

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670468

研究課題名(和文) ニッチペプチドによる新規造血幹細胞制御法の開発

研究課題名(英文) Novel methods for regulating the hematopoietic stem cells by niche peptide

研究代表者

杉山 大介 (Sugiyama, Daisuke)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00426652

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)：申請者はマウス胎仔造血幹細胞ニッチである肝芽細胞から、新規生理活性ペプチドを同定した。それらペプチドは幹細胞の増殖を20%抑制する一方で、幹細胞分画を増加させる事から、stemness維持に関わっている事が示唆された。さらに、生理活性ペプチドを、ヒト造血幹細胞の増幅に応用するための培養法等の検討を行い、サイトカイン、ペプチドを添加した動物性成分不含培地で9日間培養する事で、CD34(+)CD38(-)細胞を55倍増幅させる事に成功した。これら造血幹細胞は、短・長期骨髓再構築能、コロニー形成能を保持していた。この事から、これらペプチドは、ヒト造血幹・前駆細胞の増幅に有効であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We determined novel bioactive peptides from mouse embryonic hepatoblast: the niche of hematopoietic stem cells. Those peptides inhibited the proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells and increased the percentage of hematopoietic stem and progenitor cell population, indicating those peptides maintain the stemness. We also established the culturing method of human hematopoietic stem and progenitor cells, and successfully increase CD34(+)CD38(-) hematopoietic stem cells 55-fold by 9 days culture in animal component-free medium with cytokines and the peptides. Those stem cells showed short and long time reconstitution ability. We concluded those peptide are useful for expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells.

研究分野：血液

キーワード：造血幹細胞 ニッチ 低分子

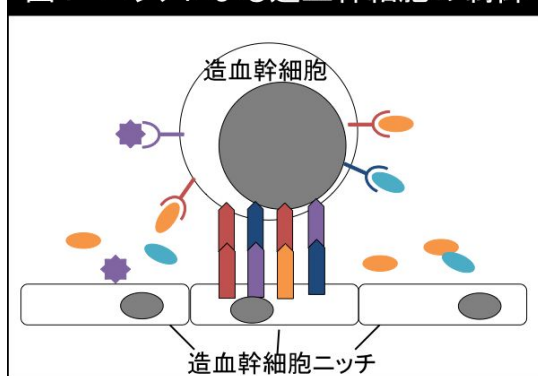
1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、その周りを取り囲む“ニッチ”と呼ばれる微小環境により制御を受けている(図1)。我々は胎生期造血幹細胞のニッチの同定とその制御機構に関する研究過程で、胎児期における造血幹細胞増殖器官である胎児肝臓において、肝細胞の前駆細胞である肝芽細胞がサイトカイン SCF (Stem Cell Factor) 及び細胞外マトリックスを発現し、造血幹細胞の増殖・分化を制御している事を明らかにした。この知見は、肝芽細胞が胎児肝臓における造血幹細胞のニッチであることを示唆している。

また、肝芽細胞において、低分子量のペプチドを加水分解する酵素である Dpp4、Ctsb、Anpep 遺伝子発現が認められる事から、肝芽細胞はこれらのペプチダーゼを介して低分子ペプチドを生成している事が推測された。

そこで、フローサイトメトリー法で純化・採取した肝芽細胞 (Dlk-1 陽性) を、タンパク質分解酵素であるトリプシンで消化し、HPLC 法で解析することにより、低分子ペプチドと考えられるピークを複数確認した。次に、低分子ペプチドを Fraction collector で採取し、凍結乾燥粉末を作製した。これらをフローサイトメトリー法で純化・採取した造血幹細胞へ添加培養して、培養2日後に、細胞周期を司る CyclinD1 遺伝子の発現を検討した。すると、フラクション 1・3・4・5 から得られた低分子ペプチドを添加した群では、コントロール群と比較して CyclinD1 遺伝子発現が 1/10~1/100 抑制されていた。この事から、肝臓芽細胞消化後のフラクションには、造血幹細胞の細胞周期を制御する低分子ペプチドが含まれていると考えられた。

