

令和元年6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16201

研究課題名(和文)造血制御における転写因子KLF2の役割の解明

研究課題名(英文)The role of transcription factor KLF2 in the regulation of hematopoiesis

研究代表者

石橋 知彦 (Ishibashi, Tomohiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30722285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血の恒常性維持に骨髄微小環境の血管系が重要である。血管系の安定性維持に重要な転写因子として知られているKlf2をTie2プロモーター制御下に過剰発現するマウス(Tie2-Klf2-Tgマウス)を用いて、Klf2や血管安定化が造血制御に及ぼす影響を解析し、Pro-B細胞以降のB前駆細胞が増加していることを見出した。Tie2のリガンドであり血管安定化作用を有するアンジオポエチン-1を過剰発現するマウスでも造血系の解析を行ったところ、リンパ球系の未分化細胞が増加することが分かり、血管安定性制御とリンパ球系造血とが密接に関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞は加齢にしたがって質的に変化し、リンパ球産生能が低下するなどの老化現象が生じることが知られている。一方、骨髄の血管構造も加齢とともに変化することが報告されている。本研究の成果は、血管安定性を制御することでリンパ球系への分化能を回復できる可能性を示唆しており、加齢に伴って低下したリンパ球分化能を回復するなどの臨床応用へ向けた基盤となると考えられる。また、研究代表者は以前に白血病細胞と血管内皮細胞との相互作用の重要性を報告しており、血管安定性の調節による造血細胞と血管系との相互作用の制御は、白血病などの造血器腫瘍における新規治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Vasculature in the bone marrow (BM) microenvironment plays a significant role in the regulation of hematopoiesis. Kruppel-like factor-2 (Klf2) is a transcription factor, which plays an important role in the regulation of endothelial cell function. To elucidate the interaction between vascular stability and hematopoiesis, we analyzed Tie2-Klf2-transgenic (Tg) mice, which express Klf2 under the regulation of Tie2 promoter. We confirmed that BM LSK cells and CD31-positive endothelial cells from Tie2-Klf2-Tg mice expressed the higher levels of Klf2 than those from wild-type control mice. Tie2-Klf2-Tg mice showed increased B-lineage progenitors after the Pro-B stage in the BM. We also analyzed mice which overexpress Angiopoietin-1, which is a ligand for the Tie2 receptor and has a vascular stabilizing effect, and these mice also showed increased number of lymphoid progenitors. These results suggest the close interaction between vascular stability and hematopoiesis.

研究分野：血液内科学

キーワード：KLF2 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は生涯にわたりすべての血球を産生する自己複製能・多分化能を有した細胞であり、骨髄内のニッチと呼ばれる微小環境に存在し、造血恒常性を維持している (Morrison SJ, Scadden DT. *Nature* 2014;505:327)。造血幹細胞のみならず、リンパ球系前駆細胞にも特徴的なニッチがあることも報告されている。骨髄ニッチを構成する細胞としては、血液細胞のほかに、血管内皮細胞、間葉系細胞、骨芽細胞、神経細胞などが報告されているが、中でも血管内皮細胞・周皮細胞などの血管系は造血と密接に関係しているとの報告が多数なされている (Kunisaki Y, et al. *Nature* 2014;502:637, Acar M, et al. *Nature* 2015;526:126)。

研究代表者は、血管内皮細胞マーカーとして報告された endothelial cell-specific adhesion molecule (ESAM) という接着分子の造血幹細胞における発現意義について研究し、(1) ESAM はヒト造血幹細胞マーカーとして有用であり、ヒト造血幹細胞の純化に利用できること、(2) 急性骨髄性白血病症例の白血病細胞にも ESAM が発現しており、骨髄への生着能と関連することを報告した (Ishibashi T, et al. *Exp Hematol* 2016;44:269)。ESAM 陽性白血病細胞は ESAM 陰性白血病細胞と比べて免疫不全マウスへの生着能が高く、ESAM は同種親和性の接着分子であることから、ESAM を介した血液細胞-血管内皮細胞間の相互作用の重要性が示唆された。以上のことから、血管系が造血を支持する分子機構を明らかにすることは、正常造血についての理解を深めるのみならず、白血病の発症機構や治療抵抗性機構の解明にも繋がるものと期待される。

