

博士論文(要約)

G0 phase analysis of Hematopoietic Stem Cell in

mVenus-p27K⁻ mice

(mVenus-p27K⁻マウスを用いた造血幹細胞の G0 期の解析)

福島 剛

目次

略語 3-6

要旨 7

序文 8-12

方法 13-22

要約 23-24

文献 25-35

謝辞 36

略語

5-FU: 5- fluorouracil

ACK: Ammonium-Chloride-Potassium

AM: acetoxymethyl ester

APC: allophycocyanin

Atg12: Autophagy-related protein 12

BrdU: Bromodeoxyuridine

BDF1: B6D2F1

BV: Brilliant Violet

CaMK: Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase

CaMKK2: Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2

CD: Cluster of differentiation

CDK: Cyclin dependent protein kinase

CLP: common lymphoid progenitor

CMP: common myeloid progenitor

Cre: Cre recombinase

CREB: cAMP response element binding protein

Cy7: cyanin 7

DNA: deoxyribonucleic acid

DP: double positive

ES: embryonic stem

EPO: erythropoietin

ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase

Flt3: fms like tyrosine kinase 3

GFP: Green fluorescent protein

GMP: granulocyte/macrophage progenitor

HIF1a: Hypoxia inducible factor 1 alpha

KI: knock in

LPS: Lipopolysaccharide

LT-HSCs: long-term hematopoietic stem cells

MCU1: mitochondrial calcium uniporter1

MEP: megakaryo/erythroid progenitor

MFI: mean fluorescent intensity

Mfn2: Mitofusin 2

mTOR: mammalian target of rapamycin

MPP: multi-potent progenitor

MPs: myeloid progenitors

NFAT: Nuclear factor of activated T cells

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

Pdk: Pyruvate dehydrogenase kinase

PE: Phycoerythrin

PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PolyIC: polyinosinic-polycytidylic acid

Ras: Rat sarcoma viral oncogene

RASAL1: RasGAP-activating-like protein 1

GAP: GTPase-activating proteins

GTP: Guanosine triphosphate

Rb: Retinoblastoma

SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

Sca1: stem cell antigen 1

SCF: stem cell factor

ST-HSCs: short-term hematopoietic stem cells

TSC: Tuberos sclerosis complex

TPO: thrombopoietin

Vav1: Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1

VHL: Von Hippel–Lindau

WT: wild type

要旨

造血幹細胞は自己複製能と全ての血球の再構築能を併せ持った細胞であり、多くは細胞周期が休止期（G0期）で、必要時に細胞分裂を行い、血球を維持している。造血幹細胞の休止期から細胞周期への進行がどのように調節されているかについては未だに解明されていない。

以前に当研究室では p27 の不活性化変異体 p27K に蛍光タンパクの mVenus を融合した新規 G0 マーカーである mVenus-p27K を作成した。今回、新規 G0 マーカーを Rosa26 遺伝子座にノックインしたマウスを作成し、造血幹細胞の休止期から細胞周期への進行の早期に生じる調節機構の解析を行った。

造血幹細胞の休止期では特に細胞質内のカルシウム濃度が高く、細胞周期への進行の抑制に関与している可能性が示唆された。

序文

造血幹細胞は自己複製能とすべての血球の再構築能を併せ持つ細胞で、実験的には致死量放射線照射された動物への移植にて長期に全血球の再構築が可能な細胞と定義される¹。

成体マウスでは造血幹細胞の多くは骨髄に存在し、その多くが G0 期であり、定常状態での血球の維持や、出血、炎症などのストレス時に必要な血球の産生を行うと考えられている²。

定常状態の造血幹細胞の分裂頻度については BrdU によるラベルリテイニングアッセイ³、H2B-GFP によるラベルリテイニングアッセイ³、Tie2-Cre によるトラッキング⁴を用いて 110 日から 170 日に 1 度程度と非常に低いと推測された。また H2B-GFP のラベルリテイニングアッセイでは定常状態の造血幹細胞では 2-3 ヶ月齢からの 9-10 ヶ月の間で分裂回数の増加に応じて、徐々に分裂頻度が低下し、4 回分裂以後は分裂を生じなくなるという報告もあり、分裂頻度は一定ではなく若年では比較的高く、老年では非常に低くなっている可能性が示された⁵。

トランスポゾンを利用したゲノムバーコード⁶、Poly-loxP を用いたバーコード⁽⁷⁾、Tie2-Cre によるリネージトラッキング⁴では 6-8 週齢マウスにて 26-44 週間の間では造血幹細胞の分化血球細胞への寄与は低く、より分化した

