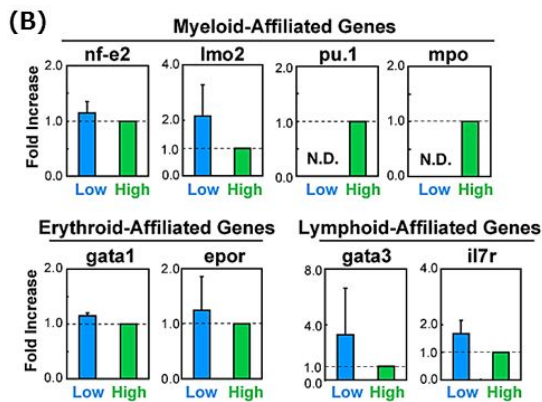
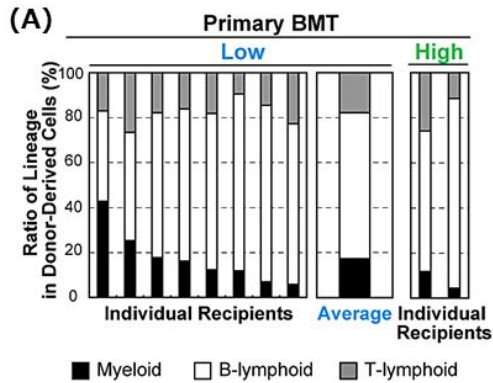
(3) 正常 HSCs での EGFP の発現を検討した。予想では CD34+HSCs での EGFP 発現は予想されたが、CD34-HSCs においてもほとんどすべての細胞が EGFP を発現していた。先の研究より c-myb の発現に応じて機能が異なることが予想されたので、EGFP の発現レベルを基に c-Myb(low)と c-Myb(high)に分けて 放射線照射マウスに移植実験を行った。結果として、c-Myb(low)のほうが高い長期再構築能を示した。



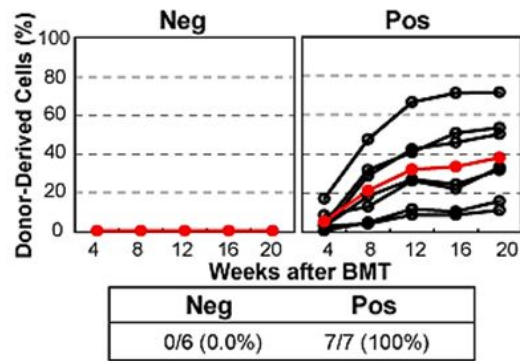
次に、細胞周期を検討したところ、c-Myb(low)の大部分の細胞は G0 期であった。次に Brd-U のラベリングの長期保持能力により、細胞分裂の頻度を比較した。この結果より、c-Myb(low)HSCs は dormant HSCs であることを確認できた。発現遺伝子の確認でも、HSCs 維持に重要である遺伝子は

c-Myb(low)HSCs に強く発現していた。

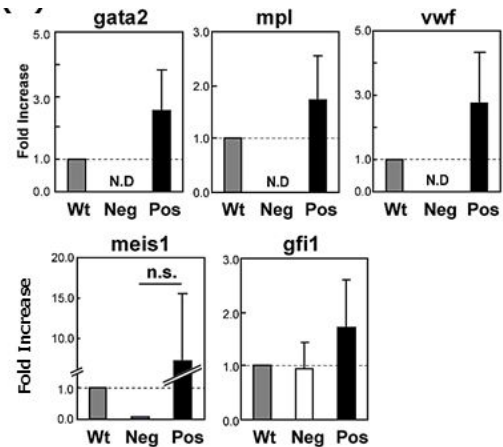
近年、HSC 細胞集団内には、各細胞系譜に偏った分化を示す lineage-biased HSC の存在が知られている。移植実験からは、先の子のグループから報告のあるような強い lineage-bias は見られなかった(A)。また、発現遺伝子の検討においても、lineage-affiliated な遺伝子の発現の偏りは、なかった(B)。



