

解説

造血幹細胞がつくられる新たなしくみ

福原 茂朋 盧 承湜 小栗 エリ 山本 清威 石井 智裕

Key words: 造血幹細胞, 造血的内皮細胞, Rap1, インテグリン, ゼブラフィッシュ

生涯にわたって血球細胞を産生する造血幹細胞は、背側大動脈の腹側に位置する血管内皮細胞からつくられる。これら造血能を有する内皮細胞を造血的内皮細胞といい、造血内皮細胞が血管壁から剥離し造血幹細胞へ生まれ変わる現象を内皮造血転換という。造血的内皮細胞と血管内皮細胞は共に中胚葉に由来し、共通の起源を持つと考えられているが、これら細胞の発生メカニズムについては不明な点が多く残されている。本稿では、造血系の発生プロセスについて概説すると共に、造血的内皮細胞の運命決定機構について筆者らの知見を含め紹介する。

I 脊椎動物における造血発生

脊椎動物における造血は、発生初期に胎児体外の卵黄囊で起こる一次造血から始まる。卵黄囊では、中胚葉に由来する血球血管芽細胞(hemangioblast)が、血球細胞と血管内皮細胞に分化し、内皮細胞が血球細胞を取り囲む血島と呼ばれるクラスターを形成する。一次造血では、主に胚型赤血球がつくられるが、この赤血球は成体型の赤血球とは異なり、成熟しても脱核せず、胎児型グロビン遺伝子を発現する。一次造血では、赤血球に加え、巨核球やマクロファージが産生されることが知られている。

その後、卵黄囊では、血管内皮細胞より多分化

能を有する赤血球骨髓系前駆細胞が分化し、脳ミクログリアや皮膚ランゲルハンス細胞を含む組織常在性のマクロファージを産生すると共に、赤血球や巨核球にも分化することが知られている¹⁾。興味深いことに、最近、赤血球骨髓系前駆細胞が血管形成にも関与することが報告された。これまで、血管の増生は、発生初期につくられた血管内皮細胞の増殖にのみ依存すると考えられてきたが、それに加え赤血球骨髓系前駆細胞から分化した血管内皮細胞の血管への取り込みが血管構築に寄与することが報告された²⁾。

二次造血では、生涯にわたって血球細胞を産生する造血幹細胞がつくられる。造血幹細胞は、すべての血球細胞への分化能を保持した幹細胞であり、胚の大動脈・性腺・中腎(aorta-gonad-mesonephros region; AGM)と呼ばれる領域から発生することが知られていたが、その後の研究から、背側大動脈の腹側に位置する血管内皮細胞が、血管壁から剥離することで造血幹細胞に生まれ変わることが明らかとなった^{3,4)}。この造血幹細胞への分化能を有する血管内皮細胞を造血的内皮細胞(hemogenic endothelium)と呼ぶ。造血的内皮細胞は、背側大動脈だけでなく、臍動脈や卵黄動脈、胎盤血管にも存在し、造血幹細胞を産生することが報告されている⁵⁾。また、頭部の動脈血管や心内膜からも造血幹細胞が産生されるとの

A novel mechanism underlying hematopoietic stem cell development

Fukuhara Shigetomo, Rho Seung-Sik, Oguri-Nakamura Eri, Yamamoto Kiyotake, Ishii Tomohiro: 日本医科大学先端医学研究所病態解析学部門 (〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5)

0370-9531/08/¥500/ 論文/JCOPY

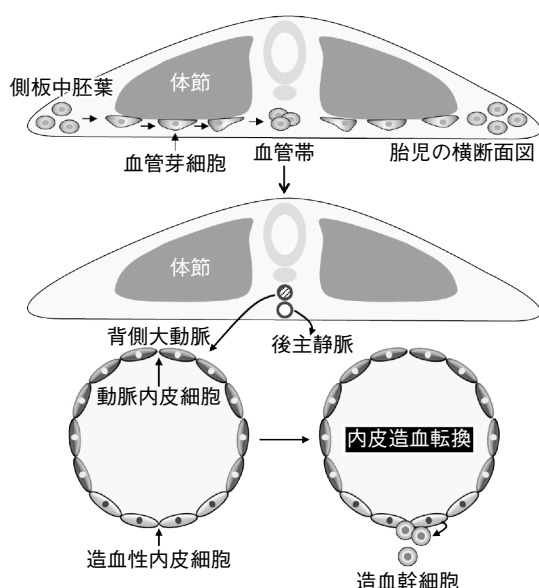


図 1 ゼブラフィッシュにおける造血幹細胞の発生機序

報告もある。造血性内皮細胞から発生した造血幹細胞は、血流を介して胎児肝に移動し一時的に造血を行うが、その後、骨髓に移動・定着し、生涯にわたって血液細胞を産生する。

