

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860799

研究課題名(和文)造血幹細胞におけるTieシグナルの解析とTie1のリガンド同定

研究課題名(英文) Investigation of Tie1 signaling in hematopoietic stem cells

## 研究代表者

百瀬 暖佳 (Momose, Haruka)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70415488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は血液系の幹細胞であり、血液システムの維持にとって極めて重要であるが、その機能を制御する分子機構についてはあまり理解が進んでいない。本研究では、造血幹細胞に高く発現しているオーファン受容体Tie1に着目し、Tie1恒常発現細胞を作製した。Tie1のキナーゼ活性は細胞増殖やリガンド候補分子の発現に影響を与えなかったものの、リガンド候補分子の添加によってTie1がトランス活性化される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells (HSCs) possess self-renewal and pluripotential capacity for the maintenance of whole blood system. The regulation of HSCs is very important for blood homeostasis, however, the precise molecular mechanisms regulating HSCs remain elusive. In this work, I investigated about an orphan receptor Tie1. The forced expression of Tie1 had no effect on the cell growth and the gene expression patterns. Interestingly, some molecules induced the phosphorylation of Tie1, indicating the trans-activation of Tie1 in hematopoietic cells.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、全ての血球細胞へ分化する多分化能と、未分化性を保持したまま増殖を続ける自己複製能をもった幹細胞であり、生涯に渡って血球細胞を供給し続ける。胎児期に AGM 領域で発生した造血幹細胞は、胎児肝臓を経て、出生の前後に骨髄へ到達する。その後、造血幹細胞は骨髄内に留まり、骨髄が成体における造血の場となる。造血幹細胞の機能分子としては、Flt3、c-kit をはじめ、数多くの受容体型チロシンキナーゼが同定され、様々な解析がなされている。

Tie1、Tie2 は Tie ファミリーを形成する受容体型チロシンキナーゼであり、血管内皮細胞に加え、血液系では造血幹細胞に高く発現している。Tie2 ではリガンド Angiopoietin ファミリーが同定され、血管、およびリンパ管形成の領域において積極的に研究が進められている。現在までに、可溶性 Tie2 が癌の抗血管新生因子として有用であること、Angiopoietin が血管疾患における血管新生因子や造血促進因子として働くこと等が次々と明らかにされてきた。造血システムでは、Tie2 および Ang1 が成体の骨髄内で造血幹細胞の未分化性維持に重要であること、Tie2/Ang1 が骨髄内の微小空間ニッチにおいて、造血幹細胞を維持するのに重要な役割を担っていることが示されている。

Angiopoietin ファミリーをリガンドとする Tie2 と異なり、Tie1 はリガンドが未同定のオーファン受容体である。Tie1 の発現パターンは Tie2 とほぼ重なっており、血管内皮細胞株では Tie1 は Tie2 とヘテロダイマーを形成する。Tie1 は Tie2 と会合することで Tie2/Ang1 シグナルを正または負に調節する調節因子であると考えられる向きが多いが、ノックアウトマウスの表現型解析の相違から、Tie1 が Tie2 とは異なる独自の機能を持っている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

造血幹細胞は未分化性と多分化能を兼ね備えた血球系の幹細胞である。造血幹細胞の機能分子として同定された受容体型チロシンキナーゼ Tie2 は成体において造血幹細胞の維持に関与している。一方 Tie2 と Tie ファミリーを形成している Tie1 も Tie2 同様に造血幹細胞の機能維持に関与していると考えられているが、ノックアウトマウスの表現型の違いから独自の機能も有している事が示唆される。

上述の通り、Tie1 は Tie2 とヘテロダイマーを形成することが報告されているが、マウス造血幹細胞画分(CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>)における Tie1 の発現量は Tie2 の約 10 倍であり(リアルタイム PCR 法)、Tie1 がホモダイマーを形成して Tie2 非依存的なシグナル伝達を担っている可能性が考えられた。本研究ではオーファン受容体である Tie1 のリガンドを探索すると共に、Tie1 の機能解明を通し

て血液細胞の機能制御に関わる分子基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Tie1 恒常発現細胞の作製

実験に用いた血球系のヒト細胞株は全て JCRB 細胞バンクより購入した。

ヒト血球細胞より調整した total RNA を用いて cDNA を合成した。これをテンプレートとして特異的プライマーによりヒト Tie1 の全長 cDNA を単離し、シーケンス解析によって配列を確認した。これを pEF1 ベクターに挿入し、PvuI 消化によって線状化させたものをヒト血液細胞株に遺伝子導入した。G418 処理を行い、Tie1 恒常発現細胞を作製した。

### (2) Tie1 との相互作用、Tie1 活性化の検討

相互作用の検討については、まずリガンド候補分子を PVDF 膜にプロットし、可溶性 Tie1 でプロット膜をインキュベーションした後、HRP 標識された protein A によってシグナルの検出を行った。また、リガンド候補分子と可溶性 Tie1 を混合した後 protein A ビーズによって免疫沈降を行い、SDS-PAGE でたん白質を分離した後、リガンド候補分子に対する抗体を用いて複合体形成の有無をウェスタンブロット法により解析した。

Tie1 活性化については、リガンド候補分子のリコンビナント蛋白質を準備し、これを Tie1 恒常発現細胞に様々な濃度で 0~60 分間処理し、可溶化した。Tie1 抗体によって Tie1 を免疫沈降した後、SDS-PAGE でたん白質を分離し、リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット法により Tie1 のチロシンリン酸化状態を検討した。

