

<特集「造血制御・造血器腫瘍研究の最前線」>

造血発生制御メカニズムの今日的理解

横田明日美, 奥田 司

京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学*

Current Topics in Regulatory Mechanisms of Hematopoiesis

Asumi Yokota and Tsukasa Okuda

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

抄 録

造血幹細胞は個体の一生を通じて、自己複製を繰り返し自らを幹細胞として維持しながらも、絶えず分化し全系統の血液細胞を産生することができる。その制御機構には、様々な因子が複雑に作用し合っており、転写因子による遺伝子発現制御、そしてサイトカインやケモカイン、接着因子等を介した間質細胞との相互作用などがある。また、造血幹細胞の存在するニッチと呼ばれる特殊な微小環境の特性、骨組織の内部であり、かつ低酸素環境であることも重要であると考えられている。

個体発生のプロセスにおいて、このような成体型造血を行う造血幹細胞は、AGM 領域といわれる場所において背側大動脈の腹側血管腔より現れ、その後胎仔肝、骨髄へとその住処を移す。胎生期における造血発生のメカニズムや造血幹細胞の制御因子は、成体型造血とは異なる点も多い。加えて、こうした造血制御に関わる転写因子群には、その変異によって造血器腫瘍を引き起こす標的遺伝子となっているものも多く、発症機序の理解においても重要である。本稿では、造血幹細胞の胎生期における制御機構と共に、成体骨髄における造血制御機構についても述べる。

キーワード：造血幹細胞, 胚型造血, 成体型造血, 微小環境.

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) retain their potency of self-renewing and differentiating toward all hematopoietic lineages in the bone marrow (BM) throughout adult life. The regulatory mechanisms of hematopoiesis contain various factors, including transcriptional factors, cytokines, chemokines, and adhesion molecules. The stromal cells also interact with HSCs in the specialized microenvironment, called the BM niche, and are involved in regulating them.

In the process of ontogeny, HSCs emerge from the vascular wall of the dorsal aorta within the AGM region. The definitive hematopoiesis subsequently initiates in the fetal liver, followed by colonization of the bone marrow. The molecules regulating early hematopoiesis in the embryo are largely different from those involved in adult hematopoiesis. In addition, many of these transcriptional factors regulating hematopoiesis are known to serve as target genes responsible for hematological malignancies.

Here we will review the regulatory mechanisms of hematopoiesis both in embryonic stage and in adult BM.

Key Words: Hematopoietic stem cell, Primitive hematopoiesis, Definitive hematopoiesis, Microenvironment.

はじめに

哺乳類の造血発生は、大きく二つのステージに分けることができる。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 AGM (aorta-gonad-mesonephros) 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。このように、造血の場が変化すること、また、特に哺乳類の胚発生は母体内で起こること、成体型造血の主たる場となる骨髄も、明確な臓器としての形態を持たない上に骨組織の中に存在するため観察も困難であることから、発生過程での造血幹細胞の起源はどこであるのか、そしてその制御機構の詳細については未だに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 *in vivo* imaging 技術等の進歩によって、研究者が観察することが可能な領域は広がり、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最近の新しい報告についても述べてみたい。

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日目に、胚仔体外の卵黄嚢 (yolk sac) において起こる。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ものである。血液細胞と血管内皮細胞は共通祖先の細胞から分化すると考えられており、この細胞を「hemangioblast」と呼ぶ。一次造血において形成される最初の血液細胞は赤血球が主であるが、成体型の二次造血でつくられる赤血球とは異なり大型で、成熟しても有核である。また、この時期特異的な胚仔型のグロビン遺伝子 (β H1, ζ , ϵ) を発現していることも特徴である。さらに、赤血球のみではなく、巨核球¹⁾ やマクロファージ²⁾ も産生されるという報告がなされている。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10.5日目頃より、胎仔体内の AGM 領域と呼ばれる部位の背側大動脈内腔から造血幹細胞が発生することで始まる。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るが、この時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とから、血液細胞に分化可能な性質をもつ血管内皮細胞、つまり「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。この造血幹細胞は、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 γ 線照射した成体マウスに移植すると長期に骨髄再構築をすることができる、LT-HSC (long-term repopulating hematopoietic stem cell) 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運ばれ定着し、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その住処を移し、骨髄が成体の一生を通じた造血の場となるのである。

出生後、造血幹細胞は骨髄間質細胞やそれら細胞成分から産生、放出されるサイトカイン、ケモカイン等から成る「ニッチ (niche)」と呼ばれる特殊な骨髄微小環境による制御を受けることになる。