ゼブラフィッシュは、臓器の発生や構造がヒトと類似した脊椎動物である。また、体外で受精し、発生が早く、胚が透明であるため、生きたまま形態形成を観察することが可能である。このような理由から、近年、ゼブラフィッシュは生命医学研究に有用なモデル動物として利用されてきた。特に、ゼブラフィッシュにおける血管系・造血系の発生機構の多くは哺乳動物でも保存されており、ゼブラフィッシュを用いた解析により、これまで多くの重要な発見がなされてきた。ゼブラフィッシュは、卵黄嚢を持たないため、一次造血は哺乳動物とは異なった中胚葉組織で起こる。胚型赤血球は後方側板中胚葉から発生し、マクロファージなどの骨髓系細胞は前方側板中胚葉から産生される。一方、二次造血では、哺乳動物と同様に、背側大動脈の腹側に位置する造血性内皮細胞が血管壁から剝離することで造血幹細胞がえられる(図1)。その後、造血幹細胞は血流を介して尾部の caudal hematopoietic tissue (CHT) と呼ばれる造血組織に移動し、最終的には腎臓の髄質

に移動・定着し、生涯にわたって血球細胞を産生する。このため、ゼブラフィッシュにおける造血の場である CHT は、哺乳動物における胎児肝に、腎髄質は骨髓に相当すると考えられる。

II 造血性内皮細胞から造血幹細胞が つくられる“内皮造血転換”

背側大動脈の腹側に位置する造血性内皮細胞が、血管壁から剝離し、造血幹細胞へと生まれ変わるプロセスを「内皮造血転換(endothelial-to-hematopoietic transition)」と呼ぶ(図1)。以前から、造血細胞が背側大動脈の内腔面でクラスターを形成することが知られており、血管内皮細胞が造血幹細胞の起源である可能性が考えられてきた。この仮説は、ゼブラフィッシュを用いた蛍光イメージングにより証明された。血管内皮細胞と造血幹細胞を異なった蛍光タンパク質で標識したゼブラフィッシュ胚をライブイメージングすることにより、背側大動脈の腹側に造血性内皮細胞が出現し、血管壁から剝離することで球状の造血幹細胞がえられることが示された^{6,7)}。更に、マウス胚から取り出した AGM 外植片のライブイメージングにより、哺乳動物において背側大動脈から造血幹細胞が発生する様子が確認された⁸⁾。なお、ゼブラフィッシュでは、造血幹細胞は背側大動脈の外側に剝離し、その後、後主静脈に侵入するのに対し、哺乳動物では背側大動脈の内腔側に剝離し、血流に乗って体内を循環する。

Runx1(runt-related transcriptional factor 1)は、内皮造血転換を制御する鍵となる核転写因子であり、AML(acute myeloid leukemia)とも呼ばれ、急性骨髄性白血病の発症とも関連する。Runx1は造血性内皮細胞に発現するマーカー遺伝子であるが、造血性内皮細胞の発生には必要なく、その後の内皮造血転換を制御することが知られている⁹⁾。また、血流に起因する力学的刺激が、内皮造血転換による造血幹細胞の発生に関与することが知られている¹⁰⁾。ゼブラフィッシュを用いた解析から、血流は *klf2* の発現を介して一酸化窒素を産生し、造血性内皮細胞における *runx1* の発現を維持することで、内皮造血転換を制御することが示されている^{11,12)}。更に、血流が Prostaglandin

E₂ の産生を介して, cyclic AMP-protein kinase A 経路を活性化し, 内皮造血転換による造血幹細胞の発生を制御していることが報告されている^{13,14)}。

