

博士論文

造血幹細胞における **Wnt** シグナルの役割

岡村 敏志

## 目次

1. 略語表	1
2. 要旨	4
3. 序文	5
4. 方法	11
5. 結果	23
6. 考察	35
7. 謝辞	42
8. 引用文献	43
9. 図表	53

## 1. 略語表

AGM	aorta-gonad-mesonephros
APC	allophycocyanin
BM	bone marrow
BMC	bone marrow cells
BrdU	bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
CamKII	Ca <sup>2+</sup> / calmodulin-dependent protein kinase II
CD	cluster of defferentiation
cDNA	complementary DNA
Cre	Cre recombinase
Cre-ERT2	Cre recombinase - estrogen receptor T2
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FL	fetal liver

Fz	frizzled
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSC	hematopoietic stem cell
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin
KSL	c-Kit positive, Sca-1 positive, lineage marker negative
LeptinR	Leptin receptor
Lin	lineage marker
LRP 5 / 6	low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 / 6
Ly5.1	C57BL / 6 Ly-5 congenic
Ly5.2	C57BL / 6
PB	peripheral blood
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	phenol : chloroform : isoamylalcohol
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR $\alpha$	platelet-derived growth factor receptor alpha
PE	phycoerythrin
PFA	paraformaldehyde



PI	propidium iodide
PIPC	polyinosinic:polycytidylic acid
PKC	protein kinase C
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase-PCR
SAV	streptoavidin
SCEM	super cyoembedding medium
SCF	stem cell factor
SDF-1	stromal cell derived factor 1
SDS	sodium lauryl sulfate
SM	staining medium
ST	SCF + TPO
ST5a	SCF + TPO + Wnt5a
TPO	thrombopoietin
Tx	transplantation
VECad	vascular endothelial cadherin
W / O	with or without
WT	wild type
YS	yolk sac

## 2. 要旨

造血幹細胞はニッチと呼ばれる微小環境により制御されているが、生体における制御機構は解明されていない。近年、造血幹細胞の制御機構の一つとして noncanonical Wnt 経路が重要であると報告されたが詳細な機構は明確でない。私は代表的 noncanonical Wnt タンパク質である Wnt5a が造血幹細胞に対する生体制御因子であるとの仮説を立て、Cre / loxP システムを用いて *in vivo* 解析を行った。その結果、Tie2-Cre 陽性細胞が供給する Wnt5a が造血幹細胞を維持することが示された。本研究により、造血幹細胞制御において血管性ニッチである血管内皮細胞の供給する Wnt5a の重要性が示唆された。

### 3. 序文

幹細胞は多分化能と自己複製能を持つ細胞と定義される。生体において幹細胞は分化細胞を供給し、幹細胞の維持を行っている。幹細胞の中でも、古くから研究されている造血幹細胞（hematopoietic stem cell : HSC）は、全ての血球の基となる細胞であり、一つの細胞でも生体の全種類の血球を供給する能力を持つと同時に自己複製を行う（1）。生体において HSC はニッチと呼ばれる微小環境によって制御されると考えられているが、その制御機構は未だ明らかになっていない。HSC の制御機構が解明され、HSC の体外増幅が可能となれば、ドナーに頼らない造血幹細胞移植や血液細胞の供給が可能となると期待されている。

HSC の自己複製は細胞分裂を介して行われる。HSC は *in vitro* において無刺激では細胞分裂が起こらないことから、外部刺激によるシグナル伝達によって自己複製が誘導されると考えられる。HSC を刺激し、HSC の細胞分裂を誘導すると考えられている因子には interleukin-3（IL-3）、interleukin-6（IL-6）、interleukin-11（IL-11）、stem cell factor（SCF）、thrombopoietin（TPO）、Flt3-ligand などが知られており、それらの組み合わせが HSC に与える影響が解析されてきた（2）。先行研究により、限定的であるが *in vitro* で HSC の自己複製を誘導させる組み合わせが分かってきた。マウス HSC は無血清培地で SCF と TPO 存在下で培養すると、高効率で細胞分裂が誘導され、コロニー形成が促進される。また、培養後の細胞を移植すると長期骨髄再構築能を示すことから（3）、SCF と TPO 刺激により HSC の自己複製が誘導

されると考えられる。

SCF と TPO によるシグナル伝達や HSC 制御に関しては多くの報告がある。SCF は受容体チロシンキナーゼである c-Kit と結合し、Ras / Erk シグナルや PI3K シグナル等を活性化させる (4)。HSC は c-Kit を強く発現しており (5)、c-Kit に変異を持つ HSC は骨髄再構築能が低いことから (6)、SCF による刺激は造血幹細胞の自己複製に関与していると考えられる。一方、TPO は受容体である c-Mpl と結合し、Jak / STAT シグナルや MAPK シグナル、PI3K シグナル等を活性化させる (7)。HSC は c-Mpl も強く発現しており (8)、c-Mpl 欠損造血幹細胞は骨髄再構築能が低いことから (9)、TPO によるシグナルも造血幹細胞の自己複製に関与していると考えられる。そして c-Kit、c-Mpl 両受容体に変異を持つマウスは単独の変異を持つマウスよりも造血が乏しいため、SCF と TPO によるシグナルは相乗的に作用すると考えられる (10)。しかしながら SCF と TPO の両受容体に変異があったとしても血球が供給されていることから、SCF や TPO だけでなく他の因子も HSC 制御に関与していると考えられる。

現在、哺乳類において Wnt タンパク質は 19 種類存在することが分かっており、その受容体である Frizzled ( Fz ) は 10 種類が知られている (11)。この 19 種のリガンドと 10 種類の受容体との親和性の違いによって、Wnt シグナルの反応性を制御していると考えられる。Wnt タンパク質は純化が難しく、どのタンパク質がどの受容体と結合するかは明らかでない部分が多い。2003 年には生化学的な活性を持つ Wnt タンパク質として Wnt3a の純化法が確立された (12)。この純化法は Wnt5a の純化に

も応用が可能であったが、他の Wnt タンパク質において活性を持った状態での純化は未だ困難であり、他の Wnt タンパク質の生化学的な性質は明らかになっていない (13)。

Wnt シグナルは二つの経路に大別される。β-カテニン依存的な経路は canonical wnt pathway と呼ばれ、β-カテニン非依存的な経路は noncanonical wnt pathway と呼ばれる (11)。Canonical wnt pathway は、Fz と low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 / 6 ( LRP 5 / 6 ) からなる受容体と Wnt タンパク質が結合することにより、β-カテニンの核移行が促進され標的遺伝子の転写を活性化する。一方で、noncanonical wnt pathway は 2 つの経路が知られており、それぞれ Wnt / planar cell polarity 経路と Wnt / Ca<sup>2+</sup> 経路と呼ばれる。これらの経路は LRP 5 / 6 非存在下でもシグナルを活性化されると考えられている。Wnt / planar cell polarity 経路では Ras homolog gene family, member A ( RhoA )、Rac の活性化、Wnt / Ca<sup>2+</sup> 経路では protein kinase C ( PKC )、Ca<sup>2+</sup> / calmodulin-dependent protein kinase II ( CaMKII )、の活性化が知られている (14)。

Wnt3a は canonical pathway を活性化する代表的な Wnt タンパク質であり、造血において Wnt ファミリーの中で最も研究されたタンパク質である (15)。Wnt3a はアポトーシス耐性成体造血幹細胞の *in vitro* 増幅を促進できると報告がされており (16)、HSC 制御に関与すると考えられる。また、Wnt3a 欠損マウスは胎生致死であるが、胎仔肝臓中の HSC に欠陥が見られる。Wnt3a 欠損胎仔肝臓は野生型に比べて HSC 集団が少なく、二次移植時の骨髄再構築能が低いということが示されてい

る (17)。そして、*in vivo* において適切な canonical wnt signal が HSC の機能維持に重要であることも示されており (18)、HSC 制御における Wnt3a の役割は解析されてきた。

一方、noncanonical wnt signaling による HSC 制御に関しては多くは明らかになっていない。近年、noncanonical wnt signaling が HSC の維持に重要であると報告されたが (19)、具体的にどの Wnt タンパク質が HSC の維持に関与するかは明らかでない。Noncanonical wnt pathway に関与する Wnt タンパク質の中で造血において最も研究されているのは Wnt5a である (15)。Wnt5a は *in vitro* の培養系において canonical wnt pathway を阻害し、細胞周期を抑制することで造血幹細胞を維持すると報告されている (20、21、22、Figure 1A)。それに対し、Wnt5a は *in vitro* の培養系において効果がないという報告もなされた (23)。このように HSC に対する Wnt5a の直接的作用に関しては議論の余地が残っている。

Wnt5a 欠損マウスは、四肢などの伸長が著しく低下し、周産期致死であることから、Wnt5a は発生期において非常に重要な役割を果たすタンパク質であると考えられる (24)。Wnt5a は発生過程において、yolk sac (YS)、aorta gonad mesonephros (AGM)、fetal liver (FL) など発生期における造血器で発現が高いことが知られている (25)。Wnt5a 欠損マウスの解析から、Wnt5a は B 細胞の増殖を抑制しているという報告がなされているが (26)、HSC の発生における Wnt5a の役割や HSC の自己複製や分化に対する Wnt5a の役割は未だ明らかになっていない。また、YS、AGM、FL だけでなく骨髄においても Wnt5a はストローマ細胞での発現が確認されている (27)。そ

して骨髄において、骨芽細胞の供給する Wnt5a が破骨細胞の分化誘導を制御しているという報告がなされた (28)。これら報告から、Wnt5a は骨髄においてストローマ細胞や骨芽細胞が発現し、HSC の制御因子として働いている可能性が考えられる。しかし、成体骨髄において Wnt5a が HSC を制御しているという報告は無く、骨髄内のどの細胞が HSC に Wnt5a を供給しているかも明らかでない。

HSC を制御する微小環境としてニッチは概念的に定義されたものであったが、研究が進むにつれ様々なニッチ構成細胞が提唱されてきた。骨芽細胞は HSC ニッチ構成細胞としてはじめて報告された細胞であり、骨芽細胞ニッチを形成している (29、30)。その後、血管内皮細胞や血管周囲のペリサイトを構成細胞として持つ血管性ニッチも提唱された (31、32)。さらに、神経細胞であるシュワン細胞が HSC のニッチとして働くことが示され (33)、細動脈ニッチが HSC の休止状態を維持するとの報告もなされた (34)。これらの報告から、骨髄中の様々な細胞が HSC の維持に関与していると考えられる。

ニッチ構成細胞が明らかになるにつれ、ニッチ細胞特異的に遺伝子を欠損させることで、HSC 制御因子の供給細胞の同定が可能になってきた (35)。Cre / loxP システムを用いることで目的の遺伝子をコンディショナルに欠損させるマウスを作製し、解析することで SCF や stromal cell derived factor 1 ( SDF-1 )、Jagged-1 の供給源となるニッチ細胞が同定されている (32、36、37)。現在のところ、骨芽細胞系譜で標的遺伝子を欠損させる場合は Osterix-Cre マウス、血管周囲のストローマ細胞で標的遺伝子を欠損させる場合は Leptin-receptor-Cre ( LeptinR-Cre ) マウス、そして血管内

皮細胞で標的遺伝子を欠損させる場合は Tie2-Cre マウスや VE-Cadherin-Cre マウスが用いられている ( Figure 1B )。このように、様々な因子に対して *in vitro* の培養系だけでなく *in vivo* での機能解析や発現細胞の同定が可能になってきた。しかし、HSC の制御に関与していると考えられる Wnt タンパク質をニッチ細胞特異的に欠損させ解析した報告は無い。特に Wnt5a に関しては先述の通り *in vitro* 培養系における効果には議論の余地が残っており、*in vivo* における HSC に対する Wnt5a の機能に関しては過去に報告がない。

これらの背景から、私はマウス生体においてニッチ細胞が Wnt5a を分泌し HSC を制御しているという仮説を立て、その仮説を検証しようと考えた。そのため、HSC における Wnt5a の効果を *in vitro* および *in vivo* 実験によって多角的に解析することとした。本研究では、*in vitro* の培養系により、Wnt5a の HSC に対する直接的な作用を評価し、*in vivo* のにおいてニッチ構成細胞特異的に Wnt5a 遺伝子を欠損させることにより、HSC の制御因子と考えられる Wnt5a がどの細胞系譜に由来するか解析した。



## 4. 方法

### マウス

C57BL/6 系統マウス（以下 Ly5.2 マウス）は日本 SLC 株式会社より購入したものであり、同系統 Ly-5 ローカス コンジェニックマウス（以下 Ly5.1 マウス）は三協ラボ株式会社から購入したものを使用した。

Wnt5a<sup>flox/flox</sup> および Wnt5a<sup>+/-</sup> マウスは菊池章先生、本田浩章先生より提供されたものを医科学研究所動物センターに導入し、動物センター内で繁殖させたものを用いた。また、LeptinR-Cre マウスは The Jackson Laboratory（Bar Harbor, USA）より購入し、Osterix-Cre マウスは小林泰浩先生より、Tie2-Cre マウスは同研究所内の清木元治先生より提供されたものを、Mx1-Cre マウスは過去に報告のあるものを用いた（38）。それぞれのマウスは動物センターに導入し繁殖させたものを使用した。すべての動物実験は、医科学研究所の動物実験委員会において許可を得て実施した。

### マウス tail-tip および培養細胞からの DNA 抽出

マウス tail-tip を 1.5 mL チューブに入れ、300  $\mu$ L の Tail Lysis Buffer を添加し、10 mg / mL の Proteinase K 溶液を 6  $\mu$ L 加えて、55°C の恒温槽中で一晩静置した。このときの Tail Lysis Buffer は 10 mM Tris-HCl（pH 8.0）、100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5 % SDS を含む。翌日、チューブをボルテックスした後、スピンドウンして上清 150  $\mu$ L を新たな 1.5 mL チューブに移した。そこに、PCI 溶液から、フェ

ノール / クロロホルムを 150  $\mu$ L 取り出して添加し数回転倒混和した後、4°C、15000 rpm で 5 分間遠心した。このときの PCI 溶液は、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを 25 : 24 : 1 の割合で混合し 4°C にて静置したものである。遠心後、上清 100  $\mu$ L を新しい 1.5 mL チューブに入れ、100 % EtOH を 250  $\mu$ L 加え、数回転倒混和した後、4°C、15000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、室温で静置し適度に乾燥させた。乾燥後、蒸留水を 20  $\mu$ L 加え、ボルテックス、スピンドアウンをした後、4°C にて保存した。

#### 細胞からの RNA 抽出および逆転写

1.5 mL チューブに 300  $\mu$ L の TRIzol reagent ( Life Technologies, Carlsbad, USA ) を加え、そこに細胞をソーティングしボルテックスで攪拌した後、- 80°C で保存した。- 80°C で保存していた溶液を融解し、クロロホルム 60  $\mu$ L を添加した後、4°C、15000 rpm で 15 分間遠心した。遠心後、上層液を新しい 1.5 mL チューブに移した。そこにイソプロパノール 150  $\mu$ L、20 mg / mL のグリコーゲンを 1  $\mu$ L 加え、4°C、15000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、上清を除き、75 % EtOH を 1 mL 加え、4°C、15000 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、上清を除き適度に乾燥させた。乾燥後 7  $\mu$ L の RNase free water を 7  $\mu$ L 加え、RNA 溶液を得た。

得られた RNA 溶液を鋳型 RNA 溶液として primescript II first strand cDNA synthesis Kit ( Takara Bio Inc., Shiga, Japan ) を用いて逆転写を行い cDNA を得た。

## PCR

DNA 溶液 1  $\mu$ L に対し、10 $\times$  PCR Buffer 1.5  $\mu$ L、dNTP Mixture 1.2  $\mu$ L、TaKaRa taq 0.06  $\mu$ L（いずれも Takara Bio Inc.）、プライマー 0.3  $\mu$ L を加えたものに蒸留水を添加し、15  $\mu$ L の反応溶液を調製した。反応溶液は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（Takara Bio Inc.）中で反応させ目的の DNA 領域を増幅した。

各目的遺伝子のプライマーの配列および反応条件は以下である。Wnt5a KO のタイピングではプライマー名および DNA 塩基配列は mWnt5a-52F : 5'-ATTAAGCCCGGGAGTGGCTTT-3'、mWnt5a-53R : 5'-GCTTCTATAACAACCTGGGCG-3'、mWnt5a KO-R : 5'-TGGCTACCCGTGATATTGCT-3' であり、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 30 秒、63 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 35 サイクルとした。Wnt5a<sup>flox/flox</sup> のタイピングでは mWnt5a-24F : 5'-ATTTCTCGGAAGGTACTGCTATCTCCTACC-3'、mWnt5a-33R : 5'-GAAAACAGAGGTATTGTGCAGTCCCCACCC-3' であり、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 30 秒、52 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 35 サイクルとした。Wnt5a<sup>flox/flox</sup> のコンディショナル欠損を確認する際のプライマーは mWnt5a-32F : 5'-GCCTTCGCGCTCTTCTCGCCCATGGAATTA-3' と前述の mWnt5a-33R であり、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 30 秒、65 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分 30 秒を 35 サイクルとした。

RT-PCR における Wnt5a に対するプライマーの配列は Wnt5a-Fwd-v3 : 5'-ATTGTCCCCCAAGGCTTAAC-3'、Wnt5a-Rev-v3 : 5'-GTCTCTCGGCTGCCTATTG-3' であり、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒とした。GAPDH に対するプライマーの配列は、F primer : 5'-CTTCACCACCATGGAGAAGGC-3'、R

primer : 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' であり、反応条件は 94°C 15 秒、64°C 15 秒、72°C 30 秒とした。

