

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成22年3月31日現在

研究課題名（和文） 造血幹細胞ニッチと細胞分裂制御
研究課題名（英文） Regulation of Hematopoietic Stem Cell Division
in a Niche

研究代表者

須田 年生 (SUDA TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・教授



研究の概要：

幹細胞の静止期性(G0)は、造血幹細胞を維持する上で重要である。我々は、骨髄の内骨膜領域にある造血幹細胞が、Tie2/Angiopoietin-1 や Mpl/Thrombopoietin のシグナルを通じて骨芽細胞に接着し、静止期性を維持することを見出した。また、ストレス下では、活性酸素種 (ROS) は上昇し、幹細胞がニッチから離れる。p38MAPK や INK4A の増加は、幹細胞の消耗・老化を引き起こす。幹細胞は低酸素状態で、分裂・増殖が抑えられていて、解糖系優位という代謝学的特徴を有する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、ニッチ、骨芽細胞、自己複製能、Tie2 / Angiopoietin-1、活性酸素、Mpl / Thrombopoietin

1. 研究開始当初の背景

各組織の恒常性を長期にわたり維持するためには、幹細胞周囲の特殊な微小環境「ニッチ」との相互作用が重要である。我々は、細胞周期の静止した (G0 期の) 静止期造血幹細胞を同定し、この細胞が内骨膜領域に接着して存在することを示し、骨芽細胞との接着、サイトカインシグナル制御により、静止状態と自己複製のバランスを維持していることを明らかにした。

再生医学への期待が高まるなかで、幹細胞研究は注目されており、幹細胞の未分化性はいかに維持されているのか、幹細胞を取りまくニッチはいかにそれを制御しているのかを明らかにする必要があるが、造血幹細胞は他の組織幹細胞に比べ、幹細胞ニッチと細胞周期など、細胞生物学的アプローチの困難さにより未開拓のまま残されてきた。造血幹細胞ニッチの発見により、幹細胞の自己複製と分化の不均等分裂をニッチとの相互作用の観点から議論できるようになった。

2. 研究の目的

幹細胞を「高い増殖能を有しながら分裂を止めている状態の細胞」と定義することにより、造血幹細胞の環境(ニッチ)分子を明らかにすると同時に、幹細胞の細胞周期制御機構を解析するとともに、不均等分裂の機構を解明し、幹細胞の動態を明らかにし、定常的に細胞が更新する造血において、幹細胞はどのように維持され、動員されるのか、いわゆる「幹細胞

の使い方」を理解する。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞ニッチの分子基盤解明：

① 静止期造血幹細胞特異的に発現する分子を同定し、幹細胞の静止期制御におけるニッチシグナルの機能を明らかにする。

② 骨髄内の内骨膜領域の造血ニッチ細胞を同定し、造血幹細胞維持における機能を明らかにする。

(2) 細胞周期・分裂に関する研究

① 幹細胞の分裂の可視化

一個の造血幹細胞が2個の娘細胞に分かれた際の、静止期幹細胞特異的分子の発現を検討し、造血幹細胞の不均等分裂の解析系を構築する。

② 幹細胞の細胞周期制御

骨芽細胞性ニッチで機能するサイトカインシグナルによる造血幹細胞の静止期 (G0) 維持機構について解析する。

③ 活性酸素制御、低酸素ニッチの解析

造血幹細胞の自己複製能、静止状態の維持、幹細胞とニッチの接着制御における活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の機能を解析し、造血幹細胞維持における低酸素性ニッチの機能を明らかにする。

4. 研究の主な成果

(1) 幹細胞ニッチの分子基盤解析

① 静止期造血幹細胞マーカーの同定
静止期幹細胞 (LSK-side-population (SP))