卵黄嚢, AGM 領域での造血制御

1. 血島での造血—Hemangioblast からの血液細胞発生モデル—

卵黄嚢は前述の通り、血島において血管内皮細胞との共通祖先である hemangioblast から血液細胞が初めて産生される場であると考えられている。hemangioblast は中胚葉細胞のマーカー Brachyury と血管内皮細胞のマーカー Flk-1 (Fetal liver kinase-1) を発現しており³⁾, この2つのマーカーを用いたマウス原腸胚の研究により、Branchyury⁺Flk-1⁺ の hemangioblast は原始線条 (primitive streak) の後側に主に存在することが示され、卵黄嚢での血島形成以前の段階で既に血液細胞と血管内皮細胞への分化決定が起こっている可能性が示唆された⁴⁾。さらに、*flk1* (内皮細胞マーカー) と *gata1* (赤血球マーカー) 遺伝子プロモータ下にそれぞれ蛍光タンパクが発現するトランスジェニックゼブラフィッシュの原腸胚の観察によっても、hemangioblast の存在が示唆された⁵⁾。ゼブラフィッシュは造血発生の研究において、きわめて有用な脊椎動物モデルであるが、これについては後の章で述べることとする。

2. 一次 (胚型) 造血の制御

一次造血制御の分子メカニズムについては、2種のノックアウトマウスが最初の手がかりを与えた。

T細胞性白血病において、染色体転座による遺伝子発現活性化が高頻度で見られる転写因子 Scl (Stem cell leukemia)/Tal-1 (T-cell acute lymphocytic leukemia) をノックアウトすると、マウスは胎生 8.5~10.5 日目の間に死亡する。このマウスは、卵黄嚢での血液細胞産生が完全に欠如しており、*in vitro* での colony assay においても、Scl ノックアウトマウス卵黄嚢由来の細胞は全く血球コロニーを形成しないことが示さ

れ、一次造血の段階で Scl は非常に重要な役割を担っていることが明らかとなった⁶⁾。また、胚様体からの血液細胞分化誘導の検討からも、このことが支持された。胚様体は、LIF (leukemia inhibitory factor) などを除き未分化状態維持を解除した条件で ES 細胞を浮遊培養して得られる、初期胚に似た細胞塊であり、様々な系統の細胞に分化誘導可能である。胚様体を分化誘導して得られる blast colony-forming cell (BL-CFC) は、血液細胞と血管内皮細胞から成るコロニーを形成し、卵黄嚢における hemangioblast と同等の細胞集団であるとされている。この BL-CFC は Scl を発現していないこと、そして *Scl*^{-/-}Flk-1⁺ の胚様体は血球コロニーを形成できないことから、Scl は hemangioblast の発生には重要ではないものの、hemangioblast から血液細胞が分化する過程に必須であることが示唆されている⁷⁾。

Lmo2 (LIM domain only 2)/Rbtl2 も同様に、T細胞性白血病で見られる染色体相互転座に関連して同定された転写因子であり、Scl や GATA1 などと共に複合体を形成することが知られている^{8,9)}。Lmo2 のノックアウトマウスは、卵黄嚢での血島形成と一次造血特徴的な核赤血球が全く見られず、胎生 10.5 日目頃に死亡することが報告されている¹⁰⁾。このことから、Lmo2 は GATA-1 同様¹¹⁾、胚型造血の初期発生に重要であることが示唆されている。

3. 二次 (成体型) 造血の制御

二次造血は、前述のように「hemogenic endothelium」と呼ばれる血液細胞への分化能を保持した特殊な血管内皮細胞により造血幹細胞が産生されることで開始される。細胞表面マーカーの発現としては、Flk-1⁺Branchyury⁻, Tie2^{hi}, c-Kit⁺, CD41⁻ であるとされる。Scl^{-/-}ES 細胞由来 Flk-1⁺ 細胞を *in vitro* で培養し、細胞表面マーカーの変化をフローサイトメトリーで経時的に観察した検討により、Scl^{-/-}Flk-1⁺ 細胞から Tie2⁺c-Kit⁺ の細胞集団は現れず、CD41⁺ 細胞も全く同定されなかった。このことから、Scl は hemangioblast から hemogenic endothelium への方向づけに必須であることが示唆され¹²⁾、前述の D'Souza らの報告とも一致する。

さらに、二次造血が開始される AGM 領域からの血液細胞産生が障害されるノックアウトマウスの解析からも、重要な制御因子が明らかにされた。

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 1) とも呼ばれるように、急性骨髄性白血病で最も高頻度に染色体相互転座の標的となる遺伝子である。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¹³⁾。その後 *Runx1*^{-/-} マウスの一次造血の詳細な解析から、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報告された¹⁴⁾。

また、*Runx1*^{-/-} ES 細胞由来の Flk-1⁺ 細胞を *in vitro* で培養した結果から、Runx1 は hemogenic endothelium の形成には必須ではないが hemogenic endothelium から血液細胞が産生されるプロセスに不可欠な因子であることが示された¹²⁾ (図 1)。別のグループによって、VE (vascular

endothelial)-Cadherin 発現細胞で Runx1 をコンディショナルにノックアウトしたマウスの解析結果が報告された。VE-Cadherin は胎生 7.5 日目には卵黄嚢でも一過性に発現され、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。彼らもまた、VE-Cadherin⁺ の血管内皮細胞から造血幹細胞が産生されるプロセスに Runx1 が必須となることを示した¹⁵⁾。

