

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790912

研究課題名（和文）発生最初期の骨髓球／リンパ球共通前駆細胞の解析

研究課題名（英文） Characterization of the earliest hematolymphoid progenitors that emerge during mouse development

研究代表者

山根 利之（TOSHIYUKI YAMANE）

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30452220

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ガス運搬、止血反応、骨吸収、免疫機構など生体の維持に不可欠な諸機能に関わっている血液細胞が、胚発生期にどのように誕生してくるのか、発生最初期の多分化能を備えた造血細胞の起源またその動態を調べることで、血液細胞発生過程の細胞の系譜、またその発生する場所について明らかにした。特に系譜解析においては胎生期に一過性に産生される胎仔型赤血球と多分化能を備えた造血細胞が共通の起源をもつことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Blood cell types are involved in gas transport, hemostasis, bone resorption, and immune response. To understand the process of blood cell development during mouse ontogeny, we traced back the origin of the earliest multipotent blood cell progenitors we previously isolated to the mesodermal stage of development. The detailed analysis showed that primitive red blood cells, which are transiently produced during ontogeny, and multipotent blood cell progenitors share a common developmental pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液学 幹細胞生物学 免疫学 発生生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血発生 免疫発生 成体型造血 胎仔型赤血球 多分化能 造血幹細胞
胚性幹細胞 マウス

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、単一細胞レベルで成体マウスの造血系を長期間にわたり再構築可能な自己複製能と多分化能を兼ね備えた細胞と定義される。この定義をみたく造血幹細胞は、マウス胚において胎齢 11.5 日目 (E11.5) に胎仔肝臓、大動脈周辺領域、卵黄嚢、胎盤に初めて検出される。その後、造血幹細胞は主に胎仔肝臓で増殖し、発生後期以降、骨髓あるいは一部脾臓に留

まり、生涯にわたって成熟血液細胞系譜を産生し続ける。しかしながら造血幹細胞が出現する以前に、造血活性自体は、E7.5 の卵黄嚢において胎仔期に一過性に認められる胎仔型赤血球が血島と呼ばれる凝集塊として産生されるとともに、E9.5 には卵黄嚢や大動脈周辺領域においてリンパ球系譜とミエロイド系譜の両方を産生する多能性造血前駆細胞が検出されている。また卵黄嚢や大動脈周辺領域において未

分化中胚葉細胞から新規に造血細胞の形成される時期は遅くとも E9.5 までであるので、最初の中胚葉細胞からの造血細胞形成から造血幹細胞が出現するまでの間に時間的空白があり、この空白期間を埋める細胞集団として、造血幹細胞へ分化する前駆細胞(プレ造血幹細胞)の存在が示唆されている。

研究開始当初、我々は発生過程の最初に出現するリンパ球系譜とミエロイド系譜への分化能を有する多能性造血前駆細胞として、 $CD45^+c\text{-Kit}^+AA4.1^+$ の細胞表面抗原発現パターンを有する細胞(以降 KA45 細胞と呼ぶ)をマウス胚性幹(ES)細胞の分化系を用いて単離していた。胚胎内において KA45 細胞は、E9.5 には明確な細胞集団として分離できる。E9.5 胚において KA45 細胞の大部分は卵黄嚢に、また一部は大動脈周辺領域を含む胎仔後方部に存在しており、ES 細胞由来 KA45 細胞同様に T 細胞、B 細胞などのリンパ球系譜、また単球・マクロファージ、顆粒球、赤血球などのミエロイド系譜へ寄与することから、KA45 細胞は胚胎内においても最初期の多能性造血前駆細胞であることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の点について解明することを目標とした。

(1) KA45 細胞の起源と発生場所の解明

胚発生過程においてリンパ球系譜とミエロイド系譜の両方の分化能を有した多能性造血細胞がどこで発生するのかについては、多くの議論があるところであり、我々の単離した発生最初期の多能性造血細胞である KA45 細胞も、胎仔循環の開始した E9.5 以降にはじめて明確な細胞集団として検出できるため、さらに発生段階をさかのぼり、KA45 細胞がいつどこで形成されるのか、胎仔循環確立前後のマウス胚について KA45 細胞の有無を精査する。また KA45 細胞の起源についても、その前駆細胞を探索し、胚胎内における発生場所を明らかにする。

(2) KA45 細胞の胎仔造血への寄与、造血幹細胞への分化能

胚発生期における KA45 細胞の造血系、免疫系発生への寄与について明らかにする。また造血幹細胞が初期の造血発生に遅れて出現する現象について、KA45 細胞がこの時間的空白を埋めるプレ造血幹細胞に相当するものであるのか検討する。

