

**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 25 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分裂をより正確に解析するシステムを確立し、幹細胞分裂制御におけるニッチ分子、ニッチシグナルの機能を解析する。

- 造血幹細胞の分裂パターンをより正確に分類するため、造血幹細胞と前駆細胞を細かく分類して分取し、それぞれの single cell 遺伝子発現データを学習させた support vector machine (SVM) により、娘細胞ペア (paired daughter cell: PDC) の遺伝子発現データを解析する。このシステムを用いて、8 週齢と 4 週齢の造血幹細胞の分裂パターンの比較、ニッチ分子 Angiopoietin-1 (Angpt1) の細胞分裂制御における機能解析を行う。
- 骨髄移植実験により PDC の機能解析を行う。Angpt1 を添加した培養で得られた PDC とコントロール培養で得られた PDC について、限界希釈法を用いた競合的骨髄移植実験を行い、長期骨髄再構築能をもつ造血幹細胞の数を定量することにより、Angpt1 の細胞分裂における機能を明らかにする。
- Angpt1 刺激により造血幹細胞での発現が亢進する Protection of telomere 1 (Pot1) について、細胞分裂における機能を明らかにすると共に、ヒト造血幹細胞の自己複製能維持における作用を明らかにする。
- Angpt1 により PDC に対称性に発現する分子を同定し、細胞分裂における機能を明らかにする。

2. 研究の実施状況

1. 造血幹細胞の分裂様式の解析

造血幹細胞の分裂パターンをより正確に分類するため、LSKCD41⁻CD48⁻CD150⁺CD34⁻Evi1-GFP⁺ (Evi1G⁺)、LSKCD41⁻CD48⁻CD150⁺CD34⁻Evi1-GFP⁻ (Evi1G⁻)、LSKCD41⁻CD48⁻CD150⁺CD34⁺ (CD150⁺)、LSKCD41⁻CD48⁻CD150⁻CD34⁺ (CD150⁻)、LSKCD41⁻CD48⁻ (LSK) の各細胞分画について、8 週齢サンプルでは、① Evi1G⁺と CD150⁻、② Evi1G⁺と LSK、③ LSK と CD150⁻について、また 4 週齢サンプルでは、① Evi1G⁺と CD150⁻、② Evi1G⁺と CD150⁺、③ CD150⁺と CD150⁻について、それぞれを分類するのに有効な遺伝子セットを明らかにし、それらを学習させた SVM を用いて PDC のデータ解析を行った。

その結果、8 週齢マウス造血幹細胞から得られた PDC は、前駆細胞-前駆細胞 (progenitor-progenitor: P-P) タイプの対称分裂の頻度が高く、培養により造血幹細胞数が減ってくるのに対し、4 週齢マウス造血幹細胞から得られた PDC は、そのほとんどが幹細胞-幹細胞 (stem cell-stem cell: S-S) タイプの対称分裂を行うことが明らかになった。また、Angpt1 は 8 週齢 PDC において、P-P 分裂を減らし、S-P と S-S 分裂を増やすことにより、幹細胞数の減少を抑制することが分かった。

2. 骨髄移植実験による PDC の機能評価

Angpt1 存在および非存在下で Evi1G⁺造血幹細胞を培養して得られた PDC を 2、4、8、12 細胞ずつ、移植細胞数を変えて骨髄移植を行い、造血幹細胞数の定量を行った。その結果、コントロール培養で得られた PDC には、12.2 個に 1 個の幹細胞が含まれたのに対し、Angpt1 存在下で得られた PDC には 4.6 個に 1 個の幹細胞が含まれることが分かった。これは上記 1 の結果と同様の傾向を示すデータであり、Angpt1 が造血幹細胞の分裂制御においては、幹細胞数の減少を抑えて、維持する作用があると考えられた。

3. Pot1 の機能解析

細胞膜透過性ペプチド (membrane translocation motif: MTM) を用いて Pot1a を造血幹細胞に導入し、10 日間の培養を行い、10 日後に造血幹細胞を再度分離した後、さらに培養して細胞分裂パターンを Tie2 と CD48 の免疫染色により検討した。その結果、Pot1a タンパクの導入により P-P 分裂が減少し、S-S 分裂が増えることが分かった。さらに、human POT1 (hPOT1) タンパクがヒト臍帯血造血幹細胞の維持に働くか検討したところ、マウス同様、ヒト造血幹細胞も MTM-hPOT1 の作用により自己複製能が維持されることが明らかになった。

様式19 別紙1

4. Angpt1 によって対称性発現が誘導される分子の同定と機能解析
 幼若マウス (4 週齢) および成獣マウス (8 週齢) の PDC サンプルについて、それぞれ Angpt1 刺激により対称性の発現を示す遺伝子の同定を試みた。その結果、4 週齢では Etv6, Hif1a, Fbxw7, Cdkn1c, Bmi1 他 12 遺伝子、8 週齢では Tal1, Hoxb4, Myb など 9 遺伝子が Angpt1 刺激により PDC 間で対称性に発現することが分かった。今後、MTM タンパクの系を用いて造血幹細胞に導入し、細胞分裂における作用を検討する。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 1 件	(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Yamashita M, Nitta E, Nagamatsu G, Ikushima YM, Hosokawa K, Arai F, Suda T. Nucleostemin is indispensable for the maintenance and genetic stability of hematopoietic stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 441 (1): 196-201, 2013. (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件
会議発表 計 1 件	専門家向け 計 1 件 Arai F, Ikushima Y, MacArthur BD, Suda T. Paired daughter cell analyses for the regulation of the symmetric self-renewal division of hematopoietic stem cells by Angiopoietin-1. 42nd Annual Scientific Meeting of the ISEH – Society for Hematology and Stem Cells, August 22nd-25th, 2013, Vienna, Austria. 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)	「最先端・次世代研究開発支援プログラム 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」(http://www.celldiff.med.keio.ac.jp/ss-index.html)
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

該当なし

実施状況報告書(平成25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せん

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	105,540,000	17,460,000	0	0
間接経費	36,900,000	31,662,000	5,238,000	0	0
合計	159,900,000	137,202,000	22,698,000	0	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	0	17,460,000	0	17,460,000	17,460,000	0	0
間接経費	0	5,238,000	0	5,238,000	5,238,000	0	0
合計	0	22,698,000	0	22,698,000	22,698,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	4,333,539	実験用動物、実験用器具・試薬等
旅費	1,438,766	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	11,236,980	博士研究員(2名)人件費
その他	450,715	検査等外注、実験用資材等輸送費、学会参加費、機器保守費等
直接経費計	17,460,000	
間接経費計	5,238,000	
合計	22,698,000	

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		