

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:造血幹細胞の自己複製を誘導する生態学適所の解明

### 2 研究者氏名:高倉 伸幸

研究員:山田 賢裕 (研究期間 H.15.2~H.16.3)

研究員:岡本 里香 (研究期間 H.17.4~H.17.8)

### 3 研究のねらい:

我々は造血幹細胞の試験管内での増幅法の確立を最終的な目標に据え、造血幹細胞の自己複製能、未分化性維持機構といういわゆる幹細胞性がいかなる分子メカニズムにより制御されているのかを解析することを研究の目的とした。手段としては、1)未分化造血幹細胞に特異的に発現する分子の中でも、DNA複製の開始に関与する分子の探索、2)造血幹細胞に発現し、造血幹細胞の接着性や未分化性維持に機能することを証明してきた造血幹細胞上のレセプター型チロシンキナーゼ TIE2 の活性化により制御される網羅的遺伝子探索である。本研究では1)、2)の解析により得られた遺伝子の単なる機能解析にとどまらず、これら遺伝子の機能解析を通して、幹細胞生物学における幹細胞制御のあたらしい概念を導き出すことをねらいとして研究を遂行してきた。また、近年再生医療に対する社会的な注目が集まる中、胚性幹細胞などを用いた細胞治療は期待通りには発展してきていない。これは、これら細胞を用いた際の倫理的、免疫抵抗性の問題がクリアされてきていないことに起因する。そこで、本研究では自己のもつ再生能力という観点から、脂肪組織の幹細胞による細胞分化誘導技術の開発を合わせて行ない、再生医療に対する新しい提言を行なうことも研究のねらいの一つとした。

### 4 研究成果:

#### 1)造血幹細胞の DNA 複製に関与する遺伝子マウス PSF1 の機能解析

造血幹細胞の自己複製に関わる新規分子を発見するために、未分化造血幹細胞と成熟した血液細胞のサブトラクションから E11 と名付けた新規核内分子を単離し、本分子が酵母において DNA 複製の開始に重要とされてきた Psf1 のほ乳類相同遺伝子であることが判明した。本遺伝子の機能を解析するため、PSF1 ノックアウトマウスを作成したところ、造血の生じる前の胎生6日前後において全能性幹細胞群である内部細胞塊の増殖停止により致死となり、このマウスにおける PSF1 遺伝子が未分化細胞における細胞増殖に必須の役割を果たすことが示された(Mol. Cell. Biol. In press)。しかし、本ノックアウトマウスは造血幹細胞の発生前に致死となるために造血幹細胞における本分子の機能を判定することができなかった。そこで PSF1<sup>+/+</sup>成体マウスを用い 5-FU

による骨髄破壊後の骨髄再建能を解析したところ、野生型マウスでは 5-FU 投与後6日目には骨髄機能が回復し生存したが、PSF1+/-マウスは骨髄機能の回復が遅れ、5-FU 投与後 7 日目には全て致死となった。正常マウス由来の造血幹細胞を放射線照射した PSF1+/-マウスに移植後、同量の 5-FUを投与した際には骨髄の再建はすみやかに生じることから、PSF1+/-の骨髄環境が造血幹細胞の増殖支持能に与える影響は否定された。よって PSF1 そのものが、造血幹細胞の増殖にとって重要であることが証明された。詳細な検討結果 PSF1+/-マウス由来の造血幹細胞は 5-FU 投与後の急速な造血幹細胞増殖期において、S/G2/M 期へのエントリーが遅延するために骨髄再建能に遅延が生じることが判明した。よって、PSF1 は造血幹細胞の増殖機構に関わることが示唆された (Reviewed in Nature, preparation for resubmission)。

