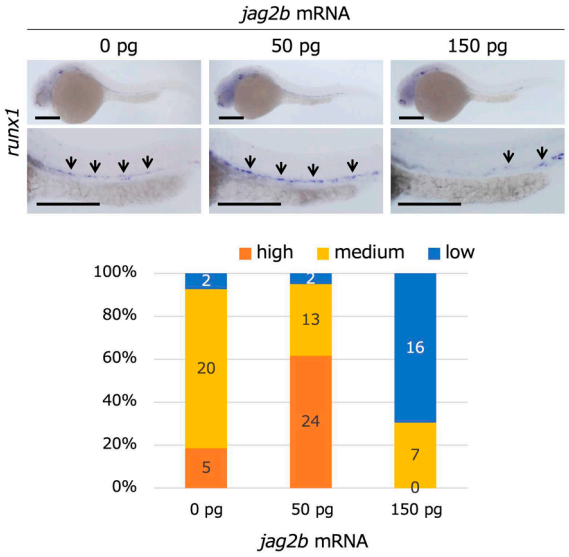
147　造血幹細胞の分化誘導および増幅に関する研究	小林　功

【目的】造血幹細胞は全ての種類の血液細胞を生涯に亘って供給し続けられるという特殊な能力から、骨髄移植という形で白血病などの難治性血液疾患に対する治療に応用されている。人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から造血幹細胞へ分化誘導するには、胚発生期における造血幹細胞の発生過程を生体外で忠実に再現する必要がある。そのため造血幹細胞が生体内でどのように制御されて発生するのかを分子レベル・細胞レベルで詳細に解明することが求められている。脊椎動物の発生過程において造血幹細胞は血管芽細胞と呼ばれる血液・血管系の共通前駆細胞から発生することが知られており、その発生過程には Notch シグナルが重要な役割を果たしていることが知られている。そこで本研究では、発生生物学の分野で有用な実験モデルとして知られるゼブラフィッシュを用いて、Notch リガンドである Jagged 2b（Jag2b）が造血幹細胞の発生過程でどのような役割を果たすのか、および Jag2b の強制発現によって造血幹細胞を増幅させることができるのかについての検討を行った。

【方法】ゼブラフィッシュにおける Jag2b の機能を抑制するために、Morpholino oligo（MO）を一細胞期の受精卵へ注入した。また、遺伝子の強制発現を行うために、生体外で合成した mRNA を MO と同様の方法で受精卵へ注入した。注入した胚において遺伝子の発現を調べるために、Whole-mount in situ hybridization （WISH）および免疫組織化学染色を行った。

【結果】ゼブラフィッシュ胚において *jag2b* は体節において発現していたが、血管芽細胞へ直接シグナルを伝達している可能性は低く、Jag2b は何か別のシグナル伝達分子を介して造血幹細胞の発生を制御しているものと考えられた。野生型胚と *jag2b* MO 胚で造血幹細胞の制御に関わる分子の発現を比較した結果、Jag2b は体節において *wnt16* の発現制御に関わっている可能性が示唆された。しかしながら、Jag2b によって誘導される Notch の活性化細胞と *wnt16* の発現細胞は互いに隣接するように分布しており、重複しなかったことから、Jag2b による *wnt16* の発現制御の間にも別のシグナル伝達分子が存在すると考えられた。詳細な解析の結果、Ephrin A-L1 が Jag2b から *wnt16* へのシグナル伝達の橋渡しを行なっていることを見出すことに成功した。一方、*jag2b* mRNA をゼブラフィッシュ胚へ注入し、強制発現を行ったところ、50 pg の mRNA を注入した胚では、造血幹細胞のマーカー遺伝子である *runx1* の発現が増加したのに対し、150 pg の mRNA を注入した胚では逆に *runx1* の発現が減少した。これらのことから、Jag2b の適度な過剰発現では造血幹細胞の増幅が見込めるものの、過剰になりすぎると逆に造血幹細胞への分化を抑制してしまうことが明らかになった。

