

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14980

研究課題名(和文) 組織再生における有核血球細胞の動態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the dynamics of nucleated blood cells in tissue regeneration

研究代表者

原本 悦和 (HARAMOTO, Yoshikazu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30540869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：組織が損傷を受けた際、最初に起こる重要な生理反応が止血である。止血の際に形成される血餅には多くの血球がトラップされる。哺乳類以外の生物では、赤血球や血小板の役割を果たす栓球が有核であることから、これらの血球細胞が無核である哺乳類とは異なる生理反応を示す可能性がある。本研究では、血液凝固反応の過程で血餅にトラップされる有核血球細胞がダイナミックに遺伝子発現を変化させていることを明らかにした。また、各種血球細胞を識別するためのマーカー探索および標識技術の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類と異なり、両生類では赤血球や血小板の働きを担う栓球が有核であることに着目し、創傷治癒のもっとも初期におこる血液凝固反応において、有核血球細胞が担う役割について解析を進めた。両生類がもつ高い創傷治癒・組織再生能力に関して、独創的な観点に基づいてメカニズムの解明に取り組む挑戦的な研究である。血液凝固反応における有核血球細胞の動態と生理的役割が明らかになれば、これらの細胞が担っていた役割を別のかたちで付与することによって、新たな再生医療技術の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：When tissue is damaged, the first important physiological response is hemostasis. Many blood cells are trapped in the blood clot formed during hemostasis. In organisms other than mammals, since erythrocytes and thrombocytes that play a role of platelets are nucleated, these blood cells may exhibit different physiological responses from that anucleated those of mammals. In this study, we clarified that nucleated blood cells trapped in blood clots dynamically change gene expression in the process of blood coagulation reaction and searched for markers and labeling techniques to identify each blood cell type.

研究分野：発生生物学

キーワード：血球細胞 血液凝固 両生類 ツメガエル イペリアトゲイモリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織が創傷を負った際、最初に起こる重要な生理反応の一つが止血である。止血のメカニズムは古くから研究がなされており、多くの因子が関与する精緻なシステムであることが知られている。本研究では、止血の際に形成される血餅を構成する細胞に着目した。血餅には赤血球、白血球、血小板など多くの血球がトラップされていることは容易に想像できる。哺乳類の赤血球は無核であるのに対して、他の脊椎動物の赤血球は有核であることが知られている。また、哺乳類では無核の血小板が血液凝固に関与するのに対して、他の脊椎動物では、これに相当する栓球と呼ばれる有核の細胞が関与している。哺乳類は、『赤血球から核を除く』あるいは『細胞質を分割して血小板を作る』などの機構を獲得することで新たな血球を産生出来るようになった一方で、これらの血球から核を失ったとも言える。これまで、哺乳類の赤血球や血小板が無核であることの生理的意義についてはいくつか説が唱えられている。しかし、その他の脊椎動物において、赤血球や栓球の核が果たす役割についてはほとんど研究されてこなかった。鳥類の末梢血を用いた研究において、赤血球の機能を維持するために必要なグロビン遺伝子の転写が確認されているにすぎない。しかし、この結果は末梢血であっても有核赤血球は新たに RNA を転写する能力を有していることを示している。血液凝固は損傷部位において迅速に起こる生理反応であり、その過程において血餅にトラップされる有核血球細胞がダイナミックに遺伝子発現を変化させることによって、これまで知られていない生理機能を発揮しているのではないかと、さらに創傷治癒・組織再生能力が高い両生類において重要な役割を担っているのではないかと、という着想に至った。

2. 研究の目的

止血の際に形成される血餅には多くの血球がトラップされる。哺乳類以外の生物では、赤血球や血小板の役割を果たす栓球が有核であることから、これらの血球細胞が無核である哺乳類とは異なる生理反応を示す可能性が考えられる。しかし、このような視点から有核血球細胞の役割を調べる研究はなされてこなかった。本研究は、各血球細胞を識別するためのマーカー探索、および標識技術の検討を行うとともに、遺伝子発現解析から、両生類の止血反応時における有核血球細胞の動態と生理的役割、それらの反応に関わるシグナル経路の解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 血液凝固時の経時的遺伝子発現の網羅的解析

両生類の中でも遺伝子情報が整備されているアフリカツメガエルを利用して、血液凝固後の継続的な遺伝子発現変化を網羅的に解析する。採血直後の血液試料と血液凝固後時間経過した血餅試料を用いて、経時的な遺伝子発現変化をマイクロアレイにより網羅的に調べることで、血液凝固後に有核血球細胞がどのような変化を引き起こしているのか、遺伝子発現の側面から明らかにする。

