

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 22 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	細胞分裂制御 (対称・非対称分裂) の操作による造血幹細胞増幅
研究機関・ 部局・職名	慶應義塾大学・医学部・専任講師
氏名	新井 文用

1. 当該年度の研究目的

造血幹細胞の自己複製機構を理解し、これを幹細胞増幅に繋げるためには、幹細胞の細胞分裂制御機構を明らかにする必要がある。そこで、造血幹細胞およびその娘細胞 (paired daughter cell: PDC) の遺伝子発現を単一細胞レベルで解析することにより、造血幹細胞の対称・非対称分裂にそれぞれ特徴的な遺伝子発現の規則性を同定し、幹細胞分裂を規定する分子機構を明らかにする。そのため、single cell 定量 PCR アレイシステムを用い、造血幹細胞が分裂した後の PDC について、single cell 定量 PCR アレイにより PDC における遺伝子発現を明らかにする。また、細胞分裂解析 (PDC 解析) を行うためには、細胞分裂前の親幹細胞 (Parental LT-HSC) の均質性を向上させることが極めて重要である。そのため、造血幹細胞特異的遺伝子のレポーターマウス (Evi1-GFP マウス) を用い、その造血幹細胞の遺伝子発現を解析し、均質な造血幹細胞を分離可能か検討すると共に、骨髄再構築能を解析することにより Evi1 の幹細胞マーカーとしての生物学的有用性を確認する。

2. 研究の実施状況

細胞分裂の解析を進めるにあたり、均一に純化したと考えられる造血幹細胞であっても遺伝子発現にはバリエーションがあり、細胞集団を対象とした解析では、データが平均化され、個々の幹細胞の特性を明らかにすることが出来ない。そこで、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析により細胞分裂制御機構の解析系 (single cell real-time PCR array) を用い、マウス骨髄から分離した造血幹細胞 (lin-Sca-1+c-Kit+ (LSK) CD48⁻CD150⁺細胞) を培養して得られる娘細胞のペア (paired daughter cell: PDC) について、遺伝子の発現解析を行った。これまでに、21遺伝子がPDCで非対称に発現することを明らかにしており、これらの分子は造血幹細胞の細胞分裂様式を制御すると考えられた。

そこでさらに、均一な造血幹細胞を得るために造血幹細胞特異的に発現するEvi1のGFPトランスジェニックマウスを用い、LSKCD41⁻CD48⁻CD150⁺CD34⁻Evi1-GFP⁺細胞 (Evi1-GFP⁺ LT-HSC) を分離し、遺伝子発現を単一細胞レベルで検討したところ、遺伝子発現の面で極めて均一な集団であることを明らかにした。Evi1-GFP⁺ LT-HSCを用いたPDC解析の結果、19遺伝子 (Cxcr4, Alcam, Notch1, Tek, Csf3r, Itgb2, Itga2b, Cdh2, Cdkn1a, Cdkn1c, Ccne1, Ccne2, Npm2, Tal1, Tert, Numb, Ndn, Bcl2) がPDC間で非対称に発現し、造血幹細胞の分裂様式の制御 (非対称分裂) に関わると考えられた。今後、これらの分子がいかにして造血幹細胞の細胞分裂制御に関与するのか解析する予定である。

また造血幹細胞の培養系について、polyethylene glycol (PEG) を用いたmicrowell arrayを作製し、造血幹細胞のsingle cell培養を行う系を確立した。今後、PEG microwell arrayを用いた培養とPDCの遺伝子発現解析を組合せて造血幹細胞の細胞機構を解析し、自己複製を誘導する培養系の確立を図りたい。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

雑誌論文 計0件	(掲載済み一査読有り) 計0件 . (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件
会議発表 計0件	専門家向け 計0件 一般向け 計0件
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/
国民との科 学・技術対話 の実施状況	本年度の実施なし
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	特になし

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成22年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額
直接経費	123,000,000	0	41,000,000	82,000,000
間接経費	36,900,000	0	12,300,000	24,600,000
合計	159,900,000	0	53,300,000	106,600,000

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度 執行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額
直接経費	0	41,000,000	0	41,000,000	1,036,665	39,963,335
間接経費	0	12,300,000	0	12,300,000	0	12,300,000
合計	0	53,300,000	0	53,300,000	1,036,665	52,263,335

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	1,036,665	サーマルサイクラー、実験試薬等
旅費	0	
謝金・人件費等	0	
その他	0	
直接経費計	1,036,665	
間接経費計	0	
合計	1,036,665	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
サーマルサイク ラー	ライフテクノロジー ジャパン・Veriti200	1	926,100	926,100	2011/3/23	慶應義塾大学
				0		
				0		