

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06249
研究課題名(和文) マウス胎生中期の大動脈血液細胞塊に生じる造血幹細胞の発生・成熟・維持機構の解明
研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms for development, maturation, and maintenance in hematopoietic stem cells of intra-aortic hematopoietic cell clusters at midgestated 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの胎仔において、全ての血液細胞の源となる造血幹細胞は胎生10.5日胚の大動脈に接する血液細胞塊に最初に生じる。この時期の造血幹細胞の発生・成熟・維持に関わる転写因子Sox17が誘導する遺伝子およびシグナル経路を解析したところ、接着分子ESAM、GTPase活性をもつGimap6、NF-kappaBが活性化されるシグナル経路、およびDNA脱メチル化に關与するTET1の關与がそれぞれ示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今回得られたマウス胎生中期における大動脈内腔の造血幹細胞を含む血液細胞塊の形成・成熟・維持にかかわる分子およびシグナル経路をさらに解析していくことにより、生体の造血幹細胞の特性と比較することにより、培養皿上での造血幹細胞の形成および維持機構の解明につながることを期待される。

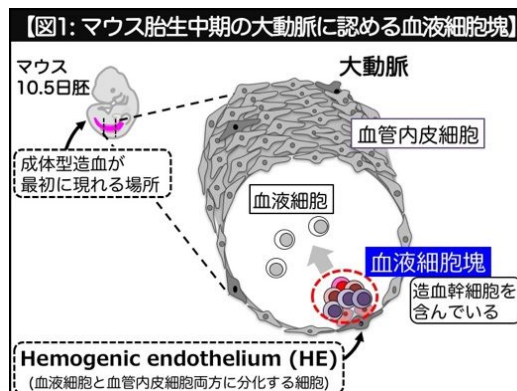
研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells, which are the source of all blood cells, first arise in hematopoietic cell clusters of the dorsal aorta in the embryonic day 10.5 of the mouse embryo. We analyzed genes and signaling pathways induced by Sox17, a transcription factor involved in the development, maturation and maintenance of hematopoietic stem cells in midgestation mouse embryos. We investigated the involvement of adherent molecules ESAM, the GTPase Gimap6, the signaling pathway activating NF-kappaB, and TET1 involved in DNA methylation, respectively.

研究分野：発生生物学

キーワード：造血幹細胞 転写因子 血液細胞塊 Sox17 胎仔

1. 研究開始当初の背景

全ての血液細胞を生み出す源となる造血幹細胞は、マウスの発生過程では胎生中期に大動脈の血管内皮細胞と血液細胞の共通の起源細胞である hemogenic endothelium (HE) より出芽するように生じる血液細胞塊の中に最初に認められることが知られている(図1)。近年、血液細胞塊で造血幹細胞の成熟が起きることを示唆する論文が報告され、胎生 9.5 日胚でまず未熟なプロ造血幹細胞が小さな血液細胞塊に生じ、胎生 10.5 日胚に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って造血幹細胞を生み出すことが出来る「造血幹細胞」であるプレ造血幹細胞へと成熟する。また、造血幹細胞が生じる血液細胞塊において、細胞塊の位置により発現するタンパク質が異なる、つまりは細胞の分化状態が異なることを示している。



そこで我々は、血液細胞塊における未分化性に寄与する遺伝子として転写因子 Sox17 に注目した。血液発生においてはコンディショナル遺伝子欠損マウスの解析により、Sox17 は成体骨髄ではなく胎仔期の造血幹細胞で機能することが示唆されていたので、Sox17 の血液細胞塊における発現を確認したところ、血液細胞塊の血管内皮細胞に接する細胞で強い発現を認めた。続いて、血液細胞塊の構成細胞(CD45^{low}c-Kit^{high}細胞)に Sox17 を導入すると、造血幹細胞を含む血液細胞塊が複数回の継代を経ても維持することが出来た。さらに、転写因子 Sox17 による血液細胞塊の未分化性維持機構の検討を行い、Sox17 が Notch1 のプロモーター領域に直接結合して発現誘導し、さらに下流遺伝子 Hes1 を発現誘導すること、細胞塊形成に重要である複数の接着分子についても直接発現誘導することが未分化性維持に重要であることを見出した。また、Sox17 導入細胞における血液細胞塊形成・未分化性維持に、液性因子 Thrombopoietin (TPO) の刺激が重要であることを示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大動脈に生じる造血幹細胞を含む血液細胞塊について分化状態と関連を認める細胞の位置に注目して、申請者が独自に見出した転写因子 Sox17 の幹細胞性を維持する分子機構について解析することにより、造血幹細胞の発生、成熟、および維持機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 胎生 10.5 日目のマウス胎仔より血液細胞塊構成細胞(CD45^{low}c-Kit^{high}細胞)に Sox17 を導入することで造血能が維持される細胞集団と造血能が維持されない Sox17 非導入細胞集団について、マイクロアレイ解析を行い、発現プロファイルを解析した。