これまでの解析では酵母と同様に、マウス PSF1 は SLD5 と結合することが、two-hybrid 法を用いて明らかとなり (paper in submission)、さらに最近その他 PSF2、PSF3とも結合して4量体を形成することが判明した (図1)。興味深いのは、1)この PSF1 分子群は酵母では DNA 複製フォークの形成時に必須の役割を果たしており、進化的に考えれば哺乳動物の全ての細胞増殖に関っているいわゆる細胞増殖の普遍的分子と考えられる、しかし、本分子はマウスの発生初期ほぼ全ての細胞が増殖期にある際にも、ある一定の幹細胞群にしか発現していないことと、さらに成体でも、造血幹細胞や皮膚の基底層に存在する表皮幹細胞や精巣や卵巣の生殖幹細胞にしか発現が認められない点、2)そして本分子は染色体分配にも関与していることである (paper in preparation)。このことは、PSF1 が哺乳動物ではある特定の幹細胞の DNA 複製と染色体分配という G1/S/M 期に全般に細胞分裂を制御している可能性があるといえ、特定の幹細胞レベルのみに DNA 複製に関するという分子はこれまで知られておらず、幹細胞性における新しい機能解析につながる可能性がある。実際、静止期の造血幹細胞では PSF1 の発現が非常に弱くしか発現が認められないのに対し、増殖期の幹細胞には発現が強いことから、いかなるシグナルがこの PSF1 の発現を制御するのかに興味を持たれる。そこで、我々は現在 PSF1 や SLD5 の上流領域についての解析を行ない、それぞれ 5Kb 上流域のプロモーターを単離し、これらのプロモーターに EGFP を連結した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成中である。これらのマウスからソーティングした造血幹細胞を用い、細胞分裂、なかでも自己複製のメカニズムを解析すべく、外来性シグナルによる PSF1 遺伝子の発現制御機構につき詳細にする計画である。

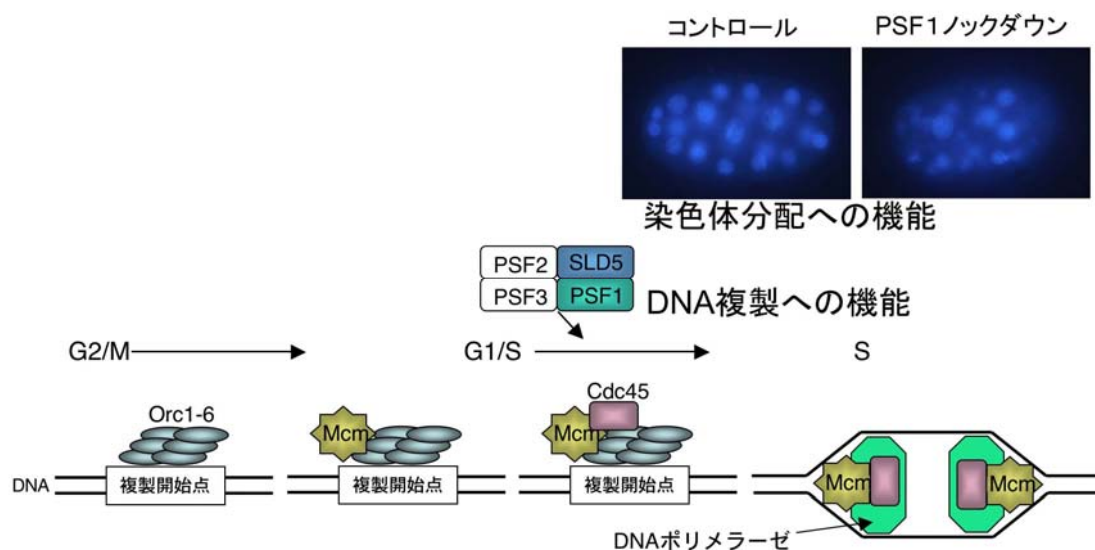


図1: 酵母における PSF1 の機能は DNA ポリメラーゼの DNA 複製フォークへの動員に必須とされる CDC45 と会合して DNA 複製に関ることが解明されてきているが、ほ乳類ではまだその機能が明らかではない。我々は PSF1 が DNA 複製に関るだけでなく、染色体の分配にも関与することを突き止めた。上の写真は *C.elegans* を用い PSF1 のノックダウンによって観察される染色体分配の異常像。

