

機関番号：32202

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790920

研究課題名 (和文) 造血幹細胞生着・維持への細胞骨格蛋白質 Vinculin の関与

研究課題名 (英文) Vinculin is indispensable for hematopoietic stem cell repopulation

研究代表者

大森 司 (Tsukasa OHMORI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382843

研究成果の概要 (和文) : Vinculin は接着斑に存在する蛋白として広く発現が認められる。本研究では Vinculin の造血幹細胞機能制御に関する検討を行った。マウス造血幹細胞である c-Kit⁺Scal⁺Lin⁻ (KSL) 細胞の Vinculin 発現を shRNA 発現レンチウイルスベクターでノックダウンすると細胞接着やホーミングには影響がないが、感染 KSL 細胞由来の造血構築が減少した。Vinculin のノックダウンで細胞周期の修飾や細胞増殖が抑制され、Cobblestone-like area forming cell が減少することから Vinculin は造血幹細胞の Repopulation に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Vinculin is a highly conserved actin-binding protein that is localized in integrin-mediated focal adhesion complexes. This study showed that the ability of c-Kit⁺Scal⁺Lin⁻ (KSL) hematopoietic stem cells (HSCs) to support reconstitution of hematopoiesis after competitive transplantation was severely impaired by lentiviral transduction with short hairpin RNA sequences for vinculin, albeit adhesion to the extracellular matrix and homing to bone marrow were not inhibited. Our results suggest that vinculin is an indispensable factor determining HSC repopulation capacity, independent of integrin functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学

1. 研究開始当初の背景

(1) Vinculin は接着斑に存在する細胞骨格蛋白質である。接着斑は細胞外マトリックスと結合するインテグリンのクラスタリングにより生じる構造であり、細胞の足場として機能するだけでなく、細胞内の様々な蛋白質を

介してインテグリンからのシグナルを伝達する。Focal adhesion には Vinculin を始め、Talin, α -actinin, Paxillin など様々な蛋白質が存在している。Vinculin の機能は、その N 末端と Talin の会合がインテグリンのリガンド結合に重要なことや細胞接着、細胞進展

に關与することが報告されている。また、Vinculin のノックアウトマウスは胎生致死であり、脳や心臓の形成不全を引き起こす (Development (1998) 125: 327-337)。ごく最近、コンディショナルノックアウトマウスの報告がされ、心臓特異的な Vinculin 欠損が拡張型心筋症を引き起こすと報告されている。

(2) 私は以前より血小板の細胞内シグナル伝達、特に細胞骨格蛋白質に焦点を当て検討を続け、レンチウイルスベクターを用いた RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) の手法により、無核の血小板における目的蛋白質のノックダウンによる血小板シグナル伝達研究法を提唱した (ATVB, 2007)。この手法はノックアウトマウスの作成より簡便に血小板内の目的蛋白質の減少を可能とし、実際にこの系を用いて作成した Talin 欠損血小板では血小板活性化後のインテグリン α IIb/ β 3 の活性化が起こらないことを証明した。Vinculin の血小板インテグリン活性化に対する効果を検討するために Vinculin に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクター (LentiLox) を骨髄細胞に感染させ、Vinculin ノックダウン血小板を得ようと試みた。しかし、Vinculin に対する shRNA を骨髄細胞に発現させた場合、移植後の GFP 陽性血小板 (感染細胞由来血小板) が殆ど出現しなかった。この結果は2つの shRNA 配列に共通した現象であった。以上より、実験開始当初は全く予測しえなかったが、Vinculin が造血幹細胞の生着・維持、もしくは分化に關与する因子であるという仮説を立て、今回の検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究の目的は接着斑に存在する細胞骨格蛋白 Vinculin を抑制すると Vinculin 抑制血小板が殆ど得られない現象に着目し、Vinculin が造血幹細胞機能を制御するかどうか、またその機序を検討することである。

(2) また血小板インテグリンの活性化に対して Vinculin がどのような作用をもつかを CHO 細胞の発現系を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) レンチウイルスベクターの作製: RNA ポリメラーゼ III である U6 プロモーターの下流に目的 mRNA を抑制する shRNA を発現し、かつ CMV プロモーターの下流で EGFP を発現するレンチウイルスベクタープラスミド (pLL3.7) を ATCC より購入した。shRNA の配列は Dharmacon RNA Technologies の Web サイトを用いて検索し、pLL3.7 の HpaI と XhoI サイトに挿入した。目的のレンチウイルスベ

