

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440118

研究課題名(和文)胎生中期の大動脈に接する造血幹細胞を含む血液細胞塊の形成と幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the formation and the maintenance of hematopoietic cell clusters, which contain hematopoietic stem cells, along with endothelial cells of the dorsal aorta in midgestation mouse embryos

研究代表者

信久 幾夫 (Nobuhisa, Ikuo)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40332879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて造血幹細胞を最初に認める胎生10.5日胚の大動脈に隣接する血液細胞塊の構成細胞に転写因子Sox17を導入すると、培養皿上で造血幹細胞を含む血液細胞塊が構築される。この未分化性を維持しつつ血液細胞塊を形成する分子機構として、Thrombopoietin/c-Mplシグナル経路の活性化、転写因子Sox17のNotch1プロモーターへの結合による発現誘導とNotch1細胞内領域の蛋白質量の増加、Notch1細胞内領域による転写因子Hes1の発現誘導、およびSox17による接着分子Vascular Endothelial-Cadherinの発現誘導が、それぞれ重要であることを明らかとした

研究成果の概要(英文)：During mouse development, hematopoietic stem cells (HSCs) firstly arise intra-aortic cell clusters (IAHCs) of the dorsal aorta at embryonic day 10.5. Introduction of transcription factor Sox17 into cells of IAHCs leads to consistent formation of cell clusters containing HSCs in vitro. We examined the molecular mechanism of this phenomenon in this project. We showed the importance of the thrombopoietin/c-Mpl signal pathway in Sox17-transduced hematopoietic cell clusters. Moreover, we demonstrated that the binding of Sox17 to the Notch1 promoter induced the Notch1-expression and Notch1 intra-cellular domain (NICD, the active form)-transduced cells maintained the undifferentiated state. Cells transduced with Hes1, which is one of the target genes of the Notch signaling pathway, have a capacity to maintain the undifferentiated state. Furthermore, the Sox17-induced adherent molecule vascular endothelial cadherin has a role of the formation and the maintenance of hematopoietic cell clusters.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：AGM Hematopoiesis Sox17 Notch1 VE-Cad

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスにおいて造血幹細胞を最初に認める胎生 10.5 日の大動脈-生殖原基-中腎 (AGM) 領域において、造血幹細胞形成は大動脈の血管内皮細胞、とりわけ血液細胞と血管内皮細胞両方に分化する能力を有する細胞である Hemogenic endothelium に隣接する血液細胞塊が重要であることが明らかとなりつつある。

(2) 申請者が注目した血液細胞塊より血液細胞を生み出す過程の制御蛋白質である転写因子 Sox17 について、コンディショナルに遺伝子を欠損するマウスの解析から、胎生期および出生直後の造血幹細胞において重要であることが示されていた (Kim et al., Cell, 2007)。

(3) 準備研究として、Sox17 が胎生 10.5 日胚 AGM 領域の大動脈血管内皮細胞および血液細胞塊、とりわけ血管内皮細胞に隣接する領域に発現を認めること、血液細胞塊の構成細胞である $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞に Sox17 を強制発現すると浮遊した状態で細胞塊を形成しつつ未分化性が多数回の継代を経ても保持すること、Sox17 の発現量と血液細胞塊の構成細胞の分化状態に相関があることを示し、これより Sox17 が未分化な血液細胞が分化するためのスイッチとして機能していることが示唆された。さらに、Sox17 強制発現細胞を致死量放射線照射を施したマウスに移植すると、長期間に渡り造血幹細胞を維持しつつ血液細胞を産生することを示し、Sox17 の発現が生体内においても幹細胞の維持に機能することを示した (図 1、雑誌論文)。

