

造血幹細胞の非対称分裂と Midbody の動態

東京大学医科学研究所細胞療法分野

田中 洋介

1. 目的

幹細胞は対称分裂・非対称分裂することで、幹細胞プールを維持しているが、分裂と多能性維持との詳細な関連性は明らかではない。細胞分裂の際の2個の娘細胞をつなぐ構造物であるmidbody（中央体）は、いずれかの娘細胞に継承または放出される。継承される細胞分裂では、結果として非対称分裂ということになる。Midbodyは幹細胞では放出されやすい、放出した細胞は分化する傾向があるとの報告がある（文献1）。このmidbodyのマーカーであるMgcRacGAPをレポーターとして用いることで、midbodyを継承した娘細胞と放出した娘細胞とを識別することが可能である（文献2）。したがって、このMgcRacGAPレポーターを利用することで、幹細胞の非対称分裂をライブイメージングできるようになることが期待される。そこで、造血幹細胞をモデルとして、まず娘細胞におけるmidbodyのあるなしによる分化能の違いを明らかにし、in vivoにおいて造血幹細胞がどのように対称・非対称分裂しているのかをライブイメージングすることを目指す。また、造血器腫瘍モデルにおいてmidbodyの継承・放出に異常が認められるかどうかを検討し、治療応用も視野に入れた研究を行なう。

2. 方法

幹細胞の非対称分裂とmidbodyの非対称分配との関連性の有無を造血幹細胞の非対称分裂をモデルとして検証する。造血幹細胞が対称・非対称分裂する際の娘細胞のmidbodyのあるなしによる分化能の違いとの関連性、骨髄ニッチとの関連性についてin vitroとin vivoで検証を進める。具体的には、

- ① 造血幹細胞・前駆細胞特異的にMgcRacGAP-hmKu02融合タンパクを発現するマウスを作製し、そこから集めた造血幹細胞、あるいは野生型マウス骨髄より採取した造血幹細胞にレトロウイルスベクターを用いてMgcRacGAP-hmKu02を遺伝子導入したものを多能性維持培地と分化培地とで培養しmidbodyの維持・放出の割合を比較することで、造血幹細胞・前駆細胞の非対称分裂におけるmidbodyの動態と娘細胞の分化について検証する。
- ② 造血幹細胞の細胞分裂をライブイメージングできる培養系の構築。まず、細胞の動きをある程度抑えることを目的として、ガラス底培養ディッシュを用いて、メチルセルロース培地またはOP9ストローマ細胞の上で造血幹細胞を培養し、ライブイメージングできるかを検証する。同時に蛍光色素の検証も行なう。
- ③ ②で選定した培養条件で造血幹細胞のPaired daughter cell (PDC) assay、娘細胞のシングルセルRNA-Seq解析を行い、対称・非対称分裂それぞれにおけるmidbodyの有無の違いによる娘細胞の多能性維持因子の発現の違いを比較解析し、さらに1回の細胞分裂で分化した娘細胞のマーカーになる因子をみつける。
- ④ マウス造血幹細胞あるいはヒト臍帯血由来造血幹細胞/前駆細胞を用いて、正常造血細胞と白血化細胞(MLL-AF9の過剰発現によるAML)との細胞分裂時におけるmidbodyの継承・放出の違いを比較する。両者に違いが検出できれば、その違いを検証するプロジェクトを新たに立ち上げ、造血器腫瘍幹細胞をin vivoで特定するための知見を深める研究を行なう。
- ⑤ In vitroでのライブイメージングに続いて、2光子励起顕微鏡を用いた骨内のライブイメージングを大阪大学免疫細胞生物学教室（石井優教授）との共同研究で行い、骨髄ニッチにおける造血幹細胞の非対称分裂並びにmidbodyの維持・放出の割合を検証する。

3. 結果

- ① Rosa26遺伝子座にLoxP-Neo-STOP-LoxPカセットとともにMgcRacGap-hmKu02をノックインしたマウス（R26R-MRG-hmKu02マウス）を作製した。これにより、細胞種特異的Creマウスとかけ合わせることで、細胞種特異的にMRG-hmKu02融合タンパクを発現させることが可能になった。当初、使用予定であった造血幹細胞・前駆細胞特異的にCreを発現するeR1-Cre（文献3）マウスは、期待したほど造血幹細胞・前駆細胞に特異性が高くなかったため使用を断念した。代わりに血液細胞特異的にCreを発現するVav1-Creマウスとかけ合わせた後に、蛍光抗体染色により造血