(2) 続いて、Sox17 プロモーター制御下で GFP タンパク質を発現するマウス(Sox17-GFP マウス)の胎生 10.5 日目のマウス胎仔より、Sox17 が発現している血液細胞塊構成細胞(CD45^{low}c-Kit^{high}細胞)および Sox17 非発現血液細胞塊構成細胞をそれぞれ回収し、RNA シークエンス解析を行い、血液細胞塊における転写因子 Sox17 により発現誘導が起きると考えられる遺伝子の検討を行った。

(3) 胎生 10.5 日目のマウス胎仔より血液細胞塊構成細胞(CD45^{low}c-Kit^{high}細胞)を単離した後、レトロウイルスを用いて、転写因子 Sox17 および Sox17 が発現誘導することで造血能維持に寄与する候補遺伝子を導入し、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) 存在下で培養を行った。これらの細胞について、半固形培地上で、他系列の血液細胞への分化能を占める Mix コロニーの形成能を解析する事で、培養皿上での造血能の判定を行った。さらに、造血能が維持される Sox17 導入血液細胞塊様細胞について、Sox17 が発現誘導することで造血能維持に寄与する候補遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) をレトロウイルスを用いて導入し、遺伝子発現を減少させた。これらの細胞について、同様に、半固形培地上で Mix コロニーの形成能を解析し造血能の判定を行った。

(4) 胎生 10.5 日目のマウス胎仔について、各種抗体を添加してホールマウント免疫染色を行い、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タンパク質の発現を、共焦点顕微鏡を用いて解析を行った。また、同じく胎生 10.5 日目のマウス胎仔について、in situ hybridization

を行った。

4. 研究成果

(1) 胎生 10.5 日目のマウス胎仔より血液細胞塊構成細胞(CD45^{low}c-Kit^{high}細胞)に Sox17 を導入することで造血能が維持される細胞集団と造血能が維持されない Sox17 非導入細胞集団におけるマイクロアレイ解析により発現が亢進していた接着分子 endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)の関与について検討を行った(図2)。ESAM はマウス胎生中期の大動脈の血管内皮細胞、血液細胞塊、および血液細胞塊構成細胞 CD45^{low}c-Kit^{high}細胞において発現を認めた。CD45^{low}c-Kit^{high}細胞に Sox17 を強制発現した細胞集団において ESAM の発現は亢進しており、Sox17 強制発現細胞のなかで ESAM の発現は細胞塊において高く、これら ESAM 陽性細胞は *in vitro* において高い造血能を示した。さらに、タモキシフェン依存的に Sox17 が核内外へ移行する系を用いると、Sox17 が核内に存在するときに ESAM の高発現が認められ、Sox17 が直接 ESAM の遺伝子プロモーター領域に結合し転写を活性化することを明らかにした。また、Sox17 強制発現細胞において ESAM の発現量を減少させると細胞塊の形成能が低下した。以上の結果から、マウス胎生中期における大動脈内腔の造血幹細胞を含む血液細胞塊の形成と維持には、Sox17 によって発現が誘導される ESAM を含む接着分子が関与することが示唆された。

