

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670471

研究課題名(和文)造血幹細胞の対称性分裂制御子の機能解析と細胞分裂操作への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of symmetric division-related molecules in the regulation of self-renewal of hematopoietic stem cells

研究代表者

新井 文用(ARAI, FUMIO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90365403

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)：造血幹細胞数は対称・非対称分裂のバランスにより制御されている。我々は、Aniopoietin-1 (Angpt1)が幹細胞の娘細胞間の対称性遺伝子発現を誘導し、自己複製分裂を増加させることを見出した。そこで、Angpt1によって対称性発現が誘導されるBmi1について、自己複製分裂の誘導に対する機能解析を行っている。また、Angpt1が造血幹細胞の自己複製を選択的に誘導するか解析したところ、その作用は自己複製分裂の確率の増加であることを明らかにした。さらに、造血幹細胞の分裂による老化に対するAngpt1の機能を解析したところ、Angpt1は老化に対して抑制的な作用があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The number of hematopoietic stem cells (HSCs) is controlled by the balance of the asymmetric/symmetric divisions. We have identified that niche factor Angpt1 increases the symmetric gene expression in paired daughter cells (PDCs) and induces self-renewal division of HSCs. To clarify the function of Angpt1 in the regulation of self-renewal division, we are investigating the function of Bmi1 that is induced symmetric expression between daughter cell pairs by Angpt1 in the regulation of self-renewal of HSCs.

In this study, we also analyzed whether Angpt1 could induce the deterministic HSC self-renewal. We identified that Angpt1-induced self-renewal fitted to the stochastic model in which individual divisions were not closely regulated, regulation was exerted at the level of probabilities. We also analyzed the effect of Angpt1 on cell division induced HSC aging. We found that the culture induced age-related phenotype in PDCs and Angpt1 prevented the cell division induced aging of HSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞 自己複製 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を持ち、生涯にわたり、造血の恒常性を維持している。幹細胞プールの維持には、幹細胞の対称・非対称分裂のバランスが重要な働きを持つ。すなわち、幹細胞(stem: S)を2個生み出すS-S対称分裂によって幹細胞数が増加し、幹細胞と前駆細胞(progenitor: P)を1個ずつ生み出すS-P非対称分裂により幹細胞数と前駆細胞数が維持される。また、前駆細胞を2個生み出すP-P対称分裂を行う場合、幹細胞は枯渇する(図1)。

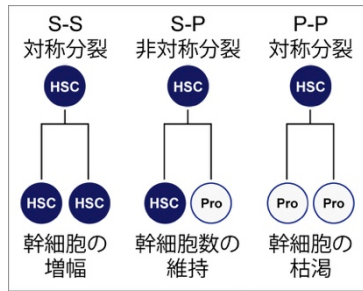


図1. 幹細胞の細胞分裂パターン

この細胞分裂のバランス制御には、細胞内在性因子の機能に加え、周囲の微小環境(ニッチ)からのシグナルが重要な役割を果たしていると考えられる。

我々は、造血幹細胞の維持に対するニッチの機能に関して研究を行い、Tie2受容体陽性の造血幹細胞が細胞周期の静止した静止期幹細胞であり、ニッチ細胞から産生されるAngiopoietin-1 (Angpt1)とTie2のシグナルが造血幹細胞の未分化性維持に重要な働きをしていることを明らかにした(Arai et al. Cell 2004)。

また、造血幹細胞の細胞分裂によって生じる1組の娘細胞ペア(paired daughter cell: PDC)について、シングルセル遺伝子発現解析を行い、各娘細胞が幹細胞としての性質を維持するのか、それとも分化して前駆細胞となったのかを機械学習モデル(support vector machine: SVM)による解析で判定することで、造血幹細胞の細胞分裂パターン(S-S, S-P, P-P分裂)を分類する手法(PDC-SVM解析)を確立した(図2)。