図1 ニッチによる造血幹細胞の制御



2. 研究の目的

造血幹細胞は胎児期の造血器官である、卵黄嚢、AGM 領域、肝臓などを経て脊椎に定着 (ホーミング) することが分かっている。また、それぞれの造血器官において、造血幹細胞を取り囲むニッチは、サイトカインや接触を介して造血幹細胞を誘導し、制御している。それら制御機構を解明することで、造血幹細胞の樹立、維持、増幅方法の確立につながる事が期待される。

我々はこれまでに造血幹細胞を制御する胎生期幹細胞ニッチである肝芽細胞から“低分子ペプチド”を得ている。そこでこれらペプチドの同定と機能解析を行い、造血幹細胞の制御機構を解明するとともに、幹細胞制御法開発へ向けた新規シーズの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝芽細胞からの低分子ペプチド同定

(1)-1. 妊娠 14 日目の C57BL/6N 雌性マウスの腹部より胎齢 14.5 日目の胎仔を取り上げ、顕微鏡下の解剖により肝臓を採取した。一腹分の仔の肝臓を同時にフィルターによりミンスし、さらに 37 のコラゲナーゼ処理で細胞をほぐした後、フローサイトメトリー法により、Dlk-1(+)/CD45(-)/Ter119(-)肝芽細胞集団を純化・採取した。

(1)-2. (1)-1 で純化・採取した肝芽細胞集を、加水分解酵素であるトリプシンを 37 で反応させて消化し、遠心分離することで上清からペプチドの混合物を抽出した。予備実験から、1 匹の胎仔より約 10,000 個の Dlk-1(+)/CD45(-)/Ter119(-)肝芽細胞が採取可能である事が分かったため、約 30 匹のマウス胎仔を集めて酵素消化サンプルを調整した。

(1)-3. (1)-2 で抽出したペプチド混合物を HPLC 法で解析した。

(1)-4. (1)-3 で得られたピークごとにペプチド混合溶液を Fraction collector にて回収し、凍結乾燥機にかけて粉末状にした。

(1)-5. マウス胎齢 14.5 日目の胎仔より肝臓を採取した。フィルターにより細胞をミンスして、PBS による洗浄を行った後に、フローサイトメトリー法により、CD45(+)/c-Kit(+)/Sca-1(+)/造血幹細胞集団を採取した。これら細胞を無血清培地に播種し、凍結乾燥粉末ペプチドを加えて培養した。この際、コントロールとして、不添加群を作成した。

(1)-6. 24 時間後に細胞を回収して、real-time PCR 法で CyclinD1 (細胞周期)、Runx-1・Myb (造血転写因子)、Myc (細胞増殖)、Bcl xl・Mcl-1 (アポトーシス) の遺伝子発現を解析した。

(1)-7. (1)-6 で細胞増殖関連遺伝子に変化の見られたピークを、(1)-1,2 の作業を繰り返すことで再度採取・集積し、LC-MS/MS によりアミノ酸配列の同定を行った。

(1)-8. 同定した 5 種類のペプチドのうち、推定分子量 2,000 以下のペプチドを選抜した。さらにペプチド合成機でペプチドを合成、精製して、(1)-6 と同様の実験を行い、生理活性を確認した。

(2) 低分子ペプチドの発現解析

フローサイトメトリー法で Dlk-1(+)/CD45(-)/Ter119(-)肝芽細胞を純化・採取し、酵素処理をせずに、直接超音波破碎を行った後、HPLC 法で解析した。

(3) 低分子ペプチドの機能解析

妊娠 14 日目の C57BL/6N 雌性マウスの腹部より胎齢 14.5 日目の胎仔を取り上げ、顕微鏡下の解剖により肝臓を採取した。マウス胎齢 14.5 日目肝臓から、Lin(-)CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)造血幹細胞集団をフローサイトメトリー法で純化・採取し、合成した低分子ペプチドを添加して 2-7 日間培養し、フローサイトメトリー法を用いて生存率及び、Ter119、CD71、CD45、c-Kit、Sca-1 の発現解析を行い、増殖・分化の評価を行った。同時にこれら細胞を純化・採取し、mRNA を抽出して、real-time PCR 法で CyclinD1 (細胞周期)、Runx-1・Myb (造血転写因子)、Myc (細胞増殖)、Bcl xl・Mcl-1 (アポトーシス) の遺伝子発現を解析した。