jag2b の強制発現による造血幹細胞数の変化



147. 造血幹細胞の分化誘導および増幅に関する研究

小林　功

*金沢大学 理工研究域 自然システム学系

Key words：造血幹細胞，ゼブラフィッシュ，Jag2b，血管芽細胞，体節

緒　言

造血幹細胞は全ての種類の血液細胞を生涯に亘って供給し続けられるという特殊な能力から、骨髄移植という形で白血病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、慢性的なドナー不足や移植後の免疫拒絶など、骨髄移植には様々な問題点が残されており、骨髄移植によって全ての血液疾患を根治的に治療するのは難しいのが現状である。一方、近年樹立された人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は生体のほぼ全ての細胞へ分化可能な万能細胞でありながら、患者自身の細胞を用いて樹立できるため、“自家移植”という新たな移植医療への応用が期待されている。iPS 細胞から造血幹細胞を造り出すことができれば、ドナー不足や免疫拒絶の問題は払拭されるが、iPS 細胞から造血幹細胞へ分化誘導することは難しく、血液疾患に対する治療には応用できていない。iPS 細胞は、細胞の“初期化”（リプログラム）によって発生初期の多能性細胞と類似した性質を獲得した細胞であるため、iPS 細胞から造血幹細胞へ分化誘導するには、胚発生期における造血幹細胞の発生過程を生体外で忠実に再現する必要がある。そのため造血幹細胞が生体内でどのように制御されて発生するのかを分子レベル・細胞レベルで詳細に解明することが求められている［1］。

ゼブラフィッシュはヒトと類似した血液の発生機構を有する脊椎動物でありながら、体外発生を行い、胚が透明であるため、特定の細胞を蛍光タンパク質で可視化することによって、発生過程をリアルタイムに追跡することができる。そのため、造血幹細胞の発生メカニズムを解明するのに非常に優れた実験モデルといえる。

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から分化して造られることが知られている［2］。我々はこれまでに、ゼブラフィッシュを用いた研究から、造血幹細胞の発生には Notch と呼ばれるシグナル伝達分子が必須な役割を果たすことを突き止めている。Notch は血管芽細胞の細胞膜上に発現し、Notch リガンドと結合することによって活性化するが、血管芽細胞のうち、体節由来の Notch リガンドである Dlc および Dld を受け取り、Notch を高く活性化させたものが造血幹細胞へと分化することが明らかになっている［3］。このことは、Notch の活性化レベルによって、血管芽細胞の運命が血液系または血管系のどちらに向かうのかが決まることを示しており、Notch の活性化レベルを制御することによって発生する造血幹細胞の数を制御できる可能性を示唆している。我々は最近、Notch リガンドの１つである Jagged 2b（Jag2b）がゼブラフィッシュにおいて造血幹細胞の発生に必須であることを見出した。そこで、本研究では Jag2b がどのような分子メカニズムで造血幹細胞の発生を制御するのかを突き止めると共に、Jag2b の強制発現によって造血幹細胞を増幅させることができるかについての検討を行なった。

方　法

1.　Jag2b の機能抑制および強制発現

ゼブラフィッシュにおける Jag2b の機能を抑制するために、*jag2b* mRNA を特異的に認識し、その翻訳を阻害する Morpholino oligo （MO）を一細胞期の受精卵へ 3.5 ng 注入した。また、Jag2b の強制発現を行うために、生体外で合成した mRNA を MO と同様に受精卵へ注入した。

*現在の所属：金沢大学 理工研究域 生命理工学系 幹細胞発生学研究室

2. Jag2b の機能抑制および強制発現

ゼブラフィッシュにおける Jag2b の機能を抑制するために、*jag2b* mRNA を特異的に認識し、その翻訳を阻害する Morpholino oligo（MO）を一細胞期の受精卵へ 3.5 ng 注入した。また、Jag2b の強制発現を行うために、生体外で合成した mRNA を MO と同様に受精卵へ注入した。

3. Whole-mount in situ hybridization および免疫組織化学染色

注入した胚における遺伝子発現を野生型胚と比較するために、4% paraformaldehyde で固定し、標的遺伝子に対する Digoxigenin 標識 RNA probe を用いて Whole-mount in situ hybridization（WISH）を行なった。胚における Notch の活性化状態を比較するために、Notch レポーター系統である *Tp1:GFP* の胚を固定し、ニワトリ抗 GFP 抗体、および Alexa 488 標識抗ニワトリ IgY 抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった。

結　果

1. Jag2b は体節において *wnt16* の発現を制御する

ゼブラフィッシュ胚において *jag2b* は体節に発現するが、*jag2b* の体節における発現部位は血管芽細胞が直接接触できる場所ではなかったため、我々は Jag2b による造血幹細胞の発生制御には間に何か別のシグナル伝達分子を介して行われているものと考えた。ゼブラフィッシュ体節には *wnt16*、*dlc*、*dld*、*vegfaa* などのシグナル伝達分子が発現しており、造血幹細胞の発生に関わっていることが知られている［4］。そこで、MO によって Jag2b の機能を欠損させた胚において、これらの遺伝子の発現を WISH によって調べた。その結果、野生型胚に比べ、Jag2b 欠損胚では *wnt16*、*dlc*、および *dld* の発現が低下していた（図 1）。体節における *dlc* および *dld* の発現は Wnt16 による制御を受けていることが報告されているため［5］、Jag2b は体節の Notch シグナルを活性化し、*wnt16* の発現を制御することで造血幹細胞の発生を促進しているものと考えられた。

