

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713035

研究課題名(和文) 巨核球による造血幹細胞運命制御の解明

研究課題名(英文) Megakaryocytes determine the cell fate of hematopoietic stem cells

研究代表者

石津 綾子(Nakamura-Ishizu, Ayako)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員准教授

研究者番号：10548548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：恒常的な血球産生には骨髄において造血幹細胞の維持・増殖・分化は不可欠である。当研究は成熟血球である巨核球に焦点を当て、巨核球のニッチとしての作用及び造血幹細胞からの巨核球の分化の解明を目的としている。巨核球が造血幹細胞を制御していることを報告した。また、巨核球による造血幹細胞制御が巨核球上の膜タンパクであるCLEC2により制御されていることを報告した。さらに、CLEC2のリガンドであるPodoplaninの骨髄内機能、また、巨核球ニッチが造血幹細胞において、特異的な血球系統への分化を促しているかどうか、とくにThrombopoietinの造血幹細胞への作用を検証し、報告する予定である。

研究成果の概要(英文)：The maintenance, proliferation and differentiation of hematopoietic stem cell (HSC) within the bone marrow (BM) microenvironment is essential for healthy hematopoiesis. In this project we have investigated the role of mature megakaryocytes in regulating hematopoietic stem cells in the BM. We have characterized CLEC2 expressing Megakaryocytes as potent niche cells and have reported their function in maintaining HSCs in quiescence. We are further preparing to report the effect of CLEC2 receptor podoplanin in BM hematopoiesis and the role of the cytokine, Thrombopoietin in determining HSC cell fate.

研究分野：実験血液学

キーワード：造血幹細胞 巨核球 分化 ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

一生涯にわたって血液細胞を産生し続けるためには、造血の場である骨髄ニッチ(造血微小環境)で、造血幹細胞が適切に維持・増殖・分化されることが必須である。造血維持には最も未分化な造血幹細胞の細胞周期を静止期に保つ必要がある。造血幹細胞は内因性の制御とともに、特殊な微細環境、骨髄ニッチにより未分化性を制御されている。これまで骨髄ニッチは骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞を中心に、骨髄における非血球細胞から構成されると考えられてきた(Hoggatt et al. *JCI* 2013)が、申請者は非血球系のニッチ細胞ではなく、成熟血球である巨核球に着目し、巨核球の造血幹細胞ニッチ機構の可能性を研究してきた。骨髄中の巨核球をマウス抗体投与ないし巨核球のアポトーシスを誘導できる *PF4-Cre: Mos-iCsp* マウスにて巨核球を特異的に死滅させると最も幼弱な未分化造血幹細胞の数の著しい減少を認め、骨髄中の造血幹細胞数の維持には巨核球が必要と考えた。つまり、成熟血球が骨髄ニッチの一員としてフィードバック調節を行うという、巨核球ニッチの新概念を提示した。

## 2. 研究の目的

骨髄における造血幹細胞の維持・増殖・分化は恒常的な血球産生に不可欠である。造血幹細胞は特殊な微細環境である骨髄ニッチによって制御されている。申請者はこれまでの研究にて、骨髄中の成熟巨核球が骨髄ニッチとして機能し、骨髄における成熟血球が造血幹細胞に直接フィードバックし制御することを提唱してきた。本研究は、これまでの研究をさらに深堀し、生理的及び病的状態で**成熟巨核球が造血幹細胞に及ぼす影響及びその機構**を解明していく。先駆する研究にて、巨核球に発現する CLEC2 タンパクを特異的に欠損させたマウスの骨髄造血幹細胞機能の低下を認めた。そこで、CLEC2 発現が巨核球のニッチ作用として重要な分子であると仮説し、CLEC2 の機能を詳細に解析していく。また、CLEC2 が結合するポドプランニンにも焦点をあて、その骨髄内での発現より、巨核球が他のニッチ細胞とどのように関連し、骨髄造血幹細胞の維持にかかわっているかを解析していく。

