

## &lt;特集「個体発生と細胞分化の医学」&gt;

## 血球発生と血管分化の Crossroad

山元 康敏\*, 奥田 司

京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学

## Crossroad between Hematopoiesis and Vascular Differentiation

Yasutoshi Yamamoto and Tsukasa Okuda

*Department of Biochemistry and Molecular Biology,  
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

## 抄 録

近年の発生生物学や血液腫瘍学における目覚ましい進歩にもかかわらず、造血幹細胞の発生メカニズム解明はようやく理解の端緒についたばかりである。これまでの多くの研究成果によって、造血幹細胞は特殊な血管内皮細胞、いわゆる「血球産生型血管内皮」から発生するという概念が打ち立てられた。血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生するメカニズムは未だ不明な点が多く残されているが、本過程においては、血管内皮細胞の形態変化、細胞極性と細胞接着因子の喪失と、遊走性の獲得が認められる。このような表現型の変化に類似するものとして、上皮間葉転換（内皮間葉転換）が知られている。本稿では、血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生するプロセスにおける上皮間葉転換（内皮間葉転換）の重要性について概観する。本プロセスの詳細な理解は正常造血発生メカニズムの理解のみならず、造血系疾患の新たな治療ターゲット探索に大きく貢献することが期待される。

キーワード：造血幹細胞，血球産生型血管内皮，内皮造血転換，上皮間葉転換，Runx1.

## Abstract

Despite continuous progress in developmental biology, hematology, and oncology, the molecular mechanism in hemopoietic stem cell (HSC) emergence is only beginning to be understood. Various kinds of research works suggested that HSC comes from specialized endothelium, hemogenic endothelium. The process of HSC emergence from hemogenic endothelium involves changes in endothelial cell shape, loss of cellular polarity and adhesion, and gain of mobility. This kind of phenotypic changes are similar to epithelial to mesenchymal transition (EMT), more specifically, endothelial to mesenchymal transition (EndMT). In this review, we overview the significance of EMT and/or EndMT upon the HSC emergence from hemogenic endothelium during developmental stage. The elucidation of the mechanism underlying HSC emergence from hemogenic endothelium will not only contribute to the better understanding of the normal hematopoietic development but to the innovative therapeutic application for hematopoietic disorder.

---

平成25年 5月14日受付

\*連絡先 山元康敏 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地  
yamagen@koto.kpu-m.ac.jp

**Key Words:** Hematopoietic stem cell, Hemogenic Endothelium, Endothelial to hematopoietic transition (EHT), Epithelial to mesenchymal transition (EMT), Runx1.

## はじめに

脊椎動物において造血発生は大きく次の2ステージに分類される。一次造血 (primitive hematopoiesis) は、「胚型造血」ともいわれ、胎生初期に卵黄嚢において一過性に起こる造血であり、引き続き aorta-gonado-mesonephros (AGM) 領域で開始される二次造血 (definitive hematopoiesis) にまもなく置き換わることになる。こちらは「成体型造血」ともいわれる。主な造血の場はその後、胎仔肝、骨髄へと移動する。一次造血過程においては、同一細胞集塊からコホートを形成するかたちで血球細胞と血管内皮細胞が発生し、一方二次造血過程においては、特殊な血管内皮細胞が造血幹細胞を産生することが知られている。発生過程での造血幹細胞の起源については未だ議論が分かれ、その制御機構の詳細については不明な点も多く残されている。その中で、近年の遺伝子工学、またイメージング技術等の進歩によって、多くの興味深い知見が得られてきた。本稿では、造血発生についてのこれまでの知見と共に、血球発生を血管分化の観点から捉え、最近の新しい報告もあわせて概観してみたい。

## 脊椎動物における造血の発生

個体発生の過程において、血液細胞の産生はまず一次造血といわれる初期造血によって開始する。マウスの胎生期間は約20日であるが、胎生6.5日目には原腸陥入が始まり、外胚葉、中胚葉、そして内胚葉が形成される。一次造血は胎生7.5日目に、胚仔体外の卵黄嚢 (yolk sac) において起こる<sup>1-3)</sup>。中胚葉由来の細胞が血島 (blood island) と呼ばれるクラスターを形成し、これらがやがて血管内皮細胞と、血管内皮細胞に囲まれ接着して存在している血液細胞とに運命決定を受けて分化する。この一次造血は一過性であり、その後続く二次造血にすぐに置き換わる

ことになる。

二次造血は、マウスでは胎生8.5日目に体循環が開始した後に、胎仔体内のAGM領域と呼ばれる部位の背側大動脈内腔、卵黄動脈、臍帯動脈、および卵黄嚢から始まる<sup>4,7)</sup>。また、尿膜<sup>8,9)</sup>や胎盤<sup>11)</sup>も造血の場としての役割を担うと考えられている。最近、中枢神経系の血管も造血発生となっている可能性が示された。胎生10.5日目頃から、背側大動脈腹側に位置する血管内皮細胞から造血幹細胞が発生する。この時、造血幹細胞のクラスターが、「budding」と呼ばれる通りあたかも出芽するように血管内腔の血管壁から現れ、背側大動脈の血管内皮細胞と造血幹細胞は密接に相互作用しているように観察される。この様に、血液細胞に分化可能な性質をもつ血管内皮細胞、つまり血球産生型血管内皮 (hemogenic endothelium) と呼ばれる細胞から造血幹細胞は産生されると考えられている (図1, 2)。造血幹細胞は、全ての系統の血液細胞を個体の生涯にわたって産生可能であり、致死量放射線照射して造血細胞を破壊した成体マウスに移植すると、生涯にわたってその造血を再構築することができる、LT-HSC (long-term repopulating hematopoietic stem cell) とも呼ばれる細胞群である。