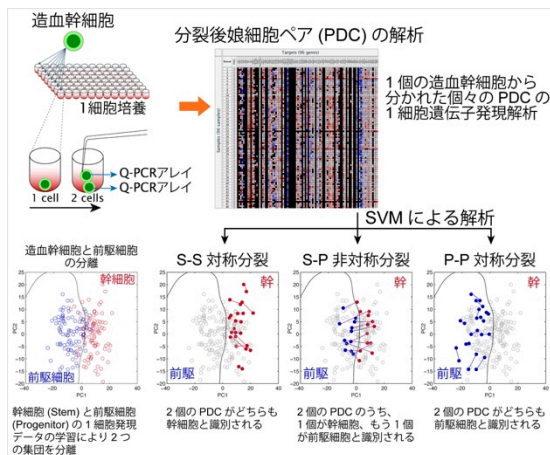


図2. 造血幹細胞の分裂パターン解析 (PDC-SVM 解析)

そこで、造血幹細胞の細胞分裂に対するニッチ分子Angpt1の作用を検討したところ、Angpt1は造血幹細胞の維持に重要な転写因子のPDC間での対称性発現を誘導した。さらに、造血幹細胞のS-S分裂を増加させるとともに、P-P分裂を抑制することで、*in vitro*で造血幹細胞数を維持する働きを持つことが明らかになった(図3)。

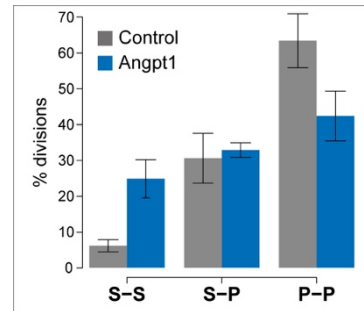


図3. 成体(8週齢)マウス造血幹細胞の細胞分裂に対するAngpt1の作用  
ControlではP-P分裂の頻度が高いのに対し、Angpt1はP-P分裂を抑制し、S-S分裂の頻度を増加させた。

加えて、骨芽細胞特異的Angpt1トランスジェニックマウスにおいて、造血幹細胞数の増加を確認した。

これらの結果から、Angpt1刺激によりPDC間での対称性発現が誘導される遺伝子(PDC対称性発現分子)が、造血幹細胞の自己複製分裂の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

2. 研究の目的

Angpt1は造血幹細胞の対称性の自己複製分裂を誘導することにより、幹細胞プールの維持に働くと考えられる。

本研究では、Angpt1により誘導されるPDC対称性発現分子の細胞分裂の制御における機能を明らかにする。さらに、PDC対称性発現分子の機能を応用して造血幹細胞の体外増幅を目指す。また、Angpt1が選択的に対称性自己複製分裂(S-S対称分裂)を誘導するのかを明らかにする。

本研究は、造血幹細胞の自己複製分裂を規定する分子機構を明らかにするものであり、その成果は、幹細胞の細胞分裂の制御技術の確立に繋がると考えられる。特に、幹細胞の体外増幅による新規移植法の確立への応用が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、造血幹細胞のシングルセル培養を行い、幹細胞から生じたPDCについて、定量PCRアレイを用いてシングルセル遺伝子発現解析を行った。さらに、個々の娘細胞の遺伝子発現プロファイルを機械学習モデルによって解析することで、細胞分裂様式を、S-S対称分裂、S-P非対称分裂、P-P対称分裂に分類した。このアッセイ系により、造血幹細胞の細胞分裂制御におけるAngpt1の機能を解析している。

#### (1)PDC対称性発現分子の細胞膜透過性タンパク作製と機能解析

Angpt1によって誘導されるPDC対称性発現分子の中からBmi1に着目し、細胞膜透過性タンパク(MTMタンパク)を作製し、造血幹細胞にBmi1を導入して、自己複製分裂の誘導について検討を試みている。

