

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18999

研究課題名(和文) Nrf2誘導剤による造血幹細胞の活性化とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of hematopoietic stem cell activation induced by Nrf2 inducers

研究代表者

村上 昌平 (MURAKAMI, Shohei)

東北大学・加齢医学研究所・産学官連携研究員

研究者番号：20746911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレス応答的に活性化する転写因子Nrf2の一時的な活性化が造血幹細胞を増加させるかどうかを検討した。Nrf2誘導剤であるCDDO-Imをマウスに投与し、造血幹細胞を調べると、Nrf2の活性化は造血幹細胞の増殖を促進させることが分かった。しかし、骨髄移植実験の結果から、この増加した造血幹細胞は分化し易く、幹細胞機能を維持していないと考えられた。一方、Nrf2が活性化した造血幹細胞は、トロンボポエチン(TPO)存在下で培養すると、巨核球様細胞に分化し易いことが分かった。ゆえに、Nrf2活性化はTPOへの感受性を亢進させることで、造血幹細胞の増殖・分化を誘導していると推察される。

研究成果の概要(英文)：To examine whether a stress-responsive transcription factor, Nrf2, contributes to proliferation of hematopoietic stem cells (HSCs) by its transient activation, we treated mice with an Nrf2 inducer, CDDO-Im, and investigated the effects of transient Nrf2 activation on HSCs. Nrf2 activation induced by CDDO-Im treatment promoted HSC proliferation, but bone marrow transplantation experiment revealed that the proliferative HSCs due to the Nrf2 activation easily undergo differentiation and hardly maintain their stem activity. It turned out that under the culture condition with thrombopoietin (TPO), Nrf2 activation enhanced HSC differentiation into megakaryocyte-like cells. Therefore, Nrf2 activation likely induces proliferation/differentiation of HSCs through enhancing the sensitivity to TPO signaling.

研究分野：医化学

キーワード：Keap1-Nrf2制御系 造血幹細胞 増殖・分化

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は、通常状態において静止期に維持されており¹、この維持には様々な転写因子が寄与している。一方、骨髄移植や慢性炎症などのストレス曝露下においては、造血幹細胞は活性化され、増殖・分化を促進するが^{2,3}、その分子機構については多くの不明な点が残されている。

Keap1-Nrf2 制御系はストレス応答的に細胞防御に貢献する分子機構である⁴。転写因子 Nrf2 は、通常状態では Keap1 依存的に分解されているが、ストレス曝露下では Keap1 が失活することにより、Nrf2 は活性化する。近年、Nrf2 は細胞増殖・分化制御にも貢献していることが明らかにされつつあり⁵、これまでに申請者は、Keap1 欠損マウスを用いた実験によって、恒常的な Nrf2 の活性化が造血幹細胞の増殖・分化を促進し、末梢血中への動員を惹起することを見出した。その一方で、Keap1 欠損による恒常的な Nrf2 の活性化は造血幹細胞の幹細胞性を消失させてしまうことも分かっており、これは、Nrf2 の『恒常的な』活性化は造血幹細胞の増殖・分化および末梢血中への動員を促進し続けるためであると考えられた。

以上の背景から、Nrf2 の活性化は『一時的』であれば、一過性に造血幹細胞の増殖および末梢血への動員を誘導するものの、その後の静止期への復帰および骨髄への帰還を阻害しないと予想される。したがって、『一時的な』Nrf2 の活性化は、機能的な造血幹細胞を増加させると期待された(目的1)。

一方、造血幹細胞は、炎症状態では免疫担当細胞から放出される炎症性サイトカインの刺激により、増殖・分化が促進され、末梢血中へ動員されることが知られている。これまでに、Keap1-Nrf2 制御系は炎症性シグナルにも応答し、Nrf2 を活性化させることが報告されている⁶。そこで、Keap1-Nrf2 制御系は造血幹細胞において、炎症性シグナルを感知し、炎症状態における造血幹細胞の活性化に寄与している可能性があると考えられた(目的2)。