Runx1 の共役因子である CBF β (core binding factor β) 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ものの、胎仔肝での二次造血が重度の障害を受けることが知られている¹⁶⁾。Tie2 プロモータ下で血管内皮細胞、造血前駆細胞特異的に CBF β を発現させると、胎仔肝での二次造血は回復するものの、骨髄球、リンパ球系統への分化は障害されることから、CBF β 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¹⁷⁾。

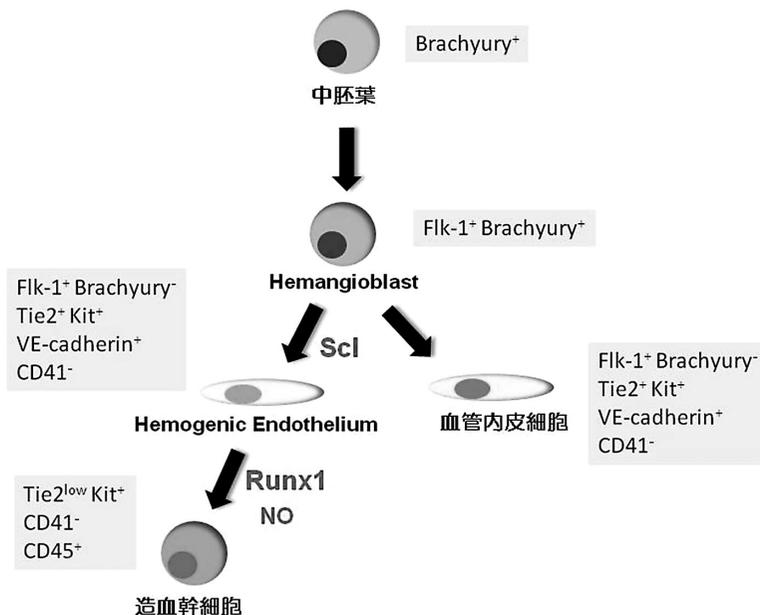


図 1. Hemangioblast, Hemogenic Endothelium を介する造血幹細胞発生のモデル
ここでは、Hemangioblast を経て Hemogenic Endothelium, 造血幹細胞となるモデルの 1 つを示す。

その他、GATA-2¹⁸⁾ や MLL¹⁹⁾ 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ており、多様な転写因子がその時期特異的、また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。

4. ゼブラフィッシュを用いた AGM 領域での造血幹細胞発生プロセスの可視化

哺乳類における造血幹細胞の誕生の場は胚仔内であるため、その観察は極めて困難であるが、ゼブラフィッシュは非常に有用な動物モデルである。体外で受精・発生を行う上、発生のスピードは早く、受精後 24 時間で器官形成はほぼ全て終了する。そして、最も重要な点の一つであるが、発生の全期間を通して胚が透明であるため、目的分子を蛍光タンパクとの融合蛋白として発現させ観察することが可能であり、発現時期や部位をきた胚で経時的に調べることができる。加えて、造血巣の消長や貧血の出現の情報も、透明な生体を通して血液自体の赤色を観察することで得ることができる。このような特性を利用して、*in vivo imaging* により AGM 領域における造血幹細胞の発生プロセスが詳細に観察された。

血管内皮細胞を *kdrl (flk1)*⁺、造血幹細胞を *cmyb*⁺ とし、それぞれ蛍光タンパクの発現として観察可能なトランスジェニック個体において、背側大動脈の血管内腔を覆う *kdrl*⁺*cmyb*⁻ 血管内皮細胞から *kdrl*⁺*cmyb*⁺ の hemogenic endothelium を経た後、この細胞から *kdrl*⁻*cmyb*⁺ 造血幹細胞が出現することが示された²⁰⁾。また、同時に別のグループからもやはりゼブラフィッシュ胚において、背側大動脈の腹側血管壁を血管内皮細胞が大動脈下のスペースに遊走し、その血管内皮細胞自体が造血幹細胞になる「endothelial hematopoietic transition (EHT)」と新たに提唱される細胞動態をとることが示された。彼らはこの EHT に Runx1 の発現が重要であることも示している²¹⁾。この報告をサポートするように、Lam らのグループもゼブラフィッシュ胚の *in vivo imaging* によって、背側大動脈下に

において血管内皮細胞が造血幹細胞に分化すること、そしてこの現象が Runx1 の発現、背側大動脈の正常な発生と血流に依存していることを報告した²²⁾。また、最近マウス胚においても、胚スライスを培養下に観察することで、背側大動脈における造血幹細胞発生の *in vivo imaging* を行う試みがなされている²³⁾。