MTM(membrane translocating motif)は、細胞へのタンパクの取込みを促進することが報告されている。我々はこれまでに、テロメアの1本鎖DNAに特異的に結合するPot1aのMTMタンパク(MTM-Pot1a)を作製し、造血幹細胞の維持に対する機能解析を行っている。MTM-Pot1aの造血幹細胞への導入効率を検討したところ、培養後、2時間以内に90%以上の造血幹細胞に取り込まれ、最低でも96時間以上安定して細胞内に存在することを確認している。この結果から、MTMタンパクを用いることで、造血幹細胞に効率よくBmi1を導入する事ができると期待される。

#### (2)Bmi1過剰発現マウス造血幹細胞の細胞分裂解析

上記(1)の実験と併行して、Bmi1を過剰発現するノックイン(Bmi1-KI)マウス(千葉大学岩間教授より供与)を用いた細胞分裂解析を行っている。Bmi1-KIマウスをVav1-Creマウスと交配することにより、造血幹細胞でBmi1を過剰発現させた後、シングルセル培養を行い、細胞分裂によって生まれたPDCについて、遺伝子発現解析および機械学習モデルによる分裂パターンの分類を行い、自己複製分裂に対する作用を検討している。

#### (3)造血幹細胞分裂のstochasticityの解析

Angpt1が造血幹細胞のS-S対称分裂を選択的に誘導するのか、それとも確率論的(stochastic)にS-S対称分裂を誘導するのかを解析した。そのため、実際の実験で得られた細胞分裂パターンと娘細胞のペアをランダムに組み換えたnullモデル(ランダムペア)の細胞分裂パターンの比較を行った。

#### (4)Angpt1による細胞分裂制御と老化の関連性の解析

細胞分裂解析における造血幹細胞と前駆細胞の識別に加え、細胞分裂による造血幹細胞の加齢変化を解析するために、SVMによる解析に代えて、機械学習モデルの1つである人工ニューロンネットワーク(artificial neural network: ANN)をデータ解析に取り入れた。本研究では、幼若マウス(4週齢)、成体マウス(8週齢)、および老化マウス(1.5年齢)の造血幹細胞と前駆細胞のシングルセル遺伝子発現プロファイルをトレーニングデータとしてANNに学習させ、細胞分裂後の娘細胞が各週齢の幹細胞、前駆細胞のどの細胞集団の性質を持つのかを判別し、細胞分裂による老化の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)MTM-Bmi1タンパク作製と機能解析

Angpt1により誘導される対称性発現分子の同定を進め、幼若マウス(4週齢)の造血幹細胞から得られたPDCサンプルの遺伝子発現から、Ctnd1, Bmi1, Numb, Npm2, Gata1, Pbx1, Notch1, Cdkn1a, Fbxw7, Cdkn1b, Foxo4, Cdkn2a, Hes1, Bcl2, Itga2b, Slamf1がAngpt1の刺激により、対称性に発現することを明らかにしている。これまでに、4週齢の造血幹細胞が高頻度にS-S分裂を行うことを見出していることから、これらのPDC対称性発現分子は造血幹細胞の対称性自己複製分裂の誘導に関わっていると考えられた。ただし、これらの分子の中で、Itga2b、Gata1は前駆細胞レベルで発現するため、候補から除いた。本研究では、造血幹細胞の自己複製を誘導することが知られているBmi1に注目し、MTM-Bmi1タンパクを作製と、これを用いたPDC-SVM解析を進めている。Bmi1を導入する事により、造血幹細胞の自己複製分裂が誘導されることが考えられる。