前駆細胞以下の分画が分化血球の維持をしていると推測された。一方で **Pdzk lip1-Cre** でのトラッキングでは 16 週間、骨髄球系の細胞、36 週間までにリンパ系の細胞への寄与を強く認め、造血幹細胞が定常状態の造血を維持している可能性も示された⁸。

これまでに造血幹細胞の細胞周期の進行、G0 期の維持に関与する因子は多数報告されている。早期の細胞周期の進行に関与する因子である **CyclinD1/2/3** トリプルノックアウト⁹、**CDK4/6**¹⁰ のダブルノックアウトでは血液細胞の分裂が障害され胎性致死する事が知られている。**CDK6** 単独のノックアウトは定常状態の造血幹細胞には変化がみられなかったが、移植、**5-FU** 投与によるストレス状態での造血幹細胞の細胞周期の進行が抑制された¹¹。**CyclinE1** の単独ノックアウトでも定常状態の若年造血幹細胞には変化がみられなかったが、**5-FU** 投与によるストレス状態では造血幹細胞の細胞周期の進行が抑制された¹²。一方で **CDK2** は **CDK4** との **double** ノックアウトでも造血幹細胞の割合、細胞周期に変化はみられなかった¹³。

Rb family 蛋白は **CDK** によりリン酸化されると **E2F** 転写活性の抑制を解除することが知られている。**G1** 期が進行すると、ある時点で成長因子が無くても分裂を完了できるようになるポイントが存在し、**R** ポイントと言われている。また **R** ポイントは **Rb** のリン酸化と一致するという報告がある¹⁴。造血幹細

胞では Rb1/p130/p107 のトリプルノックアウトにて造血幹細胞の細胞周期の亢進を認めたが Rb1/p130 のダブルノックアウトでは亢進はみられなかった¹⁵。

CIP/KIP ファミリーの CDK inhibitor である p57 ノックアウトでは造血幹細胞数、骨髄再構築能の低下、細胞周期の亢進がみられた。p27、p21 はそれぞれ単独のノックアウトでは造血幹細胞の割合、骨髄再構築能、細胞周期に変化はみられなかった¹⁶。また p53 のノックアウトは造血幹細胞の細胞周期の進行を促進するため p53 は定常状態の造血幹細胞で細胞周期の進行の抑制に関与することが示唆されたが、この効果は p21 非依存性であった¹⁷。これらより G1 期サイクリン/CDK は造血幹細胞の細胞周期への進行には必須であり、その作用を p57 が抑制していると考えられている。

骨髄は低酸素環境であることが知られており¹⁸、HIF1 α のノックアウトでは造血幹細胞の細胞周期の亢進を認め、反対に HIF1 α の分解に関与するユビキチンリガーゼの VHL のノックアウトでは細胞周期の抑制を認めた¹⁹。HIF1 α のノックアウトでは好気代謝の亢進を認め、HIF1 α のノックアウトによる好気代謝の亢進と細胞周期進行の促進は Pdk2 または Pdk4 の過剰発現により減弱した²⁰。これらより造血幹細胞において代謝の活性化と細胞周期の進行促進との関連があることが示唆される。

また TSC のノックアウトは造血幹細胞でミトコンドリアの酸化的リン酸化

の活性を増加させ、細胞周期の進行を促進し²¹、**Atg12** のノックアウトではミトファジーが低下し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の活性を増加、細胞周期の進行の促進を生じた²²。**mTOR** パスウェイは α -ケトグルタル酸、アミノ酸などにより調節される事が知られており²³、オートファジーはその下流である²⁴ ことから造血幹細胞において代謝と細胞周期の関連があることが示唆される。

造血幹細胞では細胞質内カルシウムが高いことが知られている²⁵。**Mfn2** ノックアウトは造血幹細胞の細胞質内カルシウムの増加、**NFAT** 活性化によるリンパ系への分化抑制を認められ、また **CD150-High** の造血幹細胞は **Mfn2** の **expression** が低かった²⁶。**CD150-High** 造血幹細胞は骨髄球系の分化バイアスを有していることが知られており²⁶、**CD150-High** における分化バイアスと細胞質内高カルシウムの関与が示唆された。また一方で **non-canonical wnt** シグナルは造血幹細胞にて **L** 型カルシウムチャネルによる細胞質内カルシウムの増加を抑制し、**NFAT** の活性化を抑制することが報告されている。また恒常活性型 **NFAT** の過剰発現は造血幹細胞の細胞周期の進行を促進し、**NFAT** の **inhibitor** は細胞周期の進行を抑制した²⁷。カルシウム依存性因子の **CaMKK2** のノックアウトは造血幹細胞の細胞周期の進行を促進するという報告がある²⁸。造血幹細胞ではカルシウムによる細胞周期の調節は促進的、抑制的要素を