### マウス成体骨髄からの CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞の純化

成体マウスから大腿骨を取得した後 PBS 中で破碎し、骨髄細胞を得た。それらの細胞懸濁液をメッシュに通した後 15 mL チューブに移し、1500 rpm で 5 min 遠心した。その後上清を除去し、PBS を 5 mL 加え懸濁した。新しい 15 mL チューブに 5 mL の Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS ( GE Healthcare UK Ltd、 Amersham Place、 Little Chalfont、 Buckinghamshire、 England ) 溶液を入れた後、細胞懸濁液をゆっくりと上乗せした。これを 1500 rpm break off で 15 min 遠心した。遠心後、上層、中間層、下層と3層に溶液が分かれ、低比重有核細胞（単核球細胞）を含む中間層を新しい 15 mL チューブに移した。そこに PBS を加え全量を 14 mL とし、1800 rpm で 5 min 遠心した。その後、上清を除き PBS で再び懸濁し、セルカウントした。セルカウントの際、チュルク溶液で細胞を染色し、核が染色された細胞をカウントした。これを 1500 rpm で 5 min 遠心し、 $1 \times 10^7$  個の細胞に対して Lineage maker-biotin 抗体 cocktail を 3  $\mu$ L 加えた。その際の Lineage maker-biotin 抗体 cocktail は Gr-1-biotin 抗体 100  $\mu$ L、Mac-1-biotin 抗体50  $\mu$ L、Ter119-biotin 抗体 100  $\mu$ L、CD4-biotin 抗体 25  $\mu$ L、CD8-biotin 抗体 25  $\mu$ L、B220-biotin 抗体 50  $\mu$ L、IL-7R-biotin 抗体 50  $\mu$ L に PBS を 300  $\mu$ L 加えて 700  $\mu$ L にしたものである（ 使用した抗体の詳細は Table 1A に記載 ）。4°C で 30 min 反応させた後、PBS を 10 mL 加え懸濁し、

1500 rpm で 5 min 遠心した。その後上清を除去し、 $1 \times 10^7$  個の細胞に対してヤギ抗ラット IgG-microbeads 抗体を 3  $\mu$ L 加えて 4°C で 15 min 反応させた。反応後に PBS を 10 mL 加え懸濁し、1500 rpm で 5 min 遠心した。遠心中に LD カラムに脱気した PBS を 2 mL 通し洗浄した。サンプル遠心後、上清を除去し、脱気 PBS を 2 mL 加え懸濁した後、LD カラムに通した。溶出液を回収し、セルカウントするとともにサンプルを 1500 rpm で 5 min 遠心した。上清を除去し、 $1 \times 10^7$  個の細胞に対して Lineage maker-biotin 抗体 cocktail ( Table 1A ) を 1  $\mu$ L 加え 4°C で 30 min 反応させた後、PBS を 5 mL 加え 1500 rpm で 5 min 遠心した。その後、上清を除去し  $1 \times 10^7$  個の細胞に対して CD150-PE 抗体 1  $\mu$ L、CD34-FITC 抗体 2.5  $\mu$ L、c-Kit-APC 抗体 1  $\mu$ L、Sca-1-PE-Cy7 抗体 1  $\mu$ L ( いずれも eBioscience Inc. San Diego、USA )、streptoavidin-APC-Cy7 抗体 1  $\mu$ L ( BioLegend San Diego、USA ) を加え、4°C で 90 min 反応させた。反応後 PBS を 5 mL 加え、1500 rpm で 5 min 遠心した。遠心後上清を除去した後 PBS を加え  $1 \times 10^7$  細胞 / mL とし、フローサイトメーター Mo-Flow ( Daco Cytomation、Glostrup、Denmark ) を用いてソーティングした。そのとき Lineage marker 陰性、c-Kit、Sca-1両陽性かつ CD150陽性 CD34陰性画分である CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞を成体造血幹細胞集団としてソーティングした ( Fig. 1-1A and Table 2 )。

#### マウス胎仔肝臓からの CD48<sup>+</sup>KSL 細胞の純化

妊娠 13.5 日目のマウスから胎仔を取り出し、10 mM HEPES / HBSS 中で胎仔肝臓を

単離した。その後、胎仔肝臓を 0.05 % collagenase 10 mL が入った 15 mL チューブに移し、37℃の恒温槽で 20 min 処理した。Collagenase 処理後、ピペッティングして細胞を懸濁し、10 mM HEPES / HBSS を 5 mL 加え 1200 rpm で 5 min 遠心した後、上清を除いた。再び、同様の洗浄を行った。さらに 10 mM HEPES / HBSS を 5 mL 加えセルカウンターを用いてセルカウントした。セルカウントの際、チュルク溶液で細胞を染色し、染色された細胞をカウントした。セルカウント中に 1200 rpm で 5 min 遠心して上清を除いた。そこに  $1 \times 10^7$  個の細胞に対して Lineage maker-biotin 抗体を 3  $\mu$ L 加えた。その際の Lineage maker-biotin 抗体は Gr-1-biotin 抗体 100  $\mu$ L、Ter119-biotin 抗体 100  $\mu$ L、CD4-biotin 抗体 25  $\mu$ L、CD8-biotin 抗体 25  $\mu$ L、B220-biotin 抗体 50  $\mu$ L に PBS を 400  $\mu$ L 加えて 700  $\mu$ L にしたものである(使用した抗体の詳細は Table 1B に記載)。4℃ で 30 min 反応させた後、10 mM HEPES / HBSS を 10 mL 加え 1200 rpm で 5 min 遠心して上清を除いた。その後  $1 \times 10^7$  個の細胞に対してヤギ抗ラット IgG-microbeads 抗体を 2  $\mu$ L 加え 4℃ で 30 min 反応させた。そこに 10 mM HEPES / HBSS を 10 mL 加え 1200 rpm で 5 min 遠心して上清を除いた。遠心中に LD カラムに 10 mM HEPES / HBSS を 2 mL 通し洗浄した。サンプル遠心後、上清を除去し 10 mM HEPES / HBSS を 2 mL 加え懸濁した後、LD カラムに通した。溶出液を回収し、セルカウントするとともにサンプルを 1200 rpm で 5 min 遠心した。その後、上清を除去し  $10^7$  個の細胞に対して Lineage maker-biotin 抗体を 1  $\mu$ L 加え 4℃ で 30 min 反応させた。反応後、10 mM HEPES / HBSS を 5 mL 加え 1200 rpm で 5 min 遠心した後、上清を除去し  $1 \times 10^7$  個の細胞

に対して CD150-APC 抗体 2  $\mu$  L、CD48-Alexa Fluor-488 抗体 1  $\mu$  L、c-Kit-PE-Cy7 抗体 2  $\mu$  L、Sca-1-PE 抗体 1  $\mu$  L、streptoavidin-APC-Cy7 抗体 1  $\mu$  L を加え、4°C で 30 min 反応させた。反応後、10 mM HEPES / HBSS を 5 mL 加え 1200 rpm で 5 min 遠心した後、上清を除去し 10 mM HEPES / HBSS を加え  $1 \times 10^7$  細胞 / mL とし、フローサイトメーター ( Mo-Flow : Dako Cytomation、Glostrup、Denmark ) を用いてソーティングした。そのとき、Lineage marker 陰性、c-Kit、Sca-1 両陽性かつ CD48 陰性画分である CD48<sup>-</sup>KSL 細胞を胎仔造血幹細胞画分としてソーティングした ( Fig. 1-1B ) ( Table. 2A )。

#### 造血幹細胞画分の培養と Bromodeoxyuridine ( BrdU ) の取込み実験

造血幹細胞画分である成体骨髄 CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞を 96 ウェル丸底プレート ( TPP、Trasadingen、Switzerland ) の各ウェルにフローサイトメトリーによってソーティングした。このときの培養液は SF-O3 であり、組成は 1 % BSA、10 ml / L L-glutamine-penicillin-streptomycin solution ( Sigma-Aldrich Corp. Missouri、USA )、50 ng / mL stem cell factor ( SCF )、50 ng / mL thrombopoietin ( TPO ) (ともに PeoroTec、New Jersey、USA ) とした。この条件を基礎とし、Wnt5a を含む条件 ( 10 or 100 ng / mL ) と含まない条件を比較した。Wnt5a は菊池章先生により提供されたものであり、生化学的活性が証明されている純化した Wnt5a を用いた (39) 。

また、シングルセル由来のコロニーを形成させる実験では、CD34<sup>-</sup>KSL 細胞を 96 ウェル丸底プレートの各ウェルにフローサイトメトリーによってソーティングした。

このときの培養液は SF-O3 であり、組成は 10 % FBS 、 1 % BSA、 10 ml / L L-glutamine-penicillin-streptomycin solution ( Sigma-Aldrich )、 10 ng / mL SCF、 10 ng / mL TPO、 10 ng / mL interleukin-3 ( PeoroTec ) とした。 14 日間培養し、コロニーを形成したものをピックアップし実験に用いた。

そして、BrdU の取込み実験では培養液中に BrdU ( Sigma-Aldrich Japan ) を最終濃度 10  $\mu$ g / mL になるように添加した後培養し、BrdU を取込ませた。取込ませた BrdU は後述のインドロップレット免疫染色法により染色した。

### 液性因子による造血幹細胞画分の刺激

液性因子による刺激には液滴（ドロップレット）が形成されるよう撥水コートをしたスライドガラスを用いた。このスライドガラスに poly-L-Lysin ( Sigma-Aldrich Corp. Missouri, USA ) を 30  $\mu$ L 乗せ、2 時間ほど静置した。その後、スライドガラスを milli Q で洗浄し乾燥させコーティングをした。コーティングをしたスライドガラス上に培養液 SF-O3 のドロップレットを作製した。次に、造血幹細胞画分 700 個を各 droplet にソーティングした。そして、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で刺激した。

### インドロップレット免疫染色と Array Scan VTI による解析

インドロップレット免疫染色は過去の報告を改変した手法を用いた (40、41)。poly-L-Lysin コートしたスライドガラス上に細胞が付着したことを顕微鏡によって確認した後、上清を除き、4 % paraform aldehyde 溶液、もしくは 100 % EtOH によって



固定した。固定した細胞は上清を除き、PBS で 2 回洗浄し、10 % goat serum を加え、4℃ で一晩ブロッキングした。ブロッキング後、PBS で 2 回洗浄し、PBS で 50 倍に希釈した一次抗体を加え、4℃ で 6 時間反応させた。その後、PBS で 2 回洗浄し、500 倍に希釈した goat anti-rabbit IgG-Alexa fluor-488、anti-mouse IgG-Alexa fluor-488 もしくは anti-BrdU-Alexa fluor-488 ( いずれも Life technologies、invitrogen、USA ) を加えて室温で 30 分反応させた。反応後に上清を除き DAPI / PBS もしくは TOTO-3 ( Life technologies、invitrogen、USA ) を添加して室温で 10 分間反応させ核を染色した。その後 PBS で 3 回洗浄して上清を除き、fluorescence mounting medium ( Dako Denmark A / S Produktionsvej 42DK-2600 Glostrup、Denmark ) を加えた後カバーガラスをかけて包埋した。

染色されたサンプルは Array Scan VTI を用いて蛍光強度を定量化した。定量化には Target Activation を用いた。Array Scan VTI によって取得した画像データを見て、核が DAPI もしくは TOTO-3 によって染まっている細胞以外のものはデータから除外した。

## 凍結骨切片の作製

凍結骨切片は川本法により作製した (42)。マウスより大腿骨を取得し、川本法用凍結包埋剤である Super Cryoembedding Medium ( SCEM : Leica Microsystems Japan、Tokyo、Japan ) に付けた後、低温にしたヘキサン ( 和光純薬工業株式会社、大阪、日本 ) 中で凍結した。凍結した大腿骨はさらに SCEM に包埋した後、低温ヘキサン

中で凍結し、ブロックを作製した。得られたブロックからクライオスタット Leica CM3050S ( Leica Microsystems、Wetzlar、Germany ) を用いて 5  $\mu$ m の凍結骨切片を作製した。作製した切片は 4 % 低温 PFA もしくは低温 EtOH により固定した。固定した切片はインドロップレット免疫染色法と同様に染色した ( 使用した抗体は Table. 2B に記載 )。

### 造血幹細胞移植

移植実験のレシピエントには 8-12 週齢のマウスを用いた。ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞を見分けるために Ly5.1 のコンジェニックマウスを用いた。レシピエントをメスマウスとし、移植前に 485 R を 2 回放射線照射した。ドナー由来テスト細胞を、レシピエント由来の競合細胞と共に 200  $\mu$ L の staining medium ( 3 % FBS / PBS ) に懸濁し、尾静脈から注射した ( 一次移植 )。

一次移植後のレシピエント ( 一次レシピエント ) の大腿骨中の骨髓細胞をプールし、致死量放射線照射した二次レシピエントに一匹あたり大腿骨 1/2 相当の骨髓細胞を一次移植と同様の方法により移植した ( 二次移植 )。

### マウス末梢血解析

移植後のマウスから末梢血をおよそ 70  $\mu$ L 採血し、0.1 M EDTA およそ 10  $\mu$ L と混ぜ、凝固を阻害した後、溶血バッファー (  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.3 g / mL ) を 1 mL 加え、20-30 min 静置し溶血した。その後、2000 rpm で 2 min 遠心し、上清を除き SM を

180  $\mu$  L 加え懸濁した。懸濁したサンプルを 96 ウェルプレートに 1 ウェルにつき 1 サンプル移し、1800 rpm で 2 min 遠心した。遠心後プレートを勢いよく転倒し上清を除き、1 サンプル当たり anti-CD45.1 ( Ly5.1 ) -biotin 抗体を 0.1  $\mu$  L 加え 4°C で 30 min 反応させた。反応後各ウェルに SM を 200  $\mu$  L 加え 1800 rpm で 2 min 遠心した。遠心後プレートを勢いよく転倒し上清を除き、1 サンプル当たり二次抗体を 50  $\mu$  L 加え 4°C で 30 min 反応させた。このときの二次抗体は CD45.2 ( Ly5.2 )-FITC 抗体 0.1  $\mu$  L、streptavidin-APC-Cy7 抗体 0.1  $\mu$  L、B220-PE-Cy7 抗体 0.1  $\mu$  L、CD4 および CD8-APC 抗体 0.1  $\mu$  L ずつ、Gr-1 および Mac-1 -PE 抗体を 0.025  $\mu$  L ずつを含む ( Table. 1-2A )。二次抗体反応終了後に各ウェルに SM を 200  $\mu$  L 加え 1800 rpm で 2 min 遠心した。遠心後プレートを勢いよく転倒し、上清を除き、各ウェルに1  $\mu$  g / mL propidiumiodide ( PI ) / staining medium ( SM ) を 100  $\mu$  L 加えた。サンプルは FACS ( fluorescence activated cell sorter )チューブに移し、フローサイトメーター ( FACS Cant II : BD Bioscience、San Jose、 CA、 USA ) でデータを取得し、 FlowJo で解析した。

得られたデータから PI 陰性画分にゲートを掛け、CD45 ( CD45.1  $\cup$  CD45.2 ) 陽性細胞中の CD45.1 陽性細胞の割合を求めることで全体の % chimerism を算出した。また、CD45.1 陽性細胞中の CD4、8 ( CD4  $\cup$  CD8 ) 陽性細胞を T lymphoid cell とし、CD45.1 陽性細胞中の B220 陽性細胞を B lymphoid cell とし、CD45.1 陽性細胞中の Gr-1、Mac-1 ( Gr-1  $\cup$  Mac-1 ) 陽性細胞を myeloid cell とし、全体の % chimerism 中の T cell、B cell、myeloid cell の組成を求めた ( Fig. 1-2A )。

## 統計処理

得られたキメリズム等の数値は、Prism 4 の解析ソフトを用いて統計処理を行った。

有意差検定には、Mann Whitney test を用いた。

## 5. 結果

*in vitro* において Wnt5a は HSC 集団に対し直接的に作用する

HSC に対する Wnt5a の直接的効果を解析するために、CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を HSC 集団として骨髓から純化し ( Fig. 2-1A )、無血清および無フィーダー細胞の条件下で培養した。CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞 40 個を、50 ng / mL SCF、50 ng / mL TPO の SCF + TPO 条件 ( ST 条件 )、もしくは ST 条件に Wnt5a ( 10 or 100 ng / mL ) を添加した SCF + TPO + Wnt5a 条件 ( ST5a 条件 ) で 7 日間培養した。7日後の培養で細胞は増幅し、細胞集団を形成した。次にこれらの培養細胞に含まれる造血幹細胞画分を CD150、c-Kit、Sca-1、分化マーカーに対する抗体を用いて染色し、フローサイトメーターによって解析した。このとき、propidium iodide ( PI ) も同時に染色し、細胞集団中の生細胞数も計測した。

その結果、7 日間培養後の細胞集団中の生細胞数は Wnt5a 0 ng / mL で  $1.12 \pm 0.39 \times 10^4$  個 ( n=10 )、10 ng / mL で  $6.90 \pm 2.10 \times 10^3$  個 ( n=10 )、100 ng / mL で  $5.85 \pm 2.44 \times 10^3$  個 ( n=10 ) であった ( Fig. 3A )。興味深いことに Wnt5a を ST 条件に添加することにより ST 条件と比較して培養細胞集団中の生細胞数が有意に減少した。次に、生細胞中の CD150<sup>+</sup>KSL 細胞集団の頻度を求めると、Wnt5a 0 ng / mL で  $7.82 \pm 2.84 \%$  ( n=10 )、10 ng / mL で  $10.4 \pm 2.07 \%$  ( n=10 )、100 ng / mL で  $11.5 \pm 2.63 \%$  ( n=10 ) であり、Wnt5a 濃度依存的に HSC 細胞集団の頻度が上昇した ( Fig. 3B and 3C )。最後に、細胞集団中の CD150<sup>+</sup>KSL 細胞の絶対数を比較したと

