

G₀ 期マーカー mVenus-p27K⁻プローブを用いた造血幹細胞の in vitro in vivo における解析

田中洋介

東京大学医科学研究所 細胞療法分野

【研究の背景】

長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞 (LT-HSCs) は骨髄微小環境に存在し、大半のものが細胞周期の G₀ 期にいる。つまり G₀ 期の細胞を特異的に検出できる蛍光プローブがあれば、骨髄中あるいは培養系において G₀ 期にある LT-HSCs を顕微鏡や Flow Cytometry で検出可能である。また、2 光子励起顕微鏡を用いた骨内腔のイメージング技術 (Ishi M et al., Nature, 2009) と組み合わせれば、in vivo における G₀ 期の LT-HSCs が観察可能である。申請者らは、G₀ 期のマーカーである p27 に着目し、G₀ 期の細胞を mVenus で識別できる mVenus-p27K⁻プローブ (Oki T et al., Sci. Rep, 2014) の発現を Cre により誘導できるマウスを樹立した (mVenus-p27K⁻レポーターマウス)。細胞周期モニタリングマーカーとしては Fucci プローブ (Sakaue-Sawano, A et al., Cell, 2008) が有名であるが、G₀ 期と G₁ 期とを区別できない。一方、mVenus-p27K⁻プローブは G₀ 期の細胞を区別することが可能である。この mVenus-p27K⁻レポーターマウスを用いて LT-HSCs の 90% 以上が G₀ 期であることを確認した。興味深いことに、LT-HSCs の 80% は mVenus-p27K^{-high}、14% は mVenus-p27K^{-low}、6% は mVenus-p27K^{-neg} であった。さらに興味深いことに、DAPI と Ki67 による染色では mVenus-p27K^{-neg} にも G₀ 期の細胞が存在していることがわかった。以上のことから、同じ G₀ 期であっても、mVenus-p27K⁻の輝度の違いよりいくつかの細胞集団に分割可能であることが明らかになった。現在、これらの G₀ 期の LT-HSCs を解析中である。

【目 的】

細胞周期の静止期 (G₀ 期) を可視化できる mVenus-p27K⁻レポーターマウスを用いて長期骨髄再構築能を持つ造血幹細胞 (LT-HSCs) のさらなる純化を目指す。また、造血器腫瘍モデルに mVenus-p27K⁻を導入し、腫瘍幹細胞の特定と薬剤スクリーニング系の構築を目指す。

【方 法】

以下の方法により本研究を遂行した。

① LT-HSCs をより純化する。

LT-HSCs は mVenus-p27K⁻プローブにより mVenus-p27K^{-high}、mVenus-p27K^{-low}、mVenus-p27K^{-negative} の 3 つの細胞分画に分けることができる。これらの 3 つの LT-HSCs 細胞分画の長期骨髄再構築能を比較し、より純化された LT-HSCs が含まれている細胞分画を突き止める。

② mVenus-p27K^{-high}、mVenus-p27K^{-low}、mVenus-p27K^{-negative} LT-HSCs のシングルセル解析。

mVenus-p27K^{-high}、mVenus-p27K^{-low}、mVenus-p27K^{-negative} の LT-HSCs の遺伝子発現をシングルセルで比較する。また、in vitro においてシングルセルタイムラプスライブイメージングを行い、細胞周期の変化、細胞分化や対称・非対称分裂等に違いがあるかを検討する。

③ mVenus-p27K⁻プローブを指標として造血器腫瘍幹細胞の特定を目指す。

mVenus-p27K⁻マウスの骨髄細胞に BCR-ABL を導入し、mVenus-p27K⁻陽性の細胞と陰性で移植モデルにおける発症率を比較する。治療抵抗性の腫瘍幹細胞は G₀ 期にいと想定されるので、放射線照射や薬剤投与を行い、治療後に mVenus-p27K⁻陽性の細胞の割合が増加しているかどうかを調べる。mVenus-p27K⁻陽性の細胞を腫瘍幹細胞と想定して、陽性率の減少を治療効果とする単純な方法で抗腫瘍効果のある薬剤の評価系を構築する。

【結 果】

Venus-p27K^{-high}、mVenus-p27K^{-low}、mVenus-p27K^{-negative} の LT-HSCs の中でいずれのものも LT-HSCs も G₀ 期でありながら mVenus-p27K^{-high} の LT-HSCs が mVenus-p27K^{-low}、mVenus-p27K^{-negative} と比較して高い長期骨髄再構築能を示した。次に、これら 3 つの分画の LT-HSCs の違いを評価するために、① シングルセル RNASeq によるシングルセルレベルでの遺伝子発現比較解析、② シングルセルイメージングによるシングルセルレベルにおける細胞分裂速度の比較解析を行った。興味深いことに、シングルセルレベルにおける遺伝子発現の違いは 3 つの細胞分画の LT-HSCs では認められなかった。しかしながら、シングルセルイメージングから mVenus-p27K^{-high} の LT-HSCs が他の 2 つの分画に比較して細胞分裂速度が遅いことが明らかになった。また、BcrAbl 導入による CML モデルにおいて、腫瘍幹細胞分画を正常幹細胞と同様に mVenus-p27K⁻プロープにより high, low, negative に分けることができた。現在、2 次移植による再発率を比較するとともに、同モデルを用いて薬剤投与実験を開始したところである。これにより薬剤抵抗性白血病幹細胞の mVenus-p27K⁻プロープの輝度を明らかにして、薬剤抵抗性白血病幹細胞の特性を明らかにする。

【考 察】

mVenus-p27K⁻プロープは正常造血幹細胞、造血器腫瘍幹細胞のいずれにおいても、G₀ 期の細胞をさらに分割することが可能であり、mVenus-p27K^{-high} 分画により純化された幹細胞が含まれることから、従来の幹細胞をより純化できることが明らかになった。このことから、mVenus-p27K⁻プロープは他分野の幹細胞研究においても有用なツールとなることが期待できる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の研究では達成には至らなかったが、BcrAbl 導入による CML モデルにおいて、腫瘍幹細胞分画が正常幹細胞と同様に mVenus-p27K⁻プロープにより high, low, negative に分けることができ、2 次移植による再発率は mVenus-p27K^{-high} 腫瘍幹細胞分画が高い傾向が認められたことから、この CML モデルにおいて薬剤投与することにより薬剤抵抗性の白血病幹細胞の特性を調べることで、薬剤抵抗性白血病幹細胞の骨髄での局在を特定し、そのニッチを明らかにすることができれば、ニッチ特異的な分子標的医薬の開発につながるものと期待される。

【参考・引用文献】

Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, Proia RL, Germain RN. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009;458:524-8.

Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, Sakaue-Sawano A, Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A, Kitamura T. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K⁻, identifies quiescent cells and visualizes G₀-G₁ transition. *Sci. Rep* 2014;4:4012.

Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 2008;132:487-98.