共に有すると考えられた。

p27 は CDK inhibitor の一つで、G0 期から G₁ 期への進行時に細胞質へ移行したのち^{29,30}、E3 ligase KPC によりユビキチン化され、プロテアソームにより分解される³¹。当研究室では以前に p27 を用いた新規 G0 マーカー開発を行った³²。p27 の CDK binding domain の mutant (p27K) は CDK 活性を抑制しないことが知られており³³、p27K と mVenus の融合蛋白 mVenus-p27K を作成し、mVenus-p27K が NIH-3T3 にて細胞分裂を抑制することなく、G0 期のみをマークすることが示されている³²。

今回私は、新規 G0 マーカーである mVenus-p27K をノックインしたマウスを作成し、造血幹細胞の G0 期から細胞周期の進行の調節機序について解析を行った。

方法

動物

C57BL/6N マウスは日本 SLC (静岡, 日本) から購入した。C57BL/6-Ly5.1 マウスは三共ラボサービス (筑波, 日本) から購入した。

Rosa^{mVenus-p27K-KI}-マウス系統樹立のためターゲティングベクターとして STOP-eGFP-ROSA26TV (理研, 横浜, 日本) に *mVenus-p27K*³² をサブクローニングした。KY1.1 ES 細胞 (大阪大学, 大阪, 日本) へ既報の通りにエレクトロポレーション、スクリーニングを行った³⁵。ホモログスリコンビネーションを生じた ES 細胞クローンの同定のため、下記プライマーにてゲノム PCR を行った。

Primer1 (5'-ctctatggcttctgaggcggaaagaaccag-3')

Primer2 (5'-ctttaagagccatggcaatgttcaagcagg-3')

PCR にてバンドの検出できたクローンに対して、*EcoR I* で処理したゲノム DNA を 5'external probe を用いてサザンブロットを行った。

ホモログスリコンビネーションを生じた ES 細胞クローンを、C57BL/6 × BDF1 マウス由来の胚盤胞に注入した。生まれたキメラマウスの雄を C57BL/6 マウスの雌と交配しノックインアレルを有する *Rosa^{mVenus-p27K-KI}*-マウス系統を樹立した。樹立した *Rosa^{mVenus-p27K-KI}*-マウスと *Vav1-Cre* マウス³⁵ と交配

した。

動物を用いたすべての実験は、東京大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

マウス遺伝子型確認

Rosa^{mVenus-p27K-Kl}-マウスは系統樹立後、尾先端を採取し 50 mN NaOH 300 μ l 95°Cにて 15 分煮沸後、1M Tris-HCl 50 μ l で中和にて抽出したゲノム DNA を以下のプライマーセットを用い PCR を行った。382 bp のバンドのみを認めるものを変異型ホモ接合体、255 bp のバンドのみを認めるものを野生型ホモ接合体、382 bp と 255 bp の 2 つバンドを認めるものをヘテロ接合体と判定した。

変異アリル/野生型アリル共通 Fowrd: 5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGT-3'

変異アリル Reverse: 5'-GGGTCGTTTGTTCGGATCCAT-3'

野生型アリル Reverse: 5'-CACCAGGTTAGCCTTAAGCC-3'

フローサイトメトリー解析

末梢血は経尾静脈的に採取した。胸腺、脾臓は安楽死処置を施したマウスより摘出後、45 μ m ナイロンフィルター上ですりつぶし、PBS に懸濁すること

で細胞浮遊液を調整した。骨髄は両大腿骨、脛骨を採取し、両端を剪刀で切り落とし 21 G 清針を用い PBS にてフラッシュアウトし採取した。末梢血、脾臓、骨髄は ACK lysis buffer (150 mM ammonium chloride, 10 mM potassium bicarbonate, 10 μ M EDTA disodium) にて溶血処理を行った。骨髄は biotin-conjugated anti-Gr1 antibody (Clone: RB6-8C5, BioLegend, San Diego, CA, USA) 、 biotin-conjugated anti-Mac1 antibody (Clone: M1/70, BioLegend, San Diego, CA, USA) 、 biotin-conjugated anti-Ter119 antibody (Clone: TER-119, BioLegend, San Diego, CA, USA) 、 biotin-conjugated anti-B220 antibody (Clone: 53-7.3, BioLegend, San Diego, CA, USA) (1:1000) にて 4°C 10 分で反応した。1500 rpm で 5 分遠心し上清を除いた後、300 μ l で再懸濁し、streptavidin-microbeads (Miltenyi Biotec, BG, GER) 6 μ l を加え 4°C 15 分で反応し、MACS カラム (Miltenyi Biotec, BG, GER) にて磁気細胞分離を行った。上記で調整した細胞を以下の抗体と Propidium Iodide または Diamidino-Phenylidole にて染色した。フローサイトメトリー解析は BD フローサイトメトリー Aria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 、 BD フローサイトメトリー Verse (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) にて行った。

