

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791070

研究課題名（和文） 血液細胞の Hes-1 発現様式及びその破綻が自己複製・分化に与える影響の解明

研究課題名（英文） Demonstration of Hes-1 oscillation in progenitors and analysis of its effect on differentiation in hematopoiesis.

研究代表者

横山 泰久（YOKOYAMA YASUHISA）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70512820

研究成果の概要（和文）：マウス胎仔肝から血液前駆細胞分画を分取し、単一細胞レベルでの Hes-1 発現を顕微鏡下にルシフェラーゼ反応の発光としてとらえ、Hes-1 の発現が短時間で上下していることを証明した。MLL-AF9 融合遺伝子を血液前駆細胞に導入しマウスに移植すると白血病を引き起こすが、Hes-1 ノックアウトマウス由来の前駆細胞に導入した場合、野生型よりも、白血病によって早期にマウスが死亡した。これらから、MLL-AF9 による白血病において、Hes-1 は腫瘍抑制的にはたらくことが示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated ultradian oscillation of Hes-1 expression in single hematopoietic progenitor cells separated from murine fetal liver. Hematopoietic progenitors introduced with MLL-AF9 fusion gene cause leukemia in *in vivo* model. When progenitors derived from Hes-1 knockout mice were used, the Hes-1-knockout cells with MLL-AF9 caused earlier death than wild-type cells, which indicated that Hes-1 works as tumor suppressor gene in MLL-AF9 leukemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学、Hes-1、白血病、発現振動

1. 研究開始当初の背景

(1) 血液細胞における Hes-1 のはたらき

Hairy and enhancer of split (Hes)-1 は Notch シグナルの下流に位置する重要な分子のひとつである (Genes Dev 6:2620-2634, 1992)。Notch シグナルは造血幹細胞の未分化性の維持にはたらき (Blood 98:3283-3289, 2001)、また胎生期における造血幹細胞の発生に必須である (Immunity 18:699-711, 2003)。一方、血液系細胞の分化においては、Notch シグナルは T 細胞 (Immunity 10:547-558, 1999) や巨核球 (Cell Stem Cell 3:314 - 326, 2008)、肥満細胞 (PNAS 105:7839-44, 2008) などへの分化にもはたら

くことが知られており、幹細胞から分化細胞まで造血系全体を通じて重要な分子である。Notch の下流に位置する Hes-1 も同様に、造血幹細胞およびその分化の制御に重大な影響を与える。マウスにおける造血幹細胞は c-kit 陽性・sca-1 陽性・分化マーカー陰性細胞 (KSL 細胞)、特に CD34 陰性 [CD34(-)] KSL 細胞に含まれることが知られているが、この CD34(-) KSL 細胞にウイルスベクターによって Hes-1 の発現を誘導すると、移植モデルにおける造血再構築能を増加させる (Blood 101:1777-1783, 2003)。また応募者らのグループは、造血前駆細胞における Hes-1 の過剰発現は細胞を不死化させ、慢性骨髄性白血病

の原因遺伝子である *bcr-abl* と共発現させると白血病の急性転化に似た病態を引き起こし、さらにヒトの慢性骨髄性白血病の急性転化症例において実際に *Hes-1* が高発現している例があることを報告しており (Blood 115:2872-2881, 2010)、*Hes-1* と白血病の関連が近年注目されるようになった。

(2) *Hes-1* の発現振動

Hes-1 およびそのファミリー分子は、そのタンパク発現レベルが連続的に上下する、すなわち振動する、という特徴的な発現様式をとることがある。*Hes-1* タンパクは自らのプロモーター領域に結合することで、自分自身の発現を負に制御している。*Hes-1* タンパクはユビキチン化を受け分解されるが、その結果、抑制から解放され、再び転写が行われる。この繰り返しによって、発現振動が形成されると考えられている (Science 298:840-843, 2002)。マウス胎生期の体節形成では、2 時間ごとに 1 対ずつ体節が形成されるが、*Hes* ファミリー分子である *Hes-7* の発現も約 2 時間周期で振動しており、この発現振動が失われると体節形成不全が起こる (Nat Genetics 36:750-754, 2004)。また、神経系の発達においては、神経幹細胞のうち *Hes1* が高発現している時に分裂したものは自己複製を行い、発現が低下している時に分裂したものは分化へと進むといった、幹細胞の自己複製と分化におけるストキャスティックモデルの機構に *Hes1* 発現振動が関与しているという仮説が提唱されている (Neuron 58:52-64, 2008)。

一方で、中脳後脳境界など各脳の境界に位置する神経幹細胞は脳実質を形成する幹細胞と異なり、分裂は遅く分化した神経細胞を生まみ出さない。境界の神経幹細胞では *Hes-1* は発現振動をせず高発現レベルにとどまっております、これが分化抑制につながっていると考えられる (Development 133:2467-2476, 2006)。また、肝前駆細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の 2 つに分化する能力を持つが、*Hes-1* を欠損させると、肝細胞は正常に形成されるが、肝内胆管は作られない (Gastroenterology 127:1775-1786, 2004)。肝前駆細胞で *Hes-1* が発現振動しているかは明らかでないが、このように、*Hes-1* はその発現レベルによって未分化性の維持や分化の方向付けを調整していると考えられる。