2. 研究の目的

(1) Nrf2 誘導剤による一時的な Nrf2 活性化が造血幹細胞の増殖および末梢血中へ動員を誘導するかどうかを検討する。また、Nrf2 誘導剤投与によって、増加あるいは末梢血中に動員された造血幹細胞が正常な幹細胞機能を維持しているかどうかを調べる。そして、これら Nrf2 活性化による造血幹細胞の性質変化に寄与する分子機構を検討する。

(2) 炎症刺激による造血幹細胞の活性化に Nrf2 活性化が寄与しているかどうかを明らかにするために、炎症性サイトカイン刺激後の造血幹細胞の活性化に Nrf2 活性化が必要であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) Nrf2 誘導剤 CDDO-Im を野生型マウスに投与し、長期造血幹細胞の細胞数および細胞周期への影響を調べた。ここで観察された造血幹細胞の変化が Nrf2 活性化に依存していることを検討するため、Nrf2 欠損マウスに CDDO-Im を投与し、同様に解析を行い、野生型マウスで観察された変化が Nrf2 欠失によって消失するかどうかを検討した。

また、CDDO-Im を投与した野生型マウスの骨髄から全骨髄細胞を採取して、致死量の放射線を照射したレシピエントマウスへ骨髄移植(競合的骨髄移植実験)を行った。移植後、4週毎にレシピエントマウスの末梢血におけるドナー由来細胞の割合を調べた。これによって、『一時的な』Nrf2 活性化が造血幹細胞の機能を阻害しないかどうかを検討した。

Nrf2 活性化による造血幹細胞の性質変化を詳しく検討するために、造血幹細胞を幹細胞因子(SCF)とトロンボポエチン(TPO)の存在下で培養し、造血幹細胞の維持能や分化能について検討した。さらに、*in vivo*にて、Nrf2 活性化によって、造血幹細胞に分化の偏りが生じていないかどうかを検討した。

(2) polyinosinic-polycytidylic acid (plpC) は interferon などの炎症性サイトカインの分泌を誘導し、造血幹細胞の活性化を誘導することが知られている。そこで、plpC を野生型および Nrf2 欠損マウスに投与し、Nrf2 依存的な造血幹細胞の活性化が観察されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) CDDO-Im 投与によって、造血幹細胞において Nrf2 が安定化するかどうかを検討した。野生型マウスに CDDO-Im を投与し、造血幹細胞・前駆細胞を多く含む Lin⁻細胞を解析すると、Nrf2 タンパク質が安定化していることが確認できた。また、申請者がこれまでに作製した Nrf2 活性化レポーターマウス(Nrf2 活性化が tdTomato 蛍光強度の増強として観察されるマウス)⁷を用いて、長期造血幹細胞(Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD48⁻CD150⁺)において Nrf2 が活性化しているかどうかを検討すると、CDDO-Im 投与によって、長期造血幹細胞の tdTomato 蛍光強度が増強することがわかった。したがって、長期造血幹細胞では、CDDO-Im 投与によって Nrf2 が活性化することが確認できた。

次に、CDDO-Im を投与して、骨髄細胞の細胞数を検討した。その結果、CDDO-Im 投与によって、長期造血幹細胞が増加するが分かった(図1左)。さらに細胞周期を調べると、CDDO-Im 投与によって、長期造血幹細胞の細胞周期エントリーが促進される(G0期細胞が減少する)ことが分かった(図1右)。そして、この現象は Nrf2 欠損マウスでは観察されないことから、Nrf2 依存的であることが示された。