### (2)Bmi1過剰発現マウスを用いた細胞分裂解析

MTM-Bmi1を用いた造血幹細胞の分裂解析と併行して、Bmi1-KIマウスを用い、Vav-Creマウスと交配することにより、造血幹細胞でBmi1を強制発現させ、細胞分裂アッセイを行っている。これまでに、Bmi1-KIマウスにおいて、造血幹細胞がex vivoで増幅できること、さらに骨髄再構築能が亢進することが報告されていることから(Nakamura et al. PLoS One 2012)、Bmi1の過剰発現によって、造血幹細胞の自己複製分裂の頻度が増加していると考えられる。今後、上記(1)の研究結果と併せて、Bmi1がS-S対称分裂を誘導するか明らかにしたい。また、下記(3)の解析を行うことにより、Bmi1によって造血幹細胞の自己複製を選択的に誘導できるのか明らかにしたい。

### (3)造血幹細胞の自己複製分裂のstochasticityの解析

造血幹細胞の自己複製と分化の選択は、細胞外からの刺激によって指示されるのではなく、細胞内因子の働きによって確率論的に決まるとされてきた(stochastic model)。そこで、Angpt1による自己複製の増加が確率論的プロセスに従うのか、それともより選択的に行われるのかを検討した。成体(8週齢)マウスの造血幹細胞について、SVMによる解析データによって明らかになった細胞分裂パターンと娘細胞のペアをランダムに組み換えたnullモデルの細胞分裂パターンの比較を行った。その結果、実験によって得られた分裂パターンとnullモデルの分裂パターンの間には有意差が見られなかったことから(図4)、Angpt1によるS-S対称分裂の誘導は、確率(probability)の増加によるものであることが明らかとなった。

た。また、この結果は、Angpt1の単独刺激は、造血幹細胞の自己複製を選択的に誘導するには不十分であることを示唆するものであると考えられる。そこで、これまでに同定しているBmi1などのPDC対称性発現分子を直接的に造血幹細胞に導入することにより、対称性自己複製分裂を選択的に誘導できるか確認することが重要であると考えられた。

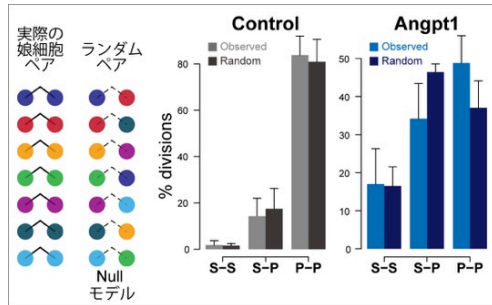


図4. 造血幹細胞分裂の Stochasticity  
娘細胞のペアをランダムに組み換えた Null model の分裂パターン (Random ペア) と実際に得られた分裂パターン (Observed ペア) の比較を行ったところ、両者に有意差が見られなかったことから、Angpt1 による S-S 分裂の誘導は確率 (probability) の増加であることが分かった。

#### (4) 造血幹細胞の分裂と老化の関連性

SVMによる造血幹細胞の分裂パターンの解析に代えて、ANNを用いて細胞分裂パターンの解析を行った。ANNに4週齢 (young: Y)、8週齢 (adult: A)、1.5年齢 (old: O) の造血幹細胞、前駆細胞のシングルセル遺伝子発現プロファイルを学習させることにより、細胞分裂後の娘細胞ペアの分裂パターンを成体幹細胞-成体幹細胞 (A-A)、成体幹細胞-老化幹細胞 (A-O)、老化幹細胞-老化幹細胞 (O-O)、幼若幹細胞-成体幹細胞 (Y-A)、幼若幹細胞-老化幹細胞 (Y-O)、幼若幹細胞-幼若幹細胞 (Y-Y) の6種類に分離し、細胞分裂による加齢変化を評価するアッセイ系を構築した。この系を用いて、8週齢のマウス造血幹細胞の老化に対するAngpt1の作用を検討したところ、コントロール、およびAngpt1を添加した培養条件のいずれにおいても、A-A分裂の頻度が高かったが、1回の分裂後にA-O分裂、O-O分裂を示すPDCが見られたことから、造血幹細胞は細胞分裂により、一定の割合で造血幹細胞が老化することが示唆された。また、Angpt1はコントロールと比較して、A-O分裂の頻度を低下させ、また、わずかではあるが、Y-O分裂およびY-Y分裂の頻度を上げ