PE-conjugated anti-CD45.1 antibody (Clone: A20, BioLegend, San Diego, CA, USA)

APC-Cy7-conjugated anti-CD45.2 antibody (Clone: 104, BioLegend, San Diego, CA, USA)

APC-conjugated anti-Gr1 antibody (Clone: RB6-8C5, BioLegend, San Diego, CA, USA)

APC-conjugated anti-Mac1 antibody (Clone:M1/70, BioLegend, San Diego, CA, USA)

PE-Cy7-conjugated anti-B220 antibody (Clone:RA3-6B2, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV421-conjugated anti-CD4 antibody (Clone:GK1.5, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV421-conjugated anti-CD8a antibody (Clone:53-6.7, BioLegend, San Diego, CA, USA)

PE-conjugated anti-CD150 antibody (Clone:TC15-12F12.2, BioLegend, San Diego, CA, USA)

APC-conjugated anti-CD150 antibody (Clone:TC15-12F12.2, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV605-conjugated anti-CD150 antibody (Clone:TC15-12F12.2, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV421-conjugated anti-CD48 antibody (Clone:HAM48-1, BioLegend, San Diego, CA, USA)

eF450-conjugated anti-CD34 antibody (Clone:RAM34, e-Bioscience, San Diego, CA, USA)

PE-Cy7-conjugated anti-Flt3 antibody (Clone:, BioLegend, San Diego, CA, USA)

APC-conjugated anti-Sca1 antibody (Clone: D7, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV421-conjugated anti-Sca1 antibody (Clone: D7, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV785-conjugated anti-Sca1 antibody (Clone: D7, BioLegend, San Diego, CA, USA)

PE-Cy7-conjugated anti-cKit antibody (Clone: 2B8, BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV605-conjugated streptavidin (BioLegend, San Diego, CA, USA)

BV421-conjugated streptavidin (BioLegend, San Diego, CA, USA)

PE-tex-conjugated streptavidin (BioLegend, San Diego, CA, USA)

細胞質内カルシウムの測定は CaSiR (五稜化学, 札幌, 日本) 0.3 μ M にて 5%CO₂ 存在下 37°C にて 30 分行った。ミトコンドリアカルシウムの測定は Rhod2 (Abcam, Cambridge, UK) 0.3 μ M にて 5%CO₂ 存在下 37°C にて 30 分行った。

得られたデータは FlowJo software (FlowJo, LCC, Ashland, OR, USA) で解析した。

細胞内抗原染色

表面抗原染色後の骨髄 Lineage-Negative 細胞を 4% Para-formaldehyde (PFA) (Wako, 大阪, 日本) 室温 15 分にて固定後、0.2% tritonX (Wako, 大阪, 日本) +10% Goat serum (Sigma-Aldrich, MO, USA) にて 4°C 60 分で透過処理とブロッキングを行い、下記の 1 次抗体にて 4°C 30 分で染色後、Alexa-Fluor 647-conjugated Goat anti-Rabbit IgG antibody にて 4°C 30 分にて染色した。フローサイトメトリー解析は BD フローサイトメトリー Aria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) にて行った。

APC-conjugated anti-Ki67 antibody (Clone: 16A8, BioLegend, San Diego,

CA, USA)

Alexa Fluor 647-conjugated anti-pRb (Ser807/811) antibody (Clone :

D20B12, Cell Signaling Technology, USA)

Alexa Fluor 647-conjugated anti-pS6 (Ser235/236) antibody (Clone :

D57.2.2E, Cell Signaling Technology, USA)

Rabbit anti-Cdk4 antibody (Clone : EPR17525, Abcam, Cambridge, UK)

mouse anti-Cdk6 antibody (Clone: DSC-87, Santa Cruz Biolechnology, CA,

USA)

Rabbit ant-pp130 antibody (Clone : EPR2389, Abcam, Cambridge, UK)

ラベルリテイニングアッセイ

BrdU (Sigma-Aldrich, MO, USA) を 800 μ g/ml の濃度で水に混ぜ、14 日間経口投与した。投与終了より Day 0、Day 60 にて骨髓細胞を採取し Lineage deletion、表面抗原染色の後、BrdU staining Kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) の Cytofix solution にて室温 20 分にて固定、Cytofix/permeabilize slution にて 15 分 4°C で透過処理、Cytofix solution にて室温 5 分にて再固定した。その後 300 μ g/ml の DNAase I 37°C で 1 時間反応し、APC-conjugated anti-BrdU antibody にて室温 20 分染色した。解析は BD フローサイトメトリ