Ⅲ 造血性内皮細胞の発生メカニズム

前述のとおり, 血球細胞と血管内皮細胞は共に中胚葉に由来し, 共通の起源を持つ。また, 造血幹細胞を産生する造血性内皮細胞は, 背側大動脈に出現することから, 造血幹細胞および造血性内皮細胞の発生には, 動脈分化のプロセスが必要であると考えられる⁴⁾。実際にこの仮説を支持する知見として, 内皮細胞の動脈分化と造血幹細胞の発生が, Hedgehog, vascular endothelial growth factor (VEGF), Notch などの共通のシグナル系に依存していること, 静脈分化の鍵遺伝子である COUP-TFII を内皮細胞で欠損したマウスでは, 静脈で Nr1p1, Hey1, Jag1, Notch1 などの動脈遺伝子の発現が誘導されると共に, その内腔面に造血細胞のクラスターが形成されることが報告されている。これらの知見は, 血管芽細胞の造血性内皮細胞への運命決定に, 動脈分化が中間プロセスとして必要である可能性を示唆しているが, 造血性内皮細胞への運命決定に, 動脈分化が必要ないことを示唆する知見も報告されており, 今後の解析が待たれる¹⁵⁾。

これまでにゼブラフィッシュを用いた解析により, 血管芽細胞が造血性内皮細胞の運命を獲得する機構の一端が明らかにされてきた。ゼブラフィッシュ胚では, 側板中胚葉から血管芽細胞が正中線に向かって移動し, 受精後約 20 時間に正中線で紐状の血管構造である血管帯を形成, その後, 血管帯は背側大動脈と後主静脈を構築する(図 1)。造血性内皮細胞のマーカー遺伝子である *runx1* の発現は, 受精後約 23 時間から背側大動脈の腹側で認められることから, 造血性内皮細胞はこの時期に出現すると考えられる(図 1)。しかし, 血管芽細胞は, それ以前に後方側板中胚葉から正中線に移動する過程において, 細胞自立的および細胞非自立的 Notch シグナルによって造血性内皮細胞の運命を獲得することが報告された⁴⁾。Notch リガンドは細胞膜上に存在するため,

Notch シグナルの活性化には, 細胞同士の接着が必要である。そのため, 血管芽細胞は, 後方側板中胚葉から正中線に向かって遊走する際, 体節の腹側領域を移動し, Notch リガンドである DeltaC (Dlc) および DeltaD (Dld) を発現する体節細胞と接着することで, 自身の Notch1 受容体を活性化し, 細胞自立的に造血性内皮細胞の運命を獲得すると考えられている(図 2)¹⁶⁾。Notch シグナルは, 標的遺伝子である Gata2 の発現を誘導することで, *runx1* 陽性の造血性内皮細胞の発生を促す。この細胞自立的 Notch シグナルの活性化には, 血管芽細胞と体節細胞の接着が必要であるが, 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子 junctional adhesion molecule がこれら細胞間の接着に関与することが示唆されている¹⁶⁾。一方, 細胞非自立的 Notch シグナルも造血性内皮細胞の発生を制御する¹⁷⁾。Wnt16 は, 非古典的 Wnt 経路を介して, 体節における *dlc*, *dld* の発現を誘導する。体節に発現する Dlc および Dld は, 前述のとおり血管芽細胞の Notch1 を活性化し, 細胞自立的に造血性内皮細胞の運命決定を制御する。更に, Dlc および Dld は, 硬節の形態形成を制御することで, 細胞非自立的に造血性内皮細胞の運命決定に寄与すると考えられるが, その分子機序は明らかにされていない。

Ⅳ Rap1 低分子量 G タンパク質が造血性内皮細胞の運命決定を制御するメカニズム

Rap1 は, Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質であり, もともと Ras による細胞の形質転換を阻害する分子として同定された。その後の解析から, Rap1 はインテグリンの接着活性を強め, 細胞-基質間接着を制御することが明らかになった¹⁸⁾。更に, 筆者らを含む幾つかのグループから, Rap1 はカドヘリン接着にも関与しており, 細胞間接着の形成を促進することが示された¹⁸⁾。筆者らはこれまで, 主に *in vitro* の培養内皮細胞を用いた解析を行い, Rap1 が vascular endothelial-cadherin を介した内皮細胞間接着形成を促進し, 血管透過性を抑制する, 血管恒常性維持に重要な分子であることを明らか