骨髄の血管系が造血と密接に関係していることから、血管系の安定性が保たれることは造血の恒常性維持において極めて重要であると推測される。血管内皮細胞の安定性を維持する転写因子として KLF2 の重要性が知られている (Atkins GB and Jain MK. *Circ Res* 2007;100:1686)。KLF2 は zinc finger モチーフを有する転写因子であり、スタチンや層流 (ずり応力) によって内皮細胞での発現が増強し、eNOS や S1P1 受容体を介して血管安定性をもたらす (Sen-Banerjee S, et al. *Circulation* 2005;112:720)。血液分野においては、赤血球分化に必要であること、B 細胞・T 細胞の活性化に関与していること、B1 細胞の維持に重要であること等が報告されている (Cao Z, et al. *Blood* 2010;116:4404, Hart GT, et al. *J Immunol* 2012;189:3293)。また、脾辺縁帯リンパ腫の 42% で Klf2 の変異が認められるとの報告もある (Clipson A, et al. *Leukemia* 2015;29:1177)。しかし、KLF2 と骨髄ニッチとの関連性についてはこれまで検討されておらず、血管の安定性変化が造血へどのように影響するかについては、まだ十分に明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の所属する研究施設で作製された Tie2 プロモーター制御下に Klf2 を過剰発現するマウス (Tie2-Klf2-TG マウス) を用いて、KLF2 が造血制御に果たす役割について明らかにする。血管の安定性変化が造血へどのように影響するかを調べるため、血管の安定性に関わる分子である Angiopoietin-1 を血管周囲で過剰発現させたマウスも作製し、造血系の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Tie2-Klf2-TG マウスの骨髄微小環境における Klf2 発現変化

Tie2-Klf2-Tg マウスの骨髄をコラゲナーゼによる酵素処理し、フローサイトメトリーによって血管内皮細胞分画と造血幹・前駆細胞分画を分取し、リアルタイム PCR によって Klf2 発現量を定量した。

### (2) Tie2-Klf2-TG マウスの造血系の解析

Tie2-Klf2-Tg マウスおよび野生型のコントロールマウスの造血組織 (末梢血、骨髄、脾臓) を採取し、フローサイトメトリーによって解析した。

### (3) Angiopoietin-1 過剰発現マウスの造血系の解析

タモキシフェン誘導型 CreERT2 システムによって Angiopoietin-1 を過剰発現するマウスを用いて、マウスの造血組織 (末梢血、骨髄、脾臓) を採取し、フローサイトメトリーによって解析した。CreERT2 陰性のマウスをコントロールとした。

## 4. 研究成果

### (1) Tie2-Klf2-TG マウスの骨髄微小環境における Klf2 発現変化

Tie2 は血管内皮細胞だけでなく、造血幹・前駆細胞でも発現が認められるため、Tie2-Klf2-Tg マウスでは血管内皮細胞と造血幹・前駆細胞の両方で Klf2 が過剰発現すると考えられた。それぞれの Klf2 発現の程度を確認するため、Tie2-Klf2-Tg マウスの大腿骨をコラゲナーゼ処理した後、CD45 陰性 CD31 陽性の血管内皮細胞分画と、CD45 陽性 Lin 陰性 Sca-1 陽性 c-kit 陽性

(LSK) 細胞 (造血幹・前駆細胞分画) とを分取し、Klf2 の発現量をリアルタイム PCR で確認した。この結果、血管内皮細胞分画、造血幹・前駆細胞分画のいずれも、Tie2-Klf2-Tg マウスは Klf2 野生型と比べて Klf2 発現量が約 2 倍になっていること、造血幹・前駆細胞分画と比べると血管内皮細胞分画のほうが Klf2 を高発現していることを確認した。

## (2) Tie2-Klf2-Tg マウスの造血系の解析

末梢血の解析では、3 系統 (白血球、赤血球、血小板) の血球数には明らかな変化を認めなかったが、骨髄の各血球系統の細胞比率をフローサイトメトリーで解析したところ、Tie2-Klf2-Tg マウス骨髄では WT と比較して B220 陽性 CD11b 陰性の B 細胞比率が有意に増加していることを明らかにした。

続いて、骨髄中の造血幹細胞レベルから B 細胞前駆細胞までの各分画を詳細に解析した。造血幹・前駆細胞が含まれる LSK 分画の比率・絶対数は Tg マウスと野生型で変化がなく、造血幹細胞 (CD150 陽性 CD48 陰性 LSK) にも変化は認めなかった。リンパ系共通前駆細胞 (CLP) にも、Tg マウスと野生型マウスとで違いは認められなかったが、さらに B 細胞系列の分化段階を追っていくと、Pro-B 細胞以降の B 前駆細胞が Tg マウスで増加していることが明らかとなった。また、脾臓内の B 細胞比率も Tg マウスで増加していた。

