

造血幹細胞のホメオスタシスの維持と破綻

Homeostasis of hematopoietic stem cells and its break down

課題番号：26221309

須田 年生 (Suda Toshio)

熊本大学・国際先端医学研究機構・卓越教授



研究の概要

ヒトでは一日に2000億個の赤血球が骨髄で作られ、造血は一生にわたって維持される。その恒常性は、造血幹細胞とそれをとりまく微小環境（ニッチ）によって制御されている。本研究では、「いかにして、造血幹細胞は幹細胞ニッチによって制御され、幹細胞のまま存在するのか」を、主として、骨髄組織の分子論的、代謝学的アプローチにより解析する。本研究により、造血幹細胞は、静止期から細胞周期に入るとき、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が亢進することを見出した。一方、恒常的に酸化的リン酸化が続くと、幹細胞消失につながることから、ミトコンドリア代謝の重要性に注目している。

研究分野：血液学、幹細胞生物学

キーワード：造血幹細胞、ニッチ、細胞代謝、細胞回転

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、多分化能を示すと同時に未分化性を維持することのできる細胞である。造血幹細胞の運命は自律的に決定されるだけでなく、周囲の細胞や分子（ニッチ）によって制御されている。このニッチが幹細胞の機能にどのように関わるかを知ることは、血球産生の恒常性を知る上できわめて重要である。

2. 研究の目的

本研究は、ニッチ分子の同定とそのシグナル解析を行い、造血幹細胞の自己複製と静止状態を制御する系の確立を目指す。

3. 研究の方法

造血幹細胞、及びニッチ細胞に由来する液性因子、接着分子を同定し、それらが幹細胞の維持・分裂に影響を及ぼすかを解析した。また、静止期幹細胞と活性化幹細胞間におけるエネルギー代謝の相違に着目し、**Metabolic Switch**を誘導するメカニズムについて検討する。さらに、加齢に伴う造血幹細胞におけるDNA損傷の蓄積、ニッチ機能の劣化に着目し、造血システムの恒常性が破綻するメカニズムを解析する。方法としては、FACSを用いて幹細胞を分離し、遺伝子発現解析、機能解析、試験管内における幹細胞とニッチの再構成実験、遺伝子破壊マウスの移植実験などを行う。また、*in vivo imaging*、**超微細形態3次元の構造解析法**等を駆使して、ニッチ制御の機構を組織学的に明らかにする。また、一細胞遺伝子発現解析により幹細胞の分裂様式を解析した。

4. これまでの成果

a) 幹細胞ニッチに関する研究

巨核球から産生されるTPO（トロンボポエチン）が、造血幹細胞の静止期性を制御していることから、幹細胞の子孫細胞が幹細胞の恒常性に寄与することを示した。さらに、造血幹細胞から巨核球への分化について集中的に検討し、巨核球にコミットしながらも、自己複製能のある細胞を同定し、幹細胞の多様性を示した。

また、造血幹細胞の骨髄増殖性疾患であるCMLにおいて、CD25陽性細胞から産生されるIL-2、IL-6、IL-13などのサイトカインが、病態を進行させることを明らかにし、CML治療法における新しい可能性を示唆した。

さらに、生体内における造血幹細胞の動態を組織学的に検討した結果、幹細胞はニッチ内で振動（“Oscillation”）していること、幹細胞とニッチの間でミトコンドリアが移送されていることを見出した。

b) 造血幹細胞の代謝

造血幹細胞は骨髄ニッチ中では、Hypoxia Inducible Factor (HIF)1a等の働きにより、TCAサイクルが抑制されることを見出した。さらに、シャペロン分子の一つであるMortalinがDJ-1/Park7と共同して造血幹細胞のMitochondriaにおける酸化的リン酸化を制御することを見出した。また、これら機構の破綻が幹細胞機能の著しい低下を誘導することも確認した。