AGM領域で産生された造血幹細胞はその後、血液循環によって胎仔肝に移動後定着し、成体型の二次造血を行う。出生直後まで胎仔肝が主な造血の場となるが、出生直前に造血幹細胞は骨髄に移動し、骨髄 (マウスでは脾臓も) が成体の一生を通じた造血の場となる。

## 造血幹細胞の起源

卵黄嚢における一次造血の場で、血液細胞と血管内皮細胞が同時に発生することから、これらの起源が共通祖先の細胞“ヘマンジオブラスト”に由来すると一般に考えられてきたが、ヘマンジオブラストの実体の詳細は未だ不明であ

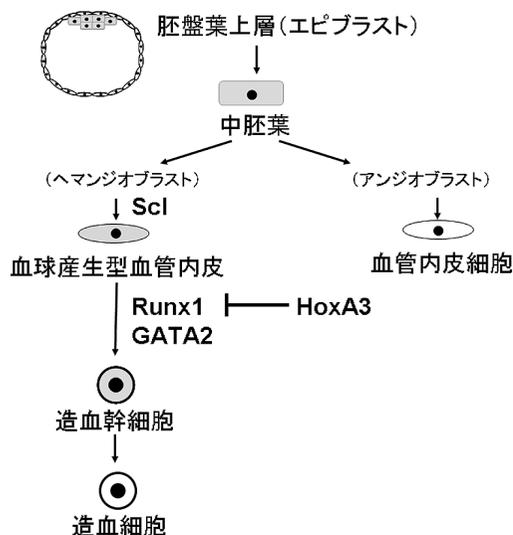


図1 造血幹細胞の発生モデルの一つ  
中胚葉から血球産生型血管内皮を経て造血幹細胞が産生される。  
Scl (Stem cell leukemia)/Tal-1 (T-cell acute lymphocytic leukemia)

る。一次造血においては主に赤血球が形成されるが、成体型の二次造血でつくられる赤血球とは異なる。一次造血にて発生する赤血球は大型で有核であり、時期特異的な胚仔型のグロビン遺伝子 ( $\beta H1$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ) を発現していることが特徴として挙げられる。さらに、赤血球のみではなく、巨核球<sup>12)</sup> やマクロファージ<sup>3)</sup> も産生されるという報告もなされている。他方、造血幹細胞の起源については、未だ詳細は解明されていない。その要因の一つとして前述したヘマンジオブラストの存在が挙げられる。ヘマンジオブラストは中胚葉から発生し、血管内皮細胞と造血細胞の両系統に分化可能と考えられているが、その存在そのものについても、未だ議論が分かれている。In vivo イメージング技術を用いた最近の報告では、造血幹細胞は背側大動脈腹側に位置するよく分化した血管内皮細胞で構成される、血球産生型血管内皮から発生するという概念が支持されている<sup>13)</sup> (図1)。さらに近年、胚体内においては、上記の背側大動脈腹側部に加え、頭部のやはり血管内皮細胞から造血幹細胞が産生されるとの報告がなされた<sup>14)</sup>。