(4) ヒト造血幹細胞培養への応用

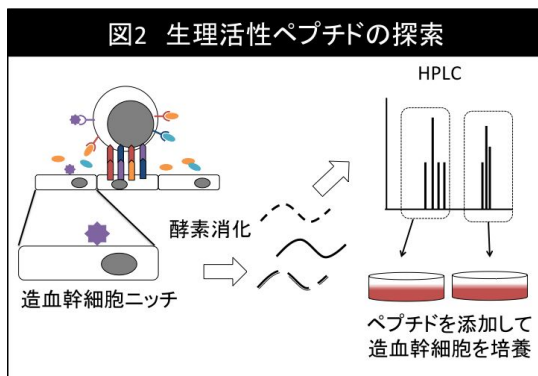
(4)-1. 肝芽細胞から見つけた生理活性ペプチドを用いて、ヒト造血幹・前駆細胞の培養を行う為の条件検討を行った。ヒト臍帯血由来 CD34(+)造血幹・前駆細胞を解凍し、冷 PBS で洗浄後、StemSpan SFEM (Veritas Co., USA)もしくは、StemSpan ACF Veritas Co., USA)に TPO、SCF、IL-6、sIL-6R、Flt3-Ligand、我々がみつけたペプチドを添加して、2-11 日間培養した。

細胞の増幅を見る為に、培養した細胞の一部を回収し、トリパンブルー染色による細胞数のカウントを行った。

(4)-2. 培養したヒト造血幹・前駆細胞を回収して、フローサイトメトリー法を用いて、CD34(+)CD38(-)造血幹細胞の解析を行った。

(4)-3. 培養したヒト造血幹・前駆細胞を回収して、500-1000 cell/ dish となるようにコロニーアッセイ培地に播種し、14 日間培養した後に、コロニー数のカウントを行った。

(4)-4. 培養したヒト造血幹・前駆細胞を免疫不全マウスに尾静脈から移植した。3 ヶ月



後に骨髄より細胞を回収し、フローサイトメトリー法を用いて、ヒト CD45(+)細胞を測定した。

(5) 低分子ペプチドのシグナル解析

(5)-1. (4)-1 と同様にヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹・前駆細胞を 9 日間培養した。培養条件のサンプルを回収して、PBS 洗浄し、

RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出した後に、マイクロアレイ解析を行った。また、Z Score による解析から、ペプチド非添加で培養した際に比べて、ペプチド添加培養した場合に増加もしくは抑制する遺伝子のパスウェイ解析を DAVID (<https://david.ncicrf.gov>)で行った。

(5)-2. 低分子ペプチドをビオチン標識した標識ペプチドを造血細胞へ 24 時間取り込ませた後、抗ビオチン抗体を用いて IP を行った。アクリルアミドゲルによる電気泳動後、銀染色を行い、バンドを切り出して、LC-MS/MS 解析を行った。

(5)-3. MASCOT を用いて(5)-2 で得られたアミノ酸配列をアノテーション後、Score をもとに候補因子を選出した。(4)-1 と同様にヒト造血幹細胞を培養して細胞を回収後、RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出、cDNA に変換して、定量 PCR で validation することで、低分子ペプチドに結合する因子を同定した。

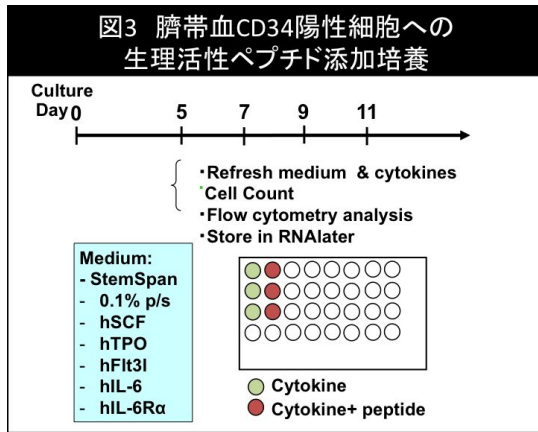
(5)-4. (5)-3 で同定した因子に対する抗体を購入した。ビオチン標識したペプチドを造 CD34(+)血幹・前駆細胞に 24 時間添加して、サイトスピンを行った。購入した抗体で一次染色を行い、蛍光標識ストレプトアビジンと購入した抗体に対する 2 次抗体で染色した。核染色には TOTO3 を使用した。染色後の細胞を共焦点顕微鏡で観察する事で、ペプチドと因子の共局在を検討した。