(2) 各種血球マーカーの同定

止血反応における有核血球の生理的役割を明らかにするためには、血球細胞の動態を *in vivo* で追跡する必要がある。ライブイメージングに必要な各血球マーカーの探索および血球細胞の標識技術を検討する。新たなマーカー遺伝子の探索に加え、糖鎖構造特異的に結合するレクチンをスライドガラス上にアレイ化したレクチンアレイを用いた解析から、各血球特異的に結合するレクチンマーカーの選定を進める。血球細胞表面の糖鎖構造を認識して結合するレクチンを蛍

光色素で標識して、各血球細胞を染色する方法を検討する。また、長期にわたる追跡を可能とするため、蛍光タンパク質遺伝子導入方法を検討する。

4. 研究成果

(1) 鮮血（採血直後）、血餅（採血1時間後）の試料から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、血餅形成後1時間で200を超える遺伝子が2倍以上発現上昇しており、血液凝固が引き金となって新たな転写反応が起こることがわかった。更に、血液凝固開始から3時間後および5時間後の血餅試料から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現の経時的変化を調べた結果、早い段階では、脂質・ホルモン応答、プログラム細胞死、細胞表面のシグナル伝達経路に関わる遺伝子群が発現上昇し、その後、器官形成・組織発生に関わる遺伝子群が発現上昇することがわかった。これは赤血球・栓球・白血球などすべての血球成分を含んだ結果であるが、血餅内にトラップされた血球細胞から積極的な転写が行われている証拠として非常に興味深い。今回、遺伝子発現変化を起こしている細胞種の同定には至っていない。血液凝固反応がそれぞれの細胞にどのような変化をもたらすのか、その結果として血餅全体におこる変化について、引き続き詳細な解析が必要である。

(2) 新たなマーカー遺伝子の解析を進めている。この遺伝子は、アフリカツメガエル幼生期において、胚内に散在する血球細胞に特徴的な発現を示すが、既知遺伝子のパターンとは異なっている。密度勾配遠心法により成体の循環血を解析すると、赤血球層と血漿との間に生じるパフィーコート（白血球や栓球・血小板の層）に含まれる血球細胞で発現していることがわかってきた。今後、この遺伝子を発現している血球種の詳細な分類を進めるだけでなく、同定した血球マーカー遺伝子が生体内でどのような役割を果たしているのかについても解析を進めたい。

両生類の中でも高い治癒能力をもつ有尾両生類を用いて解析を行うには、遺伝子配列情報を得る必要があった。しかし、イモリはゲノムサイズが大きいなどの理由で、研究の基盤となる遺伝子配列情報がほとんど整備されていなかった。有尾両生類であるイペリアトゲイモリは、日本の研究者が中心となって、飼育システムの確立、近交系の確立、高効率のゲノム編集法の開発など研究基盤の構築が進められており、実験室での飼育や繁殖が容易な新しいモデル生物として注目されている。そこで、国内の複数の研究機関と共同して、様々な試料から抽出した RNA をもとに網羅的な遺伝子配列情報を得た。その成果は誌上发表するとともに、得られた遺伝子配列情報はポータルサイト iNewt で公開しており、研究者が自由に利用することが可能となっている。

(3) 血球細胞表面の糖鎖構造は、血球を区別する重要な要素となることから、各血球細胞の表面糖鎖構造を特異的に認識して結合するレクチンの選定を進めた。蛍光色素標識したレクチンによる染色性の差異によって血球細胞を分類することを目指した。各血球細胞に対して異なる結合性を示すレクチンを見出している（図1）。

この結合特異性が両生類生物種間を超えて保存されるのかどうか、無尾両生類・有尾両生類それぞれのモデル生物を用いて検証するとともに、これらの結果をもと

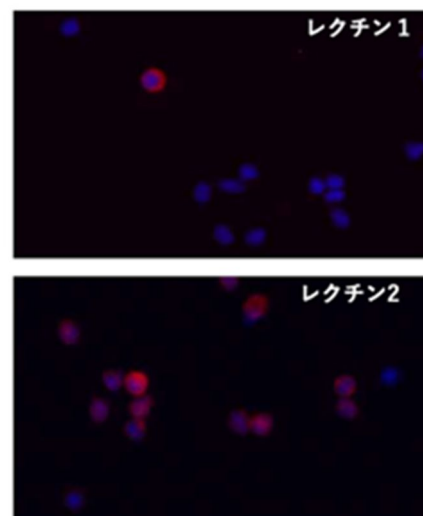


図1: ツメガエル血液細胞のレクチン染色例

に、生物種に応じた各血球細胞の選別技術・標識技術の最適化を進めたい。

(4)細胞質型ウイルスベクターであるセンダイウイルスベクター(SeV)が、多くの哺乳動物細胞に感染・増幅できることから、遺伝子導入のための新しい有望な手段として利用されている。細胞の挙動をリアルタイム観察するための方法として、SeV システムによる遺伝子導入法の検討を行った。アフリカツメガエル初期胚(図2)や培養細胞株(A6)(図3)を用いて検討したところ、細胞の種類によって遺伝子導入効率がかなり異なる可能性が示された。細胞種によっては、ウイルスベクターによる遺伝子導入が効率的に行えない可能性もあるため、細胞を標識する手法については更に検討を進める必要がある。