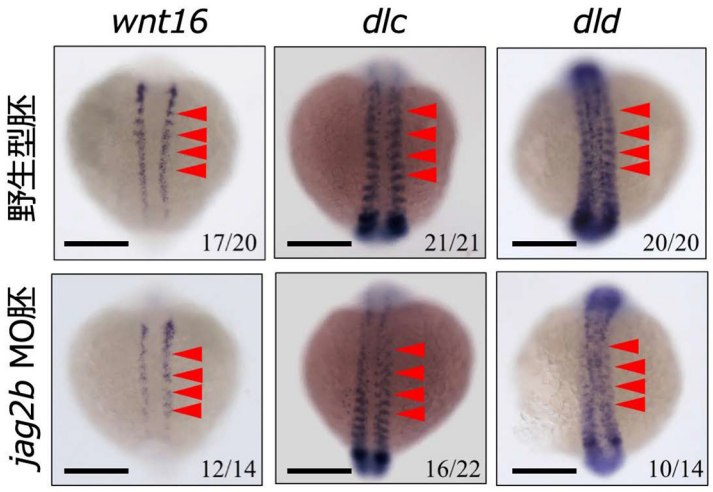


図 1. *jag2b* MO 胚における *wnt16*、*dlc* および *dld* の発現解析
野生型胚に比べ、*jag2b* MO 胚では体節における *wnt16*、*dlc* および *dld* の発現が低下する（矢尻）。スケールバー：100 μm

次に、Jag2b によって Notch が活性化する細胞において実際に *wnt16* が発現しているかどうかについて、Notch のレポーター系統である *Tp1:GFP* を用いて調べた。*Tp1:GFP* 系統は Notch の活性化に伴って GFP を発現する系統であるが、体節における GFP の発現部位と *wnt16* の発現部位は互いに隣接するように分布しており、重複することはなかった（図 2）。このことは Notch の活性化細胞と *wnt16* の発現細胞が異なることを表しており、Jag2b による *wnt16* の発現制御の間にも少なくとも 1 つのシグナル伝達分子を介している可能性が高いと考えられた。

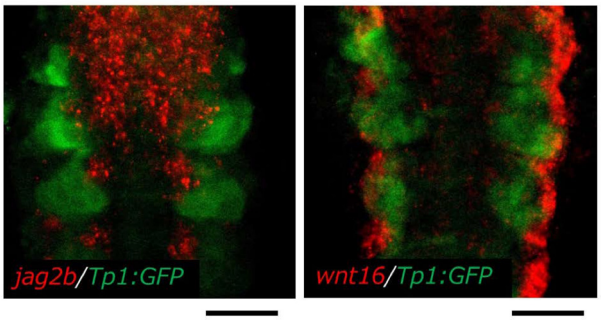


図 2. *jag2b*、*wnt16*、および *Tp1:GFP* の発現解析
ゼブラフィッシュ胚の体節において *jag2b*（左図赤）および *wnt16*（右図赤）はそれぞれ *Tp1:GFP*（緑）の内側および外側に発現し、その発現部位は互いに隣接するように分布し、重複しなかった。スケールバー：50 μm

2. Jag2b の標的分子 Ephrin A-L1 の同定

我々は次に Jag2b の下流分子の候補として Ephrin 分子に注目した。Ephrin は Eph と呼ばれる受容体に特異的に結合し、そのシグナルを隣接する細胞へ伝達するため、今回の体節のシグナル伝達モデルに合致する。我々は Ephrin 分子のうち、ゼブラフィッシュ体節に高発現する Ephrin B2A（遺伝子名：*efnb2a*）および Ephrin A-L1（遺伝子名：*efna1b*）の 2 つに注目し、その発現を野生型胚および *jag2b* MO 胚で比較した。その結果、*efnb2a* の発現には異常が見られなかったものの、*efna1b* の発現が *jag2b* MO 胚の体節において大幅に減少していた（図 3）。また、野生型胚において *efna1b* mRNA を注入し、強制発現を行なったところ、体節における *wnt16* の発現が上昇した（図 4）。これらのことから、Jag2b は体節において Notch を活性化し、Ephrin A-L1 – Eph のシグナルを介して *wnt16* の発現を制御し、さらに Wnt16 から硬節の *dlc* および *dld* の発現を増強することで血管芽細胞における Notch の活性を高めているものと考えられた。