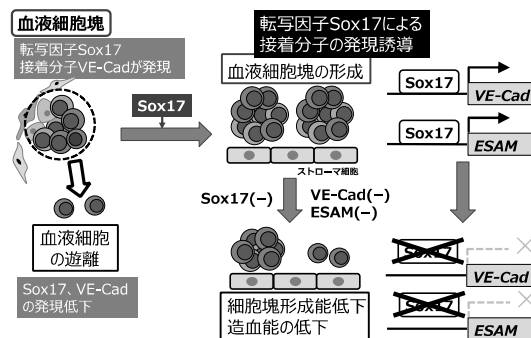


図2. 血液細胞塊形成および造血能維持における接着分子ESAMの関与

(2) Sox17 プロモーター制御下で GFP を発現する妊娠 10.5 日胚血液細胞塊構成細胞を Sox17 発現及び非発現細胞に分画し、RNA シークエンス解析により遺伝子発現様式を比較した。その結果、Sox17 発現細胞集団において GTPase 活性を持つ GIMAP ファミリーをコードする遺伝子の発現が高かった。そこで、血液細胞塊構成細胞である CD45^{low}c-Kit^{high}細胞に Sox17 を強制発現させた細胞およびタモキシフェン依存的に Sox17 を核移行させる細胞について、Gimap 遺伝子ファミリーの発現量を RT-PCR で解析したところ、Sox17 の発現およびタモキシフェン添加に伴う Sox17 の核移行により、上昇することが明らかになった。次に、GIMAP ファミリーの未分化性維持における役割を調べるために、CD45^{low}c-Kit^{high}細胞に 4 種類の Gimap ファミリー遺伝子をウイルス感染により導入した後、半固形培地における Mix コロニー形成能について解析した。その結果、Gimap6 強制発現細胞において Mix コロニー形成能が高い、つまりは造血能が高くなることを示した。一方で、Sox17 を強制発現した CD45^{low}c-Kit^{high}細胞に Gimap6-shRNA を導入して半固形培地における Mix コロニーの形成能を解析したところ、Gimap6 発現抑制細胞における造血能は低くなった。さらに、GIMAP ファミリーと GFP の融合タンパク質を用いて細胞内局在を調べたところ、GIMAP6 は他のファミリーとは異なり核周辺部にドット状の局在を示し、オートファジー形成に重要な蛋白質である LC3 と共局在することを明らかとした。以上の結果から、マウス胎生中期における大動脈内腔で血管内皮細胞に接する血液細胞塊構成細胞の転写因子 Sox17 による造血活性の維持は、Gimap6 の発現を介している可能性が示唆された(図3)。

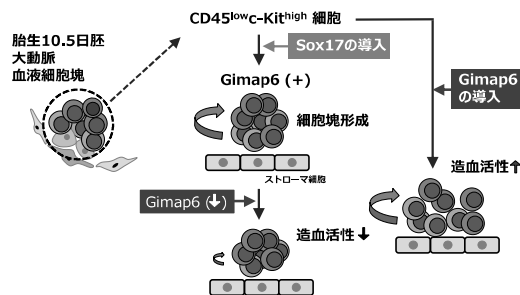


図3. 造血幹細胞が生じる血液細胞塊の造血能の維持における転写因子Sox17によるGimap6の発現の関与

(3) 血液細胞塊において未だその全容が明らかでない造血幹細胞の未分化性維持および分化誘導に寄与するシグナル伝達系を明らかにするため、さまざまなシグナル経路にかかわる抗体を用いて、ホールマウント蛍光免疫染色および共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、血液細胞塊を構成する細胞において、NF- κ B(p65)の発現が細胞質に認められる細胞と核内に認められる細胞が存在していた。また、NF- κ Bの上流に位置するAktについてもその活性化の指標となるリン酸化が認められる細胞と認められない細胞が存在した。そこで、NF- κ Bに注目して血液細胞塊における未分化性維持および分化誘導への関与について検討した。NF- κ BやAktの上流に存在する3つの受容体 TNFR、IL-1R、TLR4について、胎生 10.5 日目の血液細胞塊

の構成細胞で未分化性の高い CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞における発現を解析したところ、それぞれの受容体はいずれも低レベルに発現していた。次に、フローサイトメトリーを用いて CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞集団について TNFR 陽性細胞と陰性細胞を分離した後、半固形培地で培養して造血能を検討すると、TNFR 陽性細胞が陰性細胞と比べ、Mix コロニー形成能が高かった。さらに、ホルマウント蛍光免疫染色により、血液細胞塊において TNFR が発現していた (図4)。