ゲノム編集技術等を用いて、各血球マーカー遺伝子の発現制御領域を結合したレポーター遺伝子をノックインする、あるいは蛍光標識したレクチンで生染色するなどの方法により、特定の血球細胞を標識することで、血液凝固反応およびその後の創傷治癒過程における各血球細胞の役割を明らかにしたい。蛍光ラベルしたレクチンマーカーを用いることで、フローサイトメーターにより、各血球細胞を分取することが容易になると期待される。

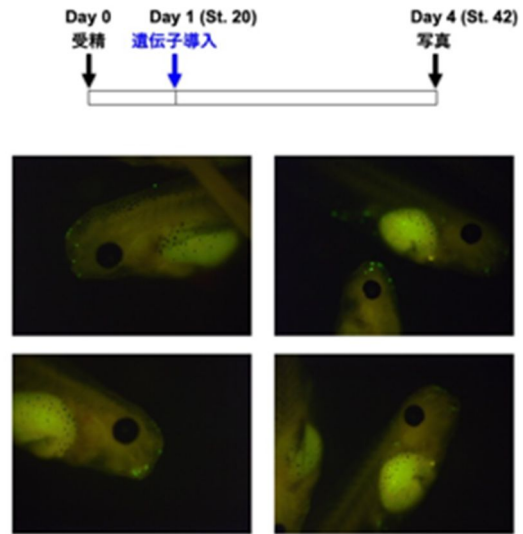


図2: センダイウイルスベクターを用いたツメガエル胚への蛍光タンパク質遺伝子の導入

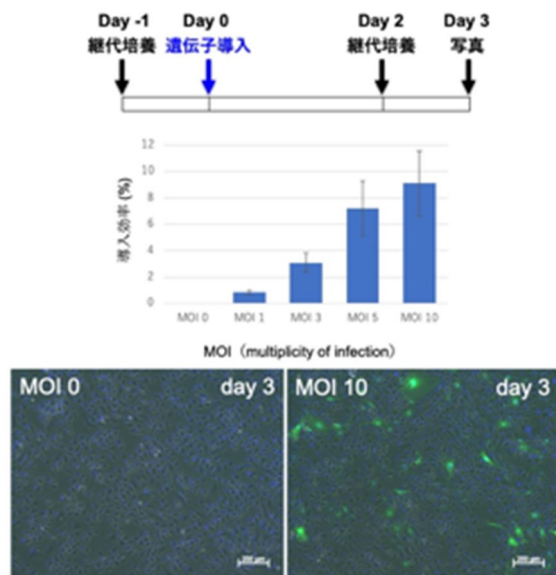


図3: センダイウイルスベクターを用いたA6細胞への蛍光タンパク質遺伝子の導入

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsunami Masatoshi, Suzuki Miyuki, Haramoto Yoshikazu, Fukui Akimasa, Inoue Takeshi, Yamaguchi Katsushi, Uchiyama Ikuo, Mori Kazuki, Tashiro Kosuke, Ito Yuzuru, Takeuchi Takashi, Suzuki Ken-ichi T, Agata Kiyokazu, Shigenobu Shuji, Hayashi Toshinori | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 A comprehensive reference transcriptome resource for the Iberian ribbed newt <i>Pleurodeles waltl</i> , an emerging model for developmental and regeneration biology | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 DNA Research | 6. 最初と最後の頁 217-229 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsz003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Haramoto Yoshikazu, Ito Yuzuru, Onuma Yasuko |
| 2. 発表標題 Sendai virus vector-based gene transfection into <i>Xenopus</i> embryos and cells |
| 3. 学会等名 17th International <i>Xenopus</i> Conference（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 原本悦和、梶山康平、小沼泰子、伊藤弓弦 |
| 2. 発表標題 組織再生における有核血球細胞の役割 |
| 3. 学会等名 第11回ツメガエル研究集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

iNewt
<http://www.nibb.ac.jp/imori/main/>
イモリの再生能力の謎に迫る遺伝子カタログの作成 - 新規の器官再生研究モデル生物イペリアトゲイモリ -
https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2019/pr20190424_2/pr20190424_2.html

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|