

**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 24 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

1. 造血ニッチ分子の幹細胞培養系へ応用する。造血幹細胞の分裂様式には細胞外因子・ニッチ分子からのシグナルが影響すると考えられる。そこで、造血ニッチ分子の1つである Angiopoietin-1 (Angpt1) の幹細胞分裂および造血幹細胞数の制御に対する機能を明らかにする。またこれに加えて、培養基質の多機能化など bioengineering 技術による培養環境の変化が細胞分裂に及ぼす影響について検討する。

2. PDC 解析データの数学的・統計学的解析から造血幹細胞の細胞分裂様式を明らかにする。すなわち、2個の幹細胞を生み出す対称分裂、1個の幹細胞と1個の前駆細胞を生み出す非対称分裂、あるいは2個の前駆細胞を生み出す対称分裂のいずれの形式となるのかを分類する方法を確立し、ニッチ分子により造血幹細胞の細胞分裂様式がどのように制御されるのかを明らかにする。また、対称・非対称分裂に関係する遺伝子の同定を進め、造血幹細胞の自己複製を制御する遺伝子ネットワークを明らかにする。

さらに、Angpt1 などのニッチ分子からのシグナルにより造血幹細胞の自己複製を誘導する培養系の樹立を目指す。

2. 研究の実施状況

1個の幹細胞の培養により生じる2個の娘細胞 (paired daughter cell: PDC) について遺伝子発現を1個1個の細胞レベルで網羅的に解析し (PDC 解析)、得られた遺伝子発現データを、現在知られている手法の中で最も認識性能が優れた学習モデルの一つである support vector machine (SVM) を用いて造血幹細胞の細胞分裂様式 (対称・非対称分裂) の分類を行った。その結果、造血ニッチ分子の1つである Angpt1 の作用により、造血幹細胞の前駆細胞-前駆細胞 (progenitor-progenitor: P-P) タイプの対称分裂を行う PDC の割合が低下し、幹細胞-幹細胞 (stem cell-stem cell: S-S) タイプの対称分裂が増加することが分かった。この結果から、Angpt1 が造血幹細胞の細胞分裂に際してはその数を増やす働きがあることが明らかとなった。

また、Angpt1 により PDC 間で対称発現が誘導される 10 種類の遺伝子を同定することができた。

人工的に作製したニッチとして Polyethylene glycol (PEG) hydrogel microwell array を用いた造血幹細胞の *in vitro* 培養を行い、その PDC 遺伝子発現解析、統計学的・数学的解析の結果、通常のプラスチック製培養器具上での培養では、造血幹細胞は P-P の組合せで対称性に分裂する割合が高いが、PEG hydrogel microwell array 上で培養した造血幹細胞は S-S の組合せで対称分裂した PDC の割合が有意に高くなることが分かった。PEG hydrogel array は柔らかく、水分含有量が高いことから、“柔らかく” “親水性” の基質が造血幹細胞の自己複製を *in vitro* で誘導する上で有用であることが明らかになった。

Angpt1 の刺激により造血幹細胞で発現が亢進する分子として、染色体の末端部 (テロメア) 保護に働く shelterin コンポーネントの一つである Protection of telomere 1a (Pot1a) を同定し、Pot1a がテロメア 1 本鎖 DNA 領域での DNA ダメージを抑制し、造血幹細胞の自己複製能の維持に働くことを見出した。さらに、ウイルスベクター等を用いることなく細胞に簡便かつ高効率に蛋白を導入できる membrane translocation motif (MTM) を用いた蛋白の細胞内導入システムを応用し、Pot1a の可溶性蛋白を導入する系を確立し、MTM-Pot1a により、造血幹細胞の培養で S-S 分裂能が維持でき、その結果幹細胞数を増加させることが出来た。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 7 件 Sugimura R, He XC, Venkatraman A, <u>Arai F</u>, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong XB, Suda T, Li L. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. Cell. 150 (2): 351-365, 2012. <u>Arai F</u>, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T. Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. Ann N Y Acad Sci. 1266: 72-77, 2012. Ito K, Carracedo A, Weiss D, <u>Arai F</u>, Ala U, Avigan DE, Schafer ZT, Evans RM, Suda T, Lee CH, Pandolfi PP. A PML-PPAR-δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nat Med. 18(9): 1350-1358, 2012. Toyama H, <u>Arai F</u>, Hosokawa K, Ikushima YM, Suda T. N-cadherin+ HSCs in fetal liver exhibit higher long-term bone marrow reconstitution activity than N-cadherin- HSCs. Biochem Biophys Res Commun. 428 (3): 354-359, 2012. Ikushima YM, <u>Arai F</u>, Nakamura Y, Hosokawa K, Kubota Y, Hirashima M, Toyama H, Suda T. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 430 (1): 20-25, 2013. Ikushima YM, <u>Arai F</u>, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T, Narumiya S, Suda T. Prostaglandin E(2) regulates murine hematopoietic stem/progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. Blood. 121 (11): 1995-2007, 2012. Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, <u>Arai F</u>, Suda T, Murata M, Ikeda Y. OP9 bone marrow stroma cells differentiate into megakaryocytes and platelets. PLoS One. 8 (3): e58123, 2013.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 4 件</p>	<p>専門家向け 計 4 件 新井文用. 造血幹細胞のニッチ制御. 第 116 回日本眼科学会総会. 2012 年 4 月 5 日. 東京 新井文用. 幹細胞の細胞分裂と自己複製. 第 66 回日本口腔科学会学術集会. 2012 年 5 月 17 日. 広島 <u>Arai F</u>. Regulation of hematopoietic stem cell division in the niche. KAIST symposium, October 22nd.2012. Daejeon, Korea. <u>Arai F</u>. Regulation of Hematopoietic stem cell division in the niche. 2nd World Congress on Cell Science & Stem Cell Research, November 14, 2012. San Antonio, USA.</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p><u>Arai F</u>, Hosokawa K, Matsumoto Y, Toyama H, Suda T. Gene expression profiling and regulatory networks in single cells. New Frontiers of Network Analysis in Systems Biology (Edited by Ma'ayan A, Macarthur BD). Springer, pp1-13, 2012</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/ss-index.html</p>

様式19 別紙1

国民との科学・技術対話の実施状況	本研究プロジェクトの Web サイトを立ち上げ、研究内容と業績を広く一般に紹介している。
新聞・一般雑誌等掲載計 0 件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	88,080,000	17,460,000	17,460,000	0
間接経費	36,900,000	26,424,000	5,238,000	5,238,000	0
合計	159,900,000	114,504,000	22,698,000	22,698,000	0

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	当該年度返還 額
直接経費	404	17,460,000	0	17,460,404	17,460,404	0	0
間接経費	0	5,238,000	0	5,238,000	5,238,000	0	0
合計	404	22,698,000	0	22,698,404	22,698,404	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	8,559,963	実験用動物、実験用器具・試薬等
旅費	3,482,320	国内/国際学会参加、海外の共同研究者との研究打合せ等
謝金・人件費等	0	-
その他	5,418,121	検査等外注、実験用資材輸送等
直接経費計	17,460,404	
間接経費計	5,238,000	
合計	22,698,404	

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
該当なし				0		
				0		
				0		