

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14739

研究課題名(和文) 血液をつくる水分調節機構の解明

研究課題名(英文) Water volume regulation involved in primary blood production

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞と血球細胞は共通前駆細胞から分化する。両者はやがて空間的に分離され、心臓の拍動開始と共に血球が血管内を循環する。血球・血管分化を制御する分子群は詳細になっているが、最初に出現する血液の水分がいつどのようにして血管内へ蓄積するのは全くの謎である。本研究では胚発生初期の血管内への水分の流入機構を解明する為、水チャネル分子Aquaporin1(AQP1)に焦点を絞り、解析を行った。その結果、血管内の水分がAQP1を介して血管内皮細胞内へ取り込まれ、血球細胞の出芽・遊離(内皮→造血転換)を引き起こすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内皮→造血転換の際に観察される扁平(内皮)から球形(血球)の細胞形態変化が一体どのようなしくみによって引き起こされるのかは、これまで未解明であった。本研究から、水チャネルAQPを介しておこる細胞内水流入が細胞の球状化に関わることが明らかになった。水分子の流入制御の観点から血液産生メカニズムを解明しようとした研究はこれまでになく、内皮→造血転換の分子機構解明に向けて新たな突破口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cells and blood cells differentiate from common progenitor cells. Both are spatially separated, and blood cells circulate in the blood vessels as the heart starts to beat. Although the molecules involved in the blood and blood vessel differentiation have been detailed, how and when the water of the first appearing blood is taken into the vasculature have not been addressed. In this study, we focused on the water channel molecule Aquaporin1 (AQP1) and analyzed it in order to elucidate the inflow mechanism of water into the blood vessels at the early embryonic development. We found a new possible mechanism by which AQP1-mediated selective water influx promotes morphological transition from flat endothelial cells to spherical blood cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：アクアポリン 血管内皮細胞 内皮→造血転換 二次造血

1. 研究開始当初の背景

血液は、発生初期から出現し、胚の成長に必須の栄養や酸素等の運搬機能を果たす。血球・血管分化の機序は詳細に理解されており、今や培養条件下で幹細胞群から人為的に分化を制御する段階にまで発展している。一方、実際の生体内を循環する血液は、細胞性成分(血球)と液性成分(血漿)から成る。液性成分の構築には、水分子が血管内へ適切に取り込まれることが必要不可欠であることが予想されるが、血管内への水分流入がいつどのような制御を受けて起こるのかは解明されていない。とりわけ、胚発生期に最初の血液を作り出す際の水流入制御メカニズムは全くの謎である。本研究では、血管内への水分流入のしくみを明らかにする為、以下の研究を行った。

2. 研究の目的

細胞内外の水分調節は、細胞膜上の水チャネル Aquaporin (AQP) を介して起こることが知られている。最初に出現する血液の水分がいつどのようにして適切に血管内へ取り込まれるのかを解明するため、血島で発現する AQP 遺伝子群に焦点を絞り、それらの役割を解析する。血液の産生制御に関わる血管内水流入メカニズムを明らかにし、血管内の水分調節が血球・血管形成に果たす役割を理解する。

3. 研究の方法

in vivo 実験システムとしてウズラ胚を用いる (Sato et al., *Dev. Growth. Differ.* 2013)。本モデル動物の特徴は、(i) 卵のサイズが小さく共焦点レーザー顕微鏡ステージ上で全卵培養できるため、循環器形成研究で最も配慮すべき酸素分圧(遺伝子発現量や血管新生の変動因子)を正常に保ったまま、タイムラプス観察解析が可能である。(ii) 血島が卵黄囊上に平面的に構築されるので、観察が容易。(iii) 血管内皮細胞と血球をそれぞれ可視化するトランスジェニック (Tg) 系統を使用できる (Sato et al. *PLoSOne*, 2010; Huss et al., *Development*, 2015)。(iv) 任意の組織内への遺伝子導入が可能である。なお、ウズラゲノム配列情報は整備公開済みであり、遺伝子単離や配列比較解析等に支障はない。

