

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390270

研究課題名（和文）生態学的適所における造血幹細胞分裂の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular analysis of hematopoietic stem cell division in the niche

研究代表者

高倉 伸幸（TAKAKURA NOBUYUKI）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80291954

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞の自己複製に関与する Tie2 受容体に関わる分子の機能解析を行った。Tie2 活性化に伴い発現の制御される DNA 複製誘導因子 PSF1 は、プロモーター制御によって無機能的な PSF1 が転写され幹細胞分裂を負に制御する可能性が示唆された。造血幹細胞は Galectin-3 を発現するが、この Galectin-3 は血管新生を誘導して血管ニッチ形成に関与することが示唆された。さらに Tie2 とともに造血幹細胞に発現する Tie1 はその活性化によって、幹細胞の分裂を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this project, we have analyzed the function of molecules associating with receptor tyrosine kinase Tie2 expressed on hematopoietic stem cells (HSCs). The functional or non-functional expression of PSF1, a member of GINS complex regulating DNA replication and self-renewal of HSCs, is alternatively regulated by the different translational initiation sites. It has been suggested that galectin-3 expressed on HSCs induces angiogenesis resulting in the induction of vascular niche formation for HSCs. Tie1 negatively regulated Tie2 mediated ERK activation through p38 activation. This downstream cascade of Tie1 may be relevant to the dormancy of HSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：再生医学、発生分化

1. 研究開始当初の背景

骨髄における造血幹細胞の生態学的適所の解明が精力的にすすめられてきており、造血幹細胞の休眠を誘導して、未分化性を維持する領域は骨髄中でも骨梁領域にあり、また骨に密接に接着している骨芽細胞がそのニッチ構成細胞であると報告されてきた。一方、

我々は造血幹細胞の発生的解析により、造血幹細胞の初期発生・増殖領域は臍腸間膜動脈であり、さらに胎児肝内でも血管領域で造血幹細胞の増殖が生じていることを解明してきた。このことより申請者らは造血幹細胞の増殖における生態学的適所として血管ニッチの概念を提唱してきた。さらに最近の報

告では、骨髄内において洞様血管近傍に未分化な表現型を示す造血幹細胞が存在することが明らかとされてきた。このように造血幹細胞の局在に関する知見は得られてきているものの、いかに造血幹細胞は骨髄内で未分化性を維持し、自己複製を含めた細胞分裂および細胞周期を制御しているのかに関する分子機構は依然として明確ではない。我々は従来より、造血幹細胞による血管新生の制御機構を詳細に解析してきており、血管ニッチの形成を造血幹細胞が自ら誘導する可能性について研究を進めてきた。これまでの結果、造血幹細胞が分泌する **Angiopoietin-1** (**Tie2** の結合因子; 以下 **Ang1** と略す) により造血幹細胞の近傍で血管網の形成を誘導する機構を明らかにし、さらに造血幹細胞は、血管形成過程において、血管透過性を抑制し、また壁細胞様の細胞に一時的に分化して安定な血管構造の維持機構に関与することも明らかにしてきた。また、血管内皮細胞と造血幹細胞に共通に発現している **Tie2** を恒常的に活性化させた遺伝子改変マウスでは、造血幹細胞および内皮細胞の両者の休眠状態により、造血および血管形成ともに抑制されることが判明している。**Tie2** は造血幹細胞の休眠状態を誘導することが示唆されてきたが、どのような分子メカニズムで休眠化を誘導するものかは不明であった。また **Tie2** の相同遺伝子である **Tie1** も造血幹細胞において発現が認められるが、この **Tie1** の機能においても不明点が多い。