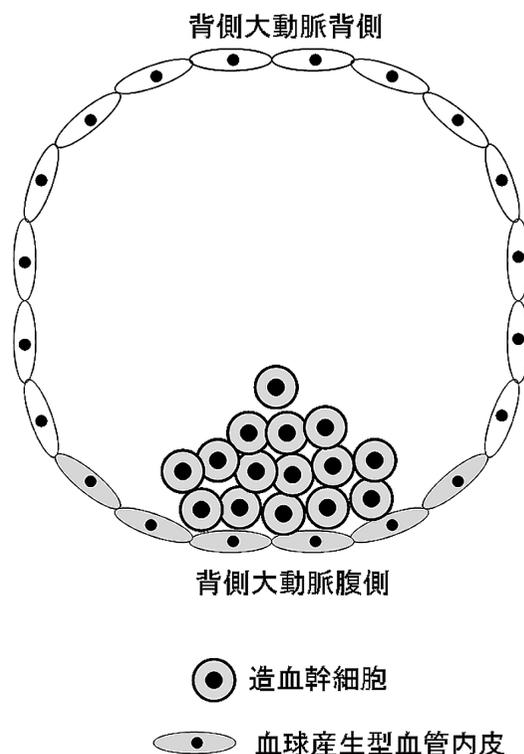


図2 血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生するモデル

AGM 領域の背側大動脈腹側部に位置する血球産生型血管内皮 (形態上は成熟した血管内皮細胞) から、発芽する如く造血幹細胞が発生する。

### 転写因子による制御

Runx1 (Runt-related transcriptional factor 1) は二次造血に必須の転写因子であり、AML1 (acute myelogenous leukemia) とも呼ばれるように、ヒト急性骨髄性白血病全体の約 20% という高頻度で染色体転座による再構成の標的となる遺伝子である<sup>15)</sup>。Runx1 ノックアウトマウスは胎生 12.5 日目頃に中枢神経系での出血と胎仔肝での二次造血の完全な欠如によって死亡する<sup>16)</sup>。さらに Runx1<sup>-/-</sup> マウスの一次造血の解析によって、胚型赤血球の正常な成熟にも Runx1 は重要な機能をもつことが明らかとなった<sup>17)</sup>。

血球産生型血管内皮から造血幹細胞が産生される過程における Runx1 の果たす役割が以下の如く報告された。Runx1<sup>-/-</sup> ES 細胞由来の Flk

(fetal liver kinase) 1<sup>+</sup> 細胞の *in vitro* 培養系を用いた実験によって、Runx1 は血球産生型血管内皮の形成には必要ではないが、血球産生型血管内皮から血液細胞が産生される過程に必須であることが示された<sup>18)</sup>。また *In vivo* における検討では、Runx1 を血管内皮特異的にノックアウトしたマウスの解析結果が別のグループにより報告された。VE (vascular endothelial)-カドヘリンは胎生 7.5 日目に卵黄嚢において一過性に発現され、胎生 8.5 日目には背側大動脈と心臓の血管内皮細胞に限局される。コンディショナルノックアウトマウスの解析により VE-カドヘリン<sup>+</sup> 血管内皮細胞から造血幹細胞が産生される過程に Runx1 が必須となることが示された<sup>19)</sup>。

一方、HoxA3 (homeoboxA3) は Runx1 発現を抑制し、血管内皮細胞としての形質を維持すると報告されている<sup>20)</sup>。

また、Runx1 の共役因子である CBF $\beta$  (core binding factor  $\beta$ ) ノックアウトマウスも Runx1 ノックアウトと類似した表現型を示し、胎生 12.5 日目頃に死亡する。卵黄嚢での一次造血は見られるが、胎仔肝での二次造血が重度の障害を受ける<sup>21)</sup>。一方、Tie2 プロモーター下で血管内皮細胞、造血前駆細胞特異的に CBF $\beta$  を発現させたレスキューマウスの解析により、胎仔肝での二次造血は回復するものの、骨髓球、リンパ球系統への分化は障害された。こうして、CBF $\beta$  は二次造血の源となる造血幹細胞の発生のみならず、その後の血液細胞の分化にも必須の分子であることが示されている<sup>22)</sup>。

その他、GATA-2<sup>23)</sup> や MLL<sup>24)</sup> も、ノックアウトマウスの解析から造血の初期発生において重要な働きをもつ分子であることが明らかとなった。このようにキーとなる Runx1 に加えて多様な転写因子がその時期・空間特異的に機能し、造血発生に重要な遺伝子群の発現を活性化させることで、正常な血液細胞の産生を制御している。

### EHT (Endothelial to Hematopoietic transition ; 内皮造血転換)

造血幹細胞発生における転写因子による制御

は、前述の如く数多くなされてきたにもかかわらず、“よく分化した血管内皮細胞からどのようなメカニズムにより造血細胞が発生するのか”という疑問については未だ不明な点が多い。近年、この問いの糸口となるいくつかの報告が発表された。単一レベルの ES 細胞に対するライブイメージング技術を応用することにより、接着細胞としての血球産生型内皮細胞が、次第に半接着細胞を経て、球状の造血細胞が発生する過程が捉えられた<sup>25)</sup>。また、ゼブラフィッシュに対する *in vivo* イメージング技術により、大動脈内腔の血管内皮細胞が球状に盛り上がり、動脈壁からはく離する模様が捉えられ、EHT (Endothelial to Hematopoietic transition ; 内皮造血転換) と命名された<sup>26)</sup>。さらに、2 種類のマーカー遺伝子 (VE-カドヘリンと CD41a) を導入したヒト ES 細胞をバイオイメージング、即ち、それぞれ血管内皮細胞、血球細胞の fate-mapping をライブ観察により行った検討で、early stage における血球産生型血管内皮は赤血球系・巨核球系前駆細胞へ、一方 late stage における血球産生型血管内皮は骨髓球系前駆細胞へ分化するとされた<sup>27)</sup>。EHT は、以下の 2 つの現象を説明する上で非常に魅力的な概念と考えられる。すなわち、①背側大動脈の血球産生型血管内皮が造血能を有する (あるいは造血幹細胞を生じる) のは一時的である点、②少なくとも鳥類において、背側大動脈の血球産生型血管内皮は造血能が消失終了した後に置き換えられる点、である。しかしながら一方では、EHT によっては、以下の現象をうまく説明できない事も挙げられる。すなわち、哺乳動物において、①血管内皮細胞に接着した造血幹細胞が認められる点、②血管内皮細胞と造血幹細胞が不均等分裂の如く細胞質を共有する場合も認められる点、である。造血幹細胞が形質転換 (EHT) により発生するか、もしくは不均等分裂により発生するか、未だ議論が分かれるところであるが、いずれにせよ、形態的に全く異なるよく分化した血管内皮細胞から造血細胞が発生する事は間違いないものであり、こうした細胞産生の分子機序は明らかにされていない。今後、i) 生

