

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06438

研究課題名(和文)造血幹細胞の形成過程におけるインテグリン由来シグナル伝達経路の役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the integrin-dependent signaling pathway in hematopoietic stem cell development.

研究代表者

小林 功 (Kobayashi, Isao)

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：30774757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程において造血幹細胞は血管との共通前駆細胞である血管芽細胞より形成されるが、その運命決定に関する詳しい分子機構には不明な点が多かった。本研究ではゼブラフィッシュを用いて血管芽細胞におけるインテグリンシグナル伝達経路の役割を調べ、造血幹細胞の形成に不可欠な分子としてsmall GTPaseの一種であるRhoHを見出した。さらにRhoHはZap70を抑制することで造血幹細胞の形成を促進するという新たな分子機構を明らかにした。本研究で明らかにしたインテグリン-RhoHに関するシグナル伝達機構は造血幹細胞の形成に極めて重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞をヒトiPS細胞から分化誘導することができれば、骨髄移植の代替法となるが、未だにiPS細胞から造血幹細胞への分化誘導は困難である。iPS細胞は初期胚の多能性細胞と類似の特徴を持つことから、胚発生期における造血幹細胞の形成過程を生体外で模倣できれば、iPS細胞から造血幹細胞を誘導することが可能になると考えられている。本研究で見出したRhoHは造血幹細胞の形成に重要な分子であることから、今後iPS細胞へ応用することで、造血幹細胞の分化誘導法の確立に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：During embryonic development, hematopoietic stem cells (HSCs) are formed from angioblasts, which are common progenitors of vascular endothelial cells. However, the detailed molecular mechanism of their fate determination has remained unclear. In this study, we investigated the role of integrin signaling pathways in angioblasts using zebrafish, and found that a small GTPase, RhoH, is essential for HSC formation. Furthermore, we revealed a novel molecular mechanism by which RhoH promotes HSC formation via suppressing Zap70. The signaling pathway of integrin-RhoH revealed in this study may play an important role in HSC formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：造血幹細胞 ゼブラフィッシュ 分化 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は全ての血液細胞を生産にわたって供給し続けることから、骨髄移植という形で白血病や再生不良性貧血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、骨髄移植には慢性的なドナー不足や、免疫拒絶による着生不全、移植片対宿主病などの問題があり、これらの血液疾患を骨髄移植によって根治的に治療するのは難しいのが現状である。一方、患者由来の細胞を用いて樹立することのできる人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は生体のほぼすべての細胞へ分化可能な万能細胞であり、患者由来の iPS 細胞から造血幹細胞を造ることができれば、骨髄移植における問題は払拭され、血液疾患の根治的な治療が可能になると考えられる。しかしながら、まだ多くの課題が残されており、最重要課題の一つとして、iPS 細胞から造血幹細胞への効率的な分化誘導法の確立が挙げられる。iPS 細胞は細胞の初期化 (リプログラミング) により、発生初期の多能性細胞のような特徴を有することから、iPS 細胞から造血幹細胞の分化過程は、個体発生における造血幹細胞の形成過程に類似すると考えられている。

発生過程において造血幹細胞は血管内皮細胞との共通前駆細胞である血管芽細胞より形成されることが知られている。しかしながら、血管芽細胞から造血幹細胞への運命決定に関わる詳しい分子機構については不明な点が多い。報告者はこれまでにゼブラフィッシュを用いて、インテグリンによるシグナルが造血幹細胞の形成に不可欠であることを見出していた。さらに、インテグリンの活性化に関わる細胞接着分子 Jam3b が血管芽細胞において、Lrrc15 という機能未知の細胞表面タンパクを制御することで造血幹細胞の形成を促進していることを明らかにしていた。すなわち、Lrrc15 が血管芽細胞においてインテグリンシグナルの標的分子として実質的な造血幹細胞への運命決定因子として機能している可能性があった。