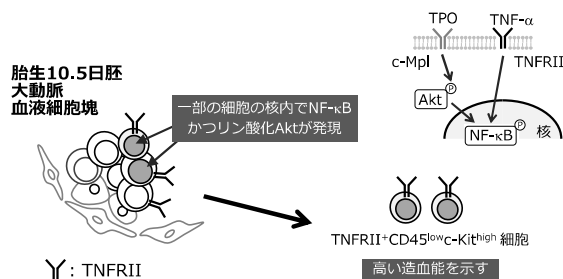


図4. 造血幹細胞が血液細胞塊の造血能維持および分化誘導におけるNF-κBシグナルの寄与

(4) 準備研究により DNA 脱メチル化に関与する TET1 (ten-eleven translocation methyl cytosine dioxygenase 1) が、Sox17 強制発現細胞に対する半定量的 RT-PCR の解析により、他の TET ファミリー分子に比べて発現が高いことを認めていた。そこで、未だ不明である AGM 領域の未分化血液細胞塊における TET1 の役割を明らかにするため、まず、in situ hybridization およびホルマウント免疫染色を行い、胎生中期大動脈の血管内皮細胞および血液細胞塊において TET1 が発現することを示した。また RT-PCR により、血液構成細胞である CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞において、その他の細胞集団より TET1 が高発現していることを示した。さらに、TET1 の発現と未分化性維持の関連を調べるために、Sox17 強制発現 CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞に TET1shRNA と対照 shRNA を導入した後培養し、shRNA 導入細胞について半固形培地で Mix コロニーを形成させ、TET1 ノックダウン時の造血能に対する影響を検討した。その結果、対照と比べ、TET1 をノックダウンした細胞は顆粒球・マクロファージ・赤血球の多系列血液細胞を含むコロニー形成能(多分化能)が低くなることを示した。TET1 のプロモーター領域には複数の Sox17 結合配列が存在し、Luciferase assay より、Sox17 によって活性化され TET1 の発現が誘導された。以上の結果より、転写因子 Sox17 により発現誘導された TET1 が、マウス胎生期大動脈内腔に出現する造血幹細胞を含む血液細胞塊の造血能の維持に寄与する可能性が示唆された (図5)。