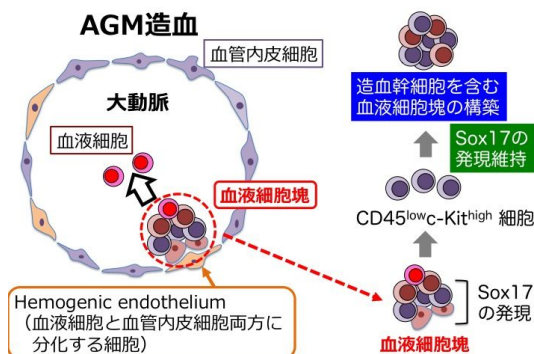


図 1 Sox17 導入による造血幹細胞を含む血液細胞塊の構築

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写因子 Sox17 および最近 Sox17 が直接発現誘導すると報告された Notch およびその関連分子に注目して、胎生中期の大動脈の血管内皮細胞に隣接する血液細胞塊形成の分子機構と細胞塊で生じる造血幹細胞の形成および幹細胞としての性質の維持機構について解析を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 胎生 10.5 日目のマウス胎仔より AGM 領域を実体顕微鏡下で回収した後、酵素により細胞を分散し、抗体反応後、フローサイトメトリーを用いて、血液細胞塊の構成成分でかつ未分化性の高い $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞を単離した。回収した細胞にレトロウイルスを用いて転写因子 Sox17、Notch1 の細胞内領域 (NICD)、および Notch1 の下流分子 Hes1 の強制発現を施し、ストローマ細胞上で、液性因子 Stem Cell Factor (SCF)、Interleukin-3 (IL-3)、および Thrombopoietin (TPO) の存在下で培養を行った。遺伝子導入された細胞について、半固形培地上で、多系列の血液細胞への分化能を示す Mix コロニーの形成能を解析することで、培養皿上での未分化性の判定を行った。

(2) マウス E10.5 日胚 AGM 領域の血液細胞塊の構成細胞である $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞に対して Sox17 を導入することにより、未分化性の高い血液細胞塊を形成する培養系において、細胞塊形成に重要な液性因子である TPO のみ添加した培養条件において、TPO が活性化する MAPK, JAK/STAT, および PI3K シグナル経路に対する阻害剤を添加して培養し、未分化性を保持した Sox17 導入細胞塊の形成に対する影響を検討した。また、Notch1、Hes1、血管内皮細胞のマーカー蛋白質である Vascular endothelial-Cadherin (VE-Cadherin) に対する short hairpin RNA をレトロウイルスを用いて Sox17 強制発現細胞に導入し、遺伝子発現の減少を確認した後、血液細胞塊形成および未分化性維持について検討を行った。

(3) 野生型および Sox17-mCherry 融合タンパク質を発現するマウスの妊娠 10.5 日目の胎仔について、凍結切片あるいはホルマウントで各種抗体を作用させて、大動脈に隣接する造血幹細胞を含む血液細胞塊における蛋白質の発現を、共焦点顕微鏡を用いて解析を行った。

(4) 生体内における長期造血再建能について検討を行うために、致死量放射線照射を施したマウス的大腿骨内に細胞移植を行った。移植した細胞の生着については、末梢血において移植した細胞の増殖および血液細胞分化を、フローサイトメーターを用いて各種の分化マーカーの発現を解析することより評価を行った。

4. 研究成果

(1) 胎生 10.5 日胚の大動脈に認める血液細胞塊の構成細胞 $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞に対して、Sox17 強制発現した後、ストローマ細胞との共培養において、液性因子 SCF、IL-3、および TPO の添加により、血液細胞塊の形成および未分化性が保持される。そこで、3 つ

の液性因子の中でどの因子が重要であるかを、様々な液性因子の組み合わせで培養し検討を行ったところ、TPO が細胞塊形成および未分化性維持に重要であることを明らかとした。さらに TPO 受容体 c-Mpl が、胎生 10.5 日胚から作成した凍結切片に対する免疫組織学的解析より、血液細胞塊に発現することを示した。また、TPO が活性化する MAPK シグナル経路の阻害剤 U0126、JAK/STAT シグナル経路の阻害剤 AG490、および PI3K シグナル経路の阻害剤 LY294002 が濃度依存的に Sox17 導入による血液細胞塊形成を阻害することを明らかにした。さらに、胎生 10.5 日 AGM 領域の血管内皮細胞から血液細胞が分化する培養系において、TPO の添加がより多くの血液細胞産生を誘導することを示した。以上の結果より、TPO/c-Mpl シグナル経路が、胎生 10.5 日胚の大動脈において血管内皮細胞から血液細胞塊における造血幹細胞を含む血液細胞の形成に重要であることが分かった(図2、雑誌論文)。