クター (LentiLox) は gag/pol, rev, VSVG を発現するプラスミドを同時に HEK293T 細胞にトランスフェクションして作成した。

(2) マウス造血幹細胞の分離と造血幹細胞移植: マウス造血幹細胞は c-Kit 陽性, Sca1 陽性, Lineage 陰性のいわゆる KSL 細胞をソーティングにより分離した。ドナーマウスには Ly5.1 マウスを用いることで、移植後に幹細胞由来の造血が同定できるようにした。分離した KSL 細胞をサイトカイン存在下に LentiLox を MOI=20 で感染させて、翌日に Competitor 細胞 (Ly5.2) と共に放射線照射 (9.5Gy) を行ったマウスに幹細胞移植した。移植後に感染 KSL 細胞由来の造血を EGFP 陽性細胞として同定した。

(3) 細胞遊走と骨髄ホーミング: *in vitro* の細胞遊走には Boyden Chamber 法を用いた (TransWell, Coster)。LentiLox に感染させた KSL 細胞を上層にいれ、下層に存在する SDF-1 α (100 nM) に対して遊走した細胞を遠心分離し、細胞数を CyCount DR dye にて定量化した。骨髄、脾臓への造血幹細胞のホーミングは感染 KSL 細胞を放射線照射を行ったマウスに静脈投与し、16-20 時間後に骨髄、または脾臓を採取して、骨髄、脾臓の CFU-GM のコロニー形成能で評価した。

(4) 細胞増殖と細胞周期: サイトカイン刺激下で KSL 細胞の *in vitro* における増殖能を細胞数で定量化した。また、同時に細胞周期を BrdU によるラベリングを行いフローサイトメトリーで評価した (BrdU Flow Kit, BD Bioscience)。

(5) Long-term culture-initiating cells (LTC-IC) と Cobblestone-like area-forming アッセイ: Methocult 5300 (Stem Cell Technologies) メディウムを用いて *in vitro* における幹細胞維持について検討した。手法はマニュアルに従い常法どおりに行った。

(6) KSL 細胞動態の *in vivo* 評価: LentiLox の EGFP を Luciferase に置換したウイルスベクターを作製して、同様に KSL 細胞に感染させた。細胞の Luciferase 活性は *in vivo* イメージングシステムである IVIS[®] Imaging System and Living Image software (Xenogen Corp.) で評価可能である。KSL 細胞を移植した後に一定時間毎に基質であるルシフェリンを 1.5 mg 腹注して細胞由来のルシフェラーゼをマウス個体のまま検出し KSL 細胞の動態を検討した。

(7) 細胞接着と細胞進展: LentiLox に感染させた KSL 細胞をフィブロネクチン上に接着さ

せ、一定時間後に接着細胞数を CyCount DR dye で定量化した。インテグリン非依存性の接着は EDTA 存在 (陰性コントロール), インテグリン活性化時の接着は MgCl₂ 存在下 (陽性コントロール) で同時に評価した。フィブロネクチン上の細胞進展はローダミン標識ファロイジンと DAPI を用いて染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Olympus FV1000)。

(8) 血小板インテグリン発現 CHO 細胞の樹立: CHO 細胞にヒトインテグリン α IIb と β 3 を同時にプラスミドトランスフェクションし, G418 とハイグロマイシン存在下で選択培養し, 細胞表面にインテグリン α IIb が高発現している細胞をクローニングした (α IIb β 3-CHO)。活性型ヒトインテグリン α IIb β 3 を発現する細胞株 (α 6B β 3-CHO) は国立循環器病センターの本田, 宮田両博士より提供いただいた。

(9) cDNA 作製: マウス Vinculin に対する cDNA を RT-PCR 法によりクローニングした。活性型となる Vinculin は N 末端から 1-258, 1-880 アミノ酸, また Closed Conformation を抑制するように C 末端の結合部位を mutagenesis により変異させた Vinculin を作成した (T12)。これらの cDNA を EGFP との融合蛋白質として発現させるために pEGFP-C (Clontech) に挿入し, その後 HIV レンチウイルスベクターを作成した。

