

研究課題名 「造血幹細胞系のリセット機構解析」

所属研究機関名 広島大学

研究者氏名 石原 浩人

## ・研究計画の概要

### 研究の趣旨・目的

造血幹細胞は、幹細胞レベルでは運命は決まっているわけではなく、周りの環境により多種多様な血球系細胞への運命決定、他臓器幹細胞へ運命変更・リセット可能であることが知られてきた。特に最近の再生医療への関心の高さが、この分野の研究の必要性を物語っている。しかし、幹細胞系を制御している機構に関しては全く分かっていない。造血幹細胞のリセット機構の解析を、「テロクロマチン制御機構」および「細胞の運命決定維持機構」という視点で捉えることで、造血幹細胞に存在する少なくとも4つのパラメーター（増殖・細胞死・分化・他臓器の幹細胞へ脱分化）の制御を介し「なぜ幹細胞の運命は維持されるのか？」という問いに答えようとするものである。しかし、そのパラメーターの一つである脱分化（他臓器幹細胞への変換）については、つい最近まで、造血幹細胞は血球系以外の臓器の体細胞（肺、消化管、皮膚、胆管、胃）などにも変換可能（脱分化）であることが示されて来たが、今年の4月24日 Nature にこれらの脱分化能は細胞融合の結果であることが報告され、本来の幹細胞機能を制御するパラメーターとは別な機構である可能性が高くなった。しかし残る3つのこれらのパラメーターの人工的な制御が、将来の再生医療にとっては重要であり、制御するための手法の一つとして細胞運命決定機構・運命維持機構の解析を行う

### 研究計画の概要

造血幹細胞、免疫担当細胞などの、細胞制御パラメーター解析し、「細胞メモリー機構」であるポリコム遺伝子群の関与を通して、幹細胞系の人工的制御技術の基礎研究を行う

第1期の目標 造血幹細胞、免疫担当細胞などの、細胞増殖や細胞死パラメーター解析

- 1.造血幹細胞・免疫担当細胞などの細胞増殖・細胞死パラメーターに関する研究
  - ・造血幹細胞の、セルソーターを用いた単離法を確立する。
  - ・細胞増殖、細胞死のパラメーター解析法を検討する。
  - ・造血幹細胞を用いた細胞移植実験系（骨髄移植）を用いて、個体レベルでの解析法を検討する。
  - ・ポリコム遺伝子群の遺伝子欠損マウスを用い、幹細胞系への関与を検討する。

第2期の目標；細胞の運命維持・リセット機構」に重要なポリコム遺伝子群の生物学的機能解析、およびその蛋白質複合体の単離・同定

- 2.ポリコム蛋白質複合体の機能解析（ハーバート大学との連携）およびSCdb(stem cell data base;プリンストン大学)との連携、幹細胞機能の人工的制御の基礎研究
  - ・ポリコム蛋白質複合体の単離・精製を行う
  - ・構成成分を明らかにし、生物学的活性を検討する。
  - ・プリンストン大学のstem cell database (SCDb)やハーバート大学医学部などと連携し、ポリコム遺伝子群の幹細胞制御系への関与を明らかにする。
  - ・リボザイム技術、morpholino-antisense RNA, RNAi,などの新技術を用い、幹細胞の分化制御や蛋白質複合体の相互作用解析などを行う

第3期の目標；(1)造血幹細胞の多分化能・脱分化能制御維持機構の解析、(2)標的遺伝子群の単離・解析、(3)細胞のメモリー機構解析

現在計画中

研究計画の詳細報告

(単位：百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. 造血幹細胞パラメーター解析に関する研究						
(1) パラメーターの事前検証	← 2 →					2
(2) パラメーター解析の予備実験	← 5 →					5
(3) 本格実験	← 13 →	8	3			24
2. ポリコム蛋白質複合体解析						
(1) 予備実験		← 4 →				4
(2) 本格実験			← 3 →			3
3. 幹細胞移植実験						
(1) 予備実験		← 4 →				4
(2) 本格実験			← 8 →			8
4. 標的遺伝子解析						
(1) 本格実験			← 5 →			5
5. とりまとめ					← →	
所要経費(合計) (間接経費を含む)	20	16	19			55