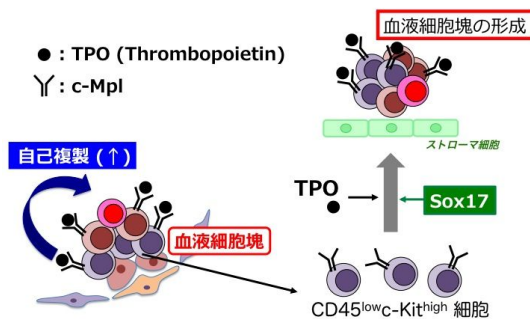


図2 血液細胞塊形成におけるTPOの重要性

(2) 準備研究により、転写因子 Sox17 により発現が誘導される Notch1 の細胞内領域 (NICD) を、AGM 領域の血液細胞塊構成細胞に強制発現すると、未分化性が維持されることを示していた。そこで、NICD の血液細胞塊における発現を、ホルマウント免疫染色法を用いて観察を行うと、胎生 10.5 日胚の一部の血管内皮細胞と血液細胞塊とつりわけ血管内皮細胞に近い細胞で発現を認めた。また、Notch1 のリガンドである Delta like 1 を発現するストローマ細胞上で、血液細胞塊の構成細胞 CD45^{low}-Kit^{high} 細胞を培養したところ、発現していないストローマ細胞との共培養と比較して、培養皿上で未分化性が維持された。さらに、NICD が発現誘導する Hes1 を同様に血液細胞塊の構成細胞 CD45^{low}-Kit^{high} 細胞に強制発現すると、Hes1 強制発現細胞は半固形培地上で Mix コロニー形成能が維持されることを明らかとした。この Hes1 強制発現細胞においては、血液細胞の発生に必須の転写因子である Runx1 が高発現していた。Sox17 強制発現細胞について、レトロウイルスを用いた RNA 干渉法により、Sox17 強制発現により形成された血液細胞塊において Notch1 あるいは Hes1 の発現をそれぞれ低下させたと

ころ、半固形培地での培養から未分化性の減少が観察された。以上の結果より、血液細胞塊においては Notch シグナルが未分化性に重要であることが示唆される(図3、投稿中)。

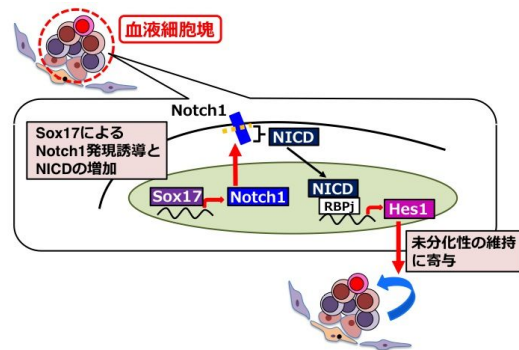


図3 血液細胞塊における Sox17-Notch1-Hes1 シグナル経路を介した未分化性維持機構

(3) Sox17 遺伝子座に蛍光蛋白質である mCherry を Sox17 と融合蛋白質を発現するように挿入したマウスを用いて、胎生 10.5 日胚 AGM 領域における Sox17-mCherry の発現を、凍結切片を作成後、抗体染色により検討を行った。すると、大動脈血管内皮細胞と共に血液細胞塊において発現を認めた。また、血液細胞塊において血管内皮細胞に隣接する細胞で Sox17 の発現が高く、外側の細胞では発現が認められなかった。さらに詳細な解析を行うために、ホルマウント免疫染色法により大動脈の血管内皮細胞に隣接する血液細胞塊を丸ごと観察すると、胎生 10.5 日胚大動脈において、凍結切片と同様に一部の血管内皮細胞および血液細胞塊の血管内皮細胞に近い細胞で Sox17 の発現を認めた。