4. 研究成果

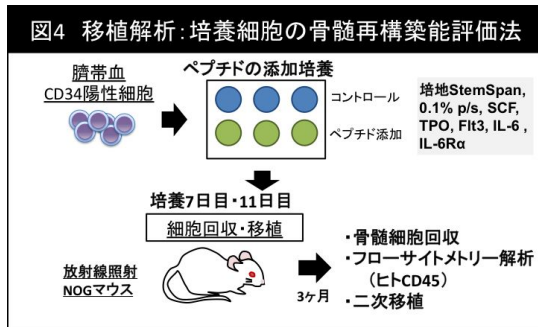
胎齢 14.5 日目のマウス胎仔肝臓より、造血幹細胞ニッチである Dlk-1(+)CD45(-)Ter119(-)肝芽細胞を回収し、酵素処理を行うことで、ペプチド試料を調整した。それら得られたペプチドを LC-MS/MS 解析することで、5 つのピークを得た。それぞれのピークを回収して、凍結乾燥したものを、マウス胎仔肝臓由来造血幹・前駆細胞(CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)細胞)に添加して 4 日間培養したところ、添加していないものに比べて、増殖が抑制された。そこで、そのピークをさらに LC-MS/MS にかけることで、ピークに含まれる 5 種類のペプチドを検出した。そのうちの 2 種類は分子量 2,000 以下の新規低分子ペプチドであることが分かった。さらに、分子量 2,000 以下の低分子ペプチドに注目し、これらを人工合成して、マウス胎仔肝臓造血幹細胞に添加培養したところ、培養 4 日目にペプチド未添加群と比較して、ペプチド添加群で細胞の増殖が約 20%抑制されていた。また、フローサイトメトリーを用いた細胞の細胞表面マーカー解析では、ペプチド未添加群に比べてペプチド添加群で c-Kit(+)造血幹・前駆細胞分画の割合が増加しており、これらのペプチドがマウス造血幹細胞の幹細胞性を維持する活性を持つことが示唆された。

次に生理活性ペプチドを用いて、ヒト造血幹細胞を培養・増殖する方法確立を目指した

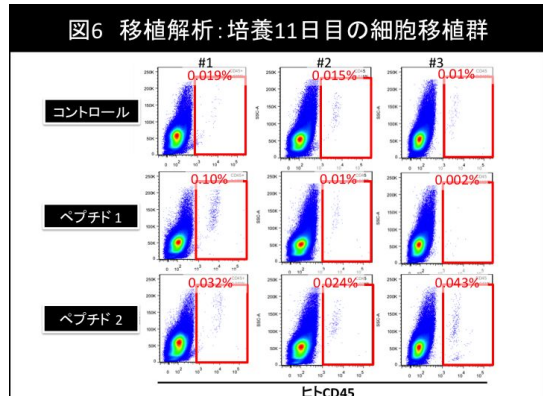
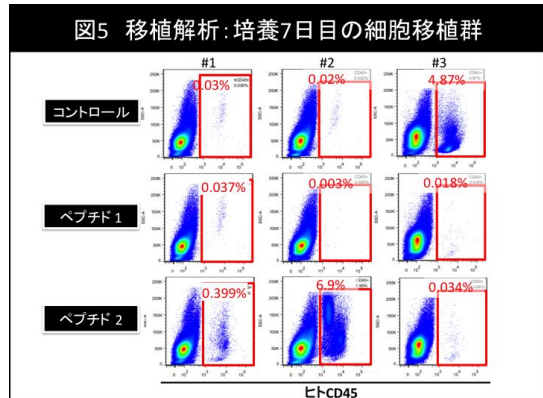
(図3)。StemSpan SFEM にサイトカイン及び、造血幹細胞ニッチである肝芽細胞から見つけた生理活性ペプチドを添加して培養することで、未添加の群と比較してペプチド添加群において、培養 11 日目に生細胞数が優位に増加する事を見いだした。さらに培養 9 日目において CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞数を 70 倍増幅させることも明らかにした。