4. 研究成果

(1) shRNA 発現による目的蛋白質の発現抑制: レンチウイルスベクターである LentiLox にコントロール配列 (Random), Talin に対する shRNA 配列 (Talin-A), Vinculin に対する shRNA 配列 (Vin-B, Vin-C) を挿入した。KSL 細胞にウイルスベクターを MOI=20 で感染させ, 蛋白発現を Western Blotting で確認した。図 1 に示すように目的蛋白質の発現抑制が認められた。

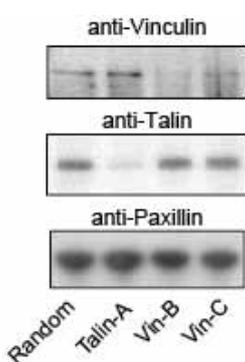


図 1 レンチウイルスベクター LentiLox に感染後の蛋白発現レベル (文献 1 より引用)。Talin や Vinculin に対する shRNA を発現する LentiLox 感染後に KSL 細胞の目的蛋白質の発現減少が認められる。

(2) Vinculin 抑制による KSL 細胞由来造血の減少: LentiLox に感染させた KSL 細胞

(Ly5.1) とコンペティター細胞としてワイルドタイプマウス (Ly5.2) の骨髄細胞を放射線照射を行ったマウスに造血幹細胞移植を行った。Vinculin の shRNA を発現する KSL 細胞由来の造血 (EGFP 陽性細胞) はコントロールや Talin の shRNA 配列よりも抑制された (図 2) 骨髄の KSL 細胞やその他の細胞でも同様の所見を認めた (データ未提示)。

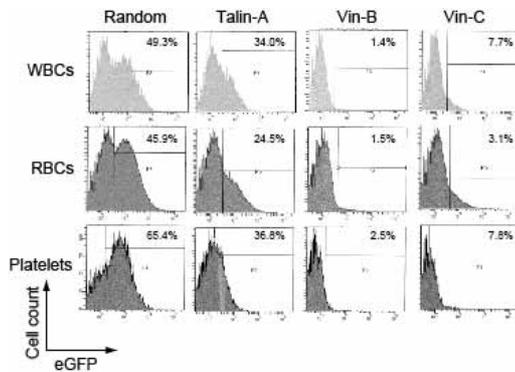


図 2 LentiLox 感染 KSL 細胞移植後の末梢血細胞 EGFP 陽性率 (文献 1 より引用)。Vinculin の shRNA 発現により KSL 細胞由来の造血が減少していることがわかる。

(3) *in vitro* でのコロニー形成能: 造血幹細胞の分化に Vinculin が関与するかどうかを検討するために LentiLox 感染後の KSL 細胞を用いて CFU-GM, CFU-G 形成能を比較した。Vinculin や Talin の抑制によりこれらコロニー形成能は影響を受けず, 少なくとも白血球分化に対する関与はないと考えられた。

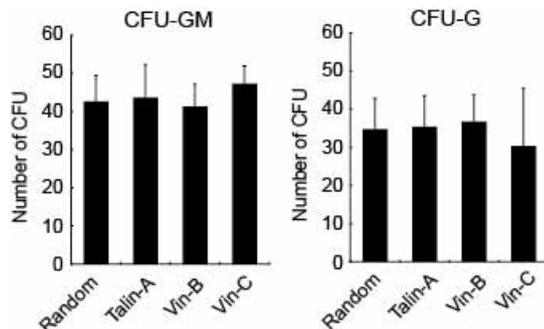


図 3 shRNA 発現による CFU-GM, CFU-G 形成能 (文献 1 より引用)。Talin や Vinculin のノックダウンにより KSL 細胞のコロニー形成能は影響を受けない。

(4) Vinculin ノックダウンによる細胞周期・細胞増殖の影響: 次に KSL 細胞の増殖に対する影響と細胞周期について検討を行った。サイトカイン刺激による KSL 細胞の *in vitro* での増殖能は Vinculin の抑制により低下した (図 4)。また細胞周期の比較では S 期細胞の減少, アポトーシス細胞の増加を認めた (データ未提示)。以上より細胞増殖や細胞