これに対して、T 細胞系列や骨髄球系細胞系列には、Tg マウスと野生型マウスで明らかな変化は認めなかった。骨髄系前駆細胞分画 (骨髄系共通前駆細胞; CMP、顆粒球・マクロファージ前駆細胞; GMP、巨核球・赤芽球前駆細胞; MEP) の数にも差は認められなかった。

研究代表者は、血管内皮抗原として報告された ESAM が造血幹細胞のマーカーとして有用であり、機能的にも重要であること、血管内皮細胞との相互作用に重要であることを報告している。このため、Tie2-Klf2-Tg マウスで造血幹細胞上の ESAM 発現に変化があるかどうかをフローサイトメトリーで解析したが、Tg マウスと野生型マウスとで ESAM の発現強度に変化はみられなかった。

## (3) Angiopoietin-1 過剰発現マウスの造血系の解析

Tie2-Klf2-Tg マウスと同様に、末梢血の血球数には明らかな変化を認めないが、骨髄の総細胞数は有意に減少することが分かった。また、脾臓の相対的重量の増加傾向がみられた。骨髄のフローサイトメトリー解析では、造血幹細胞や骨髄系前駆細胞分画には明らかな変化は認めないが、リンパ系共通前駆細胞の増加がみられ、Tie2-Klf2-Tg マウスと同様にリンパ球系の未分化細胞が増加することが分かった。

以上の結果から、血管の安定性維持に重要な転写因子である Klf2 を過剰発現させたマウス、Angiopoietin-1 を過剰発現させたマウスのいずれでも、特にリンパ球系の前駆細胞が増加することが明らかとなった。このことは、血管安定性制御と造血とは密接に関わっていることを示しており、血管安定性を制御することで造血機能を制御できる可能性を示唆している。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Doi Y, Yokota T, Satoh Y, Okuzaki D, Tokunaga M, Ishibashi T, Sudo T, Ueda T, Shingai Y, Ichii M, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Kohwi-Shigematsu T, Takeda J, Oritani K, Kanakura Y. Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate. *Cell Reports*. 2018;23(11):3223-3235. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.042
2. Ishibashi T, Yokota T, Satoh Y, Ichii M, Sudo T, Doi Y, Ueda T, Nagate Y, Hamanaka Y, Tanimura A, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Identification of MS4A3 as a reliable marker for early myeloid differentiation in human hematopoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;495(3):2338-2343. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.117

### 〔学会発表〕(計 18 件)

1. 石橋 知彦, 稲垣 薫克, 森 啓悦, 正木 豪, 浅野 遼太郎, 岡澤 慎, 中岡 良和. 平滑筋細胞特異的 Cre マウスの血液細胞における Cre 発現の解析. 第 26 回 日本血管生物医学会 学術集会 (CVMW2018). 2018.12.7-8 (発表日 12.8), 東京コンベンションホール, 東京
2. 岡澤 慎, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 正木 豪, 森 啓悦, 浅野 遼太郎, 中岡 良和. TrkB might have a role for right ventricular homeostasis under chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. 第 26 回日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2018). 2018.12.7-8 (発表日 12.8), 東京コンベンションホール, 東京
3. Ueda T, Yokota T, Uno Y, Mashimo T, Sudo T, Ishibashi T, Doi Y, Shingai Y, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. ESAM on the Cells of Endothelial Lineage Plays an Important Role in the Development of Definitive