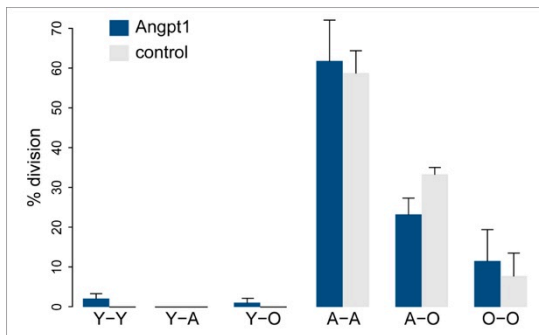


図5. 細胞分裂による造血幹細胞の老化  
4週齢 (young: Y)、8週齢 (adult: A)、1.5年齢 (old: O) の造血幹細胞、前駆細胞の遺伝子発現プロファイルを用いて ANN に学習させることにより、細胞分裂後の娘細胞ペアの老化 (A-A, A-O, O-O, Y-A, Y-O, Y-Y) の6種類の分裂パターンを評価した。

ることから、老化に対して抑制的な作用があると考えられた (図5)。

#### (5) 今後の展望、課題

造血幹細胞の体外増幅には、対称性の自己複製分裂を増加させつつ、老化を抑制する方法を確立することが重要であると考えられる。そこで、PDC対称性発現分子の機能解析については、MTM-Bmi1、およびBmi1-KIマウスを用いた細胞分裂解析を進める際に、幹細胞・前駆細胞の識別による自己複製と分化の解析に加え、ANNを用いた老化解析も行う。さらに、nullモデルとの比較により、S-S自己複製分裂を選択的に誘導できるか検討する。これによってBmi1が①自己複製分裂を誘導できるか、さらに、②造血幹細胞の老化を抑制できるかを明らかにすることができると考えられる。

また、これまでの解析結果から、Angpt1の自己複製分裂の制御における作用がS-S対称分裂の確率の増加であることが明らかとなったため、Bmi1単独では、選択的な対称性自己複製分裂の誘導 (決定論的プロセスに従う自己複製の誘導) には不十分である可能性も考えられる。そのため、Bmi1以外のPDC対称性発現分子についても検討を進め、造血幹細胞の効率の良い体外増幅の達成を目指す。

#### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 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. *Stem Cells*. 33 (2): 479-490, 2015. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Fumio Arai. Pot1 maintains hematopoietic stem cell activity under stress. Japan Society for the Promotion of Science and National University of Singapore joint symposium. 2016年1月15日. シンガポール国立大学内 Center for Translational Medicine (Singapore)

2. Fumio Arai. Introduction of hematopoietic stem cell niche. ISEH, 44th Annual Scientific Meeting. 2015年9月17日. 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

3. 新井文用. Protection of telomeres 1a による造血幹細胞の自己複製の制御. 第14回日本再生医療学会. 2015年3月21日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

4. Fumio Arai. Role of Pot1 in the

regulation of hematopoietic stem cell activity. 2015 US-Japan Meeting on Malignant Hematopoiesis and Stem cells. 2015年3月17日. Waikoloa, HI (USA).

5. Fumio Arai. Regulation of hematopoietic stem cell activity during aging. 3rd Cancer Stem Cell Symposium. 2014年11月22日. ホテル日航福岡(福岡県・福岡市)

6. 新井文用. The niche factor Angiopoietin-1 regulates stem and progenitor cell numbers by controlling hematopoietic stem cell division asymmetry. 第12回幹細胞シンポジウム. 2014年5月30日. 九州大学 百年講堂(福岡県・福岡市)

[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]

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新井 文用 (ARAI, Fumio)

九州大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：90365403

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

##### (4) 研究協力者

Ben D. MacArthur

英国、サウサンプトン大学