## 2) 造血幹細胞の幹細胞性に関わる基盤分子 TIE2 の機能解析

従来我々が造血幹細胞の発生に必須であることを報告してきた造血幹細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、TIE2 は、造血幹細胞の分化により発現が消失する。造血幹細胞の骨髓内におけるニッチ(生態学適所)では、造血幹細胞は骨梁領域の骨芽細胞と接着して未分化な状態が維持されていると考えられてきた。また、このニッチでは骨芽細胞が分泌するアンジオポエチン-1 が造血幹細胞上の TIE2 を活性化することで、造血幹細胞と骨芽細胞の接着が誘導され、幹細胞のニッチ領域への棲息および未分化性の維持がなされているのではないかと示唆されてきた。成体の骨髓では多くの造血幹細胞は静止期にあるのに対し、胎児では造血幹細胞が対数的増殖傾向を示す。そこで、上記 TIE2 の機能を証明するために、胎児期において造血幹細胞上の TIE2 を恒常的に活性化させることで、造血幹細胞の増殖が抑制されるかどうかを解析する計画を立てた。まず TIE2 の細胞膜貫通領域直下に点突然変異を挿入し、恒常的活性型 TIE2 を構築し、本遺伝子を TIE2 制御下に発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを Cre-LoxP システムにより作成した。本マウスは胎生12日目までに血管新生の抑制と貧血により致死となったが、予想したように、造血幹細胞の発生は認められたがその分化および増殖が抑制されていた(図2)。このことから、成体骨髓における骨芽細胞ニッチにおいては TIE2 の活性化により造血幹細胞の分裂を抑制することで、造血幹細胞の休眠状態を誘導していることが証明された(paper in

submission)。

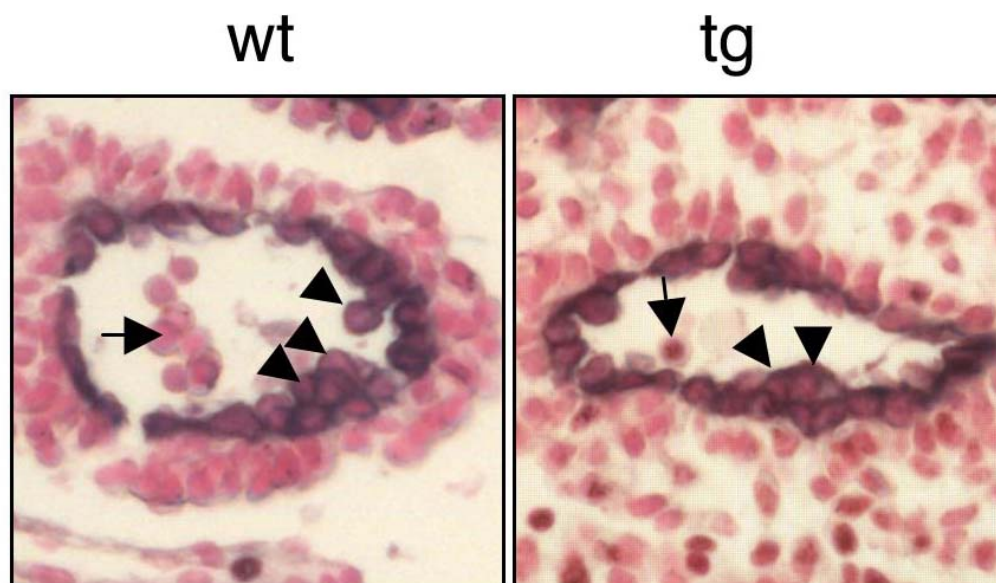


図2:造血幹細胞上の TIE2 が恒常的に活性化するコンディショナルトランスジェニックマウスにおける造血幹細胞の増殖・分化。写真は造血幹細胞の発生増殖現場である胎生 9.5 日目の脾臓間膜動脈を CD34 抗体で染色したもの。wt(野生型)、tg(トランスジェニックマウス)。Tg では造血幹細胞の増殖が抑制され(矢頭)、またその分化も抑制されているのが分かる(矢印)。