5. 物理刺激も重要な造血制御因子となる

AGM 領域における造血制御について、物理学的な作用を介した制御も重要であるとする興味深い報告が、ゼブラフィッシュとマウス胚において最近発表された。

まずゼブラフィッシュ胚を用いた検討によって、心拍動開始でもたらされる血流による背側大動脈の剪断応力増加が、AGM 領域での造血幹細胞発生の引き金となることが示された。心拍動開始以降のゼブラフィッシュ胚に、Digoxin など血流を上昇させる薬剤を投与した場合、*runx1/cmyb*⁺ で示される造血幹細胞は背側大動脈で増加したが、逆に Ergotamine など血流を低下させる薬剤を投与した場合には造血幹細胞数は減少しており、心拍動の起こらない *silent heart* 変異体では野生型ゼブラフィッシュ胚と比較してやはり造血幹細胞数は減少していた。しかし、L-Arginine や SNAP など NO 供与体を投与した場合には、心拍動開始以前でも造血幹細胞数を増加し得た。これらより、血流による剪断応力は背側大動脈の血管内皮細胞での NO 産生を刺激することによって、造血幹細胞の発生を促すことが示唆された²⁴⁾ (図 2)。

一方、ほぼ同時期に、マウスにおいても同様の検討が行われた。ES 細胞、またマウス胚 P-Sp, AGM 領域由来細胞の分化誘導培養において、AGM 領域で二次造血が始まる胎生 10.5 日目の心拍動に対応した剪断応力相当の刺激を培養ディッシュ上で与えると、CFU-C 数は増加し、また赤血球、B リンパ球など分化した細胞数も増加していた。興味深いことに、剪断応力刺激を与えた細胞において Runx1 の遺伝子発現が増加しており、剪断応力刺激による現象は Runx1 を介したものであることが示唆された。Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体である Ncx1 のノックアウトマ

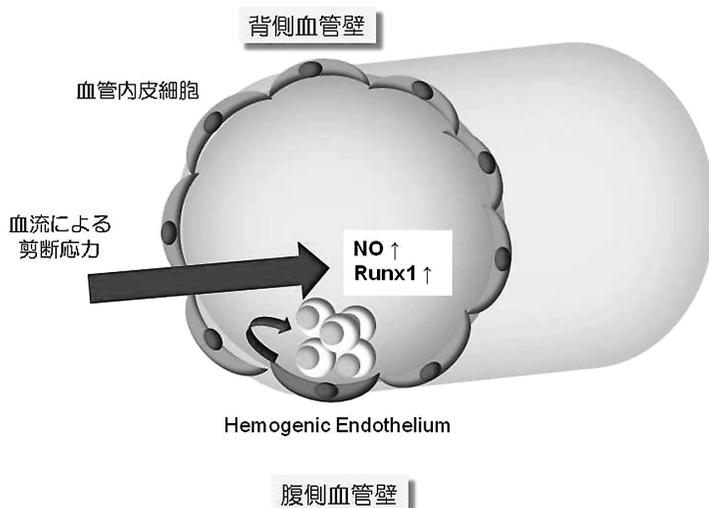


図2. 背側大動脈からの造血幹細胞発生のモデル
造血幹細胞は背側大動脈の腹側血管壁の Hemogenic Endothelium から発生し、血流による物理的的刺激も重要であるとされる。

ウスは心拍動、血液循環が起こらない表現型をもち、このマウス胚のP-Spから単離された細胞においてもやはり、Runx1の発現は低かったが、剪断応力刺激によって発現は増加し、CFU-C形成能も回復している²⁵⁾。

これらの報告は、定常状態において血流による物理的的刺激が造血制御に重要な遺伝子発現を活性化させ、造血幹細胞の分化や増殖にも影響を与えることを示唆し、胎生期における造血発生のみならず成体での造血制御にも同様の物理的的刺激を介した制御の存在が強く予想される。

造血発生における胎盤の役割

卵黄嚢とAGM領域以外にも造血発生の場としての機能が推測されているものとして、尿膜と胎盤がある。尿膜は、ニワトリ胚においてまず造血前駆細胞、血管内皮前駆細胞の存在が示されたものの²⁶⁾、マウスにおいては否定的であったが²⁷⁾、その後マウス胚においても造血組織として機能しているとする報告がなされている²⁸⁾。一方、胎盤も主要な造血組織であるとも考えられている(図3)。マウスにおいて胎生8.5日目に卵黄嚢で血液前駆細胞が現れた後に胎盤