研究項目は、毎年度作成している研究実施計画の年次計画における記載と同一の研究項目を記載すること。

所要経費の欄は、研究実施期間に合わせて記入欄を調整すること。

所要経費に関する各年度の合計額は、当該年度の示達額(委託費の確定額)と一致すること。

## ・研究成果の概要

### 研究成果の概要

この研究プロジェクトを開始した時点では、造血系幹細胞(HSC)の制御機構に関しては、「自己複製」という事しか分かっておらず、実際に(1)パラメーターがいくつ存在するのか？(2)どんな制御機構が存在するのか？(3)血球系以外の他臓器へもほとんどに分化可能なのか？(4)人工的な制御が可能なのか？(5)制御機構の分子機構は何か？などの質問に対して何一つ分かっていなかった。

研究開始後(H13)から現在までに(H15)、上記の質問(3)に関しては、賛否両論あり、最近のNatureの論文を見る限り、血液の元となる造血幹細胞の多臓器への分化は細胞融合による可能性が高くなった。

さらに「細胞の運命維持機構」「クロマチンサイレンシング」の重要な役者であるポリコーム遺伝子群が造血幹細胞の自己複製能に関与していることが、Bmi-1やRae-28遺伝子欠損マウスなどの研究で明らかになってきた。これらポリコーム遺伝子群はもともとHox遺伝子群の負の制御因子としてショウジョウバエで遺伝学的に同定されてきたものであるが、哺乳動物の造血幹細胞レベルでもHoxB4が自己複製能の制御に非常に深く関わっていること(Cell, 2002)から考えても、今年(2003)になってやっとストーリーとしての論理性がでてきたと思われる。さらに発生生物学で重要なシグナル系であるNotchやWntシステムがやはり造血幹細胞の制御に重要な役割を果たしている報告が今年(2003)に立て続けに出され、これらとポリコーム遺伝子群の関与も無視できない。

このような背景で、

まず

第一期目標である、「造血幹細胞、免疫担当細胞などの、細胞増殖や細胞死パラメーター解析」については、セルソーターを用い、c-kit, Sca-1を用いたKSL分画をさらにCD34やFlk2などで細分化しより純度の高いHSCを単離できるようになった(東大・医科研・中内先生にアドバイスを受けた)。さらに放射線照射したマウスを用いた骨髄移植実験系の確率にも成功した。このような細胞系を用いた細胞増殖、細胞死に関する実験系が可能になった。その結果、この系を用い、ポリコーム遺伝子(mel-18)改変マウスのHSCではその機能が低下していることが分かった(現在論文作成中)。さらにこの系を応用し、ダイオキシンの造血幹細胞への影響を検討したところ、HSCに対して重篤な機能障害があることを発表した(Toxi.Sci.2003)。

次に、第二期目標「細胞の運命維持・リセット機構」に重要なポリコーム遺伝子群の生物学的機能解析、およびその蛋白質複合体の単離・同定)に関して、

最大の目的は、将来の生化学的解析の基礎を作るために、とにかくポリコーム蛋白質複合体を単離し、そのサブユニット構造を明らかにすることである。これは、我々のグループで、2年間かけてトライしたが、部分精製までしか達成できなかった。そこで、ハーバード大学・Dana-Farberガン研究所の中谷教授と共同研究を始め、最近2種類のポリコーム蛋白質複合体(Bmi-1, Mel-18)の精製に成功した。しかしそのうちの1種類(Bmi-1)については去年の暮れにKingstonのグループに先に発表されてしまった。しかしクラス2のポリコームタンパク複合体を2種類持っているのは世界中で我々のみであり、これを武器に研究を展開して行きたい。またmorpholino-anti senseRNAを使った幹細胞研究から、実際、人工的にポリコーム遺伝子の発現を制御することにより、造血幹細胞を機能として濃縮できることが分かった(現在論文作成中)。

第三期の「第3期の目標」(1)造血幹細胞の多分化能・脱分化能制御維持機構の解析、(2)標的遺伝子群の単離・解析、(3)細胞のメモリー機構解析)についてはこれからである。

### 波及効果、発展方向、改善点等

今後の研究の方向性としては、(1)再生医療への応用をさぐる、(2)造血幹細胞の生物学的解析、(3)ポリコーム遺伝子群、ポリコーム蛋白質複合体の生物学的機能解析、の3点がもっとも大きな方向性になると考えている。しかし、今年になって、ポリコーム遺伝子群と幹細胞について急に研究者人口が増加した気配があり、競争はしれつつになる可能性が高い。そのような中でオリジナリティーを保つためには、我々独自のものにテーマを絞るべきかもしれない。