周期の修飾により Vinculin が造血幹細胞機能に関与することが示唆された。

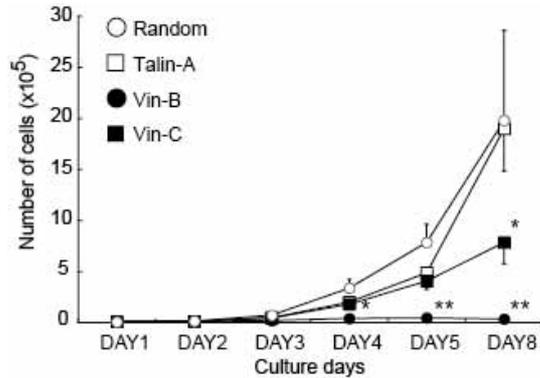


図4 Vinculinの造血幹細胞増殖に対する影響 (文献1より引用). LentiLox を感染させた KSL 細胞をサイトカイン存在下で *in vitro* で培養し, 細胞数をフローサイトメトリーで定量化した. Vinculin の抑制により細胞増殖が抑制されることが示された.

(5) Cobblestone-like area forming cell の評価: 造血幹細胞の *in vitro* における repopulation, また幹細胞機能維持を評価するために Cobblestone-like area forming cell を定量化した. Vinculin の抑制により Cobblestone-like area forming cell の頻度は減少した (図5). 同様に Long-term culture initiating cell の頻度も低下した (データ未提示).

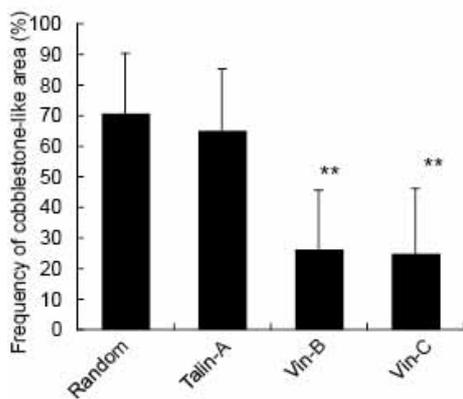


図5 Cobblestone-like area forming cell の定量化 (文献1より引用). LentiLox を感染させた KSL 細胞を骨髄フィーダー細胞 (C3H/10T1/2 cells) 上に播種し4週後にコロニーを形成する細胞の頻度で定量化した. Vinculin 抑制により Cobblestone-like area forming cell の頻度が減少する.

(6) 骨髄・脾臓ホーミングへの影響: 次に造血幹細胞のホーミングに Vinculin が関与するかどうかについて検討した. *in vitro* での SDF-1 に対する KSL 細胞の遊走能は Vinculin

ノックダウンで上昇し (データ未提示), *in vivo* の骨髄及び脾臓へのホーミングには影響を及ぼさなかった (図6).

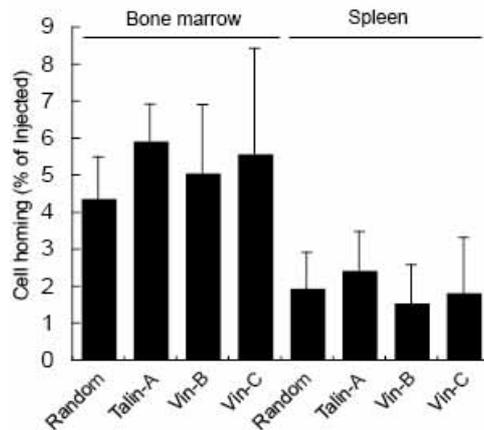


図6 骨髄・脾臓への KSL 細胞ホーミング (文献1より引用). LentiLox を感染させた KSL 細胞を放射線照射したマウスに投与し, 移植後 16-20 時間後に骨髄と脾臓を採取し, 移植 KSL 細胞の骨髄・脾臓へのホーミングを CFU-GM の形成能で定量化した.