ころ、Wnt5a 0 ng / mL で  $8.31 \pm 2.49 \times 10^2$  個 ( n=10 )、10 ng / mL で  $7.06 \pm 1.25 \times 10^2$  個 ( n=10 )、100 ng / mL で  $6.69 \pm 3.30 \times 10^2$  個 ( n=10 ) であり、有意な差は見られなかった ( Fig. 3D )。

### ST 条件への Wnt5a 添加は HSC の細胞分裂を抑制する

Fig. 3 の結果、Wnt5a の添加により培養後の細胞数が減少したことから、Wnt5a は ST 条件下で HSC 集団の増殖を抑制していると考えられる。そこで Wnt5a が ST シグナルにどのような影響を与えているか、少数の細胞のシグナルを解析できるインドロップレット免疫染色法を用いて解析した。

はじめに基本条件である SCF と TPO 刺激による HSC 集団の BrdU 取込み動態を解析した。CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞 700 個を 96 ウェルプレートにソーティングし、50 ng / mL SCF、50 ng / mL TPO および 10  $\mu$ g / mL BrdU を含む培地で培養した。培養 6 時間後、15 時間後、18 時間後、24 時間後、30 時間後、42 時間後に細胞を回収し、インドロップレット免疫染色法にて HSC 集団に取込まれた BrdU を染色した。その結果 BrdU 陽性細胞は培養 6 時間後から観察され始めた。半分の細胞が BrdU 陽性となる時間を T 1 / 2 とすると、T 1 / 2 は 22.1 hrs であった ( Fig. 4C )。

この結果から解析のタイムポイントを培養後 22 hrs に設定し、培養後 22 hrs における HSC 集団の BrdU 取込みを Wnt5a 添加群と、Wnt5a 非添加群で比較した。その結果、ST 条件に Wnt5a を加えると非添加群と比較して BrdU 陽性の細胞が減少した ( Fig. 4D )。ST 条件では BrdU 陽性細胞が 48.5 % であったのに対し、ST5a 条件

では 36.5 % であった。このことから、Wnt5a の添加は HSC 集団に直接的に作用し、ST 条件における HSC の少なくとも S 期までへの移行を抑制すると考えられる。

## ST 条件への Wnt5a 添加は一次移植において HSC 集団の骨髄再構築能を亢進しない

Fig. 3、4 の結果から、Wnt5a は HSC の細胞分裂を抑制し、*in vitro* において HSC 細胞集団を維持していると考えられる。それを検証するために、次に競合的骨髄再構築アッセイを行い、HSC の骨髄再構築能を比較した ( Fig. 5A )。CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞 40 個を 9 週齢の成体マウス骨髄より 96 ウェルプレートにソーティングした。ソーティングした細胞 ( Ly5.1 ) を Wnt5a 存在下、非存在下で 7 日間培養した。培養後にそれら細胞を  $1 \times 10^6$  個の競合細胞 ( Ly5.2 ) と共に致死量放射線照射したマウスに移植した。対照群として、純化した 40 個の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞を培養せずに移植する群 ( Fresh 群 ) を用意した。移植後にレシピエントの末梢血キメリズムを解析した ( 解析例 : Fig. 2-2 )。その結果、一次移植において移植後 24 週目における末梢血キメリズムは、非培養群である Fresh 群で  $25.3 \pm 16.9 \%$  (  $n=7$  )、ST 群で  $54.1 \pm 13.1 \%$  (  $n=8$  )、ST5a 群で  $65.5 \pm 5.93 \%$  (  $n=7$  ) であった。ST 群は Fresh 群と比較して末梢血中のキメリズムを有意に亢進した。ST5a 群は、Fresh 群と比較して有意に末梢血中のキメリズムを亢進したが、ST 群のキメリズムと比較すると有意差はなかった ( Fig. 5B )。また、各々のマウスの末梢血キメリズムを解析すると、Fresh 群は様々なバランスで Myeloid 細胞、B 細胞、T 細胞の三系統の細胞を末梢

血中に供給したが、ST 群および ST5a 群では類似した割合で三系統の細胞を末梢血中に供給しており両者に大きな違いは見られなかった ( Fig. 5C )。これらの結果から、ST 条件に対して Wnt5a の添加した培養条件は、ST 条件と比較して一次移植における HSC の骨髄再構築能を亢進する傾向はあったが、有意差は検出されなかった。この移植実験は 3 回行い、3 回とも同様の結果を得た。

### ST 条件への Wnt5a 添加は二次移植において HSC 集団の骨髄再構築能を亢進する

次に Wnt5a が *in vitro* において長期骨髄再構築能を有する HSC を維持するか検討するために二次移植を行った。一次移植におけるレシピエント ( 一次レシピエント ) の大腿骨中の骨髄細胞をプールし、致死量放射線照射した二次レシピエントに一匹あたり大腿骨 1/2 相当の骨髄細胞を移植した ( Fig. 5A )。移植後 16 週目に二次レシピエントの末梢血を解析した。その結果、二次移植において移植後 16 週目における末梢血キメリズムは Fresh 群で  $38.1 \pm 1.77\%$  (  $n=7$  )、ST 群で  $58.5 \pm 2.52\%$  (  $n=6$  )、ST5a 群で  $67.5 \pm 1.83\%$  (  $n=6$  ) であった。Fresh 群と比較すると、ST 培養群は一次移植時と同様に二次移植時においても末梢血中のキメリズムを有意に亢進させた ( Fig. 5D and E )。さらに、ST5a 群は Fresh 群と比較しても ST 群と比較しても末梢血キメリズムを有意に亢進させた ( Fig. 5D and E )。HSC に対する Wnt5a の効果を 3 回中 2 回検出したことから、私は Wnt5a が成体骨髄における HSC の制御因子であるとの仮説を立てた。



### ***In vivo* における Wnt5a 遺伝子の発現は、CD45 陰性画分に限局している**

Wnt5a が生体制御因子である場合、骨髄中で HSC に Wnt5a を供給している細胞が存在すると考えられる。そこで、骨髄中での Wnt5a 発現細胞を同定するために標的を HSC、血球、非血球細胞として RT-PCR を行った。HSC 画分として成体骨髄から CD34<sup>-</sup>KSL 細胞、胎仔肝臓から CD48<sup>-</sup>KSL 細胞をソーティングした。そして、前駆細胞として成体骨髄から CD34<sup>+</sup>KSL 細胞、胎仔肝臓から CD48<sup>+</sup>KSL 細胞をソーティングした。各々より RNA を抽出し、逆転写によって得た cDNA に対して、Wnt5a 特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、造血幹細胞画分および前駆細胞画分では Wnt5a の発現は検出されなかった ( Fig. 6A )。

次に、血球系細胞として Ter119 and / or CD45 陽性 ( TER119 / CD45<sup>+</sup> ) 細胞、非血球として Ter119、CD45 両陰性 ( TER119 / CD45<sup>-</sup> ) 細胞をフローサイトメーターによって分取し、同様に RT-PCR を行った結果、全骨髄細胞および TER119 / CD45<sup>+</sup> 細胞では Wnt5a の発現が検出されなかったが、TER119 / CD45<sup>-</sup> 非血球細胞では Wnt5a の発現が検出された ( Fig. 6B )。これらの結果から、Wnt5a は生体骨髄において造血幹細胞や前駆細胞での発現は小さく、非血球細胞で強く発現していると考えられる。

さらに、Wnt5a のタンパク質レベルでの発現を確認するために凍結骨切片を作製し抗 Wnt5a 抗体により免疫蛍光染色を行った。この結果、Sca-1 陽性の血管内皮細胞が Wnt5a を強く発現している像を得た ( Fig. 6C white arrowhead in down panel )。この Sca-1 陽性の血管内皮細胞は、HSC の造血幹細胞を制御するニッチ構成細胞であ

り (34)、血管内皮細胞は SCF の供給源であるという報告がなされている (32)。それと同時に Leptin receptor ( LeptinR ) 陽性の間葉系細胞でも Wnt5a が発現している像を得た ( Fig. 6C white arrow in down panel )。LeptinR 陽性の間葉系細胞は近年、SCF の供給源として同定されたニッチ構成細胞である (32)。

私はこれらの結果と近年の報告から、血管内皮細胞もしくは間葉系細胞由来の Wnt5a が *in vivo* において HSC を制御、維持しているという仮説を立てた。この仮説を証明するため、私は Wnt5a 遺伝子欠損マウスおよび選択的 Wnt5a 欠損マウスを用いることで、*in vivo* における Wnt5a 供給源の同定を試みた。これまでの結果から Wnt5a を欠損させる標的細胞を血球、骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞とし、Cre / loxP システムを用いて Wnt5a をコンディショナルに欠損させた ( Fig. 7 )。そこでまず、HSC や血球系細胞由来の Wnt5a が HSC に対する制御因子であるか評価するため、Wnt5a 欠損マウス および Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス由来の HSC を移植することで解析した。そして、非血球細胞に対しては、骨芽細胞特異的に Wnt5a を欠損させる Osterix-Cre、間葉系細胞特異的に欠損させる LeptinR-Cre、血管内皮と一部の血球系細胞特異的に欠損させる Tie2-Cre マウスと Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスをかけ合わせ骨髄中の HSC を解析した ( Fig.7 )。

**Wnt5a は発生において HSC 細胞集団と HSC の能力に必須な因子でない**

Wnt5a 遺伝子の欠損はマウスの周産期致死を引き起こし、成体マウスの解析は不可能である。そこで胎仔肝臓中の HSC を解析した ( Fig. 8A )。これにより HSC の発

生期における Wnt5a の効果を解析することができると考えた。Wnt5a<sup>+/-</sup> マウス胎仔肝臓中の細胞は野生型マウス肝臓中の細胞と同等の骨髄再構築能を持つことを確認したことから、本研究では Wnt5a<sup>+/-</sup> マウスを対照群として用いた。過去の報告の通り、対照群と比較して Wnt5a 欠損群では顔や四肢や尾の成長異常が起こった ( Fig. 8B )。しかし、胎仔肝臓全体の細胞数は Wnt5a<sup>+/-</sup> の対照群で  $6.87 \pm 0.980 \times 10^6$  個 ( n=13 ) であり、Wnt5a<sup>-/-</sup> 群では  $6.21 \pm 0.926 \times 10^6$  個 ( n=6 ) であった。すなわち、胎仔期に Wnt5a が欠損しても肝臓全体の細胞数には有意差はなかった ( Fig. 8C )。次に、胎仔 HSC の機能を解析するために E13.5 の胎仔肝臓から CD150<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>KSL 細胞を HSC 集団として純化した。胎仔肝臓中の PI<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> 細胞に対する HSC 集団 の頻度は、Wnt5a<sup>+/-</sup> の対照群で、 $0.37 \pm 0.144$  % ( n=17 ) であり、Wnt5a<sup>-/-</sup> 群では  $0.40 \pm 0.112$  % ( n=9 ) であり、 Wnt5a の欠損は胎仔肝臓における HSC 集団の頻度には有意な差は検出できなかった ( Fig. 8D )。さらに、移植した Wnt5a 欠損 HSC は一次移植および二次移植においても長期骨髄再構築能を示し、末梢血キメリズムにおいて Wnt5a<sup>+/-</sup> の対照群と比較して有意差は検出できなかった ( Fig. 8E and F )。これらの結果から、私は Wnt5a が HSC の発生において少なくとも E13.5 までは必須因子でないと結論づけた。そして、胎仔 HSC や血球由来の Wnt5a は胎仔 HSC の維持に必須でないと考えた。

## 生体骨髄において血球由来の Wnt5a は HSC 集団の維持に必須でない

次に、成体骨髄における血球由来 Wnt5a が HSC 維持に必須でないことを確認す

るために、Wnt5a コンディショナル欠損 HSC を解析した。はじめに、HSC 特異的に Wnt5a を欠損できるか検証した。Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを作製し polyinosinic : polycytidylic acid ( PIPC ) を 6 回一日おきに腹腔投与し ( Fig. 9-1A )、骨髄から HSC 細胞集団である CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1 細胞ソーティングした。ソーティングした細胞は 10 % FBS を含む SF-O3 培地で 10 ng / mL SCF、10 ng / mL TPO そして 10 ng / mL IL-3 を含む条件で培養した。形成されたコロニーから DNA を抽出し、ジェノタイピングを行った。その結果、Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> 群ではコロニー形成細胞 14 細胞のうち 13 細胞 ( 92.9 % ) で Wnt5a 遺伝子欠損が確認された ( Fig. 9-1B )。それに対し、対照群である Wnt5a<sup>flox/flox</sup> 群ではコロニー形成細胞 15 細胞のうち一つも Wnt5a 遺伝子欠損は確認されなかった。また、Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/+</sup> 群では 5 個のコロニー形成細胞のうち全てで Wnt5a のヘテロ欠損が確認された。この結果から、本実験系において Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの 90 % 以上の HSC 集団で Wnt5a を欠損できることが示された。次に Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髄細胞をプールして致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植した ( Fig. 9-2A )。移植後 4 週目から PIPC を 6 回一日おきに腹腔投与し、HSC での Wnt5a を欠損させた。その結果、移植後 26 週目においても Wnt5a コンディショナル欠損 HSC と対照群の HSC との間に末梢血に有意差は検出できなかった ( Fig. 9-2B )。さらに、一次レシピエントの大腿骨中の骨髄細胞をプールし、大腿骨 1 / 2 相当の骨髄細胞を二次レシピエントに移植し、末梢血解析を行った。その結果、両者には二次移植後 24 週目の末梢血のキメリズムに有意差は検出できな

った ( Fig. 9-2C )。

Wnt5a 欠損胎仔肝臓 HSC と選択的 Wnt5a 欠損成体 HSC の実験から ( Fig. 8E, 8F, 9-2B and 9-2C )、*in vivo* において血球由来の Wnt5a は骨髄中の HSC 維持に関して必須ではないことが示された。このことは、*in vivo* において血球では Wnt5a の発現が検出できなかったことに一致する ( Fig. 6A and 6B )。この結果を受け、次に非血球細胞で特異的に Wnt5a を欠損させ、骨髄中の HSC を解析した。

#### 骨髄中 HSC 集団の維持には骨芽細胞由来の Wnt5a は必須でない

骨芽細胞は造血幹細胞のニッチ構成細胞として、はじめて報告のあった細胞である (29, 30)。そして近年、骨芽細胞が Wnt5a を発現しているという報告がなされた (28)。

そこで、骨芽細胞の発現する Wnt5a が HSC 維持に重要であるか検証した。骨芽細胞特異的に Wnt5a を欠損させるため、本研究では Osterix-Cre マウスを用いた (28)。

Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスと Osterix-Cre マウスを交配し、12 週齢の Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄細胞を解析した ( Fig. 10A )。この時、対照群として Osterix-Cre Wnt5a<sup>+/+</sup> マウスを用意した。解析の結果、Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄中の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞の頻度は  $2.23 \pm 0.312 \times 10^{-3} \%$  ( n=4 ) であり、対照群の  $2.96 \pm 1.46 \times 10^{-3} \%$  ( n=6 ) と比較して有意な差は見られなかった ( Fig. 10B and 10C )。

さらに、競合的骨髄移植実験の結果、移植後 24 週目の末梢血キメリズム % は Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄細胞では、 $48.2 \pm 18.2 \%$  ( n=10 ) であり、対照群の  $43.4 \pm 22.7 \%$  ( n=9 ) と比較して有意な差は見られなかった ( Fig. 10D and 10E )。

この結果から、骨髄細胞における Wnt5a の発現は成体骨髄中の HSC 維持には必須でないことが示された。

**骨髄中 HSC 集団の維持には LeptinR-Cre 陽性細胞由来の Wnt5a は必須でない**

骨髄細胞中で LeptinR 陽性の間葉系細胞は、血管周辺に存在するペリサイトとして知られ、ペリサイトが SCF を供給することで HSC を維持しているとの報告があった (32)。そして、骨髄切片の蛍光免疫染色では、LeptinR 陽性のペリサイトで Wnt5a の発現が確認できた ( Fig. 6C )。

ペリサイトが HSC 維持のために Wnt5a を供給しているか検証するため、LeptinR 陽性細胞特異的に Wnt5a を欠損させる LeptinR-Cre マウスを Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスと交配し、12 週齢および 28 週齢の LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髄中の HSC を解析した ( Fig. 11A )。この時、対照群として Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを用意した。LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髄中の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞は  $1.60 \pm 0.45 \times 10^{-3}$  ( n=6 ) であり、対照群の  $1.69 \pm 0.34 \times 10^{-3}$  % ( n=4 ) と比較して有意な差は見られなかった ( Fig. 11B and 11C )。さらに、競合的骨髄再構築アッセイの結果、移植後 20 週目の末梢血キメリズム % は LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄細胞は  $60.9 \pm 10.4$  % ( n=8 ) であり対照群の  $67.8 \pm 7.97$  % ( n=8 ) と比較して有意な差は見られなかった ( Fig. 11D and 11E )。従って、ペリサイトにおける Wnt5a の発現は成体骨髄中の HSC 維持には必須でないと考えた。