2. 研究の目的

Tie2 の下流分子の網羅的解析により得られた **PSF1** は、酵母では DNA 複製に必須の分子である。マウスでは未分化幹細胞系列に一樣に発現して、遺伝子破壊マウスでは内部細胞塊の増殖抑制にて胎性致死となる。ヘテロ欠損マウスは、5-FU 投与によって、骨髄抑制から回復するのが遅延し、造血幹細胞増殖が生じず致死となる。**Mac1**^{lo} の分裂期の造血幹細胞に **PSF1** の発現が高く、その多くが休眠期に入るとされている **Mac1** 陰性の造血幹細胞分画において **PSF1** の発現は低いことから、**PSF1** は急速な増殖が必要とされる状況において機能すると考えられた。さらに、**PSF1** と複合体を形成することが酵母で示されていた **SLD5** に関して、マウスの相同遺伝子を単離し、**SLD5** と **PSF1** はマウスにおいても複合体を形成して細胞周期において **PSF1** と同調する発現と機能を示すことが判明した。また、**Tie2** 活性によりその発現が上昇する **Galectin-3** は、造血幹細胞の細胞周期をきわめて遅延化させることから、**Tie2** の活性化による幹細胞の細胞周期の遅延化に **Galectin-3** が関与すると結論された。骨髄内洞様血管近傍は血流が滞り、最も低酸素であることが示

唆されている。血管内皮細胞や造血幹細胞に発現する **Tie2** は、正酸素では活性化状態を維持し、低酸素では不活性化となることが血管内皮細胞では解明されてきた。**Tie2** の活性化から一時的な不活性化状態が、**PSF1** の一過性発現上昇により幹細胞分裂を誘導していると考えられ、血管ニッチ内においてどのように **Tie2** の活性化が制御されているのかは、これら **PSF1** や **Galectin-3** の発現とともに解析することにより明確に定義することができると考えられる。血管内皮細胞は低酸素では **Ang1** に対するアンタゴニストである **Ang2** の分泌が亢進すること、および造血幹細胞分画内では 30-40% の造血幹細胞が **Ang1** を分泌していることから、**Tie2** の正および負の活性化が血管ニッチ領域で造血幹細胞の細胞周期を制御していると考えられる。また、**Tie2** の相同遺伝子である **Tie1** は、**Tie2** とともに活性化を受けて、**Tie2** の細胞内シグナルに影響を与えることが示唆されてきた。そこで、本研究では 1) **PSF1** の発現制御機構の解明による、造血幹細胞の細胞分裂機構の解明、および 2) **Galectin-3** の血管ニッチ形成における役割を明らかにする、3) また **Tie2** とともに造血幹細胞に発現する **Tie1** について細胞にどのようなシグナルを与えることで、**Tie2** と関わるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) **PSF1** 発現制御機構の解明

・これまで、精巣を用いた解析では、精子幹細胞では完全長の **PSF1** 蛋白の発現が認められるのに対して、それより分化した精巣細胞では短い **PSF1** が転写されており、**PSF1** が幹細胞特有に細胞増殖を誘導する機構に関与していることが示唆されてきた。**CD34** 陰性の休眠期の造血幹細胞と **CD34** 陽性の細胞周期の回転している造血幹細胞を用いて 5' LACE 法により、**PSF1** 遺伝子の転写開始点の相違を観察する。

・**PSF1** のプロモータ活性は、1st Exon 5kb 上流遺伝子領域で制御されることを明らかにした。この領域には転写因子 **AML1/Runx1**, **tal-1/scl**, **HES1**, **Bmi-1** などの結合領域が、豊富に含まれていることが判明している。実際に、**PSF1** の発現に関わるプロモーター領域をプロモーターの突然変異体を作製して解析し、またその領域に結合する可能性のある転写因子を同定する。

2) **Galectin-3** の血管ニッチ形成における機能的意義の解明

Galectin-3 のノックアウトマウスでは、出生後とくに大きな血管異常は観察されていない。そこで成体マウスに血管新生を誘導する方法において、**Galectin-3** の欠損がいかに血管形成に影響を与えるかを検討する。具体的

な方法として、マウス皮下に腫瘍細胞 (B16メラノーマ細胞) を移植し、腫瘍血管新生においてレシビエントの Galectin-3 の有無がどのように影響を与えるかを解析する。