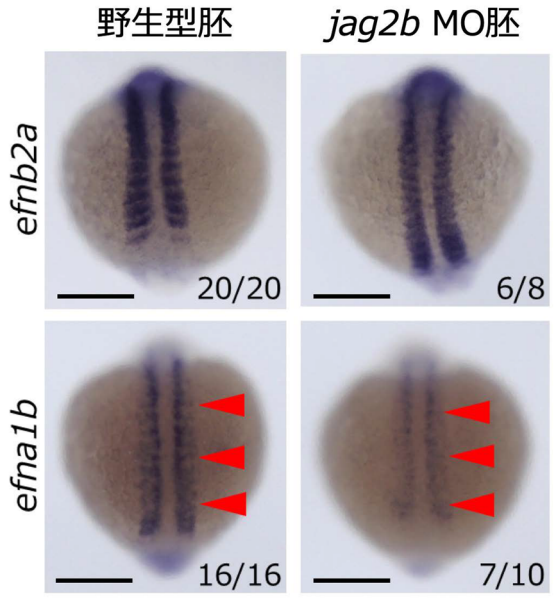


図 3. *jag2b* MO 胚における *efnb2a* および *efna1b* の発現解析
efnb2a（上図）には発現に変化が見られなかったが、*efna1b*（下図）は野生型胚に比べ、*jag2b* MO 胚の体節において著しく減少していた。スケールバー：100 μm

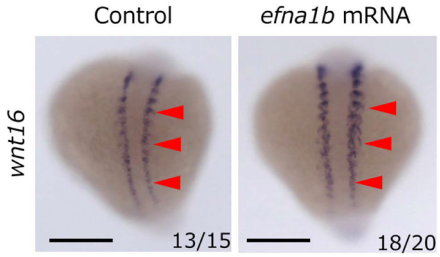


図 4. *efna1b* 強制発現胚における *wnt16* の発現解析

Control 胚（左図）に比べて、*efna1b* 強制発現胚（右図）では体節における *wnt16* の発現が上昇した。スケールバー：100 μm

3. Jag2b の発現増強による造血幹細胞の増幅

これまでの研究から我々は、Jag2b は体節におけるシグナル伝達を介して造血幹細胞の発生を制御することを明らかにした。これらの結果は Jag2b が体節におけるシグナル伝達経路の最上位で働いている可能性を示唆しており、いわば造血幹細胞への“運命決定スイッチ”としての役割を担っている可能性が高いと考えられる。そこで、*jag2b* mRNA を野生型胚へ注入し、Jag2b を強制発現することによって造血幹細胞の数を増幅させることができるかについての検討を行なった。ゼブラフィッシュの一細胞期の受精卵へ *jag2b* mRNA を 50 pg および 150 pg 注入し、造血幹細胞が背側大動脈に形成される受精 28 時間まで培養し、WISH によって造血幹細胞のマーカー遺伝子である *runx1* の発現を調べた。その結果、興味深いことに、50 pg の *jag2b* mRNA を注入した胚においては背側大動脈に出現する造血幹細胞の数が増加したのに対し、150 pg の mRNA を注入した胚においては造血幹細胞の数が逆に減少していた。このことは Jag2b の適度な過剰発現では造血幹細胞の増幅が見込めるものの、過剰になりすぎると逆に造血幹細胞への分化を抑制してしまうことを表しており、生体内では Jag2b による Notch シグナルが適切な量に調整されていることを示唆している。

