

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15393

研究課題名(和文) 背側大動脈における造血幹細胞の発生動態の解析

研究課題名(英文) Dynamic analysis of hematopoietic stem cell development in the dorsal aorta

研究代表者

小林 功 (Kobayashi, Isao)

金沢大学・生命理工学系・助教

研究者番号：30774757

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)：本研究では、ゼブラフィッシュ胚を用いて造血幹細胞の発生動態を追跡し、細胞接着分子であるインテグリンが造血幹細胞の形成に不可欠な細胞内シグナル伝達に関与していることを突き止めた。インテグリンは細胞の接着に関わるだけでなく細胞のシグナル伝達にも影響することは知られているが、造血幹細胞の発生過程に関わるインテグリンのシグナル伝達経路を明らかにしたのは今回が初めての報告となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工多能性幹細胞(iPS細胞)から造血幹細胞を造り出すためには、発生期における造血幹細胞の形成過程を分子レベルで解明する必要がある。ゼブラフィッシュは発生過程の細胞の動態を追跡しやすいなどの利点から発生生物学の分野で優れた実験モデルとして知られている。本研究で得られた知見は哺乳類でも共通である可能性が高く、今後、iPS細胞から造血幹細胞への分化誘導に応用できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have elucidated the role of integrins on hematopoietic stem cell development in the zebrafish embryo. Integrins are known to regulate not only cell adhesion but also signal transduction in many tissues. In this study, we determined, for the first time, the signaling pathway that regulates hematopoietic stem cell development.

研究分野：発生生物学

キーワード：造血幹細胞 血管芽細胞 インテグリン ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は全ての種類の血液細胞へ分化する能力(多分化能)と、未分化性を維持したまま自己を複製する能力(自己複製能)を併せ持つ細胞と定義される。造血幹細胞のこのような特殊な能力は、骨髄移植という形で白血病などの難治性血液疾患に対する治療に応用されている。しかし、骨髄移植におけるドナー不足や、移植後の免疫拒絶は深刻な問題であり、根治的な治療が難しいのが現状である。一方、近年樹立された人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS 細胞)は生体のほぼ全ての細胞へ分化可能な万能細胞であり、さらに患者由来の細胞を用いて作出できることから、“自家移植”という新たな移植医療への応用が期待されている。iPS 細胞は初期胚の多能性細胞と類似した特徴を有することから、iPS 細胞から造血幹細胞へ分化誘導するには、胚における造血幹細胞の発生過程を生体外で忠実に再現する必要がある。そのため、現在多くの研究者が造血幹細胞の発生を制御する分子機序の解明に取り組んでいる。

発生過程において造血幹細胞は、背側大動脈の腹側壁に存在する内皮細胞(血管芽細胞)の一部が内皮-造血転換という過程を経て造られる。血管芽細胞は造血幹細胞への運命を獲得するために様々な外部組織・細胞との相互作用によって分化や増殖が制御されているものと考えられている。しかしながら、造血幹細胞の発生メカニズムには不明な点が多く、血管芽細胞がいつ、どこでどのような組織・細胞と相互作用し、どんなシグナルを得ているのかは十分に解明されていない。

ゼブラフィッシュは哺乳類と類似の造血機構を有する一方で、体外発生を行い、胚が透明で、変異体やトランスジェニック系統の作出が容易であることから、造血発生の分野で優れた実験モデルとして知られている。ゼブラフィッシュ胚を用いることによって血管芽細胞のライブイメージング解析が可能となるため、細胞間の相互作用に異常がある場合には、その異常をライブイメージングによって発見することも可能である。

2. 研究の目的

組織発生の多くは細胞同士の相互作用によって厳密に制御されており、相互作用が失われると発生過程に大きな影響を及ぼす。造血幹細胞の発生過程においても細胞間の接着を介した相互作用が非常に重要であることが既に報告されている(Kobayashi et al. Nature, 2014)。そこで本研究では、造血幹細胞の発生に関わる細胞接着関連分子に着目し、細胞動態や相互作用についての解析を行うことによって、造血幹細胞の発生を制御する外部環境、および発生制御機構の時間的および空間的な理解につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

インテグリン由来シグナルを阻害できるトランスジェニック系統 *UAS:DN-itg-mCherry* および血管内皮細胞で *DN-itg-mCherry* の発現を誘導できる *fli1a:Gal4* 系統を掛け合わせて得られるダブルトランスジェニックの胚において *in situ hybridization* によって造血幹細胞のマーカー遺伝子である *runx1* の発現を調べた。また、遺伝子の強制発現を行うため、1細胞期の受精卵へ mRNA をインジェクションした。さらに、ライブイメージング解析のため、血管芽細胞を GFP で標識できる *fli1a:GFP* を用いてインテグリン阻害胚での血管芽細胞の細胞動態を観察した。遺伝子の機能を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いてゼブラフィッシュにおける *Lrrc15* 変異体の樹立を行なうとともに、PI3K、Erk などの活性を阻害する阻害剤でゼブラフィッシュ胚を処理し、機能抑制実験を行なった。

