

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06692

研究課題名(和文) 内皮-造血転換における血流メカニカルストレス作用機構の解明

研究課題名(英文) Blood flow-related mechanical stress transduction mechanism during endothelial-to-hematopoietic transition

研究代表者

佐藤 有紀 (Sato, Yuki)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90508186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は、胚発生期に背側大動脈の血管内皮細胞が分化転換することにより生まれる。この過程を経て血管から遊離した細胞群の一部が血流に乗って骨髄まで移動し、造血幹細胞として維持される。内皮-造血転換現象の解明は、造血幹細胞の成り立ちの理解および造血制御法の開発へと直結する重要な課題である。本研究では、水チャネルAquaporin (AQP)を介した細胞内への水分子流入が内皮-造血転換の際に起こる細胞球形化の直接的な要因であることを明らかにした。またこの過程において、メカニカルストレス作動性のTRPチャネル分子群が関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内皮-造血転換過程において、血管から生み出された造血幹細胞が多分化能を獲得する際に働く分子メカニズムは解明されつつある。一方でなぜ内皮-造血転換を起こす細胞が特定の血管部位に限定されているのか、また扁平な血管内皮細胞を球形の造血幹細胞へと変化させる際に直接的に働く分子機構は未解明であった。本研究から、水チャネル分子AQPを介して血管内の水分子を細胞内へ取り込むことにより細胞が球形化することが判明した。この発見をきっかけに、今後、mechanophysiologyの観点からの造血現象理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells are generated during embryogenesis by transdifferentiation of endothelial cells in the dorsal aorta. A specific cell population that is released from the blood vessels during this process migrates into the bloodstream to the bone marrow, where they are maintained as hematopoietic stem cells. Elucidation of the mechanisms underlying endothelial-to-hematopoietic transition is an important issue directly related to the understanding of the origin of hematopoietic stem cells and therapeutic regulation of the hematopoiesis. In this study, we proved that water permeation into the cell via the water channel Aquaporin (AQP) is a direct cause of the cell rounding that occurs during the endothelial-to-hematopoietic transition. Our study also suggested that a group of mechanical stress-activated TRP channel molecules may be involved in this process.

研究分野：発生生物学

キーワード：内皮-造血転換 アクアポリン 液胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、組織変形や高密度化、流体物との接触などで生まれる内外の力を“動き”に転換することが知られている。例えば、talin や vinculin などの細胞接着に関わる分子群は、力によって伸縮する性質をもつ。この物性を介し、足場や密度などの力学環境に適応的な細胞極性や移動能が生み出される。また、TRPV や Piezo 等の  $Ca^{2+}$ チャネル分子群の一部も、力の負荷によって構造を変化させ、化学的シグナルへと変換する。これらの分子群の有無、すなわち力学刺激への応答能は、遺伝子発現によって制御される。力とシグナル伝達、そして遺伝子発現は、作動原理や反応速度が全く異なる。細胞はこれらの入力情報をどのような信号として受け取り、組織の形態形成に反映させるのか？ この疑問に答えるため、血流メカニカルストレスが関与する発生現象のメカニズム解明を行う。

造血幹細胞は、胚発生中期に背側大動脈の血管内皮細胞が分化転換することにより生まれる。この過程を経て血管から遊離した細胞群の一部が血流に乗って骨髄まで移動し、造血幹細胞として維持される。このような内皮 - 造血転換現象の解明は、造血幹細胞の成り立ちの理解および血球分化制御法の開発へと直結する重要な課題である。これまでに、血管内皮からの血球分化が血流の剪断応力刺激によって誘導されることがわかっている。しかし、どのようなメカニカルストレス受容機構が内皮 - 造血転換に関わるのかは不明である。以下の研究を通してこの課題を解決する。

### 2. 研究の目的

背側大動脈内の造血能をもつ血管内皮細胞が水チャネル Aquaporin1 (AQP1) を特異的に発現すること、さらに AQP1 を異所的に発現させた血管内皮細胞が、血球様細胞へと分化することを発見している。これは AQP1 を介した細胞内への水分子の流入が内皮 - 造血転換をひきおこす可能性を示唆している。しかしながら、遺伝子発現や膜局在、チャネル開閉など、AQP1 の機能制御に関わるメカニズムは未解明である。また、内皮 - 造血転換への関与が示されてきた剪断応力刺激とどのような関わり合いがあるのかについても不明である。そこで本研究では AQP1 の機能制御に関わることが予想されるメカニカルストレス受容関連分子群に焦点を絞り、内皮 - 造血転換における役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

電気穿孔法による遺伝子導入実験およびタイムラプス観察解析が可能なウズラ胚を用いて以下の実験解析を行った。

(1) AQP1 による異所的な内皮 - 造血転換が実際に水分子の細胞内流入によって誘導されるかどうかを AQP1 (R196H) 変異体の過剰発現により検証した。