(3) 血液細胞における *Hes-1* 発現様式

血液細胞においては、生理的条件下でも KSL 細胞で *Hes-1* 発現を認めるが、発現は振動しているのか、高発現状態が持続するのか、など、その発現様式は全く分かっておらず、分化に与える影響も不明である。

2. 研究の目的

血液細胞、特に造血幹細胞を含む未分化な

KSL 細胞において、*Hes-1* の発現様式を明らかにし、それが未分化性の維持や自己複製、あるいは分化の方向性に与えている影響を解明することを第一の研究目的とする。上述のように応募者らのグループはすでに KSL 細胞や骨髄系前駆細胞における *Hes-1* の強制発現がそれぞれ造血再構築能を上昇させたり白血病化にはたらいたりすることを報告しているが、特に発現振動がみられた場合は、(強制発現でなく)振動の破綻が白血病化を引き起こす可能性を追求し、今までに例のない新たな白血病の発症機序の発見につなげたい。

3. 研究の方法

(1) *Hes-1* 発現様式の解析

① *Hes-1* mRNA の解析

胎生 14 日目のマウス胎仔肝から、フローサイトメーターを用いて KSL 細胞 (*c-Kit* 陽性、*Sca-1* 陽性、分化マーカー陰性) を分取した。これを、*Delta-1/Fc* タンパクまたはコントロールとしての *Fc* タンパクをコーティングしたプレートで培養し、30 分毎の時系列を追って細胞を回収し、*Hes-1* mRNA 発現量を定量 PCR 法で解析した。

② *Hes-1* 発現振動の可視化

Hes1 プロモーターの下流にルシフェラーゼをコードする遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (*Hes-1-Ub2-luc* マウス) が京都大学ウイルス研究所の影山龍一郎先生の研究室で樹立されている。このマウスでは *Hes-1* プロモーターからの転写がオンになる状況下でルシフェラーゼが発現するため、このマウスの細胞の懸濁液にルシフェリンを加えることで、*Hes-1* の転写がオンの時にルシフェリン/ルシフェラーゼ反応による発光を顕微鏡下にとらえることができる (PNAS 103:1313-1318, 2006)。

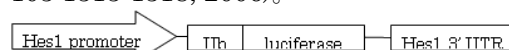


図 1 *Hes-1-Ub2-luc* マウスに導入されているコンストラクト

このマウスの胎仔肝から KSL 細胞をフローサイトメーターで分取した。Notch 受容体のリガンドである *Delta-1* を強制発現させた OP9 細胞の上に分取した KSL 細胞を置き、顕微鏡下に連続撮影を行って *Hes-1* 発現を示す発光反応を経時的に追った。

(2) 白血病モデルにおける *Hes-1* の役割

影山先生から供与いただいた *Hes-1* ノックアウトマウスおよび野生型マウスから骨髄系共通前駆細胞 (CMP) を分取し、レトロウイルスを用いて *MLL-AF9* を導入した。これを致死量の放射線を照射した野生型マウスに移植し、生存期間を解析した。

4. 研究成果

(1) Hes-1 の発現振動の証明

① Hes-1 mRNA の発現振動の可能性

Delta-1/Fc による Notch シグナルへの刺激の存在下で、mRNA の発現レベルを定量 PCR 法で解析した。図 2 に示す通り、全体として、1 回目のピークを皮切りに、およそ 2 時間ごとに数度の発現ピークが認められた。しかし、本解析からは、個々の細胞での発現振動が起きているかは不明であった。

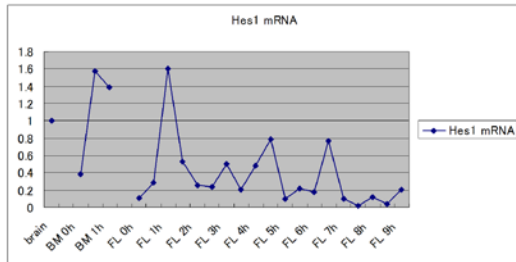


図 2 Hes-1 mRNA 発現振動

胎仔脳(brain)を 1 とし解析。胎仔肝 KSL(FL)の発現を 8 時間まで追った。BM: 成体マウス骨髄。

② 単一細胞における Hes-1 発現振動の可視化
Hes-1-Ub2-luc マウスの胎仔肝 KSL 細胞を、Delta-1 を強制発現させた OP9 細胞上で培養し、個々の細胞での Hes-1 発現を可視化した(図 3, 4)。