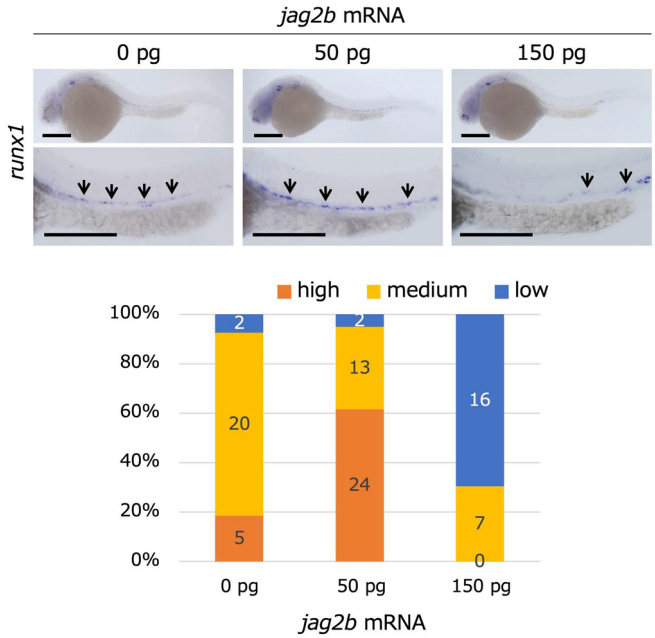


図 5. *jag2b* の強制発現による造血幹細胞の増幅

野生型のゼブラフィッシュ胚へ *jag2b* mRNA を 0、50、および 150 pg 注入後、受精 28 時間において造血幹細胞のマーカーである *runx1* の発現を背側大動脈において比較したところ、0 pg の胚（上段左図）に比べ 50 pg の胚では *runx1* の発現が増加し（上段中央図）、150 pg の胚では逆に低下していた（上段右図）。下段のグラフは *jag2b* mRNA を 0、50、および 150 pg 注入後、*runx1* の発現強度によって胚を high、medium、および low の 3 段階に分類したものを表す。50 pg の注入胚では high の割合が多いのに対し、150 pg 注入胚では low の割合が多くなっている。スケールバー：100 μm。

考　察

本研究では、ゼブラフィッシュにおいて Notch リガンドである Jag2b による体節内のシグナル伝達経路を明らかにし、造血幹細胞の発生メカニズムの一端を解明することに成功した。Jag2b による造血幹細胞の発生制御は当初考えたモデルよりも遥かに複雑なものであり、血管芽細胞に作用し、造血幹細胞の分化を促すまでに Notch receptor、Ephrin A-L1、Eph receptor、Wnt16、Wnt receptor、Dlc および Dld など、少なくとも 7 種類以上の分子を介していることが分かった（図 6）。また、Jag2b の発現量をただ単純に増やしても、造血幹細胞が増えるというものではなく、Jag2b によるシグナルがある一定以上を超えてしまうと逆に造血幹細胞の数が減少してしまうことから、体節における Jag2b の発現量を適切なレベルに保つことも不可欠であると言える。今後、Jag2b 並びに体節におけるシグナル伝達分子を制御することによって造血幹細胞の数がどのように制御されているのかについて、より詳細に解析を進めていく必要がある。

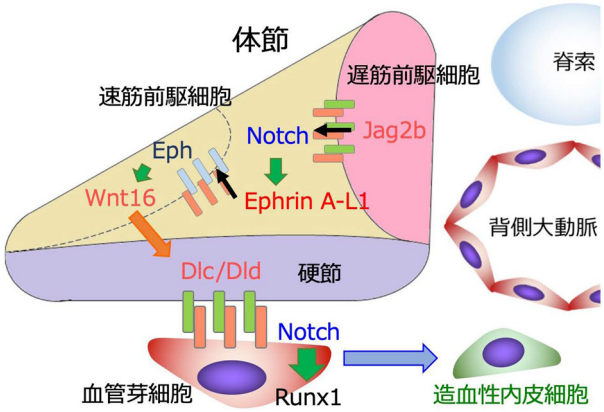


図 6.　Jag2b による体節内シグナル伝達のモデル

遅筋前駆細胞に発現する Jag2b は速筋前駆細胞の Notch シグナルを活性化させ、Ephrin A-L1 – Eph を介して速筋前駆細胞外側において Wnt16 の発現を制御する。Wnt16 はさらに硬節における Dlc および Dld の発現を制御し、血管芽細胞の Notch シグナルを活性化する。Notch シグナルを受け取った血管芽細胞は造血性内皮細胞を経て造血幹細胞へと分化を遂げる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、カリフォルニア大学サンディエゴ校の David Traver 博士である。

文　献

1) Murry CE, Keller G.Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. Cell. 2008 Feb 22;132（4）:661-80. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.008. PMID: 18295582

2) Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. Nature. 2010 Mar 4;464（7285）:108-11. doi: 10.1038/nature08738. Epub 2010 Feb 14. PMID: 20154733

3) Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Kim AD, Pouget C, Fujita N, Suda T, Traver D. Jam1a-Jam2a interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. Nature. 2014 Aug 21;512（7514）:319-23. doi: 10.1038/nature13623. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25119047

4) Clements WK, Traver D. Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification. Nat Rev Immunol. 2013 May;13（5）:336-48. doi: 10.1038/nri3443. PMID: 23618830

5) Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. Nature. 2011 Jun 8;474（7350）:220-4. doi: 10.1038/nature10107. PMID: 21654806