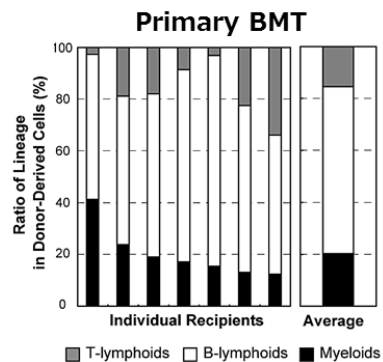
(4) 先にも述べたように c-myb は、胎生期の造血発生において必須である。この時期、血液幹細胞は盛んに自己複製を行っている。そこで、成体においても自己複製が盛んな時は c-myb が必須であると予想し、その関与を検討した。5-FU 投与により骨髄破壊を起こし、既知の HSC 画分を更に CD34 の発現の低い画分を分離したところ、そこには c-Myb(pos) と (neg) の画分が存在した。そこで、この 2 つの画分を回収し、移植実験をおこない HSC 活性を検討した。その結果、少なくとも 1/100 の確立で HSC が c-Myb(pos) のみに存在した。

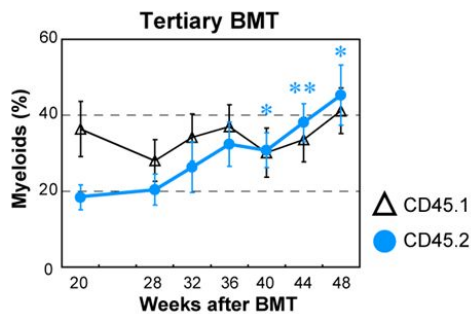


その細胞周期の検討からは、この c-Myb(pos) 画分は実際に、細胞周期が盛んに回っていることが確認できた。*この点は先に見られた dormat HSC である c-Myb(low)HSCs とは明らかに異なっている。遺伝子発現実験からも、この c-Myb(pos) が HSC 細胞画分であることが確認出来た。



この移植実験においても、強い lineage bias は観察されなかった。しかし、3 次移植において時間の経過とともに、donor 由来の myeloid 系譜の割合が増加してきた。このことは、先に報告のある Myeloid-biased HSCs は、Lymphoid-biased HSCs よりも長寿命であるとの報告と合致する。





以上の結果より、in vivo においても c-Myb はその発現量に応じて、細胞機能を調節していることが明らかとなった。また、近年の Lineage-biased HSCs の概念を確認できるとともに、これらは同様に dormant HSCs になっていることも確認できた。

このレポーターマウスは、胎児期、成体期を通じて自己複製時の HSCs を高い割合で単離できることより、自己複製機構の解明のよき道具となることが予想される。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Sakamoto H*, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, and Ogawa M

Determining c-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes. **Stem Cells** vol.33 pp479-490 (2015)

doi:10.1002/stem.1855. 査読有り

Ishida M, El-Mounayri O, Kattman S, Zandstra P, Sakamoto H, Ogawa M, Keller G, Husain M*. Regulated expression and role of c-Myb in the cardiovascular-directed differentiation of mouse embryonic stem cells. **Circ Res.** vol.110 pp253-64 (2012)

doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259499. 査読有り

[学会発表](計 4 件)

Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, Ogawa M

Determining c-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes.

熊本医学・生物科学国際シンポジウム
「幹細胞制御と臓器再建」

2014年9月4-5日 熊本 熊本市医師会館

Sakamoto H, Takeda N, Tsuji-Tamura K, Hirota S, Hashiguchi A, Ahmed T, Ogawa M

Dormant hematopoietic stem cells suppress c-Myb protein to low levels.

休眠状態の血液幹細胞は、転写因子 c-myb の発現レベルを低く保っている。

75th 日本血液学会学術集会 2013年10月11日-13日 ロイトン札幌・さっぽろ文芸館・札幌市教育文化会館 北海道

Sakamoto H, Takeda N, Tsuji-Tamura K, Hirota S, Ogawa M Levels of the c-Myb Protein Indicate Repopulating Capacity in Long-Term Hematopoietic Stem Cells.

2012 ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA

Sakamoto H, Takeda N, Garcia P, Tsuji-Tamura K, Hirota S, Frampton J, Minetaro Ogawa

Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells

転写因子 c-myb の血液幹細胞における発現と機能

74th 日本血液学会学術集会 2012年10月19日-21日 国立京都国際会館 京都

〔図書〕(計 1 件)

坂本比呂志、田村潔美、小川峰太郎；微
小環境の血液幹細胞への働きかけ

—誕生から骨髄での維持まで—

実験医学増刊 Vol.31 (5) pp38- pp42
(2013)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_differentiation/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 比呂志 (SAKAMOTO, Hiroshi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：00347014