

論文題目 ノックインシステムを用いた造血幹細胞の標識と運命決定の解析

指導教員 中内啓光

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

高柳晋一郎

序

造血幹細胞は、生涯にわたり全ての血液細胞の源となる細胞であり、多分化能と高い自己複製能力を兼ね備えた細胞である。マウスモデルにおいては、成体骨髄細胞中の CD34⁺KSL(c-Kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻)細胞分画に極めて高度に濃縮されており、FACS による単離が可能である。このため、数ある組織幹細胞の中でも最も研究の進んでいるものの一つである。

造血幹細胞から成熟細胞へ至る分化の経路や造血幹細胞の分裂様式は、幹細胞生物学における重要な命題である。これまで、2000 年に Akashi らが提唱した、造血幹細胞から分化した多能性前駆細胞から派生した骨髄球系前駆細胞およびリンパ球系前駆細胞から骨髄球系細胞およびリンパ球系細胞がそれぞれ産生するというモデルを中心に、数々のモデルが提唱されているが未だ議論の余地がある。また、幹細胞レベルの分裂様式に関する研究も大きな論点である。これらの研究の問題点として、解析の対象となる幹細胞を採取してから結果を解析・考察をするまでのタイムラグの長さが挙げられる。このため、培養や骨髄移植を経て分化・増殖能を評価するまでの情報が乏しい。

そこで、本研究では、造血幹細胞の状態をリアルタイムに観察できるよう、遺伝子ターゲットニングによる蛍光タンパクノックインモデルの作製を目的とした。造血幹・前駆細胞に特異的に発現する標的遺伝子として、新規遺伝子である *Transmembrane Molecule with Thrombospondin Module (Tmtsp)*に着目した。この遺伝子は、当研究室において EST データベ

ースを用いた IL-11 受容体との相同性検索により同定されたもので、KSL 造血幹・前駆細胞における発現が RT-PCR により確認されていた。本研究では、特異的抗体などを利用した詳細な発現解析をもとにノックインマウスによる細胞のマーキングを行った。

方法と結果

1. Tmtsp 遺伝子のタンパクおよびゲノム構造

Tmtsp は新規の膜貫通分子で、サイトカイン受容体ファミリーである IL-11 受容体遺伝子の膜貫通領域近傍の配列を基に EST database に対する相同性検索により同定された。Tmtsp タンパクの機能ドメインは、細胞外にシグナルシーケンス、3 つの Ig-like ドメイン、Thrombospondin-1(TSP1)ドメインを有し、膜貫通部位以降の細胞内領域には既知の機能ドメインはない。Tmtsp 遺伝子は 37kb にわたって 8qA2 にコードされ、5 つのエキソンから構成される。翻訳開始コドンはエキソン 2 にあり、その後各エキソンに Ig-like ドメイン、TSP1 ドメイン、膜貫通部位が分配されている。

2. 血液細胞における Tmtsp の発現

まず、半定量的 RT-PCR による Tmtsp mRNA の血液細胞系列における分布を調査したところ、Tmtsp は CD34⁺KSL 造血幹細胞から Lin⁻未分化細胞までに高発現していた。分化抗原陽性細胞の中では、骨髄中の B 細胞や胸腺中の DN 細胞などで増幅が検出され、成熟に伴う発現レベルの低下が示唆された。

続いて、作製した抗 Tmtsp 抗体を用いて、タンパクレベルでの発現を調査したところ、RT-PCR の結果と同様、CD34⁺KSL 細胞と CD34⁺KSL 多能性前駆細胞において極めて高い発現が観察された。

このように、Tmtsp 遺伝子は造血幹・前駆細胞に特異的に発現することから、蛍光標識の対象とした。

3. Tmtsp の血管内皮細胞における発現

Tmtsp mRNA の主要臓器における発現分布を Northern blotting により検討したところ、全ての臓器で mRNA が検出され、肺において最も高い発現を示した。

また、特異的抗体を用いた IHC により、VE-Cadherin 陽性血管内皮細胞に局在していた。さらにマウス脳血管種株の bEND.3 細胞や、ES 細胞由来 VE-Cadherin 陽性内皮細胞にも発現していたことから、Tmtsp は造血幹・前駆細胞に加えて内皮細胞特異的に発現していることが示された。

4. 遺伝子ターゲティングによる Tmtsp^{Venus/+}ES 細胞およびマウスの作製

Tmtsp 遺伝子の発現を EYFP の活性型変異体である Venus で標識するにあたり、開始コド

ン近傍の配列を除去し、Venus 及び薬剤選択マーカー遺伝子で置換した。ES 細胞の相同性組み換えは高頻度で起こり、*Tmtsp*^{Venus/+}マウスも樹立できた。この *Tmtsp*^{Venus/+} ES 細胞およびマウスを用い、Venus のシグナルと *Tmtsp* の発現との相関の確認を試みた。