## 骨髄中 HSC 集団の維持には Tie2-Cre 陽性細胞由来 Wnt5a が重要である

血管内皮細胞は HSC に隣接して存在するとされ、血管性ニッチの構成細胞であることが知られている (31、32)。そして近年、動脈性ニッチが造血幹細胞を休止期に維持しているという報告があり (34)、血管性、特に動脈性ニッチが造血幹細胞集団の維持に必要なのではないかと考えられている。また、骨髄切片の免疫染色では、Sca-1 陽性の血管内皮細胞で Wnt5a の発現が確認できた ( Fig. 5C )。

そこで、血管内皮細胞が HSC 維持のために Wnt5a を供給しているか検証するため、Tie2-Cre マウスを使って Wnt5a 遺伝子を血管内皮細胞からコンディショナルに欠損させ骨髄中の造血幹細胞を解析した ( Fig. 12A )。Tie2-Cre マウスは血管内皮細胞と一部の血球系細胞で組み替えを起こす事が知られている (32、43)。本研究において血液細胞由来の Wnt5a を欠損させても HSC の頻度や機能に影響を与えない事から ( Fig. 8 and 9 )、Tie2-Cre 陽性細胞での Wnt5a の欠損により影響が見られた場合、血管内皮細胞由来の Wnt5a が HSC の頻度を制御している可能性が高いと考えた。16 週および 32 週齢の Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髄中の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL の頻度は  $0.785 \pm 0.30 \times 10^{-3} \%$  ( n=9 ) であり、対照群の  $1.73 \pm 0.91 \times 10^{-3} \%$  ( n=8 ) と比較して有意差をもって 1 / 2 程度に減少していた ( Fig. 12B and 12C )。これと一致して、競合的骨髄再構築アッセイの結果、移植後 16 週目における末梢血キメリズム % は Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスの骨髄細胞は  $27.7 \pm 8.75 \%$  ( n=10 ) であり、対照群の  $49.3 \pm 8.15 \%$  ( n=10 ) と比較して有意に低い末梢血キメリズムを示した ( Fig. 12D )。Fig. 8、Fig. 9 そして Fig. 12 の結果から、血管内皮細胞由来の Wnt5a

は HSC 細胞集団の維持に重要であると考えられる。



## 6. 考察

### Wnt5a 添加による HSC の骨髄再構築能の亢進

HSC の培養系に Wnt5a を添加すると、非添加群と比較して培養後の細胞数を有意に減少させたが、HSC 集団である CD150<sup>+</sup>KSL 細胞の絶対数には有意差がなかった。しかし、Wnt5a の添加により二次移植時のキメリズム % に有意差を検出したことから、Wnt5a は *in vitro* の培養系において HSC に直接的に作用し、二次移植においても骨髄再構築できる HSC を少なくとも維持していると考えられる。しかし、Wnt5a の添加によって HSC の質が変化したのか、HSC の数が変化したのかは明らかになっていない。

この問題を明らかにするには、HSC 画分をシングルセルで Wnt5a 存在下、非存在下で培養し、細胞分裂後の娘細胞のそれぞれを移植する paired daughter 移植実験(44)を行う必要がある。その結果、Wnt5a 添加が HSC の対称分裂、非対称分裂に影響を与えた場合、Wnt5a がより直接的に HSC を制御していると考えられる。そして、Wnt5a が HSC の質を維持しているのか、HSC の数を増幅しているかが明らかになると考えられる。

また本研究では、培養後の HSC を CD150<sup>+</sup>KSL 細胞として解析した。その結果、CD150<sup>+</sup>KSL 細胞の絶対数には有意差が見られなかったが、二次移植時には有意差を検出したことから、CD150<sup>+</sup>KSL 細胞をマーカーとして使うには限界があると考えられる。今後の研究により二次移植においても骨髄再構築能を示す細胞集団を特定でき

る CD150<sup>+</sup>KSL に勝る良いマーカーが発見されれば、移植をせずとも正確な液性因子の効果を解析できると考えられる。

### **Wnt5a 添加による HSC への影響**

Wnt5a 添加が HSC の BrdU の取込みを抑制したことから Wnt5a は G1 期から S 期への移行を抑制していると考えられる。しかし、過去には Wnt5a の添加が、G0 期から G1 期への移行を抑制しているとの報告がある (20)。ゆえに本研究では、G0 期から G1 期への移行の差を BrdU の取込みという形で検出した可能性がある。Wnt5a が細胞周期のどの段階に作用しているかは詳細な解析が必要だが、これらの結果を統合すると Wnt5a は少なくとも HSC の細胞周期を抑制すると考えられる。

これまで HSC 増幅の際、細胞分裂を誘導させる因子に注目が集まってきたが (3、45)、本研究により、造血幹細胞の分裂を抑制する Wnt5a のような因子が、二次移植も可能な長期骨髄再構築能を持つ HSC 集団を *in vitro* で増幅させる際に重要である可能性が示された。Wnt5a の HSC に対する細胞分裂抑制効果が、どの段階に作用しているか明らかになれば、今後新たな因子をスクリーニングする際に有用であると考えられる。

### **Wnt5a 添加によるシグナル伝達の改変**

Wnt5a によるシグナルがどのように SCF + TPO シグナルを改変して HSC を維持しているかは明らかになっていない。Wnt5a 添加によって引き起こされるシグナル

伝達の変化が HSC の制御に重要であり、今後詳細な解析が求められる。Wnt5a が SCF と TPO によるシグナルを抑制した結果、HSC 集団が維持されている場合、抑制されたシグナルは分化に関与していると考えられる。逆に Wnt5a が SCF と TPO によるシグナルを増幅した結果、HSC 集団が維持されている場合、増幅されたシグナルは造血幹細胞の維持に関与していると考えられる。

近年、Wnt5a は lipid raft clustering を阻害する因子としての報告があった (46)。HSC における lipid raft には c-kit も集積していることが知られており、lipid raft clustering の阻害が HSC を休眠状態の維持に重要であると考えられる (47)。今のところ、c-Mpl が c-Kit と同様に lipid raft に集積しているか定かではないが、Wnt5a は lipid raft clustering を阻害することで、少なくとも c-Kit の下流のシグナル活性化を抑制している可能性がある。

### **Wnt5a 欠損が HSC の発生に与える影響**

本研究で用いた E13.5 の胎仔肝臓は HSC が増幅している時期であると考えられている (48)。Wnt5 は YS、AGM や FL で発現が認められ (25、49)、Wnt5a 欠損マウス胎仔肝臓に存在する HSC は発生の過程で Wnt5a にさらされていないと考えられる。Wnt3a の欠損は胎仔肝臓 HSC の数に影響を与え、不可逆的に HSC の能力に影響を及ぼすが (17、49)、Wnt5a の欠損は HSC の数にも能力にも影響を与えなかった。これらの結果から、Wnt5a は HSC の発生に必須の因子でなく、Wnt5a よりも Wnt3a によって活性化されるシグナルが HSC の発生に重要であると考えられ

る。

### **Tie2-Cre 陽性細胞での Wnt5a 欠損が HSC に与える影響**

Wnt5a を Tie2-Cre 陽性細胞で欠損させると骨髄における HSC 集団の頻度が有意に低くなり、同数の骨髄細胞を移植した時、骨髄再構築能も有意に減少することから、Tie2-Cre 陽性細胞由来の Wnt5a が HSC 集団の維持に重要であると考えられる。

Tie2-Cre 陽性細胞は血管内皮細胞と一部の血球であることが分かっている (32、43)。

血球における Wnt5a の欠損は HSC には影響を与えないことから、血管内皮細胞由来の Wnt5a が HSC 集団を維持するのに重要であると考えられる。

本研究の問題点の一つとして、Tie2-Cre は血球でも発現しており、血球と血管内皮細胞を切り分けることができない点が挙げられる。そのため、Tie2-Cre 発現細胞による Wnt5a 欠損の表現型は、血球由来の Wnt5a 欠損と血管内皮細胞由来の Wnt5a 欠損の合算値を見ている可能性がある。ただし、少なくとも血球単独の Wnt5a 欠損では対照群と比較して有意な差は検出できず、清田純博士が中心となり作製した Gene Expression Commons ( <https://gexc.stanford.edu/search> ) ではほぼ全ての血球系細胞で Wnt5a の発現量が低いことが分かっている。ゆえに、血球系細胞由来の Wnt5a でなく、血管内皮細胞由来の Wnt5a が、骨髄内での HSC 集団の維持に重要であると考えられる。いずれにせよ、これを証明するためには、報告のあるように VECad-Cre-ERT2 マウス (50) を用いて、標的細胞を血管内皮細胞に限定することで明確になると考えられる。

本研究のもう一つの問題点として、Cre-ERT2 などの誘導型 Wnt5a 欠損でないため、発生時期から成体までの Wnt5a 欠損の合算値を見ている可能性もある。ただし、E13.5 の Wnt5a 欠損胎仔肝臓中には対照群と比較して同等の HSC 集団が存在し、長期骨髄再構築能を示したことから、少なくとも E13.5 までの Wnt5a の欠損は HSC 集団の維持には関与しないと考えられる。E13.5 以後の Wnt5a の欠損が骨髄中の HSC 集団の維持に影響を及ぼすか明らかになっていないため、先述の誘導型の VECad-Cre-ERT2 マウスを用いる必要がある。このマウスを用いて、成体骨髄において血管内皮特異的に Wnt5a を欠損させ、HSC 集団にどのような影響を与えるかを評価することで、HSC に対する Wnt5a の供給細胞が同定できると考えられる。

最後の問題点として、Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスにおいてニッチ構成細胞に異常があるかどうかは明らかでない点が挙げられる。つまり、Tie2-Cre 陽性細胞由来の Wnt5a がニッチ構成細胞の生存や維持に重要である場合、ニッチ構成細胞が減少し、二次的に骨髄内の HSC 集団の減少が起こる可能性を否定できない。Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスにおける血管内皮細胞が量的にも質的にも正常であることを確かめる必要がある。これは VECad-Cre-ERT2 Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを用いた場合も確認しなければならない点であり、今後の研究が必要となる。

## ニッチによる制御機構と今後の展望

本研究では、骨芽細胞由来の Wnt5a を欠損させた時、HSC 集団の減少は観察されなかった。近年、noncanonical Wnt レセプターの一つである Frizzled-8 を欠損させた

マウスでは骨髄再構築能が低くなるという報告があり、noncanonical wnt signal は HSC の維持に重要であることが示されている (19)。そして、骨芽細胞は Wnt5a だけでなく Wnt4、Wnt5b、Wnt11 や Wnt16 など、noncanonical pathway を活性化させる Wnt を発現していることも示されている。本研究で骨芽細胞特異的に Wnt5a を欠損させた時に有意差が見られなかったは、noncanonical pathway を活性化させる他の Wnt タンパク質が Wnt5a の欠損を補完して HSC を維持した可能性がある。また、noncanonical pathway を活性化させる Wnt4 は Wnt / planar cell polarity 経路を介して HSC を増幅しているという報告がある (51)。これらの報告と本研究から、ニッチ構成細胞が様々な Wnt タンパク質を発現し HSC を維持している可能性が示唆された。今後 Wnt4、Wnt11、Wnt16 のコンディショナルノックアウトマウスの解析によって noncanonical Wnt タンパク質による造血幹細胞維持の詳細なメカニズムが明らかにされることが考えられる。

近年、骨芽細胞由来 Wnt5a が破骨細胞の分化を誘導しているとの報告があった (28)。本研究では、血管内皮由来 Wnt5a が HSC 集団の維持に重要ではないかという結果が得られている。つまり、Wnt5a による制御機構として、破骨細胞の前駆細胞に対しては骨芽細胞由来、HSC 集団の維持には血管内皮由来の Wnt5a が重要であり、骨髄における Wnt5a の供給細胞も標的細胞も異なると考えられる。これは、特定の細胞に対して特異的なニッチ細胞が制御するということを示唆している。

HSC に関する研究が進むにつれ、HSC がヘテロな集団であることが明らかになってきた。CD34<sup>+</sup>KSL<sup>+</sup> 分画は高度に純化された集団であるが (52)、CD150 の発現によ

って機能的に分けられることが示されている (53、54)。さらに、**repopulation** できる前駆細胞の存在が明らかになってきた (44)。本研究といくつかの報告はニッチの多様性を示唆しており (32、36、37)、ニッチの多様性がこれらの HSC や前駆細胞の多様性に対応しており、これらの細胞の運命決定を制御している可能性がある。

## 7. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、終始親切な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療センター幹細胞治療分野教授 中内 啓光博士に謹んで感謝の意を表します。また、実験を行うにあたり、親切な御指導や貴重なご助言を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療センター幹細胞治療分野助教 山崎 聡博士に心から感謝申し上げます。そして、折りにふれ適切なご助言を賜りました慶応義塾大学医学部発生・分化生物学講座特任准教授 依馬 秀夫博士に心から感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御協力頂いた高知大学医学部附属病院・次世代医療創造センター特任教授 清木 元治博士、大阪大学大学院医学系研究科分子病態生化学教室教授 菊池 章博士、広島大学原爆放射線医科学研究所 疾患モデル解析研究分野教授 本田 浩章博士、松本歯科大学総合歯科医学研究所硬組織疾患制御再建学講座硬組織機能解析学准教授 小林 泰浩博士、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科肝臓病態制御学講座講師 柿沼 晴博士に感謝申し上げます。そして実験を行うにあたり、御協力頂いた東京大学医科学研究所幹細胞治療センター幹細胞治療分野特任研究員 山本 玲博士、技術支援専門職員 大江原 淳氏、山崎 祐治氏に感謝申し上げます。

本研究のために命を失った数多くのマウス達に哀悼の意を捧げます。最後に、大学院進学時より終始様々な面で援助して頂いた両親、弟に感謝申し上げます。



## 8. 引用文献

- (1) Till, J. E., McCulloch, E. A., and Siminovitch, L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 51, 29-36. (1964).
- (2) Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273, 242-245. (1996).
- (3) Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 192, 1281-8. (2000).
- (4) Lennartsson J, Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev*. 92, 1619-49. (2012).
- (5) Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *78*. 1706-12. (1991).

(6) Thorén LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, Antonchuk J, Jacobsen SE. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol.* 180, 2045-53. (2008).

(7) de Graaf CA, Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle.* 10, 1582-9. (2011).

(8) Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T.

Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* 1, 685-97. (2007).

(9) Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 1195-200. (1998).

(10) Antonchuk J, Hyland CD, Hilton DJ, Alexander WS. Synergistic effects on erythropoiesis, thrombopoiesis, and stem cell competitiveness in mice deficient in thrombopoietin and steel factor receptors. *Blood.* 104, 1306-13. (2004).

- (11) Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors*. 23, 111-6. (2005).
- (12) Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal*. 19, 659-71. (2007).
- (13) Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423, 448-52. (2003).
- (14) Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4, a007864. (2012).
- (15) Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 4, 27-36. (2009).
- (16) Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 423, 409-14. (2003).

(17) Luis TC, Weerkamp F, Naber BA, Baert MR, de Haas EF, Nikolic T, Heuvelmans S, De Krijger RR, van Dongen JJ, Staal FJ. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*. 113, 546-54. (2009).

(18) Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, Fibbe WE, van Dongen JJ, Fodde R, Staal FJ. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*. 9, 345-56. (2011).

(19) Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong XB, Suda T, Li L. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*. 150, 351-65. (2012).

(20) Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 15436-41. (2007).

(21) Buckley SM, Ulloa-Montoya F, Abts D, Oostendorp RA, Dzierzak E, Ekker SC, Verfaillie CM. Maintenance of HSC by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line. *Exp Hematol*. 39, 114-123. e1-5. (2011).

- (22) Povinelli BJ, Nemeth MJ. Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the ryk receptor. *Stem Cells*. 32, 105-15. (2014).
- (23) Schaap-Oziemlak AM, Schouteden S, Khurana S, Verfaillie CM. Wnt5a does not support hematopoiesis in stroma-free, serum-free cultures. *PLoS One*. 8, e53669. (2013).
- (24) Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*. 126, 1211-23. (1999).
- (25) Corrigan PM, Dobbin E, Freeburn RW, Wheadon H. Patterns of Wnt/Fzd/LRP gene expression during embryonic hematopoiesis. *Stem Cells Dev*. 18, 759-72. (2009).
- (26) Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*. 4, 349-60. (2003).
- (27) Van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*. 92, 3189-202. (1998).

(28) Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med.* 18, 405-12. (2012).

(29) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 425, 841-6. (2003).

(30) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 425, 836-41. (2003).

(31) Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 121, 1109-21. (2005).

(32) Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* 481, 457-62. (2012).

(33) Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM,

Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 147, 1146-58. (2011).

(34) Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 502, 637-43. (2013).

(35) Hanoun M and Frenette PS. This niche is a maze; an amazing niche. *Cell Stem Cell*. 12, 391-2. (2013).

(36) Ding L and Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 495, 231-5. (2013).

(37) Poulos MG, Guo P, Kofler NM, Pinho S, Gutkin MC, Tikhonova A, Aifantis I, Frenette PS, Kitajewski J, Rafii S, Butler JM. Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell Rep*. 4, 1022-34. (2013).

(38) Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 269, 1427-9. (1995).

(39) Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A. Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J.* 402, 515-23. (2007).

(40) Ema H, Morita Y, Yamazaki S, Matsubara A, Seita J, Tadokoro Y, Kondo H, Takano H, Nakauchi H. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc.* 178, 2979-87. (2006).

(41) Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol.* 39, 351-359. e3. (2011).

(42) Kawamoto T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol.* 66, 123-43. (2003).

(43) Koni PA, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med.* 193, 741-54. (2001).