においてもその存在が確認され、Runx1やSclの遺伝子発現が胎盤で認められることがこのことを支持する²⁹⁾。また、胎生10.5日目頃に胎盤において造血幹細胞の出現、増幅が起こっており、AGM領域での二次造血開始とほぼ並行していることも示され、成体型の二次造血を開始する造血幹細胞の供給源、「ニッチ」としての胎盤の役割が報告された³⁰⁾。さらに、胎盤の組織学的検索、*in situ* hybridizationによる遺伝子発現パターンの解析から、特に胎盤迷路部の血管網が造血幹細胞のニッチであり、Runx1発現細胞は血管腔内、血管内皮細胞に局在しており、AGM領域と同様に、胎盤迷路部でもRunx1は造血細胞の発生に関与している可能性が示唆された³¹⁾。そして、ヒトの胎盤においてもマウスと同様に造血幹細胞のニッチとしての機能を有する可能性が報告され³²⁾、個体発生の過程での造血制御のより深い理解と共に、臍帯血とおなじく、移植や再生医療において胎盤由来の造血幹細胞の利用も期待される。

胎仔肝から骨髄へ

AGM領域で産生された造血幹細胞は、血液

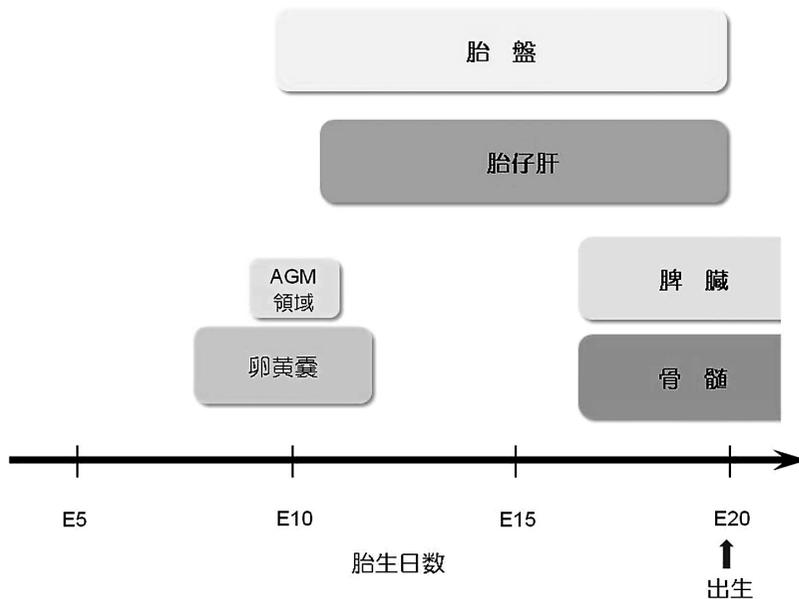


図3. マウスにおける個体発生期の造血組織の変遷
横軸には受精時をE0として胎生期間の日数を示す。ヒトと異なり、マウスにおいては脾臓も成体での主な造血組織となっている。

循環によって胎仔肝へと播種され、マウス胎生10.5日目頃から胎仔肝は主要な造血組織となる。胎仔肝では造血幹細胞が全系統の血液細胞に分化し、成体型造血を行うが、この段階での造血幹細胞の自己複製、分化能に重要な分子として、Cited2 (cAMP-responsive element-binding protein [CBP]/p300-interacting transactivators with glutamic acid [E] and aspartic acid [D]-rich tail 2), EPCR (endothelial protein C receptor) などが報告されている。

Cited2はp300やCBPと結合することで、その転写活性を調節する機能をもっていると考えられているが、Cited2ノックアウトマウスは胎生致死であり、心臓形成異常、神経管形成異常などがみられる³³⁾。Cited2ノックアウトマウスは胎生15日目頃の胎仔肝の造血幹細胞、各系統の血液細胞数も野生型と比して減少しており、骨髄再構築能も顕著に低下しており、この機序としてはCited2がBmi-1やGATA-2, LEF-1, Notch-1など造血幹細胞の生存や自己複製などに関与する遺伝子の転写調節を担っていることが考え

られている³⁴⁾。また、この分子はその後、成体での造血幹細胞の維持にも必須であることがコンディショナルノックアウトマウスの解析によって報告されている³⁵⁾。

一方、EPCRはI型膜貫通型糖タンパクであり、血管内皮細胞、肝臓の血管類洞、白血球や単球での発現が報告されている分子である。EPCR⁺かつlineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁺(KSL)の長期骨髄再構築能を有した造血幹細胞は、胎仔肝の血管類洞に存在する、リンパ管マーカーLyve-1陽性の血管内皮細胞近傍に局在しており、Lyve-1⁺血管内皮細胞が胎仔肝ニッチを構成する可能性が考えられた。また、造血幹細胞に発現しているEPCRがこのニッチとの相互作用に関与していると考えられ、これまでの知見に乏しい胎仔肝での造血幹細胞の維持機構にも関わり興味深い³⁶⁾。

造血幹細胞はその後、出生直前には成体での造血の場となる骨髄へとその住処を移すことになる。SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)はCXCL12とも呼ばれるCXCモチーフをもつケモ

カインの一種であり、このプロセスで重要な役割を担う分子である。SDF-1はその受容体CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)を発現している細胞に対して濃度勾配によって細胞遊走を引き起こす。SDF-1ノックアウトマウスは、胎生期のB細胞産生と骨髄での造血が障害されており³⁷⁾、CXCR4ノックアウトマウスでも同様の表現型が認められている³⁸⁾。また、SDF-1は胎仔骨髄の血管内皮細胞近傍に局在していることが明らかとなり、骨髄中に存在しているSDF-1がCXCR4⁺造血幹細胞を胎仔肝から骨髄に遊走させ、定着させるプロセスに必須であることが示唆された³⁹⁾。このSDF-1とCXCR4の相互作用は成体における造血幹細胞の骨髄ニッチへの局在にも重要な役割を果たす。成体骨髄では、CAR (CXCL12-abundant reticular)細胞と呼ぶ特徴的な間質細胞がSDF-1の供給源となっており、造血幹細胞は骨髄中でCAR細胞の近傍に局在していることも明らかとなった⁴⁰⁾。

これまで見てきたように、胎仔肝での二次造血、そして骨髄への定着と、造血幹細胞は個体発生のプロセスでダイナミックな細胞動態を示す。最後に、造血幹細胞が成体の個体の一生を通じて維持される骨髄での造血制御機構についても触れてみたい。

骨髄微小環境における造血制御

成体の骨髄微小環境については、現在主に骨芽細胞ニッチと血管内皮細胞ニッチのモデルが提唱されている。骨芽細胞は骨内膜に沿って存在し、石灰化やI型コラーゲン等骨基質タンパクの産生によって、骨形成を担当する間質細胞である。長骨の骨端部分には、骨梁が複雑に張り巡らされた海綿骨領域があり、この部分に骨芽細胞ニッチは存在すると考えられている。骨芽細胞は、NotchリガンドであるJagged-1や、N-cadherin, Angiopoietin, Osteopontin, TPO (thrombopoietin)等の接着因子やサイトカインを発現しており、これらを介して造血幹細胞の未分化能や自己複製能、細胞周期静止期の維持の制御に関わるとされている⁴¹⁻⁴⁵⁾。また、交感神経が骨芽細胞の機能を制御することで造血幹細

胞の動態に影響を与えるとする報告もあり^{46,47)}、骨芽細胞ニッチは多様な構成因子から成る。骨芽細胞の発現するRANKL (receptor activator NF- κ B ligand)によって単球・マクロファージ系統より分化誘導される破骨細胞も、骨吸収の過程で骨基質から放出するカルシウムイオンの濃度勾配によってcalcium-sensing receptor (CaR)を発現している造血幹細胞を骨髄ニッチにホーミングさせ⁴⁸⁾、また骨基質タンパクを分解する酵素Cathepsin KやMMP-9 (matrix metalloproteinase-9)によってSCF (stem cell factor)やSDF-1を切断し、ニッチ環境を修飾することで造血幹細胞を制御している⁴⁹⁾。

最近、神経幹細胞のマーカーとして知られるnestin陽性MSC (mesenchymal stem cell)が、交感神経やカルシウム代謝に関わるホルモンの制御を受けながら造血幹細胞の維持を担うニッチを構成するとの報告や⁵⁰⁾、ビタミンD受容体のノックアウトマウスは細胞外カルシウムイオン濃度が低下するために造血幹細胞が骨髄ニッチに留まることができず、末梢循環中や脾臓へと局在が変化するとの報告がなされた⁵¹⁾。これらはカルシウムと骨代謝、そして造血制御をリンクさせる興味深い知見であろう。

一方、血管内皮細胞ニッチは骨髄の類洞 (sinusoid)の血管内皮細胞により構成され、骨芽細胞ニッチと同じく造血幹細胞の幹細胞性維持に関与している⁵²⁾。肝臓、脾臓などで髄外造血が起こる場合、つまり骨芽細胞ニッチのない環境では、血管内皮細胞は造血幹細胞を制御するニッチとして重要であると考えられている。また、巨核球の成熟、血小板の末梢循環への放出も血管内皮細胞ニッチが制御しており、血管内皮細胞ニッチへの巨核球の遊走にSDF-1が、また血管内皮細胞とCD41⁺巨核球のVE-cadherinを介した接着にはFGF-4 (fibroblast growth factor-4)が関与しているとの報告もあり⁵³⁾、血管内皮細胞ニッチは造血制御において骨芽細胞ニッチと異なる役割を担っている可能性があると考えられる。

これらの接着因子、サイトカインやケモカインの他、骨髄の低酸素環境も造血幹細胞の維持

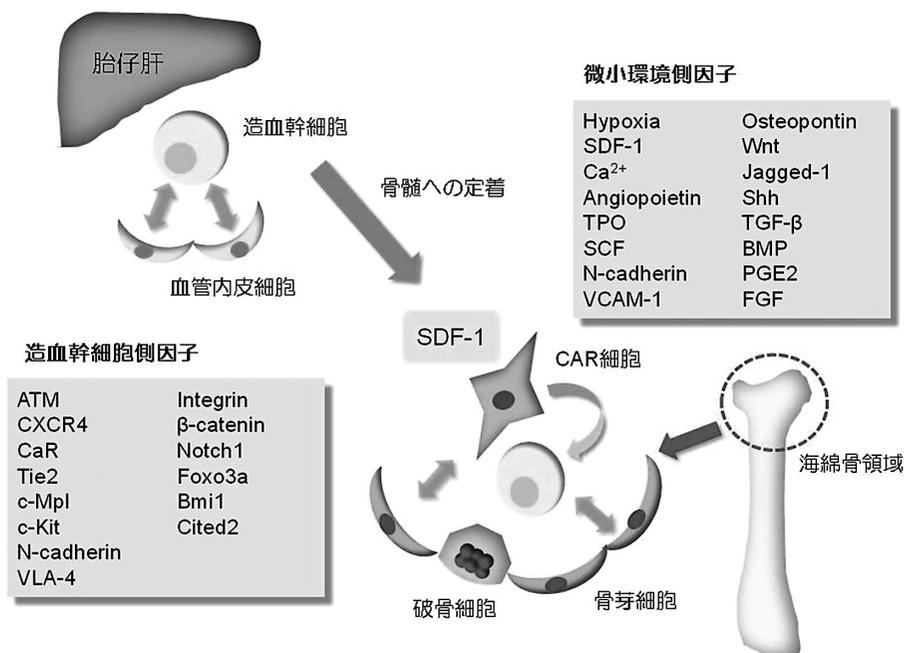


図4. 骨髄微小環境における造血制御に関わる因子
造血幹細胞の胎仔肝から骨髄への定着, そして成体において造血幹細胞の機能制御に重要であると報告されている分子を示す。(VLA-4; Very late antigen-4, Shh; Sonic hedgehog, TGF- β ; Transforming growth factor- β , BMP; Bone morphogenetic protein, VCAM-1; Vascular cell adhesion molecule-1, PGE2; Prostaglandin E2)
※本文中に略語表記の出ているものについては説明を省略する。

に重要な役割を果たす。造血幹細胞のニッチが低酸素環境であることは以前から報告されており^{54,55)}, 約1~6%程度の濃度であるとされる。細胞周期チェックポイント分子である ATM (ataxia telangiectasia mutated) は DNA 損傷修復に関わるが, ATM ノックアウトマウスの造血幹細胞は細胞内に活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) が蓄積することで細胞老化 (senescence) が引き起こされ, その結果, 造血幹細胞は自己複製能を失い枯渇する。このことは, ROS が造血幹細胞において p38MAPK を活性化させ, p16^{INK4a} の発現を上昇させることに起因することが示されている^{56,57)}。したがって, 低酸素環境の骨髄内のニッチにおいて造血幹細胞内の ROS を低濃度に保つことで, 酸化ストレスによる傷害から造血幹細胞を保護し, その自己複製能を維持することも, ニッチの造血制御における役割として重要であると考えられる (図4)。

おわりに

これまで見てきたように, 様々な因子が複雑に相互作用しながら造血発生制御機構を構築しており, 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* imaging や遺伝子工学分野の技術進歩によって, 成体での造血制御機構に加えて今まで観察が困難であった個体発生のプロセスでの詳細についても, 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への応用に将来繋げることが可能となることが期待される。

文 献

- 1) 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: 1433-1441.
- 2) 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: 5073-5084.
- 3) Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003; 130: 4217-4227.
- 4) Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 2004; 432: 625-630.
- 5) Vogeli KM, Jin SW, Martin GR, Stainier DY. A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature* 2006; 443: 337-339.
- 6) Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature* 1995; 373: 432-434.
- 7) D'Souza SL, Elefanti AG, Keller G. SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* 2005; 105: 3862-3870.
- 8) Osada H, Grutz GG, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH. LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. *Leukemia* 1997; 11 Suppl 3: 307-312.
- 9) Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997; 16: 3145-3157.
- 10) Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 1994; 78: 45-57.
- 11) Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SE, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; 349: 257-260.
- 12) Lancrin C, Sroczyńska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009; 457: 892-895.
- 13) Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-330.
- 14) 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: 4075-4080.
- 15) 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: 887-891.
- 16) 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: 5697-5702.
- 17) 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: 645-649.
- 18) 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: 221-226.
- 19) Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 1997; 90: 1799-1806.
- 20) Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*