現在のところ、ひと造血幹細胞の活性を in vivo で検証する為には、免疫不全マウスへの移植とレシピエントマウスの骨髄中に占めるヒト CD45 陽性細胞を調べることが、唯一の方法である。そこで同様に培養したヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹・前駆細胞を培養して、7、11 日目の細胞を回収して免疫不全マウス(NOD/Shi-scid,IL-2R KO)に移植し、3 ヶ月後に骨髄細胞を採取してフローサイトメトリー解析を行った(図4)。



レシピエントマウスの骨髄中に占めるヒト CD45 陽性細胞の割合を求めたところ、培養 7 日目の細胞を移植した場合には、コントロール(ペプチド未添加群)に比べてペプチド 2 添加群においてヒト CD45 陽性細胞の割合が約 13 倍に増加した(コントロール群 0.03%、ペプチド 1 添加群 0.037%、ペプチド 2 添加群 0.399%)。一方、培養 11 日目の細胞を移植したレシピエントにおいては、ヒト CD45 陽性細胞の割合がいずれの条件においても 0.1%以下であった(コントロール群 0.019%、ペプチド 1 添加群 0.1%、ペプチド 2 添加群 0.032%)(図5、6)。また、コロニーアッセイにより、多分化能(幹細胞性)を保持していることが確認された。



さらに、臨床応用を想定して安全性を高めるために、動物由来成分を含まない培地を使用して同様の実験を行い、培養 7、9、11 日の生細胞数、フローサイトメトリーを用いて CD34(+)CD38(-)造血幹・前駆細胞数を解析することで、至適培養日数を検討した。すると、培養 9 日目に造血幹・前駆細胞増殖のピークを迎え、培養 11 日目には造血幹・前駆細胞が減少することが分かった。また、培養 9 日目において CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞数を 55 倍増幅させることに成功している。

次に、生理活性ペプチドによるヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹・前駆細胞の増幅・制御機構を調べた。生理活性ペプチドと共に培養した臍帯血由来造血幹・前駆細胞をマイクロアレイ解析したところ、ペプチド非添加で培養した場合と比較してペプチド添加した場合に 5 倍以上発現が上昇する遺伝子群として、神経系、細胞外マトリックス、シナプス様細胞接合因子などがあげられた。また、発現が 1/5 以下に抑制される遺伝子群としては、免疫系、細胞増殖、プリン塩基結合因子があげられた。

さらに、生理活性ペプチドの標的分子を同定するため、ビオチン標識したペプチドを造血細胞へ 24 時間取り込ませた後、抗ビオチン抗体を用いて IP を行った。得られた結合タンパク質を LC-MS/MS 後に MASCOT を用いてアノテーションする事で結合タンパク質の候補を得た。そのうち、すでに造血に関わる事が知られているもの、細胞基質を除く事で、造血幹細胞制御に関わる新規因子候補を 5 種類得た。また、これら候補因子に対する抗体を購入し、ビオチン標識したペプチド

ドとの共局在を共焦点顕微鏡で証明した。現在、これら因子の機能解析を推進している。

以上をまとめると、我々はマウス胎仔造血幹細胞ニッチである肝芽細胞から、新規生理活性ペプチドを同定した。それらペプチドは、造血幹・前駆細胞の増殖を20%抑制する一方で、c-Kit(+)造血幹・前駆細胞分画を増加させる事から、造血幹細胞のstemness維持に関わっている事が示唆された。さらに、同様に肝芽細胞から見いだした生理活性ペプチドを、ヒト造血幹細胞の増幅に応用するための培養法等の検討を行い、動物性成分不含有培地にサイトカイン、ペプチドを添加した条件で9日間培養する事で、CD34(+)CD38(-)造血幹・前駆細胞を55倍増幅させる事に成功した。これら造血幹細胞は、短・長期骨髓再構築能、コロニー形成能を保持していた。この事から、我々が見いだしたペプチドは、臍帯血由来ヒト造血幹・前駆細胞の増幅に有効であると考えられた。現在、これらペプチドの分子メカニズム解明にむけた研究を推進している。

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 1 件)

Yumine A, Fraser TS, Sugiyama D. Regulation of the embryonic erythropoietic niche: a future perspective. Blood Research, 査読有り, 52巻, 2017, 10-17.

〔学会発表〕(計 件)

〔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

<http://jisedai.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 大介 (SUGIYAMA Daisuke)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：00426652

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()