3. 研究の方法

(1) KA45 細胞の起源と発生場所の解明

心臓が拍動を開始する E9.0 前後に、 $c\text{-Kit}/AA4.1/CD45$ に加えて正および負の選択

マーカーを追加することで、微量の KA45 細胞の有無をフローサイトメトリーにより探索した。また ES 細胞のストローマ細胞株との共培養系を用いて、初期中胚葉から KA45 細胞に至る分化経路について、フローサイトメーターによる細胞表面抗原の発現解析と細胞分画、セルソーターによる細胞採取、またその後の細胞培養と形成された細胞の解析を通して系譜図の作製を試みた。さらにその中胚葉と KA45 細胞の中間段階にあたる細胞を胚胎内で探索することで、造血場所が時間的、空間的に移行していく過程を観察した。

(2) KA45 細胞の胎仔造血への寄与、造血幹細胞への分化能

発生中期の主な造血組織、リンパ組織において KA45 細胞の有無を調べるとともに、その分化能について(特に様々なサブセットの知られているリンパ球系譜について)、培養系、またその後の移植系によって分化傾向を詳細に調べた。また造血幹細胞への寄与を観察するアッセイ系として、まず造血幹細胞を発生することが知られている胎仔器官の *ex vivo* 培養系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) KA45 細胞の起源と発生場所の解明

E8.0(体節数 1-7)においては、KA45 細胞は皆無であったが、E8.5(体節数 8-12)においては、少量ではあるが KA45 細胞が卵黄嚢において検出された。よって心臓が拍動を開始し胎仔循環が始まる E9.0(体節数 13-20)以前に少なくとも卵黄嚢において胚体とは独立に既に多能性造血細胞が発生していることが判った。

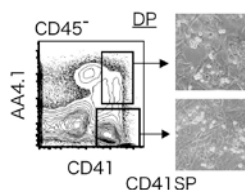


図1 CD45 発現以前の中胚葉の分画と造血細胞形成能。

我々は、さらにその胚発生期最初期の多能性造血細胞である KA45 細胞の起源を探るため、中胚葉細胞から KA45 細胞に至る分化経路について ES 細胞の培養系を利用して解析した。中胚葉とその由来細胞を特異的に標識するため、中胚葉特異的遺伝子である *Mesp1* の遺伝子座に *cre* リコンビナーゼを有し、恒常的遺伝子発現活性を有する *Rosa* 領域に *cre* 応答 *eYFP*(黄色蛍光タンパク質)レポーター遺伝子を持つ ES 細胞(当講座の山崎により樹立)を使用した。この ES 細胞を用い eYFP 陽性の中胚葉細胞

をさらに細胞表面抗原の発現を指標に分画した。この実験系において汎血球マーカーである CD45 を発現する以前の中胚葉細胞中、CD41⁺AA4.1⁺(CD41SP)分画と CD41⁺AA4.1⁺(DP)分画に造血活性のあることを見いだした(図1)。さらに詳細な解析を行ったところ、DP細胞はKA45細胞の前駆細胞であり多能性造血細胞へ運命決定を受けていることが判明した。一方、CD41SP細胞は、DP細胞/KA45細胞の多能性造血細胞の方向へ分化するとともに、興味深いことに、胎仔型赤血球への分化能も有していた。CD41SP細胞は単一細胞レベルにおいても約40%の高い頻度で多能性造血細胞と胎仔型赤血球へ分化することから、CD41SP細胞は胎生期に一過性に産生される胎仔型赤血球とすべての血液細胞系譜を供給する成体型の多能性造血細胞の共通前駆細胞であると言える。以上の結果から考えられた造血発生過程における細胞系譜の分岐モデルを図2に示した。

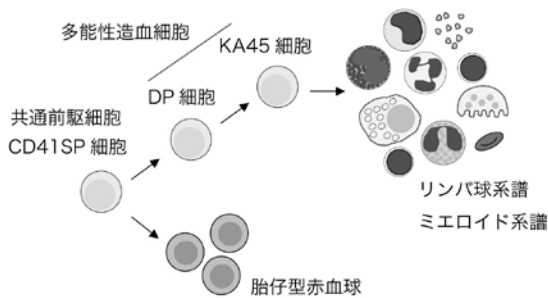


図2 胎生期の造血細胞分化モデル。

さらに我々はマウス胚に対しても我々のモデルがあてはまるのか確認をおこなったところ、マウス胚から採取した CD41SP細胞、DP細胞ともES細胞培養系同様に、培養系においてミエロイド系譜とリンパ球系譜の両方へ分化するとともに、CD41SP細胞は胎仔型赤血球への分化能を備えていた。従って生体内においても上記のモデルに沿って造血細胞分化が進行していることが確認できた。

次に最も未熟な血液細胞である CD41SP細胞が胚胎内のいつどこで形成されるのか調べることで、造血細胞系譜の発生学的起源を探った。CD41SP細胞は、卵黄嚢において E8.0には明確に分離できる細胞集団として存在しており、E8.5までに劇的な増加が認められた。その細胞数は E9.5までゆるやかに増加した。一方、胚体において CD41SP細胞は E8.5に初めて認められ、E9.5にかけて大幅に増加した。以上、心臓が拍動を開始し胎仔循環が確立される E9.0以前に、卵黄嚢、胚体いずれにおいても最も未熟な血液細胞である CD41SP細胞分画が存在していることから、卵黄嚢と胚体で独立に中胚葉細