## 研究成果発表等の状況

### (1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0件	6件	30件	36件
国際	8件	0件	10件	18件
合計	8件	6件	40件	54件

### (2) 特許等出願件数

合計 0件 (うち国内0件、国外0件)

### (3) 受賞等

0件 (うち国内0件、国外0件)

### (4) 主な原著論文による発表の内訳

\* 発表者氏名；発表題目，文献名，巻(号)，頁，(掲載年)の順

国内誌 (国内英文誌を含む)

特になし

国外誌

- Hiragun,T., Morita,E., Shindo,H., Tanaka,T., Kameyoshi,Y., Okabe,T., Kanno,M. and Yamamoto,S.  
Altered in vitro apoptosis os cultured mast cells prepared from an inbred strain of mice, NC/Kuj.  
Clinical and Experimental Allergy, 30: 433-438,(2000)
- Tanaka,T., Morita,E., Mihara,S., Kanno,M. and Yamamoto,S. Identification of leukemia inhibitory  
factor as a potent mast cell growth-enhancing factor produced by mouse keratinocyte cell  
line ,KCMH-1. Arch Dermatol. Res. 293: 18-25, (2001)
- Akasaka,T., van Lohuizen,M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal,  
M., Alkema, M., Berns, A., and Koseki,H. Mice doubly deficient for Polycomb group genes Mel18  
and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression.  
Development 128: 1587-1597, (2001)
- Yamasaki,M., Sasho,T., Moriya,H., Kanno,M., Harada,M., kameda,N., Shimizu,E., Nakayama,T.,and  
Taniguchi,M. Extrathymic development of Va11T cells in placenta during pregnancy and their  
possible physiological role. J. Immunology 166: 7244-7249, (200 1)
- Miyazaki ,K., Inoue ,H., Onai ,N., Ishihara ,H., and Kanno, M. Chemokine-mediated  
thymopoiesis is regulated by a mammalian Polycomb group gene, mel-18. Immunol Lett.  
80:139-43 ,(2002)
- Muto A, Tashiro S, Tsuchiya H, Kume A, Kanno M, Ito E, Yamamoto M, Igarashi K. Activation of  
Maf/AP-1 Repressor Bach2 by Oxidative Stress Promotes Apoptosis and Its Interaction with

Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies.. **J Biol Chem.** 277:20724-20733, (2002)

7. Fujisaki S, Ninomiya Y, Ishihara
8. H, Miyazaki M, Kanno R, Asahara T, and Kanno M. Dimerization of the Polycomb-group protein Mel-18 is regulated by PKC phosphorylation. **BBRC** 300:135-140, (2003)
9. Sakai R, Kajiume T, Inoue H, Kanno R, Miyazaki M, Ninomiya Y, and Kanno M. TCDD treatment eliminates the long-term reconstitution activity of hematopoietic stem cells. **Toxicol. Sci.** 72, 84-91, (2003)

原著論文以外による発表(レビュー等)

国内誌(国内英文誌を含む)

10. 菅野雅元、石原浩人 Polycomb 遺伝子群/Trithorax 遺伝子群と発がん 細胞はどのようにして正常な状態を記憶しているかー **Molecular Medicine** Vol.36 No11, (1999)
11. 石原浩人、藤崎成至、宮崎こずえ、菅野雅元 Polycomb 遺伝子群による免疫系の制御 蛋白質核酸酵素 **Vol.45, No.9, 1633-1644, (2000)**
12. 石原浩人、藤崎成至、菅野雅元 ほ乳類 Polycomb 蛋白質群 **実験医学** Vol.18 No.8, (2000)
13. 石原浩人、菅野雅元 「Polycomb 蛋白質群と発がん」 細胞はどのようにして正常な状態を記憶しているのかー **G.I.Research** vol9.No4, 39(319)-45(325), (2001)

(5)主要雑誌への研究成果発表

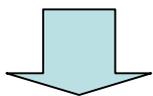
Journal	Impact Factor,2001
Development	8.624
J.Immunology	7.065
J.Biol.Chem.	7.258
BBRC	2.946
Tox.Sci	2.634