## 2. 研究の目的

本研究ではインテグリンおよび Lrrc15 によるシグナルがどのように造血幹細胞の形成を制御するかについてゼブラフィッシュ胚を用いて検討することで、これまで困難であった造血幹細胞への運命決定メカニズムの理解に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

DN-itgb1b-mCherry によってインテグリンのシグナルを阻害した胚において Lrrc15 の発現を調べると共に、これらの胚に Lrrc15 を強制発現することによって造血幹細胞の形成が回復するかについて検討した。Lrrc15 変異胚における血管芽細胞のライブイメージング解析を行い、正常胚と比べ、血管芽細胞の形態、分布、細胞移動、分裂・増殖、および周囲組織 (体節、間葉系組織など) との相互作用に異常がないかを調べ、インテグリンおよび Lrrc15 がいつ、どのように造血幹細胞の形成に関わるのかを検討した。Lrrc15 の変異ゼブラフィッシュと正常なゼブラフィッシュの血管芽細胞を用いて RNA-seq 解析を行い、インテグリンの下流でどんな遺伝子が機能しているのかを調べた。上記の RNA-seq 解析によって見出された rhoh という遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いて rhoh 変異体を作成し、さらに rhoh mRNA を胚へ注入することで、rhoh の強制発現を行い、造血幹細胞の形成に関する RhoH の役割について調べた。さらに RhoH と相互作用する可能性のある Zap70 についての機能解析も RhoH と同様に行った。

## 4. 研究成果

DN-itgb1b-mCherry によってインテグリンのシグナルを阻害した胚において Lrrc15 の発現を調べたところ、Lrrc15 の発現は大幅に減少しており、同時に形成される造血幹細胞の数も減少していた。この DN-itgb1b-mCherry 発現胚へ Lrrc15 の強制発現を行ったところ、造血幹細胞の数が正常胚と同レベルにまで回復したことから、インテグリンの下流で Lrrc15 が造血幹細胞の形成に寄与することが示された。

次に、Lrrc15 変異胚および正常胚の血管芽細胞において血管芽細胞のライブイメージング解析を行い、Lrrc15 の欠損に伴って血管芽細胞の動態にどのような変化が見られるかについて検討を行った。ライブイメージングの結果、Lrrc15 変異胚における血管芽細胞は側板中胚葉から正中への移動の過程が遅れることが分かった。報告者はこれまでに、血管芽細胞の細胞移動には、血管芽細胞に発現する接着分子 Jam1a と体節表面の接着分子 Jam2a との相互作用が不可欠であることが報告しており (Kobayashi et al., Nature 2014)、Lrrc15 変異胚における血管芽細胞の細胞移動の遅れは Jam1a 欠損胚と非常に良く似ていた。Lrrc15 は構造解析から細胞外マトリックスと相互作用することが示唆されていたことから、血管芽細胞における Lrrc15 は体節表面のフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスと相互作用する可能性が考えられた。そこで、フィブロネクチンでコートした培養皿上に Lrrc15 変異胚および正常胚の血管芽細胞を播種したところ、正常胚に比べ、Lrrc15 変異胚では血管芽細胞のフィブロネクチンへの接着性に低下が見られた。これらのことから、Lrrc15 は側板中胚葉から正中への移動の課程で体節表面のフィブロネクチンと相互作用しているものと考えられた。

次に、Lrrc15 変異体および正常胚の血管芽細胞において RNA-seq による発現解析を行った。

その結果、Lrrc15 変異体の血管芽細胞では small GTPase に関する遺伝子群に発現減少が見られ、特に rhoh の発現が顕著に減少していた。RhoH は哺乳類の造血幹細胞にも発現することが報告されており、造血幹細胞の形成や機能維持に不可欠である可能性が考えられた。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ゼブラフィッシュ胚における RhoH の機能を阻害したところ、胚における造血幹細胞の数が減少した。一方、Lrrc15 変異胚において rhoh を強制発現すると造血幹細胞の形成が正常なレベルに回復した。これらのことから、Lrrc15 によるシグナルは rhoh の発現調節を行い、RhoH が造血幹細胞の形成に関与しているものと考えられた。さらに、RhoH は Zap70 と相互作用することが報告されていたことから、RhoH と Zap70 の機能解析を行った。Zap70 を抑制した胚においては造血幹細胞の数に増加が認められ、Lrrc15 および RhoH の抑制とは逆の表現型が認められた。そこで、RhoH と Zap70 の両方の機能を抑制したところ、RhoH の低下に伴って減少する造血幹細胞の数が正常近くまで回復した。このことは、RhoH は Zap70 の機能を抑制することで、造血幹細胞の形成を促進している可能性が示唆された。