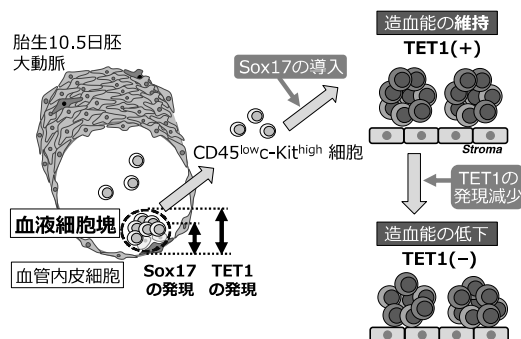


図5. マウスにおいて最初に造血幹細胞が生じる血液細胞塊における転写因子Sox17と脱メチル化に関わるTET1の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Kiyoka, Nobuhisa Ikuo, Harada Kaho, Takahashi Satomi, Anani Maha, Lickert Heiko, Kanai-Azuma Masami, Kanai Yoshiakira, Taga Tetsuya	4. 巻 365
2. 論文標題 Maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells in fetal intra-aortic hematopoietic clusters by the Sox17-Notch1-Hes1 axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 145 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.02.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tabu Kouichi, Liu Wenyu, Kosaku Akina, Terashima Kazuo, Murota Yoshitaka, Aimaitijiang Alapati, Nobuhisa Ikuo, Hide Takuichiro, Taga Tetsuya	4. 巻 38
2. 論文標題 Glioma stem cell (GSC)-derived autoschizis-like products confer GSC niche properties involving M1-like tumor-associated macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 921~935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Satomi, Nobuhisa Ikuo, Saito Kiyoka, Melig Gerel, Itabashi Ayumi, Harada Kaho, Osawa Mitsujiro, Endo Takahiro A, Iwama Atsushi, Taga Tetsuya	4. 巻 115
2. 論文標題 Sox17-mediated expression of adherent molecules is required for the maintenance of undifferentiated hematopoietic cluster formation in midgestation mouse embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 53-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2020.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Anani Maha, Nobuhisa Ikuo, and Taga Tetsuya	4. 巻 25
2. 論文標題 Sry-related high mobility group box 17 functions as a tumor suppressor by antagonizing the Wntless-related integration site pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 204~212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15430/JCP.2020.25.4.204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nobuhisa I, Saito K, and Taga T
2. 発表標題 Expression of TET family members in hematopoietic stem cell-containing clusters of the dorsal aorta in midgestation mouse embryo.
3. 学会等名 The 16th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東康哉、信久幾夫、齋藤清香、飯塚直樹、田賀哲也
2. 発表標題 成体型造血が出現する胎生期AGM 領域の未分化 血液細胞塊におけるエピジェネティック因子TET 1 の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚直樹、信久幾夫、齋藤清香、東康哉、田賀哲也
2. 発表標題 マウス胎生中期の大動脈内腔に存在する造血幹細胞 含有細胞塊の未分化状態維持におけるNF- B シグナルの寄与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤清香、信久幾夫、田賀哲也
2. 発表標題 マウス胎生中期AGM 領域におけるTet ファミリー遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Nobuhisa I, Saito K, Azuma K, Iizuka N, and Taga T
2 . 発表標題 The contribution of TET1 to the maintenance of the hematopoietic capacity in hematopoietic stem cell-containing clusters in the dorsal aorta in midgestation mouse embryo
3 . 学会等名 The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hagihara H, Shoji H, Kohno T, Hayata A, Tamada K, Hori K, Tatsukawa T, Shibutani M, Wakatsuki S, Hagino Y, Kasahara T, Numakawa T, Ohtabi H, Nobuhisa I, et al.
2 . 発表標題 Systematic analysis of brain pH and lactate levels in animal models: relationships and implications for behavioral outcomes
3 . 学会等名 The 21st Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Aimaitijiang A, Tabu K, Wang W, Nobuhisa I and Taga T.
2 . 発表標題 Enhanced erythropoiesis in bone marrow of C6 glioma-bearing mice
3 . 学会等名 The 17th Stem Cell Research Symposium
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tsukahara Y, Nobuhisa I, Saito K, Kanai Y, Kanai M, and Taga T
2 . 発表標題 The role of GIMAP family in the maintenance of hematopoietic capacity in hematopoietic cell cluster in midgestation mouse dorsal aorta
3 . 学会等名 第42回分子生物学会年会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhisa I, Saito K, Tsukahara R, Azuma K, Melig G, Itabashi A, Taga T
2. 発表標題 Involvement of TET1 in the maintenance of the hematopoietic capacity in hematopoietic cell clusters in the dorsal aorta in midgestation mouse embryo
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 信久幾夫, 塚原涼太, 齋藤清香, 金井克晃, 金井正美, 田賀哲也
2. 発表標題 胎生中期マウス内動脈内腔における転写因子Sox17を介したGIMAP6発現の造血能に対する寄与
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Melig G, Nobuhisa I, Kiyoka S, Tsukahara R, Itabashi A, Kanai Y, Kanai M, Taga T
2. 発表標題 Role of the Rasip1 in the hematopoiesis of HSC-containing hematopoietic cluster cells in midgestation of mouse embryos
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板橋歩未, 信久幾夫, 横居優貴, 齋藤清香, 塚原涼太, Melig Gerel, 田賀哲也
2. 発表標題 マウス胎仔肝臓・成体骨髄の造血幹細胞を含む細胞集団への転写因子Sox17強制発現による細胞塊形成と未分化性維持
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Melig G, Nobuhisa I, Kiyoka S, Tsukahara R, Itabashi A, Kanai Y, Kanai M, Taga T
2. 発表標題 Contribution of Rasip1 to the maintenance of hematopoietic activity of cluster-forming cells in midgestation mouse embryos
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板橋歩未、信久幾夫、横居優貴、齋藤清香、塚原涼太、Melig Gerel、田賀哲也
2. 発表標題 転写因子Sox17を導入した造血幹・前駆細胞の細胞塊形成能は発生の進行に伴い低下する
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------