### (3) 細胞増殖率、および遺伝子発現解析

Tie1 恒常発現細胞を 96 ウェルプレートにまき、1 日毎にトリパンブルー染色、および MTT 法を用いて細胞の生存率と増殖率を検討した。また、Tie1 恒常発現細胞から調整した total RNA を用いて cDNA を合成し、特異的プライマーによってリガンド候補分子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 可溶性 Tie1 とリガンド候補分子の相互作用の検討

リガンド候補分子と Tie1 の相互作用を検討するため、Tie1 の細胞外ドメインと IgG Fc 領域の融合蛋白質(可溶性 Tie1)を準備した。リガンド候補分子を膜上にプロットし、可溶性 Tie1 を用いてオーバーレイアッセイを行ったが、キャリアとして用いている BSA の非特異反応により、陽性のスポットを検出することは困難であった。そこで、可溶性 Tie1 を用いてリガンド候補分子の免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法による相互作用の

検出を行ったが、明確なバンドは認められなかった。

### (2) 内在性Tie1発現細胞に対するリガンド候補分子の添加効果

生理的リガンドは必ずしも受容体と安定な複合体を形成する訳ではない。そこで、リガンド候補分子のTie1活性化能を検討するため、内在性Tie1を発現しているヒト血球細胞を準備した。リアルタイムPCR法による解析では、Tie1の発現量はTie2の250倍であり、Tie1の機能解析に適していると考えられた。これにTie1のリガンド候補分子を添加し、Tie1の自己リン酸化の有無を検討したところ、処理時間を長くするとTie1のチロシンリン酸化が低下する現象が見出された。リガンド候補分子の添加の有無に関わらず、インキュベーションを行うことによりTie1の発現量が低下したことから、Tie1のチロシンリン酸化の低下はTie1の発現量の低下が原因と考えられた。

血管内皮細胞においては、刺激依存的に $\gamma$ -secretaseによるTie1の細胞外ドメイン切断が報告されている。血球細胞におけるTie1の発現量低下にも $\gamma$ -secretaseが関与している可能性を考え、 $\gamma$ -secretase阻害剤の共存下で同様の検討を行った。しかしながらTie1の発現量の低下に改善は見られず、Tie1の不安定性の要因は $\gamma$ -secretaseによる細胞外ドメインの切断以外の要因に起因すると考えられた。

### (3) 細胞増殖に対するTie1の効果

内在性Tie1発現細胞を用いた検討が困難であったため、ヒトTie1のcDNAをクローニングし、Tie1恒常発現細胞を作製した。チロシンキナーゼの活性化型、不活性化型についてはTie2変異体の報告を参考にして作製し、Tie1のチロシンリン酸化をウェスタンブロットで確認した。野生型、および活性化型ではTie1の自己リン酸化が認められ、不活性化型ではTie1のチロシンリン酸化が消失することを確認した ( Fig.1 )。

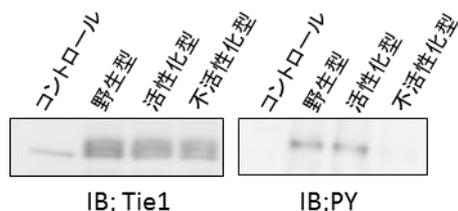


Fig.1 Tie1変異体の作製

Tie1が細胞増殖に与える影響について検討したところ、野生型、チロシンキナーゼの活性化型、不活性化型共に同様の増殖率を示した。細胞増殖に対するTie1の影響は認められなかった ( Fig.2 )。

Tie1、およびTie1変異体の過剰発現によりTie1リガンドの発現量が変動する可能性を考え、Tie1恒常発現細胞において複数のリガンド候補分子の発現量を解析した。その結果、Tie1の過剰発現によって顕著に発現変動する候補分子は見出されなかった ( data not shown )。

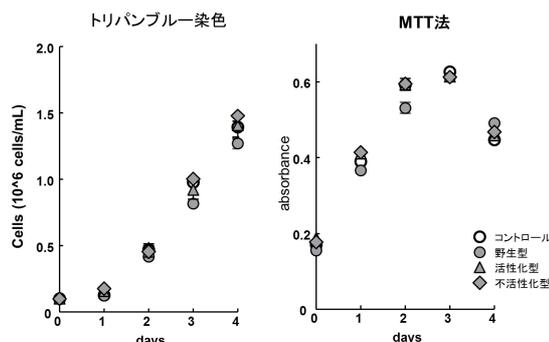


Fig.2 Tie1が細胞増殖に与える影響

### (4) Tie1恒常発現細胞におけるリガンド候補分子の添加効果

Tie1恒常発現細胞を用いて、pervanadate処理の効果を検討したところ、アダプター蛋白質との相互作用が見出され、Tie1がチロシンリン酸化経路を介して何らかのシグナル伝達を担っている可能性が示唆された。そこで、Tie1恒常発現細胞に対するリガンド候補分子の添加効果を検討した。その結果、血管内皮細胞において報告されているような、刺激依存的な細胞膜貫通領域近傍における切断は認められなかった。一方、Tie1のチロシンリン酸化については、野生型に対して著明な効果は認められなかったものの、活性化型や不活性化型においてチロシンリン酸化が亢進する候補分子が見出された。Tie1のチロシンリン酸化の亢進は中和実験によって抑制されたことから、Tie1を直接活性化できる生理的リガンドではないものの、何らかの因子を介してTie1をトランスに活性化できる因子である可能性が示唆された。

## 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 0 件)

[ 学会発表 ] (計 0 件)

[ 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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

百瀬 暖佳 (MOMOSE HARUKA)  
国立感染症研究所・血液・安全性研究部・  
主任研究官  
研究者番号：70415488