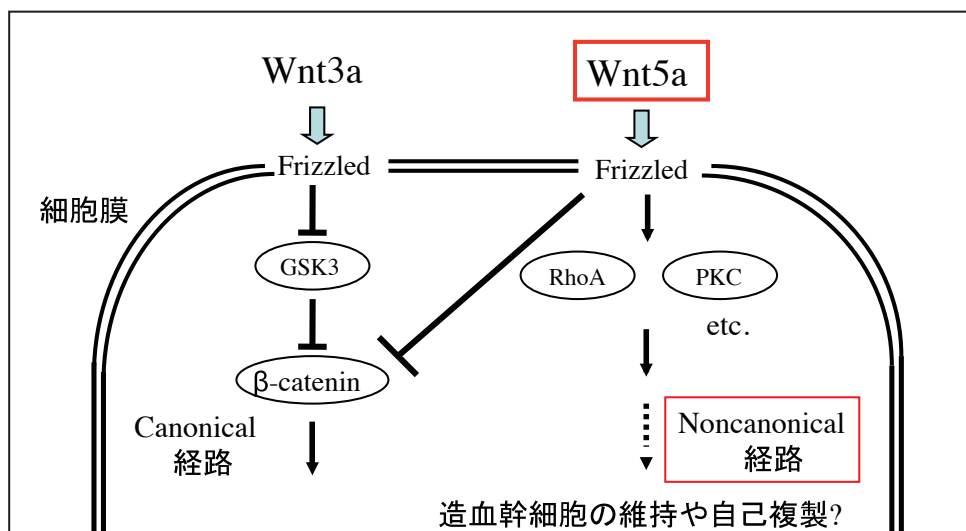


- (44) Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. 154, 1112-26. (2013).
- (45) Bryder D, Jacobsen SE. Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. *Blood*. 96, 1748-55. (2000).
- (46) Vannini N, Roch A, Naveiras O, Griffa A, Kobel S, Lutolf MP. Identification of in vitro HSC fate regulators by differential lipid raft clustering. *Cell Cycle*. 11, 1535-43. (2012).
- (47) Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J*. 25, 3515-23. (2006).
- (48) Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*. 95, 2284-8. (2000).
- (49) Luis TC, Naber BA, Fibbe WE, van Dongen JJ, Staal FJ. Wnt3a nonredundantly controls hematopoietic stem cell function and its deficiency results in complete absence of canonical Wnt signaling. *Blood*. 116, 496-7. (2010).

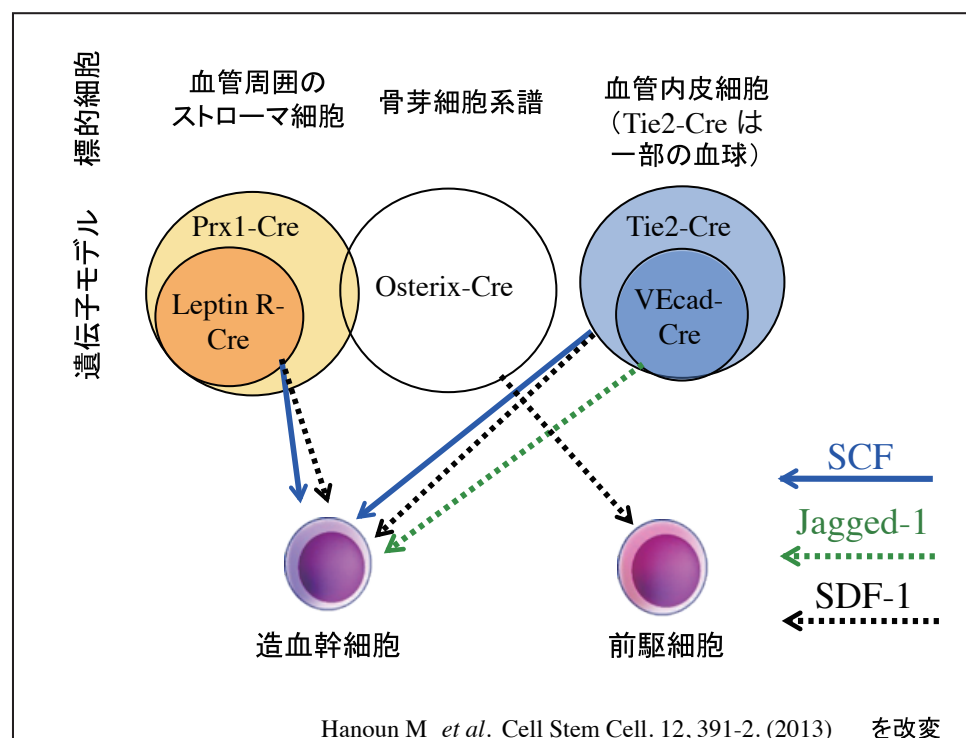
- (50) Monvoisin A, Alva JA, Hofmann JJ, Zovein AC, Lane TF, Iruela-Arispe ML. VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev Dyn*. 235, 3413-22. (2006)
- (51) Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosi J, Perreault C. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One*. 6, e19279. (2011).
- (52) Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*. 207, 1173-82. (2010).
- (53) Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, Rossi DJ. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 5465-70. (2010).

Figure. 1

A



B



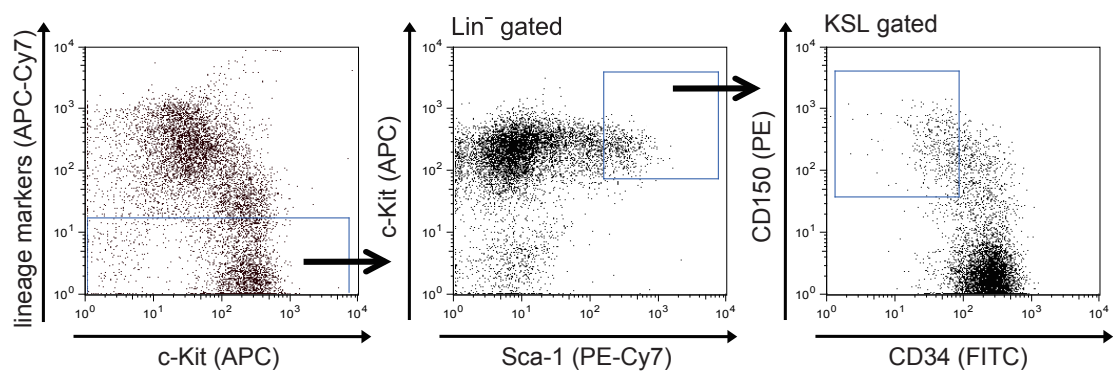
**Fig. 1**

(A) 代表的な Wnt タンパク質と Wnt シグナル経路。Wnt シグナルには  $\beta$ -カテニンを活性化させる canonical 経路と  $\beta$ -カテニン非依存的な noncanonical 経路の二つが知られている。Wnt3a は canonical 経路を活性化させる代表的な Wnt タンパク質である。Wnt5a は noncanonical 経路を活性化させる代表的な Wnt タンパク質であると考えられている。Wnt5a には canonical 経路を活性化するという報告もあるが、ここでは図示していない。Noncanonical 経路として Wnt / planar cell polarity 経路と Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  経路が知られている。Wnt / planar cell polarity 経路では Ras homolog gene family, member A ( RhoA )、Rac の活性化、Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  経路では protein kinase C ( PKC )、 $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin-dependent protein kinase II ( CaMKII )、の活性化が知られている。

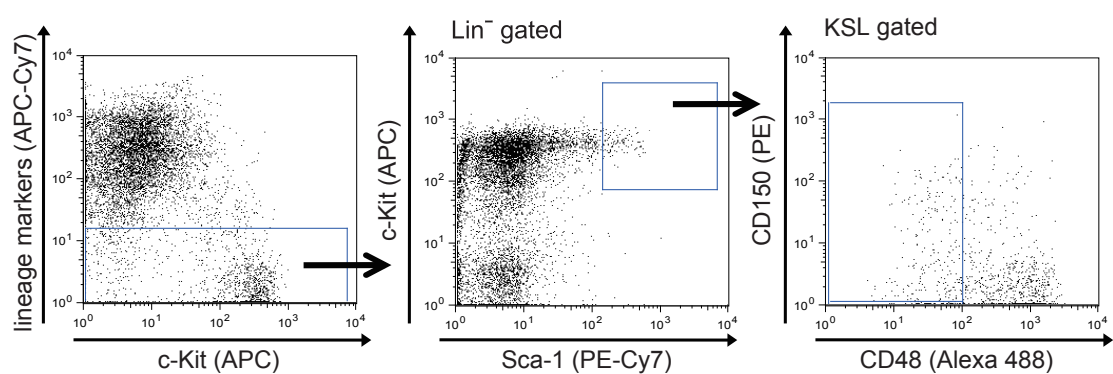
(B) Cre / loxP システムを用いたニッチ構成細胞特異的な遺伝子の欠損。ニッチ構成細胞として、血管周囲のストローマ細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞等が提唱されてきた。ニッチ構成細胞が明らかになるにつれ、Cre / loxP システムを用いてニッチ構成細胞特異的に遺伝子を欠損させることが可能となっている。血管周囲のストローマ細胞を標的にする場合 LeptinR-Cre マウス、骨芽細胞を標的にする場合 Osterix-Cre マウス、血管内皮細胞を標的にする場合、Tie2-Cre マウス（一部の血球も標的となる）や VE-Cadherin-Cre マウスが用いられている。

**Fig. 2-1**

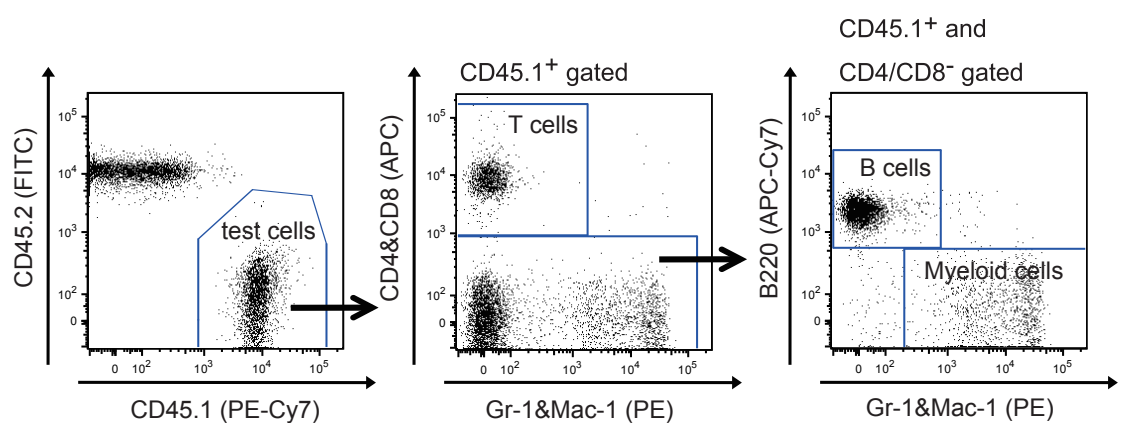
**A**



**B**



**Fig. 2-2**



**Fig. 2-1**

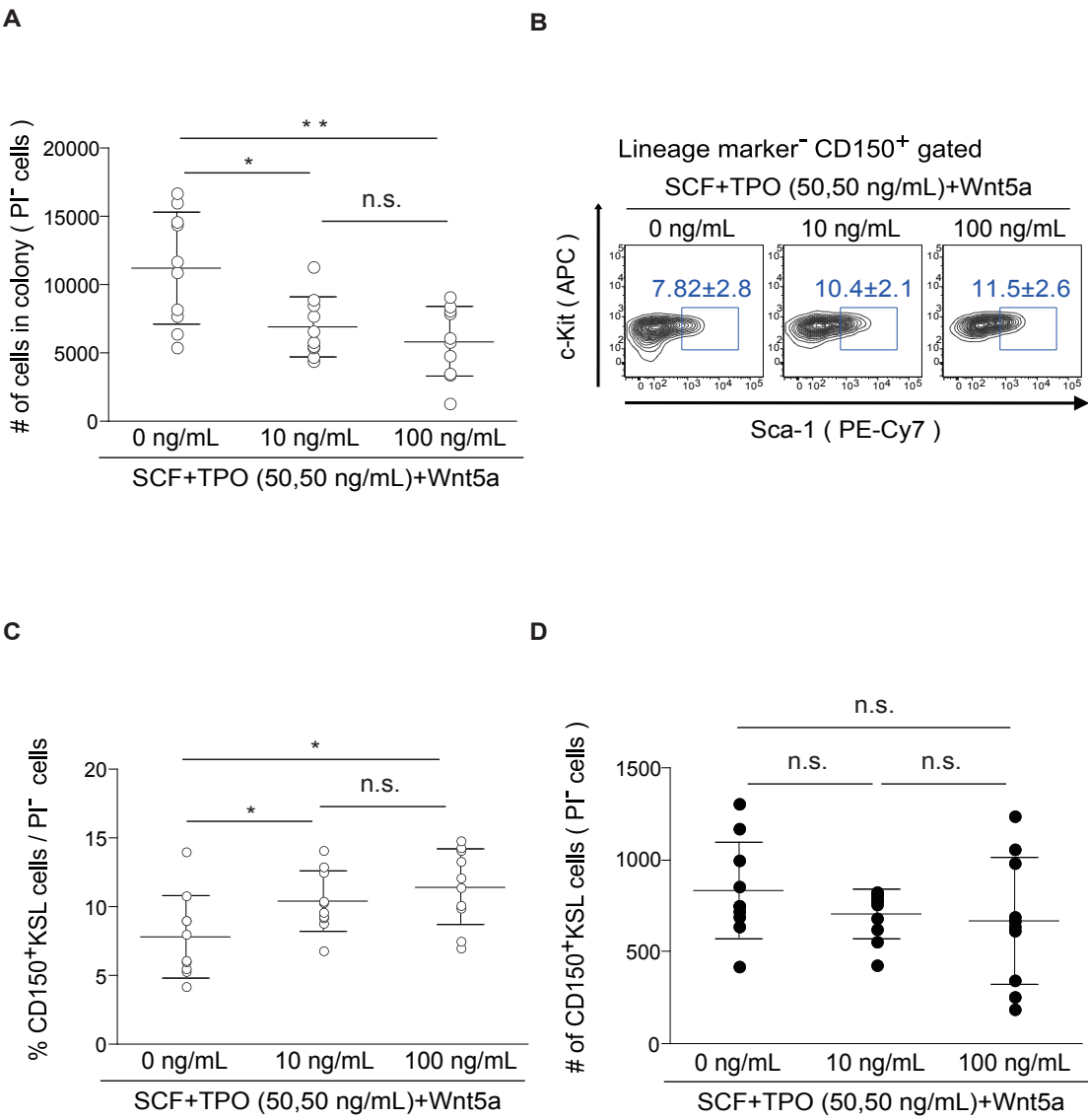
(A) フローサイトメトリーによる代表的な骨髄細胞の染色パターン。成体マウス骨髄より、分化マーカー陰性、c-Kit および Sca-1 両陽性かつ CD34 陰性 CD150 陽性の細胞を成体造血幹細胞画分として用いた。

(B) フローサイトメトリーによる代表的な胎仔肝臓細胞の染色パターン。胎仔肝臓より、分化マーカー陰性、c-Kit および Sca-1 両陽性かつ CD48 陰性の細胞を胎仔造血幹細胞画分として用いた。

**Fig. 2-2**

フローサイトメトリーによる代表的な末梢血細胞の染色パターン。末梢血を各種抗体で染色し、CD45.1 陽性細胞をテスト細胞のキメリズムとし、その中で CD4 U CD8 陽性の細胞を T 細胞、B220 陽性の細胞を B 細胞、Mac-1 U Gr-1 陽性の細胞を骨髓球系細胞として、CD45 陽性細胞中のキメリズム % を求めた。

Fig. 3



**Fig. 3**

(A) 無血清培養後の細胞集団の細胞数。40 個の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を 7 日培養した後、抗分化マーカー抗体、抗 c-Kit 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗 CD150 抗体および PI を用いて染色し、フローサイトメーターにより解析した。

(B) フローサイトメトリーによる代表的な培養細胞の染色パターン。分化マーカー陰性で CD150 陽性の細胞を c-Kit と Sca-1 で展開した。

(C) フローサイトメトリーによる CD150<sup>+</sup>KSL 細胞の頻度の解析。40 個の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を 7 日培養した後、上記抗体を用いて染色し、フローサイトメーターにより頻度を解析した。

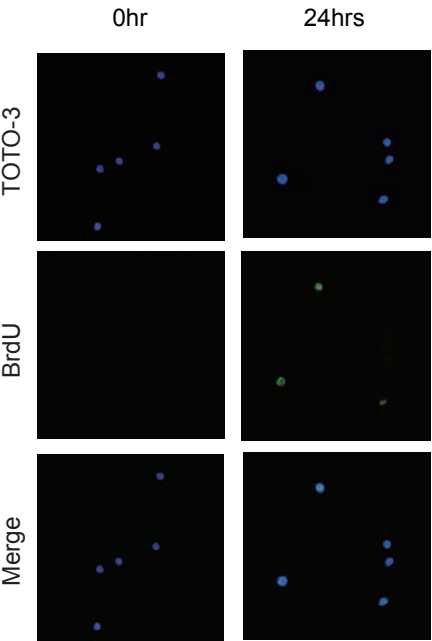
(D) フローサイトメトリーによる CD150<sup>+</sup>KSL 細胞の絶対数の解析。40 個の CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を 7 日培養した後、上記抗体を用いて染色し、フローサイトメーターにより絶対数を解析した。