ー Aria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) にて行った。

単細胞イメージング

骨髄より mVenus-High LT-HSCs、mVenus-Low HSCs、mVenus-Negative LT-HSCs、mVenus-Negative 2N LT-HSCs、mVenus-Negative 4N LT-HSCs、mVenus-High/CaSiR-High LT-HSCs、mVenus-High/CaSiR-Low LT-HSCs を 96 well U bottom plate (Corning, NY, USA) 1well に 1 細胞をソーティングした。Stem span (STEMCELL TECHNOLOGY, Vancouver, CAN)、mouse recombinant SCF (R&D system, MN, USA) 50 ng/ml、human recombinant TPO (R&D system, MN, USA) 50 ng/ml 下にて ECRIPSE Ti (Nikon, 東京, 日本) にて 10 倍位相差対物レンズ、FITC フィルターにて 30 分おきに 96 時間まで撮影した。取得した画像は NIS Element (Nikon, 東京, 日本) にて解析した。

阻害薬アッセイ

骨髄より mVenus-Positive LT-HSCs をソーティングし、Stem span (STEMCELL TECHNOLOGY, Vancouver, CAN)、mouse recombinant SCF (R&D system, MN, USA) 50ng/ml、human recombinant TPO (R&D system,

MN, USA) 50 ng/ml と阻害薬を以下の濃度にて 24 時間、5% CO₂ 37°Cにて培養した後、フローサイトメトリーにて解析を行った。阻害薬スクリーニングは東京大学創薬機構から提供を受けた作用点既知の 1280 の化合物それぞれ 3 μMにて行った。

PD0332991 (CDK4/6 inhibitor, AdooQ Bioscience, CA, USA) 1 μM

Roscobitine (CDK1/2 inhibitor, Cell Signaling Technology, USA) 20 μM

PD98059 (MEK1/2 inhibitor, Cell Signaling Technology, USA) 20 μM

Ly294002 (PI3K inhibitor, Cell Signaling Technology, USA) 20 μM

PP2 (SRC inhibitor, Abcam, Cambridge, UK) 5 μM

SB203580 (p38 MAPK inhibitor, Cell Signaling Technology, , USA) 10 μM、

Calcimycin (Calcium ionophore, Abcam, Cambridge, UK) 1 μM

Thapsigargin (SERCA inhibitor, Abcam, Cambridge, UK) 0.1 μM

同種骨髄移植

Rosa^{mVenus-p27K-Kl/-};Vav1-Cre⁺または Rosa^{mVenus-p27K-Kl/-};Vav1-Cre⁻マウスより採取した全骨髄細胞 2.5×10^5 、Rosa^{mVenus-p27K-Kl/-};Vav1-Cre⁺マウスより単離した mVenus-High LT-HSCs、mVenus-Low LT-HSCs、mVenus-Negative LT-HSCs 100 細胞、または Rosa^{mVenus-p27K-Kl/-};Vav1-Cre⁺マウスより単離した

mVenus-High/CaSiR-High LT-HSCs、 mVenus-High/CaSiR-Low LT-HSCs

100 細胞を C57B6/J マウスより採取した全骨髓細胞 2.5×10^5 と共に PBS 200 μ l に懸濁し、8-12 週齢の C57B6/J マウスに致死量放射線 (475 rad を 4 時間おきに 2 回) 照射した後に尾静注した。

統計解析

全ての統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。誤差の表記は、すべて標本平均の標準誤差 (standard error of the mean、SEM) である。2 群間の比較は、肉眼的に正規分布に従うことを確認したのち、F 検定を行い、比較対象群間にて両側 T 検定を行った。3 群間以上の比較は ANOVA の検定を行い、比較対象軍艦にて Tukey-kramer 法にて検定を行った。P<0.05 である場合を統計学的に有意であるとした。

要約

新規 G0 マーカーが G0 をマークしているかを評価するため、mVenus-p27K- と既存の細胞周期マーカーの比較を行った。G0 マーカー陽性細胞の大部分が Ki67-であり、mVenus-p27K-は血球系細胞においても G0 期をマークすることが確認された。また G0 マーカーは Ki67-でマークされる G0 期を G0 マーカーの蛍光強度により更に分離することが可能であることを示した。

造血幹細胞の G0 マーカーの蛍光強度ごとの細胞周期の評価では、In vitro の培養では造血幹細胞の G0 マーカー陽性細胞内で G0 マーカーの蛍光強度の異なる細胞間で分裂時間に差はみられなかったが、BrdU label retaining assay では G0 マーカーの蛍光強度の高い細胞は BrdU 陽性細胞の残存が多く、in vivo では造血幹細胞分画内では G0 マーカーの蛍光強度が高い細胞は分裂頻度が低いことを示した。

