

造血幹細胞の不均等分裂の制御による幹細胞増幅

慶應義塾大学 医学部 発生・分化生物学

新井 文用

1. はじめに

生体の幹細胞は自己複製能と多分可能をもち組織・臓器の恒常性維持に極めて重要な働きをしている。この組織幹細胞の機能は、幹細胞周囲の微小環境、すなわちニッチからの刺激により制御されている。造血幹細胞のニッチとしては、骨芽細胞性ニッチと血管性ニッチが幹細胞制御に関わっていることが示されており¹⁾、造血幹細胞はこれらのニッチと相互作用することにより、自己複製と分化のバランスを保っていると考えられる。しかしながら、定常的に細胞が更新する造血系において、幹細胞の自己複製と分化の振り分けがいかんして制御されているのかは不明な点が多い。また、ニッチからの外的シグナルが造血幹細胞の分裂制御にいかん関わっているのかを明らかにすることも重要な課題となっている。

組織幹細胞はその細胞分裂に際し、2 個の幹細胞あるいは分化した細胞（前駆細胞）を生み出す対称に分裂をおこなうか、非対称に分裂して幹細胞と分化した細胞を生み出している。本研究では、造血幹細胞の自己複製と分化の振り分けは、対称・非対称分裂によって調節されると考え、1 個の造血幹細胞から生じた 2 個の娘細胞（paired daughter cell: PDC）について、単一細胞レベルでその遺伝子発現を解析することで、細胞分裂様式を規定している分子機構を明らかにすることを目的とした。また、骨芽細胞性ニッチにおける造血幹細胞の制御機構、ニッチ分子に着目し、造血幹細胞の細対称分裂と非対称等分裂に対するニッチ分子の機能を明らかにすることを目的に研究を進めた。この細胞分裂機構を操作することが可能となれば、幹細胞を試験管内増幅に応用できると期待できる。

2. 方法

造血幹細胞は組織幹細胞の中で最も解析の進んだものの 1 つであるが、高度に純化され、一見均一に見える幹細胞であっても、個々の幹細胞は動的でその遺伝子発現はバリエーションに富んでいる²⁾。そのため、細胞集団を対称とした解析ではデータが平均化され、個々の造血幹細胞の特性の差を評価することは出来ない³⁾。こうした状況から、造血幹細胞の分裂様式を検討・評価する上では、従来のように造血幹細胞を細胞集団としてではなく、単一細胞レベルで解析する必要があり、集積流体回路技術（IFC：Integrated Fluidic Circuit）を応用した Single Cell 定量 RT-PCR アレイ⁴⁾により、遺伝子発現を指標として造血幹細胞や PDC の性質を解析した。

PDC の分離に関しては、LSK-CD48⁻ CD150⁺造血幹細胞を無血清培地中で Kit1 と THPO 存在下で培養し、2 日後に 1 個の幹細胞が 2 個に分裂したものについて、娘細胞それぞれをマイクロマニピュレーターを用いて採取し、single cell 定量 PCR アレイを行った。

3. 結果 研究成果

Single cell レベルでの RT-PCR アレイを用いた遺伝子発現解析系の確立に関しては、細胞を 1 個ずつソーティングし、① オリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した後、cDNA を TaqMan Gene Expression Assay Mix を用いて増幅 (18 cycle の PCR 反応) する方法、および、② 100 種類の TaqMan Gene Expression Assay Mix の混合液を用いて cDNA 合成と cDNA 増幅 (18 cycle の PCR 反応) を行う系について検討した。LSK、LSK-CD34⁻ および LSK-CD34⁺細胞 1, 10, 100 個を用いておこなった RT-PCR アレイの結果、①の方法よりも②の方法の方が効率良く定量 PCR 反応を行うことができ、1 細胞からであっても、効率良くシグナルを検出することが可能であった。そこで PDC を用いた遺伝子発現解析では、②の方法を用いて single cell 定量遺伝子発現解析を進めることとした。

まず Lineage⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK)-CD48⁻ CD150⁺細胞から生じた 47 組の PDC について、86 遺伝子について single cell 定量 PCR アレイを行った。その結果、1 個の親細胞から分かれた 2 個の娘細胞で遺伝子発現にばらつき (asymmetry) が見られることが明らかとなった。統計学的・数学的解析を行い、Unsupervised clustering 解析の結果、p16Ink4a、Ccne1、Ccne2、Ccng2、Cdkn1a、Fbxw7、Foxo1、Foxo4、Tek、Cxcr4、Epcr、Slamf1、Hoxb4、Pbx1、Tert、Notch1、Numb、Bcl2、Lnk、Itga2b、Csf3r、Vwf、Kdr の 23 遺伝子については、発現している細胞としていない細胞が混在することがわかった。また、PDC 間で遺伝子発現レベルを比較した結果、各 pair 間で発現レベルの異なる (娘細胞 A では発現しているが娘細胞 B では発現していない) 遺伝子は、clustering 解析で同定された遺伝子群とオーバーラップすることがわかり、p16Ink4a、Ccne1、Ccne2、Ccng2、Cdkn1a、Fbxw7、Foxo1、Foxo4、Tek、Cxcr4、Epcr、Slamf1、Hoxb4、Pbx1、Tert、Notch1、Numb、Bcl2、Lnk、Itga2b、Csf3r の 21 遺伝子が非対称に発現する遺伝子 (asymmetry gene) の候補と考えられた。