きたままの哺乳動物において、血管内皮から造血幹細胞が発生する過程の詳細な可視化、ii) 本過程におけるRunx1を始めとする分子が果たす具体的な分子制御機構の解明が望まれる。

## 上皮間葉転換 (EMT) の特徴

前述の如く、血球産生型血管内皮から造血幹細胞が発生するメカニズムは未だ不明な点が多く残されているが、本過程においては、血管内皮細胞の形態変化、細胞極性と細胞接着因子の喪失と、遊走性の獲得が認められる。このような表現型の変化に類似するものとして、EMT (epithelial to mesenchymal transition; 上皮間葉転換) や EndMT (endothelial to mesenchymal transition; 内皮間葉転換) が知られている。以下に、①EMTとEndMTの特徴について述べた後に、②これらと幹細胞化との関連と、③これらと血球細胞や造血幹細胞との関連について言及する。

EMTは、上皮細胞が上皮細胞としての特徴を喪失し、間葉系細胞としての特徴を獲得する過程を意味する<sup>28-30</sup>。本過程においては、細胞はE-カドヘリンを介する細胞-細胞間接着と細胞極性を喪失する一方、顕著な細胞骨格の再構成を認め遊走能を獲得する。E-カドヘリンは上皮細胞のホメオスタシスに重要な役割を有し、その発現低下により上皮細胞マーカー、タイトジャンクション (密着結合)、および細胞極性タンパク質の発現低下や再構成に到り、EMTの代表的な特徴の一つといえる。さらに細胞外マトリックスリモデリング酵素 (マトリックスメタロプロテアーゼ) と共に、間葉系マーカー (ビメンチン, N-カドヘリン, smooth muscle actin; SMA) の発現低下が、アクチン細胞骨格系の再構成と共に認められる。このようにEMTには、複雑な細胞分子レベルのメカニズムが存在している<sup>28-30</sup>。

### 1. Type1 EMT

EMTは、その生物学的・病理学的役割とタイムウィンドウにより3つのタイプに分類される<sup>29-31</sup>。胎児期および発生段階におこる上皮間葉転換は1型EMT (Type1 EMT) と呼ばれる。

EMTと、その逆順の過程であるMET (Mesenchymal-Epithelial Transition; 間葉上皮転換) は特殊化した細胞が分化や遊走して複雑な三次元構築を有する臓器を形成する際に互いに必要不可欠な関係にある。胎児期には、各臓器は一次、二次、三次EMTと称される一連のEMTを経由して形成される<sup>28</sup>。胎児期初期において、一層の上皮細胞からなるエピブラスト (胚盤葉上層) は一次EMTを経由し、胚盤葉下層に遊走して中胚葉細胞となる。最終的な臓器形成は、二次EMTおよび、一連のEMT/METを経由して成される。異なる領域の中胚葉層は異なる臓器・組織を形成する (心臓弁形成や神経堤細胞の遊走・分化による臓器・組織形成は異なる領域の中胚葉層から成る) (図3)。

### 2. Type2 EMT

よく分化した上皮細胞が活性型線維芽細胞に移行する過程は、2型EMT (Type2 EMT) と呼ばれ、創傷治癒、組織再生、および臓器線維化と関連している (図3)。2型EMT (あるいはEndMT) は成体の様々な臓器・組織 (腎臓、肝臓、皮膚、腸管、肺、眼、および、心臓) において生じる<sup>32-35</sup>。1型EMTと異なり、2型EMTは慢性炎症によって惹起され、臓器線維化の過程で遷延する炎症に反応して持続し、組織破壊に至らしめる。

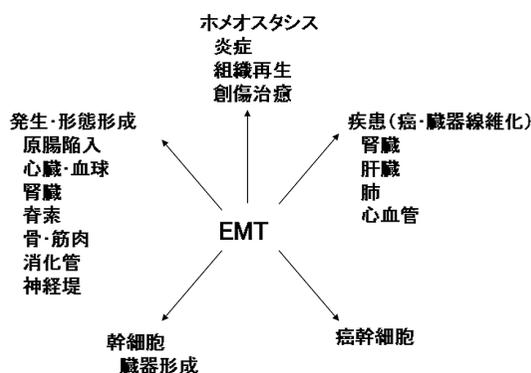


図3 EMT

生物学的・病理学的役割により3つのタイプに分類される。ここでは、1型EMT (発生・形態形成)、2型EMT (ホメオスタシス維持、疾患発症)、3型EMT (癌悪性化) とは別に、幹細胞、癌幹細胞への役割を分類したモデルを記す。

### 3. Type3 EMT

3型 EMT (Type3 EMT) は、腫瘍細胞の悪性細胞への移行過程で重要なステップと考えられている。癌腫においては、上皮性腫瘍細胞が、E-カドヘリンの喪失に伴い腫瘍組織から剥離・離脱し、間葉細胞の如き遊走型形質を獲得し、こうして形質転換した上皮性腫瘍細胞の転移過程で、3型 EMT が重要な役割を担っていると考えられている<sup>36-39)</sup> (図3)。

#### EMT と幹細胞らしさ (stemness)

Mani らは乳腺上皮細胞が EMT 制御因子を導入により、幹細胞としての特徴を備えた細胞が作製されることを報告した<sup>40)</sup>。また、Medici らは血管内皮細胞が EndMT を経由して多能性幹細胞様細胞に変化することを報告した<sup>41)</sup>。その他の組織・臓器 (肺) においても、血管内皮/間葉細胞可塑性を有するマウス胎仔肺間葉細胞が、骨髄由来間葉系幹細胞にきわめて類似した特徴を有することを、筆者らは報告した<sup>42)</sup>。このように、上皮細胞のみならず血管内皮細胞においても、EMT あるいは EndMT を介して幹細胞様の形質を獲得しうることが明らかになってきた (図3)。

#### EMT の分子制御

これまで、生体内で EMT を引き起こす因子を探るため、主に培養細胞を用いた EMT 誘導因子の研究が広く行われてきた。TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), FGFs (fibroblast growth factors; 線維芽細胞増殖因子), HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子), EGF (epidermal growth factor; 上皮細胞増殖因子), PDGF (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子) などの増殖因子の EMT 誘導作用が報告されているが、中でも TGF- $\beta$  は最も代表的な EMT 誘導因子として知られている。また、EMT と EndMT は様々な転写因子による制御を受けていることが知られており、以下にこれら転写因子と血球細胞・造血幹細胞発生や血管発生の関連について論じてみたい。

#### EMT 制御因子 (Snail ファミリー)

Snail は zinc-finger 型転写因子でショウジョウバエから、中胚葉形成に必須の分子として単離され、Snail1-3 と scratch を含めたファミリーを形成し、50 種類以上の遺伝子を含んでいる。これらは、種を越えてよく保存された N 末端の 7~9 アミノ酸, SNAG (SNAIL/GFI-1) ドメイン、および C 末端の zinc-finger 型 DNA 結合ドメイン構造を共有する<sup>43-46)</sup>。中央の SLUG ドメインは Slug に固有である<sup>47)</sup>。Snail が EMT に関与することはニワトリ胚を用いた、Slug (Snail2) の機能阻害実験によって明らかとなった。その後、過剰発現させた Snail が強力に E-カドヘリンの転写抑制をすること、EMT 誘導時に Snail の発現が増加すること、E-カドヘリンプロモーター上に直接結合することが示され、Snail が代表的な EMT 誘導因子の 1 つとされる<sup>48)</sup>。

Snail 遺伝子の完全型ノックアウトマウスの表現型は、中胚葉形成不全による胎生致死 (E7.5) である<sup>49)</sup> が、エピプラスト特異的 Snail 遺伝子ノックアウトマウスでは多発性血管形成異常による胎生致死 (E9.5) となることが報告されている<sup>50)</sup>。今後さらに、Snail 遺伝子の血管内皮細胞における詳細な役割を理解する上で、Snail<sup>fllox/fllox</sup> マウス<sup>51)</sup> と血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウス (VE-カドヘリン Cre や Tie2 Cre マウスなど) を用いたコンディショナルノックアウトマウスの解析が重要と考えられ、その成果が期待される。一方、Slug 遺伝子の完全型ノックアウトマウスは、生存可能で繁殖力を有するが、放射線に対しては感受性が高く、末梢血数減少、多発性微小出血、ならびに微小膿瘍を呈して早期に死亡する<sup>52)</sup>。

また上述の如く、Snail は EMT 制御因子としてのみならず、幹細胞様細胞としての形質の誘導因子および幹細胞機能維持に重要な因子としても働いている。さらに、Snail は癌幹細胞の発生・維持に関与する他、細胞の生存においても重要な働きを担っていることが知られている。

## EMT 制御因子 (Zeb ファミリー)

DNA 結合転写調節因子である ZEB (Zinc finger E-Box binding) ファミリーは 2 つの構造の類似したタンパク質 (Zeb1, Zeb2) を含む<sup>53</sup>。これらの遺伝子構造はきわめて類似しており、N 末端および C 末端に zinc-finger 型 DNA 結合ドメイン構造を有し、ホメオドメイン、Smad タンパク結合ドメインおよび CtBP (carboxy-terminal binding protein) 結合ドメインはより中央に位置する。一方、N 末端の NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) 相互作用モチーフ、別名 NIM (Nucleosome Remodeling and Deacetylase-Interaction Motif) は Zeb2 に特異的である<sup>53-55</sup>。

Zeb1 遺伝子の完全型ノックアウトマウスは、劇的な骨格異常と重度の胸腺萎縮を呈し、生後まもなく死亡する<sup>56</sup>。また、Zeb1 遺伝子の C 末端に位置する zinc finger ドメインを切断した機能喪失型モデルマウスは、生存可能であり骨格異常は見られないが、T リンパ球の分化阻害を呈する<sup>57</sup>。一方、Zeb2 は造血幹細胞および造血前駆細胞に高発現が認められるのに対し、成熟 T 細胞においては発現が低いとされる<sup>58,59</sup>。造血細胞特異的 Zeb2 ノックアウトマウスは脳出血のため胎生致死であり<sup>58</sup>、この表現型は造血の転写調節因子である Runx1 の完全型ノックアウトマウスの表現型に酷似する<sup>16</sup>。Runx1 ノックアウトマウスでは造血幹細胞の発生が完全に喪失するが、Zeb2 ノックアウトマウスでは造血幹細胞の発生は影響を受けない<sup>16,58</sup>。In vitro の分化系解析により、Zeb2 は胎仔における造血幹細胞の初期発生に必須ではなく、その後の分化ならびに遊走・定着に重要であることが示唆されている。

## EMT 制御因子 (GFI1 と GFI1B)

Gfi (Growth factor independence)-1 および Gfi1b は、核内 zinc-finger 型タンパクとして DNA に結合し、転写抑制因子として機能する<sup>60,61</sup>。N 末端の SNAIL/GFI-1 (SNAG) ドメインを介して、これらの抑制機能を発揮する<sup>43</sup>。

GFI1 は造血幹細胞、B および T 細胞、樹状細胞、顆粒球、そしてマクロファージに発現が認められる<sup>62-64</sup>。GFI1 ノックアウトマウスでは重度の好中球減少症が見られ<sup>65</sup>、造血幹細胞の自己再生能が障害を受ける<sup>66,67</sup>。一方、GFI1B は赤芽球と巨核球前駆体に発現が認められる<sup>68</sup>。GFI1B ノックアウトマウスでは、成人型赤血球無形成と巨核球発育阻害により胎生致死 (E14.5) となる<sup>69</sup>。近年、Lancrin らは GFI1 と GFI1B が Runx1 の直接のターゲットであり、EHT の重要な制御因子であることを報告した<sup>70</sup>。同時に彼らは、GFI1 と GFI1B が EHT 過程において血球産生型血管内皮が血管内皮としての特徴を失う際にも重要であることを示した。

## EMT 制御因子 (bHLH ファミリー)

E2A (E-プロテインとも呼ばれる) は bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子であり、E12 と E47 が bHLH のクラス I ファミリーに属する。これらの遺伝子構造はきわめて類似しており、bHLH 領域においてのみ異なる<sup>71</sup>。

E-プロテインは造血幹細胞の維持と系統再生能を制御している<sup>72</sup>。E47 は長期にわたる造血幹細胞の自己再生とエネルギー代謝を制御する一方、短期での活性化や骨髄球系分化への方向付けには関与しないとされる<sup>73</sup>。また、E47 アイソフォーム欠損が B 細胞の減少に至ることより、リンパ球分化過程には E47 のホモダイマーが重要な役割を持つと示唆される。一方、E12 欠損は、正常であるが非効率的な B 細胞分化が見られる<sup>74</sup>。

## シェアストレス

造血幹細胞の発生は心拍動開始による物理的刺戟 (シェアストレス) による Runx1 発現促進により開始すると報告されたが<sup>75,76</sup>、詳細なメカニズムは不明である。興味深いことに、シェアストレスが NF- $\kappa$ B シグナルを介して EndMT をもたらすことが、ニワトリ胚を用いた検討により明らかにされている<sup>77</sup>。また近年、マウスを用いた検討においてもシェアストレスが

EndMTにより心血管リモデリングをもたらすことが示された<sup>33)</sup>。こうした観察は、造血幹細胞が内皮細胞から分化する際には、EndMTを介するメカニズムが働いている事を強く示唆するものである。

## おわりに

これまで見てきたように、造血発生制御機構は様々な因子が複雑に相互作用しながら構築されている。本稿で紹介することができたものはそのうちのごくわずかであるが、今後も *in vivo* イメージングや遺伝子工学分野の技術進歩によ

り、血球産生型血管内皮から造血幹細胞が生じるメカニズムの詳細についても、多くの重要な新しい知見が得られることと思われる。それら研究成果は生物学的な意義だけでなく、移植可能な未分化状態かつ多分化能を保持した造血幹細胞の *ex vivo* での増幅技術、正常造血制御の破綻による白血病や血液疾患発症機構の解明と新規治療法開発の分子基盤ともなり得ると期待される。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## 文 献