造血幹細胞の G0 マーカーの蛍光強度ごとの骨髄再構築能の評価では、G0 マーカーの発現の高い細胞で骨髄再構築能が高かく、G0 マーカーの発現の低い細胞、陰性の細胞では骨髄再構築能が低かった。G0 期の造血幹細胞の中でも既に、G0 マーカーの蛍光強度の低い細胞では骨髄再構築能が低下するということを示した。

G0 マーカーの調節機構の解析では、CDK4/6 inhibitor は培養による G0 マ

一カー発現減少を完全に抑制した。また G0 マーカーの発現が低い造血幹細胞への CDK4/6 inhibitor treat は G0 マーカーの発現を増加させた。造血幹細胞では G0 マーカーHigh から G0 マーカーLow/Negative への移行には CDK4/6 活性が必須であり、G0 マーカーLow では低い G0 マーカーの蛍光強度の維持には CDK4/6 の活性が必須であることが示された。

造血幹細胞は細胞質内カルシウム濃度が高かく、造血幹細胞分画内では G0 マーカーの蛍光強度が高い細胞で細胞質内カルシウム濃度が高いことが示された。また G0 マーカーの蛍光強度が高い造血幹細胞を細胞質内カルシウム濃度で分離すると、細胞質内カルシウムの高い分画では *in vitro* での分裂までの時間が長く、移植では骨髄再構築能が高い傾向があり、造血幹細胞では細胞質内カルシウム濃度が休止期の制御、幹細胞機能に関与する可能性が示唆された。

文献

- (1) Ryo Yamamoto, Yohei Morita, Jun Ooehara, Sanae Hamanaka, Masafumi Onodera, Karl Lenhard Rudolph, Hideo Ema, and Hiromitsu Nakauchi, Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells, *Cell* 154 (5), 1112–1126, 2013

- (2) Katherine Y. King and Margaret A. Goodell, Inflammatory modulation of HSCs, *Nature Review immunology* 11 (10), 685-692, 2011

- (3) Anne Wilson, Elisa Laurenti, Gabriela Oser, Richard C. van der Wath, William Blanco-Bose, Maike Jaworski, Sandra Offner, Cyrille F. Dunant, Leonid Eshkind, Ernesto Bockamp, Pietro Lio', H. Robson MacDonald, and Andreas Trumpp, Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair, *Cell* 135 (6), 1118–1129, 2008

- (4) Katrin Busch¹, Kay Klapproth¹, Melania Barile, Michael Flossdorf,

Tim Holland-Letz, Susan M. Schlenner, Michael Reth, Thomas Höfer and Hans-Reimer Rodewald, Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo, *Nature* 518 (7540), 542-546, 2015

(5) Jeffrey M. Bernitz, Huen Suk Kim, Ben MacArthur, Hans Sieburg, and Kateri Moore, Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions, *Cell* 167 (5), 1296–1309, 2016

(6) Jianlong Sun, Azucena Ramos, Brad Chapman, Jonathan B. Johnnidis, Linda Le, Yu-Jui Ho, Allon Klein, Oliver Hofmann and Fernando D. Camargo, Clonal dynamics of native haematopoiesis, *Nature* 514 (7522), 322-327, 2014

(7) Weike Pei, Thorsten B. Feyerabend, Jens Rössler, Xi Wang, Daniel Postrach, Katrin Busch, Immanuel Rode, Kay Klapproth, Nikolaus Dietlein, and Claudia Quedenau, Wei Chen, Sascha Sauer, Stephan Wolf, Thomas Höfer, Hans-Reimer Rodewald, Polylox barcoding reveals haematopoietic stem cell fates realized in vivo, *Nature* 548 (7668), 456-460, 2017

(8) Catherine M. Sawai, Sonja Babovic, Samik Upadhaya, David J.H.F. Knapp, Yonit Lavin, Colleen M. Lau, Anton Goloborodko, Jue Feng, Joji Fujisaki, Lei Ding, Leonid A. Mirny, Miriam Merad, Connie J. Eaves, and Boris Reizis, Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals, *Immunity* 45 (3), 597-609, 2016

(9) Katarzyna Kozar, Maria A. Ciemerych, Vivienne I. Rebel, Hirokazu Shigematsu, Agnieszka Zagozdzon, Ewa Sicinska, Yan Geng, Qunyan Yu, Shoumo Bhattacharya, Roderick T. Bronson, Koichi Akashi, and Piotr Sicinski, Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins, *Cell* 118 (4), 477–491, 2004

(10) Marcos Malumbres, Rocío Sotillo, David Santamaría, Javier Galán, Ana Cerezo, Sagrario Ortega, Pierre Dubus, and Mariano Barbacid, Mammalian Cells Cycle without the D-Type Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6, *Cell* 118 (4) , 493–504, 2004