幹細胞・前駆細胞を識別する方法をとることにした。現在、R26R-MRG-hmKu02マウスとVav1-Creとのかけ合わせを行っている。R26R-MRG-hmKu02マウスの作製中に、野生型マウスから採取した造血幹細胞にレトロウイルスベクターを用いてMRG-hmKu02を遺伝子導入し、造血幹細胞におけるMRG-hmKu02融合タンパクの動態を観察した。観察条件は後述するが、in vitroの培養下において、造血幹細胞はNIH3T3細胞株に比べて高頻度にmidbodyを放出することが明らかとなった。また、造血幹細胞の分化マーカーであるCD48の発現を調べると、midbodyを継承しなかった細胞は継承した細胞と比べて培養後48時間以内にCD48陽性になる割合が高いことが明らかになった。

- ② 造血幹細胞の細胞分裂をライブイメージングできる系を構築した。具体的には、ノンコーティング96ウェルU底プレートに造血幹細胞をシングルセルソーティングし、細胞がU底の底に安定した後にタイムラプスライブイメージングを行う。ニコン社製のTi顕微鏡をベースに、東海ヒット社製の培養チャンバーを使用することにより、1つの造血幹細胞を増殖速度にもよるがライブセルイメージング可能である。他に同じニコン社製のBiostation IM顕微鏡をベースにして、系の構築を試したが、造血幹細胞の移動範囲を平底で限定することは不可能であり、断念した。なお、造血幹細胞タイムラプスライブセルイメージング用の培地としてステムセルテクノロジー社のStemSpan培地を選定した。
- ③ タイムラプスライブセルイメージングにおける造血幹細胞の分化を蛍光標識された抗CD48抗体を培養系に添加することでイメージング出来ることを明らかにした。PDC解析については、R26R-MRG-hmKu02とVav-Creとをもつマウスから採取した造血幹細胞を用いて行う予定である。
- ④ MLL-AF9白血病細胞株にレトロウイルスによりMRG-hmKu02を導入し、白血病細胞株におけるMidbodyの継承・放出を観察した結果、造血幹細胞と同じく、高頻度にMidbodyを放出することが明らかになった。
- ⑤ R26R-MRG-hmKu02とVav-Creとをもつマウスが完成した後、MRG-hmKu02の蛍光が2光子励起顕微鏡下で観察できるかを検討する予定である。

4. 考察 まとめ

R26R-MRG-hmKu02マウスの作製に時間がかかってしまったため、全体的に研究に遅れが生じてしまったが、研究期間を通して以下の研究結果を得た。

- 1) 1個の造血幹細胞の細胞分裂とその後の増殖とをタイムラプスライブセルイメージングできる系を開発した。
- 2) 蛍光標識された抗CD48抗体を1)の培養系に添加しておくことで、造血幹細胞の分化をタイムラプスライブセルイメージングできる系を開発した。
- 3) バックアップとして行っていたレトロウイルス感染によりMRG-hmKu02を導入した野生型造血幹細胞を使ったタイムラプスライブセルイメージングにより、「細胞分裂後、非対称・対称分裂に関わらずMidbodyを継承しない娘細胞が継承した娘細胞よりも早く分化する。」ということを示唆した。
- 4) MLL-AF9白血病細胞株では高頻度にMidbodyを放出することが明らかになったが、細胞分裂の際にMidbodyの分配が確認できないケースもあることから、Midbodyの放出以外の現象が起こっている可能性が示唆された。

1)のイメージング系の構築により造血幹細胞の1回目の細胞分裂を観察することができるようになったので、MRG-hmKu02マウス作製後に行う予定であるPDC解析を行う準備が整った。2)の結果は、文献1の結果と一致しているが、レトロウイルス感染の期間をはさむため、感染の間に造血幹細胞が前駆細胞に分化してしまっている可能性を否定できない。したがって、同様の実験をMRG-hmKu02マウスから採取した造血幹細胞で再試する必要がある。タイムラプスライブセルイメージングにおける造血幹細胞の分化を蛍光標識された抗CD48抗体を培養系に添加することでイメージングできることは、PDC解析を行う際に有用であると期待される。4)の結果は造血幹細胞と白血病細胞との細胞分裂の違いがあることを示唆している可能があり、将来的に治療薬のターゲットになりうることも期待できる。

5. 発表論文、参考文献

1. Ettinger AW, Wilsch-Bräuninger M, Marzese AM, Bickle M, Lohmann A, Maliga Z, Karbanová J, Corbeil D, Hyman AA, Huttner WB. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun.* 2011 Oct 18;2:503.
2. Nishimura K, Oki T, Kitaura J, Kuninaka S, Saya H, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Kitamura T. APC (CDH1) targets MgcRacGAP for destruction in the late M phase. *PLoS One.* 2013 May 16;8(5):e63001.
3. Koh CP, Ng CE, Nah GS, Wang CQ, Tergaonkar V, Matsumura T, Yokomizo T, Suda T, Osato M. Hematopoietic stem cell enhancer: a powerful tool in stem cell biology. *Histol Histopathol.* 2015 Jun;30(6):661-72.