(7) 移植 KSL 細胞の血液再構築に対する長期的観察-*in vivo* イメージングを用いた評価: 同一の個体で長期の血液再構築を観察するために LentiLox の EGFP を Luciferase に置換したウイルスベクターを作成した. このウイルスを感染させた KSL 細胞を造血幹細胞移植して, 経時的に KSL 細胞由来のルシフェラーゼを IVIS Imaging システムを用いて可視化した (図7). 移植後早期には Vinculin 抑制 KSL も生着するが, KSL 細胞由来のルシフェラーゼ活性は徐々に低下した (図7).

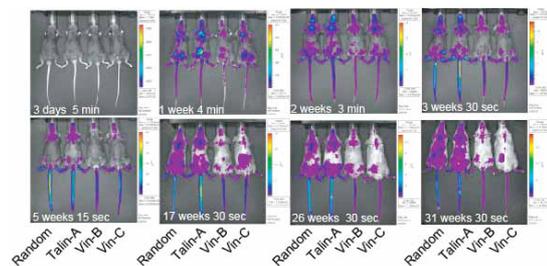


図7 IVIS Imaging システムを用いた KSL 細胞動態の可視化 (文献1より引用). ルシフェラーゼを発現する LentiLox を KSL 細胞に感染させ, 幹細胞移植を行った. 移植後一定時間毎に基質であるルシフェリンを腹腔内投与して KSL 細胞の動態を可視化した.

(8) 細胞接着・進展能の評価: KSL 細胞での Vinculin ノックダウンによる変化がインテ

グリンの機能に依存するかどうかについて検討した。βインテグリンの発現には変化は認められず（データ未提示）、フィブロネクチンへの接着能がTalinノックダウンでは抑制されたが、Vinculinノックダウンでは抑制されなかった（図8）。また、フィブロネクチン上の細胞進展も抑制されなかった（データ未提示）。

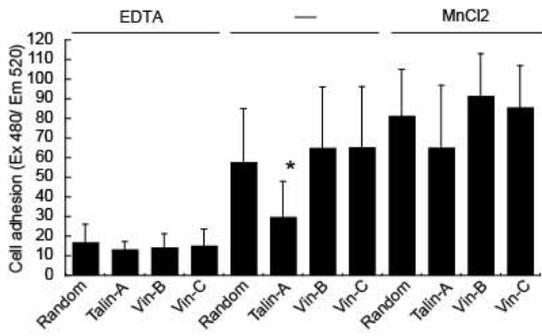


図8 KSL細胞のフィブロネクチン上への接着反応（文献1より引用）。LentiLoxに感染させたKSL細胞をフィブロネクチン上に播種し接着細胞を定量化した。EDTA, Mnはそれぞれ陰性、陽性コントロール。

(10)まとめ-1: 以上より造血幹細胞ではVinculinが移植後のRepopulationに重要なことが示唆された。その機序としてはインテグリン非依存性の経路が重要であり、細胞周期の修飾がその1機序として考えられた。

(11) CHO細胞を用いた血小板インテグリン評価系の確立: 上述の通り、shRNA発現により造血幹細胞を移植後にVinculinノックダウン血小板を得ることは困難である。血小板インテグリン活性化におけるVinculinの役割を検討するためにCHO細胞にヒト血小板インテグリンαIIbβ3を安定的に発現する細胞を確立して実験系に用いた(αIIbβ3-CHO)。

(12)Vinculin強発現によるインテグリン活性化: αIIbβ3-CHOにレンチウイルスベクターでEGFP融合蛋白としてVinculinを発現させた。野生型のVinculinの強発現ではインテグリン活性化は認められなかったが、N末端のみ(1-880, 1-258), またClosed conformationを抑制する変異型(T12)ではαIIbβ3インテグリンの活性化を認めた(図9)。この反応はTalinノックダウンで減少することからTalinを介した反応であることが示唆された（データ未提示）。

(13) 活性型αIIbβ3を発現するCHOへの影響: αIIbの細胞質ドメインをα6Bに改変すると活性型αIIbβ3を発現するCHOが得られる(α6Bβ3-CHO)。Vinculinに対するshRNAを

発現するウイルスベクターを感染させるとVinculinノックダウンのにより有意にαIIbβ3の活性化が減少したが、その効果はTalinノックダウンと比較すると明らかに弱かった（図10）。