3) Tie1 シグナルの解明

Tie1 の結合因子は同定されていない。しかし、最近 Tie2 が Ang1 により活性化すると Tie1 の Tie2 近傍への動員が誘導されて Tie1 がリン酸化されるということが報告されてきた。Tie2 および Tie1 はともに造血幹細胞に発現しているが、Tie2 の活性化による Tie1 の活性がどのような影響を及ぼすのかは不明である。そこで、まず Tie1 の活性化単独でどのような細胞内シグナルが入るのかを観察するために、Tie2 が過剰発現系ではリガンド非依存的に 2 量体形成によるリン酸化が誘導されることを利用する。Tie1 は過剰発現させるだけではリン酸化が誘導できない。そこで、Tie2 変異体の作製により、Tie2 同士が 2 量体形成が抑制されるアミノ酸配列を同定する。Tie2 と Tie1 のアミノ酸配列を比較し、2 量体形成領域が Tie1 に存在しなければ、2 量体形成配列を Tie1 に挿入し、その遺伝子の過剰発現により、リガンドが存在しなくても Tie1 が自己リン酸化する受容体の作製を試みる。この受容体を用いて、細胞内シグナルを解明して、そのシグナルが Tie2 活性化にどのように影響を与えるかを解析する。

4. 研究成果

1) PSF1 発現制御機構の解明

CD34 陰性～弱陽性の休眠中の造血幹細胞では、主に短い PSF1 が産生されており、CD34 陽性の増殖期の造血幹細胞では、完全長の PSF1 の産生が観察された。このことは PSF1 遺伝子のプロモーター領域において、PSF1 の発現をコントロールすることにより、短い PSF1 の産生により造血幹細胞の DNA 複製を抑制して幹細胞の細胞周期を負に制御していることが予想された。そこで、PSF1 遺伝子のプロモーター領域を解析したところ、1 番目のエクソンより 0～5 Kb 上流の領域内では、PSF1 のプロモーター活性は 0～2 Kb の領域が必須であり、2～5Kb の領域はプロモーター活性に影響を与えなかった。興味深いことに、造血幹細胞の細胞周期に関与することが予想されている、E2F の結合領域が、5' 上流領域に存在し、この領域において E2F が結合することにより、PSF1 の完全長の遺伝子発現が制御されている可能性が示唆された。

そこで、この領域においては特に E2F1-3 の予測結合領域が存在したため、これらの E2F1-3 の実際の結合を、ChIP 解析を行い、E2F1 の結合が示唆された。次いで、E2F1 分子の遺伝子ノックダウンを行い、PSF1 遺伝子発現が観察される colon26 大腸がん細胞、B16 メラノ

ーマ細胞および、NIH3T3 線維芽細胞株において細胞増殖を解析した。しかし、E2F1 ノックダウン単独では細胞増殖に影響がみられなかった。以上から PSF1 は様々な E2F ファミリー因子により発現が誘導されている可能性があり、E2F1 発現が抑制されても、その他の E2F が相補的に PSF1 の遺伝子転写を制御する可能性が示唆された。

2) Galectin-3 の血管ニッチ形成における機能的意義の解明

Galectin-3 ノックアウトマウスと野生型マウスにおいての腫瘍増大を観察すると、Galectin-3 ノックアウトマウスに形成された腫瘍の方が増大傾向が強いことが判明した。腫瘍内部の血管を観察すると、野生型マウスに形成された腫瘍に比べ、血管密度が高いことが判明した。Galectin-3 の欠損による血管新生の亢進の原因を解析したところ、Galectin-3 ノックアウトマウスに形成された腫瘍内部には血管新生を誘導することで知られるマクロファージの侵入が多いことが判明した。腫瘍細胞には Galectin-3 の産生が高いことから、Galectin-3 ノックアウトマウスの宿主内では腫瘍にのみ Galectin-3 が高く存在することになる。マクロファージは Galectin-3 により濃度依存的に遊走活性が高まることから、今回観察されたマクロファージの腫瘍内への亢進した侵入は Galectin-3 濃度勾配によると考えられた。造血幹細胞機能として本解析を考察すると、造血幹細胞に発現する Galectin-3 はマクロファージ等の血管形成アクセサリ細胞を幹細胞周辺に動員することで、血管形成に関与することが示唆された。

