

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461454

研究課題名(和文)造血幹細胞の発生後期にみられるゲノムワイドな転写抑制の機構とその意義

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of genome-wide transcriptional repression in hematopoietic stem cell development

研究代表者

横溝 智雅 (Yokomizo, Tomomasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定事業研究員

研究者番号：80590314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス胎児において、造血幹細胞がどのように産まれてくるのかを明らかにすることを目的としており、とくに幹細胞らしさがどのようにして獲得されるのかに焦点を当てて進められた。研究期間内には、造血幹細胞が産まれる過程において、mRNA量、細胞の大きさが大幅に減少すること、細胞表面タンパクであるCD71およびCD98が減少することを明らかにしており、mTORシグナルの関与が強く示唆された。これらは、幹細胞らしさの獲得メカニズムの一端を明らかにする成果であり、造血幹細胞の試験管内誘導法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand how hematopoietic stem cells (HSCs) are generated during mouse development. Especially we focused on how stemness is obtained after the specification of hematopoietic cells. Our study revealed that total amount of mRNA, cell size and surface marker expressions (CD71 and CD98) decrease during the HSC generation, suggesting that mTOR signaling might be involved in this process. These results could be applied to develop a new culture system for in vitro HSC generation.

研究分野：血液細胞の発生

キーワード：造血発生 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS/ES 細胞からさまざまな種類の細胞の誘導が試みられており、疾患治療・再生医療への応用が期待されている。血液細胞への分化誘導の研究もさかんにおこなわれており、現在までに多種の血液細胞(赤血球、巨核球など)の試験管内誘導が可能となっている。しかしながら、もっとも応用範囲が広いと思われる造血幹細胞の試験管内誘導については、いまだ成功の報告はない。誘導が成功しない主たる理由として、生体内での造血幹細胞の発生メカニズム、とくに幹細胞性獲得のメカニズムの詳細が分かっていないため、生体を模倣した効果的な培養系を構築することができていない点が指摘されている。そこで、この幹細胞性獲得のメカニズムの早急な解明が強くのぞまれていた。

2. 研究の目的

申請者らは、造血幹細胞の発生過程において、血液細胞への運命が決定された後に mRNA の総量が著しく低下する“転写抑制”が起きていることを見だしている。この転写抑制がおこる時期は、幹細胞性獲得の時期とよく一致しており、2つの現象の関連が強く示唆される。本研究では、このゲノムワイドな転写抑制の機構とその意義を明らかにし、造血幹細胞の試験管内誘導を可能にする培養系を構築するための基盤となる研究をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 胎生 10~14 日目マウス胎仔の造血幹細胞、および造血幹細胞の前駆段階細胞(プレ造血幹細胞; pre-HSC)について、FACS(フローサイトメトリー)を用いて表面タンパクの発現等を解析する。解析する表面タンパクについては、以前おこなった単一細胞マイクロアレイの結果をもとに、転写抑制への関与の可能性のあるものを選択する。

(2) 胎生 10~14 日目のマウス胎仔から造血幹細胞、およびプレ造血幹細胞を、FACSソーターを用いて単離し、免疫染色、電子顕微鏡観察等をおこなう。

(3) 造血幹細胞、およびプレ造血幹細胞の発生する時期である胎生 10~14 日目における各細胞種の分布について調べるため、ホールマウント免疫染色をおこなう。ホールマウント免疫染色法については、以前申請者が開発・報告した方法を用いる。

4. 研究成果

(1) RNA ポリメラーゼ II のリン酸化(転写伸長の指標)について免疫染色法を用いて調べたところ、造血幹細胞では前駆細胞に比べてリン酸化の程度が減少していることが分かった。さらに、電子顕微鏡を用いてクロマチン構造を調べたところ、転写抑制の指標と

なるヘテロクロマチン領域が造血幹細胞において増加している傾向が見られた。これらの結果は、当初の予想どおり、造血幹細胞への成熟過程で実際に転写の抑制が起きていることを示している。

(2) ゲノム全体におよぶ転写抑制が起きる際には、細胞径の減少を伴うことがこれまでに報告されている。そこで、造血幹細胞の発生段階における細胞径を調べたところ、前駆細胞から造血幹細胞への成熟過程では、細胞の大きさも小さくなっていることが確認された。また、CD71(transferrin receptor)と CD98 (amino-acid transporter) の発現も減少していた。これらの変化は、造血幹細胞の発生における mTOR シグナルの関与を示唆している。

(3) AGM(Aorta-Gonad-Mesonephros; 大動脈・生殖腺・中腎)領域と同様に、マウス胎仔頭部からも造血幹細胞が発生することが近年報告されている。しかしながら、マウス胎仔のホールマウント免疫染色実験の過程で、頭部領域に造血発生像がほとんど観察されないことに気付いたため、上記報告の妥当性についてさらなる検証を試みた。そして、以下のことを明らかにしている。