## 3. 研究の方法

本研究は遺伝子欠損マウスの形態学的、分子生物学的解析を中心に巨核球独自のプ

ログラムが造血幹細胞の系統分化に果たす役割について解析する。研究目的の分子遺伝学的な証明のため CLEC-2 及び podoplanin 細胞特異的欠損マウスを複製・飼育し、詳細な造血解析と免疫染色、flow cytometry 及び PCR によりタンパク、遺伝子レベルでの解析を行う。CLEC2 遺伝子欠損マウスとしては CLEC2Floxed マウスを巨核球特異的遺伝子欠損を起こす PF4Cre マウスと交配し、検討する。Podoplanin Floxed マウスは骨髄間葉系細胞特異的遺伝子欠損マウス(LepR-Cre, Osx-Cre)あるいは、誘発型 Cre マウス(Rosa-CreERT) マウスと交配し造血異常を検証する。また、podoplanin レポーターマウス(LacZ)を作成し、定常状態での podoplanin の骨髄内発現を完済する。また、Microarray 解析、RNA sequence や薬剤スクリーニングにて網羅的に遺伝子・転写因子の発現を解析する。造血幹細胞の機能解析としては、Flow Cytometry により造血幹細胞を分離し、生体外にて培養しその機能の変化を観察する。また、分離した造血幹細胞の細胞周期状態の解析を行う。成体内の機能解析としては、分離した骨髄造血幹細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植し、競合的骨髄移植から幹細胞能を評価する。巨核球の機能評価として、末梢血血小板数の測定、骨髄巨核球の分化解析(巨核球前駆細胞の測定、免疫染色、Flow cytometry)、生体外での巨核球コロニー形成能などを検証する。

これらの解析より、CLEC2 及び Podoplanin の巨核球分化、造血幹細胞維持及びニッチ機能を解明していく。

## 4. 研究成果

巨核球上に発現する膜タンパクの CLEC-2 を巨核球特異的に欠損させたマウス(*PF4 Cre:Clec2 floxed/floxed (Clec2<sup>MgkΔ/Δ</sup>)*)の骨髄造血を解析したところ、未分化造血幹細胞の静止状態が損なわれ、移植実験において幹細胞の長期造血再構築能が著明に低下することを認めた。*Clec2<sup>MgkΔ/Δ</sup>* マウスでは巨核球のニッチ細胞としての機能異常を認め、著しい血小板減少を認めた。興味深いことに巨核球の分化を刺激するとともに、造血幹細胞の未分化性の維持に関わるサイトカイン、Thrombopoietin (TPO)の遺伝子及びタンパク発現が CLEC-2 欠損巨核球で著しく低下していた。*Clec2<sup>MgkΔ/Δ</sup>* マウスでは血中及び骨髄中の TPO 濃度の低下を認めた。*Clec2<sup>MgkΔ/Δ</sup>* マウスに TPO を投与したところ、静止期造血幹細胞の数が増加し、造血幹細胞の静止期の維持は CLEC-2 による TPO 分泌に依存していることが示唆された。つまり、CLEC-2 依存性に TPO は産生され、造血幹細胞の分化誘導、及び、静

止期維持に寄与していることを提唱した (Nakamura-Ishizu et. al., JEM, 2015)。この結果により、CLEC2 が TPO 産生を介して、骨髄造血幹細胞を維持する重要なニッチ因子の一つであることを報告した。

さらに、CLEC-2 の受容体である Podoplanin に焦点を当て、骨髄における Podoplanin の発現、作用を解析した。具体的にはポドプランインのレポーターマウスを解析した結果、Podoplanin は骨近傍及び骨髄内の間葉系幹細胞に発現していることを認めた。よって、細胞特異的 Podoplanin 欠損マウス (podoplanin-Floxed mouse X LepR-Cre (間葉系幹細胞で遺伝子欠損) ないし Osx-Cre (骨芽細胞で遺伝子欠損)) を作成し、間葉系幹細胞、および骨芽細胞にて Podoplanin を欠損させたマウスの解析をおこなった。しかし、これらマウスの造血幹細胞及び血小板、巨核球分画には優位な異常を認めなかった。また、末梢血血小板数も異常を認めなかった。そのため、血小板 CLEC-2 による TPO の制御機構には Podoplanin 以外の受容体、シグナルがかかわっている可能性があり、これらを今後とも検証する予定である。