- 2010; 464: 108-111.
- 21) Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010; 464: 112-115.
- 22) Lam EY, Hall CJ, Crosier PS, Crosier KE, Flores MV. Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells. *Blood* 2010; 116: 909-914.
- 23) Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 2010; 464: 116-120.
- 24) 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: 736-748.
- 25) 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: 1131-1135.
- 26) Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lievre F. Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1641-1646.
- 27) Downs KM, Harmann C. Developmental potency of the murine allantois. *Development* 1997; 124: 276927-80.
- 28) Corbel C, Salaun J, Belo-Diabangouaya P, Dieterlen-Lievre F. Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois. *Dev Biol* 2007; 301: 478-488.
- 29) Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, Dieterlen-Lievre F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 2003; 130: 5437-5444.
- 30) Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 2005; 8: 365-375.
- 31) Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 2005; 8: 377-387.
- 32) Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, Lauw I, Kaimakis P, Jorna R, Vermeulen M, Kayser M, van der Linden R, Imanirad P, Versteegen M, Nawaz-Yousaf H, Papazian N, Steegers E, Cupedo T, Dzierzak E. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 385-395.
- 33) Barbera JP, Rodriguez TA, Greene ND, Weninger WJ, Simeone A, Copp AJ, Beddington RS, Dunwoodie S. Folic acid prevents exencephaly in Cited2 deficient mice. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 283-293.
- 34) Chen Y, Haviernik P, Bunting KD, Yang YC. Cited2 is required for normal hematopoiesis in the murine fetal liver. *Blood* 2007; 110: 2889-2898.
- 35) Kranc KR, Schepers H, Rodrigues NP, Bamforth S, Villadsen E, Ferry H, Bouriez-Jones T, Sigvardsson M, Bhattacharya S, Jacobsen SE, Enver T. Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 659-665.
- 36) Iwasaki H, Arai F, Kubota Y, Dahl M, Suda T. Endothelial protein C receptor-expressing hematopoietic stem cells reside in the perisinusoidal niche in fetal liver. *Blood* 2010; 116: 544-553.
- 37) Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-638.
- 38) Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9448-9453.
- 39) Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 2003; 19: 257-267.
- 40) Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988.
- 41) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425: 841-846.
- 42) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the

- haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841.
- 43) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118: 149-161.
- 44) Grassinger J, Haylock DN, Storan MJ, Haines GO, Williams B, Whitty GA, Vinson AR, Be CL, Li S, Sorensen ES, Tam PP, Denhardt DT, Sheppard D, Choong PF, Nilsson SK. Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* 2009; 114: 49-59.
- 45) Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 685-697.
- 46) Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 2006; 124: 407-421.
- 47) Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452: 442-447.
- 48) Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 2006; 439: 599-603.
- 49) Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 2006; 12: 657-664.
- 50) Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466: 829-834.
- 51) Jeanson NT, Scadden DT. Vitamin D receptor (VDR) deletion leads to increased hematopoietic stem and progenitor cells residing in the spleen. *Blood* 2010.
- 52) Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121: 1109-1121.
- 53) Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004; 10: 64-71.
- 54) Grant WC, Root WS. The relation of O₂ in bone marrow blood to post-hemorrhagic erythropoiesis. *Am J Physiol* 1947; 150: 618-627.
- 55) Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 2010; 222: 17-22.
- 56) Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431: 997-1002.
- 57) Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006; 12: 446-451.

著者プロフィール



横田 明日美 Asumi Yokota

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：2004年3月 大阪大学医学部保健学科検査技術科学専攻卒業

2006年3月 京都大学大学院医学研究科医科学専攻修士課程修了

2009年9月 京都大学大学院医学研究科医学専攻博士課程修了
医学博士

2009年10月～ 現職

専門分野：血液学，腫瘍学

- 主な業績：1. Tanaka R, Squires MS, Kimura S, Yokota A, Nagao R, Yamauchi T, Takeuchi M, Yao H, Reule M, Smyth T, Lyons JF, Thompson NT, Ashihara E, Ottmann OG, Maekawa T. Activity of the multi-targeted kinase inhibitor, AT9283, in imatinib-resistant BCR-ABL positive leukemic cells. *Blood* in press 2010.
2. Takeuchi M, Kimura S, Kuroda J, Ashihara E, Kawatani M, Osada H, Umezawa K, Yasui E, Imoto M, Tsuruo T, Yokota A, Tanaka R, Nagao R, Nakahata T, Fujiyama Y, Maekawa T. Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl(+) leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1211-1220.
3. Yokota A, Kimura S, Tanaka R, Takeuchi M, Yao H, Sakai K, Nagao R, Kuroda J, Kamitsuji Y, Kawata E, Ashihara E, Maekawa T. Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res* 2010; 34: 793-799.
4. Yokota A, Kimura S. Novel Agents to Override Imatinib Resistance Mechanisms. *Drug Development Research* 2008; 69: 398-406.
5. Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui K, Maekawa T: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph+ leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its in vivo activity. *Blood* 2007; 109: 306-314.