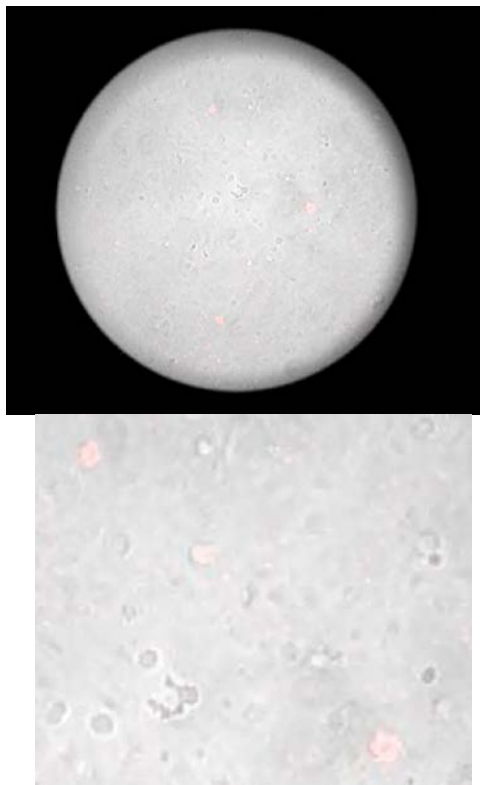


図 3 Hes-1 発現を示す発光

(上)Hes-1 発現の上昇は淡い赤色で示されている。(下)拡大図。発光は細胞像と一致して観察され、単一細胞レベルで同定が可能。

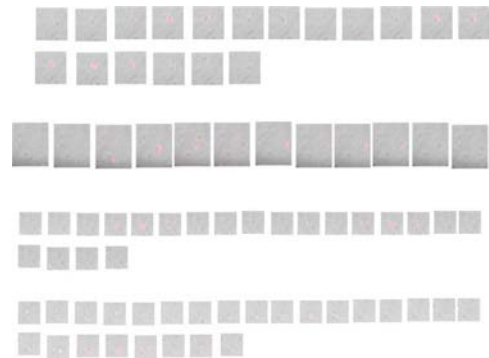


図 4 Hes-1 発現振動

同一の細胞で発光の連続した on-off、すなわち発現振動が確認された。

これらから、Hes-1 は血液前駆細胞において発現が振動しうることが確認された。その意義を解析するため、まずはノックアウトマウスを用いて Hes-1 の白血病における役割を解析した。

(2) MLL-AF9 白血病モデルにおける Hes-1 の腫瘍抑制的はたらき

MLL-AF9 融合因子を野生型マウス由来 CMP に導入し、致死量放射線照射マウスに移植すると白血病を発症する。Hes-1 ノックアウトマウス由来 CMP で同様の実験を行うと、野生型の場合よりも早期に死亡することが確認された(図 5)

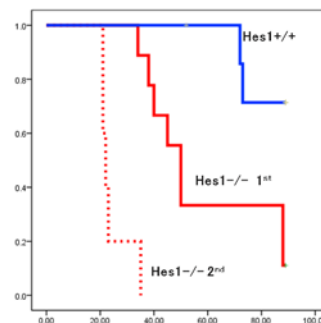


図 5 MLL-AF9 白血病における Hes-1 のはたらき

Hes-1 野生型(Hes1+/+)と比較して、Hes-1 ノックアウトマウスの場合(Hes1-/- 1st)、MLL-AF9 導入による白血病死が早まる。2 回目の移植では(Hes1-/- 2nd)さらに早まる。

このことから、MLL-AF9 による白血病モデルにおいて、Hes-1 は腫瘍抑制的にはたらいていることが示唆された。

ノックアウトマウスでは Hes-1 の発現は抑制されたままであり、発現の「振動」のはたらきは現時点で明らかにできなかった。神経細胞での発現振動の役割を考えると、特に正常分化の過程において、ひとつの細胞が 2 つの細胞運命のうちどちらに向かうか、の制御に重要である、といった仮説を考えており、今後の課題として検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Takayasu Kato, Mamiko Sakata - Yanagimoto, Yasuyuki Miyake, Hidekazu Nishikii, Yasuhisa Yokoyama, and Shigeru Chiba. Transcription Factor Hes1 Functions As a Tumor Suppressor in MLL-Associated Acute Leukemia. 第 54 回米国血液学会. 2012 年 12 月 08 日～2012 年 12 月 11 日. Georgia World Congress Center. アトランタ、米国.

(2) Takayasu Kato, Mamiko Sakata - Yanagimoto, Yasuyuki Miyake, Hidekazu Nishikii, Yasuhisa Yokoyama, and Shigeru Chiba. Transcription factor Hes1 functions as a tumor suppressor in MLL-associated acute leukemias. 第 74 回日本血液学会. 平成 24 年 10 月 19 日～21 日. 国立京都国際会館. 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 泰久 (YOKOYAMA YASUHISA)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70512820