(11) Ruth Scheicher, Andrea Hoelbl-Kovacic, Florian Bellutti, Anca-Sarmiza Tigan, Michaela Prchal-Murphy, Gerwin Heller, Christine Schneckleithner, Mar'ia Salazar-Roa, Sabine Z'ochbauer-M'uller, Johannes Zuber, Marcos Malumbres, Karoline Kollmann, and Veronika Sexl, CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation, *Blood* 125 (1),90-101, 2015

(12) Stefano Campaner, Andrea Viale, Serena De Fazio, Mirko Doni, Francesca De Franco, Luana D'Artista, Domenico Sardella, Pier Giuseppe Pelicci, and Bruno Amati, A non-redundant function of cyclin E1 in hematopoietic stem cells, *Cell Cycle* 12 (23), 3663–3672, 2013

(13) Senthil Raja Jayapal, Chelsia Qiuxia Wang, Xavier Bisteau, Matias J. Caldez, Shuhui Lim, Vinay Tergaonkar, Motomi Osato, and Philipp Kaldis, Hematopoiesis specific loss of Cdk2 and Cdk4 results in increased erythrocyte size and delayed platelet recovery following stress, *Hematologica* 100 (4), 431-438, 2015

(14) Guang Yao, Tae Jun Lee, Seiichi Mori, Joseph R. Nevins, and Lingchong You, A bistable rb - $e2F$ switch underlies the restriction point, *Nature Cell Biology* 10 (4), 476-482, 2008

(15) Patrick Viatour, Tim C. Somervaille, Shivkumar Venkatasubrahmanyam, Scott Kogan, Margaret E. McLaughlin, Irving L. Weissman, Atul J. Butte, Emmanuelle Passegue', and Julien Sage, Hematopoietic Stem Cell Quiescence Is Maintained by Compound Contributions of the Retinoblastoma Gene Family, *Cell Stem Cell* 3 (4), 416-428, 2008

(16) Akinobu Matsumoto, Shoichiro Takeishi, Tomoharu Kanie, Etsuo Susaki, Ichiro Onoyama, Yuki Tateishi, Keiko Nakayama, and Keiichi I. Nakayama, p57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells, *Cell Stem Cell* 9 (3), 262-271, 2011

(17) Yan Liu, Shannon E. Elf, Yasuhiko Miyata, Goro Sashida, Yuhui Liu,

Gang Huang, Silvana Di Giandomenico, Jennifer M. Lee, Anthony Deblasio, Silvia Menendez, Jack Antipin, Boris Reva, Andrew Koff, and Stephen D. Nimer, p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence, *Cell Stem Cell* 4 (1), 37–48, 2009

(18) César Nombela-Arrieta, Gregory Pivarnik, Beatrice Winkel1, Kimberly J. Canty1, Brendan Harley, John E. Mahoney, Shin-Young Park, Jiayun Lu, Alexei Protopopov and Leslie E. Silberstein, Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment, *Nature Cell Biology* 15 (5), 533-543, 2013

(19) Keiyo Takubo, Nobuhito Goda, Wakako Yamada, Hirono Iriuchishima, Eiji Ikeda, Yoshiaki Kubota, Haruko Shima, Randall S. Johnson, Atsushi Hirao, Makoto Suematsu, and Toshio Suda, Regulation of the HIF-1a Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells, *Cell Stem Cell* 7 (3), 391–402, 2010

(20) Keiyo Takubo, Go Nagamatsu, Chiharu I. Kobayashi, Ayako Nakamura-Ishizu, Hiroshi Kobayashi, Eiji Ikeda, Nobuhito Goda, Yasmeen Rahimi, Randall S. Johnson, Tomoyoshi Soga, Atsushi Hirao, Makoto Suematsu, and Toshio Suda, Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells, *Cell Stem Cell* 12 (1), 49–61 , 2013

(21) Chong Chen, Yu Liu, Runhua Liu, Tsuneo Ikenoue, Kun-Liang Guan, Yang Liu, and Pan Zheng, TSC – mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species, *The Journal of Experimental Medicine* 205 (10), 2397-2408, 2008

(22) Theodore T. Ho, Matthew R. Warr, Emmalee R. Adelman, Olivia M. Lansinger, Johanna Flach, Evgenia V. Verovskaya, Maria E. Figueroa & Emmanuelle Passegué, Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells, *Nature* 543 (7644), 205-210, 2017

(23) Jenna L. Jewell, Ryan C. Russell and Kun-Liang Guan, Amino acid signalling upstream of mTOR, *Nature Review Molecular Cell Biology* 14 (3), 133-139, 2013

