

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670447

研究課題名(和文)細胞競合を介した幹細胞クローン増幅機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of expansion of hematopoietic stem cell clones

研究代表者

平尾 敦(Hirao, Atsushi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：90343350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞集団を構成する個々のクローンは、その能力や動態が大きく異なる。本研究では、幹細胞クローンの優劣を決定する機構を理解するため、細胞競合という概念から取り組んだ。特に、細胞競合現象に関与するシグナルとしてRasに着目して研究を進めた。その結果、Ras/Raf/Erkシグナル制御に関与する分子として知られるSpred1が、生体内での造血幹細胞優位性の決定に寄与することを明らかにした。Spred1の挙動が造血幹細胞の能力の変化を介して、老化や白血病化に寄与する可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that quality of individual hematopoietic stem cells are highly variable. In this study, we analyzed functions of molecules in Ras signals in hematopoietic stem cell competition during hematopoietic reconstitution. We found that Spred1, a negative regulator of Ras/Raf/Erk, plays a critical role in dominancy of hematopoietic stem cells in a competitive assay in vivo. Further studies of Spred1-mediated control of self-renewal activity of hematopoietic stem cells would lead to deep understanding of stem cell aging and tumorigenesis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、分化細胞を供給する能力と、自分自身を産生する自己複製能の二つの能力を兼ね備えており、そのバランスを保ちながら、造血組織の恒常性を維持している。造血幹細胞集団を構成する個々のクローンは、その能力や動態が大きく異なると考えられている。そのため、個体レベルでの幹細胞寿命は、複数の幹細胞クローンが時間軸に沿って入れ替わり、幹細胞活性の受け渡しにより維持されている可能性がある。しかし、この理論を裏打ちする幹細胞クローン間の優劣を規定する機構の詳細は不明である。

最近、造血幹細胞シミュレーションや単一幹細胞 tracking 法により、造血幹細胞は、個々のクローンでその動態・能力が大きく異なることが報告されている。つまり、幹細胞集団としての寿命は、個々の幹細胞の寿命を制御するシグナルに加え、それぞれの幹細胞クローンの能力に依存し、それぞれのクローンがリレーし、幹細胞集団を支えているのではないかと考えられる。すべての幹細胞クローンは同期して活動しているのではなく、出生当初より幹細胞として機能するクローンから、休眠状態（増殖停止）を経て個体の老化とともに活性化するクローンへのリレーにより長期的に維持されているのではないかと考えられる。

本研究では、幹細胞クローンの優劣を決定する機構を理解するため、細胞競合という新たな概念から取り組むこととした。

2. 研究の目的

細胞競合とは、細胞間において相対的な適応度の差から相互依存的に勝者と敗者が決まる現象とされる。つまり、自律的・内因的因子のみで、クローン間の優劣が決まるのではなく、他のクローンに影響を及ぼすことにより、自身の優位性を獲得するという考えである。これまでに、ショウジョウバエなどを用いた研究の結果、Myc や Ras などのオンコジーンが、細胞競合の制御に深く関わることが知られている。そこで、本研究では、造血幹細胞の競合現象を研究対象として、Ras シグナルに着目して研究を進めた。Ras シグナルの変動がいかに幹細胞クローンの優勢・劣勢を決定する鍵になるのかを、幹細胞クローン増幅のメカニズムの解明を目標とした。

3. 研究の方法

誘導的活性化型 K-ras 発現モデル (LSL-K-rasG12D; Rosa26-CreERT2)

LSL-K-rasG12D マウスは、K-Ras 遺伝子の第一エクソンの上流に、LoxP 配列に挟まれた転写停止シグナルフラグメントが挿入され、さらに第一エクソン内第 12 コドンのグリシ

ンがアスパラギン酸に置換する変異が挿入されている。Cre リコンビネース活性非存在下では、変異アリルからの K-Ras 発現は抑制されており、野生型アリル由来の K-Ras のみ発現する。一方、Cre リコンビネース活性存在下では、LoxP 配列を介した相同組み換えによって、転写停止シグナルは排除され、変異型 K-Ras が発現する。LSL-K-rasG12D マウスと、タモキシフェンで活性化が誘導可能な Cre 酵素 (CreERT2) を恒常的に発現する Rosa26-CreERT2 マウスを交配し、LSL-K-rasG12D; Rosa26-CreERT2 マウス (KrasG12D マウス) を樹立した。本マウスにタモキシフェンを投与すると、全身の組織において Cre リコンビナーゼが活性化し、活性化型 K-Ras を誘導的に発現させることができる。本実験では、同腹仔の LSL-K-rasG12D マウス (Kras^{WT} マウス) を野生型 K-ras コントロールとして用いた。

Spred1 欠損システム

Spred1 欠損マウスは、発生段階での大きな異常は示さないため、成体マウス骨髄細胞を用いて解析を行った。また、実験によっては Spred1-flox マウスと Rosa-CreERT2 マウスを交配し、タモキシフェン誘導的に、Spred1 の欠損を誘導するシステムを構築し、解析に用いた。

生体内での造血幹細胞の競合解析法

遺伝子改変マウス由来骨髄単核球細胞と同数の野生型マウス由来骨髄単核球細胞を混合したものを、9.5Gy の X 線を照射したレシピエントマウスの尾静脈から移植した。その後、定期的に末梢血を解析し、ドナー由来細胞とコンペティター由来細胞のキメリズムを表面抗原 (Ly5.1/Ly5.2) によって判定し解析を行った。また、移植後 16 週において骨髄における造血幹細胞レベルでのキメリズム解析を行った。