3) Tie1 シグナルの解明

Tie2 の 2 量体化を容易に可視化するために、bi-molecular fluorescent complementation (BiFC) 法を用いた。Tie2 を C 末端側から順次 Tie1 のアミノ酸に変換することで、Tie2 同士が 2 量体を形成できなくなる領域を見いだした (YIA 領域)。YIA 領域は、Tie2 の過剰発現時に Tie2 の 2 量体化を誘導して自己リン酸化に関わると考え、Tie1 の相同領域を YIA に変換させた変異 Tie1 [Tie1(YIA)] を作製した。この Tie1(YIA) を過剰発現させると予想通り、Tie1 同士が 2 量体を形成して自己リン酸化することが確認された。そこで、この Tie1 活性化のシグナルを解析したところ p38 のリン酸化が誘導されることを見いだした。Tie2 単独でリン酸化が誘導される際には、細胞内で AKT および ERK のリン酸化が誘導されるが、Tie2、Tie1 がともに活性化が誘導されると ERK 活性化が抑制されることが判明した。ここで p38 の阻害を行うと、ERK の活性化が回復した。つまり、Tie2 の活性化

による細胞増殖のシグナルは、Tie1 活性化により抑制がかかるのではないかと考えられる。このシグナルが造血幹細胞でどのように関わるのかは今後の課題である。

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 31 件)

1. Takakura N. Guest editorial: mutual relationship between vascular biology and hematology. *Int J Hematol.* 95, 117-118, 2012. (査読有り)
DOI : 10.1007/s12185-012-1014-0
2. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J.* 31, 842-855, 2011. (査読有り)
DOI : 10.1038/emboj.2011.465.
3. Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T, Mochizuki N, Saya H, Takakura N. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res.* 70, 1215-1224, 2010. (査読有り)
4. Kidoya H, Naito H, and Takakura N. Apelin induces enlarged and non-leaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood* 115, 3166-3174, 2010. (査読有り)
5. Takakura N. and Kidoya H. Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells : involvement of apelin/APJ and Angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation. *Thromb Haemost.* 101:999-1005, 2009. (査読有り)
6. Naito H, Kidoya H, Sato Y, and Takakura N. Induction and expression of anti-angiogenic vasohibins in the hematopoietic stem/progenitor cell population. *J Biochem.* 145: 653-659, 2009. (査読有り)
7. Ueno M, Itoh M, Sugihara K, Asano M, and Takakura N. Both alleles of *PSF1* are

required for maintenance of pool size of immature hematopoietic cells and acute bone marrow regeneration. *Blood* 113: 555-562, 2009. (査読有り)

8. Han Y, Ueno M, Nagahama Y, and Takakura N. Identification and characterization of stem cell-specific transcription of PSF1 in spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 380: 609-613, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 32 件)

1. Nobuyuki Takakura: Impact of blood vessel maturation on vascular diseases. University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Integrative Membrane Biology and Signal Transduction Medicine. Dec. 14, 2011, Kobe, Japan (invited)
2. Nobuyuki Takakura: Identification of endothelial stem cell population in the pre-existing blood vessels. The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, December 9, 2011, Tokyo, Japan (invited)
3. 高倉伸幸: 血管新生における血管成熟化の意義、第63回日本細胞生物学会、2011年6月29日、北海道、(招待講演)
4. 高倉伸幸: 造血系と血管系における幹細胞の休眠化、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18-19日(18日)、広島
5. 高倉伸幸: Stem Cell systems in the cancer microenvironment、第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸
6. 高倉伸幸: 血管新生の基礎と臨床的進歩 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
7. Nobuyuki Takakura: Maturation of Blood Vessels by Hematopoietic Stem Cells. The 9th International Conference on Angiogenesis: Basic Science and Clinical Applications, June 22-26, 2008. Conference

and Cultural Center of the University of
Patras, Patras, Greece

8. Nobuyuki Takakura: Maturation of Blood
Vessels by Hematopoietic Stem Cells. The
15th International Vascular Biology Meeting,
June 1-5, 2008. Sydney, Australia

[その他]
ホームページ等
<http://st.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 伸幸 (TAKAKURA NOBUYUKI)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80291954