4. 研究成果

(1) AQP ファミリー遺伝子群の単離と発現解析

ニワトリ胚遺伝子発現パターンデータベース (GEISHA) で公開されている情報をもとに、血島において発現する AQP ファミリー遺伝子 AQP1, 3, 5, 8, 11 の完全長 cDNA を単離し、それらを鋳型とする RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。血島および血管内皮細胞の両方において発現する AQP1 について、ポリクロナール抗体を作製し、免疫組織染色を行った。その結果、AQP1 は二次造血場として知られる背側大動脈の血管内皮細胞に特異的な蓄積パターンを示すことがわかった。AQP1 陽性の血管内皮細胞は造血細胞マーカー CD45 陽性であることから、AQP1 が血管内皮細胞から造血細胞へと分化転換する現象(内皮 - 造血転換)に関わる可能性が示唆された。

(2) AQP1 による内皮 - 造血転換誘導

内皮 - 造血転換過程における AQP1 の発現と細胞形態変化の相関を直接的に検証するため、蛍光タンパク質融合型 AQP1 (AQP1-EYFP) を作製し、Tet-on システムを利用してヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対して AQP1-EYFP の発現誘導実験を行った。その結果、AQP1-EYFP の発現上昇に従って、血管内皮細胞が球形に変化することが判明した。生体内(ウズラ胚)においてもタイムラプス観察解析を行い、AQP1 を強制発現させた血管内皮細胞が血球様細胞へ転換し、血流循環することを確認した。さらに AQP1 の発現により異所的に血管から遊離させた血球様細胞の発生運命を調べるため、Tol2 トランスポゾンを用いて AQP1 発現誘導細胞の長期追跡実験を行った。その結果、AQP1 によって人為的に血管内皮細胞から出芽・遊離させた血球様細胞が骨髄まで移動することがわかった。これらの発見は、血管内の水分が AQP1 を介して血管内皮細胞内へ取り込まれ、造血細胞の出芽・遊離が起こる可能性を示唆している(図1)。

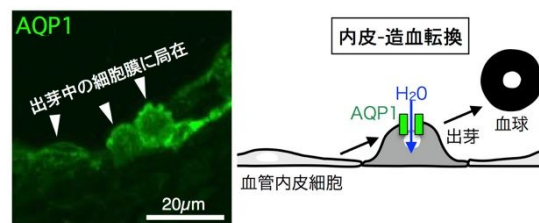


図1 血管から血球への形態変化に関わることが予想される細胞内水分流入制御

(3) 転写因子 Klf2 の関わり

AQP1 の発現制御に関わることが予想されている転写因子 Klf2 の完全長 cDNA を単離し、培養細胞および生体内において AQP1 と同様の内皮 - 造血転換誘導作用を示すかどうかを調べた。その結果、Klf2 も AQP1 と同等の作用を持つことが判明した。

当初計画では、血液産生に寄与する水分調節機構の解明というやや漠然とした目標を掲げてい

たが、最終的に胚性造血の根幹をなす内皮 - 造血転換を制御する分子メカニズムの解明に向け、大きく前進することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Sato Y, Nagatoshi K, Hamano A, Imamura Y, Huss D, Uchida T, Lansford R. "Basal filopodia and vascular mechanical stress organize fibronectin into pillars bridging the mesoderm-endoderm gap". *Development* 144, p281-291 (2017), DOI: 10.1242/dev.141259

Liu L, Suzuki K, Chun E, Murashima A, Sato Y, Nakagata N, Fujimori T, Yonemura S, He W, Yamada G. "Androgen regulates dimorphic F-actin assemblies in the genital organogenesis". *Sexual Development* 11, p190-202 (2017), DOI: 10.1159/000477452

〔学会発表〕(計3件)

佐藤 有紀 "脈動による空間伸縮が形態形成に果たす役割". Conbio 2017 (2017)

Mugiho Shigematsu, Chie Tamura, Yuki Sato. "Cell Budding During Endothelial to Hematopoietic Transition is Regulated by Aquaporin Water Channels". KEY forum (2017)

Mugiho Shigematsu, Chie Tamura, Yuki Sato. "Cell Budding During Endothelial to Hematopoietic Transition is Regulated by Aquaporin Water Channels". Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th (2018)

〔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.lab.med.kyushu-u.ac.jp/anat1/>

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：重松 麦穂

ローマ字氏名：(SHIGEMATSU, mugiho)

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。