

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590345

研究課題名(和文) Runx1はEndMTを介して血球産生型血管内皮から造血幹細胞を産生するか？

研究課題名(英文) Does Runx1 produce hematopoietic stem cell from hemogenic endothelium via Endothelial to Mesenchymal Transition?

研究代表者

山元 康敏 (YAMAMOTO, Yasutoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50405247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：造血関連転写因子AML1/Runx1が、血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生する過程を制御する分子機構解明の検討を行った。Runx1遺伝子にリポーター遺伝子(GFP)をノックインしたマウスの作製に独自に成功し、GFPシグナルの観察が可能であった。ES細胞分化モデルの網羅的遺伝子解析によりRunx1依存性分子として見出した、血管内皮間葉転換関連転写因子がRunx1遺伝子機能阻害により発現低下し、造血幹細胞発生時に解離する密着結合が発現亢進した。これらは、仮説“極性と密な接着を有する血管内皮が、Runx1により血管内皮間葉転換を介して造血幹細胞に形質転換する”を支持すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the molecular mechanism in the process of hematopoietic stem cells (HSCs) emergence from the hemogenic endothelium by the hematopoietic transcription factor AML1/Runx1. We originally succeeded in the production of knock in mouse which had reporter gene (GFP) targeting the Runx1 locus and could observe GFP signal in this mouse. We also discovered Runx1 dependent factor, endothelial mesenchymal transition related transcription factor, by using comprehensive gene expression analysis against embryonic stem cell differentiation model. Runx1 gene knock down effects on the downregulation of this transcriptional factor and upregulation of the tight junction which dissolves at the HSCs emergence. These findings suggest that Runx1 can transform vascular endothelium with polarity and tight adhesion into HSCs via hemogenic endothelium.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：血球産生型血管内皮 造血幹細胞 Runx1

1. 研究開始当初の背景

Runx1遺伝子(AML1とも呼ばれる)はヒト急性骨髄性白血病全体の約20%という高頻度で染色体転座による再構成の標的となる遺伝子であり、申請者らはRunx1遺伝子破壊マウスの作製によって、この遺伝子が造血初期発生において必須の役割を担っていることを明らかにした。造血発生は、卵黄嚢における胚型造血に引き続き、成体型造血が大動脈-生殖原器-中腎領域の背側大動脈の限られた血管内皮(血球産生型血管内皮)から、造血幹細胞が発生するかたちをとって始まるとされている。また血管内皮特異的Runx1ノックアウトマウスの解析からは、血管内皮からの造血幹細胞発生過程にRunx1が必須であることが示されている。これらの背景のもと、現在、血管内皮から造血幹細胞が発生する過程でRunx1が果たす具体的な分子制御機構の解明が望まれている。

2. 研究の目的

(1)二光子フェムト秒光パルスレーザー走査顕微鏡を用いた分子イメージングによって造血幹細胞発生動態を可視化し、遺伝子改変マウスを用いてこのステップで重要となるRunx1依存性分子を検索・同定することを目的とした。

(2)“極性と密な接着を有する血管内皮が、Runx1により内皮間葉転換を介して造血幹細胞に形質転換する”との仮説検証をもうひとつの目的とした。

3. 研究の方法

(1)造血幹細胞発生動態の解析

遺伝子改変マウス

Runx1:DsRed マウス作製のためのDNA constructは、相同組換えを用いてマウスRunx1遺伝子座中のエクソンにRunx1のcDNAを組み込み、引き続きIRES配列を介してDsRedを発現させる“ノックイン”アレルを導入すべくデザインされている。マウスへの導入は定法どおり、胚盤胞へのインジェクションによるキメラマウス作製を経て、交配による安定した胚細胞系列マウスラインの樹立を試みた。