さらに、5-フルオロウラシル (5-FU) 投与による骨髄抑制から回復期 (5-FU 投与 8 日目) にある造血幹細胞においては遺伝子発現の対称性が増える傾向にあることが確認できた。

次に、実験に用いる親幹細胞をさらに均一なものとするため、LSK-CD48⁻ CD150⁺、LSK-CD48⁺CD150⁺ および LSK-CD48⁺CD150⁻細胞について single cell 定量 PCR アレイを行い幹細胞の指標となるマーカー遺伝子を検索したところ、Evi1 が LSK-CD48⁻ CD150⁺細胞に特異的に発現することを見いだした。そこで、Evi1-GFP レポーターマウスを導入し、このマウスから LSK-CD41⁻CD48⁻ CD150⁺CD34⁺Evi1-GFP^{high}を分離して single cell 定量 PCR アレイにて遺伝子発現を検討した。その結果、LSK-CD41⁻CD48⁻ CD150⁺CD34⁺Evi1-GFP^{high}細胞は遺伝子発現の高い均一性を示すことがわかった。

4. 考察 まとめ

本研究では、Single Cell 定量 RT-PCR アレイを用いることにより、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析が可能となった。現在までに統計学的解析が終了した LSK-CD48⁻ CD150⁺細胞のデータから、p16Ink4a、Ccne1、Ccne2、Ccng2、Cdkn1a、Fbxw7、Foxo1、Foxo4、Tek、Cxcr4、Epcr、Slamf1、Hoxb4、Pbx1、Tert、Notch1、Numb、Bcl2、Lnk、Itga2b、Csf3r の 21 種類の asymmetry gene の候補が同定されている。その中には、細胞の非対称分裂に関わることが知られている Notch1 や Numb が含まれることから、本実験系は当初の期待通り、造血幹細胞の非対称分裂を解析できているものと考えられた。

また、Cdkn1a、Fbxw7、Foxo1、Foxo4、Tek、Cxcr4 など造血幹細胞の細胞周期の静止状態維持に関

わる遺伝子であることから、造血幹細胞の非対称分裂の制御と細胞周期制御に密接な関係があることが考えられた。

さらに、Tek、Cxcr4、Epcr、Notch1 は造血幹細胞とニッチの相互作用に重要な役割を果たしていることが知られている。このことから、Tie2/Angiopoietin-1⁵⁾、Cxcr4/Cxcl12⁶⁾、Epcr/activated protein C (APC) / protease-activated receptor-1 (Par1)⁷⁾、Notch/Notch リガンド⁸⁾ などニッチ分子のシグナルが造血幹細胞の非対称分裂に際し、造血幹細胞を残すことに重要な役割をしていると考えられた。

LSK-CD48⁻ CD150⁺細胞は遺伝子発現の面では、ばらつきが見られる。一方、Evi1-GFP レポーターマウスから分離した LSK-CD41⁻CD48⁻ CD150⁺CD34⁺Evi1-GFP^{high} 細胞は遺伝子発現の高い均一性を示す。このことから、今後は LSK-CD41⁻CD48⁻ CD150⁺CD34⁺Evi1-GFP^{high} 細胞を親細胞として PDC 解析を行う必要があると考えられた。また、上記の Tie2/Angiopoietin-1、Cxcr4/Cxcl12、Epcr/activated protein C (APC) / protease-activated receptor-1 (Par1)、Notch/Notch リガンドなどのシグナルに注目し、培養条件にこれらのサイトカインを加えた際の PDC の対称・非対称分裂の変化を検討することは興味深く、今後の実験として進めていく必要があると考えられた。

5. 参考文献

- 1) Morrison, S. J. & A. C. Spradling: Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132: 598-611, 2008.
- 2) Wilson, A., et al.: Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135: 1118-1129, 2008.
- 3) Stahlberg, A. & M. Bengtsson: Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods* 50: 282-288, 2010.
- 4) Nakamura, Y., et al.: Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood* 116: 1422-1432, 2010.
- 5) Arai, F., et al.: Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118: 149-161, 2004.
- 6) Sugiyama, T., et al.: Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988, 2006.
- 7) Iwasaki, H., et al.: Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood* 116: 544-553, 2010.
- 8) Calvi, L. M., et al.: Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841-846, 2003.