# 自己複製能の制御システム (4つのパラメーターの存在)

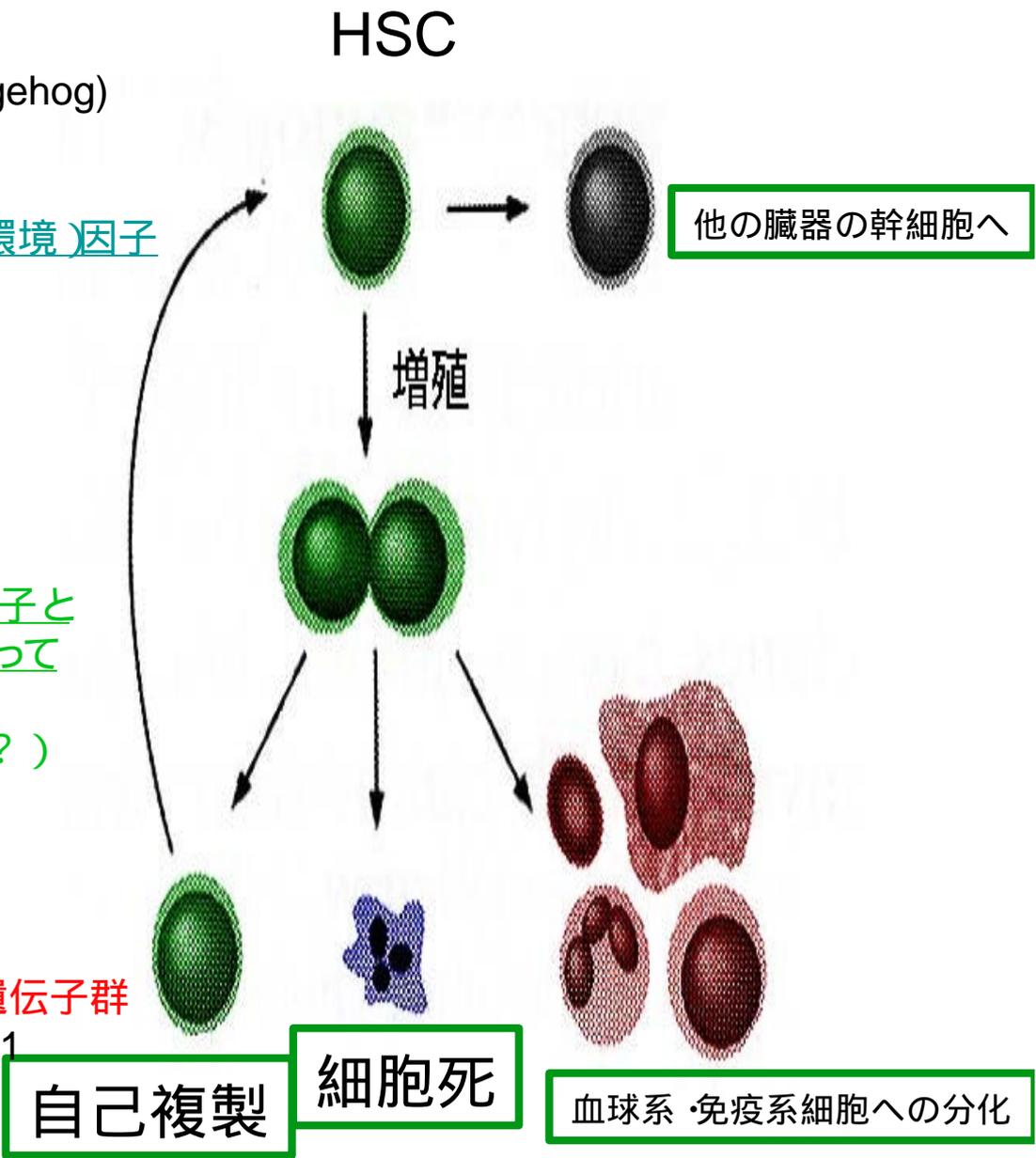
現在までに分かったものを挙げると

- Wnt
- BMP
- Shh (sonic hedgehog)
- Notch
- などの細胞外の (微小環境) 因子

では細胞内因子として何が分かっているか (標的遺伝子?)  
HoxB4



- Polycomb 遺伝子群
- Rae28/mph1
- Bmi-1
- Mel-18



自己複製

血球系・免疫系細胞への分化