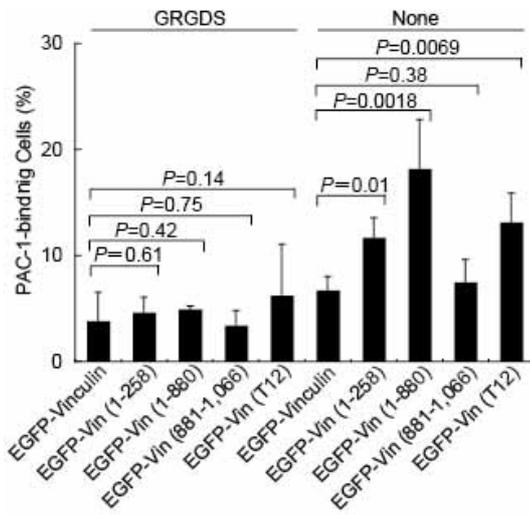


図9 Vinculin強発現によるαIIbβ3-CHOの活性化（文献2より引用）αIIbβ3-CHOにレンチウイルスベクターでEGFP融合蛋白としてVinculinを発現させた。野生型のVinculinではインテグリン活性化(PAC-1結合能)は変化しないが、N末端のみ(1-880, 1-258), またClosed conformationを抑制する変異型(T12)ではαIIbβ3インテグリンの活性化を認める。

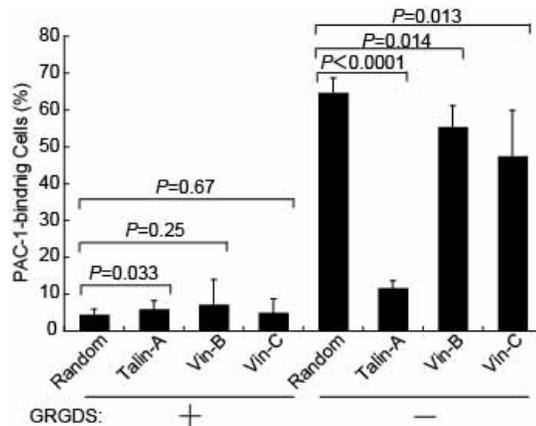


図10 α6Bβ3-CHOのインテグリン活性化に対するVinculinノックダウンの影響（文献2より引用）。活性型αIIbβ3を発現するCHO(α6Bβ3-CHO)にLentiLoxを感染させTalin, またはVinculinをノックダウンした。Vinculinノックダウンによるインテグリン活性化の抑制はTalinと比較すると軽微である。

(14) まとめ-2: N末端とC末端が解離した活性型のVinculinは血小板インテグリンを活性化するが、Vinculinノックダウンによるイン

テグリン活性化反応の抑制はすくなく、そのインテグリン活性化における役割はTalinほど重要ではないと考えられる。

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2件)

- 1) Ohmori T., Kashiwakura Y., Ishiwata A., Madoiwa S., Mimuro J., Furukawa Y., and Sakata Y. Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells, independent of integrin function. *J Biol Chem.* 285(41):31763-31773, 2010.
- 2) Ohmori, T., Kashiwakura Y., Ishiwata A., Madoiwa S., Mimuro J., Honda S., Miyata T., and Sakata Y. Vinculin activates inside - out signaling of integrin α IIb β 3 in Chinese hamster ovary cells. *Biophys Biochem Res Commun* 400(3):323-328, 2010.

[学会発表] (計3件)

- 1) 大森 司, 窓岩清治, 三室 淳, 坂田洋一 Platelet-directed gene modification by lentiviral vector. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 平成21年10月23-25日 (シンポジウム)
- 2) Ohmori T., and Sakata Y. Platelet-directed gene therapy for hemophilia by lentiviral vector. The 6th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis, Nusa Dua Bali, October 13-16, 2010 (シンポジウム)
- 3) 大森 司, 柏倉裕志, 石渡 彰, 窓岩清治, 三室 淳, 古川雄佑, 坂田洋一. Vinculin is indispensable for repopulation by hematopoietic stem cells. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜, 平成22年9月24-26日

[図書] (計1件)

- 1) Ohmori T., and Sakata Y. Hematopoietic stem cell repopulation after transplantation. *Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 2*, Springer (in press).

[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
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 司 (OHMORI TSUKASA)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70382843