4. 研究成果

本研究では細胞接着分子の一つであるインテグリンのシグナルが造血幹細胞の発生に不可欠であることを見出した。インテグリン由来シグナルを阻害できるトランスジェニック系統 *UAS:DN-itg-mCherry* と、血管内皮細胞で *DN-itg-mCherry* の発現を誘導できる *fli1a:Gal4* 系統を掛け合わせて得られるダブルトランスジェニックの胚では背側大動脈における造血幹細胞の数が著しく減少していた。また、このダブルトランスジェニック胚において、インテグリンの下流でシグナル伝達に関わることが知られている FAK を強制的に活性化させると造血幹細胞の発生が正常に近いレベルにまで回復していたことから、造血幹細胞の発生には FAK を介したインテグリン由来シグナルが不可欠であることが示された。さらに、網羅的な遺伝子発現解析、および阻害剤を用いた機能解析を通して、インテグリン由来シグナル伝達経路は PI3K を介して膜タンパクをコードする *Lrrc15* の発現を制御していることを突き止めた。*Lrrc15* は血管芽細胞、とくに造血幹細胞へと分化を遂げる造血性内皮細胞において高く発現しており、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Lrrc15* 変異体を樹立し、*Lrrc15* の機能解析を行ったところ、*Lrrc15* 変異体は造血幹細胞の発生に異常を来していた。これらのことから、*Lrrc15* がインテグリンの下流において実質的に造血幹細胞の発生を直接的に制御する分子である可能性が示唆された。このように、本研究ではゼブラフィッシュ胚を用いてインテグリン由来のシグナル伝達経路が膜タンパク *Lrrc15* の発現を制御することによって造血幹細胞の発生に重要な役割を果

たしていることを明らかにした。Lrrc15 の造血幹細胞発生における詳しい機能については今後さらに検討をおこなっていく予定である。

さらに、インテグリンの上流で機能する分子についても並行して検討を行っており、small GTPase の一種である Rap1b がインテグリンを介して造血幹細胞の発生を制御していることを見出している。rap1b 変異ゼブラフィッシュの胚では血管芽細胞においてインテグリンを介した細胞外マトリックスとの接着が低下しており、血管芽細胞の細胞移動の際に遅れが認められると同時に、本来扁平な形態で体節と強固に接着する血管芽細胞が球形になっていたことから、この変異体では血管芽細胞におけるインテグリンの活性が著しく低下しているものと考えられた。また、血管芽細胞は細胞移動の際に体節と直接接触することによって、Notch シグナルを受け取り、そのシグナルが造血幹細胞への分化に不可欠であることが知られているが (Kobayashi et al. Nature. 2014) rab1b 変異体ではインテグリンの活性が低く、体節との接着が低下してしまうため背側大動脈において形成される造血幹細胞の数が減少していた。rap1b 変異体に Notch または FAK を強制的に活性化させることによって造血幹細胞の発生が回復したことから、インテグリンは血管芽細胞と細胞外マトリックスとの結合を促し、細胞移動を促すと共に、体節からの Notch シグナルの伝達にも重要な役割を果たしていることが明らかになった。

このように本研究では、細胞接着分子であるインテグリンの造血幹細胞発生における役割に注目し、インテグリンの下流では PI3K を介して lrrc15 の発現を介して造血幹細胞の発生を制御すると同時に、インテグリン自体は細胞外マトリックスとの接着を介して血管芽細胞の細胞移動、および体節からの Notch シグナルの伝達に関わっていることを突き止めた。本研究の成果は造血幹細胞の発生メカニズムの一端を解明しており、今後、iPS 細胞から造血幹細胞への効率的な分化誘導を実現する上で重要な基礎的知見を提供することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Seung-Sik Rho, Isao Kobayashi, Eri Oguri-Nakamura, Koji Ando, Masakazu Fujiwara, Naomi Kamimura, Hiromi Hirata, Atsuo Iida, Yoshiko Iwai, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara. Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Dev Cell*. 49, 1-16 (2019)

〔学会発表〕(計 3 件)

Isao Kobayashi, Jingjing Kobayashi. Jam3b regulates hemato-vascular development through the repression of the Erk signaling pathway. ISEH 47th Annual Scientific Meeting (Los Angeles), 2018 年

Isao Kobayashi, Jingjing Kobayashi: Identification of Novel Regulatory Molecules for Hemato-vascular Development in Zebrafish, 第 2 3 回小型魚類研究会 (甲府), 2017 年

Seung-Sik Rho, Isao Kobayashi, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara: The small GTPase Rap1 regulates hematopoietic stem cell development by promoting Notch signal-mediated specification of hemogenic endothelium, 第 6 9 回日本細胞生物学会大会 (仙台), 2017 年

〔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〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 福原茂朋、飯田敦夫

ローマ字氏名： Shigetomo Fukuhara, Atsuo Iida

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。