- Hematopoiesis. 60th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition. 2018.12.1-4 (発表日 12.3), San Diego Convention Center, CA, USA
4. Shingai Y, Yokota T, Ozawa T, Ueda T, Doi Y, Ishibashi T, Tanimura A, Ichii M, Shibayama H, Kanakura Y. Monitoring ESAM Expression Levels Reveals Autonomous Fluctuation of Leukemia Stem Cells by Autocrine/Paracrine Cytokine Signaling. 60th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition. 2018.12.1-4 (発表日 12.3), San Diego Convention Center, CA, USA
  5. 森 啓悦, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 岡澤 慎, 正木 豪, 浅野 遼太郎, 熊ノ郷 淳, 中岡 良和. A novel mouse model of PAH reflecting inflammation and fibrosis. 第23回日本血管病理研究会. 2018.11.10, 海峡メッセ下関, 山口
  6. 土居 由貴子, 横田 貴史, 佐藤 友亮, 石橋 知彦, 数藤 孝雄, 上田 智朗, 新開 泰宏, 小澤 孝幸, 一井 倫子, 谷村 朗, 江副 幸子, 柴山 浩彦, Terumi Kohwi-Shigematsu, 織谷 健司, 金倉 譲. クロマチン構造制御蛋白SATB1はリンパ球分化における造血感細胞の機能的ゆらぎに關与する. 第80回日本血液学会学術集会. 2018.10.12-14 (発表日 10.13), 大阪国際会議場, 大阪
  7. 新開 泰宏, 横田 貴史, 小澤 孝幸, 上田 智朗, 土居 由貴子, 石橋 知彦, 数藤 孝雄, 谷村 朗, 一井 倫子, 江副 幸子, 柴山 浩彦, 金倉 譲. 自分泌/傍分泌サイトカインシグナル伝達を介した白血病幹細胞の自動的ゆらぎ. 第80回日本血液学会学術集会. 2018.10.12-14 (発表日 10.13), 大阪国際会議場, 大阪
  8. Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Nakaoka Y. Pristane might be useful for creating a novel model of CTD-PAH in mice. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research. 2018.9.22-23 (発表日 9.22), 奈良春日野国際フォーラム 薨 I・RA・KA, 奈良
  9. Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y. Cre expression in hematopoietic cells of smooth muscle cell-targeted Cre recombination mice. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research. 2018.9.22-23 (発表日 9.22), 奈良春日野国際フォーラム 薨 I・RA・KA, 奈良
  10. Okazawa M, Inagaki T, Ishibashi T, Masaki T, Mori H, Asano R, Nakaoka Y. TrkB might have a role for right ventricular homeostasis under chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research. 2018.9.22-23 (発表日 9.22), 奈良春日野国際フォーラム 薨 I・RA・KA, 奈良
  11. Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Nakaoka Y. A novel mouse model of PAH reflecting inflammation and fibrosis. The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. 2018.9.14-15 (発表日 9.14), 千里ライフサイエンスセンター, 大阪
  12. Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y. Cre-mediated recombination in hematopoietic lineage cells of smooth muscle cell-specific targeted Cre mice. The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. 2018.9.14-15 (発表日 9.14), 千里ライフサイエンスセンター, 大阪
  13. 森 啓悦, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 岡澤 慎, 正木 豪, 中岡 良和. プリスタンを用いた新しい膠原病性肺高血圧症モデル作製の試み. 第3回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会, 2018.6.22-23 (発表日), 千里ライフサイエンスセンター, 大阪
  14. Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Okazawa M, Nakaoka Y. Cre recombination in hematopoietic cells of smooth muscle cell-targeted Cre recombination mice. International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2018, 2018.6.3-7 (発表日 6.4), Finlandia Hall, Helsinki, Finland
  15. Shingai Y, Yokota T, Ueda T, Doi Y, Ishibashi T, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Variable Expression Levels of the Hematopoietic Stem Cell Surface Antigen ESAM Depict Heterogeneity and Fluctuations in Leukemic Stem Cells. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting and Exposition. 2017.12.9-12 (発表日 12.9), Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA
  16. Ueda T, Yokota T, Shingai Y, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Tanimura A, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule (ESAM) Plays Important Roles in the Adult-Type Hemoglobin Synthesis during Fetal Erythropoiesis. The American Society of Hematology 59th Annual Meeting and Exposition. 2017.12.9-12 (発表日 12.9), Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA
  17. 新開 泰宏, 横田 貴史, 上田 智朗, 土居 由貴子, 石橋 知彦, 谷村 朗, 一井 倫子, 江副 幸子, 柴山 浩彦, 織谷 健司, 金倉 譲. ESAMの発現変動からみた白血病幹細胞の不均一性とゆらぎの解析. 第79回日本血液学会学術集会, 2017.10.20-22 (発表日 10.21), 東京国際フォーラム, 東京
  18. Ueda T, Yokota T, Shingai Y, Doi Y, Ishibashi T, Sudo T, Nagate Y, Tanimura A, Tokunaga M, Fujita J, Ichii M, Ezoe S, Shibayama H, Oritani K, Kanakura Y. Endothelial

cell-selective adhesion molecule (ESAM) is required for the ontogeny of definitive hematopoietic system in mice. 第 15 回 幹細胞シンポジウム, 2017.5.26-27 (発表日 5.27), 東京大学 伊藤国際学術研究センター, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/vascular\\_physiology/](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/vascular_physiology/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名： 徳留 健

ローマ字氏名： Takeshi Tokudome

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。