### 3)造血幹細胞の接着、細胞死抑制に関与する候補遺伝子、galectin-3 の機能解析

上記2)の結果より、造血幹細胞の幹細胞性(未分化性維持、ニッチ構成細胞への細胞接着)に関わる分子が、造血幹細胞上に発現する TIE2 の活性化により制御されていることが証明された。そこで B リンパ球前駆細胞株 Ba/F3 に恒常的活性型 TIE2 を発現させ、親株の Ba/F3 細胞との subtractive cloning 法にて発現の上昇する分子に注目して遺伝子の単離を行った。複数の遺伝子が単離されたが、その発現量の差が極めて著しい galectin-3(carbohydrate lectin-3)に関して検討を行い、本分子を Ba/F3 細胞に遺伝子導入したところ、恒常的活性型 TIE2 を導入した際と同様に、細胞死の抑制および細胞接着による細胞塊の形成が観察された。galectin-3 は従来の報告から、インテグリンを結束させて細胞接着を促進し、Bcl-2 と会合して細胞周期・細胞死抑制に関与することが報告されている。我々の解析では galectin-3 は骨芽細胞ニッチ領域の造血幹細胞に発現することから、actin-LoxP-CAT-polyA-LoxP-galectin-3-polyA のトランスジーンを発現するマウスを作製し(現在1ライン作製、最終的に3ラインを作製予定)、本マウスと TIE2 制御下に Cre を発現するマウスとかけ合わせ造血幹細胞特異的に galectin-3 を過剰発現させることによる幹細胞性に与える影響を解析した。その結果、galectin-3 を過剰に発現ようになった造血幹細胞の低酸素条件における細胞死の抑制が観察された(paper in preparation)。ニッチの領域は

血管領域から離れており、低酸素状態になっていることが予想される。このような低酸素抵抗性に造血幹細胞が細胞死から回避するために galectin-3 の機能が利用されていることが予想された。

#### 4) 幹細胞の可塑性、多分化能を利用した再生医療への応用

脂肪組織は骨髄と同様、非常に緻密な血管網の構築がなされており骨髄環境と類似する。また脂肪組織に存在するある特定の細胞系譜は、血管内皮細胞や骨格筋細胞や神経細胞などへの分化能を有することから、骨髄の幹細胞コンポーネントと同様、幹細胞の多分可能性を利用した再生医療への応用が期待できるのではないかと考えられた。そこで脂肪組織を試験管内で維持させる培養系の構築を開始したところ、意外なことに我々の培養系では脂肪組織から非常に豊富に、拍動する心筋細胞が分化することが判明した。これら心筋細胞は  $\alpha$ -sarcomeric protein など心筋特異的な細胞骨格分子や GATA4、Nkx2.5 など転写因子を発現しており、これら培養した心筋細胞が実際、心筋梗塞モデルラットの心臓へ生着し、心筋虚血を改善させることが可能であることが判明した (paper in submission)。しかも興味深いことに本脂肪組織の培養中に  $2\mu\text{m}$  の有孔フィルターにて隔離して骨髄細胞を培養すると、骨髄細胞も心筋細胞に分化することが判明した。この系を用いた、心筋細胞の分化誘導系に関しては、心再生医療に貢献すると考えられ本 JST および金沢大学 TLO からの特許出願をしていただいた (paper in preparation)。本心筋細胞の分化培養系では、興味深いことに脂肪組織を試験管内で培養後、2、3日の間に骨髄細胞を共培養しないと、骨髄細胞の心筋細胞化が誘導できないことである。実際には生体内では脂肪組織中には心筋細胞は存在せず、また脂肪組織で心筋細胞が発生しているとは考えられず、個体から試験管内に細胞を展開した際に一過性に脂肪組織から分泌される何らかの分子が、骨髄や脂肪組織の幹細胞レベルの細胞を心筋細胞に分化させているものと考えられる。細胞融合により幹細胞の可塑性説が否定されつつある中、我々の実験系では細胞融合は完全に否定できており、この実験データに立脚し、『なぜ脂肪組織内では自発的に心筋の分化が生じないのか』について、幹細胞の可塑性を抑制するシステムの存在、そして成体から組織が切り離された際に、瞬時に反応する心筋細胞誘導因子の分泌制御について今後検討を進めていく予定である。