(2) メカニカルストレスにตอบสนองして発現する転写因子 KLF2 は AQP1 のプロモーター領域に結合することが知られている。KLF2 が内皮 - 造血転換に関わるかどうかを検証するため、強制発現実験を行い、AQP1 と同様に異所性の内皮 - 造血転換を起こすかどうかを検証した。

(3) CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いたノックアウト実験による検証を行った。AQP1 単独ノックアウトでは内皮 - 造血転換への影響が見られなかったため、また、AQP1 以外の AQP ファミリー分子群が冗長的に発現することが判明したことから、AQP1, 5, 8, 9 遺伝子の重複ノックアウト実験を行った。

(4) AQP と協調的に働く分子群を探索するため、セルソーターを用いて選別した AQP1 発現血管内皮細胞に対して RNA-seq 解析を実施した。

### 4. 研究成果

本研究を進める過程において初期の段階で AQP1 のノックダウン・ノックアウト実験が期待通りの表現型を示さなかったことから、他の AQP ファミリー分子群にまで解析対象を広げたため、当初予定にあった KLF2 については十分な解析を実施することができなかった。その反面、以下の成果を得ることができた。

AQP1 の過剰発現により、本来は球状化しない血管内皮細胞に異所性の球状化を引き起こすことができる。一方で水流入能が低い AQP1 (R196H) 変異体は細胞球状化を誘導できないことから、AQP1 による造血性血管内皮細胞の球状化は、水分子流入により引き起こされることを証明した。また、造血性血管内皮細胞において冗長的に発現する AQP1, 5, 8, 9 を多重ノックアウトした造血性血管内皮細胞群において球状化が阻害された。先行研究で行われてきた各 AQP 遺伝子のノックアウト解析からは内皮 - 造血転換への関与は不明であったが、本研究から AQP ファミリー分子群が冗長的に水流入機能を担い、造血性血管内皮細胞の球状化を引き起こすことが判明した(論文投稿準備中)。

また、AQP1 発現血管内皮細胞と非 AQP1 発現血管内皮細胞群とを選別した上で実施した RNA-seq データをもとに両者の遺伝子発現変動を比較した。その結果、AQP1 発現血管内皮細胞群において複数の膜チャネルおよびトランスポーター遺伝子群の発現量上昇が判明した。特に、メカニ

カルストレス作動性の TRP チャネル分子群の顕著な発現上昇が見られたことから、これらの分子群について、今後も引き続き細胞内局在解析および分子機能欠損実験等を行う予定である。

なお当初計画において重視していた転写因子 KLF2 が AQP1 と同様に異所性の内皮 - 造血転換誘導作用を示すことまでは実験的に検証済みであり、かつまた上記 RNA-seq 解析においても発現上昇が顕著であった。先行研究及びこれらの予備的解析結果から、血流メカニカルストレスにより惹起される KLF2 発現が AQP1 の発現制御を行う可能性が高いため、内皮 - 造血転換過程における役割を今後も検証していく。

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 Yoshihi Koya, Kato Kagayaki, Iida Hideaki, Teramoto Machiko, Kawamura Akihito, Watanabe Yusaku, Nunome Mitsuo, Nakano Mikiharu, Matsuda Yoichi, Sato Yuki, Mizuno Hidenobu, Iwasato Takuji, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	4. 巻 149
2. 論文標題 Live imaging of avian epiblast and anterior mesendoderm grafting reveals the complexity of cell dynamics during early brain development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev1999999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199999	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mugiho Shigematsu, Chie Tamura, Yuki Sato
2. 発表標題 Cell Budding During Endothelial to Hematopoietic Transition is Regulated by Aquaporin Water Channels
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mugiho Shigematsu, Chie Tamura, and Yuki Sato
2. 発表標題 Cell Budding During Endothelial to Hematopoietic Transition is Regulated by Aquaporin Water Channels
3. 学会等名 The 9th EMT International Association Meeting (TEMTIA IX)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mugiho Shigematsu, Sho Maejima, Maria Shibata, Chie Tamura, Tomas M Schultheiss, Hiroataka Sakamoto, Yuki Sato
2. 発表標題 Water permeation into the vacuoles facilitate cell rounding and release during endothelial-to-hematopoietic transition
3. 学会等名 54th Annual Meeting of Japanese Society of Development Biology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mugiho Shigematsu, Sho Maejima, Maria Shibata, Chie Tamura, Hirotaka Sakamoto, Yuki Sato
2. 発表標題 Endothelial-to-hematopoietic transition is dynamically regulated by vacuoles
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	柴田 まりあ  (Shibata Maria)	九州大学・大学院医学系学府医科学専攻・大学院生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関