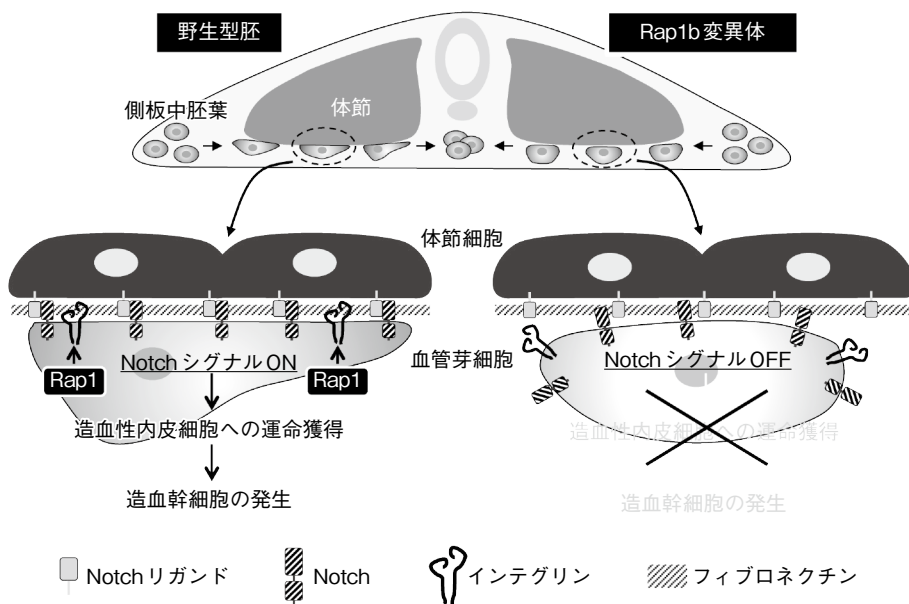


図 2 Rap1 による造血性内皮細胞の運命決定機構

にしてきた¹⁹⁾。

筆者らは最近、生体内における Rap1 の機能を明らかにするため、血管系に主に発現する *rap1b* 遺伝子を破壊したゼブラフィッシュを樹立・解析した。その結果、*rap1b* 変異体では正常な血管が形成され、血管透過性の異常も認められなかったものの、造血性内皮細胞および造血幹細胞の発生が阻害されていることを発見した。これにより、Rap1b が造血性内皮細胞の運命決定に関与することが明らかになった²⁰⁾。

前述のとおり、血管芽細胞は Notch リガンドを発現する体節細胞と接着することで、自身の Notch シグナルを活性化し、造血性内皮細胞の運命を獲得する(図 2)。そこで、Rap1b が造血性内皮細胞の発生を制御するメカニズムを知るため、*rap1b* 変異体において、血管芽細胞が後方側板中胚葉から正中線に向かって移動する様子を解析したところ、*rap1b* を欠損した血管芽細胞の異常な遊走が認められ、血管芽細胞と体節細胞の接着面積が減少していることがわかった。また、胎生 20 時間の *rap1b* 変異体の血管帯における Notch シグナルは、野生型胚に比べ低下していること、更に、*rap1b* 変異体における造血性内皮細胞の発生異常は、Notch 細胞内ドメインの発現により

Notch シグナルを活性化することで部分的にレスキューされた。以上の結果から、Rap1b は血管芽細胞と Notch リガンドを発現する体節細胞の接着を促進することで、血管芽細胞における Notch シグナルを活性化し、造血性内皮細胞の運命決定を制御していることが判明した。

筆者らは更に、Rap1b が血管芽細胞と体節細胞の接着を促進するメカニズムについて解析を進めた。まず、Rap1b がカドヘリンを介して血管芽細胞と体節細胞の接着を制御しているか検討したところ、これら細胞の接着部位にカドヘリン接着形成に必須である β -カテニンの集積がみられなかったことから、その可能性は否定された。次いで、インテグリンの関与を検討した。これまでにインテグリンのリガンドであるフィブロネクチンが体節の境界部位に蓄積していることが報告されていたが、今回の研究で、血管芽細胞は体節の境界部位に局在するフィブロネクチンに接着しながら正中線に向かって遊走していること、また、*rap1b* 変異体ではそれが阻害されていることが示された。更に、血管芽細胞を単離しフィブロネクチンをコートしたディッシュに播種したところ、野生型胚に由来する血管芽細胞はインテグリン依存性の焦点接着を形成したのに対し、*rap1b* を欠