#### 5 自己評価:

恒常的活性型 TIE2 の造血幹細胞における発現により、造血幹細胞の分化・自己複製が抑制されたことから、従来示唆されてきた、骨髄における骨芽細胞由来のアンジオポエチン-1が幹細胞の休眠状態を誘導するという仮説を実証できた。このことから TIE2 が生態学適所における造血幹細胞の自己複製を制御する重要な分子であることを証明できた。また、この TIE2 により制御される遺伝子の網羅的解析から、galectin-3 が低酸素抵抗性に幹細胞の細胞死を抑制する実行的分子であることが判明してきた。また幹細胞の自己複製を DNA 複製という細胞周期の基本機序

において機能する PSF1 が、TIE2 の活性化により負に制御されていることが明らかになりつつある。これらの解析により、これまで明確にされてこなかった、ニッチにおける幹細胞性維持機構の解明に対して、分子論的に幹細胞の“自己複製”のメカニズムを明らかにすることを可能にしたのではないかと考えられる。3年間の研究期間では、まだ造血幹細胞の増殖を試験管内で誘導できる完全な培養システムの構築には至らなかったが、いかにすれば造血幹細胞を増幅できるか、分化させないまま維持できるかについてのいくつかのヒントが、幹細胞のニッチの解析から明らかになったと考えられる。3年間の研究期間で、新規に始めたプロジェクトであったため、受理された論文数は少ないが、この研究から発生した新しい分子機序について現在多くの論文の投稿に至っており、成果としては上げられたと自己評価する。

#### 6 研究総括の見解:

取りあげたテーマは単に造血組織のみにかかわるものではなく、幹細胞生物学の根幹にかかわるものである。3年間という短い期間において波及効果の高い成果をあげ得たことは、高く評価される。また、再生医療に対する寄与においても新しい可能性を開拓したと云ってよいであろう。

#### 7 主な論文等:

##### 論文

1. Ueno M., Itoh M., Kong L., Sugihara K., Asano M., and Takakura N. *PSF1* is essential for Early Embryogenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* In press
2. Yamada Y., and Takakura N. Physiological Pathway of Differentiation of Hematopoietic Stem Cell Population Into Mural Cells. (in submission)
3. Okamoto R., Naruse T., Ueno M., Suda T., Takakura N. Silencing of Hematopoiesis and Angiogenesis by the Constitutive Activation of Tie2 (in submission)
4. Yamada Y., Wang X.-D., Yokoyama S., Fukuda N., Takakura N. Regeneration of infarcted myocardium by adipose tissue derived cells (in submission)
5. Kong L., Ueno M., Itoh M., Yoshioka K., and Takakura N. Identification and Characterization of Mouse PSF1 Binding Protein, SLD5 (in submission)

現在受理1件、その他投稿中5件、投稿準備中2件

##### 特許:

1. 発明人: 高倉 伸幸(80%)、山田賢裕(20%)

発明の名称: 脂肪組織を用いた心筋細胞の作製技術とその応用

機構整理番号 K052P14(K05208US(PCT))

特願 2004-429088:PCT/JP2004/17778

出願人:金沢大学 TLO (80%)

独立行政法人科学技術振興機構 (20%)

出願日:平成 16 年 12 月 25 日

招待講演:(2 件)

1. 高倉伸幸 リンクする血管の発生・再生と造血

基礎研究報告会(JST 主催)、2003 年 9 月 1 日

2. 高倉伸幸 再生医療への応用をめざした臓器特異的幹細胞の増殖培養法

新技術説明会(JST 主催)、2004 年 8 月 5 日