(24) Christopher A. Lamb, Tamotsu Yoshimori and Sharon A. Tooze, The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex, *Nature Review Molecular Cell Biology* 14(12), 759-774, 2013

(25) Larry L. Luchsinger, Mariana Justino de Almeida, David J. Corrigan , Melanie Mumau and Hans-Willem Snoeck, Mitofusin maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential, *Nature* 529 (7587), 528-531, 2017

(26) Yohei Morita, Hideo Ema, and Hiromitsu Nakauchi, Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment, *Journal of Experimental Medicine* 207 (6), 1173-1182, 2010

(27) Ryohichi Sugimura, Xi C. He, Aparna Venkatraman, Fumio Arai,

Andrew Box, Craig Semerad, Jeffrey S. Haug, Lai Peng, Xiao-bo Zhong,
Toshio Suda, and Linheng Li, Noncanonical Wnt Signaling Maintains
Hematopoietic Stem Cells in the Niche, *Cell* 150 (2), 351–365, 2012

(28) Luigi Racioppi, William Lento, Wei Huang, Stephanie Arvai, Phuong L
Doan, Jeffrey R Harris, Fernando Marcon, Helder I Nakaya, Yaping Liu and
Nelson Chao, Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase regulates
hematopoietic stem and progenitor cell regeneration, *Cell Death and
Disease* 8 (10), e3079, 1-12, 2017

(29) Noriko Ishida, Taichi Hara, Takumi Kamura, Minoru Yoshida, Keiko
Nakayama, and Keiichi I. Nakayama, Phosphorylation of p27Kip1 on
Serine 10 Is Required for Its Binding to CRM1 and Nuclear Export, *The
Journal of Biological Chemistry* 277 (17), 14355-14358, 2002

(30) Etsuo Susaki, Keiko Nakayama, and Keiichi I. Nakayama, Cyclin D2
Translocates p27 out of the Nucleus and Promotes Its Degradation at the
G0-G1 Transition, *Molecular and Cellular Biology* 27 (13), 4626-4640, 2007

(31) Takumi Kamura, Taichi Hara, Masaki Matsumoto, Noriko Ishida, Fumihiko Okumura, Shigetsugu, Hatakeyama, Minoru Yoshida, Keiko Nakayama and Keiichi I. Nakayama, Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27Kip1 at G1 phase, *Nature Cell Biology* 6 (12), 1229-1235, 2004

(32) Toshihiko Oki, Koutarou Nishimura, Jiro Kitaura, Katsuhiko Togami, Akie Maehara¹, Kumi Izawa, Asako Sakaue-Sawano, Atsushi Niida, Satoru Miyano, Hiroyuki Aburatani, Hiroshi Kiyonari, Atsushi Miyawaki and Toshio Kitamura, A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K⁻, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition, *Scientific Reports* 4, 4012, 2014

(33) Jaromir Vlach, Silke Hennecke and Bruno Amati, Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, *The EMBO Journal* 16 (17), 5334-5344, 1997

(34) Kenichiro Ikeda, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Yuichiro Nakata, Yasuyuki Sera, Akiko Nagamachi, Takahiko Miyama, Hiroshi Kobayashi, Keiyo Takubo, Akinori Kanai, Hideaki Oda, Linda Wolff, Zen-ichiro Honda, Tatsuo Ichinohe, Akio Matsubara, Toshio Suda, Toshiya Inaba, Hiroaki Honda, Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency, Scientific Report 6, 29454, 2016

(35) Jasper de Boer, Adam Williams, George Skavdis, Nicola Harker, Mark Coles, Mauro Tolaini, Trisha Norton, Keith Williams, Kathleen Roderick, Alexandre J. Potocnik and Dimitris Kioussis, Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre, Eur. J. Immunol 33 (2), 314-325, 2003

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の
東京大学医学系研究科細胞療法分野 北村俊雄教授、合山進准教授、田中洋介
助教、福山朋房助教に深く感謝申し上げます。

マーカーマウス設計を行っていただきました沖俊彦博士、マーカーマウスラ
インの樹立を行っていただきました広島大学 疾患モデル解析研究分野 本田
浩章教授に深く感謝申し上げます。

日常の議論を通じ貴重なご意見を賜りました東京大学医学系研究科細胞療法
分野の浅田修平氏、斎賀真言氏、林康貴氏、永瀬玲奈氏、藤野尠至氏、宮下和
也氏、佐藤成氏、竹田玲奈氏、山本圭太氏、米澤大志、劉瀟瀟氏、田村萌氏、
三神慧子氏に深く感謝申し上げます。日々の実験活動を支持頂いた土屋秋穂氏、
四方紫織氏、原示郁氏、土野香織氏に深く感謝申し上げます。

福島 剛