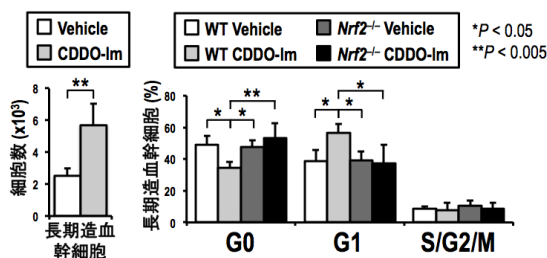


図1. CDDO-Im投与による造血幹細胞への影響

以上から、CDDO-Im 投与による一時的な Nrf2 活性化は、造血幹細胞の増殖を促進し、細胞数を増加させることが分かった。

Vehicle および CDDO-Im を投与したマウスから全骨髓細胞を採取し、致死量の放射線を照射したマウスへ競合的に骨髓移植を行った。移植後、4 週間毎にレシピエントマウスの末梢血細胞におけるドナー由来の細胞の割合を調べると、CDDO-Im 投与群では、移植前に造血幹細胞が増加していたにも関わらず、移植後の骨髓再建能は Vehicle 投与群と同程度であることが分かった (図2)。

ゆえに、『一時的な』Nrf2 活性化で増加した造血幹細胞は、正常な造血幹細胞と競合的に移植した場合には生着することが出来ず、ほとんどが分化してしまうと推察された。その一方で、『一時的な』Nrf2 活性化では、『恒常的な』Nrf2 活性化で観察されるような造血幹細胞の機能障害は生じないと考えられた。

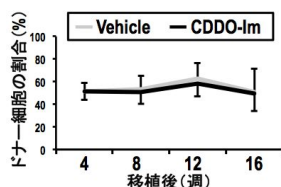


図2. 競合的移植実験

Nrf2 活性化による造血幹細胞の性質変化を詳細に検討するために、造血幹細胞を SCF および TPO 存在下で培養した。その結果、Nrf2 が活性化している造血幹細胞は、CD41 陽性で、細胞サイズの大きい巨核球様細胞に分化し易いことが分かった。TPO は巨核球分化誘導因子であることから、Nrf2 活性化は TPO シグナルに対する感受性を亢進させることで、造血幹細胞の巨核球への分化を促進させるものと推察された。

一方、これまでの報告から、造血幹細胞は単一の細胞集団ではなく、単球・顆粒球やリンパ球、あるいは、血小板へ分化方向が偏った造血幹細胞が存在することが知られている^{8,9}。そこで、最後に Nrf2 が活性化した造血幹細胞に分化方向の偏りがあるかどうかについて検討した。

これまで、巨核球・血小板へ偏った造血幹細胞特異的に発現している表面マーカーが特定されていないことから、ここでは、これまでに報告がある CD41 の発現を調べた¹⁰。その結果、Nrf2 が活性化した造血幹細胞では、CD41 陽性の造血幹細胞が増加していること

が分かった。CD41 は骨髓球系に分化が偏った造血幹細胞に発現していることが知られているが¹⁰、巨核球にも発現する表面マーカーである。したがって、今後、Nrf2 活性化によって増加した CD41 陽性の造血幹細胞は巨核球に分化しやすいかどうかを検討する必要がある。

(2) 野生型および Nrf2 欠損マウスに plpC を投与し、造血幹細胞の細胞周期について検討したところ、野生型および Nrf2 欠損マウスの両者において、静止期に維持された細胞が減少することが分かった。したがって、野生型マウスで観察された造血幹細胞の細胞増殖促進は、Nrf2 欠損でも観察されたことから、少なくとも plpC 投与による炎症様刺激に対する造血幹細胞の増殖・分化誘導には、Nrf2 は寄与していないと考えられた。

以上の結果から、Nrf2 活性化は TPO に対する応答性を亢進させることで、造血幹細胞の増殖・分化あるいは末梢血への遊走を促進していると推察される。その一方で、Nrf2 は interferon などの炎症刺激による造血幹細胞の活性化には寄与していないと推察された。今後、造血幹細胞の活性化剤として、Nrf2 誘導剤の臨床応用を目指す上で、Nrf2 下流で TPO シグナルに寄与する分子機構について検討し、造血幹細胞の増殖・分化誘導と幹細胞性消失のそれぞれに寄与している分子機構を明らかにすることが重要であると考えられる。