(4) 準備研究により、Sox17 導入により形成された血液細胞塊において、血管内皮細胞のマーカー蛋白質である接着分子 VE-Cadherin の発現が上昇していることを明らかにしていた。そこで、ホルマウント免疫染色法を用いた解析により、VE-Cadherin が胎生 10.5 日胚の血液細胞塊とつりわけ血管内皮細胞に使い細胞での発現し、一部の血液細胞塊の細胞において VE-Cadherin と Sox17 が共発現することを示した。そこで、転写因子 Sox17 が直接 VE-Cadherin を発現誘導するのか、ルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いて検討を行うと、VE-Cadherin のプロモーター上に認める Sox17 結合配列に Sox17 が直接結合し、VE-Cadherin の発現誘導を引き起こすことを明らかとした。さらに、VE-Cadherin に対する short hairpin RNA をコードするレトロウイルスを用いて導入し、Sox17 強制発現により形成された血液細胞塊において VE-Cadherin の発現を低下させると、血液細胞塊の形成能および半固形培地での Mix コロニー形成能が共に減少した。以上の結果より、転写因子 Sox17 による接着分子 VE-Cadherin の発現誘導が、培養皿上での血液細胞塊形成

および未分化性に寄与することが示唆される(図4, 投稿準備中)。

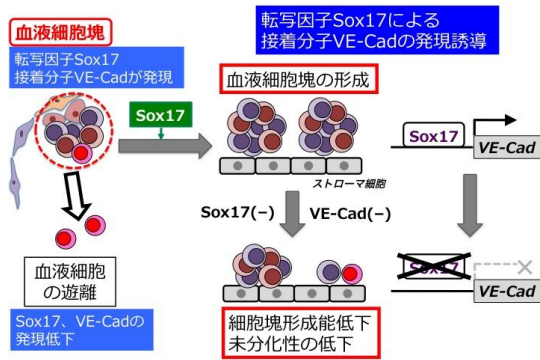


図4 血液細胞塊形成および未分化性維持における接着分子の関与

(5) 以前の研究により、AGM 領域由来の $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞に Sox17 を強制発現した細胞について、マウス個体に移植後長期造血再建能を認めることを示した。そこで、培養皿上で8回継代を繰り返した Sox17 導入細胞の長期造血再建能を、致死量放射線照射を施したマウスに移植することにより検討を行った。その結果、移植後3ヶ月後に Sox17 導入細胞を確認することは出来なかった。

(6) マウスの発生において、長期造血再建能を認める造血幹細胞は胎生 10.5 日目に AGM 領域に生じることが知られている。そこで、胎生 9.5 日の AGM 領域の少数の $CD45^{low}c-Kit^{high}$ 細胞において、Sox17 強制発現により長期造血再建能を獲得できるか検討を行った。その結果、(5)と同様に移植後3ヶ月後に Sox17 導入細胞を確認することは出来なかった。

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5件)

Harada K, Nobuhisa I, Anani M, Saito K, and Taga T. Thrombopoietin contributes to the formation and the maintenance of hematopoietic progenitor-containing cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region. *Cytokine*, 査読有, in press, 2017, doi: 10.1016/j.cyto.2017.02.012.

Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M, and Taga T. A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. *Stem Cells*, 査読有, 34: 1151-1162, 2016, doi: 10.1002/stem.2299.

Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, and Taga T. Induction of protumoral CD11c[high] macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. *Genes Cells*, 査読有, 21:241-251, 2016, doi: 10.1111/gtc.12333.

Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, and Taga T. Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. *Dev. Growth Differ.* 査読有, 56(6), 469-479, 2014, doi: 10.1111/dgd.12147.

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takaki H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, and Taga T. Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. *Mol. Cell. Biol.* 査読有, 34(6), 1975-1990, 2014, doi: 10.1128/MCB.01485-13.