- 1) Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 1971; 170: 199-223.
- 2) Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970; 18: 279-96.
- 3) Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 1999; 126: 5073-84.
- 4) Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, Godin I. Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 2001; 15: 477-85.
- 5) de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, Dzierzak E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* 2000; 19: 2465-74.
- 6) Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897-906.
- 7) Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994; 1: 291-301.
- 8) Corbel C, Salaun J, Belo-Diabangouaya P, Dieterlen-Lievre F. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois. *Dev Biol* 2007; 301: 478-88.
- 9) Dieterlen-Lievre F, Corbel C, Salaun J. Allantois and placenta as developmental sources of hematopoietic stem cells. *Int J Dev Biol* 2010; 54: 1079-87.
- 10) Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, Dieterlen-Lievre F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 2003; 130: 5437-44.
- 11) Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 2005; 8: 365-75.
- 12) Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, de Mesy-Bentley KK, Waugh R, Palis J. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood* 2007; 109: 1433-41.
- 13) Bertrand JY, Traver D. Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 243-8.
- 14) Li Z, Lan Y, He W, Chen D, Wang J, Zhou F, Wang Y, Sun H, Chen X, Xu C, Li S, Pang Y, Zhang G, Yang L, Zhu L, Fan M, Shang A, Ju Z, Luo L, Ding Y, Guo W, Yuan W, Yang X, Liu B. Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 663-75.
- 15) Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-64.
- 16) Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromoso-

- mal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-30.
- 17) Yokomizo T, Hasegawa K, Ishitobi H, Osato M, Ema M, Ito Y, Yamamoto M, Takahashi S. Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* 2008; 111: 4075-80.
  - 18) Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009; 457: 892-5.
  - 19) Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009; 457: 887-91.
  - 20) Iacovino M, Chong D, Szatmari I, Hartweck L, Rux D, Caprioli A, Cleaver O, Kyba M. HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 72-8.
  - 21) Niki M, Okada H, Takano H, Kuno J, Tani K, Hibino H, Asano S, Ito Y, Satake M, Noda T. Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5697-702.
  - 22) Miller J, Horner A, Stacy T, Lowrey C, Lian JB, Stein G, Nuckolls GH, Speck NA. The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. *Nat Genet* 2002; 32: 645-9.
  - 23) Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994; 371: 221-6.
  - 24) Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in yolk sac hematopoiesis in *Mill*-null embryos. *Blood* 1997; 90: 1799-806.
  - 25) Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 2009; 457: 896-900.
  - 26) Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010; 464: 112-5.
  - 27) Rafii S, Kloss CC, Butler JM, Ginsberg M, Gars E, Lis R, Zhan Q, Jospovic P, Ding BS, Xiang J, Elemento O, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Sadelain M, Rafii JA, James D. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 2013; 121: 770-80.
  - 28) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-90.
  - 29) Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1438-49.
  - 30) Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-8.
  - 31) Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429-37.
  - 32) Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-9.
  - 33) Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 952-61.
  - 34) Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-47.
  - 35) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13180-5.
  - 36) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-54.
  - 37) Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; 14: 818-29.
  - 38) Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol* 2008; 9: 808.
  - 39) Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10356-61.
  - 40) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A,

- Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-15.
- 41) Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 2010; 16: 1400-6.
- 42) Yamamoto Y, Baldwin HS, Prince LS. Endothelial differentiation by multipotent fetal mouse lung mesenchymal cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1455-65.
- 43) Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6263-72.
- 44) Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-9.
- 45) Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76-83.
- 46) Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3951-7.
- 47) Cobaleda C, Perez-Caro M, Vicente-Duenas C, Sanchez-Garcia I. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu Rev Genet* 2007; 41: 41-61.
- 48) Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 155-66.
- 49) Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8184-8.
- 50) Lomeli H, Starling C, Gridley T. Epiblast-specific Snail deletion results in embryonic lethality due to multiple vascular defects. *BMC Res Notes* 2009; 2: 22.
- 51) Murray SA, Carver EA, Gridley T. Generation of a Snail1 (Snail) conditional null allele. *Genesis* 2006; 44: 7-11.
- 52) Inoue A, Seidel MG, Wu W, Kamazono S, Ferrando AA, Bronson RT, Iwasaki H, Akashi K, Morimoto A, Hitzler JK, Pestina TI, Jackson CW, Tanaka R, Chong MJ, McKinnon PJ, Inukai T, Grosveld GC, Look AT. Slug, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer Cell* 2002; 2: 279-88.
- 53) Fortini ME, Lai ZC, Rubin GM. The Drosophila zfh-1 and zfh-2 genes encode novel proteins containing both zinc-finger and homeodomain motifs. *Mech Dev* 1991; 34: 113-22.
- 54) Vandewalle C, Van Roy F, Bex G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 773-87.
- 55) Verstappen G, van Grunsven LA, Michiels C, Van de Putte T, Souopgui J, Van Damme J, Bellefroid E, Vandekerckhove J, Huylebroeck D. Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFH1B/SIP1 and NuRD corepressor complex. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1175-83.
- 56) Takagi T, Moribe H, Kondoh H, Higashi Y. DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development* 1998; 125: 21-31.
- 57) Higashi Y, Moribe H, Takagi T, Sekido R, Kawakami K, Kikutani H, Kondoh H. Impairment of T cell development in deltaEF1 mutant mice. *J Exp Med* 1997; 185: 1467-79.
- 58) Goossens S, Janzen V, Bartunkova S, Yokomizo T, Drogat B, Crisan M, Haigh K, Seuntjens E, Umans L, Riedt T, Bogaert P, Haenebalcke L, Bex G, Dzierzak E, Huylebroeck D, Haigh JJ. The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. *Blood* 2011; 117: 5620-30.
- 59) Postigo AA, Dean DC. Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6391-6.
- 60) Tong B, Grimes HL, Yang TY, Bear SE, Qin Z, Du K, El-Deiry WS, Tschlis PN. The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2462-73.
- 61) Zweidler-McKay PA, Grimes HL, Flubacher MM,

- Tsichlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4024-34.
- 62) Khandanpour C, Sharif-Askari E, Vassen L, Gaudreau MC, Zhu J, Paul WE, Okayama T, Kosan C, Moroy T. Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood* 2010; 116: 5149-61.
- 63) van der Meer LT, Jansen JH, van der Reijden BA. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. *Leukemia* 2010; 24: 1834-43.
- 64) Yucel R, Kosan C, Heyd F, Moroy T. Gfi1: green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *J Biol Chem* 2004; 279: 40906-17.
- 65) Karsunky H, Zeng H, Schmidt T, Zevnik B, Kluge R, Schmid KW, Duhren U, Moroy T. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 2002; 30: 295-300.
- 66) Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431: 1002-7.
- 67) Zeng H, Yucel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Moroy T. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *Embo J* 2004; 23: 4116-25.
- 68) Vassen L, Okayama T, Moroy T. Gfi1b: green fluorescent protein knock-in mice reveal a dynamic expression pattern of Gfi1b during hematopoiesis that is largely complementary to Gfi1. *Blood* 2007; 109: 2356-64.
- 69) Saleque S, Cameron S, Orkin SH. The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes Dev* 2002; 16: 301-6.
- 70) Lancrin C, Mazan M, Stefanska M, Patel R, Lichtinger M, Costa G, Vargel O, Wilson NK, Moroy T, Bonifer C, Gottgens B, Kouskoff V, Lacaud G. GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood* 2012; 120: 314-22.
- 71) Conlon TM, Meyer KB. Cloning and functional characterisation of avian transcription factor E2A. *BMC Immunol* 2004; 5: 11.
- 72) Semerad CL, Mercer EM, Inlay MA, Weissman IL, Murre C. E2A proteins maintain the hematopoietic stem cell pool and promote the maturation of myelolymphoid and myeloerythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1930-5.
- 73) Yang Q, Esplin B, Borghesi L. E47 regulates hematopoietic stem cell proliferation and energetics but not myeloid lineage restriction. *Blood* 2011; 117: 3529-38.
- 74) Beck K, Peak MM, Ota T, Nemazee D, Murre C. Distinct roles for E12 and E47 in B cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci. *J Exp Med* 2009; 206: 2271-84.
- 75) Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, McKinney-Freeman S, Mack PJ, Gracia-Sancho J, Suchy-Dacey A, Yoshimoto M, Lensch MW, Yoder MC, Garcia-Cardena G, Daley GQ. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* 2009; 459: 1131-5.
- 76) North TE, Goessling W, Peeters M, Li P, Ceol C, Lord AM, Weber GJ, Harris J, Cutting CC, Huang P, Dzierzak E, Zon LI. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell* 2009; 137: 736-48.
- 77) Arciniegas E, Carrillo LM, De Sanctis JB, Candelle D. Possible role of NFkappaB in the embryonic vascular remodeling and the endothelial mesenchymal transition process. *Cell Adh Migr* 2008; 2: 17-29.

## 著者プロフィール



山元 康敏 Yasutoshi Yamamoto

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学・助教

略 歴：1994年3月 京都府立医科大学医学部卒業

1994年6月 京都府立医科大学小児内科

2007年7月～2010年9月

Vanderbilt University School of Medicine 研究員

2010年10月～現職

専門分野：生化学，小児循環器病学，発生生物学，血管生物学

- 主な業績：1. Yamamoto Y, Baldwin HS, Prince LS. Endothelial differentiation by multipotent fetal mouse lung mesenchymal cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1455-1465.
2. Blackwell TS, Hipps AN, Yamamoto Y, Han W, Barham WJ, Ostrowski MC, Yull FE, Prince LS. NF- $\kappa$ B signaling in fetal lung macrophages disrupts airway morphogenesis. *J Immunol* 2010; 187: 2740-2747.
3. Benjamin JT, Carver BJ, Plosa EJ, Yamamoto Y, Miller JD, Liu JH, van der Meer R, Blackwell TS, Prince LS. NF-kappaB activation limits airway branching through inhibition of Sp1-mediated fibroblast growth factor-10 expression. *J Immunol* 2010; 185: 4896-4903.
4. Wang H, Ding T, Brown N, Yamamoto Y, Prince LS, Reese J, Paria BC. Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev Biol* 2008; 318: 112-125.
5. Yamamoto Y, Shiraishi I, Dai P, Hamaoka K, Takamatsu T. Regulation of embryonic lung vascular development by vascular endothelial growth factor receptors, Flk-1 and Flt-1. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007; 290: 958-973.