損した血管芽細胞では、その形成が阻害されていた。これらの結果は、Rap1b が血管芽細胞のインテグリン活性を亢進しており、それにより血管芽細胞が体節の境界部のフィブロネクチンに効率的に接着できることを示唆している。そこで、Rap1b がインテグリンを活性化し、血管芽細胞のフィブロネクチンへの接着を亢進することで、血管芽細胞と体節細胞の接着を増強し、Notch シグナル依存的な造血性内皮細胞の運命決定を制御しているか検討した。まず、フィブロネクチンおよびその受容体であるインテグリン $\beta 1$ をノックダウンしたところ、血管芽細胞と体節細胞の接着阻害、造血性内皮細胞および造血幹細胞の発生異常が認められた。また、Rap1 の下流で機能しインテグリン接着活性を有する RIAM、更にはインテグリンの下流で細胞の接着・遊走を促進する focal adhesion kinase (FAK) の過剰発現により、*rap1b* 変異体における造血性内皮細胞の発生異常がレスキューされた。以上の結果から、Rap1b はインテグリンを活性化することで、血管芽細胞を体節境界部のフィブロネクチンに効率的に接着させ、血管芽細胞と体節細胞の細胞間接着を亢進すること、更に血管芽細胞と体節細胞の接着亢進は、血管芽細胞における Notch シグナルの活性化を促し、それにより血管芽細胞が造血性内皮細胞の運命を獲得することが明らかになった(図 2)²⁰⁾。

おわりに

現在、白血病などの難治性血液疾患を治療するため、骨髄移植などの造血幹細胞移植が行われている。しかし、造血幹細胞移植には、HLA 型が一致したドナーが必要であり、また、骨髄を提供するドナーの負担やリスクが大きいなどの問題が残されている。そのため、近年、多くの研究者が試験管内で人工多能性幹細胞から造血幹細胞を作

り出す技術の開発を目指して研究を進めているが、いまだ成功には至っていない。今後、基礎研究の更なる推進により造血幹細胞の発生メカニズムの理解が深まり、難治性血液疾患の治療法開発につながる事が期待される。

●文 献

- 1) Ciau-Uitz A, Monteiro R, Kirmizitas A, Patient R : *Exp Hematol.* **42** : 669-683, 2014
- 2) Plein A, Fantin A, Denti L et al : *Nature.* **562** : 223-228, 2018
- 3) Clements WK, Traver D : *Nat Rev Immunol.* **13** : 336-348, 2013
- 4) Butko E, Pouget C, Traver D : *Dev Biol.* **409** : 129-138, 2016
- 5) Gritz E, Hirschi KK : *Cell Mol Life Sci.* **73** : 1547-1567, 2016
- 6) Kissa K, Herbolme P : *Nature.* **464** : 112-115, 2010
- 7) Lam EY, Hall CJ, Crosier PS et al : *Blood.* **116** : 909-914, 2010
- 8) Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C et al : *Nature.* **464** : 116-120, 2010
- 9) Swiers G, de Bruijn M, Speck NA : *Int J Dev Biol.* **54** : 1151-1163, 2010
- 10) García-Cardena G, Slegtenhorst BR : *Annu Rev Cell Dev Biol.* **32** : 633-648, 2016
- 11) North TE, Goessling W, Peeters M et al : *Cell.* **137** : 736-748, 2009
- 12) Wang L, Zhang P, Wei Y et al : *Blood.* **118** : 4102-4110, 2011
- 13) Diaz MF, Li N, Lee HJ et al : *J Exp Med.* **212** : 665-680, 2015
- 14) Kim PG, Nakano H, Das PP et al : *J Exp Med.* **212** : 633-648, 2015
- 15) Slukvin II, Uenishi GI : *Exp Hematol.* **71** : 3-12, 2019
- 16) Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Kim AD et al : *Nature.* **512** : 319-323, 2014
- 17) Clements WK, Kim AD, Ong KG et al : *Nature.* **474** : 220-224, 2011
- 18) Bos JL : *Curr Opin Cell Biol.* **17** : 123-128, 2005
- 19) Rho SS, Ando K, Fukuhara S : *J Nippon Med Sch.* **84** : 148-159, 2017
- 20) Rho SS, Kobayashi I, Oguri-Nakamura E et al : *Dev Cell.* **49** : 681-696.e6, 2019