胞から多分化能を備えた血液細胞が発生していることが推察された。しかしながら、時間的には卵黄嚢における造血が胚体に対して発生段階で0.5日程度先行していることが伺えた。

(2) KA45細胞の胎仔造血への寄与、造血幹細胞への分化能

これまでに胎仔肝臓および胎盤で造血幹細胞が発生することが知られているが、KA45細胞は、造血幹細胞が発生する直前の E10.5にはこれらの組織に存在することを確認している。特に E10.5の胎仔肝臓では CD45陽性細胞の内、KA45細胞が10-20%程度を占めていた。また造血細胞の移入が起こった直後の E12.5の胎仔胸腺において、KA45細胞は最も未熟な細胞分画である Lin⁻c-Kit⁺CD25⁺(ETP/DN1)細胞の10-15%程度を占めていた。これらの知見と一致して、KA45細胞が $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の両方へ分化することを培養系を用いて確認した。これに対しB細胞系列に関しては、KA45細胞がT細胞非依存的にリン脂質や多糖類抗原にตอบสนองするB1細胞系譜へ偏った分化傾向を示すことを、培養後の細胞をリンパ球系譜を欠損した *Rag2^{-/-}IL2R γ c^{-/-or- γ}* ダブルノックアウトマウスへ移植することで明らかにした。

また KA45細胞が造血幹細胞の前駆細胞である可能性について検討するため、まず実験系の確立に着手した。これまでに造血幹細胞が発生する以前の E10.5の胎仔肝臓をマウス胚から摘出し、一週間程度の器官培養を行うことで、リンパ球系譜とミエロイド系譜の産生を生体内同様に擬似的に誘導できる *ex vivo* 培養系を確立することに成功している。

(3) 今後の展望

多能性造血細胞と胎仔型赤血球の共通前駆細胞の単離に成功したことと、この細胞を起源とした細胞分岐図が構築することができたので、今後、この細胞系譜の運命決定過程における細胞外シグナル、また細胞内の分子機構について、生体内での造血の場と関連させて明らかにしたい。また KA45細胞とプレ造血幹細胞の同一性の検討については、本研究期間に未達成であったので、今後、胎仔肝臓の *ex vivo* 器官培養系へ KA45細胞を移入することで検証したい。また KA45細胞のB細胞系列における偏向的な分化傾向については、KA45細胞と胎仔肝臓や骨髄に存在する造血幹細胞との間で細胞内情報の差異について明らかにしたい。

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 2 件)

- ① Tsuneto M, Yamane T, Hayashi SI Methods for investigation of osteoclastogenesis using

mouse embryonic stem cells. In: zur Nieden NI, ed. Embryonic stem cell therapy for osteodegenerative diseases (Methods in Molecular Biology) New York, NY: Springer, vol 690, p239-253, 2011 (査読なし)

- ② Yamane T, Hosen N, Yamazaki H, Weissman IL Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development Proc Natl Acad Sci USA 106: 8953-8958, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 鷺野亜矢, 重岡稔章, 山崎英俊, 山根利之 「マウス血液細胞発生過程における因子依存性」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸
- ② 山崎英俊, 磯野加奈, 重岡稔章, 山根利之 「歯、胸腺、骨髄の間葉系幹細胞の起源の性状の解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日 神戸
- ③ Toshiyuki Yamane, Aya Washino, Hidetoshi Yamazaki “Developmental origin of the earliest hematolymphoid progenitors” 第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24 日 横浜
- ④ Hidetoshi Yamazaki, Toshiyuki Yamane “Contribution of neural crest-derived cells and mesoderm-derived cells to the thymic and bone marrow mesenchyme from fetus to adult” 第 14 回国際免疫学会議 2010 年 8 月 23 日 神戸
- ⑤ Toshiyuki Yamane, Aya Washino, Hidetoshi Yamazaki “Lymphoid lineage potential and developmental origin of the earliest hematopoietic progenitors in mice” 第 14 回国際免疫学会議 2010 年 8 月 23 日 神戸
- ⑥ Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Developmental origin of the earliest hematolymphoid progenitors in mice” 第 8 回国際幹細胞研究学会年次集会 2010 年 6 月 17 日 サンフランシスコ
- ⑦ 山崎英俊、山根利之 「歯胚(歯髄)の間葉系幹細胞の由来とその性質」第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 12 日 横浜
- ⑧ Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Developmental origin of the earliest definitive hematopoietic progenitors” 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009 年 12 月 2 日 大阪
- ⑨ Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki “Identification and characterization of the earliest hematolymphoid progenitors in mouse development” 第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23 日 京都
- ⑩ Katsuyuki Miyazaki, Toshiyuki Yamane,

Shinjiro Kawazoe, Hidetoshi Yamazaki “Induction of neural crest-like cells from murine embryonic stem cells” 第 7 回国際幹細胞研究学会年次集会 2009 年 7 月 9 日 パルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 利之 (TOSHIYUKI YAMANE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30452220

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: