

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640044

研究課題名(和文)迅速かつ効率的な血液分化細胞の解析構築

研究課題名(英文)Establish of rapid and efficient blood cell differentiation

研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50625580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞や免疫細胞の各分化系譜細胞を標識することは、マウスを用いた迅速かつ簡便な解析方法の重要なツールになると考えられた。我々は人工染色体技術を用いることで各分化細胞遺伝子領域下に様々な蛍光タンパク質をコードする遺伝子を加えることにより、各血液分化細胞を抗体染色なしに採血後フローサイトメーターにて解析することで血液分化細胞の比率などが解析できるマウスの樹立を目標にした。始めに我々は各分化細胞の特異的遺伝子を探索した。様々な蛍光タンパク質を細胞に遺伝子導入することで最適な蛍光タンパク質の組み合わせを特定した。しかし、人工染色体の技術が間に合わなかったが、今後も継続しマウスの樹立を成功させたい

研究成果の概要(英文)：Labeling each differentiation lineage cells of the hematopoietic stem cells and immune cells were considered an important tool for rapid and convenient analysis method using the mouse. We had hypothesized that able to analyze the blood cell differentiation by using the HAC technology. We have to explore the specific genes of each differentiated cells at the beginning. A variety of fluorescent proteins were identified the optimal combination of fluorescent proteins by gene introduced into the cell. However, although the artificial chromosome technology did not meet the deadline, you want to be successful establishment of mice to continue in the future.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 免疫細胞 血液細胞 蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

主に血液学や免疫学において、マクロファージ、顆粒球、T細胞、B細胞、赤血球、血小板といった各血球系特異的に発現している細胞膜タンパク質を認識する抗体を用いることにより細胞の割合や組織における局在を解析している。しかし、マウスにおける実験においてマウスから血液細胞の分取を行い、抗体染色が完了し、解析開始するまでに数時間かかる。また、蛍光色素を標識した抗体を用いるために色の組み合わせ、さらに、細胞数における抗体量の予備実験を行わなくてはならない。申請者の現在までにフローサイトメーター、共焦点レーザー蛍光顕微鏡、細胞イメージング解析装置を用いることにより造血幹細胞の休眠状態を細胞、分子レベルにおいて解析してきた(Yamazaki et al., *EMBO*. 2006, *Blood*. 2009 *Cell*. 2011)。

この様に申請者は蛍光タンパク質の知識とそれを解析する装置を使いこなせる技術に熟練している。申請者がこれまで蓄積してきた成果と技術をさらに洗練させ、各血球系細胞特異的に蛍光色素を発現するマウスを作製することにより、迅速かつ効率的な血球系解析方法の確立を目標とした。

2. 研究の目的

血液学もしくは免疫学において、血液細胞の各細胞分化マーカーを指標に解析する手法は一般かされている。申請者は骨髄中に存在する造血幹細胞の移植系を用いることで各血液細胞マーカーをフローサイトメーターで解析する手法を用いて、造血幹細胞の休眠状態を分子レベルで定義した。さらに、骨髄中のシュワン細胞が造血幹細胞の休眠状態を誘導している細胞であることを明らかに

した。申請者は、各血球分化細胞特異的に蛍光タンパクを発現することにより、従来の抗体染色をせずとも血球の割合等の解析可能なマウスの作製し、造血幹細胞の研究を進めるにあたり実験系を迅速かつ効率的に進める手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

5色から7色を同時に解析できる蛍光タンパク質の組み合わせの評価

405nm から 700nm までの励起波長で検出可能な蛍光タンパク質は数十種類存在する。これらの蛍光タンパク質がどのような組み合わせにより5色の色を同時に解析する組み合わせをフローサイトメーターにより解析し評価した。その後、各血球系特異的プロモーター下を探索し検討を行った。申請者は、より蛍光タンパクの発現の安定化、エクソン上流配列(プロモーター領域を含む)を全て含んだ下流に蛍光タンパク質を挿入しようと考え検討を行った。またマウス1固体に5から7色の蛍光タンパクをすべて導入可能なヒト人工染色体(HAC)技術の習得を行った。

4. 研究成果

蛍光波長が重複しない蛍光タンパク質の選出：

現在までに、蛍光タンパク質を発現する遺伝子は多数存在し、それに伴い蛍光タンパク質を複数種類発現することができるマウスが作製され、基礎医学における重要な役割を果たしている。本研究では、申請者がこれまで蓄積してきた知識と技術を最大限に生かすことで、各血球系細胞が個々に異なる蛍光タンパク質を発現するマウスの作製を目指し、スクリーニングを行った。具体的には、数多くある個々の蛍光タンパク遺伝子を細胞株

に遺伝子導入し、異なる蛍光タンパク質が発現する細胞株を作製した。この異なる蛍光タンパク質を発現する細胞株を混合させフローサイトメーターを用いて解析することにより蛍光波長が異なり、さらに、蛍光補正可能な組み合わせを同定した。

血液レインボーマスウの作製と解析：

CD4,CD8,B220,Gr-1,Mac-1,CD41,CD71 プロモーター下に様々な蛍光タンパク質遺伝子を導入することを試みた、各遺伝子プロモーターの強弱があることから、プロモーターと蛍光タンパク質の組み合わせの条件検討が非常に困難であった。また、HAC ベクターの構築や技術取得に熟練の経験が必要であることで

鳥取大学の押村教授の助言をいただきながら実験を進めずことにした。

作製した血液レインボーマスウはフローサイトメーターや共焦点レーザー蛍光顕微鏡の観察技術を同時に向上されたことから免疫組織である脾臓や骨髄などを透明化技術により3次元イメージング画像を容易に取得できることを可能にした。

この技術はスタンフォード大学との共同研究で用いられ2016年2月のNatureに報告した (Chen J et al., 2016 Nature)。

本研究計画は、世界でもリードする技術と知識を融合することによって可能になりえる技術である。蛍光タンパク質やその蛍光を検出できる技術、知識は当研究室に長年にわたり確立された分野であり、フローサイトメーターを取り扱う高度なオペレータとの共同のもと困難な7色の蛍光タンパク質の組み

合わせを可能なると考えた。しかし、トランスジェニックマスウのベクター作製はメガベースという大きな遺伝子を挿入できるヒト人工染色体ベクターを用いるこという斬新かつ画期的な手法など様々な問題点が出てきたことから期間内に本プロジェクトを終えることは不可能であった。しかし、今後も本研究を続けて行いうことでマウスの作製に尽力をつくす。

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)

1. Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, Yamazaki S, Shnha R, Kao KS, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H, Weissman IL. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*. 2016 Feb 11: 223-227
2. Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports*. 2015. Oct 13: 597-608.
3. Ishida T, Yamazaki S, Nakauchi H, Higashihara M, Otsu M. Reactive oxygen species in hematopoietic stem cells affect culture outcome under inflammatory conditions. *Open Journal of Hematology*. 2015. Sep 6: 6-7
4. Okeyo KO, Kurosawa O, Yamazaki S, Oana H, Kotera H, Nakauchi H, Washizu M. Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self-Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Jun 5.
5. Nakauchi Y, Yamazaki S*, Napier C S, Usui J, Ota Y, Takahashi S, Watanabe N, Nakauchi H. **(*Correspondence author)** Effective treatment against severe Graft-versus-Host Disease with allele-specific anti-HLA monoclonal

antibody in a humanized-mouse
model. *Exp Hematol.* 2015 Feb 43.

〔雑誌論文〕（計 5 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 聡 (Yamazaki, Satoshi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50625580

(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：