\* :  $p < 0.05$  , \*\* :  $p < 0.01$  , n.s. : not significant ( Mann-Whitney test により算出した )

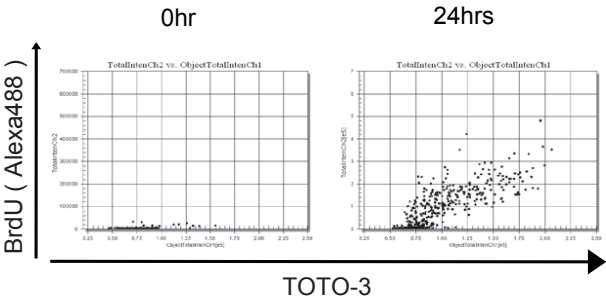


Fig. 4

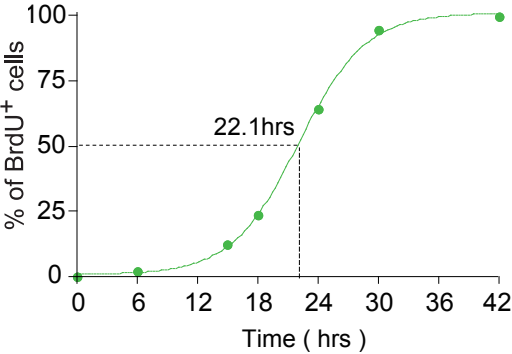
A



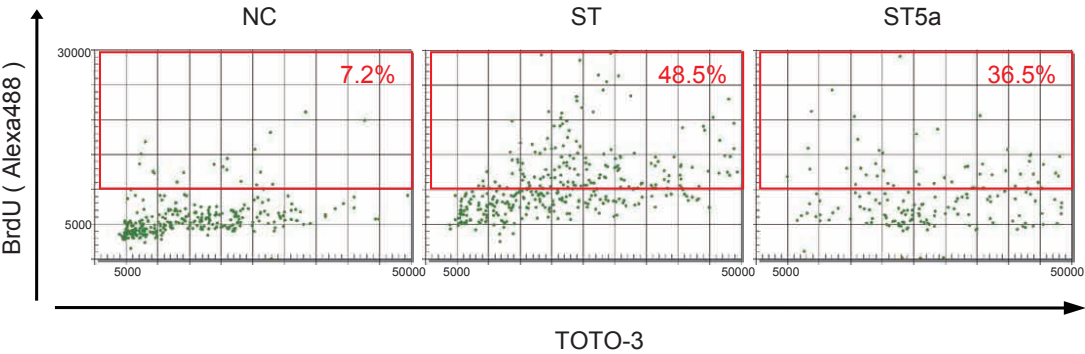
B



C



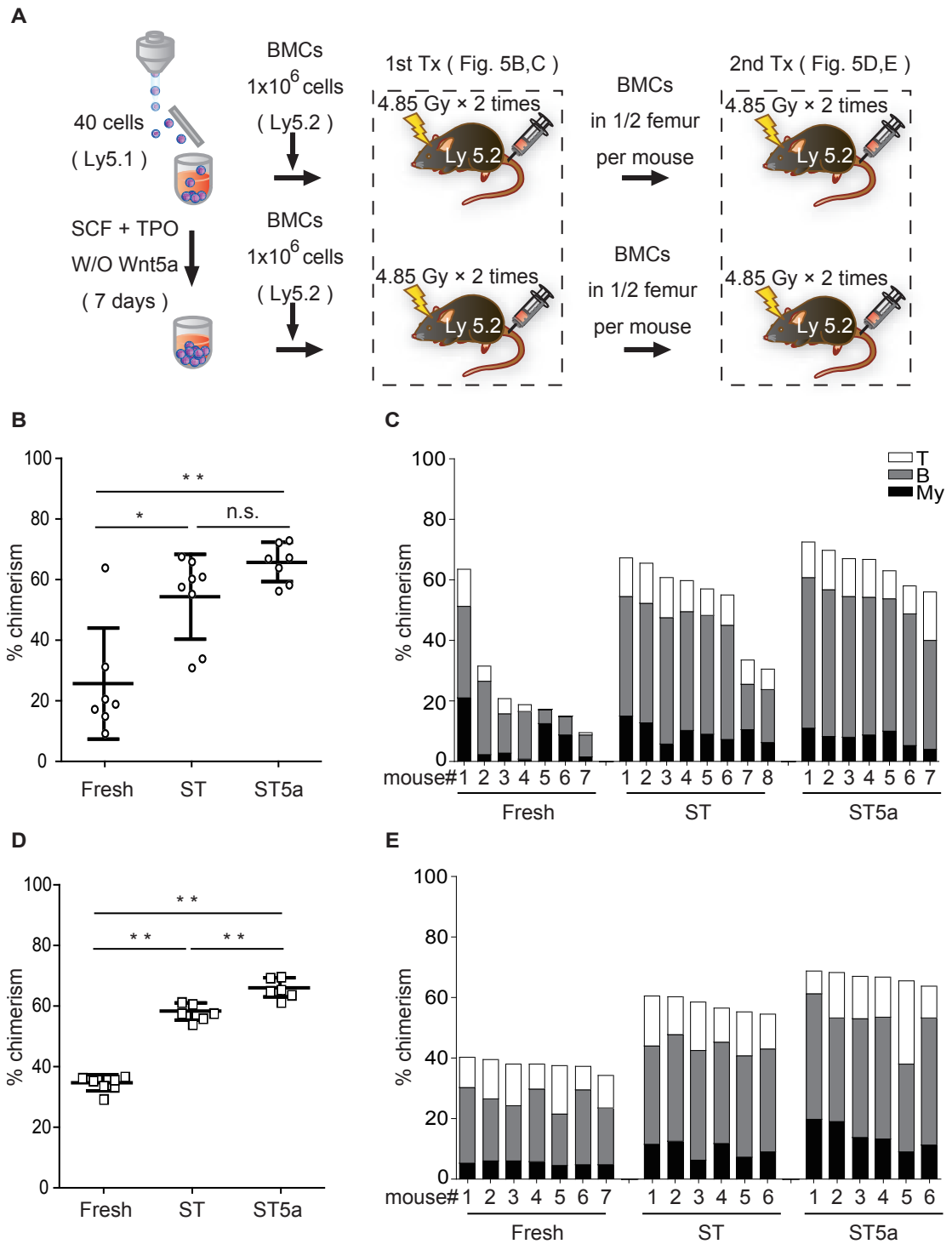
D



**Fig. 4**

- (A) SCF + TPO 培養における CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞の BrdU の取込みを免疫染色によって検出した代表例。培養 0hr、24hrs 後の細胞を回収し、抗 BrdU 抗体にて免疫染色し共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。
- (B) 抗 BrdU 抗体にて免疫染色したものを ArrayScanVTI にて解析した代表例。培養 0hr、24hrs 後の細胞を回収し、抗 BrdU 抗体にて免疫染色した後、ArrayScanVTI によって蛍光強度を定量化した。
- (C) 各培養時間における BrdU 陽性細胞をグラフ化した。半数の細胞が BrdU 陽性になる時間  $T_{1/2}$  は 22.1 時間であった。
- (D) Wnt5a 存在下、非存在下での培養 24 時間後における BrdU の取込み。NC はネガティブコントロール（BrdU 非添加）の培養条件 ST は SCF、TPO（50、50 ng / mL）の培養条件、ST5a は SCF、TPO、Wnt5a（50、50、100 ng / mL）の培養条件を示す。

**Fig. 5**



**Fig. 5**

(A) Wnt5a における *in vitro* assay の模式図。マウス骨髄より、CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞をフローサイトメーターにより取得し、培養せずにそのまま移植する非培養群をコントロールとし、Wnt5a 存在下、非存在下で培養後に移植した群とを比較した。この時の培養群は SCF + TPO ( 50、50 ng / mL ) を基礎培地とし、Wnt5a ( 10 ng / mL ) を加える群と加えない群を用意した。テスト細胞はそれぞれ  $1 \times 10^6$  個の競合細胞と共に致死量放射線照射したマウスに移植した ( 一次移植 )。一次移植後、末梢血中のキメリズムを経時的に解析した。末梢血解析後にマウス大腿骨を取得し、骨髄細胞をプールしてレシピエント当たり 1 / 2 大腿骨相当の骨髄細胞を致死量放射線照射したマウスに移植した ( 二次移植 )。

(B) 一次移植における末梢血中のテスト細胞由来の血球のキメリズム。移植後 24 週目の末梢血細胞を CD45.1、CD45.2 に対する抗体で染色し、末梢血中のテスト細胞由来の % を求めた。Fresh は非培養群、ST は SCF + TPO 培養群、ST5a は SCF + TPO + Wnt5a 培養群を示す。

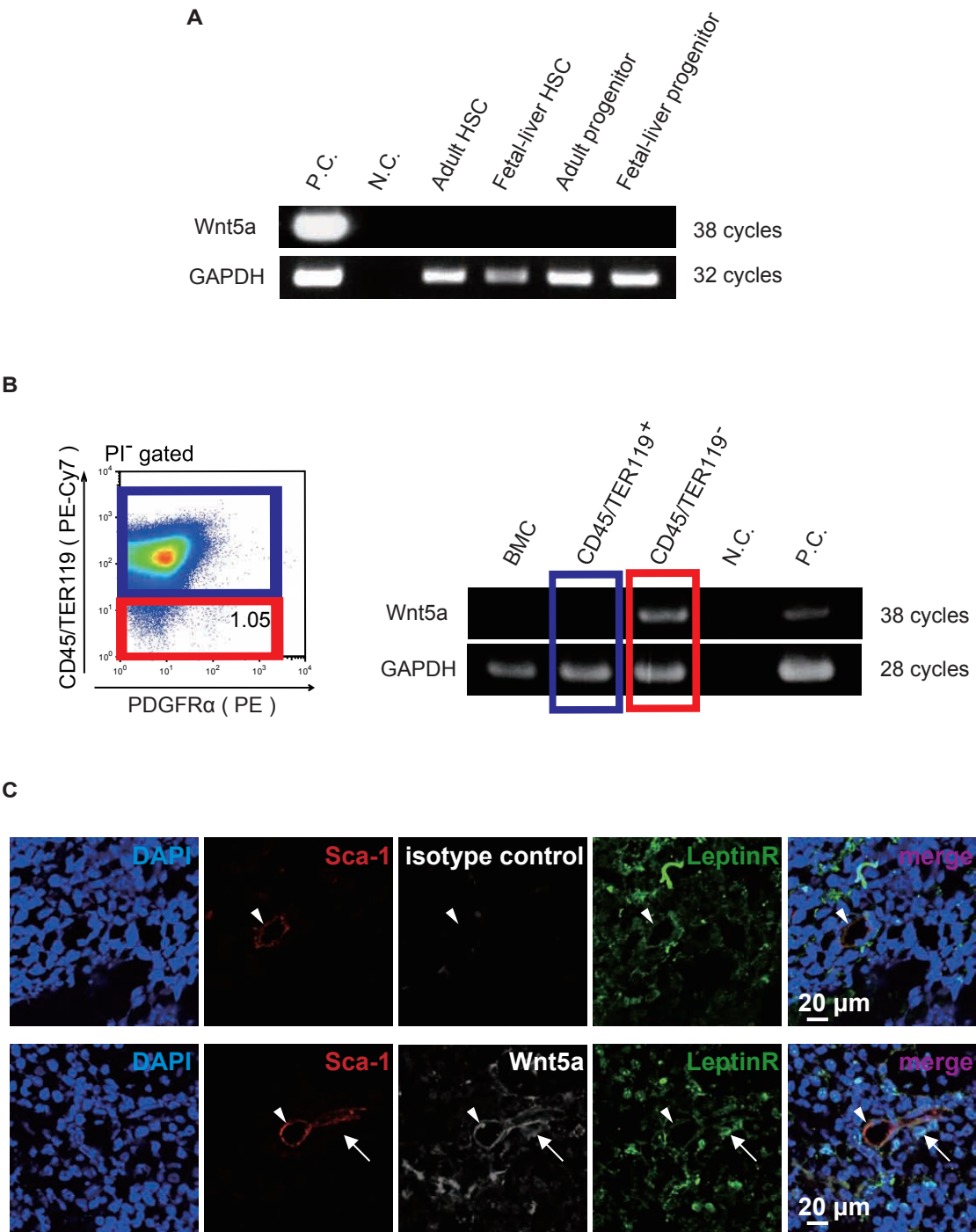
(C) 一次移植時の各マウス末梢血中の 3 系統の血球の比率。(B) で示した各テスト細胞における CD4<sup>+</sup> U CD8<sup>+</sup> 陽性細胞を T 細胞、B220 陽性の細胞を B 細胞、Mac-1<sup>+</sup> U Gr-1<sup>+</sup> 陽性の細胞を骨髄球系細胞としてテスト細胞中の割合を求めた。

(D) 二次移植における末梢血中のテスト細胞由来の血球のキメリズム。

(B) と同様の方法により、移植後 16 週目の末梢血細胞中のテスト細胞由来の % を求めた。Fresh は非培養群、ST は SCF + TPO 培養群、ST5a は SCF + TPO + Wnt5a 培養群を示す。

(E) 二次移植時の各マウス末梢血中の 3 系統の血球の比率。(D) で示した各テスト細胞における 3 系統の血球の割合を (C) と同様の方法により求めた。Tx : transplantation , \* :  $p < 0.05$  , \* \* :  $p < 0.01$  , n.s. : not significant ( Mann Whitney test により算出した )

Fig. 6



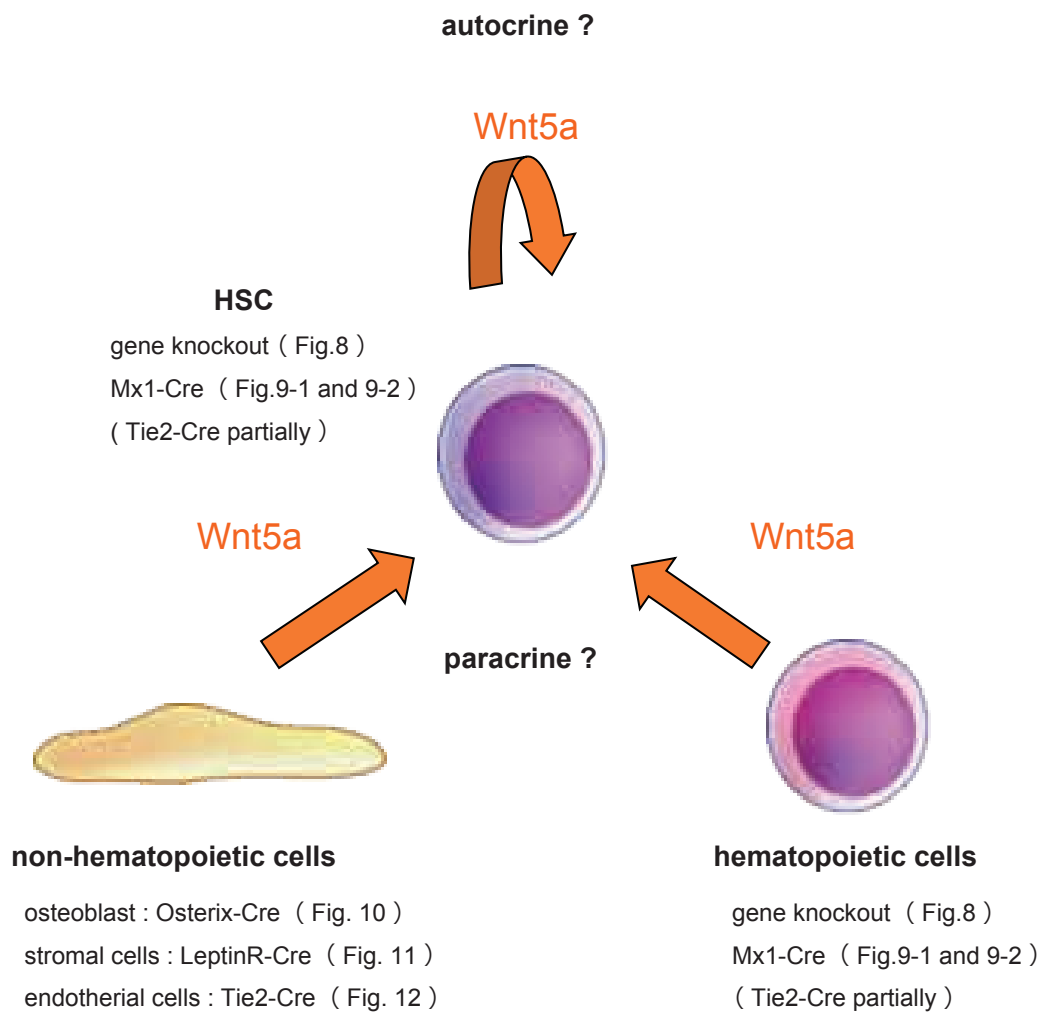
**Fig. 6**

(A) 造血幹細胞、前駆細胞における Wnt5a の発現。CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を成体骨髄中の HSC とし、CD34<sup>+</sup>KSL 細胞を成体骨髄中の前駆細胞とし、CD48<sup>+</sup>KSL 細胞を胎仔肝臓中 HSC とし、CD48<sup>+</sup>KSL 細胞を胎仔肝臓中の前駆細胞としてフローサイトメーターにより分取し、RT-PCR を行った。P.C. はポジティブコントロール、N.C. はネガティブコントロールを示す。この時の P.C. は E11.5 の AGM 領域、N.C. は H<sub>2</sub>O とした。