また、上記の補完アプローチとして、所属研究室にて独自に作製したRunx1:GFPノックインマウスも並行して以下の実験に用いた。

二光子フェムト秒光パルスレーザー走査型顕微鏡を用いた分子イメージング

Runx1の生体マーカーノックインマウスを用いて以下の3通りの方法で生体蛍光マーカーによるRunx1シグナルの検出を試みた。

Runx1ノックインマウス(ヘテロ)と野生型マウスの交配によって得られた胎仔(10.5日齢、11.5日齢、14.5日齢)を摘出後、4%パラホルムアルデヒドで1時間固定し、リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄した。引き続き、まず始めに、凍結組織包埋剤に包埋後、薄切した切片を用いて免疫蛍光抗体法(1次抗体:抗GFP抗体、抗血小板内皮細胞接着分子-1抗体)により染色後、二光子フェムト秒光パルスレーザー走査型顕微鏡を用いてGFPシグナルの観察を行った。次に、凍結標本作成後に抗GFP抗体を用いないで(1次抗体:抗血小板内皮細胞接着分子-1抗体のみを使用)観察を行った。最後に、10.5日齢の胎仔を固定洗浄後に凍結せずに、抗GFP抗体を用いないで(1次抗体:抗血小板内皮細胞接着分子-1抗体のみを使用)全載標本とし、シグナルの観察を行った。

(2)血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生する分子メカニズムの解析

Runx1依存性分子のスクリーニング・同定と造血幹細胞発生時における内皮間葉転換関与の有無の検討

遺伝子改変マウスES細胞(Runx1^{-/-}とRunx1^{+/-})および対照として野生型マウスES細胞を用いた胚様体形成モデルにおいて、培養0日、4日、6日、8日、12日目に得た細胞からRNA抽出、cDNA合成を行ったサンプルを以下の検討に用いた。まず、網羅的遺伝子解析によりRunx1依存性分子として種々の分子の検出を行った。続いてその中から、造血幹細胞発生時における血管内皮間葉転換関与の有無の検討を行う目的で、マーカー遺伝子発現評価を行った。野生型、Runx1ヘテロ(Runx1^{+/-})、Runx1ノックアウト(Runx1^{-/-})での血管内皮間葉転換マーカー(スネイル)、間葉系マーカー(ビメンチン、平滑筋アクチン)、上皮系マーカー(E-カドヘリン、ZO-1)、血管内皮系マーカー(血小板内皮細胞接着分子-1、カドヘリン5)遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて検出し、比較CT法(CT法)により相対定量比較を行った。

新規Runx1依存性分子の検出と解析

上記ES細胞分化(胚様体形成)モデルの網羅的遺伝子解析により得られた、Runx1依存性分子のリストアップを行った。発現変動の見られる分子については、上述と同様にリアルタイムPCRで相対定量にて比較を行った。新規Runx1依存性分子としての対象は、インシリコ検討でそのプロモーター領域にRunx1結合部位があるか確認を行った。確認されれば、プロモーター部位を含む遺伝子断片を用いた本分子のRunx1による転写活性調節をル

シフェラーゼアッセイにて検討するものとした。

4. 研究成果

(1) Runx1:生体マーカーノックインマウスを用いた検討

Runx1:DsRed ノックインについてはマウスES細胞で相同組み換え体を得ることができ、キメラマウスの作製に成功した。現在、交配によって胚細胞系列移行マウス系統の樹立を図っている。他方、これに先んじて、当教室で独自に作製したRunx1遺伝子にリポーター遺伝子(GFP)をノックインしたマウスを用いて以下の検討を行った。Runx1:GFPヘテロマウスにおいて、GFPによりRunx1の発現確認が可能であるか否か、シグナル検出を試みた。胎生14.5日齢の胎仔を固定・薄切後、GFP抗体を用いた免疫蛍光染色法による検討では、胸腺・肝臓において強陽性細胞が確認された。また、胎生11.5日齢の胎仔を固定・薄切後、GFP抗体を使用しない検討では、大動脈-生殖原器-中腎領域の背側大動脈において、GFP弱陽性を示す細胞集塊が確認された。さらに、胎生11.5日齢の胎仔を固定後に薄切しない全載標本に対する、GFP抗体を使用しない検討では、シグナルの検出は困難であった。現在 *in vivo* におけるRunx1シグナル発現の有無をフローサイトメーターにより確認をおこなっている。加えて、今後生きたまの組織でRunx1発現の検出を試みる計画をしている。また、今後Runx1:DsRedマウスが樹立できれば、他の遺伝子座にGFPが組み込まれたマウスと掛け合わせることで、この検出が容易になることが期待できる。