[学会発表](計13件)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani Maha, 原田果歩, 高橋聡美, Lickert Heiko, 金井正美, 金井克晃, 田賀哲也. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. 第39回分子生物学学会年会 2016年12月1日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高橋聡美, 信久幾夫, 齋藤清香, 田賀哲也. Involvement of transcription factor Sox17-mediated expression of adhesion molecules in hematopoietic cell cluster formation in midgestation mouse dorsal aorta. 第39回分子生物学学会年会 2016年12月1日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani M, 原田果歩, 高橋聡美, 田賀哲也. Mechanism of maintaining hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. 第14回幹細胞シンポジウム 2016年5月20日 淡路夢舞台(兵庫県・淡路市)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani M, 原田果歩, 高橋聡美, 田賀哲也. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region as a site of definitive hematopoiesis through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. 第38回分子生物学学会年会 2015年12月1日 神戸国際会館(兵庫県・神戸市)

信久幾夫, 齋藤清香, 高橋聡美, 原田果歩, Anani Maha, 田賀哲也. Sox17 maintains the stem cell population of intra-aortic hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region through Notch signaling. 第44回日本免疫学会総会 2015年11月19日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

信久幾夫, 大澤光次郎, 上村麻実, 原田果歩, Anani Maha, 齋藤清香, 高木春奈, 高橋聡美, 金井正美 金井克晃, 岩間厚志, 田賀哲也. Sox17 is critical for the maintenance of stem cell phenotype of intra-aortic hematopoietic clusters of cells in the aorta-gonad-mesonephros region. International Society for Experimental Hematology 44th Annual Scientific Meeting 2015年9月17日 京都国際会館 (京都府・京都市)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani Maha, 原田果歩, 高橋聡美, 田賀哲也. Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cell phenotype of intra-aortic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. International Society for Experimental Hematology 44th Annual Scientific Meeting 2015年9月18日 京都国際会館 (京都府・京都市)

信久幾夫, 田賀哲也. Sox17 maintains the stem cell population of intra-aortic hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region. 第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム2015年7月23日 北海道大学医学部学友会館 (北海道・札幌市)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani Maha, 原田果歩, 高橋聡美, 田賀哲也. Maintenance of intra-aortic hematopoietic cell clusters in the AGM region through the Sox17-Notch1-Hes1 axis. 第13回幹細胞シンポジウム 2015年5月29日 東京大学伊藤交際学術研究センター (東京都・文京区)

Anani Maha, 信久幾夫, 大澤光次郎, 岩間厚志, 原田果歩, 齋藤清香, 田賀哲也. Sustained expression of Sox17 in AGM-derived hematopoietic stem/progenitor cells maintain the self-renewal capacity and the hematopoietic ability to produce myeloid progenitors. 第43回日本免疫学会総会 2014年12月11日 京都国際会館 (京都府・京都市)

信久幾夫, Anani M, 大澤光次郎, 岩間厚志, 原田果歩, 齋藤清香, 田賀哲也. Sustained expression of Sox17 in the aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic cells maintain the self-renewal capacity and the hematopoietic ability to produce myeloid progenitors. 第37回分子生物学会年会 2014年11月25-27日 パシフィッコ横浜 (神奈川県・横浜市)

齋藤清香, 信久幾夫, Anani Maha, 原田果歩, 田賀哲也. Role of the Notch signaling pathway and its down stream genes in hematopoietic progenitor cell-containing cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region 第37回分子生物学会年会 2014年11月25-27日 パシフィッコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Anani Maha, 信久幾夫, 大澤光次郎, 岩間厚志, 原田果歩, 齋藤清香, 田賀哲也. Sox17-transduction imparts fetal hematopoietic cells with the myeloid-restricted differentiation potential 第12回幹細胞シンポジウム 2014年5月30日 九州大学百年記念講堂 (福岡県・福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・幹細胞制御分野・ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>

プレスリリース：胎生期の造血幹細胞の維持に關与する分子 Sox17 の発見
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20140423.pdf>

上記のプレスリリースの内容が、日経産業新聞、化学工業日報、マイナビニュースに掲載された

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信久 幾夫 (Nobuhisa Ikuo)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：40332879