4. 研究成果

Ras シグナル活性化による細胞競合の意義について検討するため、Cre リコンビナーゼにより活性化型に変換する KrasG12D マウスと Rosa-CreERT2 マウスを交配し、そのマウスの骨髄細胞を正常骨髄細胞と共に移植した。移植後にタモキシフェンを投与し、野生型造血幹細胞と K-ras 活性化型造血幹細胞の競合状態の観察を試みた。K-ras 活性化造血幹細胞は、タモキシフェン投与後、速やかに優位なキメリズムを示した。同時に、明らかな骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の状態が生じていた。さらに、このマウスでは、その後、高頻度に、T リンパ球白血病の発症が認められ、2 ヶ月程度で死亡したため、造血幹細胞のクローン解析や競合を評価するのは困難な状況であると考えられた。

次に、Ras/Raf/Erk シグナルを抑制する因子として発見され、FGF, EGF, Kit リガンド, IL-3 などのシグナルを抑制することが知られている Spred1 に着目して、幹細胞のクローン増幅に関する解析を進めた。Spred1 欠損マウスは、長期的な観察によっても、白血病発症など顕著な血液異常は認められなかった。しかしながら、競合的移植実験を行うことにより、野生型マウス骨髄細胞よりも常に有意になることが判明した。競合相手との移植細胞数の比率を変化させても、常に Spred1 欠損造血幹細胞が優位となることが確かめられた。また、Spred1-flox;Rosa-CreERT2 マウス由来の骨髄細胞と野生型マウス骨髄細胞を移植しキメラ状態にしておいた後、タモキシフェンを投与し、その後の両者の比率を解析しても、Spred1 欠損細胞が優位となったことから、生理的な条件においても、本分子の存在が造血幹細胞の競合を制御していると考えられた。さらに、単一造血幹細胞の移植においても、同様に優位な骨髄再構築能を示したことから、クローンレベルでの競合的優位性を示していると考えられた。以上の結果より、Spred1 の発現レベルが、造血幹細胞のクローン増幅に重要な役割を果たしていると考えられた。今後、本分子が、相互依存的に勝者と敗者が決まる現象、いわゆる細胞競合において直接機能しているのか、あるいは、主に造血幹細胞内の自律的な機能調節によってその優位性を示しているのか、明らかにする必要がある。本分子の挙動が造血幹細胞の能力の変化を介して、老化や白血病化に寄与する可能性も示唆されることから、本研究が、様々病態の理解に貢献できると考えられた。

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6件)(すべて査読あり)

1. Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Hayashi Y, Hamada J, Hirao A. Strong therapeutic potential of α -secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol.* 121(2):239-50. 2015 doi: 10.1007/s11060-014-1630-z
2. Hoshii T, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, Hirao A. Loss of mTORC1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

111(10):3805-10, 2014. doi: 10.1073/pnas.1320265111.

3. Hoshii T, Matsuda S, Hirao A. Pleiotropic roles of mTOR complexes in haemato-lymphopoiesis and leukemogenesis. *J Biochem.* 156(2):73-83. 2014. (review) doi: 10.1093/jb/mvu037
4. Ali MA, Naka K, Yoshida A, Fuse K, Kasada A, Hoshii T, Tadokoro Y, Ueno M, Ohta K, Kobayashi M, Takahashi C, Hirao A. Association of a murine leukaemia stem cell gene signature based on nucleostemin promoter activity with prognosis of acute myeloid leukaemia in patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;450(1):837-43. 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.066.
5. Hirao A, Hoshii T. Mechanistic/mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem cells and leukemia. *Cancer Sci.* 104(8):977-82, 2013. doi: 10.1111/cas.12189., 2013 (review)
6. Baba T, Naka K, Morishita S, Komatsu N, Hirao A, Mukaida N. MIP-1 /CCL3-mediated maintenance of leukemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2210(12):2661-73, 2013. doi: 10.1084/jem.20130112.

[学会発表](計9件)

1. Hirao A: Role of c-Kit signal modulation in the control of self-renewal and aging of hematopoietic stem cells. 2015 US-Japan meeting on malignant hematopoiesis and stem cells. March. 16-17, 2015 (Hawaii, USA)
2. Hirao A: The signaling pathways for the determination of hematopoietic stem cell fate. 第76回日本血液学会学術集会, 平成26年10月31日 11月2日(大阪)
3. Hirao A: The nutrient sensing signaling in the cancer stem cells. 第73回日本癌学会学術総会, 平成26年9月25-27日(横浜)
4. Tadokoro Y, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A: Control of self-renewal activity of hematopoietic stem cells by Spred1, ISEH 43rd Annual Scientific Meeting, August 21-24 2014 (Montréal, Canada)
5. Tadokoro Y, Hoshii T, Naka K, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A: Inhibitory effect of Spred1 on self-renewal activity

mediated by cell-cell interaction determines size of hematopoietic stem cell pool, The 12th Stem Cell Research Symposium, May 30-31 2014 (Fukuoka)

6. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic and leukemia stem cells. SNUCRI CANCER SYMPOSIUM, April 16-19, 2014(Korea)
7. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic stem cells and leukemia. The 23th Hot Spring Harbor International Symposium, Nov.5, 2013, Kyushu University(Fukuoka)
8. 平尾 敦: 栄養センサーシグナルと幹細胞制御 第86回日本生化学会大会, 平成25年9月11-13日, パシフィコ横浜(横浜)
9. Hirao A: The nutrient sensing signaling pathways in the hematopoietic stem cells and leukemia. 2013 SUCRI-KUCRI Joint Symposium, July 10, 2013, Seoul National University (Korea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ :
<http://cri-mol-gen.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平尾 敦 (HIRAO ATSUSHI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号: 90343350

(2)研究分担者

田所 優子 (TADOKORO YUKO)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 00447343

(3)連携研究者

なし