(2) Runx1依存性分子のスクリーニング・同定と造血幹細胞発生時における内皮間葉転換関与の有無の検討

ES細胞分化(胚葉体形成)モデルの網羅的遺伝子解析によりRunx1依存性分子として種々の分子が見出された。その中から、造血幹細胞発生時における血管内皮間葉転換関与の有無の検討を行う目的で、野生型、Runx1ノックアウト(Runx1^{-/-})でのマーカー遺伝子発現の検討を行った。結果として、血管内皮間葉転換を促進する転写因子スネイルは、Runx1^{-/-}では野生型と比較して、発現低下が確認された。間葉系マーカーのビメンチン、

平滑筋アクチンにおいても発現低下が見られた。上皮系マーカーであるE-カドヘリン、ZO-1や血管内皮細胞マーカーの血小板内皮細胞接着分子-1、カドヘリン5では、野生型と比較してRunx1^{-/-}では発現増加が確認された。

以上より、ES細胞レベルではRunx1ノックアウトにより血管内皮間葉転換マーカーの発現

低下、間葉系マーカーの発現低下、上皮・血管内皮細胞マーカーの発現増加する傾向が確認され、仮説“極性と密な接着を有する血管内皮が、Runx1により血管内皮間葉転換を介して造血幹細胞に形質転換する”を支持すると考えられた。今後、さらに個体レベルでのマーカー発現の検討を行う予定である。

内皮間葉転換関連転写因子スネイルの機能解析

Runx1依存性に発現変化するスネイル遺伝子において、プロモーター領域に種を超えて保存されたRunx1結合部位が存在することが確認された。今後、スネイルのRunx1による転写活性調節をルシフェラーゼアッセイにより検討する予定である。

新規Runx1依存性分子として見出されたノンコーディングRNAの機能解析

種々のRunx1依存性分子の中で、特に発現変化が顕著なノンコーディングRNAが見出された。リアルタイムPCRによる相対定量比較により、野生型と比較してRunx1(-/-)では極めて顕著な発現低下が認められた。現在、胎仔サンプル(野生型、Runx1ヘテロマウス、Runx1ノックアウトマウス)を用いて、*in vivo*レベルでの本分子の発現評価を行っている。さらに、プロモーター領域にRunx1結合部位が存在することから、本分子のRunx1による転写活性調節をルシフェラーゼアッセイにて検討する準備を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

山元康敏, 奥田司. <特集「個体発生と細胞分化の医学」> 血球発生と血管分化のCrossroad, 京都府立医科大学雑誌, 122(6):329-340, 2013 (査読無)

[学会発表](計 6 件)

山元康敏(代表)ほか 2 名: 間葉細胞/血管内皮分化過程を解析可能な新規細胞培養システムの構築, 第3回 4 大学連携研究フォーラム, 2013年12月9日, 京都.

Yasutoshi Yamamoto(代表)ほか 2 名: A Cellular and Molecular Analysis for Endothelial / Mesenchymal Plasticity, 第86回 日本生化学会大会, 2013年9月11日-12日, 横浜.

Yasutoshi Yamamoto(代表)ほか 2 名: A Novel Cell Culture Model for Endothelial / Mesenchymal Plasticity, 第 85 回 日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡.

Yasutoshi Yamamoto(代表)ほか 2 名: Fetal Lung Vascular Progenitor Cells Exhibit Endothelial/Mesenchymal Plasticity, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICH2012), 2012 年 8 月 26 日-29 日, 京都.

山元康敏(代表)ほか 1 名: マウス胎仔肺間葉細胞による血管内皮細胞への分化, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, 2012 年 4 月 13 日, 京都.

山元康敏(代表): マウス胎仔肺間葉細胞による血管内皮細胞への分化, 第 10 回京滋ハートセミナー, 2011 年 11 月 24 日, 京都.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山元 康敏 (YAMAMOTO, YASUTOSHI) ・京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号 : 50405247

(2)研究分担者

奥田 司 (OKUDA, TSUKASA) ・京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 30291587

(3)連携研究者

なし