(B) 骨髄中の細胞における Wnt5a の発現。骨髄中の CD45 and / or TER119 陽性 ( TER119 / CD45<sup>+</sup> ) 細胞を血球、CD45、TER119 両陰性 ( TER119 / CD45<sup>-</sup> ) 細胞を非血球細胞としてフローサイトメーターにより分取し、RT-PCR を行った。BMC は骨髄細胞、N.C. はネガティブコントロール、P.C. はポジティブコントロールを示す。この時の P.C. は E12 の胎仔肝臓、N.C. は H<sub>2</sub>O とした。

(C) 凍結骨髄切片における抗 Wnt5a 抗体による蛍光免疫染色。凍結骨髄切片を抗 Sca-1 抗体、抗 Wnt5a 抗体、抗 LeptinR 抗体によって蛍光免疫染色した。白矢尻は Sca-1 陽性の血管内皮細胞を示す。白矢印は LeptinR 陽性の間葉系細胞を示す。

**Fig. 7**



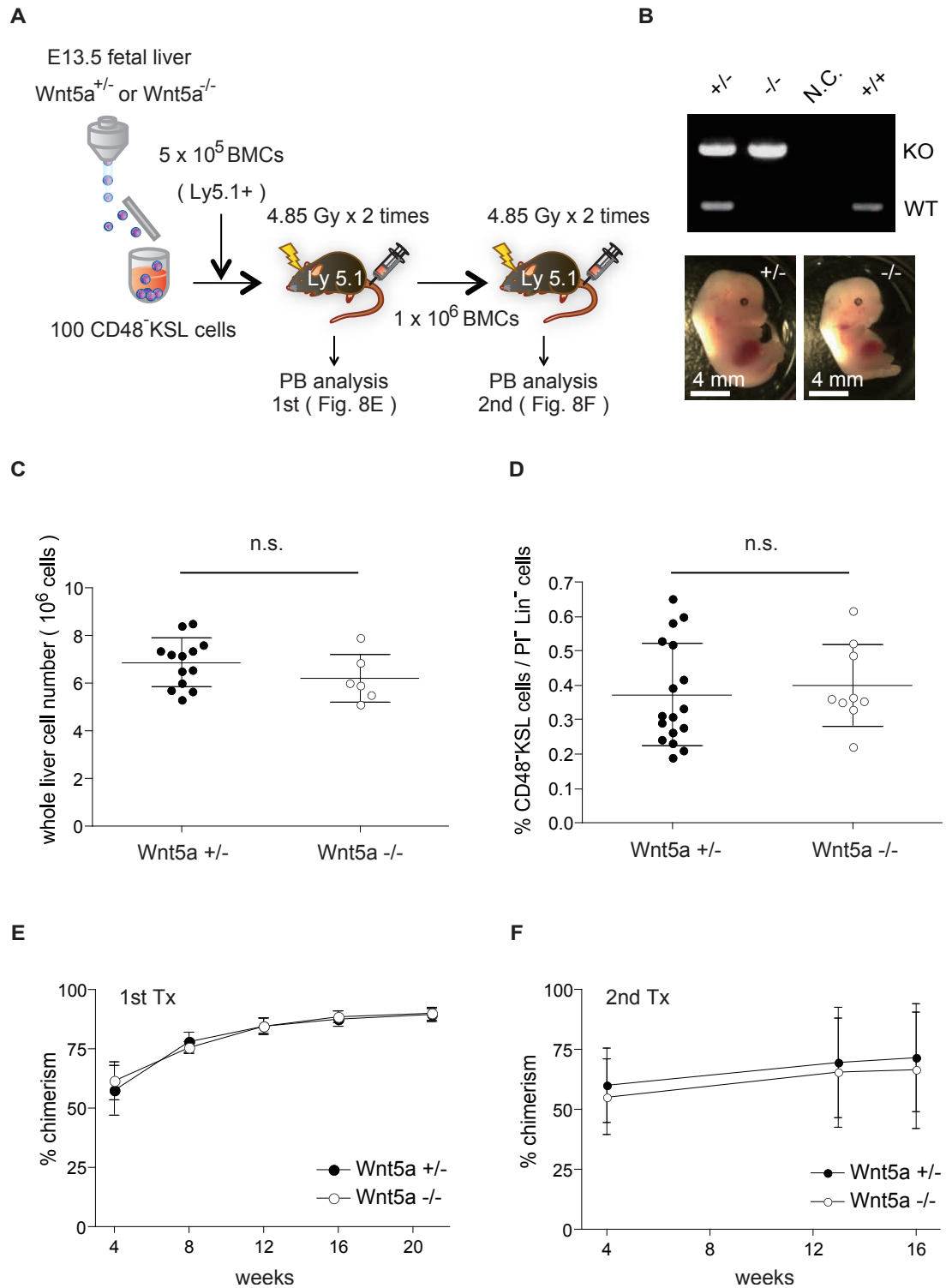
**Fig. 7**

(A) Wnt5a 欠損マウス、Wnt5a コンディショナル欠損マウスを用いた *in vivo* 解析の模式図。

Wnt5a を *in vivo* で欠損させるため、標的細胞を HSC と血球、非血球細胞とした。Wnt5a 欠損マウスより HSC を取得し、野生型のマウスに移植することで HSC および血球で Wnt5a を欠損させたときの影響を評価することができる。同様に Mx1-Cre マウスを用いることで成体マウス骨髄中の HSC と血球で Wnt5a を欠損させたときの影響を評価した。そして、非血球細胞特異的に Wnt5a を欠損させるために、骨芽細胞系譜に対しては Osterix-Cre マウス、間葉系細胞系譜に対しては LeptinR-Cre マウス、血管内皮細胞に対しては Tie2-Cre マウスを用い、Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスとかけ合わせることで、Wnt5a が欠損したときの影響を評価した。



**Fig. 8**



**Fig. 8**

(A) 胎仔肝臓細胞の競合的骨髄再構築アッセイの模式図。  $Wnt5a^{-/-}$  および  $Wnt5a^{+/+}$  胎仔肝臓より、CD48<sup>+</sup>KSL 細胞 ( Ly5.2 ) をフローサイトメーターにより 100 個ソーティングし  $5 \times 10^5$  個の競合細胞と共にレシピエント ( Ly5.1 ) に移植した ( 一次移植 )。一次移植後のレシピエントから  $1 \times 10^6$  個の骨髄細胞を取得し二次レシピエントに移植した ( 二次移植 )。

(B)  $Wnt5a$  ヘテロ欠損胎仔と  $Wnt5a$  欠損胎仔のジェノタイピング。 $Wnt5a^{-/-}$  および  $Wnt5a^{+/+}$  胎仔肝臓以外の部分から DNA を抽出し、ジェノタイピングを行った。N.C. はネガティブコントロールを示し、 $H_2O$  を用いた。

(C) 肝臓中の細胞数の比較。肝臓中の細胞をチュルク溶液により染色し、セルカウントした。

(D) 肝臓中の CD48<sup>+</sup>KSL 細胞の頻度の比較。肝臓中の細胞を抗 CD48 抗体、抗 c-Kit 抗体、抗 Sca-1 抗体、抗分化マーカー抗体で染色し、フローサイトメーターによって解析した。

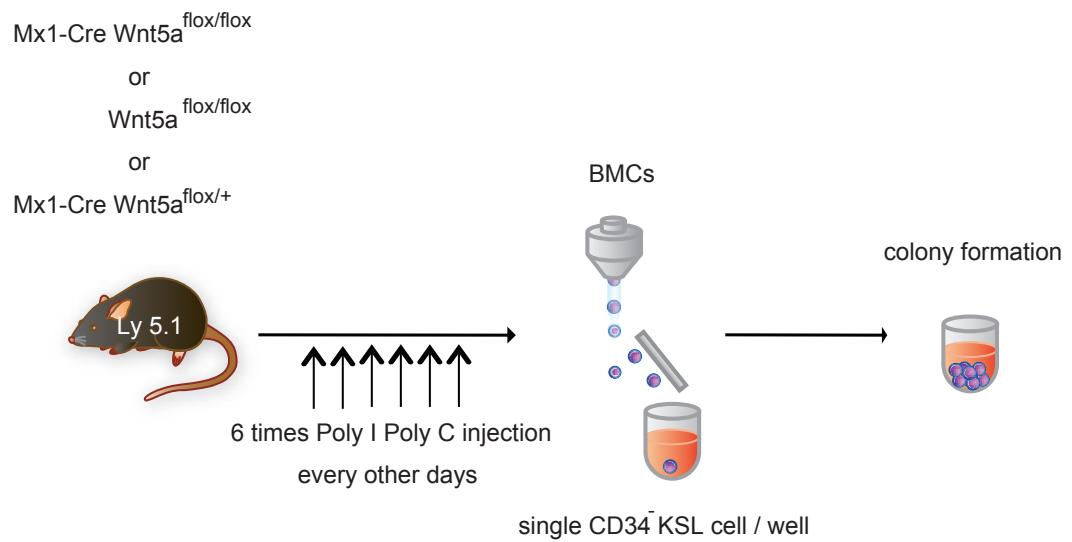
(E) 一次移植におけるキメリズムの比較。(A) の競合的骨髄再構築アッセイを行い、テスト細胞由来のキメリズムを比較した。

(F) 二次移植におけるキメリズムの比較。(A) の競合的骨髄再構築アッセイを行い、テスト細胞由来のキメリズムを比較した。

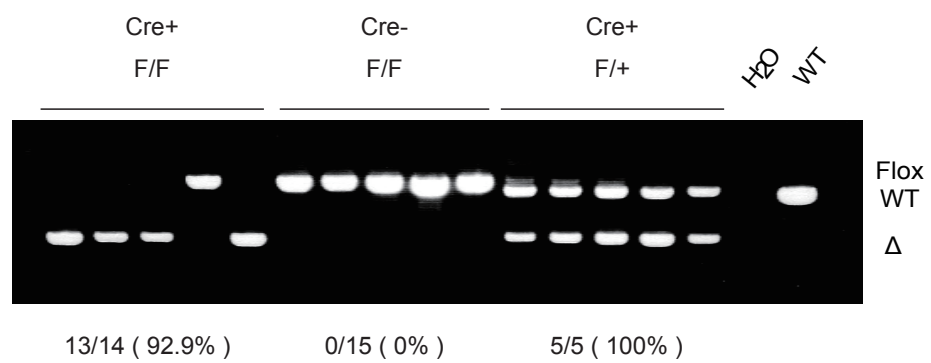
n.s. : not significant ( Mann Whitney test により算出した )

**Fig. 9-1**

**A**



**B**



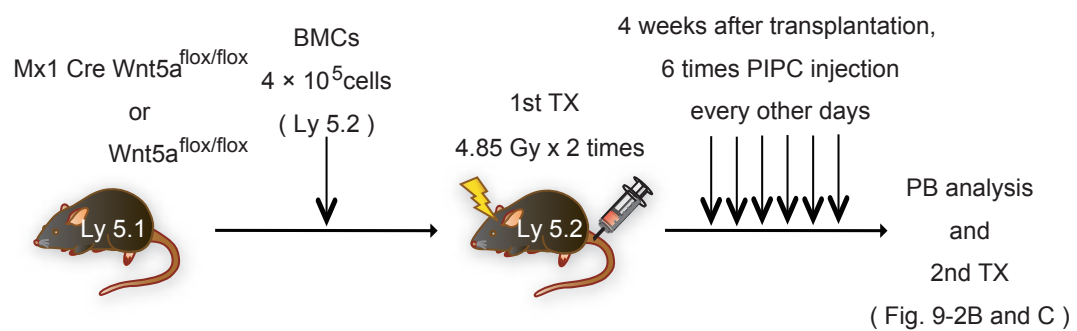
**Fig. 9-1**

(A) Polyinosinic:polycytidylic acid ( PIPC ) による Wnt5a 遺伝子のコンディショナル欠損の解析。Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup>、Wnt5a<sup>flox/flox</sup>、および Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/+</sup> マウスに対して PIPC を 6 回一日おきに投与し、CD34<sup>+</sup> KSL 細胞 1 個を 96 ウェルプレートにソーティングし、10 ng / mL SCF、10 ng / mL TPO、および 10 ng / mL の IL-3 条件下で培養し、シングルセル由来のコロニーを形成させた。

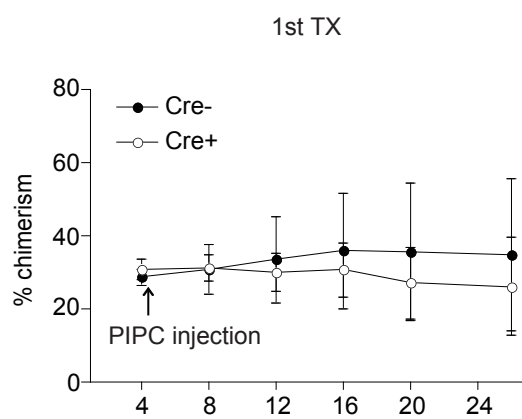
(B) コロニーを形成した細胞のジェノタイピングの代表例。シングルセル由来のコロニーより DNA を抽出し PCR を行った。Cre<sup>+</sup> は Mx1-Cre 遺伝子を持つ、Cre<sup>-</sup> は Mx1-Cre 遺伝子を持たない、+ は Wnt5a 野生型、F は Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を示す。Flox は Wnt5a<sup>flox</sup> のバンドサイズ、WT は Wnt5a 野生型のバンドサイズ、Δ は Wnt5a コンディショナル欠損型のバンドサイズを示す。ジェノタイピングの結果、Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> では合計で 14 中 13 コロニー ( 92.9 % )、Wnt5a<sup>flox/flox</sup> では合計で 15 中 0 コロニー ( 0 % )、Mx1-Cre Wnt5a<sup>flox/+</sup> では合計で 5 中 5 つのコロニー ( 100 % ) の flox サイトのコンディショナル欠損が確認された。

**Fig. 9-2**

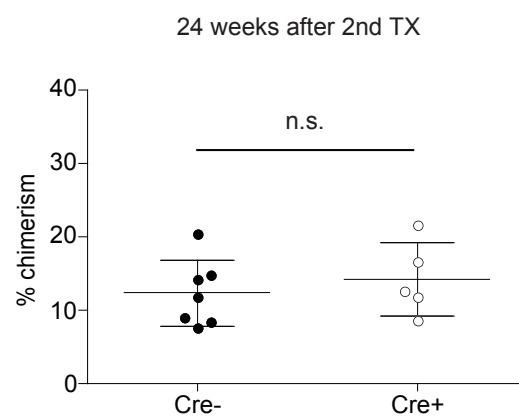
**A**



**B**



**C**



**Fig. 9-2**

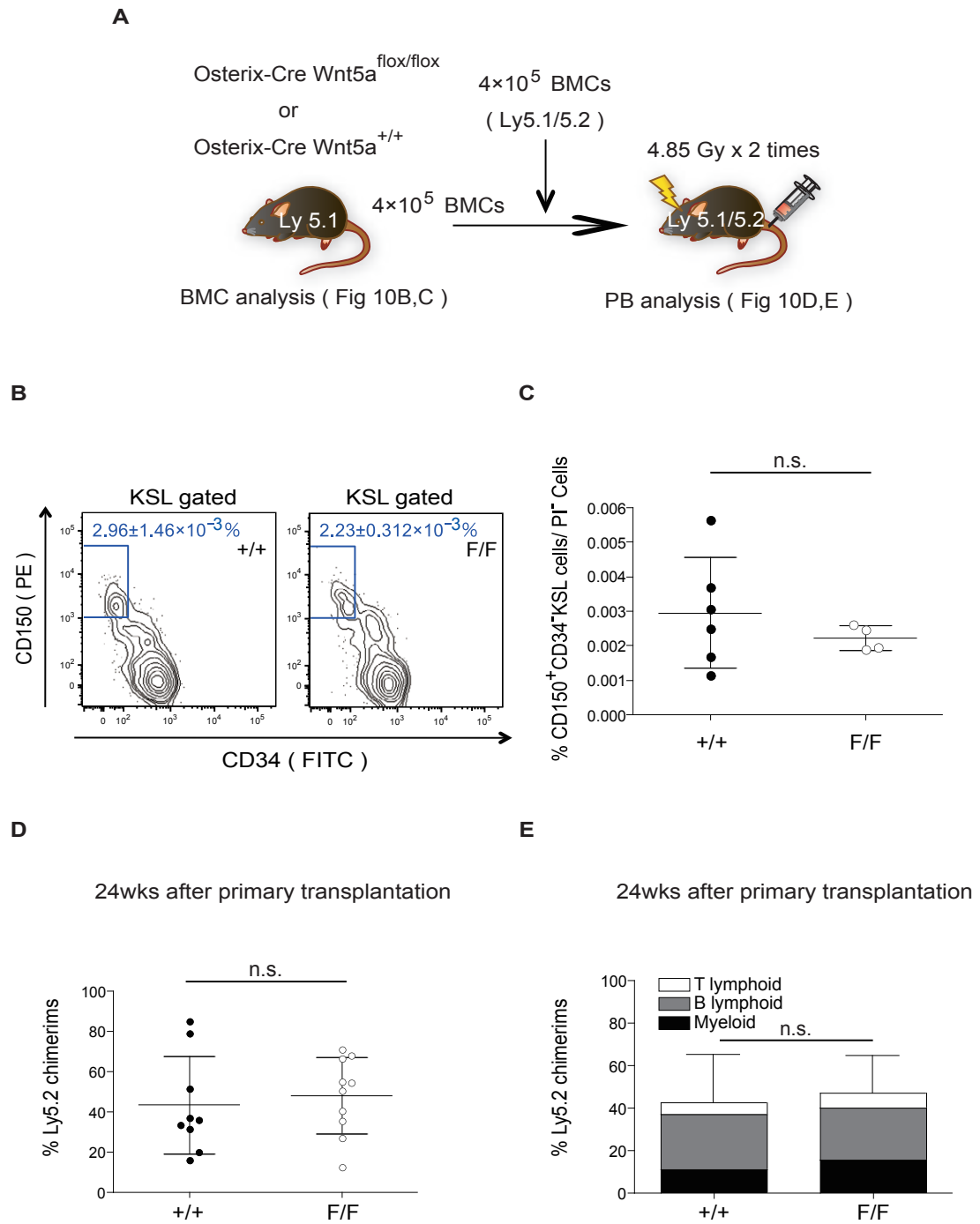
(A) 血球での Wnt5a コンディショナル欠損が、HSC の骨髄再構築能に与える影響の解析。Mx1-Cre 遺伝子を持つ Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスと持たない Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスから骨髄細胞を  $4 \times 10^5$  個 (Ly5.1) 取得し、 $4 \times 10^5$  個 (Ly5.2) の競合細胞と共に致死量放射線照射した Ly5.2 のレシピエントマウスに移植した。移植後 4 週後に末梢血を解析した後、PIPC を 6 回一日おきに投与した。その後も末梢血を定期的に解析した。