CLEC2 遺伝子欠損マウスの解析を行う中、ニッチ因子である TPO の重要性を再確認した。これまでの研究にて、骨髄ニッチ因子である Thrombopoietin が造血幹細胞の維持に重要であることはいくつも報告されている。しかしながら、骨髄造血幹細胞を解析するにあたり、造血幹細胞及び非常に未熟な巨核球前駆細胞が多くの表面マーカーや発現分子を共有し、細胞の区別が非常に難しいということを確認した。事実、Thrombopoietin は造血幹細胞に直接影響し、維持するとともに、造血において、巨核球・血小板分化にも必須の因子である。そこで、TPO の造血幹細胞の分化傾向、特に未熟な巨核球前駆細胞の発生への関与も解析した。Thrombopoietin は造血幹細胞の自己複製能をたかめるよりも早期に巨核球分化を促進させることを確認した。また、単一細胞の RNA シークエンス解析にて、TPO 投与により、造血幹細胞のミトコンドリア関連遺伝子の発現が増加することを認めた。実際、造血幹細胞の細胞内ミトコンドリア活性を測定したところ、TPO 投与にて優位に増加を認めた。これらのことから、TPO によるミトコンドリア代謝活性の制御が造血幹細胞の巨核球分化に重要であると考えられる。これらの結果を現在報告すべく、論文を準備中である。

##### 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 3 件)

- (1) Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med*. 2015 Nov 16;212(12):2133-46. (corresponding author)(査読あり)
- (2) Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development*. 2014 Dec;141(24):4656-66. (corresponding author)(査読あり)
- (3) Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Nov 14;454(2):353-7. (corresponding author)(査読あり)

(学会発表)(計 5 件)

- (1) ISEH 46<sup>th</sup> annual meeting, Poster presentation, Selected Abstract, Frankfurt, Germany August 24-27th 2017 Ayako Nakamura-Ishizu (発表者), Takayoshi Matsumura, A'Qilah Banu Bte Abdul Majeed, Terumasa Umemoto, Toshio Suda "Thrombopoietin-mediated exit from quiescence involves metabolic priming of hematopoietic stem cells for rapid megakaryocyte lineage differentiation"
- (2) ISEH 45<sup>th</sup> annual meeting, Poster presentation, Selected Abstract, San Diego, USA August 25-28th. 2016 Ayako Nakamura-Ishizu (発表者), Takayoshi Matsumura, A'Qilah Banu Bte Abdul

Majeed, Terumasa Umemoto , Toshio Suda  
“Rapid and direct megakaryocyte-lineage differentiation from HSCs hallmark hematopoietic system response to stress”

- (3) **JSPS-NUS Joint Symposium**, Invited speaker, NUS Singapore, January 14-15th. 2016 Ayako Nakamura-Ishizu (発表者), Takayoshi Matsumura, A'Qilah Banu Bte Abdul Majeed, Terumasa Umemoto , Toshio Suda

“Cytokine networks regulate the emergence of megakaryocyte-biased hematopoietic stem cells”

- (4) **ISEH 44<sup>th</sup> annual meeting**, Oral presentation, Selected Abstract, Kyoto Japan Sepember 17-19th 2015 Ayako Nakamura-Ishizu (発表者), Toshio Suda  
“CLEC-2 signaling is crucial for the production of thrombopoietin in the megakaryocyte niche”

- (5) **120<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists**, Invited speaker, Kobe March 21-23th, 2015 Ayako Nakamura-Ishizu (発表者), Toshio Suda  
“The function of platelet factor CLEC-2 in the hematopoietic stem cell niche”

{図書}(計 件)

該当なし

{産業財産権}

該当なし

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)

該当なし

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

石津 綾子(Nakamura-Ishizu, Ayako)

研究者番号:10548548

熊本大学・国際先端医学

研究機構・客員准教授

(2)研究分担者

該当なし

(4) 連携研究者

該当なし

(5)研究協力者

該当なし