<引用文献>

- Wilson A., et al. "Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair" *Cell*, Vol.135, 2008, pp.1118-1129.
- Baldrige M.T., et al. "Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- in response to chronic inflammation" *Nature*, Vol.465, 2010, pp.793-797.
- Essers M.A., et al. "IFN activates dormant haematopoietic stem cells *in vivo*" *Nature*, Vol.458, 2009, pp.904-908.
- Motohashi H. and Yamamoto M. "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism" *Trends Mol. Med.* Vol.10, 2004, pp.549-557.
- Murakami S. and Motohashi H. "Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation" *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.88, 2015, pp.168-178.
- Kansanen E., et al. "Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin

J2.” *Free Radic. Biol. Med.* Vol.47, 2009, pp.1310-1317.
Murakami S., et al. “Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells” *Genes Cells*, Vol.19, 2014, pp.238-253.
Challen G.A., et al. “Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- 1” *Cell Stem Cell*, Vol.6, 2010, pp.265-278.
Sanjuan-Pla A., et al. “Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy” *Nature*, Vol.502, 2013, pp.232-236.
Gekas C. and Graf T. “CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age” *Blood*, Vol.121, 2013, pp.4463-4472.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

村上昌平、本橋ほづみ。「血液・免疫細胞および白血病細胞における KEAP1-NRF2 制御系の役割」、臨床血液(日本血液学会学会誌) 査読有、Vol.57、No.10、2016、pp.1860-1868。

DOI:10.11406/rinketsu.57.1860

Murakami S., Motohashi H. “Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation” *Free Radic. Biol. Med.* 査読有, Vol.88, 2015, pp.168-178.

DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030

Honkura Y., Matsuo H., Murakami S., Sakiyama M., Mizutani K., Shiotani A., et al. “NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea” *Sci. Rep.* 査読有, Vol.6, No.6, 2016, 19329.

DOI:10.1038/srep19329

[学会発表](計6件)

村上昌平、山本雅之、本橋ほづみ。“KEAP1-NRF2 system contributes to hematopoietic stem cell senescence”、*Frontiers in aging research toward healthy longevity* ~健康長寿をめざした老化研究の最前線~、査読無、ポスター、丸の内 MY PLAZA ホール(東京) 2016年11月17日。

村上昌平、山本雅之、本橋ほづみ。「造血

幹細胞における KEAP1-NRF2 制御系の機能解析」、第89回日本生化学会、査読有、ポスター、仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(仙台) 2016年9月25-27日。

村上昌平。「Keap1-Nrf2 制御系による造血幹細胞の増殖・老化制御」、*新学術領域研究 酸素生物学&ダイニングコード 合同若手会議*、査読無、口頭、一宮シーサイドオーツカ(一宮) 2016年1月26-28日。

Murakami S., Yamamoto M., Motohashi H. “A stress-responsive transcriptional factor NRF2 activates hematopoietic stem cells” *57th ASH Annual Meeting and Exposition*, 査読有, Poster, Orange Country Convention Center, Orlando (FL, USA), December 5-8, 2015.

Murakami S., Yamamoto M., Motohashi H. “A stress-responsive transcriptional factor NRF2 activates hematopoietic stem cells” *44th Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology*, 査読有, Poster, Kyoto International Conference Center (Kyoto, JAPAN), September 17-19, 2015.

村上昌平、山本雅之、本橋ほづみ。「Keap1-Nrf2 制御系の造血幹細胞における役割の解明」、*日本生化学会東北支部第81回例会・シンポジウム*、査読有、口頭、東北大学片平さくらホール(仙台) 2015年5月9日。

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 昌平 (MURAKAMI Shohei)
東北大学・加齢医学研究所・遺伝子発現制御
産学官連携研究員
研究者番号：20746911

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

鈴木 琢磨 (SUZUKI Takuma)
東北大学大学院・医学系研究科・血液・免疫
病学分野・大学院生 (博士過程)