(B) 一次移植における骨髄再構築能に与える影響の比較。末梢血におけるテスト細胞のキメリズムを移植後、4、8、12、16、20、26 週目に解析した。

(C) 二次移植における骨髄再構築能に与える影響の比較。各グループの一次移植時のレシピエントから骨髄細胞を得てプールした後、一匹あたり、 $10^6$  個の骨髄細胞を二次レシピエントに移植した。移植後 24 週目における末梢血の % キメリズムを示す。

n.s. : not significant ( Mann Whitney test により算出した )

**Fig. 10**



**Fig. 10**

(A) Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを用いた HSC 集団に与える影響の解析。Osterix-Cre Wnt5a<sup>+/+</sup> マウスと Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスから骨髓細胞を  $4 \times 10^5$  個 (Ly5.2) 取得し、 $4 \times 10^5$  個 (Ly5.1 / 5.2) の競合細胞と共に致死量放射線照射した Ly5.1 / Ly5.2 のレシピエントマウスに移植した。移植後、定期的に末梢血を解析した。

(B) Osterix-Cre Wnt5a<sup>+/+</sup> マウスおよび Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髓細胞のフローサイトメーターによる解析。KSL 細胞をゲーティングした後 CD150、CD34 によって展開した代表例を示す。

(C) 造血幹細胞画分の比較。PI<sup>-</sup> 細胞中における CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞の割合をまとめたもの。

(D) 移植後 24 週目における Ly5.2 陽性テスト細胞の末梢血中のキメリズムの比較。末梢血の細胞を CD45.1、CD45.2 に対する抗体で染色し、末梢血中のテスト細胞由来の % を求めた。

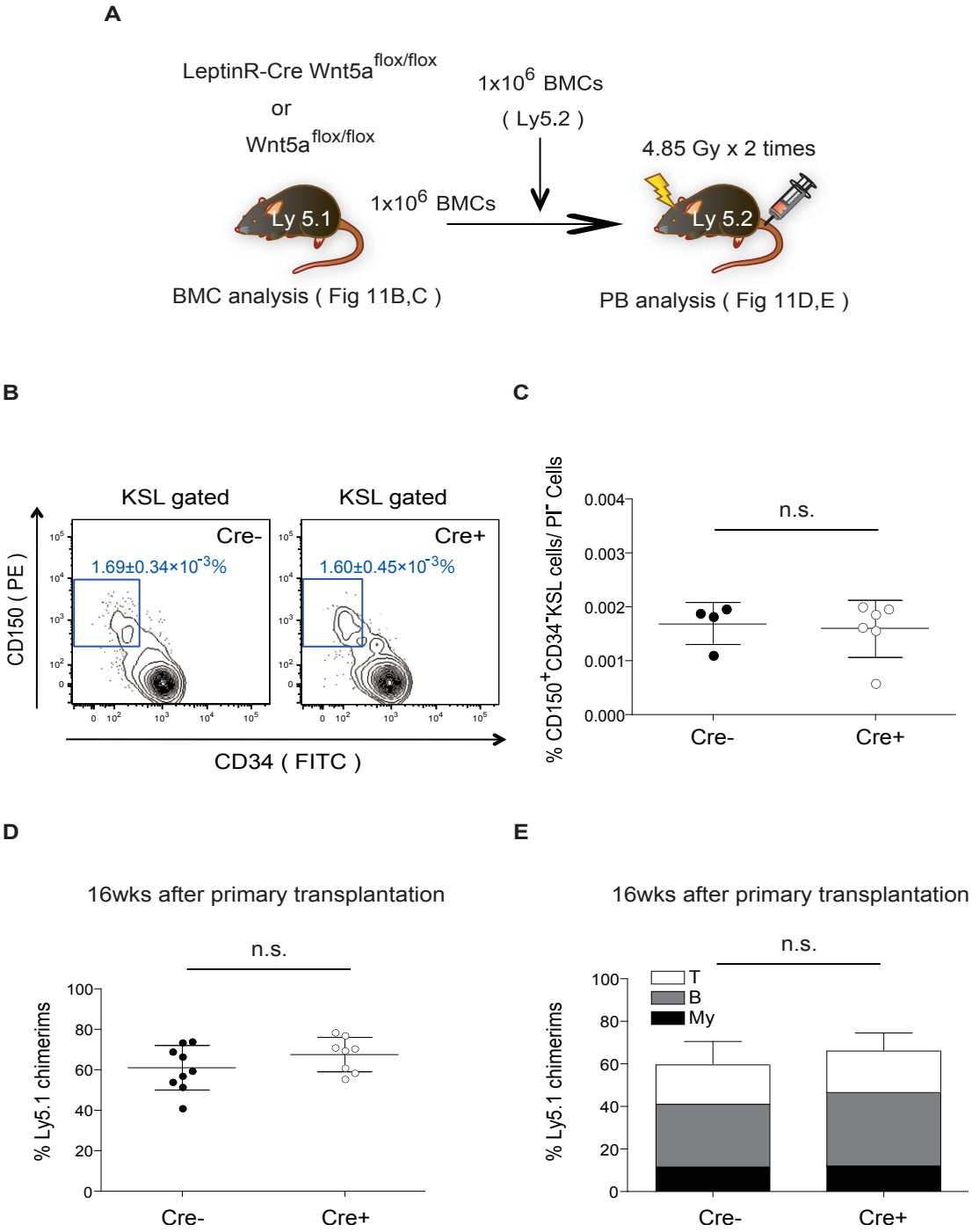
(E) 移植後 24 週目におけるテスト細胞中の三系統の血球の比率。(D) で示したテスト細胞の中で CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 陽性細胞を T 細胞、B220<sup>+</sup> 陽性の細胞を B 細胞、Mac-1<sup>+</sup> Gr-1<sup>-</sup> 陽性の細胞を骨髓球系細胞としてテスト細胞中の割合を求めた。

+ / + は Osterix-Cre Wnt5a<sup>+/+</sup> を表し、F / F は Osterix-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を表す。

n.s. : not significant ( Mann-Whitney test により算出した )



**Fig. 11**



**Fig. 11**

(A) LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを用いた HSC 集団の解析。LeptinR-Cre を持つ Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスと持たない Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスから骨髓細胞を  $1 \times 10^6$  個 (Ly5.1) 取得し、 $1 \times 10^6$  個 (Ly5.2) の競合細胞と共に致死量放射線照射した Ly5.2 のレシピエントマウスに移植した。移植後、定期的に末梢血を解析した。

(B) LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスおよび Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髓細胞のフローサイトメーターによる解析。KSL 細胞をゲーティングした後 CD150、CD34 によって展開した代表例を示す。

(C) 造血幹細胞画分の比較。PI<sup>+</sup> 細胞中における CD150<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KSL 細胞の割合をまとめたもの。

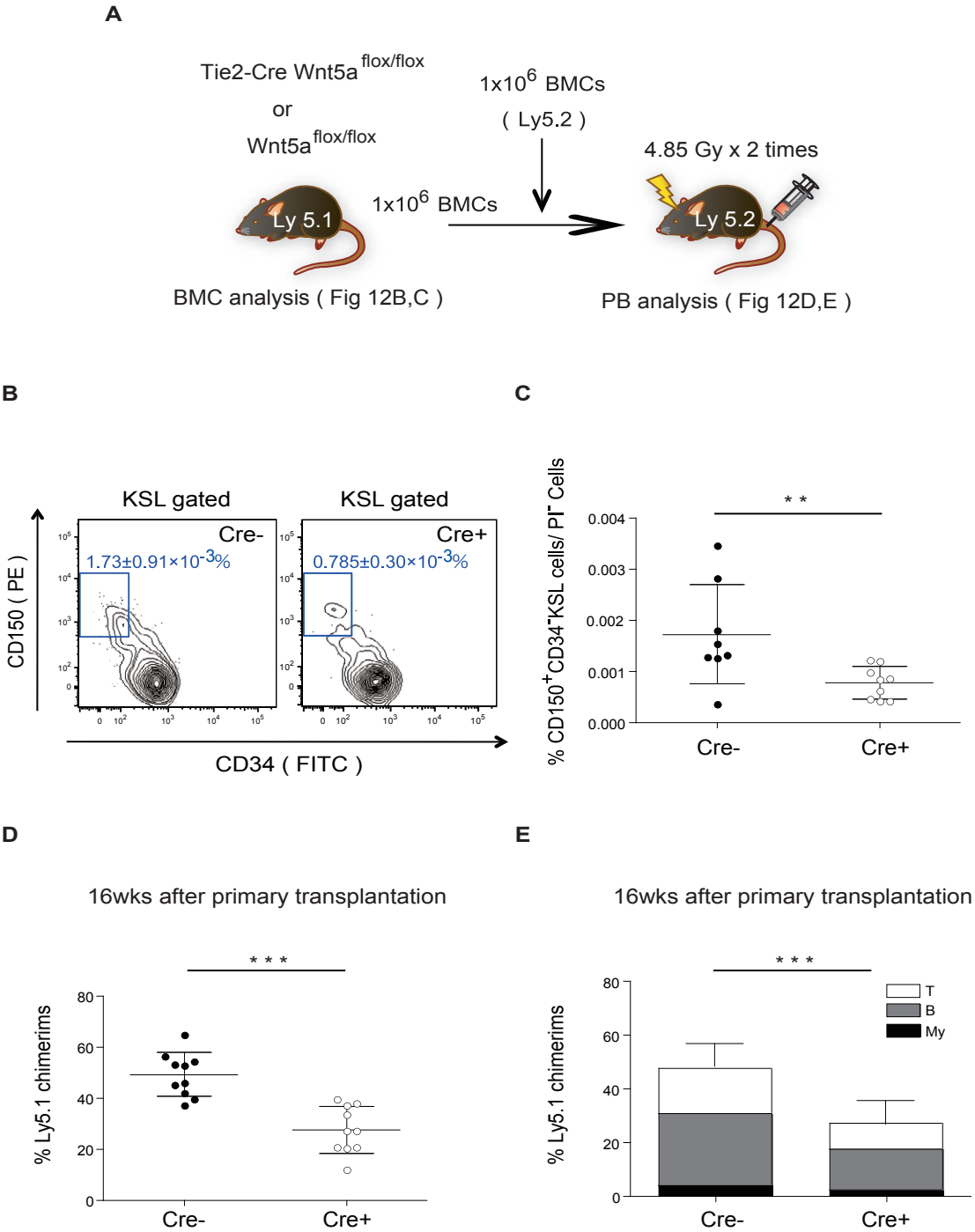
(D) 移植後 16 週目における Ly5.2 陽性テスト細胞の末梢血中のキメリズムの比較。末梢血の細胞を CD45.1、CD45.2 に対する抗体で染色し、末梢血中のテスト細胞由来の % を求めた。

(E) 移植後 16 週目におけるテスト細胞中の三系統の血球の比率。(D) で示したテスト細胞の中で CD4<sup>+</sup> U CD8<sup>+</sup> 陽性細胞を T 細胞、B220<sup>+</sup> 陽性の細胞を B 細胞、Mac-1<sup>+</sup> U Gr-1<sup>+</sup> 陽性の細胞を骨髓球系細胞としてテスト細胞中の割合を求めた。

Cre<sup>+</sup> は LeptinR-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を表し、Cre<sup>-</sup> は Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を表す。

n.s. : not significant ( Mann-Whitney test により算出した )

**Fig. 12**



**Fig. 12**

(A) Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスを用いた HSC 集団の解析。Tie2-Cre を持つ Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスと持たない Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスから骨髓細胞を  $1 \times 10^6$  個 (Ly5.1) 取得し、 $1 \times 10^6$  個 (Ly5.2) の競合細胞と共に致死量放射線照射した Ly5.2 のレシピエントマウスに移植した。移植後、定期的に末梢血を解析した。

(B) Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウスおよび Wnt5a<sup>flox/flox</sup> マウス骨髓細胞のフローサイトメーターによる解析。KSL 細胞をゲーティングした後 CD150、CD34 によって展開した代表例を示す。

(C) 造血幹細胞画分の比較。PI<sup>-</sup> 細胞中における CD150<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>KSL 細胞の割合をまとめたもの。

(D) 移植後 16 週目における Ly5.2 陽性テスト細胞の末梢血中のキメリズムの比較。末梢血の細胞を CD45.1、CD45.2 に対する抗体で染色し、末梢血中のテスト細胞由来の % を求めた。

(E) 移植後 16 週目におけるテスト細胞中の三系統の血球の比率。(D) で示したテスト細胞の中で CD4<sup>+</sup> U CD8<sup>+</sup> 陽性細胞を T 細胞、B220<sup>+</sup> 陽性の細胞を B 細胞、Mac-1<sup>+</sup> U Gr-1<sup>+</sup> 陽性の細胞を骨髓球系細胞としてテスト細胞中の割合を求めた。

Cre<sup>+</sup> は Tie2-Cre Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を表し、Cre<sup>-</sup> は Wnt5a<sup>flox/flox</sup> を表す。

\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.0001$  (Mann-Whitney test により算出した)

**Table. 1****A**

target	clone	concentration	final conc.	company
Ter119	TER119	0.5 mg/mL	143 µg/mL	eBioscience
Gr-1	RB6-8C5	0.5 mg/mL	143 µg/mL	eBioscience
B220	A73-602	0.5 mg/mL	71.4 µg/mL	Biolegend
CD4	RM4-5	0.5 mg/mL	35.7 µg/mL	eBioscience
CD8	53-6.7	0.5 mg/mL	35.7 µg/mL	eBioscience
IL-7R	A7R34	0.5 mg/mL	71.4 µg/mL	eBioscience

**B**

target	clone	concentration	final conc.	company
TER119	TER119	0.5 mg/mL	143 µg/mL	eBioscience
Gr-1	RB6-8C5	0.5 mg/mL	143 µg/mL	eBioscience
B220	A73-602	0.5 mg/mL	71.4 µg/mL	Biolegend
CD4	RM4-5	0.5 mg/mL	35.7 µg/mL	eBioscience
CD8	53-6.7	0.5 mg/mL	35.7 µg/mL	eBioscience

**C**

target	clone	concentration	final conc.	company
CD45.1	A20	0.5 mg/mL	1 µg/mL	eBioscience
CD45.2	104	0.5 mg/mL	1 µg/mL	eBioscience
CD4	RM4-5	0.2 mg/mL	0.4 µg/mL	eBioscience
CD8	53-6.7	0.2 mg/mL	0.4 µg/mL	eBioscience
Mac-1	M1/70	0.2 mg/mL	0.1 µg/mL	eBioscience
Gr-1	RB6-8C5	0.2 mg/mL	0.1 µg/mL	eBioscience
B220	A73-602	0.5 mg/mL	1 µg/mL	Biolegend

**Table. 1**

- (A) マウス成体骨髄中 HSC 純化の際に用いた抗分化マーカー抗体リスト。  
 (B) マウス胎仔肝臓中 HSC 純化の際に用いた抗分化マーカー抗体リスト。  
 (C) 末梢血解析時に用いた抗体リスト。

**Table. 2**

A			
target	clone / protein	conjugation	company
CD34	RAM34 / Rat IgG	FITC	eBioscience
CD48	HM48-1 / Hamster IgG	Alexa488	Biolegend
CD117	2B8 / Rat IgG	APC	Biolegend
CD150	TC15-12F12.2 / Rat IgG	PE	eBioscience
Sca-1	D 7 / Rat IgG	PECy7	eBioscience
biotin	- / streptavidin	APCCy7	Biolegend
B			
target	clone / protein	conjugation	company
Wnt5a	442625 / Rat IgG2a	-	R&D systems
Sca-1	D 7 / Rat IgG	PE	eBioscience
Leptin R	polyclonal / Goat IgG	-	R&D systems
-	2H3 / Rat IgG2a	-	MBL
Goat IgG	polyclonal / Donkey Ig	Alexa Fluor 488	Invitrogen
Rat IgG	polyclonal / Chicken Ig	Alexa Fluor 647	Invitrogen

**Table. 2**

(A) フローサイトメータ解析に用いた抗体、蛍光色素リスト。

(B) 免疫蛍光染色に用いた抗体、蛍光色素リスト。