と活性化造血幹細胞 (LSK-non-SP) を用いたマイクロアレイ解析により、静止期造血幹細胞幹細胞に Tie2、Mpl、N-cadherin などが高発現していることを見いだした。また、Tie2 結合因子 Angiopoietin-1 (Ang-1)、Mpl 結合因子 Thrombopoietin (THPO) が骨芽細胞から産生されることを見いだした。さらに、長期骨髄再構築能をもつ造血幹細胞の中でも Mpl⁺ 分画で cyclin dependent kinase inhibitor の 1 つである p57^{Kip2} が特異的な発現を示すことを見いだした。現在、造血幹細胞の静止状態の制御における p57^{Kip2} の機能について解析を進めている。

② 幹細胞ニッチ細胞の同定と機能解析

マウス骨髄の内骨膜領域から分離した細胞は間葉系前駆細胞、骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞に分かれ、それぞれの分画についての遺伝子発現解析の結果、サイトカインの発現は間葉系前駆細胞分画で高く、接着分子は成熟骨芽細胞に高発現していることを見いだした。この結果から、骨芽細胞性ニッチでは、特定のニッチ細胞が機能するのではなく、複数の細胞が複合体を構成し、造血幹細胞制御に関わっていることを見いだした。

(2) 細胞周期・分裂に関する研究

① 幹細胞の分裂の可視化

LSK-CD34-造血幹細胞を培養し、1 個の幹細胞から分裂した 2 個の娘細胞について、Numb と Tie2 の発現を免疫染色で検討したところ、Numb と Tie2 が 2 個の娘細胞で不均等に分配されることがわかった。

② 幹細胞の細胞周期制

Tie2/Ang-1 や Mpl/THPO シグナルは細胞接着の亢進、c-Myc や細胞周期制御因子の発現を制御により、定常状態での造血幹細胞の静止期維持に重要な働きをしていることがわかった。また、Mpl 中和抗体投与による Mpl/THPO のシグナルの抑制により、幹細胞と骨芽細胞ニッチの相互作用が阻害され、放射線照射によらない幹細胞移植が成立した。

③ 活性酸素制御

細胞周期制御因子 Ataxia Teleangiectasia Mutated (ATM)、および代謝・寿命・老化の制御に関わる Forkhead 転写因子 Foxo3a の遺伝子欠損マウスの解析、連続骨髄移植の解析から、酸化ストレスにより p38MAPK の造血幹細胞特異的に活性化され、幹細胞機能が消失すること、これらの異常は、抗酸化剤投与によって回復させることができることを示した。さらに、ROS が造血幹細胞の N-cadherin の発現を抑制し、細胞接着を阻害することでニッチから離脱し、細胞周期が活性化されることを明らかにした。

④ 低酸素性ニッチに存在する幹細胞の代謝的特性について、酸化的リン酸化ではなく、解糖系によりエネルギーを得ていること、その代謝調節に低酸素応答分子である HIF-1 α が関与していることを明らかにしていた。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究では造血幹細胞と骨芽細胞性ニッチ

の相互作用による造血幹細胞の細胞周期の静止状態と自己複製のバランスを維持することが長期的な幹細胞の維持に必須であることを証明した研究として評価された。現在、ニッチによる幹細胞の静止期維持の重要性は正常幹細胞のみならず、白血病幹細胞においても適用されるに至っている。我々の研究はニッチ操作をターゲットとした新しい新規治療法の可能性を提唱する物と考えられる。

また、我々は世界に先駆けて、造血幹細胞機能における ROS の関与を明らかにすることが出来た。幹細胞老化は、早老を示す ATM や FOXO3a 変異マウスなどにおいて確認され、ヒトの骨髄機能不全を説明する機構として注目されている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重線、連携研究者は点線)

(1) Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T: Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev*, 22: 986-91, 2008

(2) Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T: Thrombopoietin/Mpl signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, 1:685-97, 2007.

(3) Miyamoto K, Araki K, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A: Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1: 101-12, 2007.

(4) Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Nakagata N, Ikeda Y, Tak W, Mak, Suda T: Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431: 997-1002, 2004.

(5) 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*, 118: 149-161, 2004.

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/index.html>