このように報告者はインテグリンから始まるシグナル伝達経路は Lrrc15 の発現を制御することによって血管芽細胞の細胞移動に関与することを見出し、さらに Lrrc15 は rhoh の発現を制御することで、Zap70 を抑制し、造血幹細胞の形成を促進することが示された。以上の成果は、今後 iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するための基盤となる知見を提供しており、今後のさらなる発展が大いに期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kosuke Kuroda, Tetsuo Komori, Kojiro Ishibashi, Takuya Uto, Isao Kobayashi, Riki Kadokawa, Yui Kato, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi, Eishu Hirata	4. 巻 3
2. 論文標題 Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-00409-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jingjing Kobayashi-Sun, Nobuo Suzuki, Atsuhiko Hattori, Masaaki Yamaguchi, Isao Kobayashi	4. 巻 530
2. 論文標題 Melatonin suppresses both osteoblast and osteoclast differentiation through repression of epidermal Erk signaling in the zebrafish scale	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 644-650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.075	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 Jingjing Kobayashi-Sun, Shiori Yamamori, Mao Kondo, Junpei Kuroda, Mika Ikegame, Nobuo Suzuki, Kei-ichiro Kitamura, Atsuhiko Hattori, Masaaki Yamaguchi, Isao Kobayashi	4. 巻 3
2. 論文標題 Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0925-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Hirakawa Y, Ouchi M, Yasuda K, Kamei H, Fukuhara S, Yamaguchi M.	4. 巻 147
2. 論文標題 Dual role of Jam3b in early hematopoietic and vascular development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 181040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.181040.	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 Yukino Wada, Hikaru Tsukatani, Chihiro Kuroda, Yurika Miyazaki, Miku Otoshi, Isao Kobayashi	4. 巻 149
2. 論文標題 Jagged 2b induces intercellular signaling within somites to establish hematopoietic stem cell fate in zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200339	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 Katsuhiko Konno, Jingjing Kobayashi-Sun, Fumio Arai, Isao Kobayashi, Daisuke Sugiyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Hematopoietic Cell Isolation by Antibody-Free Flow Cytometry in the Zebrafish Embryo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Mao Kondo, Shiri Yamamori, Isao Kobayashi
2. 発表標題 Sinusoidal endothelium is a key component of hematopoietic niches in the zebrafish kidney
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiori Yamamori, Koki Kimura, Mao Kondo, Makoto Taniguchi, Isao Kobayashi
2. 発表標題 Developing hematopoietic stem cells acquire adaptability to the final hematopoietic niche
3. 学会等名 第26回小型魚類研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukino Wada, Isao Kobayashi
2. 発表標題 Jagged-2b triggers intercellular signaling in the somite to establish the hematopoietic stem cell fate in zebrafish
3. 学会等名 The 50th Annual Scientific Meeting of the ISEH-Society for Hematology and Stem Cells
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田涼平, 大内円, 小林静静, 小林功
2. 発表標題 母性由来Abcg2aは背側化を抑制して造血・血管発生を促進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村昂暉, 山森汐莉, 近藤真央, 小林功
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおいて古典的Wntシグナルの阻害は造血幹細胞を維持する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田友紀乃, 塚谷光, 黒田千央, 宮崎由里圭, 小林功
2. 発表標題 Jagged-2bは体節内細胞間シグナル伝達を介して造血幹細胞の発生を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------