まず、*Tmtsp*^{Venus/+} ES 細胞を Embryoid Body(EB)形成により分化誘導させ、VEGF 存在下で OP-9 細胞上に播種し、内皮細胞に分化誘導したところ、全ての Venus 陽性細胞が *Tmtsp* タンパクを発現していた。同時に、抗 *Tmtsp* 抗体の免疫染色同様、内皮細胞マーカーである VE-Cadherin や CD31 も発現していた。また、EB 形成 7 日目の細胞の FACS によっても *Tmtsp* タンパクと Venus の発現の相関が確かめられた。さらに、胎齢 15.5 日の胎仔表皮下の CD31 陽性内皮細胞においても Venus が観察されたことから、*in vivo* においても Venus の蛍光が *Tmtsp* 遺伝子の発現制御下にあることが示された。

5. 発生段階における *Tmtsp*/Venus の発現

胎齢 8 日前後に相当する、EB 形成 4 日目から顕微鏡下で Venus の蛍光が検出できたことから、血液発生の初期段階から *Tmtsp*/Venus が発現していると考えられる。

Tmtsp^{Venus/+} ES 細胞由来の EB における Venus の発現を FACS で経時的に観察した。Venus⁺ 細胞は早期 (EB3~4 日) の中胚葉系分化マーカーである Flk-1⁺細胞分画中で EB3 日目に初めて検出された。また、胎児期の造血のマーカーである CD41 の発現を検討したところ、EB4~6 日目にかけて Venus⁺ CD41⁺細胞が存在した。

このことから、Venus は胎仔中の造血前駆細胞を標識しているとの仮説を立て、*Tmtsp*^{Venus/+} 胎仔を用いてコロニーアッセイを行った。胎齢 8.5 日および 9.5 日の yolk sac と胎齢 10.5 日の AGM 領域を採取し、OP-9 細胞上で培養したところ、血球コロニー形成細胞は CD41⁺Venus⁺細胞分画に極めて高く濃縮されていた。このことから、Venus は発生段階の造血前駆細胞の有用なマーカーであることが示された。

6. *Tmtsp*/Venus の成体マウス血液細胞における発現と造血能の相関

FACS による Venus の発現プロファイリングを行った結果、Venus は CD34⁺KSL 造血幹細胞と CD34⁺KSL 多能性造血前駆細胞に高発現していた。これらより一段分化した、運命決定した前駆細胞群においては、骨髓球系前駆細胞(CMP)、顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (GMP)、巨核球・赤血球系前駆細胞 (MEP) の 3 分画において Venus の発現が確認され、その発現レベルは CMP から GMP および MEP への分化に伴い減少した。リンパ球系前駆細胞 (CLP) においても CMP と同程度の発現が観察された。また、B 細胞と T 細胞系列の成熟に伴う蛍光強度の低下も観察された。TER119 や NK1.1 などの分化抗原陽性細胞における発現は検出されなかった。

続いて、Lin⁻細胞を Venus で分画し、各分画のコロニー形成能や骨髓移植を試みたところ、コロニーアッセイによる未分化な前駆細胞の指標である HPP-CFC は Lin⁻Venus^{high} 細胞分画に高度に濃縮され、骨髓移植により実験的に定義される造血幹細胞も同分画にのみ存在し

た。これらの結果は、Tmtsp/Venus の発現が造血幹細胞および前駆細胞を標識していることを機能的に示すものである。

考察

本研究では、造血幹・前駆細胞に発現する新規遺伝子に注目し、蛍光タンパク遺伝子のノックインマウスの作製に成功した。この遺伝子は TSP1 ドメインを細胞外に持つ膜貫通分子であり、造血幹・前駆細胞のほかに内皮細胞で発現していた。これまでに多くの遺伝子が未分化血液細胞と内皮細胞に共通して発現しており、これらの細胞の発生や機能に重要な役割をしていることが知られているが、Tmtsp は TSP1 ドメインを持つ、最初の遺伝子である。TSP1 ドメインは細胞接着や遊走へ関与することから、内皮細胞のネットワーク形成や造血幹細胞 niche への homing などに関与すると考えられる。

これまでに、造血幹細胞発生の研究のためのマウスモデルがいくつか報告されており、時間的および形態学的に造血幹細胞発生やその分化を同定することを容易にできるものである。Tmtsp^{Venus/+}マウスは胎仔および成体マウスの造血や血管発生の解析に有用なモデルとなるだろう。

遺伝子の生物学的な意義を知る上で、ノックアウトマウスの解析は大きな手がかりとなる。Tmtsp^{Venus/Venus}(Tmtsp^{-/-})マウスの解析は現在進行中である。ヘテロマウス同士の交配からはメンデル比に従って新生仔マウスは産まれることから、発生段階の Tmtsp の発現分布からの予想に反し、胎内での致死性はない。ホモマウス同士の交配も可能であったことから、生殖系統の異常も観察されなかった。今後は、ノックアウトマウス由来の造血幹細胞の *in vivo* での挙動や血管網の形態などについて、詳細な検討を重ねていく予定である。