また、tumor suppressor geneであるFolliculin (FLCN)の欠損は酸化的リン酸化

の過剰な充進を通して、静止期幹細胞を消失させ、造血不全をもたらすことを示した。

さらに、オートファジー関連分子 ATG7 欠損マウスの造血幹細胞ではミトコンドリアの蓄積、並びに、幹細胞機能の低下を認めた。

一方で、骨髄抑制モデルにおいては、細胞回転とミトコンドリア量・活性の関係を検討した結果、造血幹細胞が増加し始める直前に、幹細胞は既にミトコンドリアリッチになることを見出した。

c) 造血幹細胞における DNA 損傷反応

Cyclic di-GMP/STING や Interferon が造血幹細胞の増殖を抑制することを見出し、ウイルス感染等での造血抑制機構において重要な知見を示した。

また、p53 関連アポトーシス促進因子である ASPP1 の欠損は、造血幹細胞のストレス耐性、静止期維持、移植生着率をそれぞれ向上させることを示した。一方で、ASPP1 欠損は DNA 損傷 Foci の消失が遅延すると共に、白血病発症のポテンシャルが劇的に上昇することも見出した。ASPP1 欠損造血幹細胞は、ストレス抵抗性の前白血病クローンになりうる可能性を示した。

さらに、テロメア末端の保護を司るシェルタリン複合体の構成分子の一つである Protection of Telomere (Pot1) の発現強度と幹細胞機能が相関すること、Pot1 が ATR-p53 のシグナルや ROS の上昇に寄与する可能性を見出した。

d) 幹細胞分裂様式 および自己複製に対するニッチ制御

一細胞遺伝子発現解析より、HSC および前駆細胞の遺伝子群の「プロファイル」を決め、幹細胞の分裂様式を数理生物学的に解析した。これらの結果を基にさらに、Tie2 陽性造血幹細胞は、生体内でも自己複製分裂を示す頻度が高いことを示し、これらの自己複製幹細胞は、一部 Autophagy 機構によって維持されていることを明らかにした。

5. 今後の計画

造血幹細胞の分裂の前に、ミトコンドリア機能が增加することが分かったので、これを指標として、造血幹細胞の ex vivo 維持に再度挑戦する。

6. これまでの発表論文等

1) 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* 512: 319-323, 2014

2) Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T: The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* 15: 4656-4666, 2014

3) Sakamoto H, Takeda N, Arai F, Hosokawa K, Garcia P, Suda T, Frampton J, Ogawa M: Determining C-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes. *Stem Cells* 33(2):

478-490, 2015

4) Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, Takubo K. Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. *Cell Rep.* 11(1):71-84, 2015

5) Nagamatsu G, Saito S, Takubo K, Suda T. Integrative Analysis of the Acquisition of Pluripotency in PGCs reveals the mutually exclusive roles of Blimp-1 and AKT signaling. *Stem Cell Reports* S2213-6711(15)00150-2, 2015

6) Yamashita M, Nitta E, Suda T. Aspp1 Preserves hematopoietic stem cell pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell.* 17(1):23-34, 2015

7) Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue, Suda T: CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in bone marrow. *J Exp Med*, 212: 2133-2146, 2015

8) Yamashita M, Nitta E, Suda T: Regulation of hematopoietic stem cell integrity through p53 and its related factors. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1370: 45-54, 2016

9) Baba M, Toyama H, Sun L Takubo K³ Suh HC, Hasumi H, Nakamura-Ishizu A, Hasumi Y, Klarmann KD, Nakagata N, Schmidt LS Linehan WM, Suda T, Keller JR.

Loss of Folliculin disrupts hematopoietic stem cell quiescence and homeostasis resulting in bone marrow failure. *Stem Cells* 34:1068-1082, 2016

10) Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, Takubo K. p38 α activates purine metabolism to initiate hematopoietic stem/progenitor cell cycling in response to stress. *Cell Stem Cell.* 19:192-204, 2016

11) Ito K, Turcotte R, Cui J, Zimmerman SE, Pinho S, Mizoguchi T, Arai F, Runnels JM, Alt C, Teruya-Feldstein J, Mar JC, Singh R, Inkel T, Suda T, Lin CP, Frenette PS, Ito K: Self renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science*, 354(6316):1156-1160, 2016