胎生 10 日目のマウス頭部では造血幹細胞を産み出す過程である血管内皮-血液転換(Endothelial-Hematopoietic Transition; EHT)を示す像が観察されない。血管内皮-血液転換が頻繁に起きている AGM 領域では、血管内皮-血液転換の途中段階である半球状の細胞が見られるが、頭部では観察されなかった(図 1)。

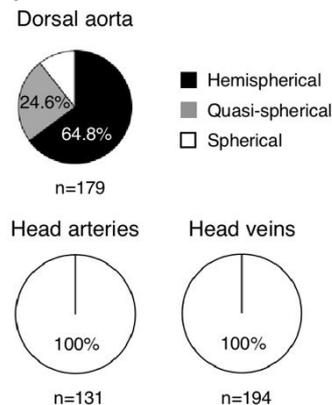


図 1 c-Kit 陽性細胞の形態

転写因子 Runx1 は造血性内皮細胞(Hemogenic endothelium)のマーカーとして知られている。そこで、胎生期頭部血管における Runx1 の発現を Runx1-GFP レポーターマウスを用いて調べたところ、Runx1 陽性の血管内皮細胞は確認できなかった(図 2)。この結果は、頭部においては造血性内皮細胞が存在していないことを示唆している。

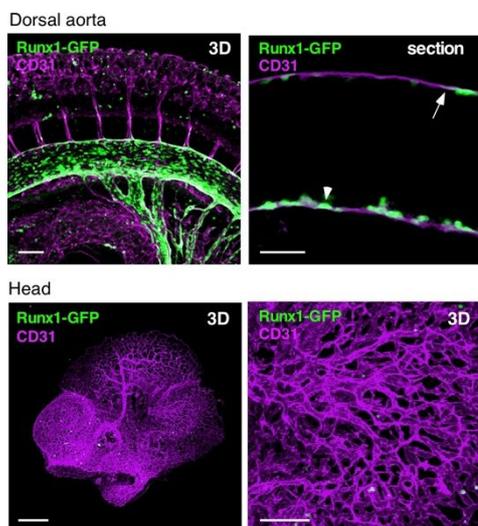


図2 Runx1 陽性血管内皮細胞の分布

マウス胎仔頭部には造血幹細胞、造血前駆細胞が存在しているが、細胞表面マーカーの発現様式等は、血流によって循環している造血幹細胞、造血前駆細胞に類似していた。この結果は、頭部で観察される造血幹細胞、造血前駆細胞は、他の部位から血流によって移動してきたものであることを示唆している。

以上の結果は、マウス胎仔頭部においては血管内皮-血液転換が起こっていないか、起こっていても非常にまれであることを強く示唆しており、AGM 領域の特異性をあらためて浮かび上がらせることとなった。

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 5 件)

Wang CQ, Mok MM, Yokomizo T, Tergaonkar V, Osato M., Runx Family Genes in Tissue Stem Cell Dynamics. *Adv Exp Med Biol* 査読無 962, 117-138 (2017) DOI: 10.1007/978-981-10-3233-2_9.

Kaimakis P., de Pater E., Eich C., Solaimani Kartalaei P., Kauts M.L., Vink C.S, van der Linden R., Jaegle M., Yokomizo T., Meijer D., Dzierzak E. Functional and molecular characterization of mouse Gata2-independent hematopoietic progenitors. *Blood* 査読有 127, 1426-1437 (2016) DOI: 10.1182/blood-2015-10-673749.

Iizuka K., Yokomizo T., Watanabe N., Tanaka Y., Osato M., Takaku T., Komatsu N. Lack of Phenotypical and Morphological

Evidences of Endothelial to Hematopoietic Transition in the Murine Embryonic Head during Hematopoietic Stem Cell Emergence. *PLoS One* 査読有 11(5):e0156427 (2016) DOI: 10.1371/journal.pone.0156427.

Chin D.W., Sakurai M., Nah G.S., Du L., Jacob B., Yokomizo T., Matsumura T., Suda T., Huang G., Fu X.Y., Ito Y., Nakajima H., Osato M. RUNX1 haploinsufficiency results in granulocyte colony-stimulating factor hypersensitivity. *Blood Cancer J.* 査読有 6:e379 (2016) DOI: 10.1038/bcj.2015.105.

Koh C.P., Ng C.E., Nah G.S., Wang C.Q., Tergaonkar V., Matsumura T., Yokomizo T., Suda T., Osato M. Hematopoietic stem cell enhancer: a powerful tool in stem cell biology. *Histol Histopathol.* 査読有 30, 661-672 (2015) DOI: 10.14670/HH-30.661.

〔学会発表〕(計 1 件)

Yokomizo T., Cellular heterogeneity of hematopoietic clusters in the mouse embryo. Hematopoietic stem cell researchers symposium at IMS, 2016年9月9日、東京大学医科学研究所

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横溝 智雅 (YOKOMIZO, Tomomasa)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特定

事業研究員
研究者番号：80590314

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
森 誠一 (MORI, Seiichi)
がん研究会がん研究所・主任研究員
研究者番号：10334814

(4)研究協力者
飯塚 和秀 (IIZUKA, Kazuhide)
順天堂大学・医学部・博士課程大学院生